



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

ROZPRAWA DOKTORSKA

**OTRZYMYWANIE I BADANIE NOWYCH UKŁADÓW
BIOKOMPOZYTOWYCH DO STOMATOLOGII JAKO
UZUPEŁNIENIA STRUKTUR TKANKOWYCH W
MEDYCYNIE SPERSONALIZOWANEJ NA BAZIE
RESORBOWALNYCH POLIMERÓW.**

lek. dent. ANNA HAN

Promotor: Prof. dr hab. Rafał J. Wigłusz

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Maciej Dobrzyński,
profesor uczelni

Wrocław 2022



Praca doktorska powstała w ramach programu doktorat wdrożeniowy,
edycja I, (7/DW/2017/01/1).

Realizowana w Centrum Badawczo-Rozwojowym NOVASOME
i Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej
Akademii Nauk

pod opieką prof. dr hab. Rafała J. Wiglusza
oraz dr hab. n. med. Macieja Dobrzyńskiego, prof. uczelni.

Składam serdeczne podziękowania swojemu promotorowi
Panu Prof. dr. hab. Rafałowi J. Wigłuszowi
za okazaną mi pomoc, inspiracje i wkład włożony w powstanie pracy doktorskiej.

Pragnę serdecznie podziękować promotorowi pomocniczemu
Panu dr. hab. Maciejowi Dobrzyńskiemu, prof. uczelni
za zaangażowanie, życzliwość, których doświadczyłam w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Serdecznie dziękuję Panu dr. Tomaszowi Gębarowskiemu
za inspirujące dyskusje, wsparcie w opracowaniu metod laboratoryjnych, dobre rady i wiarę
w powodzenie wykonywanych przeze mnie badań.

Chciałabym również serdecznie podziękować
Pani dr Elżbiecie Gębarowskiej za pomoc w wykonaniu badań mikrobiologicznych.

Dziękuję Pracownikom Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej
Akademii Nauk za pomoc w wykonywaniu pomiarów.

Dziękuję Kolegom i Koleżankom z Centrum Badawczo-Rozwojowego Novasome.

Wyrazy wdzięczności składam również Pani dr Marii Szymonowicz,
Panu dr. Bartoszowi Mielanowi, Panu dr. Lucjanowi B. Jerzykiewiczowi
Pani mgr Magdalenie Pajączkowskiej, Pani dr Benicie Wiatrak,
Pani dr Agnieszce Rusak oraz Pani dr hab. Małgorzacie Semsel-Czekale, prof. instytutu
za wszelką pomoc w powstaniu pracy doktorskiej.

Dziękuję również Zarządowi firmy Novasome za możliwość wzięcia udziału w programie
Doktorat Wrożeńowy

Szczególne podziękowania kieruję do mojego Męża oraz Rodziców za nieocenioną pomoc w łączeniu życia naukowego i rodzinnego oraz za wiarę w moje możliwości i nieustające wsparcie.

Mężowi za cierpliwość i pomoc, szczególnie w chwilach zwątpienia.

Rodzicom i siostrze chciałam serdecznie podziękować za ich ogromne wsparcie na całej mojej drodze edukacji.

Niniejszą pracę dedykuję moim córkom Neli i Elenie

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	5
1.1 UBYTKI KOSTNE W OBRĘBIE TWARZOCZASZKI I METODY ICH REGENERACJI	5
1.2. WYMAGANIA STAWIANE SUBSTYTUTOM KOŚCI	8
1.3 CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH MATERIAŁÓW DO PRODUKCJI BIODOPROZOSTÓW HYBRYDOWYCH	12
1.3.1. POLIMERY STOSOWANE W STOMATOLOGII.....	12
1.3.2. RODZAJE RESORBOWALNYCH POLIMERÓW	13
1.3.3. POLIMERY NATURALNE	14
1.3.4. POLIMERY SYNTETYCZNE.....	15
1.3.5. RESORBOWALNE MEMBRANY	18
1.3.6. MEMBRANY KOLAGENOWE	18
1.3.7. MEMBRANY SYNTETYCZNE.....	19
1.4. NANOHYDROKSYAPATYT I JEGO WŁAŚCIWOŚCI.....	20
1.5 KOMÓRKI MACIERZYSTE.....	21
POZYSKIWANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ.....	22
1.6 TKANKA KOSTNA.....	23
1.6.1 MECHANIZM POWSTAWANIA KOŚCI.....	24
1.6.2 PROCES GOJENIA KOŚCI.....	26
FAZA ZAPALNA.....	26
FAZA PROLIFERACJI.....	26
FAZA REMODELINGU	26
1.6.3 ZANIK WYROSTKA ZĘBODOŁOWEGO	27
1.6.4 STEROWANA REGENERACJA KOSCI (GBR)	28

1.7 DOSTARCZANIE LEKÓW	29
2. CEL PRACY	37
3. MATERIAŁ I METODY	38
3.1 MATERIAŁY	38
3.1.1 PODSTAWOWE SUROWCE DO WYTWORZENIA KOMPOZYTÓW.....	38
ODCZYNNIKI DO BADAŃ BIOLOGICZNYCH:.....	39
MATERIAŁY WYKORZYSTANE W PROCESIE WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW ..	41
3.2. METODOLOGIA	45
3.2.1. SYNTEZA HYDROKSYAPATYTÓW	45
3.2.2. OTRZYMYWANIE KOMPOZYTÓW NA BAZIE POLIMERU I HYDROKSYAPATYTU.....	46
OTRZYMYWANIE MONOLITÓW.....	46
3.2.3. WYTWARZANIE TABLETEK Z OPRACOWANYCH KOMPOZYTÓW	47
3.2.4 BADANIA STRUKTURALNE.....	48
DYFRAKCJA RENTGENOWSKA (XRD).....	48
RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA	49
MIKROSKOPIA RAMANOWSKA.....	49
SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI.....	50
WIDMA FT-IR	50
SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA	50
3.2.5. WYTWARZANIE FILAMENTU Z BIOKOMPOZYTU	51
EKSTRUZJA TOPLIWA	51
PROJEKTOWANIE Z POMOCĄ PRGRAMU CAD.....	53
3.2.6 WYTWARZANIE KOMPOZYTOWYCH SUBSTYTUTÓW KOŚCI ZA POMOCĄ DRUKU 3D.....	55
3.2.7. WYTWORZENIE PROTOTYPÓW W DRUKU 3D Z FILAMENTU MODYFIKOWANEGO CZĄSTECZKĄ LEKU.....	58
BADANIA BIOLOGICZNE.....	59

3.2.8. PODATNOŚĆ MATERIAŁÓW NA ADHEZJĘ MIKROORGANIZMÓW	59
3.2.9. HODOWLA KOMÓRKOWA	59
PRZYGOTOWANIE MEDIUM HODOWLANEGO	60
3.2.10. IZOLACJA I HODOWLA KOMÓREK Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ.....	61
3.2.11 OCENA EKSPRESJI WYBRANYCH ANTYGENÓW POWIERZCHNIOWYCH	63
3.2.12. RÓŻNICOWANIE KOMÓREK MSC W OSTEOLASTY	63
PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO TESTÓW PROLIFERACYJNYCH.....	64
OCENA ŻYWOTNOŚCI I LICZEBNOŚCI	64
3.2.13. OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI (TEST MTT)	65
KOHODOWLA KOMÓREK Z BADANYMI MATERIAŁAMI	66
3.2.14. OCENA ŻYWOTNOŚCI I WZROSTU KOMÓREK NA BADANYCH MATERIAŁACH.....	67
OCENA WZROSTU KOMÓREK NA BADANYCH BIOMATERIAŁACH	68
3.2.15. BADANIE UWALNIANIA LEKÓW Z RUSZTOWAŃ.....	69
WARUNKI BADANIA UWALNIANIA <i>IN VITRO</i>	69
PARAMETRY METODY OZNACZENIA ILOŚCIOWEGO UWOLNIONEGO MELOKSYKAMU.	70
4 WYNIKI.....	72
4.1.1. SYNTEZA HYDROKSYAPATYTÓW	72
4.1.2. OPRACOWANO SPOSÓB WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW NA BAZIE POLIMERU I HYDROKSYAPATYTU.	72
4.1.3 WYTWORZENIE KRĄŻKÓW Z OTRZYMANYCH KOMPOZYTÓW	73
4.2. BADANIA STRUKTURALNE.....	74
4.2.1. DYFRAKTOMETRIA PROSZKOWA XRPD (ANG. X-RAY POWDER DIFFRACTION)	74
4.2.2. RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA	78
4.2.3 SKANINGOWA KALORYMETRIA RÓŻNICOWA DSC	79

4.2.4. MIKROSKOPIA RAMANOWSKA.....	80
4.2.5. SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI.....	80
4.2.6. SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA.....	85
4.2.7 WYTWARZANIE FILAMENTU DO DRUKU 3D	90
4.2.8. OPRACOWANIE PROJEKTÓW GRAFICZNYCH PRZESTRZENNYCH I POROWATYCH SUBSTYTUTÓW KOŚCI W TECHNOLOGII CAD.....	91
4.2.9 WYTWORZENIE PRZESTRZENNYCH PROTOTYPÓW SUBSTYTUTÓW KOŚCI METODĄ DRUKU 3D O RÓŻNEJ ARCHITEKTURZE WEWNĘTRZNEJ.....	92
4.2.10. WYTWORZENIE KOLEJNYCH PROTOTYPÓW W DRUKU 3D Z FILAMENTU MODYFIKOWANEGO CZĄSTECZKĄ LEKU.....	94
4.2.11. PODATNOŚĆ MATERIAŁÓW NA ADHEZJĘ MIKROORGANIZMÓW	95
4.2.12. IZOLACJA KOMÓREK Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ.....	99
4.2.13 OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI <i>IN VITRO</i>	102
4.2.14. OCENA WZROSTU KOMÓREK NA BADANYCH BIOMATERIAŁACH	108
WZROST KOMÓREK NA WYDRUKACH 3D	116
4.2.15 AKTYWNOŚĆ PRZECIWPALNA NA MODELU LINII KOMÓRKOWEJ THP1	119
4.2.16. WPŁYW NA RÓŻNICOWANIE KOMÓREK IZOLOWANYCH Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ W KIERUNKU OSTEOLASTÓW	121
4.2.16. UWALNIANIE LEKU	122
5 DYSKUSJA	125
6. WNIOSKI.....	135
7. PRZYPISY	137
8. SKRÓTY.....	153
INDEKS SKRÓTÓW I OZNACZEŃ STOSOWANYCH W PRACY.....	153
STRESZCZENIE	155
ABSTRACT	157
SUPLEMENT	159

1. WSTĘP

1.1 UBYTKI KOSTNE W OBRĘBIE TWARZOCZASZKI I METODY ICH REGENERACJI

Kość jest drugą najczęściej przeszczepianą tkanką. Zabiegi te są wykonywane m.in. w chirurgii stomatologicznej, w ortopedii, w chirurgii plastycznej oraz w chirurgii szczękowo-twarzowej. Szacuje się, że na całym świecie w samych procedurach ortopedycznych wszczepianych jest około 2,2 miliona przeszczepów kostnych rocznie (Polo-Corrales i wsp., 2014), a w samej Europie jest ich ponad milion. Mimo, że tkanka kostna ma duże zdolności samoregeneracji, to niestety, gdy dochodzi do znacznej utraty objętości struktury kostnej (np. po przebytych złamaniach, resekcjach, wrodzonych wadach anatomicznych, jak również rozległych zanikach wyrostka żębodołowego szczęki i żuchwy spowodowanych brakami zębowymi, torbielami czy chorobami przyzębia), w takich wypadkach brakujący fragment nie zostanie zregenerowany przez organizm. Niezbędna jest wówczas konieczność augmentacji kości. Niestety, obecne metody leczenia ubytków kostnych nie do końca spełniają potrzeby pacjentów (Babak i wsp., 2020; Bao i wsp., 2013). Regeneracja tkanki kostnej nadal stanowi ogromne wyzwanie. Szczególnie gdy weźmiemy pod uwagę starzenie się populacji i zwiększającą się długość życia. Dlatego inżynieria tkanek stwarza nowe możliwości w regeneracji kości.

Współcześnie rehabilitacja narządu żucia opiera się na kompleksowym leczeniu z wykorzystaniem implantów stomatologicznych. Utrata zębów oraz związana z tym resorpcja podłoża kostnego często utrudnia lub nawet uniemożliwia proces terapeutyczny. Wielu pacjentów w takiej sytuacji wymaga leczenia za pomocą augmentacji kości wyrostka żębodołowego. Rozległe zaniki kostne oraz zwiększające się oczekiwania estetyczne pacjentów są sporym wyzwaniem dla lekarzy dentystów. Jednym z czynników warunkujących powodzenie zabiegu wszczepienia implantu oraz zadowalający PLLAekt estetyczny, jest odpowiednia ilość tkanki kostnej w miejscu planowanego zabiegu (Peintinger i wsp., 2007).

Mimo wielu metod rekonstrukcji wyrostka zębodołowego z wykorzystaniem materiałów autogennych, allogennych i alloplastycznych obok materiałów kośćcozastępczych stosuje się produkty biotechnologii, które umożliwiają sterowaną odbudowę kości (Ponte i wsp., 2006). Wielu specjalistów preferuje różne techniki augmentacyjne w celu poprawy geometrii kości (Misch, 1997). Metody rekonstrukcji wyrostka zębodołowego z wykorzystaniem dystraktora lub z wykorzystaniem siatek tytanowych są stosowane u pacjentów, u których doszło do znacznej atrofii tkanki kostnej. W tych metodach konieczna jest jednak dodatkowa interwencja chirurgiczna, która wydłuża czas i koszt całego leczenia (Kopczyński i wsp., 2012).

Najczęściej, w regeneracji wyrostka zębodołowego stosuje się kość ksenogenną. Udowodniono jednak brak jej całkowitego zastąpienia przez tkankę kostną w procesie przebudowy. Z tego względu materiał ksenogeny ma ograniczone zastosowanie przy rozległych zanikach, gdzie brak jest ograniczenia kostnego oraz gdy cały implant lub większa jego część ma być w nim umieszczona. Dlatego nadal tzw. „złotym standardem” pozostaje kość autogenna (Belser i wsp., 2009; Kan i wsp., 2011; Misch, 2011; Rocchietta, Simion, 2016). Ta metoda powoduje niestety dodatkowy uraz w miejscu dawczym, wydłuża całkowity czas zabiegu, powoduje silniejsze objawy pozabiegowe (obrzemie, dolegliwości bólowe) i zwiększa ryzyko powikłań takich jak porażenia nerwów czy uszkodzenia zębów własnych pacjenta (Leonetti, Koup, 2003; Nissan i wsp., 2011; Guarnieri i wsp., 2006; Ewers, 2005). Ponadto, w procesie przebudowy wielu autorów zauważyło znaczny zanik objętości przeszczepionej kości sięgający 49,5%. Znane są także doniesienia o całkowitej resorpcji autoprzeszczepu, dlatego też powszechnie stosuje się alternatywne materiały do augmentacji kości (Hallman i Thor, 2000, 2008; Moore i wsp., 2001; Nkemke i Stelzle, 2009; Perrotti i wsp., 2009).

W ostatnich latach ze względu na znaczny rozwój inżynierii tkankowej (TE - *Tissue Engineering*), można zaobserwować znaczny postęp medycyny regeneracyjnej. Strategia rekonstrukcji wyrostka zębodołowego jako część medycyny regeneracyjnej jest dość trudna, mimo to w ostatnich dziesięcioleciach nastąpił znaczący rozwój w tej dziedzinie. W tym kontekście głównym jej celem jest projektowanie biologicznych substytutów zdolnych do naprawy, wymiany, a także regeneracji narządów i tkanek (Langer i Vacanti, 1993). Koncepcja TE obejmuje trzy główne filary:

- 1) zastosowanie odpowiedniego rodzaju komórek np.: mezenchymalnych komórek macierzystych,

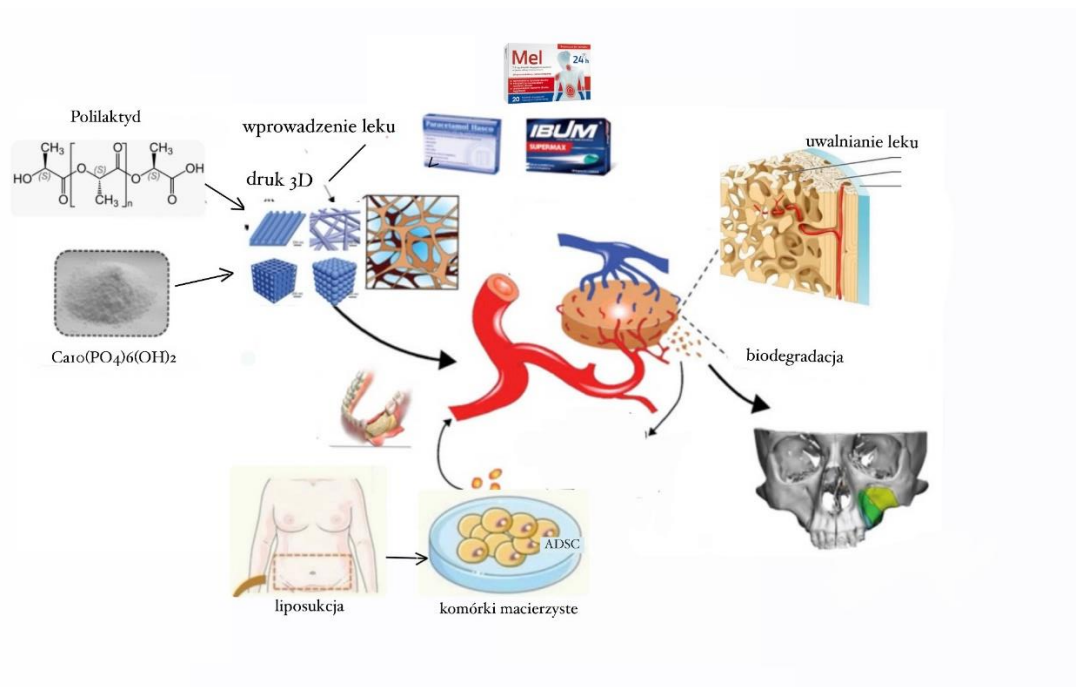
- 2) wykorzystanie matrycy biomateriału jako rusztowania,
- 3) uzupełnienie produktu TE o czynniki wzrostu (Lymperi i wsp. 2013).

Na rusztowaniach zwykle umieszcza się komórki macierzyste (Martin i wsp., 2004; Gathani i Raghavendra, 2016). Bioaktywna matryca w połączeniu z czynnikami wzrostu i różnicowania - poprzez ich uwalnianie - aktywnie wspomaga proces regeneracji (Ceccarelli i wsp., 2017; Evans i wsp., 2006).

Podstawowymi elementami, wykorzystywanymi w inżynierii tkankowej są biomateriały, komórki macierzyste (progenitorowe) oraz cząsteczki bioaktywne. Elementy te tworzą tzw. triadę inżynierii tkankowej, warunkując (razem bądź oddzielnie) proces regeneracji i przebudowy tkanek.(O'Brien, 2011).

Nowoczesne inteligentne materiały hybrydowe mogą być zarówno w swej strukturze jak i na powierzchni modyfikowane substancjami aktywnymi farmaceutycznie (API - ang. Active Pharmaceutical Ingredient), o kontrolowanym czasie uwalniania. Mogą to być leki przeciwzapalne lub antybiotyki (Kruk i wsp., 2017), które stanowią ochronę antybakteryjną lub zmniejszać fazę zapalną w procesie gojenia kości.

Takie układy będą tworzyć matrycę dla mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej (ADSC – ang. *adipose-derived stem cells*) przyspieszając tym samym proliferację i mechanizm kościotworzenia (ryc. 1).



Ryc.1. Schemat przedstawia budowę inteligentnych układów hybrydowych do rekonstrukcji tkanki kostnej.

Przy wykorzystaniu nowoczesnych technik np. druku 3D wraz z obrazowaniem z pomocą tomografii komputerowej, rusztowania kośćcozastępcze mogą posiadać kształt idealnie dopasowany do miejsca ubytku. Możliwe jest również zaprojektowanie wielkość i rozmieszczenie wolnych przestrzeni w materiale, aby spełniały wymagania stawiane substytutom kości. Dodatkową zaletą jest fakt, że można je łatwo kształtować, dzięki czemu skraca się zarówno czas jak i koszty zabiegu chirurgicznego. Dotychczasowy dwuwymiarowy sposób hodowli komórek nie pozwala na interakcję między komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, *ang. Extracellular Matrix*). Trójwymiarowe rusztowania umożliwiające hodowlę komórek macierzystych w warunkach 3D są powszechniej stosowane (Dai i wsp, 2016).

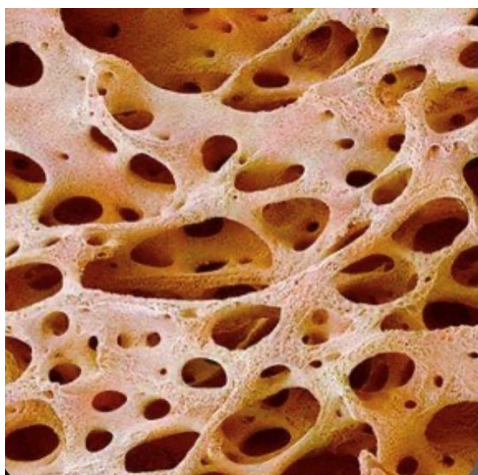
Oczywiście biomateriały, z których powstają rusztowania do hodowli komórek muszą spełniać kilka warunków. Konieczne jest, aby materiał, z którego jest zbudowany miał właściwości biokompatybilne i nie powodował gwałtownej reakcji układu immunologicznego. Struktura takiego układu powinna być wysoce porowata, tak aby przypominać swoją budową naturalny biomateriał oraz posiadać właściwości mechaniczne charakterystyczne dla tkanki kostnej (Dai i wsp., 2016; Tapp i wsp., 2009; Turnbull i wsp., 2018).

1. 2. WYMAGANIA STAWIANE SUBSTYTUTOM KOŚCI

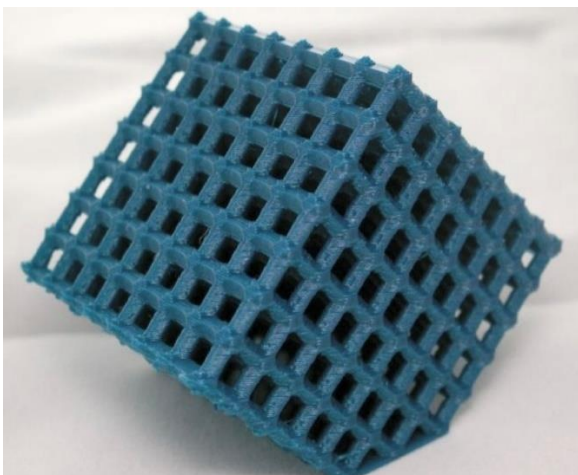
Projektując hybrydowe rusztowania do zastosowania w augmentacji tkanki kostnej należy wziąć pod uwagę szereg parametrów charakteryzujących biomateriały. Jednym z nich jest odpowiednia struktura wewnętrzna, umożliwiająca proliferację oraz różnicowanie komórek. Równie istotne są odpowiednie właściwości mechaniczne.

Tworząc idealne rusztowanie główną kwestią jest wielkość i rozmieszczenie porów. Ma to duże znaczenie, aby umożliwić wzrost komórek, zapewnić zaopatrzenie w składniki odżywcze, szybkie usuwanie produktów przemiany materii, tworzenie unaczynienia oraz przebudowę nowej tkanki. Pod uwagę należy wziąć również objętość porów oraz ich wielkość, kształt i rozmieszczenie. Zbyt mała wielkość i ilość otworów w biomateriale może powodować zmniejszoną dystrybucję składników odżywczych, a tym samym powstawanie obszarów martwiczych. W rezultacie wielkość porów w rusztowaniu wpływa na adhezję komórek i wynikającą z tego proliferację, migrację i infiltrację biomateriału (Murphy i wsp., 2013). Porównanie porowatości dla tkanki kostnej i rusztowania biomateriału (*ang. scaffold*) przedstawia ryc. 2.

a.



b.



Ryc. 2. Zdjęcie przedstawia porowatość tkanki kostnej (a) oraz rusztowanie biomateriału (b).

(źródło: <https://www.bbc.com/news/science-environment-26242256>)

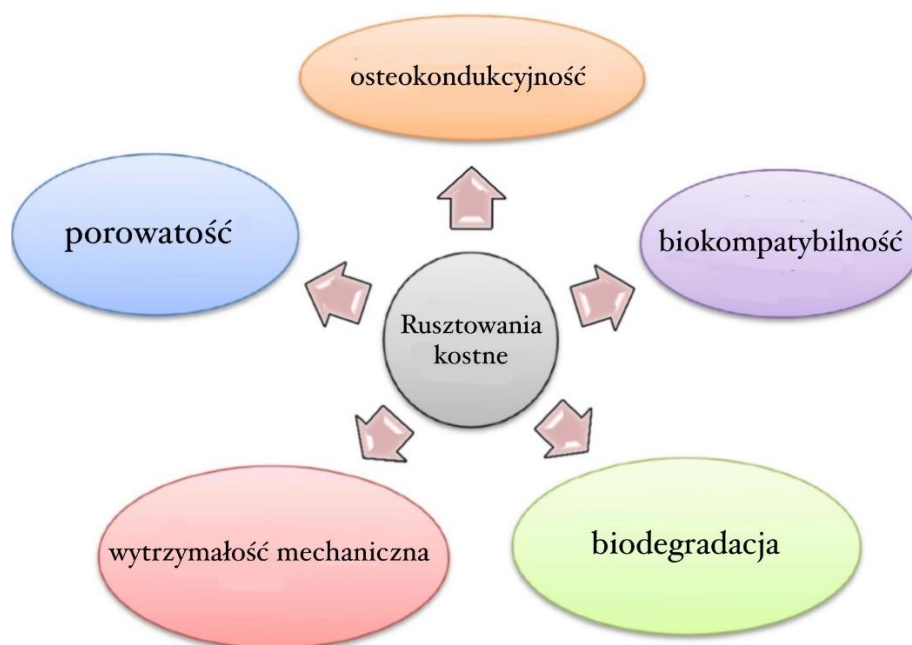
Aby możliwa była regeneracja tkanki kostnej rozmiar luk w biomateriale powinien odpowiadać wymiarom kanałów Haversa, średnio 100-350 μm . Jeśli otwory mają wielkość min. 100 μm możliwa jest penetracja tkanki żywej. Poniżej 100 μm nie dochodzi do procesu formowania kości (Marciniak i wsp., 2008). Wielkość powyżej 500 μm sprzyjają powstawaniu tkanki drobnowłóknistej (bliznowatej) i szybkiemu jej unaczynieniu (Kim i wsp., 2003). Zależność regeneracji tkanki kostnej od wielkości porów przedstawia Tab.1.

Tab. 1. Zależność regeneracji tkanki kostnej od wielkości luk w rusztowaniu kośćcozastępczym.

Wielkość porów	Wpływ na regeneracje tkanek
<5 μm	nie zachodzi wzrastanie tkanek
>25 μm	wzrastanie tkanki włóknistej oraz naczyń
>50 μm	mineralizacja wrośniętych tkanek
>100 μm	mineralizacja przekracza głębokość 1000 μm , a wrośnięta kość jest prawidłowo odbudowana

Ludzka tkanka kostna gąbczasta wykazuje całkowitą porowatość w granicach od 30% do 90%. Strukturę zawierającą puste przestrzenie uważa się za odpowiednią do regeneracji kości Ryc. 2. Większa porowatość i wielkość porów skutkują większym wrastaniem tkanek *in vitro* i *in vivo* (Karageorgiou i Kaplan, 2005). Jednakże wyjątkowo wysoka porowatość może zagrozić ogólnej mechanicznej stabilności szkieletu poprzez zmniejszenie jego ogólnej wytrzymałości na ściskanie. W związku z tym należy osiągnąć równowagę między tempem

przebudowy kości i degradacją materiału. Połączenie korzystnych właściwości wielu różnych materiałów nadaje dodatkowych cech takiemu układowi. Połączenie co najmniej dwóch różnych, odpowiednio dobranych faz poprawia właściwości otrzymanego materiału w porównaniu z właściwościami poszczególnych składników. Rusztowania wykonane z materiałów polimerowo-ceramicznych symulujących tkankę kostną zapewniają odpowiednią odpowiedź immunologiczną, dobrą wytrzymałość, a aktywny materiał bioceramiczny korzystnie wpływa na połączenie macierzy z otaczającą tkanką. W inżynierii tkankowej coraz częściej stosuje się materiały kompozytowe - około 30% obecnie stosowanych biomateriałów. Zainteresowanie kompozytami wynika z podejścia biomimetycznego, które stara się naśladować budowę i mechanizmy naturalnej tkanki. Cechy rusztowań kości przedstawia Ryc. 3.



Ryc. 3. Wymagania stawiane rusztowaniom kości

Sukpaita, T.; Chirachanchai, S.; Pimkhaokham, A.; Ampornaramveth, R.S. Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration. Mar. Drugs 2021, 19, 551. <https://doi.org/10.3390/md19100551>

Dodanie materiałów nieorganicznych (np. bioszkieł) do rusztowania polimerowego ma kilka zalet, w tym połączenie osteokonduktywności i potencjału wiązania fazy nieorganicznej kości z porowatością i konstrukcją 3D. Wybierając materiały do regeneracji tkanki kostnej oraz projektowania rusztowań należy wziąć pod uwagę szereg właściwości materiału.

Biozgodność to jedna z najważniejszych właściwości biomateriału w inżynierii tkankowej. Użyte materiały nie mogą działać kancerogennie, teratogennie, wywoływać reakcji

alergicznym ani przewlekłym stanom zapalnym. Materiał kośćcozastępczy powinien być osteokondukcyjny (umożliwić adhezję, namnażanie oraz formowanie macierzy zewnątrzkomórkowej na powierzchni oraz wewnątrz rusztowania). Osteokondukcja wspiera wzrost kości na swojej powierzchni i nadaje kierunek stopniowemu formowaniu kości wokół resorbowanego materiału (Stodulska i wsp., 2018; Hallman i Thor, 2000/2008). W idealnych warunkach, sieć naczyń krwionośnych wnika w strukturę wewnętrzną implantu. Powoduje to efektywny transport składników odżywczych, tlenu i metabolitów, co sprzyja odbudowie kości w obrębie ubytku kostnego (Kruk i wsp., 2017). Osteoindukcyjność to zdolność materiału do pobudzania odbudowy kości przez sygnały biomolekularne oraz komórki prekursorowe (Kruk i wsp., 2017).

Pożądaną cechą substytutów kości jest biodegradowalność. Nie jest ona jednak bezwzględnie wymagana. Materiał powinien ulegać resorpcji lub przekształceniu do produktów, które są nietoksyczne dla organizmu. Aby idealnie dopasować czas potrzebny na przebudowę rusztowania do czasu regeneracji tkanki kostnej bardzo istotna jest szybkość oraz kontrola degradacji materiału. Rozkład oraz mechanizm tworzenia nowej tkanki kostnej uzależniony jest od cech zastosowanego materiału oraz od warunków jakie panują u danego pacjenta. Jednym z kryteriów jest wiek pacjenta. Degradacja scaffold'u u dziecka powinna trwać około 3 miesięcy, natomiast u osoby starszej już blisko 9 miesięcy. Istotne jest również miejsce wszczepienia materiału. Tempo degradacji substytutów kości powinno być dopasowane do tempa regeneracji tkanek. Zbyt szybka może powodować nie tylko przedwczesną utratę właściwości mechanicznych, lecz także uwalnianie w krótkim czasie znacznej ilości produktu degradacji, przekraczającą zdolność organizmu do ich wydalania. Bezpośrednim tego skutkiem jest wówczas przedłużający się stan zapalny. Z drugiej strony, degradacja materiału nie powinna być zbyt powolna. W warunkach optymalnych, scaffold powinien ulegać stopniowej resorpcji, przebiegającej zgodnie z postępującym procesem gojenia tkanek. W przypadku polimerów czas resorpcji zależy od masy cząsteczkowej np. dla polilaktydu (PLA) waha się od 32 tygodni do 4 lat (Besso i wsp., 1997). Dzięki stosowanym dodatkom można modyfikować czas rozpadu PLA.

Substytut kości powinien posiadać odpowiednią odporność mechaniczną zapewniającą prawidłową strukturę tkanki oraz aby umożliwić połączenie między rusztowaniem a tkanką gospodarza. Właściwości mechaniczne kości różnią się w przypadku tkanki kostnej gąbczastej i zbitej. Różnice we właściwościach mechanicznych oraz geometrii kości (płaskie, długie) powodują trudności w zaprojektowaniu uniwersalnego substytutu kości.

Kluczowym krokiem w strategii inżynierii tkankowej jest wybór odpowiednich komponentów do rusztowań zapewniających odpowiednie środowisko do regeneracji tkanek. Rusztowania to innowacyjne i spersonalizowane biomateriały o trójwymiarowej (3D) strukturze i wysokim stopniu porowatości. Bioaktywna macierz o wymaganej architekturze stanowi podłoże dla wszczepionych komórek, które umożliwia im prawidłowe funkcjonowanie w celu wytworzenia pożądanej macierzy zewnątrzkomórkowej.

Warto zauważyć, że wewnętrzna struktura kości jest niezwykle złożona i wyjątkowo trudna do naśladowania, dlatego koncepcja zaprojektowania i zbudowania idealnego rusztowania wciąż jest wyzwaniem. Rusztowania kompozytowe składające się z kilku rodzajów biomateriałów pozwalają przezwyciężyć problemy z niepożądanymi właściwościami wszystkich elementów, przy zachowaniu ich zalet. Istnieje wiele metod wytwarzania porowatych polimerowych struktur 3D. Istnieją tradycyjne techniki takie jak spienianie gazem, inwersja faz czy ługowanie solą oraz nowoczesne techniki szybkiego prototypowania wspomagane komputerowym projektowaniem modelowym (CAD) (Loh i wsp. 2013). Techniki takiego prototypowania (drukowania 3D) polega ją na tworzeniu skomplikowanych struktur na bazie danych opracowanych w komputerowych programach 3D CAD, bez użycia form odlewniczych.

1.3 CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH MATERIAŁÓW DO PRODUKCJI BIOKOMPOZYTÓW HYBRYDOWYCH

1.3.1. POLIMERY STOSOWANE W STOMATOLOGII

W biomedycynie materiały polimerowe znajdują szerokie zastosowanie. W chirurgii szczękowo-twarzowej służą do wypełniania ubytków kostnych wyrostków zębodołowych, rekonstrukcji kości czaszki i twarzy, oczodołu oraz korekcji twarzy, np. nosa i podbródka. Co więcej, stosuje się je do regeneracji kości w zębodołach, do zabezpieczenia implantów dentystycznych przed wrastaniem tkanki miękkiej oraz jako elastyczne podścielenia protez, zmniejszające nacisk na dziąsła wywierany przez protezy. Polimery stosowane w chirurgii szczękowo-twarzowej to głównie polietylen, najczęściej w postaci porowatych płyt lub bloków oraz polimetakrylan metylu, silikonu i poliuretany (Lelah i Cooper, 1986).

W medycynie estetycznej oraz w chirurgii plastycznej materiały polimerowe stosuje się do korekcji wyglądu estetycznego pacjenta, na przykład korekcji kształtu czerwieni wargowej, brody i nosa oraz do wolumetrii określonych obszarów twarzy. Mogą one dodatkowo spełniać

funkcje fizjologiczne zastępując uszkodzone tkanki powstałe np. w wyniku oparzeń. Przykładami takich polimerów jest kolagen, kwas hialuronowy, poliakrylamidy, oraz mikrokuleczki z polietyloakrylanów lub polimetakrylanów zawieszane w żelu kolagenowym (Lynch, 1982).

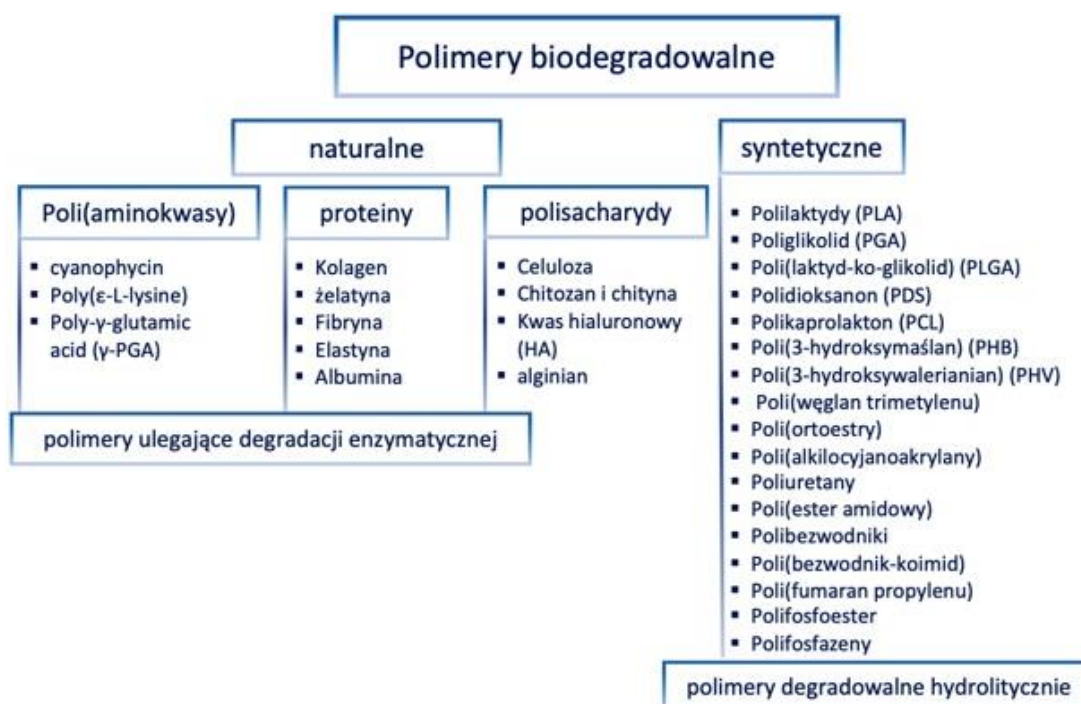
Duże zastosowanie w medycynie znajdują też wyroby z polimerów resorbowalnych. Wytwarza się z nich nici chirurgiczne, mikroporowate podłoża do regeneracji tkanek oraz śruby, nity i płytki do mocowania złamań kostnych w chirurgii szczękowo-twarzowej. Polimery bioresorbowalne stosowane w medycynie, które produkowane są na skalę przemysłową to głównie poli(kwas glikolowy) (PGA), poli(kwas L-mlekowy) (PLLA), kopolimery glikolidu z laktydami (PGLA), poli(ϵ -kaprolakton), poliortoestry, poliestroamidy oraz poliparadioksanon.

Polimery naturalne i syntetyczne były szeroko badane w zastosowaniach medycznych, szczególnie w opracowywaniu biomateriałów o odpowiednio dobranych specyficznych i unikalnych wymaganiach potrzebnych do indywidualnych problemów terapeutycznych (Huebsch i Mooney, 2009). Polimery, w porównaniu z innymi klasami biomateriałów, takimi jak metale, stopy i ceramika, są bliższe organizmom żywym (Ratner i wsp., 2004; Park i Lakes, 2007; Nair i Laurencin, 2007). Wszechstronność resorbowalnych materiałów polimerowych spowodowała, że stały się one preferowanymi kandydatami do stosowania jako biomateriały w medycynie. Cechą charakterystyczną tych materiałów jest to, że ich właściwości zmieniają się w czasie w zależności od przebiegu procesów biodegradacji w środowisku organizmu biorcy (Nair i Laurencin, 2007). Resorbowalne polimery ulegają biodegradacji *in vivo*, tworząc biologicznie akceptowalne cząsteczki, które są metabolizowane. Jednym z najważniejszych warunków pomyślnego wykorzystania resorbowalnych polimerów w zastosowaniach medycznych jest dokładne zrozumienie zależności między mechanizmami biodegradacji a ich strukturą, masą cząsteczkową, rozpuszczalnością i innymi dostosowanymi właściwościami, w tym składem kopolimerów, a także kształtu i struktury wytwarzanych biomateriałów (Ratner i wsp., 1996) W tym przypadku resorbowalne polimery są wykorzystywane do konkretnego zastosowania w terapii, a ich wartość została wykazana w zastosowaniach takich jak: w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej (Park i Lakes, 2007).

1.3.2. RODZAJE RESORBOWALNYCH POLIMERÓW

Resorbowalne polimery, określane również jako polimery biodegradowalne, po pewnym czasie od wprowadzenia do organizmu ulegają resorpcji. Biodegradacja materiałów polimerowych jest procesem biochemicznym i polega na rozerwaniu wiązań (kowalencyjnych) w łańcuchu

polimerowym (Ikada i Tsuji, 2000). Hydroliza jest najczęstszym procesem chemicznym biodegradacji łańcucha polimerowego, ale rozpad może również zachodzić na drodze mechanizmu enzymatycznego (Ratner i wsp., 2004). W zależności od sposobu degradacji materiały polimerowe można podzielić na polimery degradowalne hydrolitycznie i polimery degradowalne enzymatycznie (Ratner i wsp., 2004; Nair i Laurencin, 2007; Ratner i wsp., 1996). Większość naturalnie występujących polimerów ulega biodegradacji enzymatycznej. Z drugiej strony polimery syntetyczne mają na wiązania chemiczne podatne na działania H₂O (Ikada i Tsuji, 2000; Maitz, 2015) (Ryc. 4). Podatność polimeru na biodegradację determinują wewnętrzne właściwości grup funkcyjnych oraz czynniki molekularne i morfologiczne, takie jak: struktura konfiguracyjna, krystaliczność, powierzchnia, ilość resztkowego monomeru, stosunek kopolimerów, porowatość i środowisko wdrożenia (Ratner i wsp., 1996).



Ryc. 4. Klasyfikacja polimerów biodegradowalnych (Ratner i wsp., 2004; Ikada, Tsuji, 2000; Maitz, 2015).

1.3.3. POLIMERY NATURALNE

Główną zaletą naturalnych polimerów jest ich bioaktywność i jak opisano wcześniej, ulegają one naturalnie kontrolowanej biodegradacji *in vivo* przez enzymy. Szybkość biodegradacji różni się znacznie w zależności od miejsca implantacji i ściśle zależy od dostępności i stężenia enzymów (Ratner i wsp., 1996; Pathak i Navneet, 2017).

Najbardziej rozpowszechnionym polimerem naturalnym jest kolagen. Jest to najobficiej występujące białko w ludzkim organizmie i występuje i jest głównym składnikiem skóry i tkanki mięśniowo-szkieletowej. Kolagen to polimery aminokwasów zawierające trzy podjednostki polipeptydowe, które są ułożone w trójwymiarową pofałdowaną strukturę. Powtarzająca się sekwencja aminokwasów w potrójnej helisie: glicyny, proliny i hydroksyproliny przy względnej obfitości lizyny i strukturze heliakalnej determinuje wewnętrzną wytrzymałość mechaniczną kolagenu (Shoulders i Raines, 2009). Głównym źródłem kolagenu wykorzystywanego do zastosowań medycznych jest skóra bydlęca, wieprzowa lub bydlęca i końskie ścięgna Achillesa (Silvipriya, 2015). Ze względu na doskonałą biokompatybilność i biodegradowalność kolagen ma wszechstronne zastosowanie medyczne, szczególnie w celach kosmetycznych, stomatologicznych, ortopedycznych i chirurgicznych. Kolagen jako naturalny składnik może wspierać tkanki organizmu poprzez tendencję do przyłączania komórek, proliferacji i różnicowania (Harkness, 1996; Haugh, 2011). Dlatego najbardziej obiecującym zastosowaniem kolagenu jest inżynieria tkankowa (Głowacki i Mizuno, 2008; Fields i Prockop, 1996). Wysoka reaktywność kolagenu pozwala na jego modyfikację poprzez sieciowanie (Chamy, 2013; Haugh i wsp., 2011). Implantacja do organizmu biomateriału kolagenowego nie powoduje reakcji zapalnych i immunologicznych o podłożu toksycznym. Wadą biomateriałów kolagenowych jest wysoki koszt czystego kolagenu, zmienne właściwości fizykochemiczne i degradacyjne w zależności od źródła kolagenu (Lee i wsp., 2001; Parenteau-Bareil i wsp., 2010).

Kwas hialuronowy (HA) jest liniowym polisacharydem i posiada unikalne właściwości lepkością. HA poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe może tworzyć trójwymiarowe struktury w roztworze (Andrades, 2013; Oldenkamp i wsp., 2018). Obecnie kwas hialuronowy jest szeroko stosowany w medycynie estetycznej oraz w chirurgii plastycznej.

1.3.4. POLIMERY SYNTETYCZNE

Dużo uwagi poświęca się wykorzystaniu polimerów syntetycznych w medycynie, ze względu na ich właściwości, takie jak biokompatybilność i możliwość kontrolowania szybkości biodegradacji, a także fakt, że nie są one tak aktywne biologicznie jak polimery naturalne. Najszerzej zbadaną i szeroko stosowaną grupą syntetycznych polimerów biodegradowalnych są poliestry i ich kopolimery. Oferują wiele zalet: można je dopasować do pożądanego kształtu, morfologii porów i trójwymiarowej struktury. Co więcej, wiązania estrowego ulegają hydrolizie, czego efektem jest powstawanie kwasów, które są eliminowane ze środowiska

organizmu w postaci dwutlenku węgla i wody w cyklu Krebsa (Gilding, Reed, 1979; King i wsp., 2013).

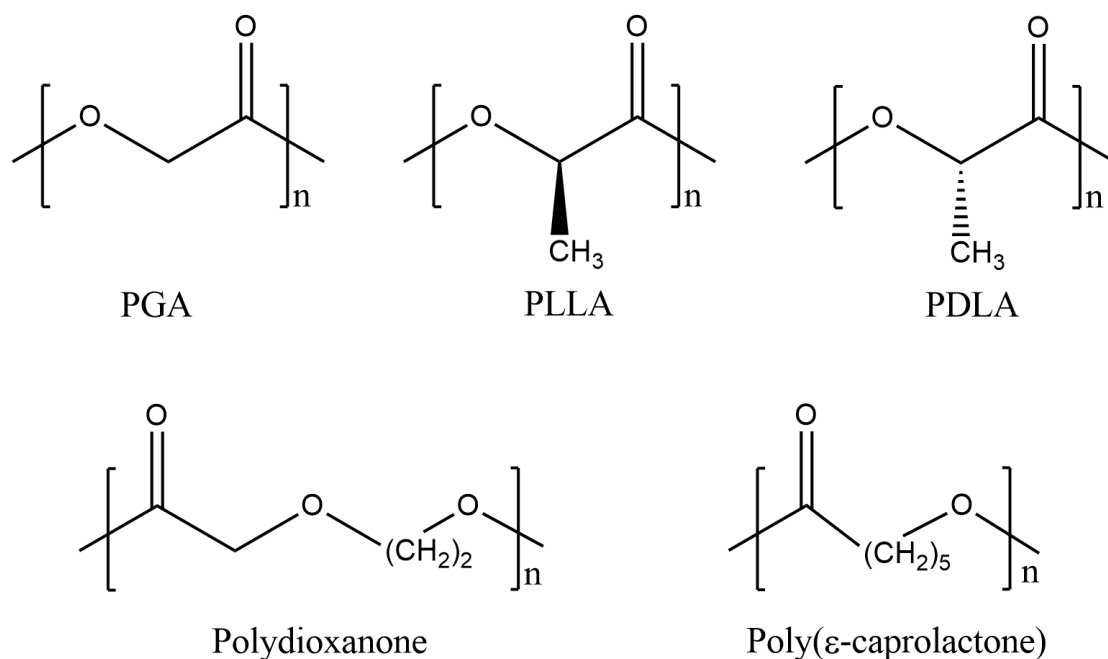
Poliestry zostały zatwierdzone jako wyrób medyczny - biokompatybilny materiał do niektórych zastosowań medycznych u ludzi (Ratner i wsp., 2004). Syntetycznym polimerem o największej historii i potencjale zastosowania jest poli(kwas mlekowy) (PLA) należący do grupy poliestrów resorbowlanych. PLA znany również jako polilaktyd jest wykonany z monomeru laktydowego. Kwas mlekowy jest związkiem chemicznym wykazującym chiralność optyczną i występuje w dwóch formach stereoizomerycznych: kwas L-mlekowy i kwas D-mlekowy, które tworzą kilka odrębnych morfologicznie polimerów: poli-L-laktyd (PLLA), poli-D-laktyd (PDLA) i poli-DL-laktyd (PDLLA) (Ryc. 2) (Gunatillake, Adhikari, 2003). Właściwości polilaktydu zależą od składu izomerów w łańcuchu polimerowym, stąd PLLA i PDLA są materiałami semikrystalicznymi, natomiast PDLLA jest amorficzny. Różnice w krystaliczności mają bezpośredni wpływ na biodegradowalność. PLLA jest częściej stosowana niż PDLA ze względu na fakt, że PLLA ulega hydrolitycznej biodegradacji do kwasu L-mlekowego, nietoksycznego i naturalnie występującego stereoizomeru kwasu mlekowego (Ulery, 2011). Półkrystaliczny PLLA znalazł wiele zastosowań, w szczególności tam, gdzie wymagana jest wysoka wytrzymałość mechaniczna i ciągliwość (Ratner i wsp., 2004; Nair, Laurencin, 2007), Innym rodzajem resorbowlanego polimeru syntetycznego jest poli(kwas glikolowy) (poliglikolid - PGA), który jest najprostszym liniowym poliestrem alifatycznym (Ryc 5). PGA jest krystaliczny, a materiały z niego wykonane tracą wytrzymałość mechaniczną i wchłaniają się w organizmie szybciej niż jakikolwiek inny poliester (Ratner i wsp., 2004; Nair i Laurencin, 2007).

Ta cecha jest klinicznie ważna, ponieważ szybkość resorpcji jest ważnym czynnikiem w przebudowie tkanki kostnej. Atrakcyjność biomateriałów opartych na PGA wynika z ich wysokiej wrażliwości na rozkład hydrolityczny, co prowadzi do powstania naturalnego metabolitu - kwasu glikolowego. Jednak znaczna hydrofilowość PGA i wysoka wrażliwość na biodegradację hydrolityczną wymagają bardzo dokładnej kontroli warunków i technik przetwarzania podczas otrzymywania tego biomateriału. W przypadku PGA może wystąpić jego nagła biodegradacja, która prowadzi do miejscowego wzrostu stężenia kwasu, skutkując odpowiednią zapalną i nagłą utratą właściwości mechanicznych. (Ceonzo i wsp., 2006). Co więcej PGA, ze względu na możliwość wytworzenia tego polimeru w postaci włókien, został on poddany badaniom biomedycznym co skutkowało opracowaniem w 1970 roku pierwszym

komercyjnie dostępnym syntetycznym szew medycznym (Ratner i wsp., 2004; Nair i Laurencin, 2007; Gilding i Reed, 1979).

Aby zoptymalizować właściwości fizykochemiczne resorbowalnych polimerów, przeprowadzono szeroko zakrojone badania nad opracowaniem kopolimerów. Kluczowy parametr, jakim jest szybkość biodegradacji polimerów, można modyfikować przez kopolimeryzację i struktury krystalicznej biomateriałów. Najbardziej rozpowszechniony kopolimer - PLGA poli(kwas mlekowo-glikolowy) wytwarzany jest z kwasu glikolowego i mlekowego. Właściwości końcowego biomateriału, zwłaszcza szybkość degradacji, można regulować stosunkiem ilościowym PLA do PGA.

PLGA można wytwarzać w różnych formach, w tym arkuszy, bloków, mikrokulek i nanowłókien o zaprojektowanej architekturze i szybkościach degradacji. Podobnie jak w przypadku PLA i PGA, mechanizmem biodegradacji PLGA *in vivo* jest proces hydrolizy, a jego produkty uboczne są eliminowane z organizmu, powodując minimalne reakcje zapalne. PLGA ze względu na swoje właściwości dobrze rokuje jako materiał do zastosowania w medycynie regeneracyjnej i stomatologii. Charakterystyczne cechy, takie jak dobra adhezja i proliferacja komórek, czynią z PLGA potencjalne biomateriały do zastosowań w inżynierii tkankowej. Poli(kwas mlekowy) i poli(kwas glikolowy) oraz ich kopolimery były szeroko badane pod kątem medycznych i innych zastosowań niż jakiegokolwiek inne resorbowalne polimery (Nair, Laurencin, 2007), (Fakirov, 2015). Wzory strukturalne przedstawia Ryc. 5.



Ryc. 5. Struktury chemiczne szeroko zbadanych biodegradowalnych polimerów (Gunatillake, Adhikari, 2003).

1.3.5. RESORBOWALNE MEMBRANY

Resorbowalne membrany zwane również bonami zaporowymi są szeroko stosowane w zabiegach z zakresu chirurgii stomatologicznej (Wang i wsp., 2016). Przede wszystkim błony zapobiegają wrastaniu nabłonka w obszar, w którym pożądana jest tkanka kostna. Metoda, w której zapobiega się migracji nabłonka do określonego obszaru, nazywana jest sterowaną regeneracją tkanek (GTR) (Nyman i wsp., 1982, Gottlow i wsp., 1984). Błony idealnie nadają się również do utrzymania przestrzeni podczas zabiegów sterowanej regeneracji kości (GBR) w celu wspomaganie regeneracji i wzrostu kości w przebiegu chorób periodontologicznych. W procesie regeneracji tkanki kostnej dochodzi do zwiększenia grubości i wysokości wyrostka zębodołowego. Kość jest oddzielona od tkanek miękkich przez ograniczającą ją membranę. Po określonym czasie dochodzi do jej resorpcji (Dimitriou i wsp. 2012; Neel i wsp., 2014; Liu, Kerns, 2014). Błony zaporowe skutecznie zapobiegają zanikowi wyrostka zębodołowego. Obecnie sterowaną regenerację kości stosuje się głównie w jamie ustnej w celu wspomaganie wzrostu nowej tkanki kostnej, aby umożliwić stabilne umieszczenie implantów zębowych (Pellegrini i wsp., 2013). Podstawową zaletą membran resorbowalnych jest to, że minimalizują dyskomfort i koszty pacjenta ze względu na brak konieczności dodatkowej operacji usunięcia błony, a tym samym eliminują potencjalne powikłania chirurgiczne i nie zakłócają procesu gojenia (Dimitriou i wsp. 2012; Neel i wsp., 2014; Pellegrini i wsp., 2013). Resorbowalne membrany zbudowane są z podobnych polimerów pochodzenia zwierzęcego i syntetycznego. Po raz pierwszy naturalny polimer został użyty przez Chunga w 1990 roku do leczenia ubytków tkankowych w przestrzeniach międzyzronowych przez błony kolagenowe (Chung i wsp., 1990). Z drugiej strony membranę syntetyczną po raz pierwszy zastosował w 1995 roku Polson (Polson i wsp., 1995).

1.3.6. MEMBRANY KOLAGENOWE

Obecnie, ze względu na optymalną biokompatybilność, najpopularniejsze membrany zbudowane są z kolagenu. Jednak ze względu na jego charakter nie ma kontroli nad czasem resorpcji, który jest uzależniony jest od indywidualnych cech organizmu. Ponadto, szybkość degradacji zależy od źródła materiału kolagenowego i jego modyfikacji (Wang i wsp., 2016; Bunyaratavej i wsp., 2001). Najczęściej stosowanymi membranami kolagenowymi dostępnymi na rynku są Bio-Gide® firmy Geistlich i BioMend® firmy Zimmer. Są one wytwarzane z różnych źródeł zwierzęcych i charakteryzują się różnymi szybkościami resorpcji, wynoszącymi odpowiednio od 2-4 tygodni i 8 tygodni. Bio-Gide® to dwuwarstwowa błona z kolagenu wieprzowego, natomiast BioMend® jest wykonana z bydlęcego ścięgna Achillesa (Wang

i wsp., 2016; Miller i wsp., 1997). Typowe membrany są dostępne w różnych rozmiarach i wyglądają jak płaska, biała tkanina. Kolagen jest powszechnie modyfikowany chemicznie w procesie sieciowania, co wpływa na właściwości materiału takie jak: zmniejszenie zdolności wchłaniania wody i zmniejszenie rozpuszczalności, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia wytrzymałości na rozciąganie (Ferreira i wsp., 2012; Delgado i wsp., 2015). Błony kolagenopochodne mają wiele wymaganych cech, w tym: niską immunogenność, aktywność hemostatyczną, przyciąganie i aktywację komórek fibroblastów. Ponadto błony kolagenowe oddziałują z różnymi komórkami i wywołują reakcje, które warunkują proces gojenia i regeneracji.

1.3.7. MEMBRANY SYNTETYCZNE

Większość dostępnych na rynku membran syntetycznych wytwarzana jest z wykorzystaniem poliestrów alifatycznych, w tym: poli(kwasu mlekowego), poli(kwasu glikolowego) i poli(ϵ -kapolaktonu) oraz ich kopolimerów. W Tab. 2. przedstawiono najpopularniejszy przykład membran syntetycznych wraz z ich charakterystycznymi parametrami użytkowymi (Gunatillake, Adhikari, 2003; Wang i wsp., 2016). Na przykład membrana Resolut Adapt® jest wykonana z kopolimeru PLGA i może utrzymywać swoją funkcję barierową przez co najmniej 8 tygodni, podczas gdy jest stopniowo wchłaniana średnio przez 6 miesięcy. Dodatkowo wykazano, że membrana zbudowana na PLGA ma podobną skuteczność w leczeniu GBR porównywalną z błoną kolagenową (Hua i wsp., 2014).

Tab. 2. Komercyjnie dostępne membrany syntetyczne i ich główne cechy (Gunatillake i Adhikari, 2003; Wang i wsp., 2016).

Nazwa handlowa (producent)	Materiały	Czas działania	Szybkość resorpcji
Resolut Adapt (W.L. Gore)	kopolimer PLGA poli(kwas D, L-mlekowy)/poli (kwas glikolowy)	8-10 tygodni	5-6 miesięcy
Epi-Guide (Curasan, Inc.)	PDLLA Poli(kwas D, L-mlekowy)	20 tygodni	6-12 miesiące
Vivosorb (Polyganics)	kopolimer poly(kwas D, L-mlekowy)/poly(ϵ -kapolakton)	10 tygodni	24 miesiące

Od czasu klinicznego zastosowania błon zaporowych w połowie lat 80-tych XX wieku zabiegi GBR i GTR stały się standardem w różnych dziedzinach stomatologii: periodontologii, implantologii i chirurgii stomatologicznej. Przeznaczone są do wspomaganie procesu gojenia się ran w ramach: zabiegów chirurgii jamy ustnej przygotowujących do wszczepienia

implantów zębowych, chirurgii przyzębia oraz augmentacji wyrostka. Ponadto, w ciągu ostatnich 30 lat dokonano wielu postępów w zakresie rozwoju ich wytwarzania, ostatnio wykorzystując innowacyjne techniki zmiany i programowania szybkości resorpcji membran (Rodella i wsp., 2011; Bottino, Thomas, 2015).

1.4. NANOHYDROKSYAPATYT I JEGO WŁAŚCIWOŚCI

Nanohydroksyapatyt charakteryzuje się dobrą bioaktywnością, biokompatybilnością i osteokondukcją. Pod względem chemicznym wykazuje duże podobieństwo do ludzkiej kości, dlatego ma potencjalne zastosowanie jako materiał do implantacji.

Nanokrystaliczny hydroksyapatyt (nHAp) pochodzenia syntetycznego ma działanie wspomagające adhezję i proliferację osteoblastów. Apatyt wapnia o ogólnym wzorze chemicznym $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ w rozmiarze nanometrycznym cechuje się wysoką cytokompatybilnością oraz osteokondukcyjnością. Dlatego nHAp został uznany za najbardziej biokompatybilny materiał do regeneracji kości. Syntetyczny hydroksyapatyt tworzy nie tylko wiązania chemiczne, ale powoduje również wrastanie żywej tkanki w porach, wykazując zachowanie bioaktywne. Nanohydroksyapatyt stosowany jest w augmentacji kości w różnej formie m.in. w postaci granulek oraz kształtek. W stomatologii oraz w ortopedii bioceramika hydroksyapatytowa jest szeroko stosowana do wypełnienia ubytków kostnych oraz w charakterze nośników leków (Nałęcz, 2003). Nanorozmariowy HAp można modyfikować aktywnym środkiem przeciwbakteryjnym lub przeciwzapalnym promując jednocześnie żywotność i aktywność proliferacyjną MSC (ang. MSC- *Mesenchymal Stem Cells*). Co więcej, nHAp skutecznie promuje potencjał różnicowania osteogennego MSC i może być stosowany jako skuteczne narzędzie do systemu dostarczania leków i / lub środka bioaktywnego.

Niestety niskie parametry wytrzymałościowe nanohydroksyapatytu stały się dużym ograniczeniem w szerokim zastosowaniu tego materiału jako substytutu kości, dlatego połączenie nHAp z innymi materiałami do rekonstrukcji tkanki kostnej wydaje się obiecujące. Zaprojektowanie kompozytu, który będzie posiadał dobre parametry wytrzymałościowe, ale również zawierał w swoim składzie nanohydroksyapatyt stwarza dużą szansę dla rekonstrukcji tkanki kostnej. Aby tkanka żywa mogła wrastać w pory substytutu oraz aby nie doszło do martwicy bardzo ważna jest odpowiednia wielkość porów. Projektując materiał spełniający wymagania dotyczące wielkości otworów można spodziewać się, że przy dobrym unieruchomieniu materiału, do porów będzie wnikała unaczyniona kość (Zieliński i wsp., 2008; Hench, 1993; Cao, Hench, 1996; de Groot, 1998; Ratner i wsp., 1996).

1.5 KOMÓRKI MACIERZYSTE

Obiektem zainteresowania współczesnej medycyny są terapie zaawansowane. Jednym z rodzajów komórek, które mogą być wykorzystywane w regeneracji tkanek są mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej ADSC (adipose-derived stem cells). Komórki te zostały opisane po raz pierwszy przez Zuk i wsp. w 2001 roku. Wykorzystanie komórek macierzystych w medycynie zwiększa się z roku na rok. Ważnym krokiem w kierunku ich wykorzystania w terapii były odkrycia ich właściwości biologicznych, tj. różnicowania do adipocytów, chondrocytów, osteoblastów, neuronów, komórek Schwanna, komórek śródbłonna naczyniowego i innych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Zuk i wsp., 2001; Planat-Benard i wsp., 2004; Konno i wsp., 2010; Rangappa i wsp., 2003; Uysal i Mizuno, 2010; Tobita i Mizuno, 2010). Niestety, mimo wielu starań aktualnie jest tylko jeden zarejestrowany produkt leczniczy przeznaczony do leczenia ludzi - Alofisel – Takeda. Jest on przeznaczony do leczenia trudno gojących się przetok przy odbytnicznych.

Zgodnie z obowiązującym prawem (Rozporządzenie (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej i zmieniające dyrektywę 2001/83/WE oraz rozporządzenie (WE) nr 726/2004) komórki macierzyste, które są stosowane w terapii należy traktować jako produkty lecznicze terapii zaawansowanej. Produktem leczniczym są komórki pobierane od pacjenta i poddane znaczącej manipulacji (np. hodowla) lub/i „*nie są przeznaczone do stosowania do tej samej podstawowej funkcji lub tych samych podstawowych funkcji u biorcy co u dawcy*”. Zapis ten powoduje, że każde podanie komórek macierzystych - nawet niepoddanych manipulacji - jest wytworzeniem i podaniem produktu leczniczego. W związku z tym podmiot wytwarzający tego typu produkty lecznicze musi spełnić wymagania związane z wymogami Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne. Produkty zawierające komórki macierzyste w zależności od zastosowania możemy podzielić na 3 grupy:

- produkt inżynierii tkankowej to produkt posiadający właściwości regeneracyjne, naprawcze lub zastępowania tkanki ludzkiej;
- produkt leczniczy somatycznej terapii komórkowej – o innym działaniu jak regeneracja lub naprawa tkanek;
- produkt leczniczy skojarzonej terapii zaawansowanej oznacza produkt leczniczy który musi zawierać w sobie, jako część integralną produktu, jeden lub więcej wyrobów medycznych.

Produkty zawierające komórki macierzyste mogą zostać zastosowane u pacjentów w przypadku, gdy zostały wytworzone w wytwórni posiadającej pozwolenie na wytwarzanie jednego z trzech typów produktów leczniczych ATMP:

- **ATMP-HE** – (Advanced Therapy Medicinal Products – Hospital Exemption) produkt leczniczy terapii zaawansowanej – wyjątek szpitalny, to produkt, który można zastosować u ludzi w przypadku, gdy nie działają lub nie są znane inne skuteczne procedury medyczne w ramach eksperymentu medycznego. Wydanie zgody na ich wytwarzanie dokonywane jest w drodze decyzji administracyjnej wydawanej przez Głównego Inspektora Farmaceutycznego (GIF).
- **ATIMP** – (Advanced Therapy Investigational Medicinal Products) oznacza ATMP który jest stosowany w badaniu klinicznym
- **ATMP** – (Advanced Therapy Medicinal Products), podlega centralnej rejestracji przez Europejską Agencję Leków. Po rejestracji wprowadzenie do obrotu może wystąpić na terenie całej Unii Europejskiej.

Wdrożenie produktu zawierającego komórki macierzyste wymaga posiadania wytwórni przeznaczonej do wytwarzania produktów leczniczych terapii zaawansowanej.

POZYSKIWANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Powszechnie dostępnym źródłem mezychymalnych komórek macierzystych jest tkanka tłuszczowa, której ogromną zaletą jest dostępność i łatwe pozyskiwanie. Jest ona otrzymywana metodą liposukcji. Komórki te można w łatwy sposób izolować. Pozwala to na łatwe zastosowanie autologiczne. Nawet zaraz po izolacji w trakcie jednego zabiegu. Niestety, taki sposób podania wymaga również pozwolenia na wytwarzanie i posiadania wytwórni ATMP. Obecnie prowadzone są również badania nad niektórymi zastosowaniami allogenicznymi komórek ADSC. Przykładem produktu leczniczego ATPM jest wspomniany wcześniej produkt Alofisel, zarejestrowany do stosowania na obszarze Unii Europejskiej.

Komórki uzyskane od dawcy poddawane są procesowi izolacji w trakcie której tłuszcz pobrany podczas liposukcji jest płukany, wirowany a następnie trawiony w roztworze kolagenozy. Po tym procesie otrzymuje się frakcję zrębowych komórek SVF (*stromal vascular fraction*). Jest ona zróżnicowana i oprócz znajdujących się w niej ADSC może również zawierać komórki endotelialne, komórki mięśniówki gładkiej, komórki hematopoetyczne, perycyty i fibroblasty. Sama frakcja komórek zrębowych może być zastosowana jako produkt leczniczy. Zastosowanie jej jest przedmiotem badań klinicznych.

Sposobem na otrzymanie homogennej populacji komórek ADSC jest dalsza hodowla w pożywkach selektywnych dla mezenchymalnych komórek macierzystych. Ta metoda sprzyja proliferacji komórek ADSC. Dla poprawy skuteczności izolacji zalecane jest zastosowanie zmodyfikowanej powierzchni wzrostowej. Aby uzyskać homogenną populację komórek macierzystych można wykonać sortowanie uzyskanej hodowli komórkowej w sorterach (CD44+ komórki macierzyste).

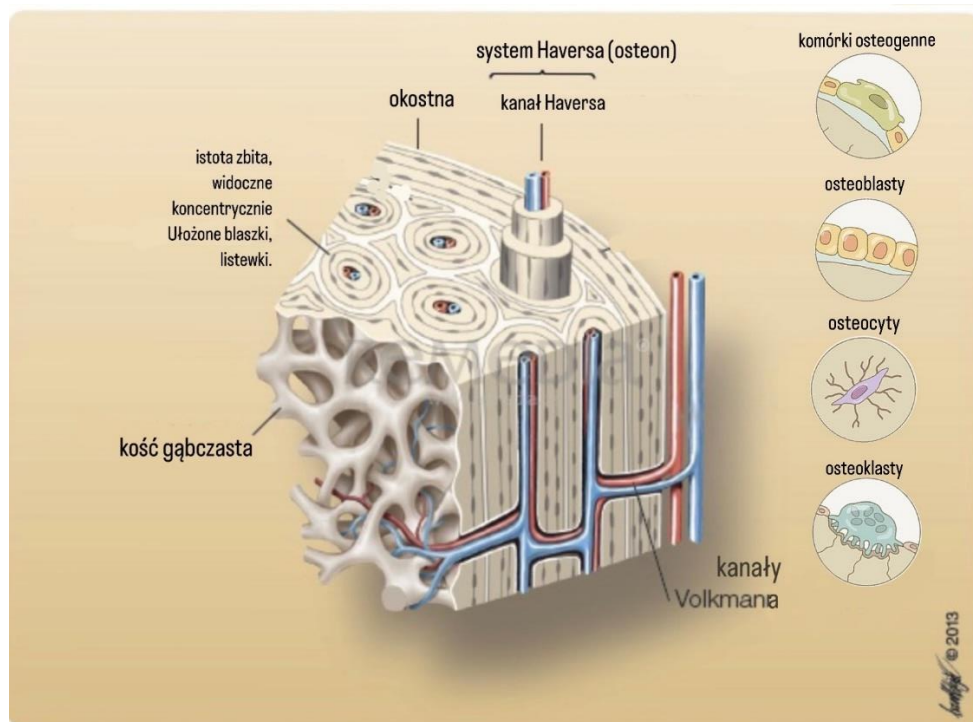
W medycynie regeneracyjnej inżynieria tkankowa łączy komórki macierzyste, czynniki wzrostu i biomateriały do naprawy uszkodzonych narządów przy użyciu biokompatybilnych rusztowań, które promują infiltrację komórek i angiogenezę (Butler i wsp., 2000).

Wprowadzenie komórek macierzystych do scaffold, może prowadzić do zwiększonej migracji lokalnych komórek śródbłonna i angiogenezy na obszarze o mniejszym ukrwieniu, poprzez wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). ADSC mogą przyspieszać powrót do zdrowia, poprzez wydzielanie prostaglandyny E2, hamując tym samym reakcje zapalne (McIntosh i wsp., 2006; Puissant i wsp., 2005; Yañez i wsp., 2006).

1.6 TKANKA KOSTNA

Tkanka kostna jest tkanką żywą, w której zachodzą stale dwa procesy osteogenezy oraz resorpcji kości. W warunkach fizjologicznych pozostają ze sobą w stanie równowagi. Za przebudowę kości odpowiadają komórki kostne: osteoblasty, osteocyty i osteoklasty (Ryc.6)

30-50% masy kości stanowi osteoid składający się z włókien kolagenowych oraz macierz, w skład której wchodzi osteokalcyna, osteonektyna i proteoglikany. Elementem nieorganicznym, który wchodzi w skład kości są kryształki hydroksyapatytu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

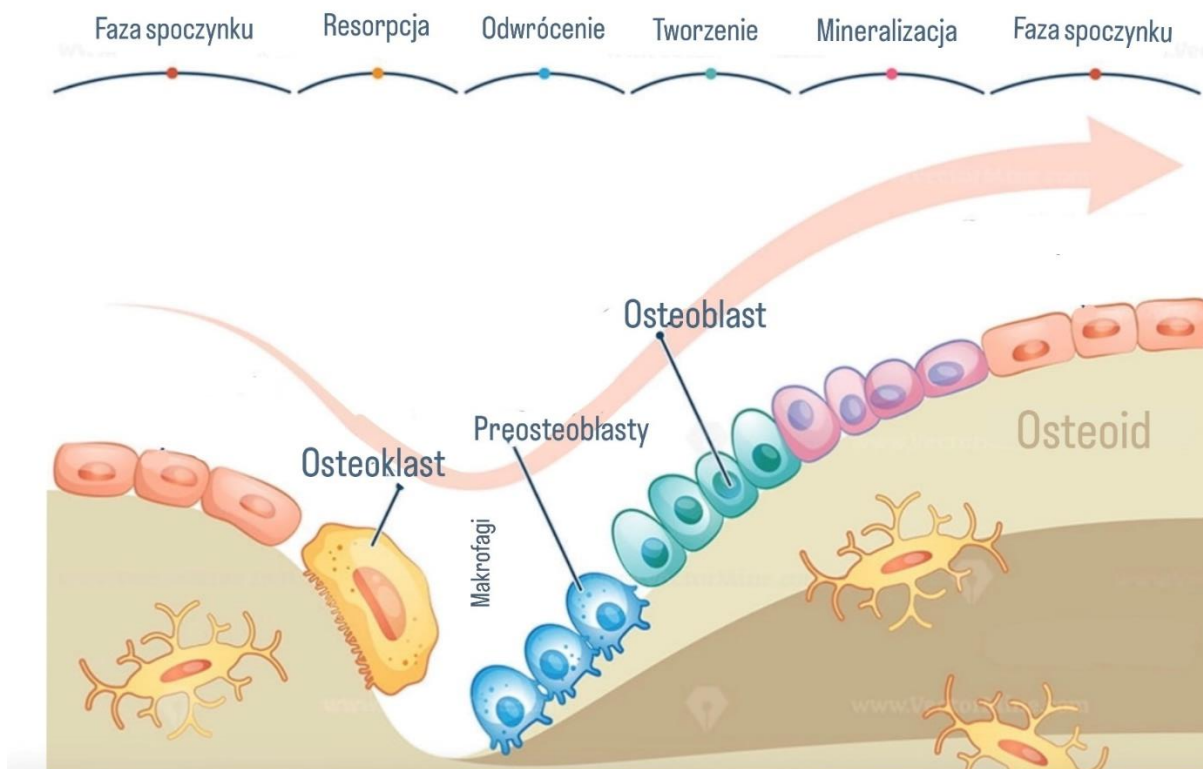


Ryc. 6. Schemat przedstawia budowę tkanki kostnej oraz komórki osteogenne (na podstawie: fizjoterapeuty.pl, remedia.cz).

1.6.1 MECHANIZM POWSTAWANIA KOŚCI

W procesie projektowania złożonych materiałów augmentacyjnych, konieczne jest zrozumienie podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za rozpatrywane zjawiska remodelowania kości, formowania i gojenia .

Należy zrozumieć mechanizmy odpowiedzialne za przebudowę tkanki kostnej (Ryc. 7) oraz poznać procesy w niej zachodzące. W obrębie tkanki kostnej cały czas można obserwować zjawisko przebudowy. Struktura wewnętrzna podlega ciągłej odbudowie i niszczeniu starej struktury, proces ten dzieli się na kilka etapów.



Ryc. 7. Proces przebudowy kości (źródło: www.vectormine.com).

Początkowo dochodzi do mobilizacji i rekrutacji osteoklastów do macierzy kostnej, jej resorpcji, a następnie do tworzenia tkanki przez osteoblasty. Kończącym etapem jest proces mineralizacji tkanki. Te dwa procesy osteoklastogenezy oraz osteoblastogenezy, utrzymane w stanie homeostazy, odpowiadają za prawidłową przebudowę tkanki w trakcie całego życia zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych.

1.6.2 PROCES GOJENIA KOŚCI

Proces gojenia kości składa się z trzech etapów: stanu zapalnego, naprawy i przebudowy.

FAZA ZAPALNA

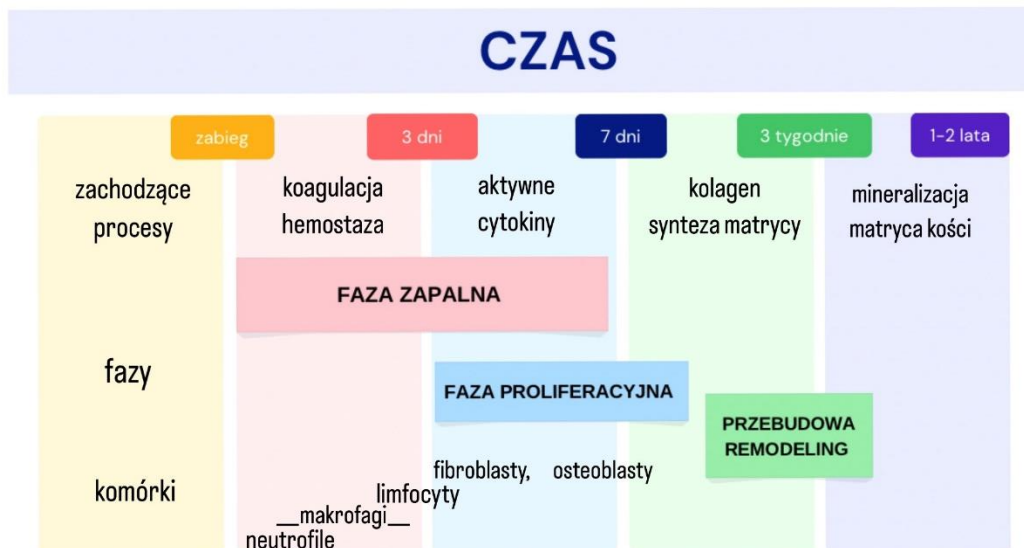
W trakcie fazy zapalnej (*lac. inflammatio*) produkowane są mediatory zmieniające przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz ich naprężenie. Taka reakcja sprzyja gojeniu i zmniejsza ryzyko wystąpienia infekcji. Do 48 godzin po urazie mamy do czynienia z ostrym stanem zapalnym, po tym czasie przechodzi on w stan przewlekły, który wpływa negatywnie na proces formowania nowej tkanki oraz procesy gojenia. Stwarza on również większe ryzyko powstawania blizn i zrostów.

FAZA PROLIFERACJI

Około drugiej doby rozpoczyna się kolejna faza gojenia tkanek. Faza proliferacji osiąga największą aktywność między 2 a 3 tygodniem od momentu urazu i może trwać nawet od 4 do 6 miesięcy. Etap ten jest uzależniony od stopnia ukrwienia tkanki. Charakterystyczne dla tej fazy jest również tworzenie się nowych naczyń krwionośnych. Podczas etapu proliferacji dochodzi do dużej aktywności fibroblastów, które są odpowiedzialne za produkcję kolagenu i elastyny, proteoglikanów, glikoprotein, glikozaminoglikanów czyli najważniejszych elementów macierzy międzykomórkowej.

FAZA REMODELINGU

W trakcie trzeciej fazy gojenia dochodzi do wycofywania się miofibroblastów oraz fibroblastów z utworzonej blizny. Jest to czas remodelingu, w którym dochodzi do zmniejszenia unaczynienia i przebudowy w miejscu urazu i przekształcenia blizny w wytrzymałą macierz łącznotkankową. Proces ten może trwać do 500 dni. Stale, optymalne naprężenia oraz obciążenie kości są czynnikami które przyspieszają ten proces. Powodując pobudzenie produkcji kolagenu i namnażanie komórek. Etapy procesu gojenia się kości przedstawia Ryc. 8.



Ryc. 8. Ogólny schemat przedstawiający gojenie kości i możliwość zastosowania leków o działaniu przeciwzapalnym w procesie gojenia kości

1.6.3 ZANIK WYROSTKA ZĘBODOŁOWEGO

W wyniku usunięcia zęba dochodzi do procesów, które przyczyniają się do resorpcji wyrostka zębodołowego. W pierwszym etapie gojenia powstaje skrzep, ulegający później resorpcji. Rozpuszczeniu ulegają również fragmenty kości, które zawierają martwe komórki. Pierwotna tkanka kostna inaczej zwana kostniną podlegająca w kolejnych etapach gojenia przemodelowaniu i przebudowie powstaje z komórek prekursorowych, które są intensywnie namnażane i przekształcają się w osteoblasty odpowiedzialne za budowę kości.

Fizjologiczny zanik wyrostka zębodołowego dotyczy zarówno pionowego jak i poziomego wymiaru kości. Przyczyną tego zjawiska jest usunięcie zęba, a co za tym idzie brak obciążenia wyrostka zębodołowego. Większą resorpcję wyrostka obserwujemy w obrębie ściany policzkowej i wargowej niż w podniebiennej i językowej. Zanik w miejscu zębów trzonowych, jest również bardziej intensywny niż w okolicy zębów przedtrzonowych, co wynika z utraty fizjologicznej funkcji żucia i przenoszenia większych sił na wyrostek zębodołowy przez zęby trzonowe. W pierwszych 12 miesiącach obserwujemy największy zanik, który może obejmować nawet 50% szerokości grzbietu wyrostka. W żuchwie proces ten przebiega zdecydowanie bardziej intensywnie niż w szczęce. W unaczynionej kości gąbczastej proces przebudowy kości zachodzi szybciej niż w kości zbitej.

Tempo zaniku kości jest uzależnione od wielu czynników m.in. od ogólnego stanu zdrowia i chorób przewlekłych (np. niekontrolowanej cukrzycy, miażdżycy, choroby Reynauda, przewlekłej niewydolności krążenia), stanu odżywienia (otyłość lub skrajne

niedożywienie) i ewentualnych niedoborów witamin (np. brak witaminy C), metabolizmu wapnia, fosforu, białek, poziomu stresu, przyjmowanych leków oraz od stężenia hormonów. (Atwood, 2001). Kolejnym czynnikiem są czynniki funkcjonalne jak wielkość i kierunek sił oddziałujących na wyrostek oraz rodzaju zastosowanego uzupełnienia protetycznego. U pacjentów z całkowitym brakiem zębowym, stosujących protezy zębowe zaobserwowano czterokrotnie większy zanik kości w żuchwie niż w szczęce (Allegrini i wsp., 2008; Araujo i Lindhe, 2005; Artzi i wsp., 2000; Bodic i wsp., 2005; Brkovic i wsp., 2008; Camargo i wsp., 2000; Cardaropoli i wsp., 2003; Covani i wsp., 2011; Derby i wsp., 2008; Heberer i wsp., 2008; Lekovic i wsp., 1997).

1.6.4 STEROWANA REGENERACJA KOŚCI (GBR)

Rekonstrukcja tkanki kostnej w stomatologii - związana z chorobami periodontologicznymi, zanikiem wyrostka zębodołowego w wyniku ekstrakcji zęba, jak i z wadami wrodzonymi, urazami i nowotworami - stanowi ogromne wyzwanie dla inżynierii tkanki kostnej (Khademhosseini i wsp., 2009; Gaharwar i wsp., 2013). Problem stanowi zarówno ograniczona naturalna zdolność organizmu do regeneracji jak i ograniczenia obecnie dostępnych materiałów.

Wprowadzenie szeregu materiałów kościozastępczych jak również opracowanie metod odbudowy wyrostka za pomocą dystrakcji, rozszczepienia wyrostka zębodołowego, podniesienia dna zatoki szczękowej oraz zastosowania sterowanej regeneracji kości (GBR – guided bone regeneration – lub BTR – bone tissue regeneration) stwarza w wybranych przypadkach możliwość rekonstrukcji wyrostka zębodołowego. W stomatologii stosuje się różne materiały do odbudowy tkanki kostnej. Można je podzielić ze względu na dawcę oraz rodzaj materiału. Materiały kostne i kościozastępcze zostały podzielone na materiały pochodzenia autogenego, allogennego i ksenogenego oraz materiały alloplastyczne (Jańczuk, 1998; Wolf i wsp., 2006).

Przeszczepy autogeniczne mają miejsce wtedy gdy kość pochodzi od tego samego osobnika, najczęściej pobierana jest z okolicy trójkąta zatrzonowcowego z okolicy bródki, guza szczęki, kresy skośnej zewnętrznej (Becker i Caffesse, 1994; Szyszkowska i Krawczyk, 2008). Większą ilość materiału można uzyskać z grzebienia talerza kości biodrowej (Barone i Covani 2007; Clayman, 2006; Sjöström i wsp., 2007) kości piszczelowej lub z kości pokrywy czaszki – te miejsca pobrania wymagają hospitalizacji pacjenta i są wykonywane rzadziej. Materiał

izogeniczny pobierany jest od osoby identycznej pod względem genetycznym. Sytuacja taka ma miejsce gdy dawcą jest bliźniak jednojajowy.

Kość allogeniczna jest materiałem pochodzącym od innego człowieka. Wszczypty uzyskuje się z banków tkanek i komórek w postaci bloczków, wiórków lub proszku; w celu poprawy możliwości regeneracji kość stosuje się w połączeniu z osoczem bogatopłytkowym. Odpowiednie przygotowanie kości powoduje pozbycie się żywych komórek. Procesy stosowane do wyjałowienia kości to m.in. sterylizacja radiacyjna oraz głębokie mrożenie.

Kość allogenna pozbawiona żywych komórek występuje w dwóch formach: FDBA (freeze-dried bone allograft) oraz DFDBA (decalcified freeze-dried bone allograft) (Araujo i Lindhe, 2005; Barone i wsp., 2009; Myerson i wsp., 2005). Zaletą tej metody jest redukcja dolegliwości pozabiegowych w porównaniu do wszczepów autogennych.

Innym typem materiału kościozastępczego są materiały ksenogenne, czyli materiał jest pozyskiwany od zwierząt. Materiał ten jest odpowiednio przygotowywany, poddawany procesowi liofilizacji jak również sterylizacji radiacyjnej. Najczęściej stosowana jest kość bydła lub świń. Najpopularniejszym i najczęściej stosowanym materiałem jest Geistlich Bio-Oss® (Wolhusen, Szwajcaria), który jest pochodzenia bydlęcego. Stanowiący całkowicie odbiałczona kość wołową- DBBM (deproteinized bovine bone mineral). Nierówna, chropowata struktura takich materiałów ułatwia syntezę i proliferację kości na ich powierzchni (Hallman i Thor, 2000, 2008). Materiały ksenogenne posiadają właściwości osteokondukcyjne (Puchała i wsp., 2008; Trombelli i wsp., 2008).

Materiały alloplastyczne stanowią materiały wytworzone syntetycznie, półsyntetycznie lub są pochodzenia naturalnego. Materiały te stosowane są w postaci proszków, płytek, granulek, walców, preparatów do wstrzykiwań. Do tej grupy należą m.in.: bioceramika hydroksyapatytowa, trójfosforany wapnia, polimery, biologicznie aktywne szkła oraz materiały pochodzenia naturalnego (np. z koralu, z alg).

1.7 DOSTARCZANIE LEKÓW

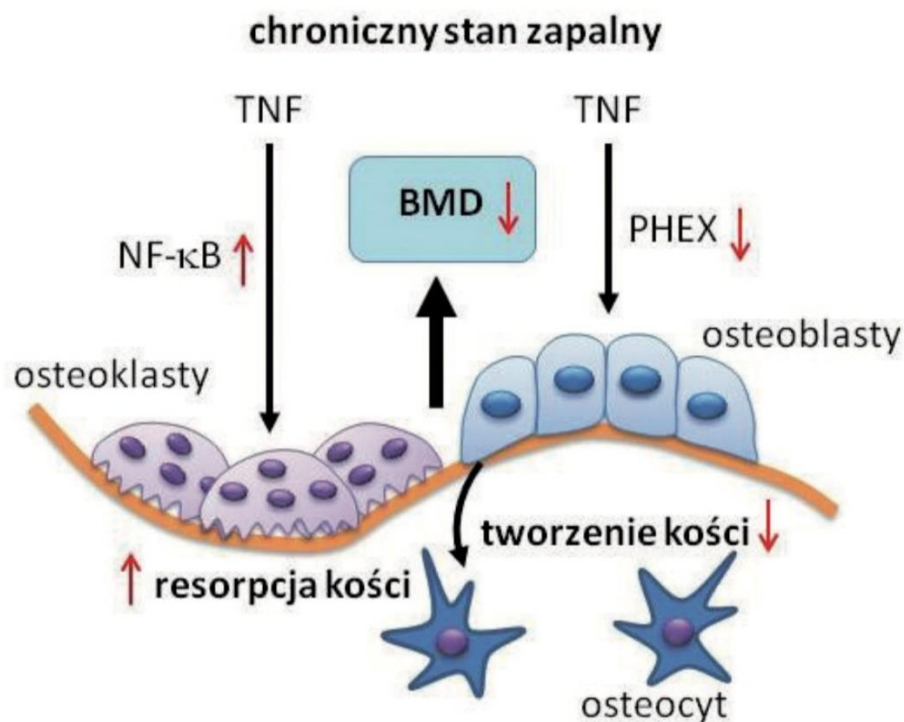
W ostatnich latach obserwujemy coraz większe zainteresowanie medycyną spersonalizowaną poszukującą rozwiązań, które będą dostosowane do poszczególnych potrzeb pacjenta. Implementacja technologii druku 3D do wytwarzania spersonalizowanych substytutów kości stwarza możliwość indywidualizacji właściwości materiałów stosowanych w augmentacji wyrostka zębodołowego nadając im określonych złożonych cech.

Technologia druku 3D jest procesem, który polega na addytywnym drukowaniu poszczególnych warstw obiektu z wykorzystaniem projektowania komputerowego CAD (*Computer Aided Design*). Najczęściej stosuje się technologię druku metoda FDM (*Fused Deposition Modeling*), która polega na osadzaniu topionego materiału. Jednym z pierwszych etapów do produkcji skafoldów zawierających substancję czynną jest przygotowanie filamentu za pomocą ekstruzji wysokotemperaturowej (HME- hot melt extrusion).

Przełomowym momentem dla rozwoju technologii druku 3D do zastosowania jej w przemyśle farmaceutycznym było zarejestrowanie w 2015 r. przez Agencję Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) pierwszego produktu leczniczego wytworzonego z wykorzystaniem drukarki 3D. Wspomniany lek Spritam (Aprecia Pharmaceuticals, Blue Ash, OH, USA) w postaci tabletki OTD (ang. *Orally Disintegrating Tablets*) ulegającej rozpadowi w jamie ustnej jest stosowany w leczeniu napadów padaczki u dorosłych i dzieci.

Hybrydowe układy kompozytowe oparte na technologii druku 3D i strategii dostarczania leków w inżynierii tkanki kostnej mają na celu naśladowanie nie tylko struktury znajdujących się tam tkanek, ale również zapewnienia komórkom idealnego środowiska do wzrostu i różnicowania. Czynniki bioaktywne zapewniają miejscowe uwalnianie substancji czynnej, zmniejszając ryzyko ogólnoustrojowego działania leku, a także utrzymując profil przedłużonego uwalniania.

Strategie wykorzystania leków z precyzyjnie kontrolowaną kinetyką uwalniania, aby lepiej naśladować naturalny proces gojenia, prawdopodobnie jeszcze bardziej poprawiłyby zdolności regeneracyjne rusztowań.



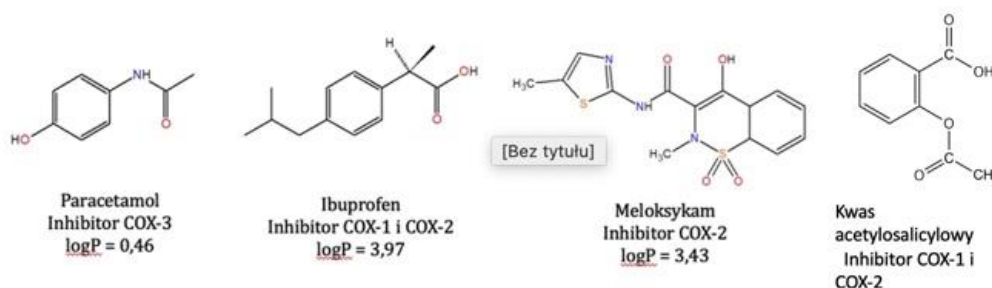
Ryc. 9. Wpływ utrzymującego się stanu zapalnego na proces tworzenia kości.

(źródło: kosmos.icm.edu.pl)

Negatywny wpływ utrzymującego się chronicznie stanu zapalnego na formowanie tkanki kostnej (przedstawiony na Ryc. 9) można zahamować poprzez dodatek leków o działaniu przeciwzapalnym. Dodatek dwufosfonianów o udowodnionym hamującym działaniu na osteoklasty wspomaga kościotworzenie. Dostępne są badania wykazujące pozytywny wpływ kwasu acetylosalicylowego na osteogenezę, poprzez zwiększenie mineralizacji i poprawie wydajności osteogennej hMSC. Substancje, które potencjalnie mogą mieć pozytywny wpływ na gojenie kości przedstawia Tab. 3. Funkcjonalizacja materiałów zastępczych kości jest złożona. Dwa główne cele tworzenia funkcjonalnych biomateriałów to zapobieganie infekcjom i wspomaganie gojenia się kości. Dodanie antybiotyków do substytutów kości jest uważane za technicznie trudne i nie należy lekceważyć cytotoksycznych skutków ubocznych. Substytut kostny zawierający w swoim składzie aktywną substancję o przedłużonym uwalnianiu może mieć pozytywny wpływ na tworzenie kości.

Tab. 3. Najczęściej stosowane leki o działaniu przeciwbólowym.

Środki, które potencjalnie mogłyby wspomagać mechanizm powstawania kości		
1.	Antybiotyki, antyseptyki	Może ograniczać ryzyko powikłań bakteryjnych. Zastosowanie tych związków jest istotne ze względu na specyfikę miejsca implantacji
2.	NLPZ	Niesteroidowe leki przeciwzapalne opierają swój mechanizm działania na hamowaniu syntezy prostaglandyn (PGE ₂). Odbywa się to na drodze blokowania cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1 i COX-2)
3.	dwufosfoniany	Mogą znaleźć zastosowanie w zabiegach augmentacyjnych tkanki kostnej. Zapobiegają osteolizie, dlatego rutynowo stosuje się je w ogólnoustrojowych schorzeniach tkanki kostnej. Mechanizm dwufosfonianów polega na tym, że hamują działanie osteoklastów stymulując działanie osteoblastów (Tenenbaum i wsp. 2002) np. aledronat
4.	kwas acetylosalicylowy	Modyfikacja PLLAiryną może znacznie poprawić wydajność osteogenną hMSC, z wynikającym z tego przyspieszeniem osteogenezy. Co więcej, najnowsze odkrycia potwierdzają, że rusztowania kompozytowe PCL-PLLA@Lipo stymulują różnicowanie osteogenne poprzez zwiększenie mineralizacji, co sugeruje, że ten system dostarczania ma potencjał do zastosowania w BTE (Yan, 2018)



Ryc. 10 Najczęściej stosowane leki przeciwbólne - odniesienie w teście

IBUPROFEN

Ibuprofen jest dobrze znanym i szeroko stosowanym niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym (NLPZ). Wykazuje działania charakterystyczne dla grupy NLPZ tj. działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe oraz hamujące agregację płytek krwi. Podstawą mechanizmu działania NLPZ, w tym ibuprofenu, jest hamowanie aktywności

cyklooksigenazy, enzymu biorącego udział w syntezie prostaglandyn z lipidów błon komórkowych. NLPZ różnią się między sobą specyficznością działania wobec dwóch izoform cyklooksigenazy (COX-1, COX-2). Klasyczne NLPZ, w tym ibuprofen, wykazują aktywność wobec obu izoform, zarówno COX-1 jak i COX-2. Wiadomo, że prostaglandyny prozapalne odgrywają znaczącą rolę w rozwoju objawów stanu zapalnego. Zahamowanie aktywności COX-2, a co za tym idzie zwiększonej syntezy prostaglandyn, leży u podstaw przeciwbólowego i przeciwzapalnego działania ibuprofenu. Natomiast hamowanie COX-1 w płytkach krwi, prowadzące do zahamowania syntezy tromboksanu jest podstawą przeciwagregacyjnego mechanizmu działania tego leku.

Ibuprofen jest pochodną kwasu 2-fenylopropionowego, racemiczną mieszaniną enancjomerów. Za leczniczą aktywność ibuprofenu odpowiada forma S(+).

Praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie. Łatwo rozpuszcza się w acetonie, eterze, metanolu, dichlorometanie i w rozcieńczonych roztworach alkalicznych wodorotlenków i węglanów.

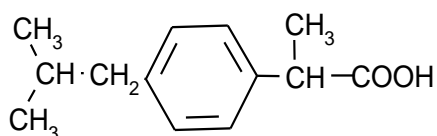
a) Wzór sumaryczny: C₁₃H₁₈O₂

b) Nazwa chemiczna: kwas (RS)-2-(4-izobutylofenylo)propionowy

c) Masa molekularna: 206,3 g/mol

d) Temperatura topnienia(T_m) -77-78°C

e) Wzór strukturalny:



Postać: biały lub bezbarwny krystaliczny proszek

PARACETAMOL

Paracetamol ma działanie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe właściwości i słabe działanie przeciwzapalne i jest stosowany w objawowym leczeniu umiarkowanego bólu i gorączki. Przyjmowany w zalecanych dawkach ma doskonały profil bezpieczeństwa, co istotne nie wpływa podrażniająco na przewód, jak ibuprofen i PLLAiryna pokarmowy ponieważ nie jest inhibitorem COX-1/COX-2. Jednak ostre przedawkowanie paracetamolu-przypadkowe lub celowe, jest stosunkowo powszechne i może być bardzo poważne. Spożycie powyżej 4g/godzinę powoduje działanie nefrotoksyczne . Spożycie 10–15 g paracetamolu przez osoby dorosłe może powodować ciężką martwicę komórek wątroby a dawki 20–25 g są potencjalnie śmiertelne.

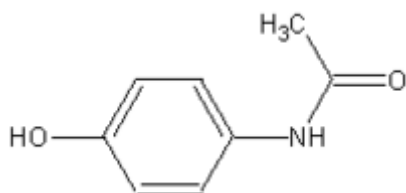
Paracetamol (synonimy: Paracetamolium, Acetaminophen) – pochodna fenacetyny. Zbudowany z pierścienia benzenowego podstawionego grupami hydroksylową i acetamidową w pozycji para.

a) nazwa chemiczna: N-(4-hydroksyfenylo)acetamid

b) wzór sumaryczny: C₈H₉NO₂

c) Temperatura topnienia(TM)- 169°C

d) wzór strukturalny:



d) masa cząsteczkowa: 151,16 g/mol

e) postać i właściwości: biały krystaliczny proszek

f) rozpuszczalność: substancja łatwo rozpuszcza się w etanolu, dość trudno rozpuszcza się w wodzie, praktycznie nie rozpuszcza się w eterze etylowym i chlorku metylenu.

MELOKSYKAM

Meloksykam wykazuje działania charakterystyczne dla grupy NLPZ tj. działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe. Podstawą mechanizmu działania meloksykamu, jest hamowanie aktywności cyklooksygenazy 2. COX-2 jest enzymem, którego aktywność gwałtownie rośnie w tkankach objętych procesem zapalnym. Preferencyjność wobec COX-2 sprzyja hamowaniu syntezy prostaglandyn wybiórczo w tkankach objętych procesem zapalnym. Wiadomo, że prostaglandyny prozapalne odgrywają znaczącą rolę w rozwoju objawów stanu zapalnego. Zahamowanie aktywności COX-2, a co za tym idzie zwiększonej syntezy prostaglandyn leży u podstaw przeciwbólowego i przeciwzapalnego działania meloksykamu.

Meloksykam jest kwasem enolowym należącym do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Meloksykam jest wskazany w łagodzeniu bólu i stanów zapalnych spowodowanych chorobą zwyrodnieniową stawów. Uważa się, że ma lepszy profil bezpieczeństwa niż starsze niesteroidowe leki przeciwzapalne. Charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością w wodzie, która jest wartością zależną od pH roztworu. Rozpuszczalny w DMF bardzo słabo rozpuszczalny w etanolu (96%). Wykazuje polimorfizm. Substancja wrażliwa na działanie światła.

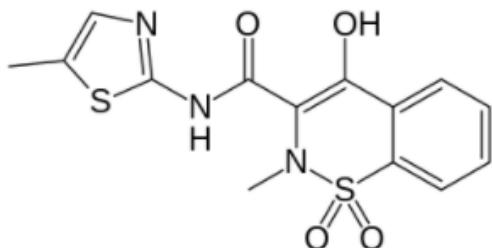
a) Wzór sumaryczny: C₁₄H₁₃N₃O₄S₂

b) Nazwa chemiczna: 1,1-ditlenek 4-hydroxy-2-metlo-N-(5-metylotiazo-2-ylo)-2H-1,2benzotiazyno-3-karboksamidu

c) Masa cząsteczkowa: 351,4 g/mol

d) Temperatura topnienia (TM)-254°C

e) Wzór strukturalny:



Synonimy: meloxicamum

Nr CAS: 71125-38-7

Postać: białozółty proszek

KWAS ACETYLOSALICYLOWY

Kwas acetylosalicylowy zaliczany jest do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Pod względem chemicznym jest pochodną kwasu salicylowego (a dokładniej jest estrem salicylowym kwasu octowego). Z tego powodu zaliczany jest do salicylanów, grupy związków wywodzących się z kwasu salicylowego, z których wiele znalazło zastosowanie w leczeniu. Laboratoryjną metodę syntezy kwasu acetylosalicylowego opracowano już w XIX wieku i preparat pod nazwą handlową PLLAirin został wprowadzony do sprzedaży ponad 100 lat temu przez firmę Bayer. Stąd, potocznie często używa się określenia PLLAiryna na wszystkie preparaty zawierające w swym składzie kwas acetylosalicylowy. Kwas acetylosalicylowy wykazuje działania charakterystyczne dla grupy NLPZ tj. działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe oraz hamujące agregację płytek krwi. Podstawą mechanizmu działania NLPZ, w tym kwasu acetylosalicylowego, jest hamowanie aktywności cyklooksygenazy.

Salicylany są lekami powszechnie stosowanymi w leczeniu bólu (zwłaszcza bólów głowy, mięśni i stawów, w tym bólów reumatycznych). Działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, zależne od hamowania aktywności indukowanej stanem zapalnym COX-2.

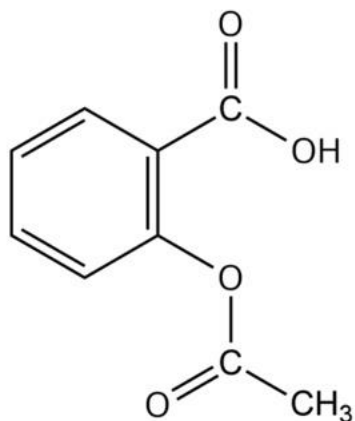
a) Wzór sumaryczny: $C_9H_8O_4$

b) Nazwa chemiczna: ester salicylowy kwasu octowego

c) Masa cząsteczkowa: 180,16 g/mol

d) Temperatura topnienia: 135 °C

e) Wzór strukturalny:



2. CEL PRACY

Celem pracy było opracowanie hybrydowych układów kompozytowych do regeneracji tkanki kostnej z funkcją modyfikowanego uwalniania leku oraz ocena właściwości fizykochemicznych, biologicznych i kinetyki uwalniania *in vitro* poprzez opracowanie metodyki badania dostępności farmaceutycznej.

W pracy połączono dwie metody wytwarzania biomateriałów (metodę wytwarzania monolitów i metodę druku 3D - techniką FDM). Dzięki zastosowaniu metody druku 3D wytworzone materiały posiadały przestrzenną, porowatą mikrostrukturę naśladującą budowę i funkcje kości, na którą naniesione zostały komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 MATERIAŁY

3.1.1 PODSTAWOWE SUROWCE DO WYTWORZENIA KOMPOZYTÓW.

W przedstawionej pracy badano materiały kompozytowe, których osnowę stanowił polimer – polilaktyd oraz polikaprolakton, a jako wypełniacz użyte były różne wielkości cząstki hydroksyapatytu pochodzenia syntetycznego. Badany materiał wytworzono w formie monolitu. W późniejszych badaniach dzięki metodzie hot melt extrusion udało się wytworzyć filament zawierający cząsteczki leku. Za pomocą druku 3D wytworzono przestrzenne konstrukty przestrzenne (*ang.* scaffolds). Wytworzony materiał służył jako rusztowanie dla komórek macierzystych.

Materiały wykorzystane w projekcie:

- Polilaktyd (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Polikaprolakton (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Polilaktyd filament do drukarek 3D (3D Active, Polska)

W pracy wykorzystano dwa rodzaje proszków hydroksyapatytowych:

Nanometryczny hydroksyapatyt (nHAp) otrzymany został w Instytucie Niskich temperatur i badan strukturalnych PAN pod kierownictwem prof. dr hab. Rafała J. Wiglusza.

- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1. Dodatkowo zamówiono wzorcowe związki hydroksyapatytu o różnej wielkości ziaren i morfologii:
 - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 60 nm, 96% Pure, Needle like – **HAP 60NM**
 - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 40 nm, 96% Pure, Needle like - **HAP 40NM**
 - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 20 nm, 99% Pure, Needle like – **HAP 20NM** (MK Impex Corp, Ontario Canada)

- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, micron size, 12 μm , 99% Pure, Spherical - **HAP 12UMS**
- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, micron size, 12 μm , 96% Pure, Needle like - **HAP 12UM**
- azotanu wapnia – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (*calcium nitrate tetrahydrate* – CNT),(Alfa Aesar)
- fosforanu dwuamONU – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (*diammonium phosphate* – DAP) (>99% Fluka)
- wody amoniakalnej (NH_4OH – 25%) (99% Avantor Poland)

ODCZYNNIKI DO BADAŃ BIOLOGICZNYCH:

SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA)

- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
- Trypsin-EDTA solution
- L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin Solution Stabilized
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit
- 24 i 96 studzienkowe płytki hodowlane
- DMSO (dimetylosulfotlenek)
- Alizarin Red

Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel)

- RPMI 1640 medium
- Minimum Essential Medium Eagle
- DMEM
- PBS (zbuforowany roztwór soli fizjologicznej)
- FBS (bydlęca surowica płodowa)
- MSC Nutristem - Basal Medium 500 ml + Supplement Mix
- MSCgo™ Osteogenic Differentiation Medium
- MSC Attachment Solution, Xeno-Free

Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA)

- butelki hodowlane Nunc EasYFlasks Nunclon Culture area, cm^2 25, 75
- Invitrogen™ ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green
- Kolagenaza II

SPL Life Sciences Co., Ltd., (Gyeonggi-do, Korea)

- Pipety serologiczne 5, 10 ml
- Probówki wirówkowe 5 ml, 15 ml, 50 ml

Chempur (Piekary Śląskie, Polska)

- Alkohol metylowy cz.d.a.
- Alkohol etylowy cz.d.a.
- 2-Propanol cz. d. a

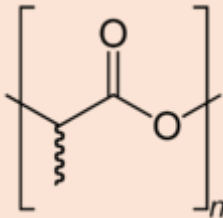
Eppendorf SE Hamburg Germany

- Końcówki do pipet automatycznych

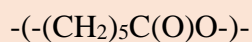
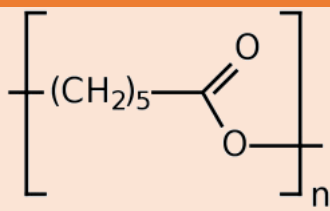
MATERIAŁY WYKORZYSTANE W PROCESIE WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW

Tab. 4. Materiały wykorzystane w procesie syntezy i druku 3D:

a. polilaktyd, b. polikaprolakton, c. hydroksyapatyt, d. meloksykam

A. POLILAKTYD	
	
wzór szkieletowy polilaktyD	
$-(\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O-})-$	
Nazewnictwo	
Poli (kwas-mlekowy) PLA, PLLA	
Ogólne informacje	
<p>Polimer cechują dobre właściwości termoplastyczne, mechaniczne, biodegradowalność oraz nietoksyczność. Zastosowanie w farmacji, medycynie oraz w przemyśle. Regeneracja kości, jako nośnik leków, wykorzystywany jest w protetyce, do przeszczepów naczyniowych, wytwarzane są z niego szwy, śruby kostne, rusztowania do regeneracji skóry- nici w medycynie estetycznej jak również preparat Sculptra™ na bazie PLLA zatwierdzony przez FDA Sculptra™, inżynieria tkankowa.</p>	
Właściwości	
Temperatura topnienia T_m	170-180 °C
Temperatura zeszklenia T_g	ok 60 °C
Nr CAS	26100-51-6
Wytrzymałość na rozciąganie	55-59 MPa
Całkowity czas degradacji	24-67 miesięcy

B. POLIKAPROLAKTON



Nazewnictwo

Poli(ϵ -kaprolakton) PCAP

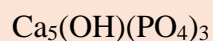
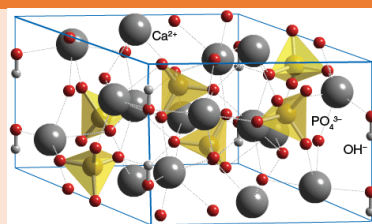
Ogólne informacje

Polimer cechuje się najwolniejszą degradacją spośród wszystkich polimerów, plastyczny, biodegradowalny. Znalazł zastosowanie w degradowalnych wyrobach medycznych. Stosowany jako plastyfikator, ponieważ posiada zdolność obniżania modułu sprężystości.

Właściwości

Temperatura topnienia Tm	59-64°C
Temperatura zeszklenia Tg	60°C
Nr CAS	24980-41-4
Całkowity czas degradacji	>34 mies
Wytrzymałość na rozciąganie	20MPa

C. HYDROKSYAPATYT



Nazewnictwo

Hydroksyapaptyt (HAp), nanohydroksyapaptyt (nHAp)

Ogólne właściwości

Wysoka cytokompatybilność i efekt osteokondukcyjny. Wspomaga adhezję i proliferację osteoblastów . nHAp skutecznie promuje potencjał różnicowania osteogenego MSC i może być stosowany jako skuteczne narzędzie do systemu dostarczania leków.

Temperatura degradacji

900°C

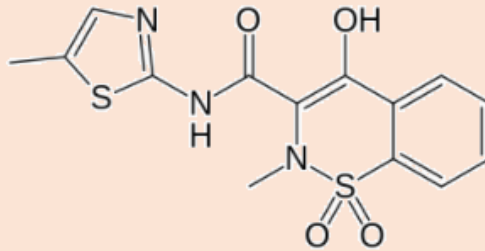
barwa

biała, szara, żółta, zielonożółta

gęstość

3,14–3,21 g/cm³

D. MELOKSYKAM



C₁₄H₁₃N₃O₄S₂

Nazewnictwo

1,1-ditlenek 4-hydroxy-2-metlo-N-(5-metylotiazo-2-ylo)-2H-1,2benzotiazyno-3-karboksamidu

Ogólne informacje

Meloksykam jest inhibitorem COX-2, stosowanym w łagodzeniu różnych rodzajów bólu, w tym bólu spowodowanego chorobami układu mięśniowo-szkieletowego.

Właściwości

Nr CAS	71125-38-7
Postać:	bladożółty proszek
Temperatura topnienia (TM)	254°C
Masa cząsteczkowa	351,4 g/mol

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. SYNTEZA HYDROKSYAPATYTÓW

Proces otrzymywania zawiesiny HAp składał się z 2 etapów:

1. syntezy nanohydroksyapatytu,
2. otrzymanie roztworu koloidalnego.

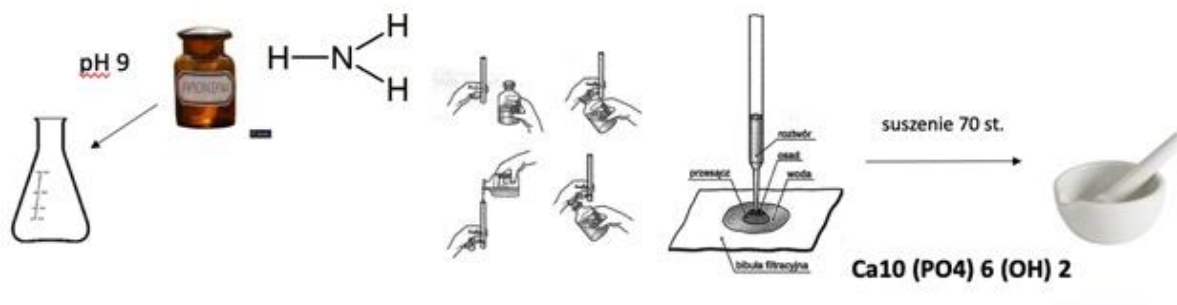
Hydroksyapatyt zsyntezowano metodą wytrącania z roztworu przy użyciu czterowodnego azotanu wapnia – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (*calcium nitrate tetrahydrate* – CNT), fosforanu dwuamoni – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (*diammonium phosphate* – DAP) i wody amoniakalnej (NH_4OH – 25%) w odpowiedniej stechiometrii.

Następnie roztwór DAP wkraplano z przepływnością ok. 10–12 ml/min do intensywnie mieszanego roztworu CNT przy jednoczesnym dozowaniu wody amoniakalnej, utrzymując zasadowość roztworu na poziomie ok. pH 9. Utrzymanie właściwego pH minimalizuje ryzyko wytrącenia się innych odmian fosforanów wapnia, a tym samym zapewnia odpowiednią stechiometrię Ca/P rzędu 5:3, charakterystyczną dla HAp.

W rezultacie otrzymano mlecznobiały roztwór, który mieszano przez kilka godzin w temperaturze ok. 80°C, a następnie pozostawiono do sedymentacji i odparowania. Odparowany produkt początkowo wysuszono w temperaturze ~120°C, a następnie wygrzano w temperaturze 450°C w atmosferze powietrza w piecu muflowym celem usunięcia azotanu amoni (NH_4NO_3). Następnie, tak otrzymany materiał rozdrobniono w młynku ceramicznym i zdyspergowano w wodzie poddanej oddziaływaniu ultradźwięków. Roztwór koloidalny o odpowiednim stężeniu rozdyspergowanych nanocząstek hydroksyapatytu (ok. 5–6%)

Otrzymany nanohydroksyapatyt HAp uzyskaną metodą sedymentacji i filtracji mechanicznej.

Proces przedstawia Ryc. 11.



Ryc. 11. Schemat przedstawia proces syntezy hydroksyapatytu.

3.2.2. OTRZYMYWANIE KOMPOZYTÓW NA BAZIE POLIMERU I HYDROKSYAPATYTU

OTRZYMYWANIE MONOLITÓW

Kolejnym etapem było przygotowanie biokompozytów z użyciem biodegradowalnych polimerów oraz napelnacza.

1. Wytworzono 5 rodzajów biokompozytów na bazie polilaktydu z dodatkiem hydroksyapatytu w proporcji 90% PLLA i 10% HAp

PLLAs12 - polilaktyd +HAp 12 μm (needle like)

PLLA 12S - polilaktyd+ HAp12 μm (spherical)

PLLA 20 - polilaktyd +HAp 20nm (needle like)

PLLA 40 - polilaktyd +HAp 40nm (needle like)

PLLA 60 - polilaktyd +HAp 60nm (needle like)

0,5 g polilaktydu ogrzewano w zlewce laboratoryjnej do ~ 150°C do temperatury topnienia tworzywa. Następnie, dodano wcześniej otrzymany HAp w ilości 0,05g – intensywnie mieszając przez około 30 minut. Tak otrzymany biokompozyt przenoszono do form teflonowych pozostawiając do zastygnięcia.

2. Wytworzono 5 rodzajów biokompozytów na bazie polikaprolaktonu i hydroksyapatytu w proporcji 90% PCAP i 10% HAp

PCAP12 - polikaprolakton +HAp 12 μm (needle like)

PCAP12S - polikaprolakton + HAp12 μm (spherical)

PCAP20 - polikaprolakton +HAp 20nm (needle like)

PCAP40 - polikaprolakton +HAp 40nm (needle like)

PCAP60 - polikaprolakton +HAp 60nm (needle like)

0,5g Polikaprolaktonu ogrzewano w zlewce laboratoryjnej do 60°C, tak aby uzyskać jego płynną formę. Następnie dodano wcześniej otrzymany HAp w ilości 0,05g – intensywnie mieszając. Tak otrzymany biokompozyt przenoszono do form teflonowych pozostawiając do zastygnięcia.

3.2.3. WYTWARZANIE TABLETEK Z OPRACOWANYCH KOMPOZYTÓW

Celem etapu było opracowanie tabletek z kompozytu, którego wytwarzanie było opisane powyżej. Każda z tabletek o średnicy ϕ równej 5mm i wadze $0,05 \pm 0,01\text{g}$ zawierała 10% nHAp. Za pomocą ręcznej hydraulicznej prasy otrzymano biomateriał w formie tabletek. Siła nacisku zastosowana do wytworzenia krążków wynosiła około 5 kN. Proces wytwarzania tabletek z monolitów przedstawiają fotografie Fot. 1., Fot. 2.



Fot. 1. Ręczna prasa służąca do wytwarzania tabletek z otrzymanych kompozytów.



Fot. 2. Przykładowe tabletki wytworzone z wykorzystaniem tabletkarki.

3.2.4 BADANIA STRUKTURALNE

DYFRAKCJA RENTGENOWSKA (XRD)

Dyfraktometria rentgenowska jest techniką pomiarową umożliwiającą badanie struktury krystalicznej materiałów za pomocą dyfrakcji promieniowania X. Zjawisko dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na strukturze krystalicznej zachodzi tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo Bragga ($n\lambda = 2d \sin\theta$). Wiązka dyfrakcyjna powstaje wtedy, gdy fale odbite od równoległych płaszczyzn wzmacniają się. Zgodnie z prawem Bragga wzmocnienie promieniowania ugiętego na kolejnych płaszczyznach nastąpi wtedy, gdy różnica dróg optycznych będzie równa całkowitej wielokrotności n długości fali padającej λ . Odbicie Bragga może zachodzić jedynie dla długości fali $\lambda \leq 2d$. Przy znanych odległościach międzypłaszczyznowych i długości fali prawo Bragga określa kąt, pod jakim musi padać fala, aby nastąpiła interferencja konstruktywna (wzmocnienie). Oznacza to, że promienie rentgenowskie padające na kryształ dają maksima promieniowania ugiętego tylko pod pewnymi kątami padania. Zatem, zjawisko dyfrakcji rentgenowskiej ma charakter selektywny

i następuje tylko wtedy, gdy wiązka promieni pada na odpowiedni zestaw równoległych płaszczyzn sieciowych pod kątem Bragga, oznaczanym jako θ . Ze względu na to, że kąt, pod którym następuje wzmocnienie jest równy kątowi padania promieniowania, zjawisko to często bywa nazywane odbiciem. Pomiar XRD zostały wykonane na dyfraktometrze proszkowym X'Pert PRO firmy Panalytical wyposażonym w źródło monochromatycznego promieniowania rentgenowskiego $\text{CuK}\alpha$ (1,5404 Å) i detektorem PIXcel^{1D}.

Opracowano wyniki i przeanalizowano refleksy na poszczególnych dyfraktogramach.

RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA

Różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. differential scanning calorimetry, DSC) to technika pomiarowa umożliwiająca monitorowanie zależności różnicy strumienia ciepłego (na podstawie pomiaru dostarczanej mocy do próbki i referencji) od czasu bądź temperatury podczas zaprogramowanego schematu zmian ich temperatury – najczęściej jednostajnego ogrzewania lub ochładzania (Haines, 1995).

Różnicowa kalorymetria skaningowa umożliwia wyznaczenie takich parametrów jak temperatury przejść fazowych, ciepło przemiany, pojemność cieplna próbki. Pozwala również na określenie kinetyki reakcji czy czystości próbki. Ważną zaletą DSC jest możliwość przeprowadzenia pomiarów przy niewielkiej ilości badanej substancji – kilku miligramów.

DSC, jako technika służąca do pomiarów termodynamicznych, umożliwia również wyznaczanie podstawowych funkcji stanu takich jak energia wewnętrzna U , entalpia H , entropia S , energia swobodna Helmholtza F , entalpia swobodna G oraz pojemność cieplna przy stałej objętości C_V lub ciśnieniu C_p .

Do badań kalorymetrycznych wykorzystano skaningowy kalorymetr różnicowy model DSC3 firmy Mettler Toledo. Dokładnie odważone próbki ($\pm 0,01$ mg), o masie 5–10 mg umieszczano w 40 μL aluminiowych płaskodennych naczynkach zamkniętych od góry pokrywką z dwoma otworkami. Pomiar prowadzono w zakresie temperatur od 200°C do 500°C przy szybkości ogrzewania 10°C w atmosferze azotu przepływającego z szybkością 50 ml/mwsp. Otrzymane dane zostały poddane analizie w programie Star v.15.00.

MIKROSKOPIA RAMANOWSKA

Pomiary próbek wykonywano z zastosowaniem konfokalnego mikroskopu Ramanowskiego WiTec Alpha 300 R. Polegały one na wykonaniu fotografii mikroskopowych w technice konfokalnej oraz pomiar Ramanowskich widm punktowych. Parametry pomiaru: obiektyw Zeiss EC Epiplan-Neofluar Dic (10x, NA 0,25), długość fali wzbudzenia 532 nm, moc

wzbudzenia do 55 mW (w pomiarach kompozytów zredukowana do 10 mW), grating: 600 g/mm, integracja na punkt 250 x 0,1 s. Uzyskane dane ramanowskie analizowano za pomocą oprogramowania Project. Wykonano korekcje CCR i wygładzenie linii bazowej. Obliczono uśrednione widma ramanowskie w obrębie próbki.

SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI

Podczerwień to zakres spektralny rozciągający się między obszarem widzialnym, a mikrofalowym, tj. między $14\ 300\ \text{cm}^{-1}$ a $200\ \text{cm}^{-1}$, przy czym dodatkowo podzielony jest on na trzy podobszary – podczerwień daleką ($700\text{-}200\ \text{cm}^{-1}$), podczerwień właściwą ($4000\text{-}700\ \text{cm}^{-1}$) oraz podczerwień bliską ($14\ 300\text{-}4000\ \text{cm}^{-1}$). Absorpcja promieniowania podczerwonego prowadzi do wzbudzenia cząsteczek i zachodzenia przejść oscylacyjnych, rotacyjnych, bądź oscylacyjno-rotacyjnych. Główny wkład do widm otrzymywanych w obszarze podczerwieni właściwej, szczególnie jeśli rozważamy widma ciał stałych lub cieczy, dają wzbudzenia oscylacyjne, ponieważ energia wzbudzeń rotacyjnych jest nawet o dwa rzędy wielkości mniejsza od energii wzbudzeń oscylacyjnych. Widma FT-IR rejestrowano przy użyciu spektrometru Bruker Bravo ALPHA II w przystawkę odbiciową (ATR) z kryształem diamentowym. Rejestracje przeprowadzono w zakresie $4\ 000\text{-}400\ \text{cm}^{-1}$, przy rozdzielczości z rozdzielczością $0,5\ \text{cm}^{-1}$.

WIDMA FT-IR

W celu pełnej charakterystyki hydroksyapatytów przeprowadzono badania spektroskopowe FTIR-ATR. Uzyskane wyniki pozwolą na określenie zmian charakterystyki widma dla układów.

SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, ang. Scanning Elektron Microscopy) Badania zostały zrealizowane w Instytucie Niskich Temperatur PAN we Wrocławiu. Mikrostrukturę podłoży obserwowano przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). W tym celu wykorzystano ultrawysokorozdzielczy mikroskop skaningowy. Skaningowa mikroskopia elektronowa (z ang. Scanning electron microscopy – SEM) jest metodą analizy mikrostruktury. Skaningowy mikroskop elektronowy wykorzystuje skolimowaną wiązkę elektronów, które emitowane są w kierunku badanej próbki. Wiązka omiata obserwowany obszar linia po linii. Mikroskop tego typu może być wyposażony w szereg detektorów.

Najczęściej wykorzystywanymi detektorami są:

- detektor niskoenergetycznych elektronów wtórnych emitowanych przez próbkę w wyniku pobudzenia próbki przez elektrony wiązki (SE – Secondary Electrons)
- detektor elektronów odbitych (BSE – Back Scattered Electrons)
- detektory promieniowania rentgenowskiego wzbudzanego w próbce przez wiązkę - spektroskopia długości fal (WDS – Wavelength Dispersion Spectroscopy) lub energii (EDS – Energy Dispersion Spectroscopy zwana także EDX – Energy Dispersive X-ray Analysis) wzbudzanego promieniowania.

W pracy morfologię i wielkość ziarna wszystkich zbadanych materiałów oraz ich skład pierwiastkowy zbadano odpowiednio za pomocą mikroskopu Hitachi S-3400 N oraz detektora spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii Thermo Scientific Ultra Dry.

3.2.5. WYTWARZANIE FILAMENTU Z BIOKOMPOZYTU

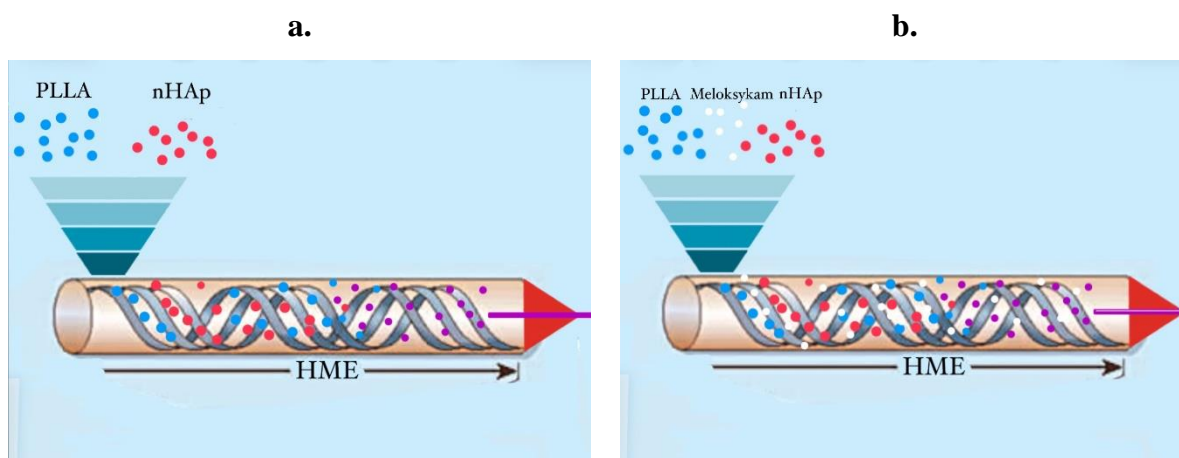
EKSTRUZJA TOPLIWA (ANG. HOT MELT EXTRUSION, HME)

Wytwarzanie filamentu oraz druk 3D był wykonany w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu na zlecenie Centrum Badawczo – Rozwojowego Novasome.

Proces polega na otrzymywaniu jednorodnego materiału i wykorzystaniu jedno lub dwuślimakowych wylączarek, dzięki którym surowcowe umieszczone w ekstruderze zostają stopione. Cały proces przebiega w kontrolowanych warunkach temperatury i ciśnienia, a wylączanie na gorąco odbywa się w temp o 15-60°C wyższej od (T_m) temp topnienia zastosowanych materiałów (Clowley i wsp., 2007). Metoda ta znalazła swoje zastosowanie w produkcji farmaceutycznej min do maskowania smaku oraz w celu wykorzystania polimerów o odmiennych właściwościach fizykochemicznych jako nośników substancji czynnej (Patil i wsp., 2015).

Do wykonania filamentu wykorzystano komercyjnie dostępny kwasu poli L-mlekowy przeznaczony do druku 3D o średnicy 1,75 mm nawinięty na szpulę, który w pierwszym etapie był cięty na mniejsze fragmenty za pomocą urządzenia peletyzator (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy). Urządzenia przedstawia Fot. 3 Kolejnym etapem było umieszczenie substratów w dwuślimakowym ekstruderze Process 11 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy) i dopasowanie optymalnej temperatury oraz ciśnienia aby otrzymać plastyczną,

homogenną mieszaninę, która po schłodzeniu ponownie nabierała sztywnych właściwości. Proces przedstawiony jest na Ryc. 12.



Ryc.12. Wytwarzanie filamentu w procesie ekstruzji topliwej a.) schemat procesu wytwarzania filamentu kompozytowego z polilaktydu oraz nanohydroksyapatytu b.) schemat wytwarzania filamentu zawierającego cząsteczkę leku-meloksykam.

Na podstawie schematu (Kozakiewicz i wsp., 2021)

Wyłaczarka dwuślimakowa współbieżna Process 11 (40 L/D) (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy) wyposażona w podajnik grawimetryczny i chłodzoną powietrzem taśmę transportową.

Tab. 5. Warunki procesu ekstruzji topliwej

Temperatura [°C]									Prędkość podajnika (rpm)	Prędkość obrotowa ślimaków (rpm)
Strefa 1	Strefa 2	Strefa 3	Strefa 4	Strefa 5	Strefa 6	Strefa 7	Strefa 8	Strefa 9		
15	140	140	150	170	170	170	170	170	15	120

Przygotowanie mieszanki:

- peletyzacja filamentu za pomocą: peletyzator; *Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy*
- homogenizacja mieszanki, wymieszanie w móżdzierzu pistlem

Ekstruder dwuślimakowy Scientific Process



Fot. 3. Ekstruder Process 11; peletyzator; *Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy*

3.2.5. PROJEKTOWANIE Z POMOCĄ PRGRAMU CAD (ANG. COMPUTER AIDED DESIGN)

Projekt druku 3D otrzymujemy przy pomocy oprogramowania CAD (ang. *computer aided design*) (Ngo i wsp. 2018) Wytworzone wirtualne modele zostają wyeksportowane do pliku STL i zamienione na Z-code a następnie które zostają wydrukowane w technologii FDM. Wirtualny obraz obiektu jest podzielony na kilka warstw, które są ze sobą połączone. Schemat wydruku opracowuje się względem osi x,y,z.). W metodzie druku FDM można wykorzystywać obrazy uzyskane za pomocą tomografii komputerowej, rezonansu magnetycznego lub dane modeli wygenerowanych komputerowo.

Model 3D wydrukowanych substytutów kości zaprojektowano w programie Tinkercad i wyeksportowano jako plik stereolitograficzny (.stl) do oprogramowania Ultimaker Cura

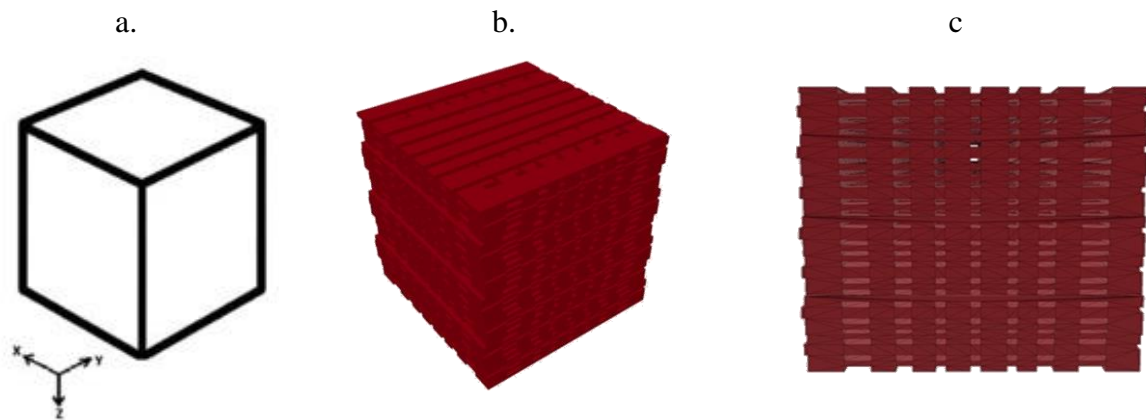
4.12.1 (Ultimaker, Holandia). Projekt rusztowań kostnych obejmował różną architekturę wewnętrzną układów kompozytowych.

A. 1000 μm 1mm odstęp przez całość (grubość warstwy 0,1 mm)

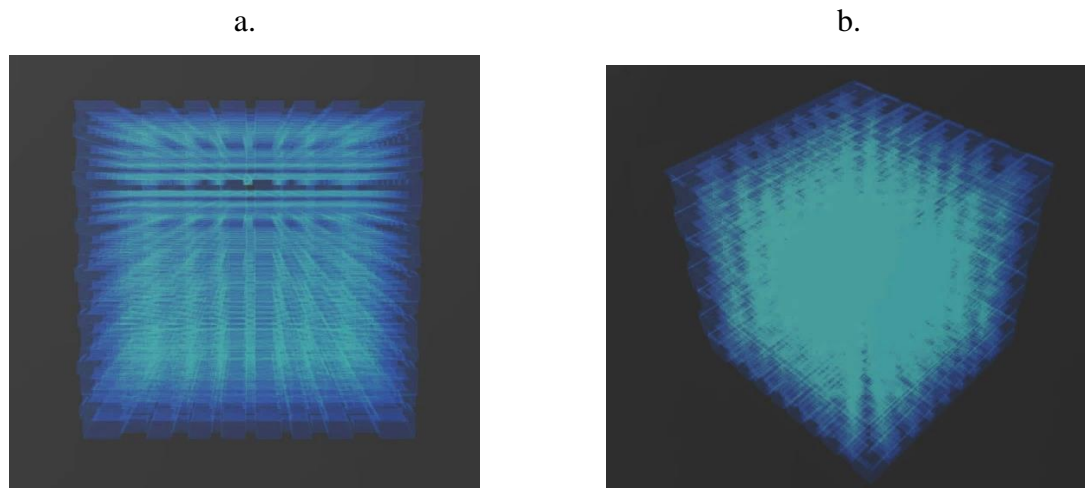
B. 500 μm 0,5 mm odstęp przez całość (grubość warstwy 0,1 mm)

C. 200 μm 0,2 mm odstęp przez całość (grubość warstwy 0,1 mm)

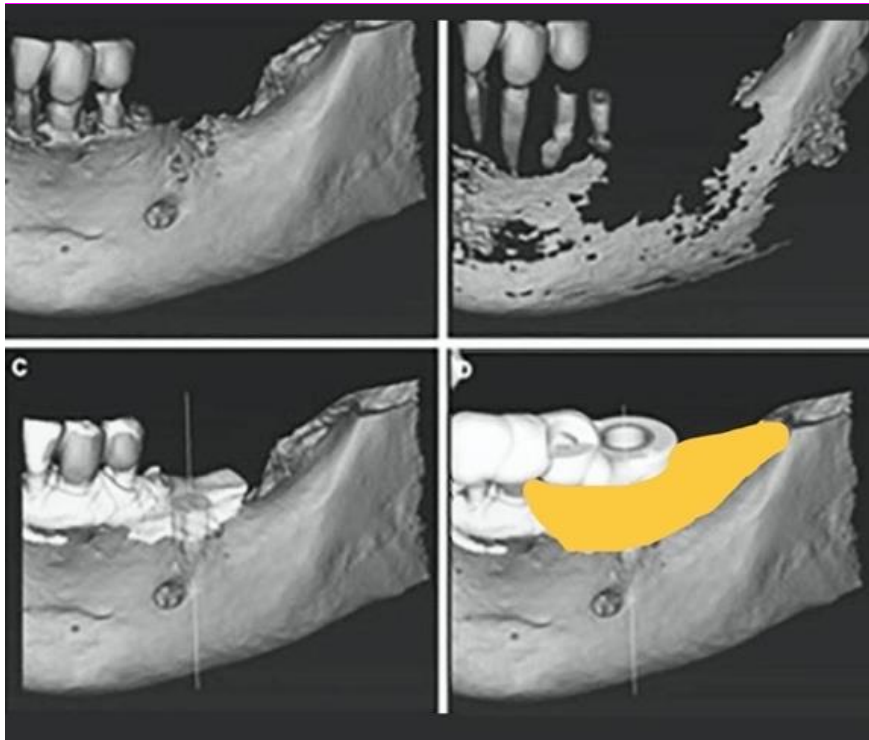
D. gradient 0,8 mm 0,8 mm 0,5 mm 0,4 mm 0,4 mm 0,5 mm 0,8 mm 0,8 mm (grubość warstwy 0,1 mm)



Ryc.13. Projektowanie druku 3D w oprogramowaniu typu CAD a. schemat projektu opracowuje się względem osi x,y,z. widok 2D b,c projekt graficzny przedstawiający przykładowy projekt przygotowany do wydruku (widok 3D)



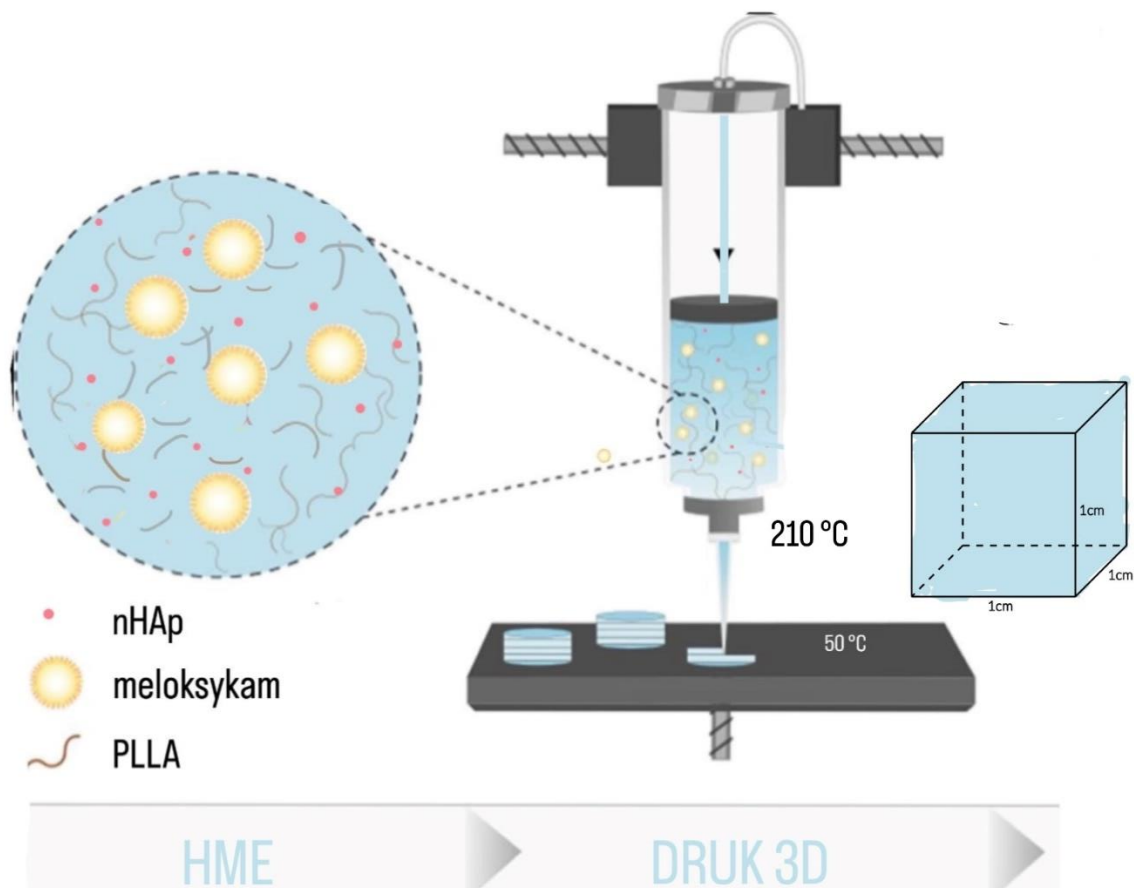
Ryc.14. Wizualizacja przygotowanego projektu a, b.



Ryc. 15. Obrazy z tomografii komputerowej CBCT przedstawiające projektowanie wydruku 3D.

3.2.6 WYTWARZANIE KOMPOZYTOWYCH SUBSTYTUTÓW KOŚCI ZA POMOCĄ DRUKU 3D

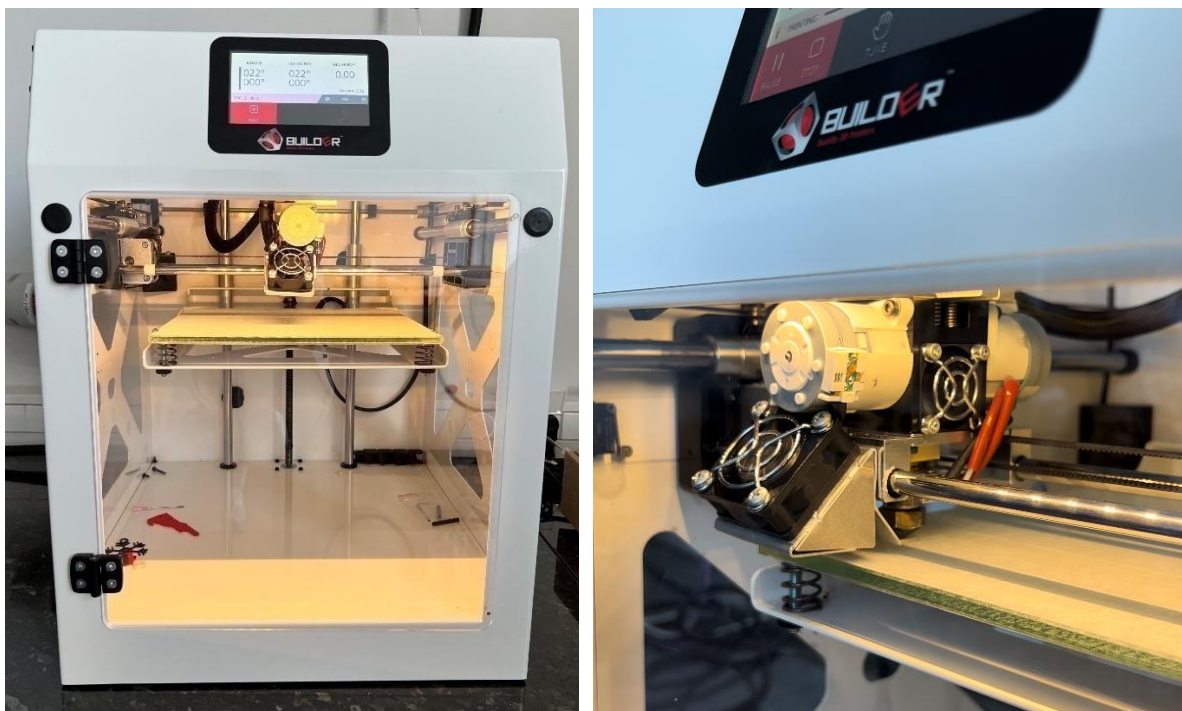
Drukowanie rusztowania w procesie osadzania stopionego materiału (ang. *fused deposition modeling*, FDM) o dokładnie określonej porowatości odbywa się warstwa po warstwie. Głowica drukarki porusza się nad stołem względem toru, który wyznacza plik g-code. Struktura 3D powstaje w procesie nakładania półpłynnego materiału rysując określone kształty. W procesie wykorzystujemy filament o stałej średnicy (1,75 mm lub 2,85 mm). Po utworzeniu wirtualnych modeli czterech rusztowań o dokładnie określonej porowatości i geometrii przystąpiono do drukowania. Do wydrukowania hybrydowych układów użyto wytworzone wcześniej dwa filamenty. Pierwszy składający się z polilaktydu i nHAp i drugi, w skład którego wchodził polilaktyd, nHAp i meloksykam. Proces druku przeprowadzono przy użyciu drukarki 3D – Builder premium. Analizując właściwości leków które potencjalnie mogłyby zostać użyte do druku, wytypowałam meloksykam m.in. ze względu na wysoką temperaturę rozkładu.



Ryc.16. Schemat obrazujący wytwarzanie hybrydowych kompozytów techniką druku 3D FDM.

(na podstawie pharmaexcipients.com)

Proces druku polegał osadzaniu roztopionego filamentu na platforma drukarki poprzez dyszę, która rozgrzana była do temperatury 210°C (Ryc.16). Aby zapewnić lepszą przyczepność pierwszej warstwy oraz ochronić drukowane elementy przed zmianą kształtu temperatura platformy wynosiła 50°C. Dla kolejnych warstw temperatura została obniżona do 30°C. Każda wcześniej utworzona warstwa była podłożem dla warstwy następnej. Po wykonaniu każdej z warstw platforma produkcyjna automatycznie obniżała się o wartość równą grubości kształtowanej warstwy, a nałożony materiał powoli się zestalał. Grubość wytłoczonego filamentu z dyszy odpowiadała grubości nakładanej ścieżki i wynosiła 0,1 mm. Ustalono odległości pomiędzy dwoma sąsiednimi prętami jako 1,75 mm. W wyniku procesu druku otrzymano pięć rodzajów rusztowań o odmiennej geometrii.



Fot. 4. Zdjęcie przedstawia drukarkę 3D FDM Builder Premium.

Do procesu wytwarzania wykorzystano urządzenie FDM Builder Premium Small 3D (Builder, Holandia). Fot. nr 4

Wypełnienie: 100%

Prędkość: 50 mm/s

Temp dyszy: 210 C

Temp platformy: 50 C

Grubość warstwy: 0,1 mm

Drukowano rusztowania w kształcie sześciangu o wymiarach około 1 cm x 1 cm x 1 cm.

Skład ilościowo-jakościowy kompozycji został zamieszczony w Tab. 6.

Lp.	Nazwa materiału wyjściowego	Skład procentowy (%) formulacji nr 1
1	polilaktyd	90,00
2	nHAp	10,00
SUMA		100%

Tab. 6. Skład ilościowo-jakościowy kompozycji

3.2.7. WYTWORZENIE PROTOTYPÓW W DRUKU 3D Z FILAMENTU MODYFIKOWANEGO CZĄSTECZKĄ LEKU.

Na podstawie analizy właściwości poszczególnych substancji czynnych wytypowano lek, który będzie wykorzystany do druku 3D. Dodatek odpowiedniej cząsteczki API ma sprzyjać regeneracji tkanki kostnej oraz zapewnić lepsze warunki do kościotworzenia. Do utworzonej matrycy wprowadzono meloksykam. Opracowana została metoda wytworzenia filamentu z inkorporowaną cząsteczką leku.

Opracowano sposób wytwarzania filamentu na bazie komercyjnie dostępnego polimeru kwasu-mlekowego o średnicy 1,75 mm nawiniętego na szpulę, nanohydroksyapatytu oraz meloksykamu. W pierwszym etapie filament był przygotowywany i cięty na mniejsze fragmenty za pomocą urządzenia peletyzatora (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy) kolejnym etapem było umieszczenie substratów w ekstruderze Process 11 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Niemcy) i dopasowanie optymalnej temperatury oraz ciśnienia w celu uplastycznienia materiału. Homogenna mieszanina, po schłodzeniu ponownie nabierała sztywnych właściwości. Skład ilościowo-jakościowy kompozycji został zamieszczony w Tab. 7.

Lp.	Nazwa materiału wyjściowego	Skład procentowy (%) formulacji nr 1 wg wynalazku
1	polilaktyd	88,78
2	nHAp	9,86
3	meloksykam	1,36
SUMA		100%

Tab. 7. Skład ilościowo-jakościowy kompozycji

BADANIA BIOLOGICZNE

3.2.8. PODATNOŚĆ MATERIAŁÓW NA ADHEZJĘ MIKROORGANIZMÓW

Adhezję zbadano wobec 12 materiałów: PLLA(K), PLLA@ nHAp/MEL (P9), PLLA@ nHAp (P10), PLLA 12 NL (P1), PLLA 20 (P2), PLLA 40 (P3), PLLA 60 (P4), PLLA 12S (P5), PCAP20 (P6), PCAP40 (P7), PCAP60 (P8), PCAP12S (P11). Materiały o oznaczeniu PLLA (PK), PLLA@ nHAp MEL i PLLA@ nHAp sterylizowano w autoklawie (121°C, 20 min), a pozostałe poddano dwukrotnej sterylizacji przy użyciu promieniowania ultrafioletowego ($\lambda=280$ nm, 30 min).

Do badań wybrano szczepy wzorcowe bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923=PCM 2054), *S. aureus* MRSA (ATCC 33592) i *Bacillus cereus* (ATCC 11778=PCM 2019) oraz Gram-ujemne pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* (PCM 2058) i *Escherichia coli* (PCM 2057). Szczepy pochodziły z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów – PCM (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, Polska). Szczepy utrzymywano na podłożu TSA (Tryptic Soy Agar, BTL, Łódź).

Z 20 godzinnych hodowli bakterii przygotowano zawiesinę drobnoustrojów odpowiadającą gęstości 1,0 w skali McFarlanda (3×10^5 j.t.k./ml) na podłożu Muller Hinton Broth (MHB, BTL, Łódź), do której wprowadzano jałowe biomateriały. Po 48 godzinach inkubacji (w temp. 37°C) materiały przepłukano 3-krotnie w soli fizjologicznej (0,9% NaCl), a następnie wytrząsano przez 1 minutę w 1 ml 0,5% roztworze saponiny (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Uzyskaną zawiesinę drobnoustrojów, pobraną z powierzchni materiałów, posiewano powierzchniowo na podłoże agarowe Muller Hinton Agar (MHA, BTL, Łódź). Badanie przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Płytki inkubowano przez 48 h w temp. 37°C, a następnie zliczono wyrosłe kolonie. Ostateczny wynik podano w jednostkach tworzących kolonie w 1 ml zawiesiny (j.t.k./ml), wyliczoną wg wzoru:

$$\text{j.t.k./ml} = \text{średnia ilość kolonii} \times \text{odwrotność rozcieńczenia} \times 10$$

3.2.9. HODOWLA KOMÓRKOWA

Badanie wpływu na komórki i aktywność biologiczną badanych kompozytów i matryc 3D badano na ciągłych liniach komórkowych, liniach pierwotnych i hodowlach pierwotnych izolowanych od pacjentów.

Wykaz linii komórkowych :

- **3T3-Balb** Fibroblasty, linia mysia, adherentna, numer ATCC: CCL-163.
- **L929** – Fibroblasty, linia mysia, adherentna, numer ATCC: CCL-1
- **7F2** – Osteoblasty mysie, adherentna, ATCC: CRL-12557
- **NHDF** – Ludzkie fibroblasty skórne, adherentna, (Lonza, Walkersville, USA)
- **THP1** - monocyty wyizolowane z krwi obwodowej od pacjenta z ostrą białaczką monocytową. Ta linia komórkowa może być wykorzystywana w badaniach nad zaburzeniami układu odpornościowego, badaniach immunologicznych i badaniach toksykologicznych numer ATCC: TIB-202
- **MSC** - hodowle pierwotnych mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej

Linie pochodziły z kolekcji Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt i zostały zakupione z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Linie pochodziły z kolekcji Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt i zostały zakupione z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Izolacja komórek MSC była wykonana na materiale uzyskanym od pacjentów w trakcie zabiegu liposukcji na podstawie zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, Nr KB398/2022. Izolacja i hodowla były prowadzone w Katedrze Biostruktury i Fizjologii Zwierząt zarejestrowaną w Polskiej Sieci Biobanków.

Linie hodowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ w kompletnym medium hodowlanym, w plastikowych butelkach hodowlanych. Ilość komórek w hodowlach była redukowana dwa razy w tygodniu, a ilość pozostawianych komórek zależała od tempa proliferacji linii. W przypadku linii adherentnych komórki były odklejane przy użyciu roztworu Trypsyny-EDTA i ponownie zawieszane w kompletnym medium hodowlanym. Nadmiar komórek wykorzystywano do przeprowadzanych testów.

PRZYGOTOWANIE MEDIUM HODOWLANEGO

Przygotowując pożywkę hodowlaną dla komórek adherentnych wykorzystywano pożywkę rekomendowaną do rodzaju komórek. Dla linii 3T3 BALB płyn Eagle'a (Minimum Essential Medium Eagle); dla linii L929, NHDF – DMEM, 7F2 – ALFAMEM. Wszystkie wymienione pożywki suplementowano surowicą płodową bydlęcą (FBS), tak aby uzyskać stężenie 10%, dodano roztwór 200 mM L-Glutaminy w proporcji 10 ml/L, gentamycyny 50 mg/ml w ilości

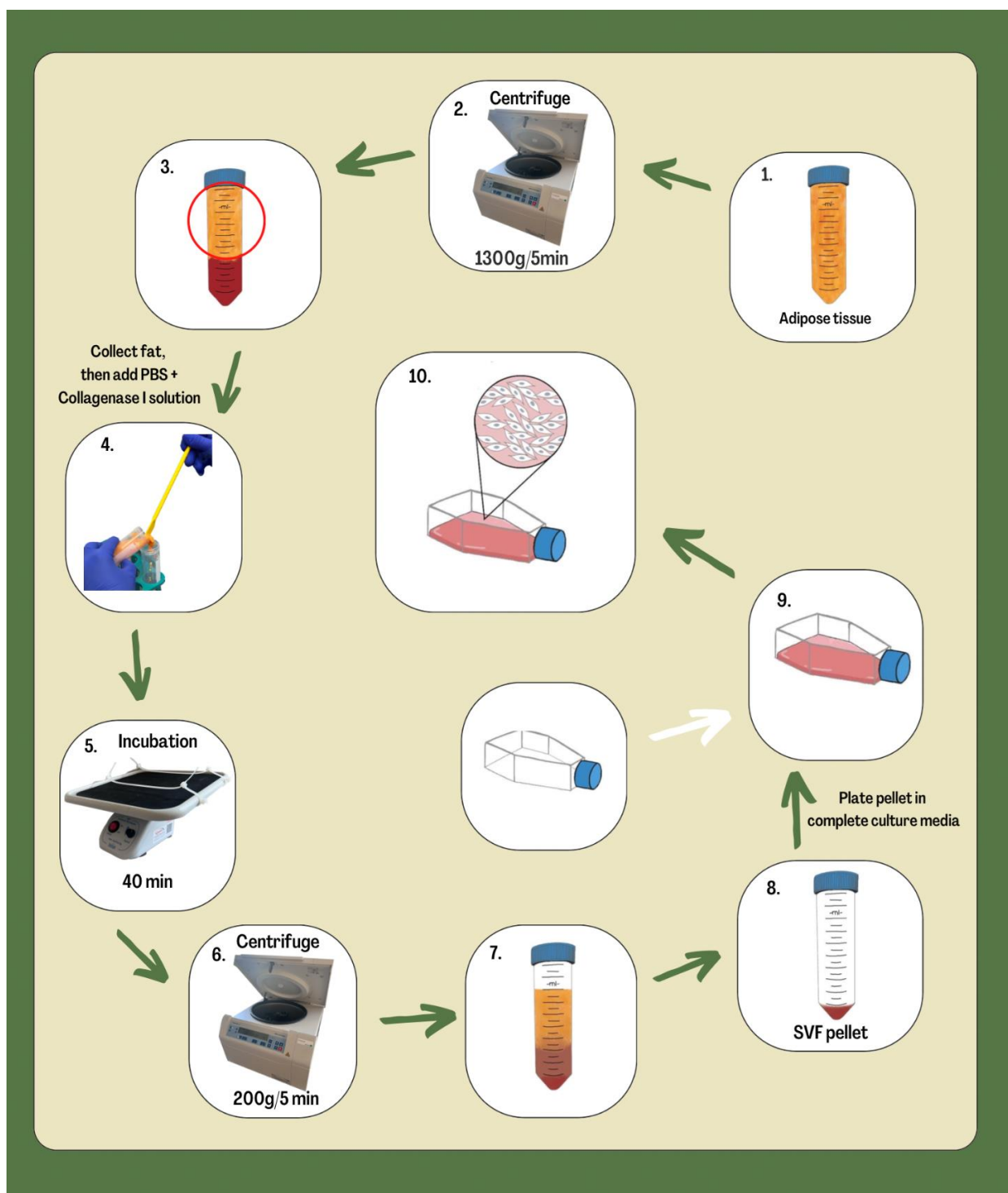
1ml/l. Tak przygotowaną pożywkę przechowywano w temperaturze 2-8°C do 4 tygodni, lub do wcześniejszego zużycia. Dla komórek rosnących w zawieszynie (THP-1) zastosowano RPMI 1640, suplementowane jak wyżej. Do hodowli komórek macierzystych zastosowano pożywkę selektywną MSC Nutristem - Basal Medium z dodatkiem zestawu suplementów. W celu poprawy skuteczności izolacji pożywkę suplementowano poprzez dodanie surowicy płodowej bydlęcej w ilości 10%.

3.2.10. IZOLACJA I HODOWLA KOMÓREK Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Przez wykonaniem procesu przygotowano butelki hodowlane poprzez opłaszanie fibronektyną (około 30 min). Następnie naczynia przepłukiwano buforowanym roztworem soli fizjologicznej (*ang.* Phosphate Buffered Saline – PBS). Proces izolacji wykonywany był w następującej kolejności:

1. Pobrąną tkankę wirowano 1300G/5 minut, 4 °C.
2. Uzyskaną w procesie wirowania tkankę, umieszczano w nowej probówce wirówkowej i dodawano do niej roztwór kolagenazy w PBS.
3. Tak utrzymaną zawiesziną inkubowano przez czas 40 minut w inkubatorze w temperaturze 37°C, wytrząsając.
4. Po inkubacji do zawiesimy dodawano pożywkę z FBS w celu neutralizacji enzymu trawiącego tkankę a następnie znów wirowano 200G/5 minut, 4 °C.
5. Po wirowaniu, usuwano zawieszinę znad peletu a frakcje macierzy tkanki tłuszczowej/frakcje stromalną (*stromal vascular fraction*) umieszczano we wcześniej przygotowanych butelkach hodowlanych. Do butelek dodawono pożywkę selektywną dla komórek macierzystych.
6. Uzyskany materiał inkubowano w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C, 5% CO₂.
7. Pożywkę hodowlaną wymieniało 2x w tygodniu, po 72h oceniano skuteczność izolacji a następnie tempo proliferacji.
8. Po osiągnięciu konfluencji minimum 80% wykonywano komórki odklejano z wykorzystaniem roztroru trypsyna/EDTA. Uzyskane komórki wykorzystywano do ich charakterystyki, namnażania do dalszych badań z wykorzystaniem badanych biomate lub do zamrożenia.

Schemat procesu izolacji przedstawia Ryc. 17.



Ryc. 17. Schemat procesu izolacji komórek z tkanki tłuszczowej. 1. tkanka pobrana od pacjenta, 2. separacja tkanki, 3. warstwa tkanki przeznaczona do izolacji, 4. przygotowanie izolacji enzymatycznej, 5. Inkubacja, 6. neutralizacja kolagenazy i tworzenie frakcji SVF, 7,8 separacja frakcji SVF, założenie hodowli, 10. hodowla komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej.

3.2.11 OCENA EKSPRESJI WYBRANYCH ANTYGENÓW POWIERZCHNIOWYCH

Celem badania była ocena jakościowa populacji komórek uzyskanych w procesie izolacji poprzez ocenę ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych. Komórki w fazie logarytmicznego wzrostu wysiano na 8 dołkowych szkiełkach mikroskopowych Millicell EZ Slide (Millipore). Po upływie 24 h komórki utrwalono za pomocą 4% PFA (20min, RT - room temperature). Kolejno utrwalone komórki przepłukano trzykrotnie buforem PBS.

W celu permeabilizacji błon komórkowych zastosowano 0.2% r-r Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Po trzykrotnym przepłukaniu komórki inkubowano 30 minut w 3% BSA w PBS (Thermo Scientific™) w celu blokowania niespecyficznych wiązań. Po etapie blokowania dodano przeciwciała pierwszorzędowe. Inkubację z przeciwciałami pierwszorzędownymi (1:200) prowadzono przez noc w 4°C. Kolejnego dnia trzykrotnie przepłukano buforem PBS, a następnie komórki inkubowano z przeciwciałami drugorzędownymi (1:1000) przez 1h w temperaturze pokojowej, chroniąc przed dostępem światła.

Użyto kozich przeciwciał antymysich oraz antykróliczych IgG znakowanych fluoroforem DyLight® 488 (Abcam). Po zakończonej inkubacji komórki przepłukano trzykrotnie buforem PBS, a następnie na szkiełka dodawano medium wiążące z DAPI (Abcam) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Do czasu analizy komórki chroniono przed światłem. Uzyskane reakcje oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym Evos FL.

3.2.12. RÓŻNICOWANIE KOMÓREK MSC W OSTEOLASTY

W celu potwierdzenia właściwości izolowanych komórek wykonano ich różnicowanie w osteoblasty. Różnicowanie komórek w osteoblasty rozpoczynano od wysiania 6×10^4 komórek do studzienki o pojemności płytki 24 studzienkowej standardowej pożywce hodowlanej. Następnie hodowlę hodowano w temperaturze 37°C, 5% CO₂. Po 24 h zmieniano pożywkę hodowlaną na pożywkę MSCgo Osteogenic XF i inkubowano przez 21 dni. Podłoże zmieniano co 2-3 dni. Po tym czasie wykonywano barwienie w celu oceny czy komórki zróżnicowały się w osteoblasty. W tym celu usuwano pożywkę i płukano studzienki roztworem DPBS, a następnie utrwalano 70% zimnym etanolem. Po czasie 60 minut usuwano etanol i płukano preparat wodą demineralizowaną.

Następnie usuwamy wodę i dodawano roztwór czerwieni alizarynowej. Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut do godziny. Usuwano roztwór ARS i przemywano studzienki wodą, który ma zapobiegać wysychaniu komórek. Komórki, w których

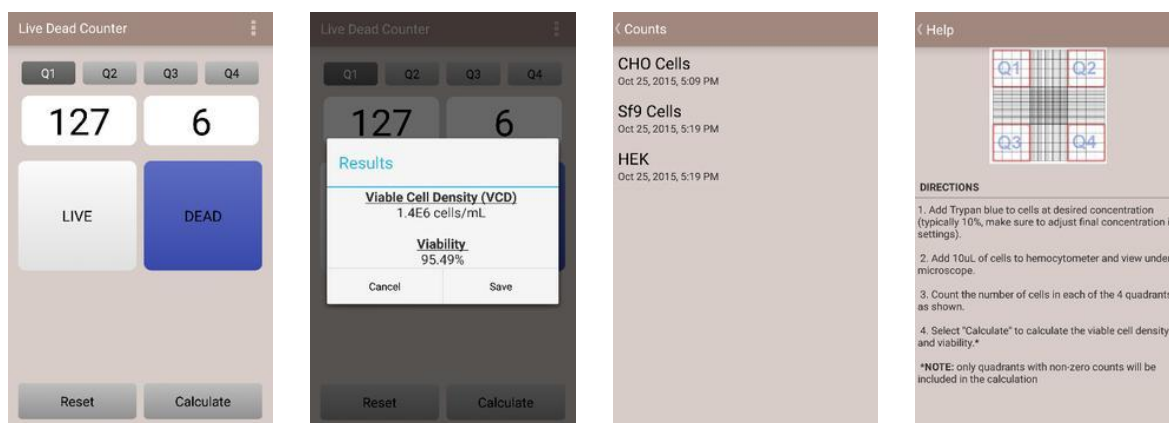
zaobserwowano złogi wapnia były zabarwione na czerwono, świadczy to o prawidłowo wykonanym różnicowaniu.

PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO TESTÓW PROLIFERACYJNYCH

Komórki linii adherentnych, po odklejeniu z butelek hodowli z użyciem roztworu Trypsyny-EDTA, zawieszano w 10 ml pożywki w probówce, celem neutralizacji roztworu Trypsyny-EDTA, natomiast komórki rosnące w zawieszynie pobierano bezpośrednio z butelek. Komórki wirowano przy $200 \times g$, przez 5 min i zawieszano w pożywce kompletnej. Komórki następnie nanoszono na płytki hodowlanych 24-studzienkowych do gęstości: 5×10^4 na studzienkę dla komórek rosnących w zawieszynie i 2×10^4 dla komórek adherentnych lub na badany materiał w objętości od 20 do 60 μl , w stężeniu 1×10^6 komórek w 1 ml. Komórki nanoszone do wydrukowanych matryc zawieszano w pożywce hodowlanej a następnie badany materiał wraz z komórkami wytrząsano 200 rpm przez czas 4 godzin w celu propagacji komórek z przestrzeni 3D.

OCENA ŻYWOTNOŚCI I LICZEBNOŚCI

Na każdym etapie wykonywano ocenę żywotności. Do oceny żywotności komórek wykorzystywano metodę barwienia komórek martwych roztworem 0,4% błękitu trypanu w PBS. W tej metodzie barwią się komórki martwe, których błona komórkowa jest przepuszczalna dla barwnika. Odsetek komórek martwych wybarwionych na niebiesko – granatowo i komórek żywych bezbarwnych, opalizujących w świetle mikroskopowym. Liczbę, jak i żywotność komórek potrzebną do założenia testu, oceniano na siatce hematologicznej Bürkera w stosunku barwnik/zawiesina komórek 1:1. Ocenę wykonywano z wykorzystaniem aplikacji: Live/Dead Cell Counter app on Android. Sposób pomiaru przedstawia Ryc. 18.



Ryc. 18. Pomiar żywotności w Live/Dead Cell Counter

3.2.13. OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI (TEST MTT)

Przygotowanie próbek

Wszystkie próbki testowe były indywidualnie pakowane i autoklawowane w celu sterylizacji. Do oceny cytotoxyczości biologicznej *in vitro* przygotowano płynne ekstrakty badanych materiałów zgodnie z postanowieniami normy: EN ISO 10993-5: Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 5: Badania cytotoxyczości *in vitro*. Zgodnie z tymi zaleceniami do badań na komórkach ssaków stosowano podłoże hodowlane z surowicą. Ekstrakcję przeprowadzano w sterylnych, chemicznie obojętnych, szczelnie zamkniętych próbkach przez 24 godziny w temperaturze 37°C. W przypadku pozostałych badań materiał badany po sterylizacji przechowywano w temperaturze pokojowej przez okres do jednego tygodnia. Przed wykonaniem doświadczeń polegających na bezpośredniej ocenie interakcji materiałów z komórkami, przygotowane przekroje zwilżano podłożem hodowlanym z dodatkiem surowicy.

Wykonanie badania

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi normy. Hodowle komórkowe uzyskiwano z butelek hodowlanych poprzez trawienie enzymatyczne (trypsyna/EDTA). Otrzymaną zawiesinę komórek odwirowywano (200 g, 5 minut). Następnie komórki były liczone i ponownie zawieszane w pożywce hodowlanej. Gęstość zawiesiny komórkowej wynosiła 1×10^5 komórek/ml. Za pomocą pipety wielokanałowej komórki dozowano po 100 μ l do płytek 96-dołkowych w ilości 1×10^4 komórek/dołek). Komórki inkubowano przez 24 h (5 % CO₂, 37 °C, 90 % wilgotności), tak aby komórki utworzyły monowarstwę na powierzchni płytki. Ten okres inkubacji zapewnia regenerację komórek, przyleganie komórek i przejście do fazy wzrostu wykładniczego.

Przed dalszymi doświadczeniami, każda płytka została sprawdzona pod mikroskopem z kontrastem fazowym, aby zapewnić, że wzrost komórek był stosunkowo jednolity na całej płytce testowej. Przeprowadzono kontrolę w celu zidentyfikowania błędów eksperymentalnych.

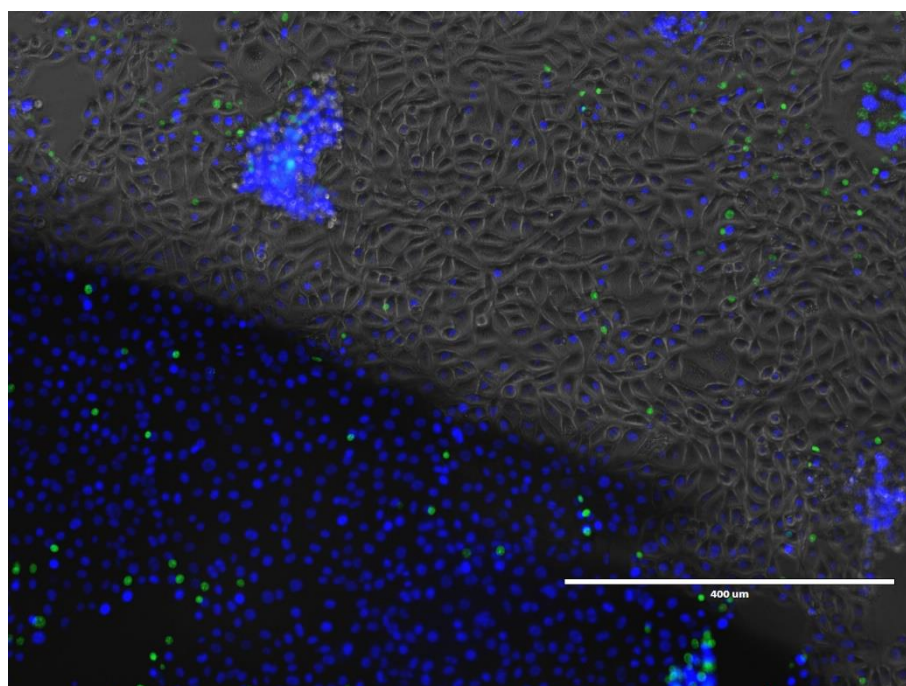
Po 24 godzinach inkubacji usuwano pożywkę z nad komórek. Do każdej studzienki dodano 100 μ l pożywki zawierającej odpowiednie ekstrakty próbek, kontrolę lub tylko ślepą próbkę. Płytki testowe inkubowano przez kolejne 24 godziny (5 % CO₂, 37 °C, 90 % wilgotności).

Po 24 godzinach inkubacji każdą płytkę oglądano pod mikroskopem z kontrastem fazowym w celu zidentyfikowania błędów w posiewie komórek oraz oceny wzrostu komórek kontrolnych i poddanych działaniu ekstraktu. Obserwowane zmiany w morfologii komórek

mogą być spowodowane cytotoksycznym działaniem ekstraktu próbki badanej. Następnie ostrożnie usunięto pożywkę z płytek i do każdego dołka dodano 50 μ l roztworu MTT o stężeniu 1mg/ml. Płytki inkubowano przez kolejne 2 godziny w inkubatorze w temperaturze 37 °C. Po tym czasie usunięto roztwór MTT i do każdego dołka dodano 100 μ l izopropanolu. Absorbancję odczytywano na czytniku MultiscanGo (Thermo Scientific, USA) przy długości fali 570 nm.

KOHODOWLA KOMÓREK Z BADANYMI MATERIAŁAMI

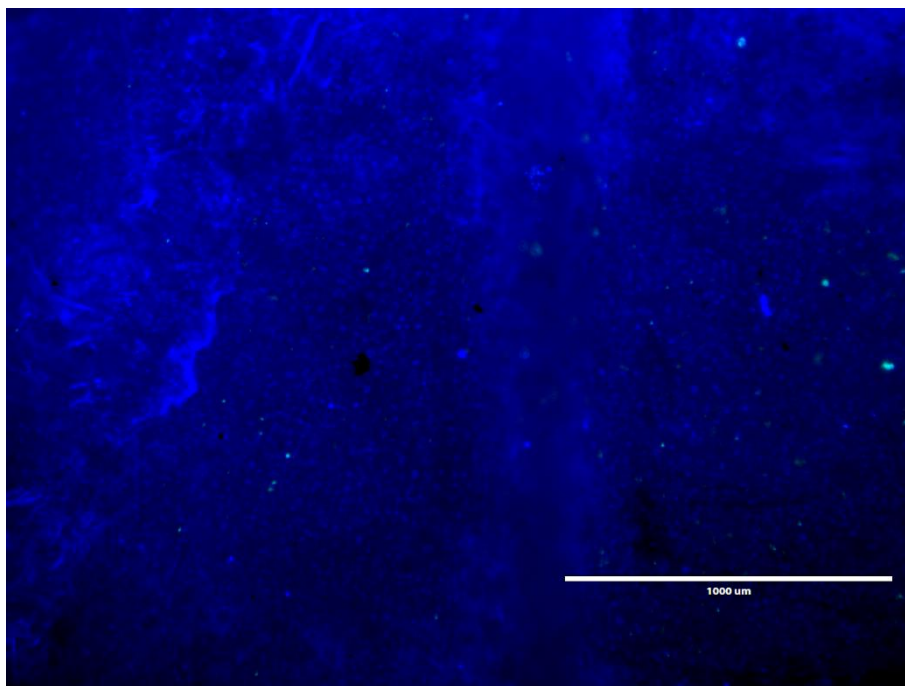
Wykonując to badanie, komórki przygotowywano zgodnie z wcześniejszym opisem. Do tego badania komórki były wysiewane do płytek 24-studzienkowych obok wcześniej umieszczonych materiałów. W tej metodzie ocena była bezpośrednia interakcja pomiędzy komórkami a materiałem badanym. Badanie było wykonywane poprzez ocenę morfologii i barwienie przy użyciu zestawu Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green). Ocena była wykonywana z wykorzystaniem mikroskopu Evos FL. Przykładową hodowlę przedstawia Ryc.19.



Ryc. 19. Przykładowa kohodowla komórek z badanym materiałem. Hodowla komórkowa rośnie również pod materiałem (dolna część ryciny). Komórki zabarwione na niebiesko – komórki żywe, na zielono – martwe. Mikroskop EVOS FL, powiększenie obiektywu 10x.

3.2.14. OCENA ŻYWOTNOŚCI I WZROSTU KOMÓREK NA BADANYCH MATERIAŁACH

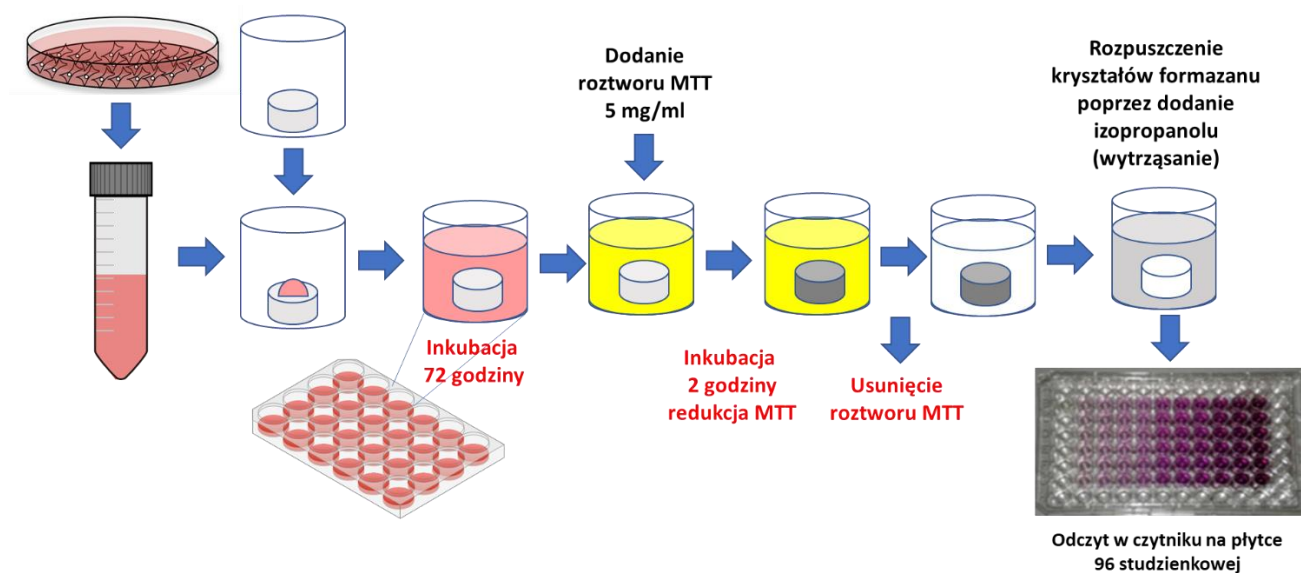
Hodowle komórkowe uzyskane z butelek hodowlanych zgodnie z opisanym protokołem były wykorzystywane do oceny adhezji. Przygotowaną zawiesiną komórek liczone i zawieszano w pożywce tak aby gęstość zawiesiny komórkowej do badania adhezji wynosiła 1×10^6 komórek/ml. Do badania używano płytek 24-dołkowych. Materiały do badania umieszczano w studzienkach. Komórki w teście były nakładane na materiał za pomocą pipety automatycznej. Po nałożeniu komórki były inkubowane przez 2 godziny (5 % CO₂, 37 °C, 90 % wilgotności), aby komórki mogły przylegać do materiałów testowych. Po tym czasie dołki uzupełniano podłożem hodowlanym z surowicą w objętości 1000 ul. Płytki testowe inkubowano przez kolejne 72 godziny (5 % CO₂, 37 °C, 90 % wilgotności). Po upływie czasu inkubacji, komórki rosnące na badanych powierzchniach barwiono przy użyciu zestawu Cell Viability Imaging Kit (Blue/Green). Barwienie polega na dodaniu barwnika do hodowli i inkubacji przez 5 do 30 minut. Po tym czasie wykonywano zdjęcia przy użyciu mikroskopu Evos Fl stosując wzbudzenie fluorescencji oświetlaczem ledowym: ex 377 em 447 i ex 469 em 525. Dalszą analizę przeprowadzono przy użyciu dedykowanego oprogramowania do analizy obrazu ImageJ. Analizowano liczbę komórek wybarwionych każdym z barwników. Komórki wykazujące niebieską fluorescencję były liczone jako żywe, zielone jako martwe. Przykładowy wzrost komórek na badanym materiale przedstawia Ryc. 20.



Ryc. 20. Przykładowa hodowla komórek na badanym materiale. Komórki zabarwione na niebiesko – komórki żywe, na zielono – martwe. Mikroskop EVOS FL, powiększenie obiektywu 4x.

OCENA WZROSTU KOMÓREK NA BADANYCH BIOMATERIAŁACH

Metodyka tego testu została opracowana na potrzeby tej pracy badawczej. Łączy ona test MTT opisany wcześniej oraz test adhezji komórek. Ocena wzrostu komórek polega na ocenie ilości komórek który wyrosły na (forma pastylki) lub w badanym materiale (wydruk) przez 72 godziny. Po czasie 72godz. do hodowli był dodawany roztwór MTT o stężeniu 5mg/ml na czas 2 godzin. Po inkubacji pożywkę z roztworem MTT usuwano a kryształy formazanu rozpuszczano 500μl izopropanolu i wytrząsano przez 30 minut 200 rpm. Przez ten czas następowało uwalnianie barwnika do rozpuszczalnika. Następnie pipetą automatyczną przenoszono roztwór na płytki 96-studzienkowe i odczytywano absorbancje zgodnie z protokołem opisanym powyżej. Metodę tą zastosowana do oceny wzrostu komórek na wszystkich badanych materiałach. Ryc. 21. przedstawia schemat wykonania badania.



Ryc. 21. Schemat wykonania oceny wzrostu komórek na badanych biomateriałach.

3.2.15. BADANIE UWALNIANIA LEKÓW Z RUSZTOWAŃ

WARUNKI BADANIA UWALNIANIA *IN VITRO*.

Badanie uwalniania meloksykamu z filamentu wytworzonego z polilaktydu i hydroksyapatytu przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu do uwalniania typu II wg. Farmakopei Europejskiej (typ łopatkowy), model Varian VK7010. Badanie uwalniania przeprowadzono w buforze fosforanowym o pH 6,8. Bufor fosforanowy przygotowano odmierając 250 ml 0,2M diwodorofosforanu potasu (POCH, czystość cz.d.a – czysty do analiz) oraz 112 ml 0,2M wodorotlenku sodu (Chempur, czystość cz.d.a) i dopełniając do 1000 ml wodą. Finalnie bufor przygotowano zgodnie z powyższą procedurą w ilości 20l. Bufor fosforanowy o pH 6,8 został wybrany jako medium do uwalniania. Badanie prowadzono w objętości 900 ml medium, przy 50 obrotach/minutę w temperaturze 37°C. Badanie przeprowadzono na 12 jednostkach filamentu. Każdą z jednostek umieszczono w odrębnym naczyniu do badania uwalniania, napełnionym odpowiednią ilością medium o temperaturze 37°C i uruchomiono ruch łopatek, rozpoczynając tym badanie. Ze względu na długotrwały proces degradacji polimeru zawierającego polilaktyd i hydroksyapatyt zdecydowano o prowadzeniu badania uwalniania przez okres 2 miesięcy. Próbkę pobierano za pomocą kaniuli w 17 punktach czasowych i następnie filtrowano przez filtry strzykawkowe, celulozowe o wielkości porów 0,45 µm (producent Macherey-Nagel). Szczegółowe parametry badania przedstawiono w Tab. 8.

Tab. 8. Parametry badania uwalniania.

Rodzaj aparatu do uwalniania:	Typ II wg Ph.Eur. (łopatki), model Varian VK7010
Temperatura [°C]:	37,0 ± 0,5
Medium:	bufor fosforanowy pH 6,8
Objętość medium [ml]:	900
Szybkość obrotu mieszadeł [obr./min.]:	50
Czas próbkowania [dzień]:	1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 32, 35, 38, 42, 45, 49, 52, 56
Filtry:	Celulozowe, średnica porów 0,45, producent Macherey-Nagel



Fot. 5. Aparat do badania uwalniania Varian VK7010.

PARAMETRY METODY OZNACZENIA ILOŚCIOWEGO UWOLNIONEGO MELOKSYKAMU.

Ilość uwolnionego meloksykamu oznaczono z pomocą chromatografii cieczowej z detekcją UV. Parametry metody chromatograficznej przedstawiono w Tab. 9.

Tab. 9. Parametry metody chromatograficznej.

Chromatograf cieczowy:	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 wyposażony w detektor typu DAD, autosampler do podawania i nastrzykiwania próbek, piec do termostatowania kolumny oraz pompę czterokanałową.
Kolumna chromatograficzna:	Agilent, Zorbax Eclipse Plus C18 100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m
Faza ruchoma:	Mieszanina metanol (POCH, czystość HPLC) : woda (70:30, v:v) doprowadzona do pH = 2,6 przy pomocy 85% kwasu ortofosforowego (VWR, czystość HPLC). Na potrzeby doprowadzenia pH wykorzystano pehametr Elmetron CPC-502.
Prędkość przepływu fazy ruchomej:	2,5 ml/min
Temperatura kolumny:	30°C
Detekcja:	355 nm
Wielkość nastrzyku:	5 μ l
Czas analizy:	1,5 minuty

W celu wykonania oznaczenia ilościowego przygotowano próbkę wzorcową meloksykamu o stężeniu 0,012 mg/ml. Zastosowano wzorzec meloksykamu producenta LGC Mikromol. Za pomocą wagi analitycznej Mettler Toledo XS205 naważono 12,0 mg wzorca do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Dopełniono do 100 ml metanolem (POCH, czystość HPLC) i rozpuszczono. Następnie pobrano 1,0 ml roztworu do kolby miarowej o pojemności 10 ml, dopełniono do 10 ml metanolem, otrzymując końcowy roztwór wzorca. Próbki badane pobrane w każdym z punktów czasowych i przesączone poddano bezpośredniej analizie chromatograficznej.

4 WYNIKI

4.1.1. SYNTEZA HYDROKSYAPATYTÓW

Zgodnie z patentem wytworzono nanohydroksyapatyt wykorzystany w druku 3D

- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

4.1.2. OPRACOWANO SPOSÓB WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW NA BAZIE POLIMERU I HYDROKSYAPATYTU.

Sposób wytwarzania monolitów został opisany w dziale Materiały i Metody.

Otrzymane biokompozyty na bazie polilaktydu z różnym rozdrobnieniem HAp

PLLA 12 - polilaktyd +HAp 12 μm (needle like)

PLLA 12S - polilaktyd+ HAp12 μm (spherical)

PLLA 20 - polilaktyd +HAp 20nm (needle like)

PLLA 40 - polilaktyd +HAp 40nm (needle like)

PLLA 60 - polilaktyd +HAp 60nm (needle like)

Otrzymane biokompozyty na bazie polikaprolaktonu z różnym rozdrobnieniem HAp

PCAP 12 - polilaktyd +HAp 12 μm (needle like)

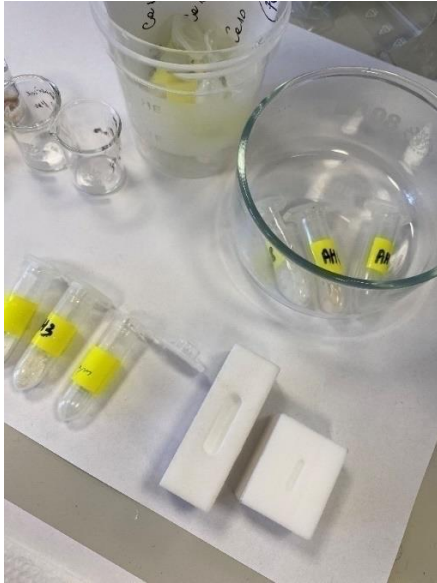
PCAP 12S - polilaktyd+ HAp12 μm (spherical)

PCAP 20 - polilaktyd +HAp 20nm (needle like)

PCAP 40 - polilaktyd +HAp 40nm (needle like)

PCAP 60 - polilaktyd +HAp 60nm (needle like)

Do wytworzenia monolitów kompozytowych wykorzystano teflonowe formy (Fot. 6)



Fot.6. Formy teflonowe – projektu prof. Rafał J. Wigłusz do wytwarzania kompozytów oraz otrzymane próbki.

4.1.3 WYTWORZENIE KRĄŻKÓW Z OTRZYMANYCH KOMPOZYTÓW

Za pomocą ręcznej tabletkarki udało się wytworzyć 10 rodzajów krążków złożonych z polimeru i HAp. Otrzymane materiały przedstawiają Fot. 7, 8, 9. Każdy krążek ważył ok. $0,05 \pm 0,01g$



Fot.7 Przedstawia krążek wytworzony na z otrzymanego wcześniej monolitu



Fot.8 Teflonowa forma służąca do wytwarzania monolitów kompozytowych.



Fot.9 Wykonane próbki

4.2. BADANIA STRUKTURALNE

4.2.1. DYFRAKTOMETRIA PROSZKOWA XRPD (ANG. X-RAY POWDER DIFFRACTION)

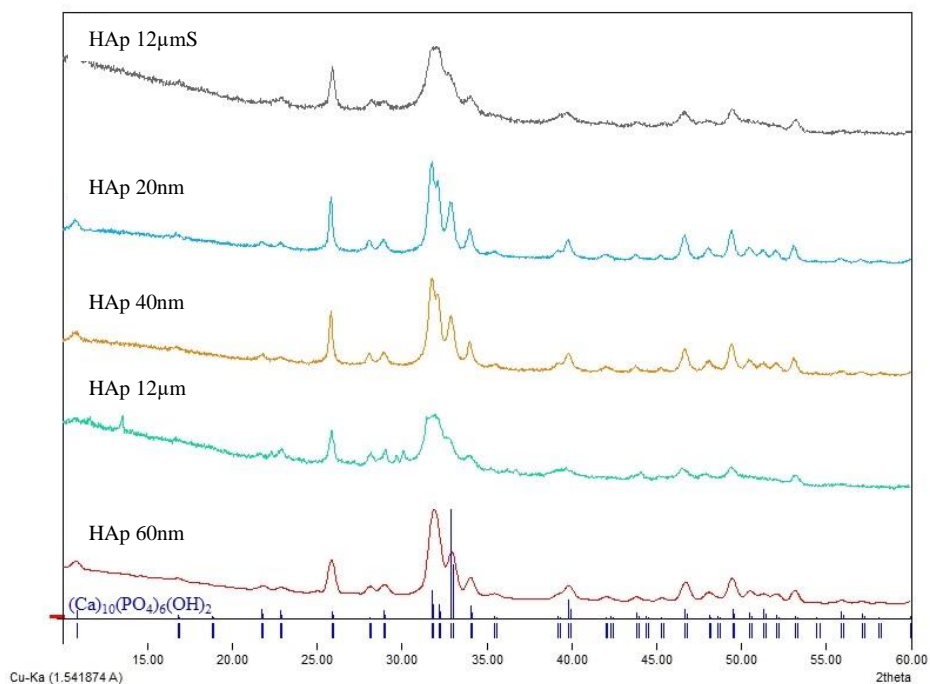
Dla czystych (niezmodyfikowanych) próbek hydroksyapatytów (HAP 60NM, HAP 12UM, HAP 40NM, HAP 20NM, HAP 12UMS) (Ryc. 20) z dyfraktogramów odczytano położenia refleksów (Tab. 10), które zgodne z danymi literaturowymi dla hydroksyapatytu krystalizującego w układzie heksagonalnym, w grupie punktowej $P6_3/m$ o parametrach komórki elementarnej wynoszą: $a=9.4189(1) \text{ \AA}$, $c=6.8827 \text{ \AA}$, $\gamma=120^\circ$ (Tas i wsp., 2013).

Wyniki pomiarów metodą XRD dla wszystkich zbadanych układów polilaktydu z hydroksyapatytem przedstawiono na Ryc. 21. Na Ryc. 22 porwano dyfraktogramy czystego hydroksyapatytu, polikaprolaktonu i biokompozytu. Na wszystkich dyfraktogramach biokompozytów zawierających polikaprolakton zlokalizowano dwa intensywne refleksy przy $2\theta=21,3^\circ$ i przy $2\theta=23,6^\circ$ świadczące o obecności w badanych próbkach tego związku organicznego (Rezaei i wsp., 2013). Również, zgodnie z oczekiwaniami na wszystkich dyfraktogramach zaobserwowano refleksy wskazujące na obecność hydroksyapatytu. Ze względu na niską krystaliczność badanego układu refleksy te były poszerzone i osłabione (Raucci i wsp., 2010).

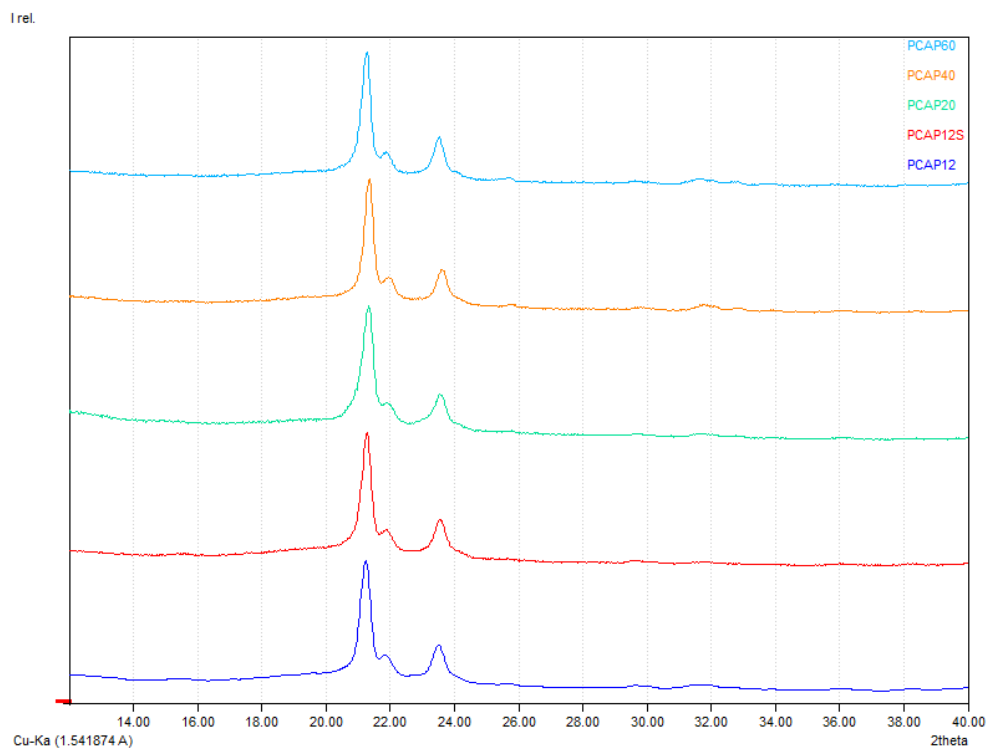
Na dyfraktogramie biokompozytu otrzymanego na bazie polilaktydu z hydroksyapatytem widoczne są wyraźne piki dyfrakcyjne ($2\theta =16.63, 18,97$) świadczące o obecności polilaktydu w badanej próbce (Ryc. 23) (Zhou i wsp., 2018). Obecność hydroksyapatytu nie powoduje przesunięcia pików pochodzących od polilaktydu, ale jedynie osłabia ich intensywności (Ryc. 24). Porównując dyfraktogramy biokompozytu PLLA40 z dyfraktogramem HAP 40NM można odnaleźć refleksy charakterystyczne dla czystego hydroksyapatytu przy następujących kątach $25,82^\circ, 27,13^\circ, 28,97^\circ, 31,88^\circ, 32,96^\circ, 34,06^\circ, 39,92^\circ, 46,67^\circ$ i $49,44^\circ$. Można zauważyć, że w dyfraktogramie biokompozytu następuje rozdzielenie się szerokiego piku w obszarze kąta 32° na trzy różne piki dyfrakcyjne przy kątach $31,91^\circ, 32,98^\circ$ i $34,07^\circ$. Podobne, przypadki zostały już omówione w literaturze naukowej (Liu i wsp., 2020). Obserwacje te można wytłumaczyć równomiernym rozmieszczeniem hydroksyapatytu.

Tab. 10. Zestawienie podstawowych informacji z dyfraktogramów badanych próbek hydroksyapatytów z danymi literaturowymi (Tas i wsp., 2013).

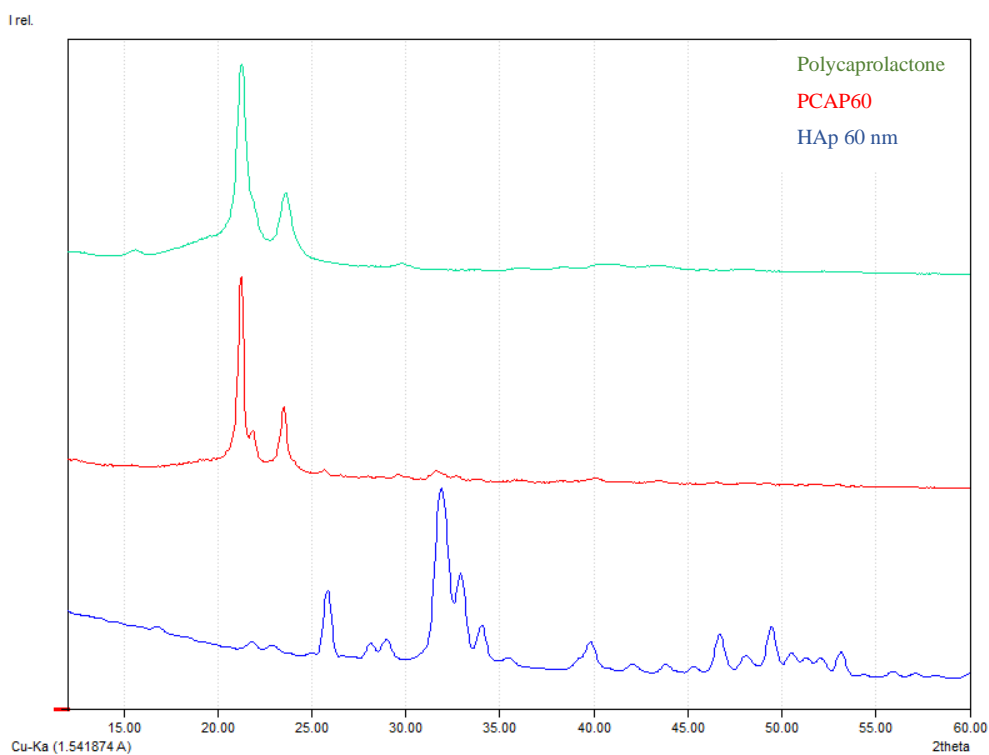
Nr	$2\theta_{\text{eks.}} (^{\circ})$					$(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (lit.)		
	HAp	HAp 12 μm	HAp 40nm	HAp 20nm	HAp 12 μmS	$2\theta_{\text{eks.}} (^{\circ})$	$d_{\text{exp}} (\text{\AA})$	hkl
2	22.88	22.80	22.80	22.85	22.80	22.86	3.8868	111
3	25.85	25.85	25.82	25.82	25.90	25.86	3.4419	002
5	28.97	28.76	28.92	28.92	28.68	28.94	3.0832	210
6	31.86	31.88	31.86	31.80	32.04	31.79	2.8128	211
7	32,93	32.91	32.88	32.88	32.87	32.91	2.7194	300
8	34.04	34.04	33.98	33.98	34.04	34.06	2.6305	202
9	39.84	39.50	39.78	39.78	39.62	39.82	2.2622	310
10	46.71	46.58	46.66	46.64	46.69	46.70	1.9434	222
11	49.44	49.44	49.42	49.42	49.55	49.48	1.8406	213



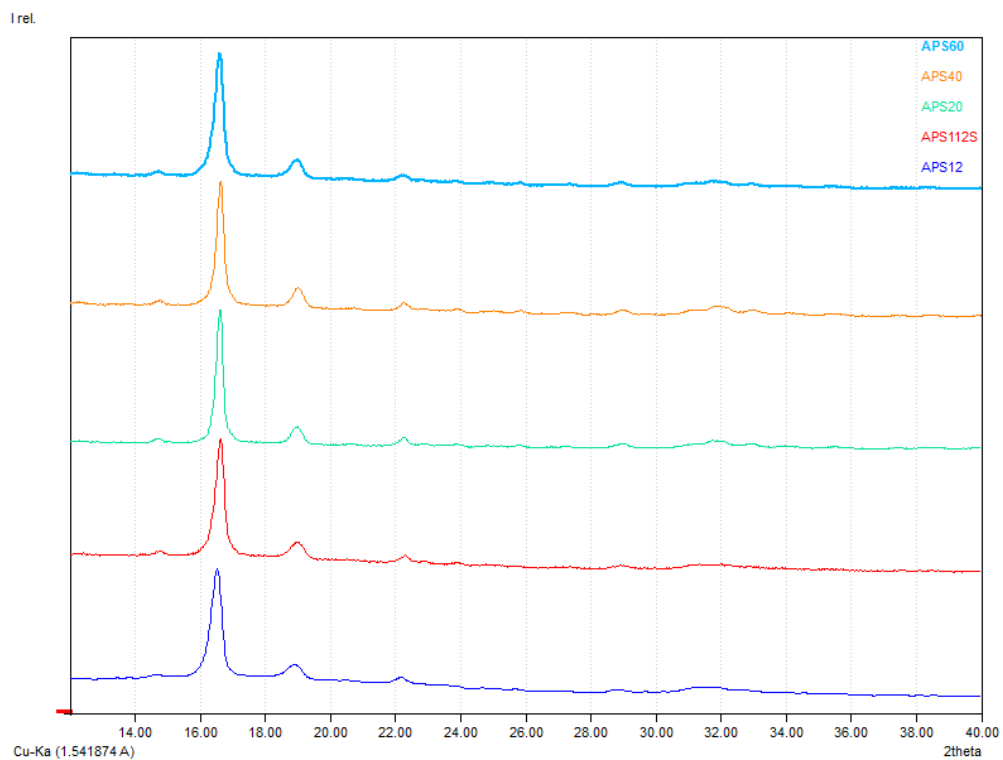
Rys. 20. Dyfratogramy hydroksyapatytów HAP 60NM-HAP 12UMS.



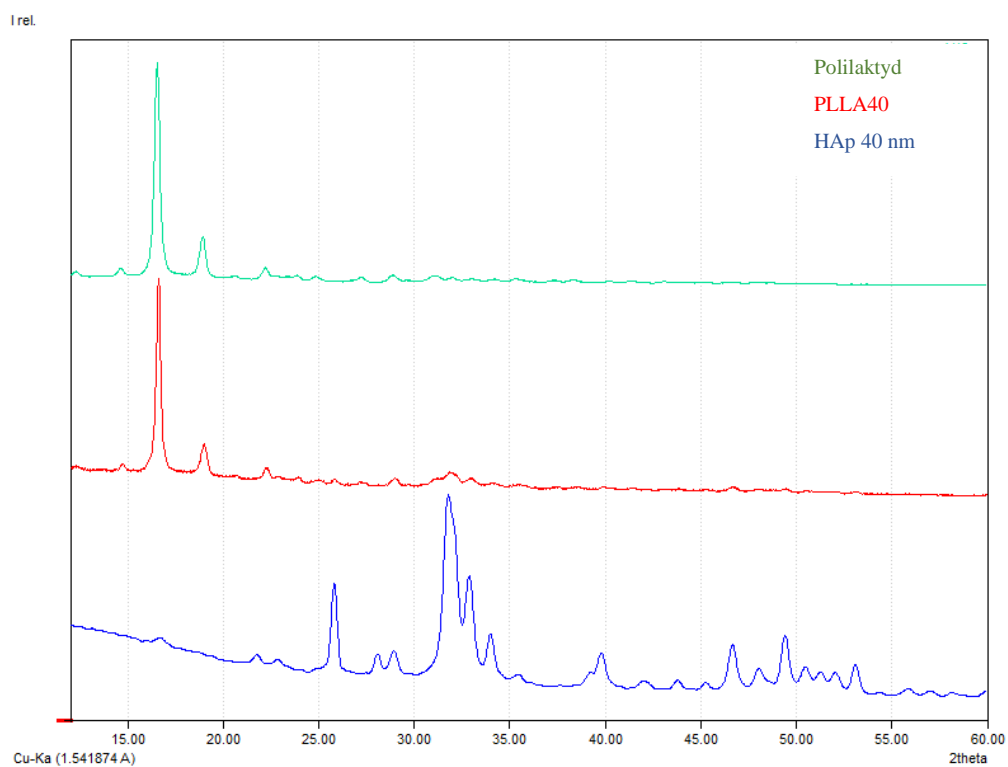
Ryc. 21. Dyfratogramy biokompozytów otrzymanych na bazie polikaprolaktonu z hydroksyapatytem.



Ryc. 22. Dyfratogramy materiałów HAP 60nm (hydroksyapatyt), PCAP60 (biokompozyt) i polikaprolakton.



Ryc. 23. Dyfratogramy biokompozytów otrzymanych na bazie polilaktydu z hydroksyapatytem.



Ryc. 24. Dyfratogramy próbek HAp 40nm, PLLA40 (biokompozyt) i polilaktyd.

4.2.2. RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA

Analiza przebiegu krzywych na widmach DSC biokompozytów pozwoliło na badanie przemian fazowych (tj. zeszklenie, topnienie, krystalizacja) zachodzących w biokompozytach. Dla badanych układów polilaktyd + hydroksyapatyt wartości temperatur przejścia szklistego dla wszystkich badanych próbek oscylują w okolicach wartości tej temperatury wyznaczonej dla czystego polilaktydu tj. 63°C (Ryc. 25).

Na podstawie tych informacji można wywnioskować, że w matrycy polilaktydu włączenie HAp nie ma zasadniczego wpływa na T_g w otrzymanym biokompozycie (P. Mróz, S. Białas, M. Mucha, H. Kaczmarek, *Thermochimica Acta*. 2013,573,186-92). Jedynie w przypadku próbki PLLA12S można określić temperaturę zimnej krystalizacji wynoszącą 108°C (Rys. 25).

Efekt ten jest związany z większą zawartością fazy amorficznej w sferycznej odmianie hydroksyapatytu. Temperatura topnienia biokompozytu głównie zależy od wielkości i jakości otrzymanej struktury krystalicznej układu polilaktyd + hydroksyapatyt, a istotny wpływ na to ma przejście ma forma hydroksyapatytu (X. Liu, T. Wang, L. Chow, M. Yang, J. W. Mitchell. *Intern. J. Polym. Sci.* 2014, 2014, 1-8.). Przebieg krzywej topnienia może być wynikiem polimorficznej przemiany krystalicznej, ponieważ polilaktyd może wykazywać trzy różne rodzaje struktur krystalicznych. Z analizy dyfraktogramów wynika, że dominującą formą jest postać α , która jest najbardziej stabilna i charakteryzuje się stosunkowo wysoką temperaturą topnienia (Chen i wsp., 2011). Z danych literaturowych wiadomo, że wzrostowi intensywności piku dyfrakcyjnego przypisywanego fazie α matrycy polilaktydu z włączeniem hydroksyapatytu towarzyszy wzrost temperatury topnienia fazy polilaktydu w nanokompozytach (~175 °C) w porównaniu z czystym polilaktydem (~165°C). Na wzrost ten nie ma wpływu większe stężenie hydroksyapatytu w biokompozytach. Analiza uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że w badanych próbkach z polilaktydem wartości temperatury topnienia zmieniają się w zakresie 173,4-177,7°C. Anomalie endotermiczne zarejestrowane w temperaturach ~305 °C dla próbek PLLA12 i PLLA12s oraz ~380 °C są związane z rozkładem polilaktydu.

Odmienną charakterystykę termiczną w stosunku do poprzednio opisanych biokompozytów mają układy otrzymane na bazie polikaprolaktonu. Na zarejestrowanych termogramach widoczne są endotermiczne piki topnienia w zakresie temperatur 63,77-66,85 °C. Wartości te zbliżone są do temperatury topnienia czystego (60°C) (S. H. Murphy, G. A. Leeke, M. J. Jenkins *J. Therm. Anal. Calorim* 2012, 107, 669–674). Niewielkie podwyższenie temperatury topnienia badanych układów wskazują na większą stabilność otrzymanych

biokompozytów i mogą być wynikiem oddziaływań międzycząsteczkowych (Scaffaro 2017). Kolejne dużo większe endotermiczne piki pojawiają się w zależności od użytego hydroksyapatytu przy następujących temperaturach: 305 °C (PLLA12, PLLA12S), 381,1 °C (PLLA20), 379,90 °C (PLLA40). Piki te związane z procesem rozkładu polikaprolaktonu i ściśle związane są z rozmiarami hydroksyapatytów.

4.2.3 SKANINGOWA KALORYMETRIA RÓŻNICOWA DSC

Dla próbek AZ3 i AZ4 analogiczny proces obserwuje się przy ok 65 °C, a ubytek masy w obu przypadkach stanowi ok 10 % - świadczy to o uwodnieniu próbek. Dla wszystkich badanych próbek obserwuje się przegięcie przy ok. 230 °C stanowiące odpowiednio dla próbek AZ1 i AZ2 ok. 10 % ubytku masy natomiast dla AZ3 i AZ4 ok. 13 %. Dla próbki AZ1 obserwuje się niewielkie, stanowiące ok 1 % ubytku masy przegięcie w temperaturze ok. 775 °C. Na krzywej próbki AZ3 obserwuje się dwa dodatkowe przegięcia – niewielkie (ok. 2 % ubytku masy) przy ok. 406 °C oraz przy 495 °C stanowiące ok. 10 % ubytku masy próbki. Analogiczny ubytek masy ok 8,5 % obserwuje się na krzywej próbki AZ4 w temperaturze ok. 482 °C.

Tab. 11. Zestawienie efektów termicznych próbek kompozytów PLLA

Kompozyt	Pik (°C)	Pik (°C)
PLLA 12 -polilaktyd + HAp 12 um (needle like)	173,36	305,83
PLLA 12S -polilaktyd + Hap 12 um (spherical)	174,96	305,08
PLLA 20 -polilaktyd + Hap 20 nm (needle like)	172,68	381,10
PLLA 40 -polilaktyd + Hap 40 nm (needle like)	177,61	379,90

Kompozyty z polilaktydem mają jeden pik endotermiczny w temp. 172-178 °C pochodzący najprawdopodobniej od polilaktydu. Drugi dużo większy pik endotermiczny pojawia się w zależności od użytego hydroksyapatytu. Dla hydroksyapatytu 12 um jest to pik przy temp. 305 °C, natomiast dla 20 nm i 40 nm przy odpowiednio 381,10 i 379,90 °C. Im mniejsze cząstki hydroksyapatytu są stosowane, tym temperatura przesuwana się do wyższych wartości.

Tab. 12 Zestawienie efektów termicznych próbek kompozytów PCAP

Kompozyt	Pik (°C)	Pik (°C)	Pik (°C)
PCAP12- polycaprolactone + HAp 12 um	66,85	332,36	386,78
PCAP12S- polycaprolactone + HAp 12 um (spherical)	65,77	335,92	400,06
PCAP60- polycaprolactone + Hap 60 nm	66,82	422,99	
PCAP40- polycaprolactone + Hap 40 nm	63,77	424,12	

Kompozyty z PCL mają jeden pik endotermiczny w temp. 63-67 °C pochodzący najprawdopodobniej od PCL. Drugi dużo większy pik endotermiczny pojawia się w zależności od użytego hydroksyapatytu. Dla hydroksyapatytu 40 nm i 60 nm przy odpowiednio 424,12 i 422,99 °C. Dla hydroksyapatytu o cząstkach wlekości nanometrów pojawia się szeroki pik nałożony z dwóch procesów endotermicznych: pierwszy mniejszy przy temp. 332,36 i 335,92 (spherical) oraz drugi znacznie większy przy odpowiednio temp. 386,78 i 400,06 °C.

4.2.4. MIKROSKOPIA RAMANOWSKA

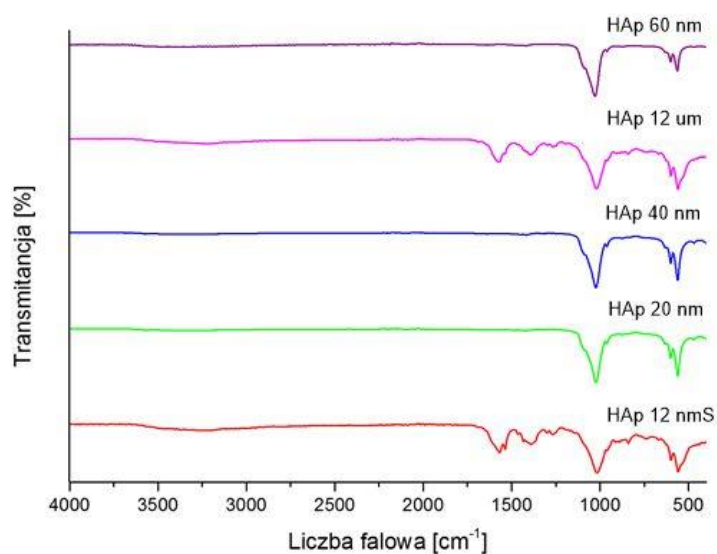
Dla badanych materiałów nie wykazano zróżnicowania pod względem wizualnym i spektralnym. Położenie pokrój pasm jest charakterystyczne dla polilaktydu. Wszystkie próbki zawierają widocznie pod mikroskopem aglomeraty HAp.

W analizowanej próbce zaobserwowano cząstkę hydroksyapatytu. Widmo zawiera charakterystyczne pasmo 965 re. 1/cm. Widmo uśrednione polimeru odpowiada polilaktydowi. Próbkę PLLA60s jest jednorodna; na zdjęciu mikroskopowym nie widać aglomeratów HAp. Uśrednione widmo można przypisać do polilaktydu. Brak pasm charakterystycznych hydroksyapatytu.

Próbki PCAP posiadają charakter jednorodny

4.2.5. SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI

W celu pełnej charakterystyki hydroksyapatytów przeprowadzono badania spektroskopowe FT-IR-ATR. Uzyskane wyniki pozwolą na określenie zmian charakterystyki widma dla układów biopolimerów. Zarejestrowane widma spektroskopowe przedstawiono na ryc. 25.



Ryc. 25. Widma FTIR próbek HAP 60NM-HAP 12μmS.

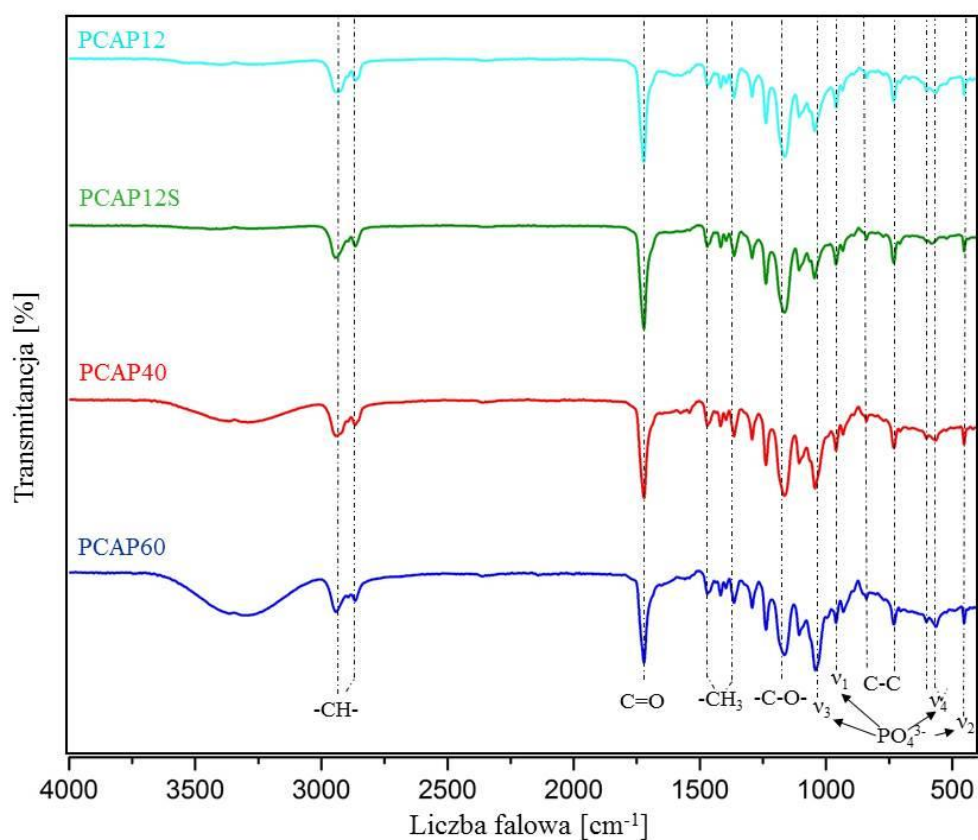
Widma FTIR wszystkich form niemodyfikowanego hydroksyapatytu (HAP 60nm-HAP 12μmS) zostało przedstawione na rysunku 1. Zgodnie z danymi literaturowymi (Costescu i wsp., 2010; Panda i wsp., 2003) zidentyfikowano wszystkie najbardziej charakterystyczne pasma dla tego związku pasmom pochodzących od grup fosforanowych PO_4^{3-} , za które odpowiedzialne są cztery rodzaje drgań: ν_1 , ν_2 , ν_3 , i ν_4 . Szerokie pasmo w zakresie liczb falowych 1026 i 1110 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi ν_3 jonu PO_4^{3-} . Pasma zginające ν_4 tej grupy zlokalizowane są na widmie przy częstości 602-607 cm^{-1} . Natomiast, dwa wąskie pojedyncze pasma przypisane odpowiednio drganiom zginających ν_2 oraz rozciągających ν_1 , zaobserwowane przy liczbach falowych 468 oraz 962 cm^{-1} .

Tab. 13. Zestawienie wszystkich charakterystycznych pasm widocznych w widmie FTIR niemodyfikowanego hydroksyapatytu (dane literaturowe) (Costescu i wsp., 2010)

pasma		rodzaj drgań lub pasma	liczba falowa (cm^{-1})
nazwa	symbol		
fosforanowe	PO_4^{3-}	zginające ν_2	470
fosforanowe	PO_4^{3-}	zginające ν_4	566
fosforanowe	PO_4^{3-}	zginające ν_4	603
hydroksylowe	OH^-	konstytucyjne	632
fosforanowe	PO_4^{3-}	rozciągające ν_1	960
fosforanowe	PO_4^{3-}	rozciągające ν_3	1033
fosforanowe	PO_4^{3-}	rozciągające ν_3	1096

Tab. 14. Zestawienie wszystkich charakterystycznych pasm widocznych w widmie FTIR niemodyfikowanego hydroksyapatytu dla badanych próbek HAP 60NM-HAP 20NM

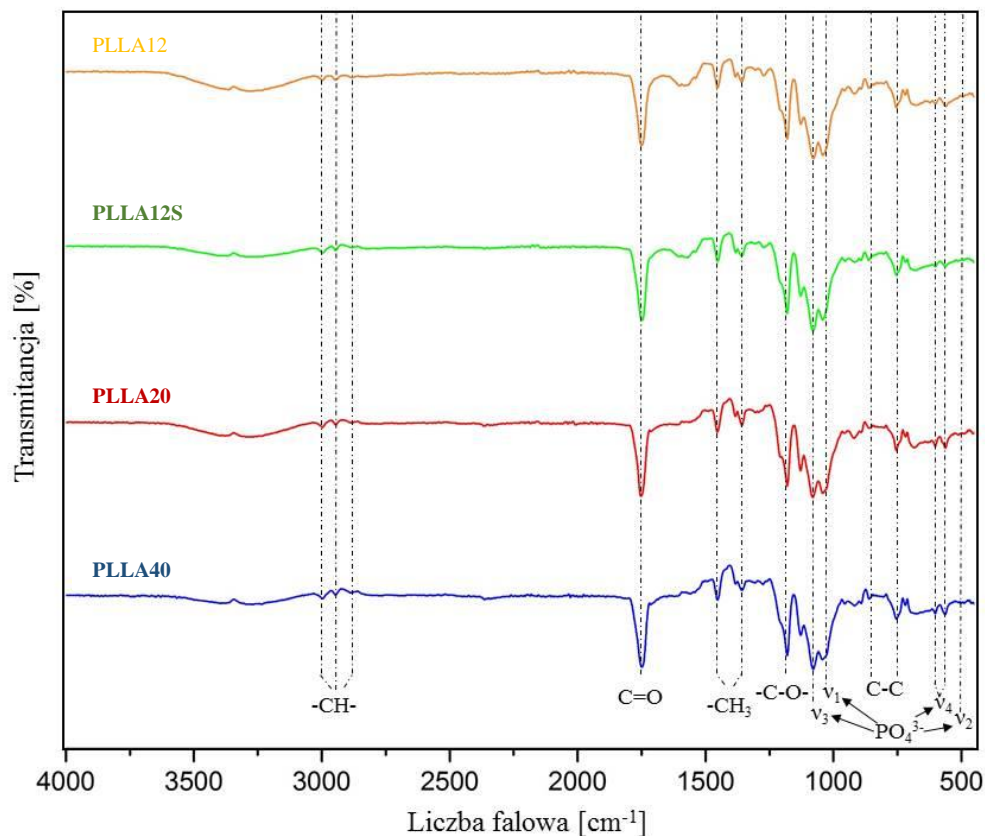
pasmo		rodzaj drgań lub pasma	liczba falowa(cm ⁻¹)				
nazwa	symbol		HAP 60NM	HAP 12UM	HAP 40NM	HAP 20NM	HAP 12UMS
fosforanowe	PO ₄ ³⁻	zginające ν ₂	467.2	469.1	467.3	463.0	468.6
fosforanowe	PO ₄ ³⁻	zginające ν ₄	563.1	553.5	561.5	563.3	559.4
fosforanowe	PO ₄ ³⁻	zginające ν ₄	598.2	601.4	601.6	600,5	602.2
fosforanowe	PO ₄ ³⁻	rozciągające ν ₁	963.3	981.8	962.7	965.3	982.3
fosforanowe	PO ₄ ³⁻	rozciągające ν ₃	1028.6	1026.4	1024.3	1028.8	1023.5
fosforanowe	PO ₄ ³⁻	rozciągające ν ₃	1087.3	1085.2	1084.8	1083.4	1084.4



Ryc. 26. Widma FTIR materiałów PCAP12, PCAP12S, PCAP40, PCAP60.

Na wszystkich widmach FTIR biokompozytów otrzymanych na bazie polikaprolaktonu z HAp (Rys. 26) zaobserwowano występowanie następujących pasm absorpcyjnych:

- Multipletowe pasmo w zakresie liczby falowej 2989 – 2882 cm^{-1} związane jest z drganiami rozciągającymi grupy $-\text{CH}$ i zginającymi grupy $-\text{CH}_3$;
- Intensywne pasmo z maksimum przy liczbie falowej 1750 cm^{-1} związane jest z drganiami rozciągającymi grupy $\text{C}=\text{O}$ i asymetrycznymi i symetrycznymi drganiami rozciągającymi grupy $\text{C}-\text{O}-\text{C}$;
- Dwa pasmo w zakresie liczby falowej 1453 – 1382 cm^{-1} zostało przypisane drganiom zginającym grupy $-\text{CH}_3$;
- Pasmo w zakresie liczby falowej 1500 – 1150 cm^{-1} zostało odpowiadają grupom estrowym w polikaprolaktonu;
- Szerokie pasma przy częstościach 1030 i 1090 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi ν_3 jonu PO_4^{3-} ;
- Pasma w zakresie liczb falowych przy 952–956 cm^{-1} i 558–562 cm^{-1} odpowiadają drganiom zginających ν_1 oraz rozciągających ν_4 jonu PO_4^{3-} ;
- Słabe pasmo w zakresie liczby falowej 856-865 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi wiązań $\text{C}-\text{C}$;
- Pasma na widmie przy częstości 602-604 cm^{-1} przypisane drganiom zginającym ν_4 jonu PO_4^{3-} ;
- Bardzo słabe pasma widmie przy częstości 456-477 cm^{-1} przypisane drganiom zginającym ν_2 jonu PO_4^{3-} .



Ryc. 27 Widma FTIR próbek PLLA12, PLLA12S, PLLA20, PLLA40.

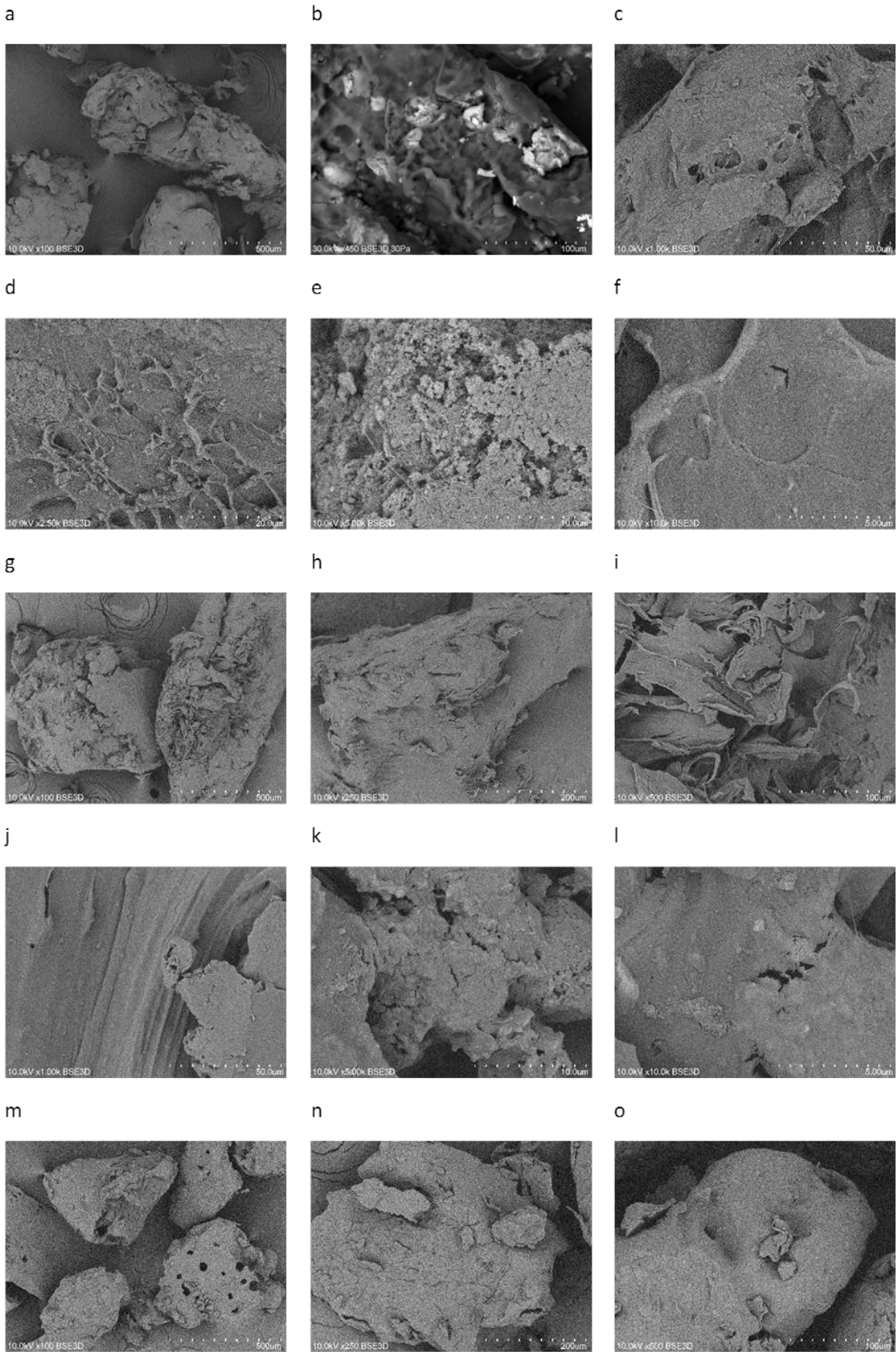
Na wszystkich widmach FTIR biokompozytów otrzymanych na bazie polilaktydu z hydroksyapatytem (Rys. 3) zaobserwowano występowanie następujących pasm absorpcyjnych:

- Multipletowe pasmo w zakresie liczby falowej $2997 - 2882 \text{ cm}^{-1}$ związane jest z drganiami rozciągającymi grupy $-\text{CH}$ i zginającymi grupy $-\text{CH}_3$;
- Intensywne pasmo z maksimum przy liczbie falowej 1750 cm^{-1} koresponduje z drganiami rozciągającymi grupy $\text{C}=\text{O}$ i asymetrycznymi i symetrycznymi drganiami rozciągającymi grupy $\text{C}-\text{O}-\text{C}$;
- Dwa pasmo w zakresie liczby falowej $1453 - 1382 \text{ cm}^{-1}$ zostało przypisane drganiom zginającym grupy $-\text{CH}_3$;
- Pasma absorpcji przy liczbie falowej $456-477 \text{ cm}^{-1}$, $558-564 \text{ cm}^{-1}$, $601-606 \text{ cm}^{-1}$, $953-956 \text{ cm}^{-1}$, $1031-1037 \text{ cm}^{-1}$ oraz $1083-1090 \text{ cm}^{-1}$ odpowiadają drganiom w obrębie grup fosforanowych.

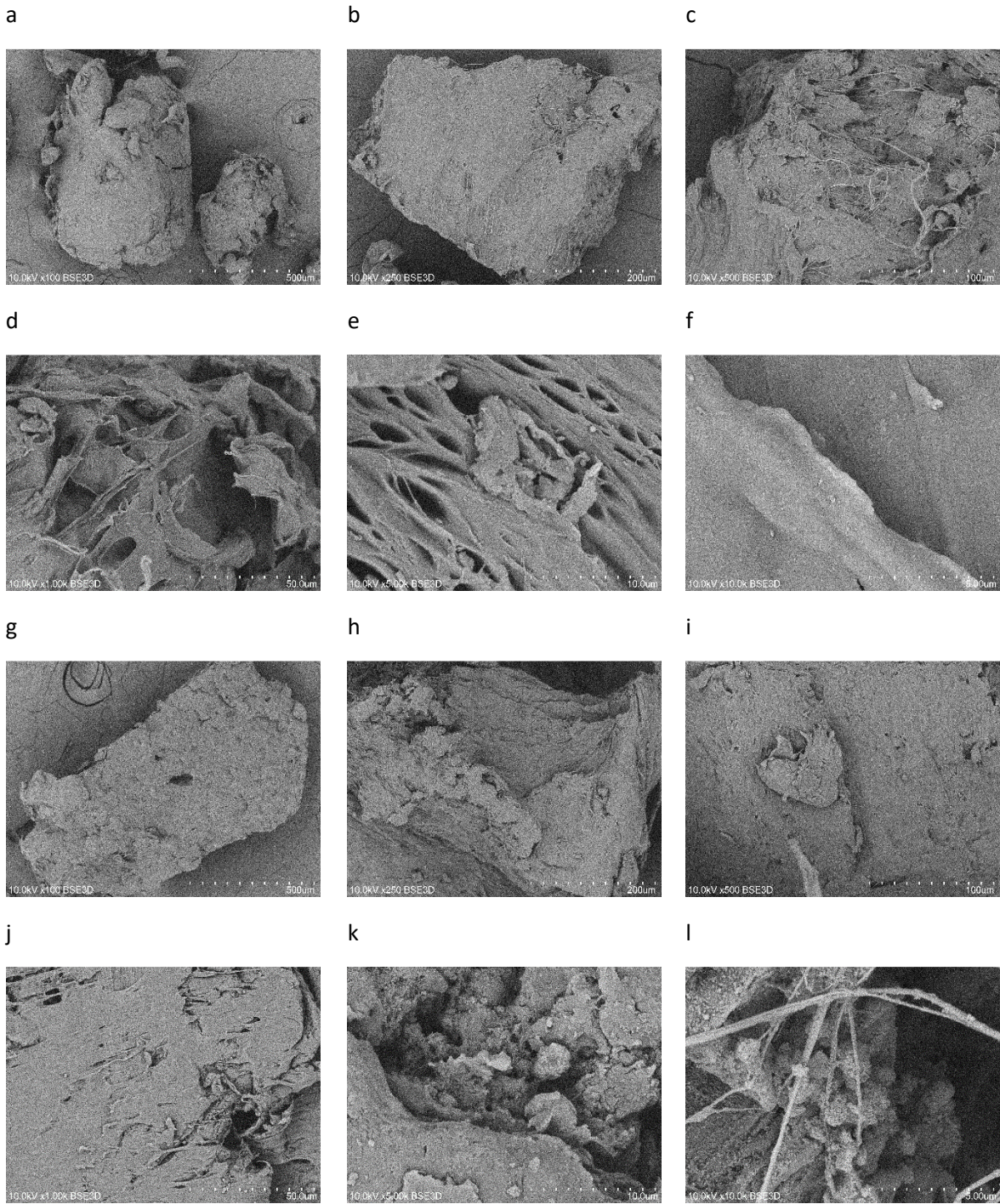
Ze względu na mały procent wagowy HAp, jego charakterystyczne pasma mają wyższy procent przepuszczalności.

4.2.6. SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

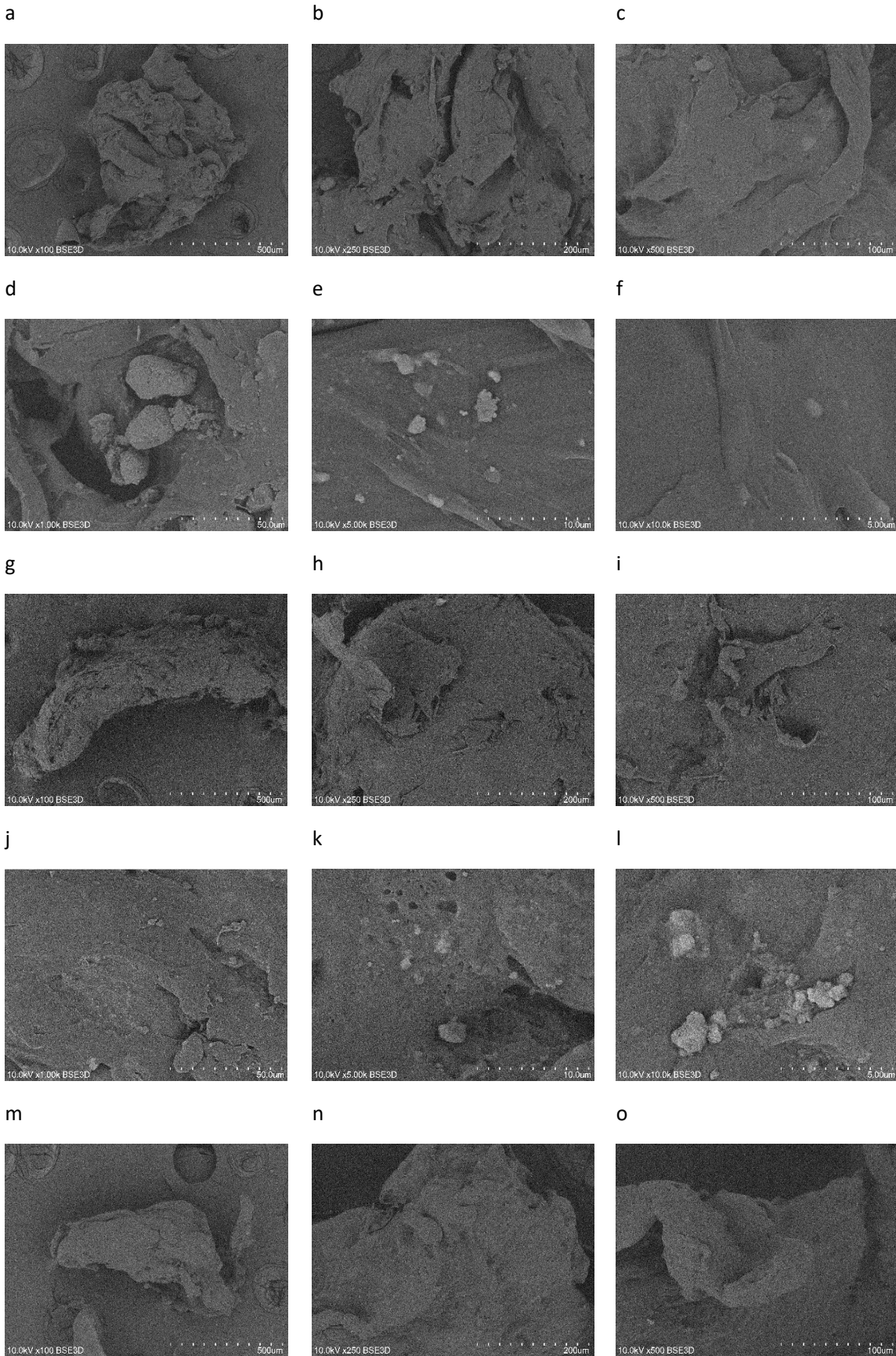
Badania mikrostruktury biokompozytów przeprowadzono w celu oceny morfologii powierzchni badanych materiałów. Na Rys. 28-29 przedstawiono mikrofotografie SEM dla wszystkich badanych próbek przy różnych powiększeniach. Z analizy obrazów wynika, że na powierzchni układów zawierających polilaktyd (Rys. 59-60) widoczne są aglomeraty hydroksyapatytu. Natomiast w biopolimerach otrzymanych na bazie polikaprolaktanu z hydroksyapatytu (Rys. 30-31) rozmieszczenie wypełniacza na powierzchni jest równomierne. Poza obserwacjami powierzchni, przeprowadzono ich analizę EDX w celu określenia składu chemicznego. Wyniki analizy dla poszczególnych próbek przedstawiono na Rys. S35-S44.



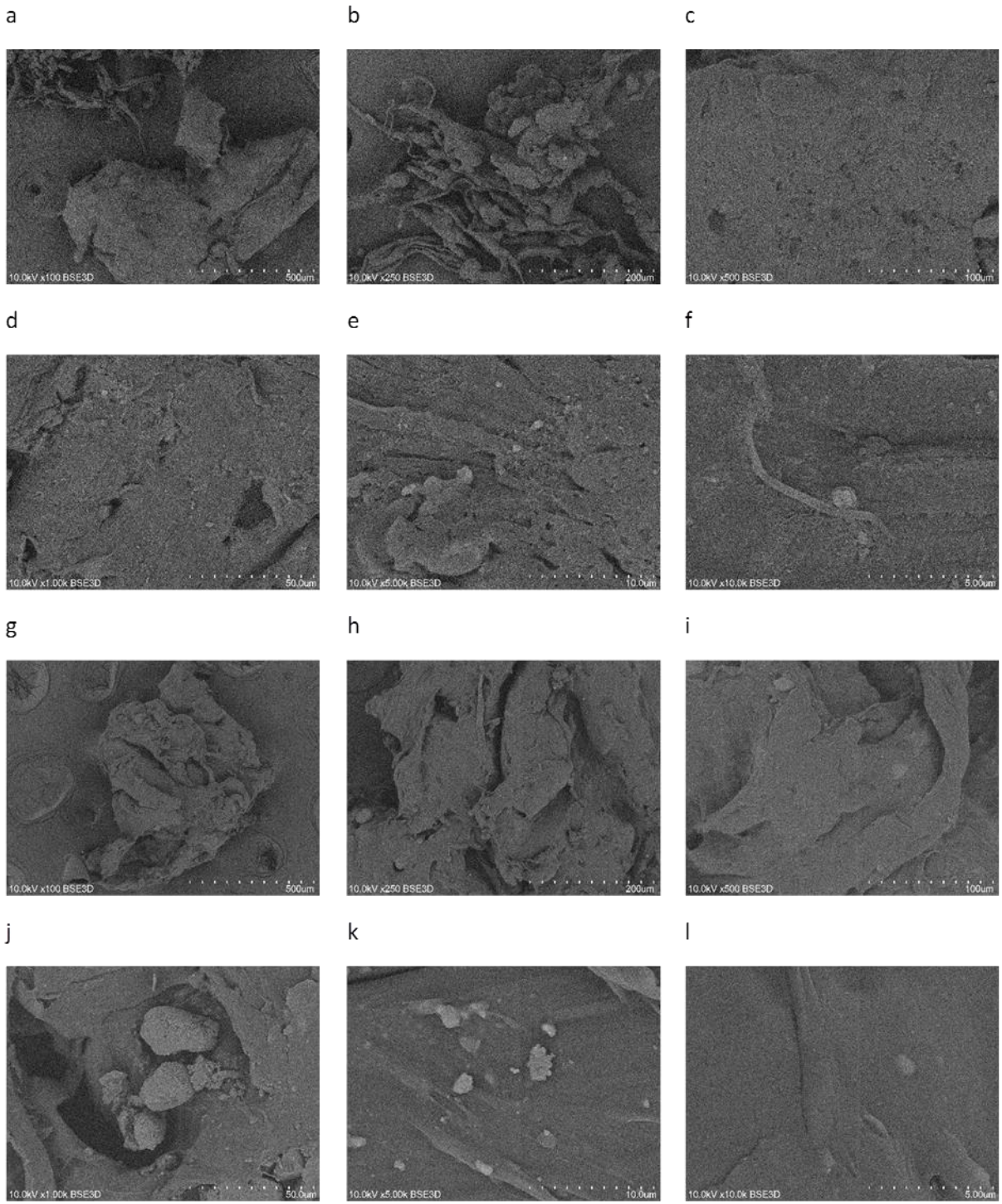
Ryc. 28 Morfologia powierzchni biokompozytów: a-f PLLA12; g-l PLLA12S; m-o PLLA20.



Ryc. 29 Morfologia powierzchni biokompozytów: a-f PLLA40; g-l PLLA60.



Ryc. 30 Morfologia powierzchni biokompozytów: a-f PCAP12; g-l PCAP12S; m-r PCA20.

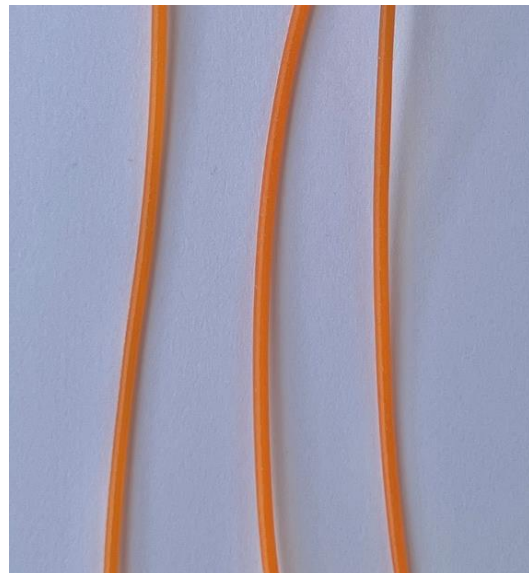
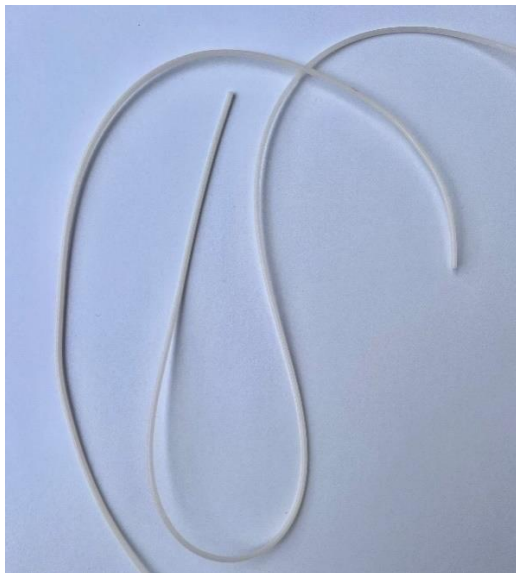
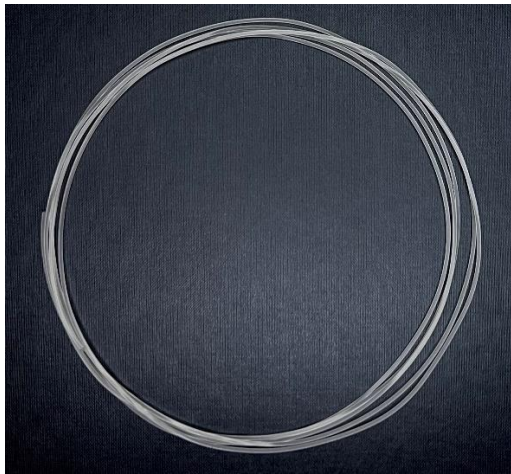


Ryc. 31 Morfologia powierzchni biokompozytów: a-f PCAP40; g-l PCAP60.

Mikrostruktura wszystkich przedstawionych próbek jest bogata; obecne są liczne nierówności, chropowatość i pory. W każdym z badanych materiałów mocno wyróżniają się aglomeraty HAp – co potwierdza dodatkowo analiza EDX wykazująca obecność atomów wapnia i potasu w niektórych obszarach. Największą homogenność próbek zaobserwowano dla PCAP20, PCAP40 i PCAP60 – w przypadku tych próbek aglomeraty są najmniej liczne, a ich rozmiary są najmniejsze, co wskazuje, że PCL łatwiej miesza się z HAp pozwalając na uzyskanie bardziej jednorodnych próbek.

4.2.7 WYTWARZANIE FILAMENTU DO DRUKU 3D

Przy zastosowaniu ekstruzji wysokotopliwej uzyskano dwa rodzaje filamentów (Fot.10, 11) Jeden zawierał w swoim składzie polilaktyd i nanohydroksyapatyt. W drugim oprócz wspomnianych składników został wprowadzony dodatek w postaci meloksykamu. Zdjęcia wytworzonego filamentu przedstawia Fot. 1 Schemat działania ekstrudera oraz dokładny skład poszczególnych filamentów opisano w dziale materiały i metody.

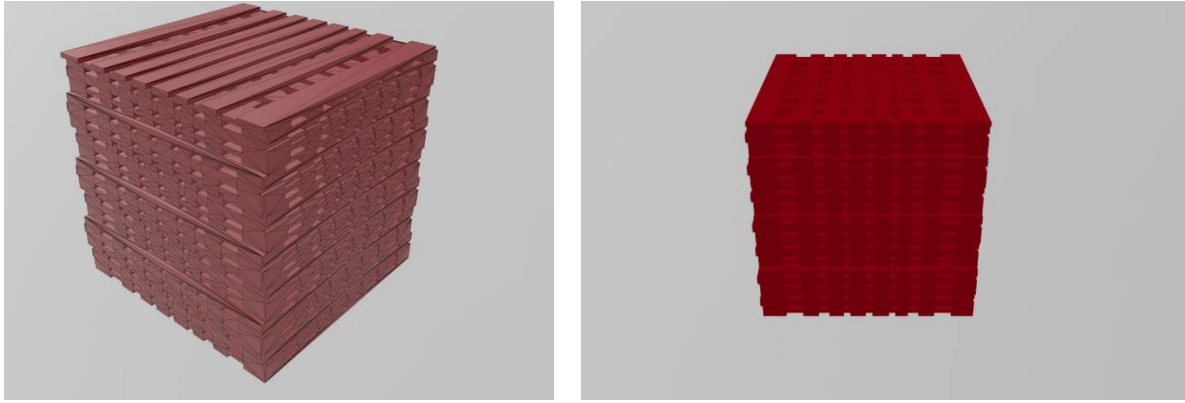


Fot.10 Filament otrzymany w procesie ekstruzji topliwej na bazie polilaktydu i nHAp

Fot. 11 Filament z dodatkiem cząsteczki leku.

4.2.8. OPRACOWANIE PROJEKTÓW GRAFICZNYCH PRZESTRZENNYCH I POROWATYCH SUBSTYTUTÓW KOŚCI W TECHNOLOGII CAD

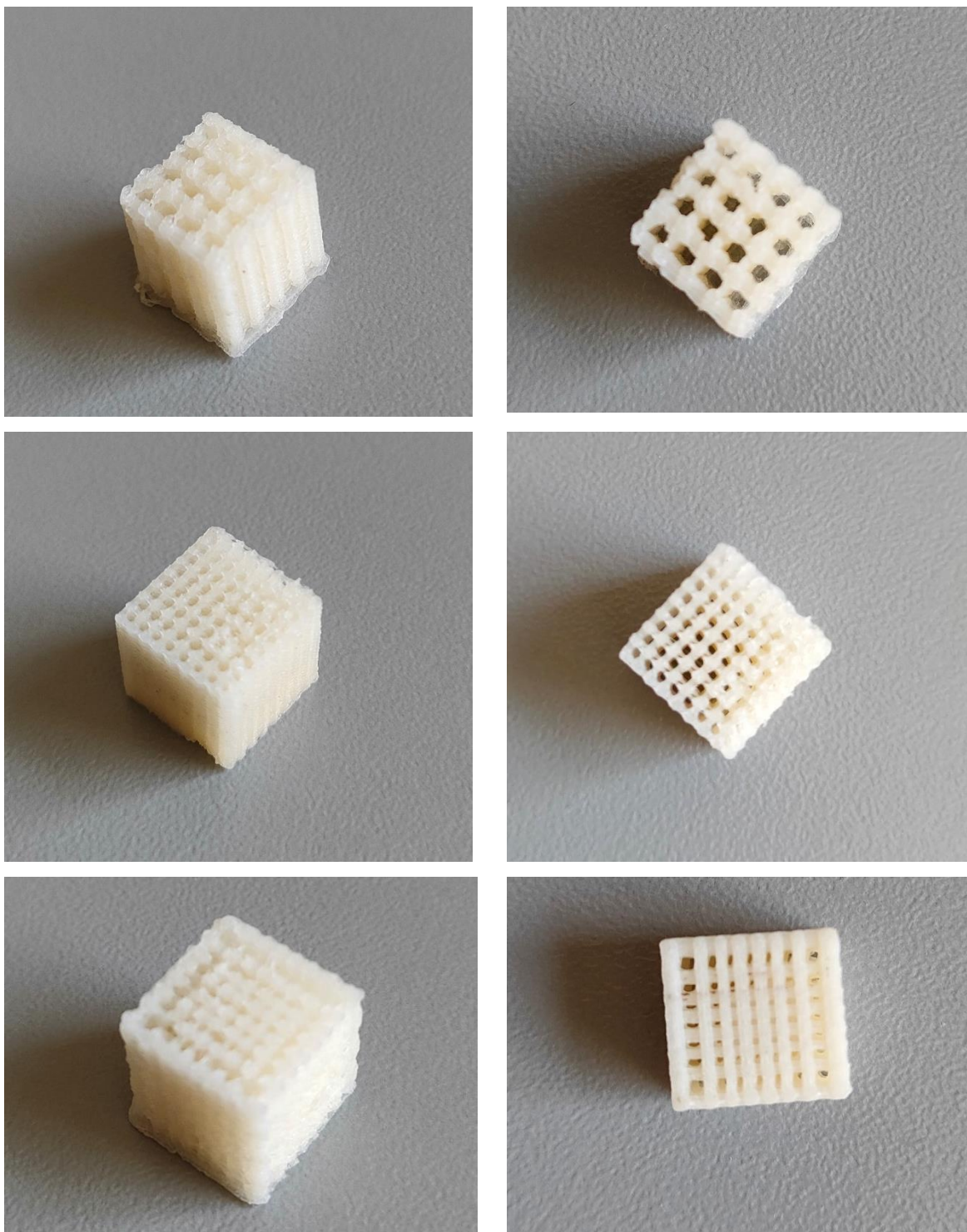
Przykładowe projekty komputerowe opracowane w trakcie realizacji badań.



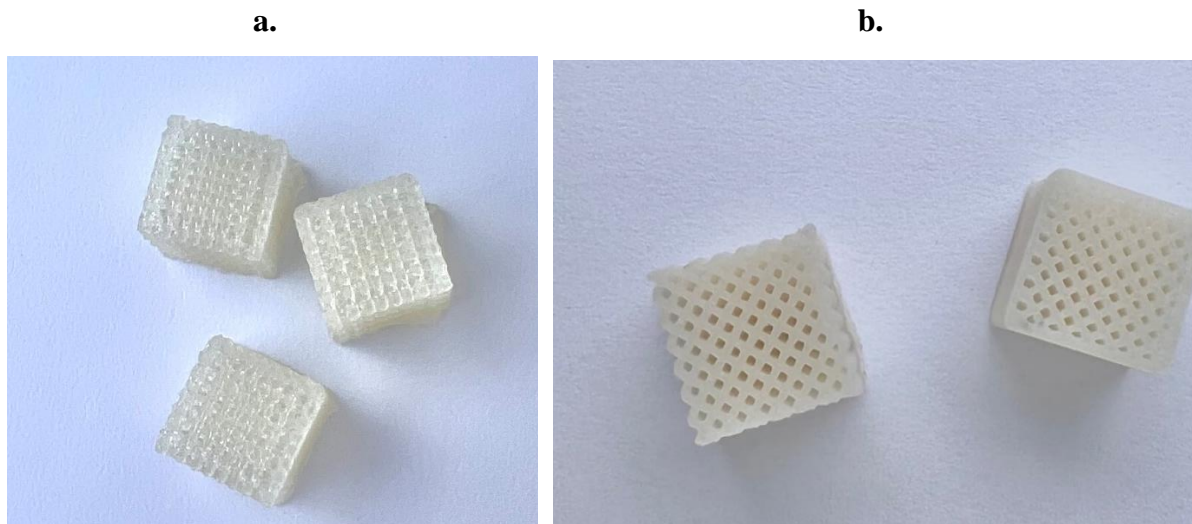
Ryc. 32. Przykładowe projekty graficznych przestrzennych i porowatych substytutów kości w technologii CAD.

4.2.9 WYTWORZENIE PRZESTRZENNYCH PROTOTYPÓW SUBSTYTUTÓW KOŚCI METODĄ DRUKU 3D O RÓŻNEJ ARCHITEKTURZE WEWNĘTRZNEJ

Po opracowaniu modeli czterech rusztozań o różnej geometrii przystąpiono do wytworzenia ich modeli fizycznych za pomocą drukarki 3D.



Fot. 12. Zdjęcia przedstawiają wydruki 3D do rekonstrukcji tkanki kostnej na bazie PLLA i nHAp o różnej porowatości.



Fot. 13. Prototypy kompozytowych rusztowań a. PLLA b. polilaktyd PLLA@nHAp

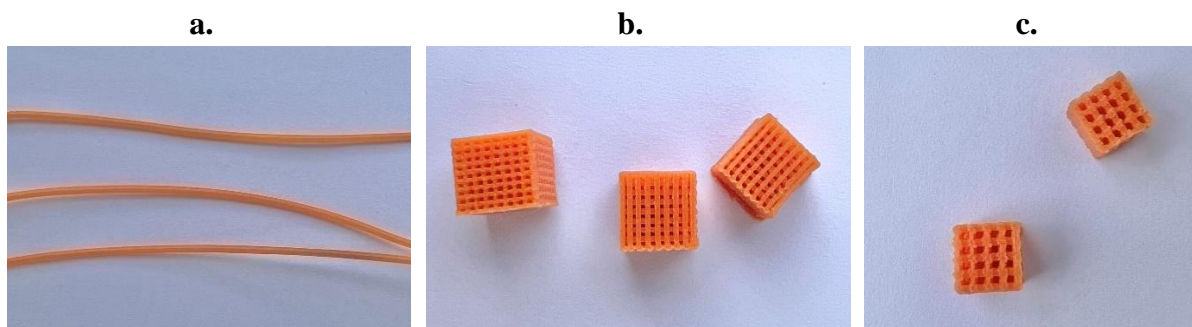
4.2.10. WYTWORZENIE KOLEJNYCH PROTOTYPÓW W DRUKU 3D Z FILAMENTU MODYFIKOWANEGO CZĄSTECZKĄ LEKU.

Wszystkie zaprojektowane wcześniej modele podłoży zostały poprawnie odwzorowane za pomocą techniki druku FDM. Tym razem użyty filament zawierał dodatkowo cząsteczki meloksykam. Otrzymano trójwymiarowe przestrzenne podłoża posiadające otwarte i połączone ze sobą pory. (Fot.z)

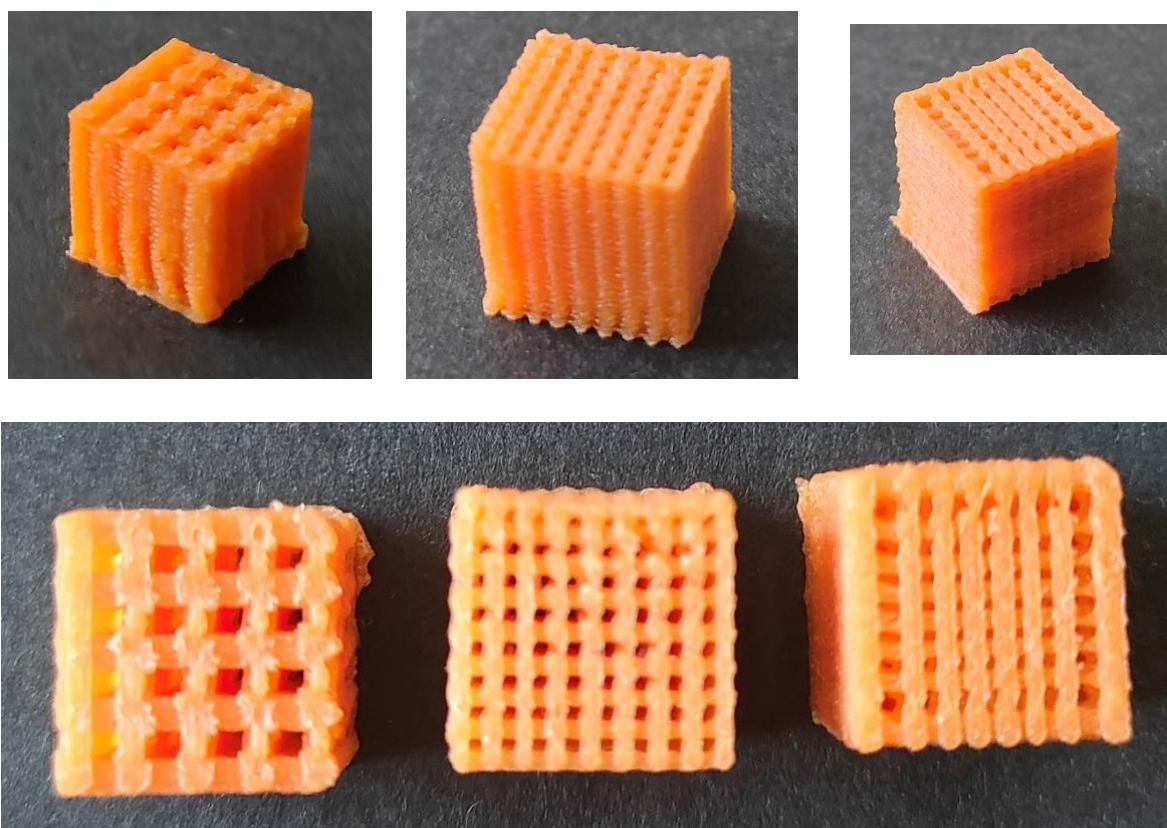
Analizując właściwości leków które potencjalnie mogłyby zostać użyte do druku, wytypowałam meloksykam ze względu na wysoką temperaturę rozkładu. (Tab. 14)

Tab. 14. Parametry fizykochemiczne wybranych leków przeciwbólowych.

	COX	logP	Temperatura rozkładu	Temperatura ekstruzji
Paracetamol	COX-3	0,46	169°C	210°C
Ibuprofen	COX-1 COX-2	3,97	75-78°C	
Meloksykam	COX-2	3,43	254°C	
Kwas acetylosalicylowy	COX-1 COX-2	1,19	136°C	



Fot. 14 Substytuty kości (b. c.) oraz filament (a.) zawierające w swoim składzie cząsteczkę meloksykamu.



Fot. 15 Wydruki zawierające w swoim składzie meloksykam o różnej architekturze wewnętrznej.

4.2.11. PODATNOŚĆ MATERIAŁÓW NA ADHEZJĘ MIKROORGANIZMÓW

Wyniki z oceny zdolności adhezyjnych testowanych szczepów bakterii w odniesieniu do powierzchni badanego biomateriału przedstawiono w tab. 15. Wyniki przedstawiono w ilości uzyskanych jednostek tworzących kolonie zdesorbowanych do 1 ml do 0,5% roztworu saponiny. Startowa liczba bakterii wynosiła 3×10^5 j.t.k. w 1 ml hodowli. Po 48 godzinach inkubacji liczba j.t.k. wynosiła w zakresie od $0.05 \pm 0.00 \times 10^3$ do $1.12 \pm 0.73 \times 10^8$. Najsłabsze zdolności adhezyjne wobec badanych biomateriałów stwierdzono wobec gram-dodatniej

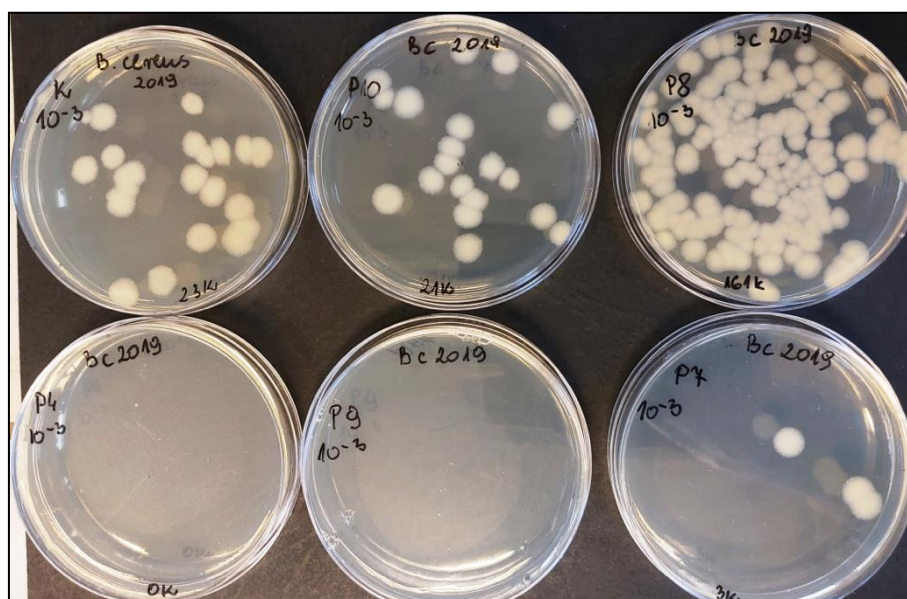
laseczki *B. cereus* PCM 2019 (Fot. 16). Najslabiej skolonizowany był biomateriał PLLA (PK) oraz PLLA@nHAp MEL (9), ilość j.t.k wynosiła $0,05 - 0,1 \times 10^8$ w 1 ml. Najlepsze właściwości adhezyjne ta przetrwalnikująca laseczka wykazywała wobec biomateriału PLLA20 (P2) i PCAP60 (P8), jednakże ilość j.t.k. nie przekraczała ilości dawki zastosowanej jako inokulum. W przypadku gram-dodatnich ziarniaków większe zdolności adhezyjne stwierdzono dla gronkowca metycylinoopornego *S. aureus* MRSA ATCC 33592. Z reguły izolowano z powierzchni biomateriałów powyżej 10^6 j.t.k. z 1 ml zawiesiny. Podobne wyniki uzyskano w przypadku gram-ujemnych pałeczek większe zdolności adhezyjne stwierdzono w przypadku *P. aeruginosa* PCM 2058 (Fot. 17) niż *E. coli* PCM 2057 (Fot. 18). Z reguły, ilość jednostek tworzących kolonie wzrastała wobec dawki inokulacyjnej o 1 lub 2 rzędy wielkości ($10^6 - 10^7$). Biomateriały PLLA (PK) i PLLA@nHAp MEL (9) były najslabiej skolonizowane przez testowane bakterie gram-dodatnie jak i gram-ujemne.

Tab. 15. Ilościowa Zdolności adhezyjne szczepów wzorcowych wobec biopolimerów wyrażone w j.t.k./ml zawiesiny testowanych bakterii

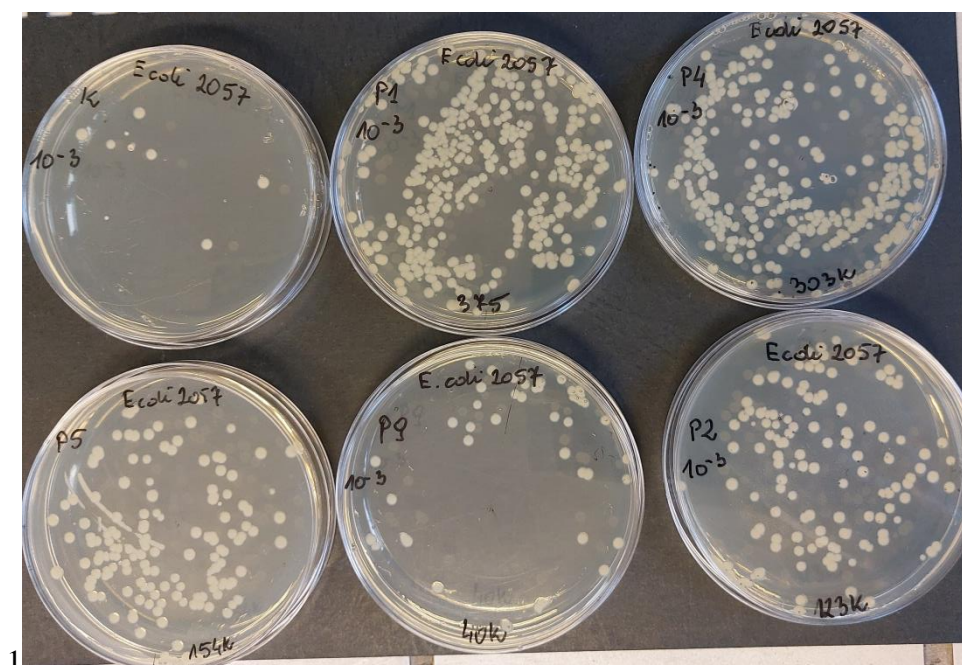
	← Polimer Mikroorganizm →	<i>B. cereus</i> PCM 2019	<i>S. aureus</i> PCM 2054	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 33592	<i>E. coli</i> PCM 2057	<i>P. aeruginosa</i> PCM 2058
1.	PLLA (PK)	$6.66 \pm 0.14 \times 10^4$	$4.80 \pm 0.52 \times 10^4$	$0.55 \pm 0.09 \times 10^4$	$6.00 \pm 0.5 \times 10^4$	$5.66 \pm 0.16 \times 10^6$
2.	PLLA@nHAp MEL (P9)	$0.10 \pm 0.10 \times 10^3$	$0.16 \pm 0.01 \times 10^4$	$1.40 \pm 0.02 \times 10^4$	$4.46 \pm 0.22 \times 10^5$	$10.4 \pm 2.50 \times 10^6$
3.	PLLA@nHAp (P10)	$8.33 \pm 0.14 \times 10^4$	$4.06 \pm 0.76 \times 10^5$	$3.19 \pm 0.20 \times 10^6$	$3.19 \pm 0.20 \times 10^6$	$6.77 \pm 0.19 \times 10^7$
4.	PLLA12NL (P1)	$2.00 \pm 0.00 \times 10^4$	$8.43 \pm 0.96 \times 10^6$	$2.76 \pm 0.25 \times 10^6$	$6.20 \pm 0.30 \times 10^6$	$2.30 \pm 0.16 \times 10^6$
5.	PLLA20 (P2)	$1.16 \pm 0.14 \times 10^5$	$3.26 \pm 0.07 \times 10^5$	$1.16 \pm 0.16 \times 10^6$	$9.76 \pm 0.96 \times 10^5$	$1.66 \pm 0.19 \times 10^7$
6.	PLLA40 (P3)	$6.66 \pm 0.14 \times 10^4$	$5.50 \pm 0.25 \times 10^5$	$1.01 \pm 0.03 \times 10^6$	$3.05 \pm 0.32 \times 10^6$	$5.32 \pm 0.72 \times 10^6$
7.	PLLA60 (P4)	$0.05 \pm 0.00 \times 10^3$	$4.63 \pm 0.07 \times 10^5$	$2.63 \pm 0.30 \times 10^6$	$7.03 \pm 0.10 \times 10^6$	$2.85 \pm 0.94 \times 10^6$
8.	PLLA12S (P5)	$2.00 \pm 0.00 \times 10^4$	$2.44 \pm 0.96 \times 10^5$	$2.59 \pm 0.24 \times 10^6$	$1.49 \pm 0.22 \times 10^6$	$1.15 \pm 0.38 \times 10^7$
9.	PCAP20 (P6)	$8.33 \pm 0.14 \times 10^4$	$1.76 \pm 0.15 \times 10^5$	$1.41 \pm 0.67 \times 10^6$	$1.52 \pm 0.72 \times 10^6$	$9.10 \pm 0.34 \times 10^6$
10.	PCAP40 (P7)	$3.66 \pm 0.14 \times 10^4$	$4.56 \pm 0.12 \times 10^5$	$2.08 \pm 0.83 \times 10^6$	$1.89 \pm 0.30 \times 10^6$	$3.40 \pm 0.25 \times 10^6$
11.	PCAP60 (P8)	$3.10 \pm 0.14 \times 10^5$	$5.03 \pm 0.16 \times 10^5$	$3.71 \pm 0.07 \times 10^7$	$4.28 \pm 0.54 \times 10^6$	$1.12 \pm 0.73 \times 10^8$
12.	PCAP12S (P11)	$2.20 \pm 0.00 \times 10^4$	$2.4 \pm 0.96 \times 10^5$	$2.39 \pm 0.24 \times 10^6$	$1.39 \pm 0.22 \times 10^6$	$1.5 \pm 0.38 \times 10^7$

±SD – odchylenie standardowe

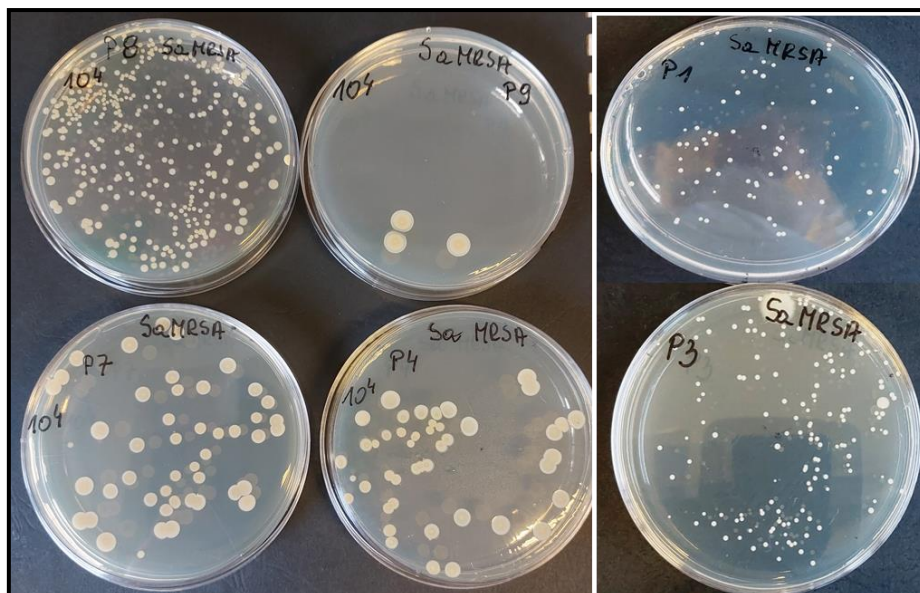
Fot. 16 Przykładowe posiewy powierzchniowe zawiesiny *B. cereus* PCM 2019 zdesorbowanych pod wpływem saponiny z powierzchni materiału PLLA (K), PLLA 60 (P4), PCAP40 (P7), PCAP60 (P8), PLLA@ nHAp MEL (P9), PLLA@ nHAp (P10) z rozcieńczenia 10^{-3} .



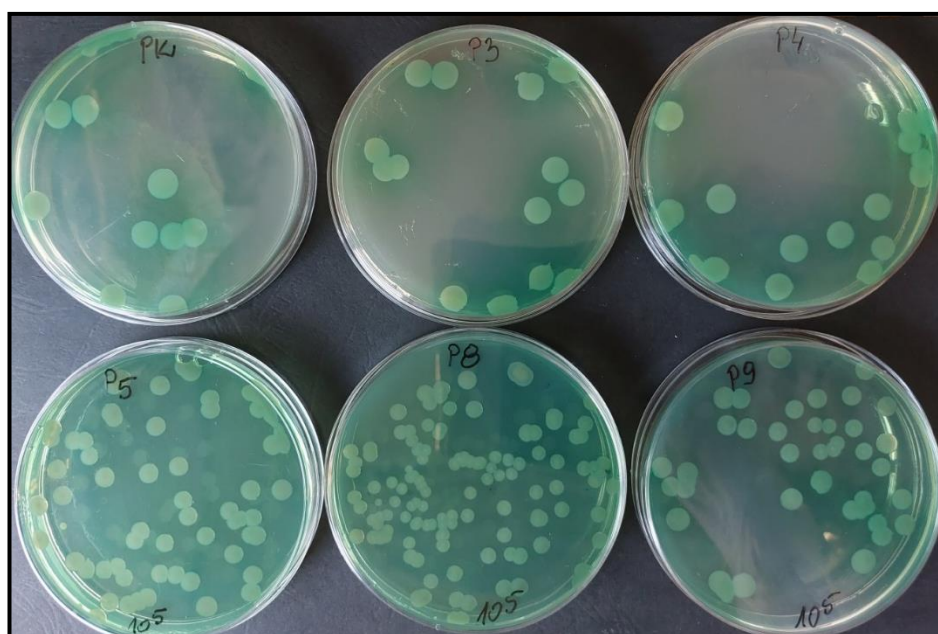
Fot. 17. Przykładowe posiewy powierzchniowe zawiesiny *E. coli* PCM 2057 zdesorbowanych pod wpływem saponiny z powierzchni materiału PLLA (K), PLLA 12 NL (P1), PLLA 20 (P2), PLLA 60 (P4), PLLA 12S (P5) i PLLA@ nHAp MEL (P9) z rozcieńczenia 10^{-3} .



Fot. 18. Przykładowe posiewy powierzchniowe zawiesiny *S. aureus* MRSA ATCC 33592 zdesorbowanych pod wpływem saponiny z powierzchni materiału PLLA 12 NL (P1), PLLA 40 (P3), PLLA 60 (P4), PCAP40 (P7), PCAP60 (P8), i PLLA@ nHAp MEL (P9) z rozcieńczenia 10^{-4} .



Fot. 19. Przykładowe posiewy powierzchniowe zawiesiny *P. aeruginosa* PCM 2058 zdesorbowanych pod wpływem saponiny z powierzchni materiału PLLA (PK), PLLA 40 (P3), PLLA 60 (P4), PLLA 12S (P5), PCAP60 (P8) i PLLA@ nHAp MEL (P9) i PLLA@ nHAp (P10) z rozcieńczenia 10^{-5} .

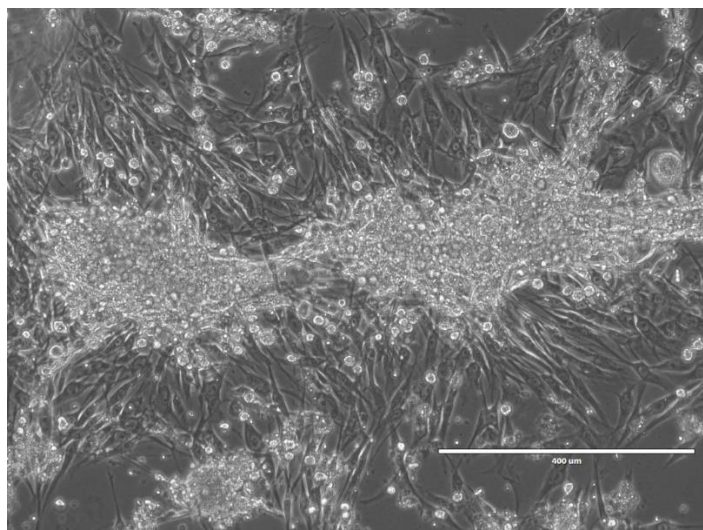


W wyniku oceny podatności materiałów na adhezję mikroorganizmów stwierdzono:

1. Najsłabsze właściwości adhezyjne wobec testowanych biomateriałów wykazywały bakterie gram-dodatnie z rodzaju *Bacillus* i gronkowce niemetycylinooporne (PCM 2054).
2. Pałeczka ropy błękitnej (PCM 2058) cechowała się najsilniejszą zdolnością adhezyjną wobec testowanych biomateriałów.
3. Z reguły, bakterie gram-dodatnie nie wykazywały zdolności adhezyjnych wobec testowanych biomateriałów.
4. Najslabiej kolonizowane przez testowane bakterie były biomateriały PLLA (PK) oraz PLLA@nHAp MEL (9).

4.2.12. IZOLACJA KOMÓREK Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ.

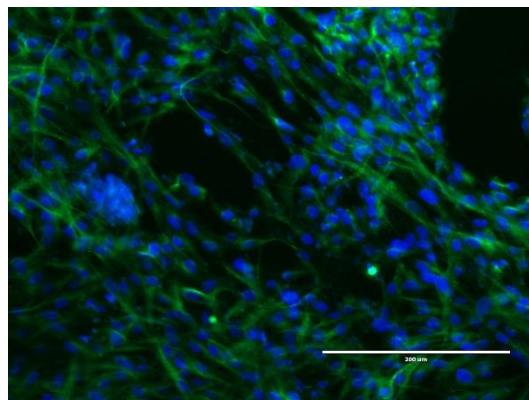
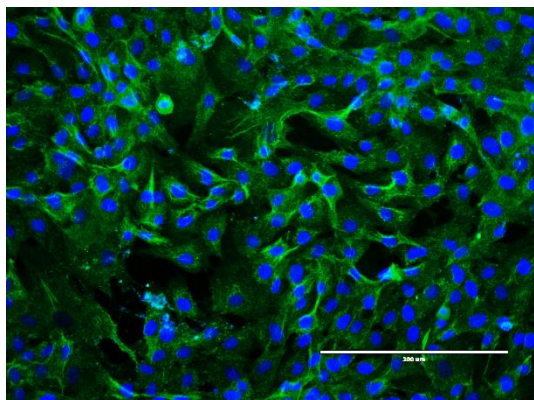
Izolację komórek przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanym protokołem. Materiał do izolacji był pobrany podczas zabiegu liposukcji i nie był przeznaczony do dalszego wykorzystania w leczeniu. W trakcie prowadzonych badań wykonano 5 izolacji od pacjentek w różnym wieku w przedziale od 25 do 42 lata. W tej grupie jedna z pacjentek była leczona z powodu zespołu metabolicznego. Wszystkie izolacje zakończyły się sukcesem, wyizolowane komórki były poddane analizie jakościowej Ryc. 33. Dla wszystkich wykonano różnicowanie w kierunku osteoblastów Ryc. 34. Wszystkie izolowane hodowle spełniły wymagania jakościowe i różnicowały się w osteoblasty. Fot. 20 przedstawia przykładową hodowlę izolowaną z tkanki tłuszczowej.



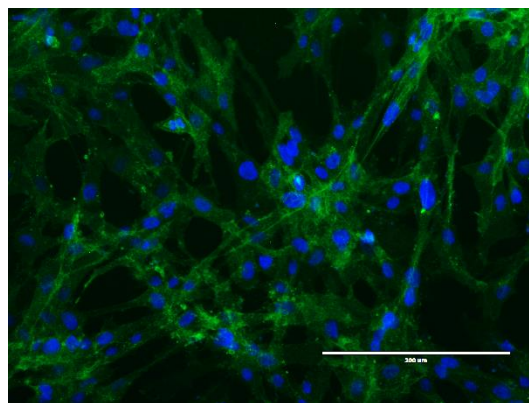
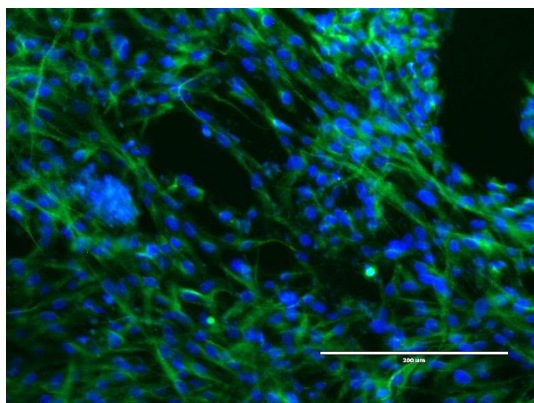
Fot. 20. Hodowla pierwotna komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej. 5 dni od izolacji, pożywka selektywna dla komórek macierzystych NutriStem. Powiększenie obiektywu 10x, mikroskop EVOS FL.

Przedstawione na rycinie komórki są adherentne, widoczne są fragmenty tkanki z której zostały wyizolowane. Morfologia komórek przypomina fibroblasty.

CD44 **CD73**

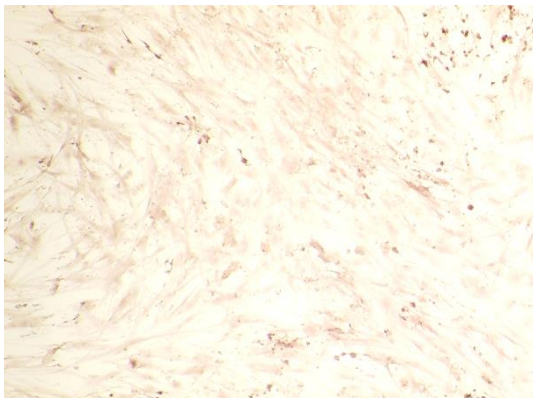


CD90 **CD105**

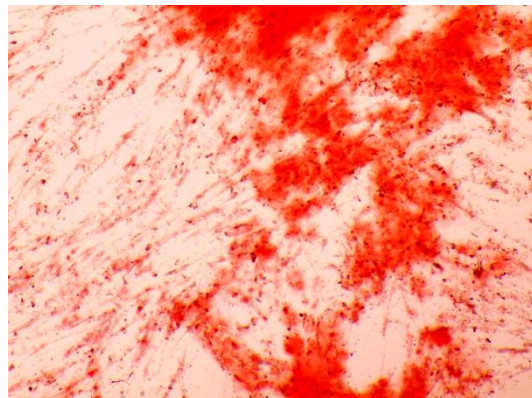


Ryc. 33. Wybrane markery powierzchniowe wykorzystywane do oceny wyizolowanych komórek. Mikroskop EVOS FL, powiększenie 20x.

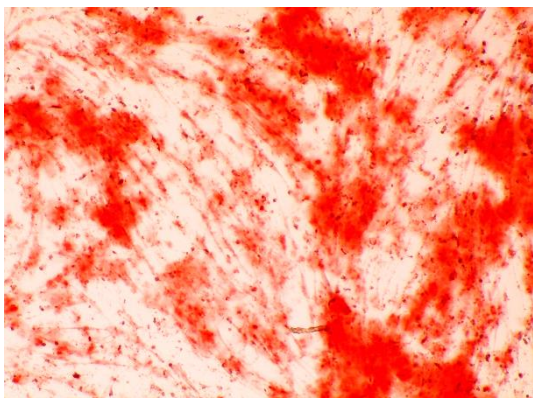
Kontrola



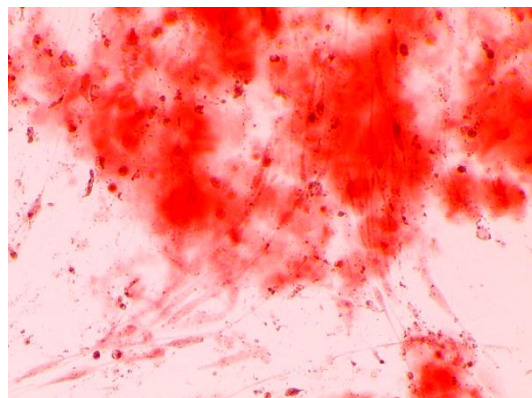
a.



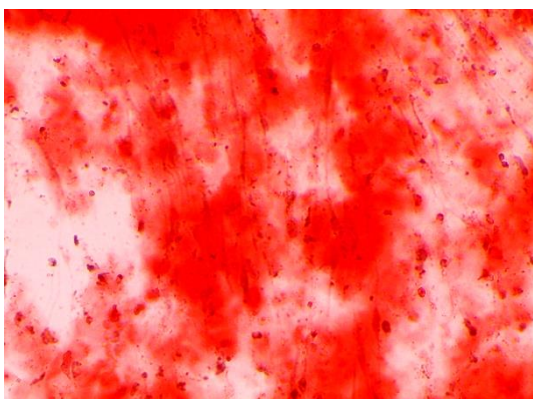
b.



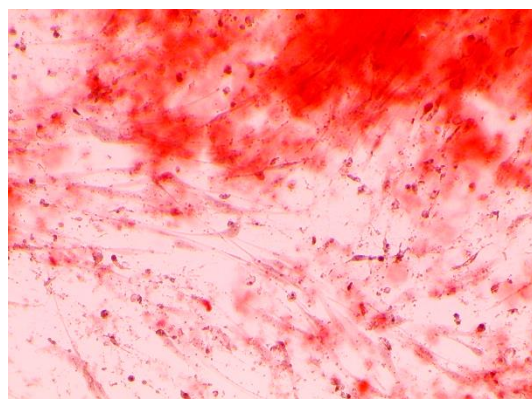
c.



d.



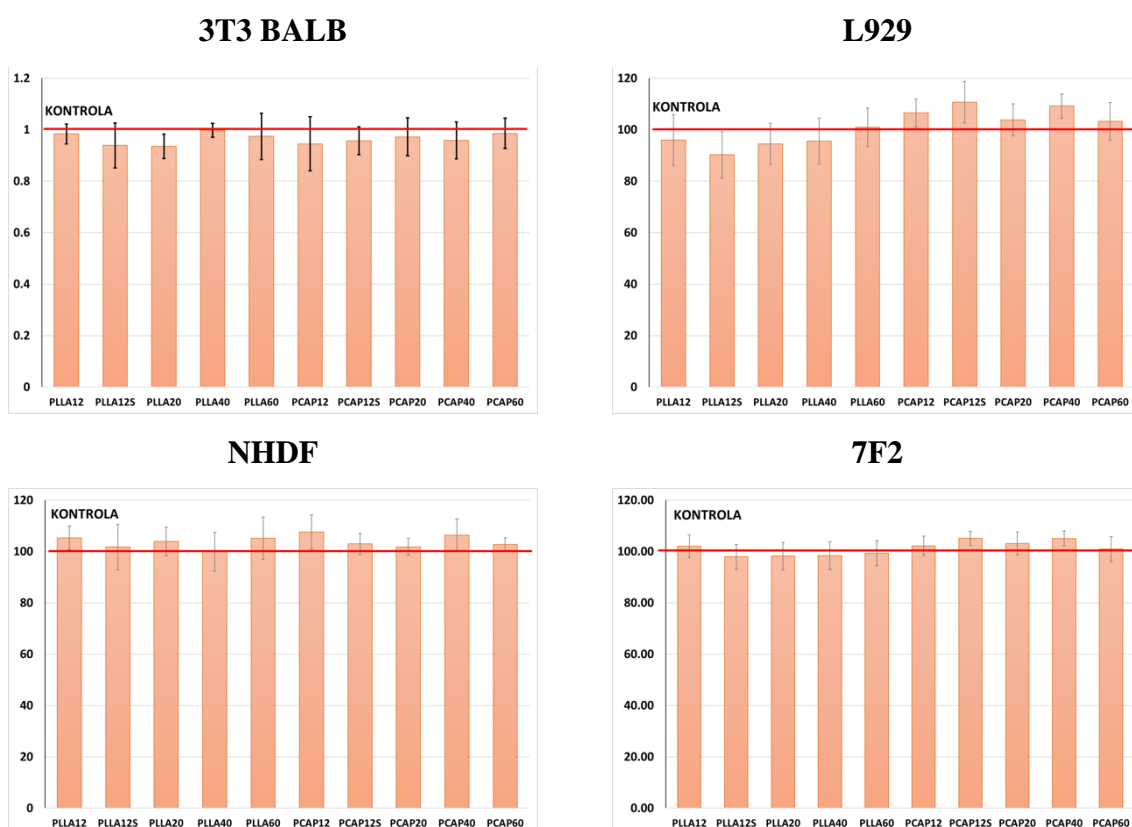
e.



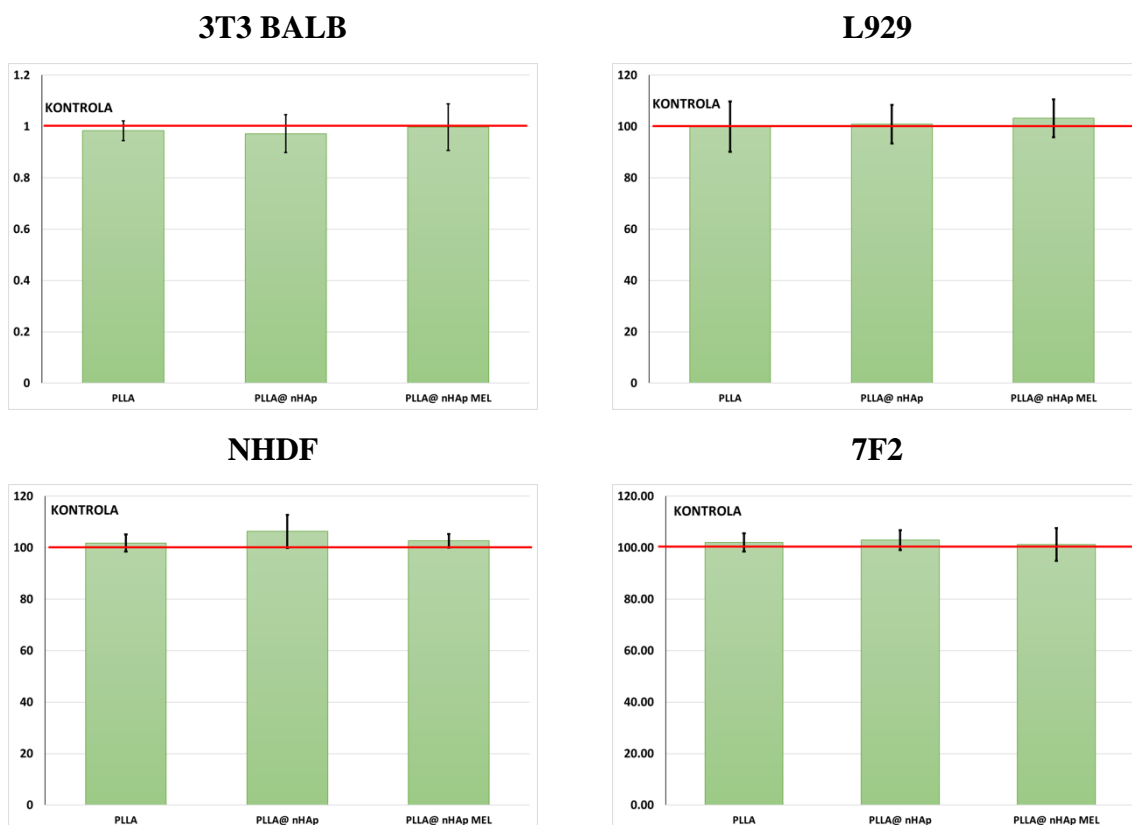
Ryc. 34 Różnicowanie poszczególnych hodowli w kierunku osteoblastów. Kontrola – komórki rosnące na pożywce selektywnej , a-e hodowla z wykorzystanie pożywki różnicującej. Mikroskop Evos XI.

4.2.13 OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI *IN VITRO*

Ocenę cytotoxycznosci przeprowadzono zgodnie z normą 10993-5, zgodnie z metodyką opisaną powyżej. Badana wykonano dla ekstraktów z badanych materiałów na wybranych liniach komórkowych. Ryc. 35 przedstawia wynik dla materiału w postaci krążków, a Ryc. 36 dla wydruku 3D. W badaniu przeprowadzonym zgodnie z normą nie stwierdzono cytotoxycznosci dla komórek.



Ryc. 35. Ocena cytotoxycznosci ekstraktów z badanych materiałów w teście MTT. Wyniki po 24 h inkubacji z ekstraktami z badanych materiałów. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione jako stosunek wartości uzyskanej w teście do hodowli kontrolnej (E/E_0). Nie stwierdzono statystycznie istotnego spadku żywotności hodowli w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$).



Ryc. 36. Ocena cytotoksyczności ekstraktów z badanych wydruków w teście MTT. Wyniki po 24 h inkubacji z ekstraktami z badanych wydruków. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione jako stosunek wartości uzyskanej w teście do hodowli kontrolnej (E/E_0). Nie stwierdzono statystycznie istotnego spadku żywotności hodowli w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$).

Dla badanych materiałów wykonano również ocenę hodowli 24 h fibroblastów linii L929 z materiałem i oceniono morfologię komórek w jego pobliżu, 1 cm od brzegu próbki, w pozostałej części dołka, a także pod krążkiem, w odwrócony mikroskop kontrastowo-fazowy EVOS FL. Kontrolę w badaniach stanowiła hodowla fibroblastów prowadzona w pełnym medium i w standardowych warunkach, która nie miała kontaktu z badanym materiałem.

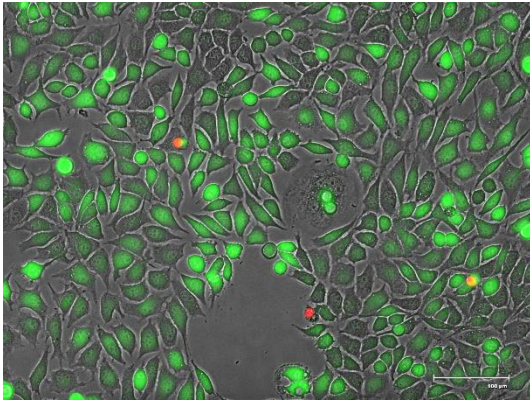
Stopień cytotoksyczności materiałów oceniono według kryteriów opisujących zmiany w morfologii komórek. Zgodnie z cytowaną normą za materiał cytotoksyczny uznaje się taki, który posiada co najmniej 2 stopień oceny.

Tab. 16: Stopnie toksyczności dla badań z zastosowaniem kontaktu bezpośredniego

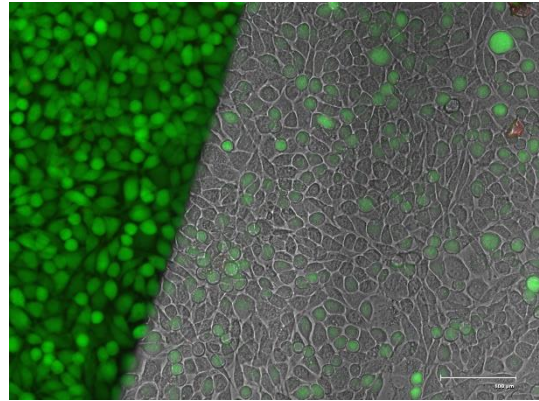
Stopień	Toksyczność	Opis zmian w hodowli komórkowej
0	brak	brak zmian w otoczeniu materiału oraz pod materiałem
1	słaba	pojedyncze komórki uległy degeneracji lub zniekształceniu pod materiałem
2	umiarkowana	strefa zmienionych komórek jest ograniczona do powierzchni pod materiałem
3	średnia	strefa zmienionych komórek jest ograniczona do 1 cm wokół materiału
4	silna	strefa zmienionych komórek przekracza granicę 1 cm wokół materiału

Ocenę zmian morfologicznych fibroblastów po czasowym kontakcie z badanymi materiałami oraz ich stopień cytotoxyczności przedstawiono na ryc. 37 i 38. Komórki fibroblastów po kontakcie z materiałami wykazywały prawidłową morfologię. W obrazie morfologicznym komórek nie zaobserwowano różnic w odniesieniu do hodowli kontrolnej, przy brzegu próbki, 1 cm od próbki, a także w dalszej odległości od próbki oraz pod próbką. W przeprowadzonych badaniach wykazano stopień cytotoxyczności na poziomie 0, w czterostopniowej skali oceny toksyczności. Świadczy to o braku działania cytotoxycznego ocenianych materiałów.

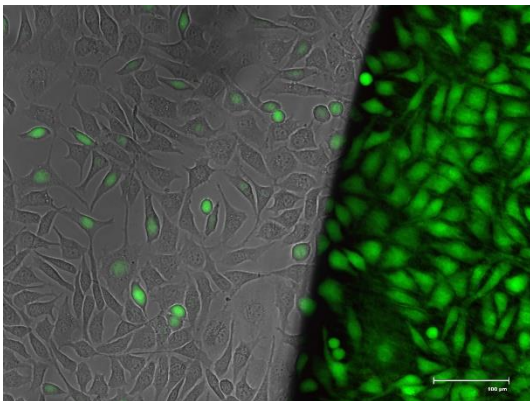
KONTROLA



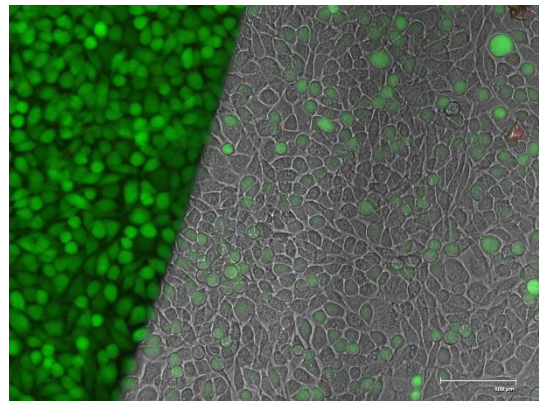
PLLA12



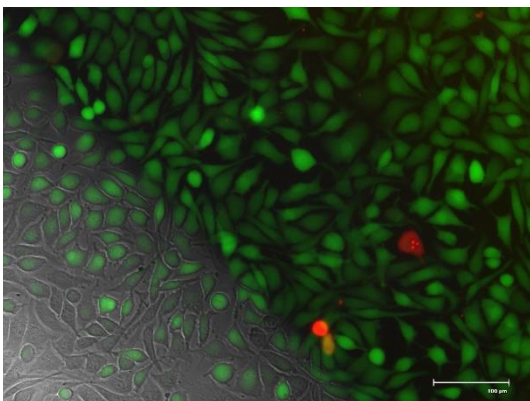
PLLA12S



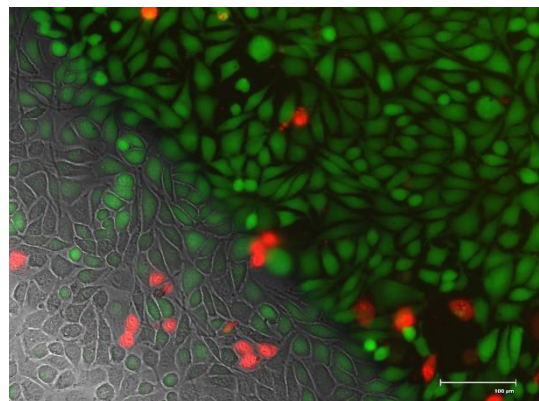
PLLA20



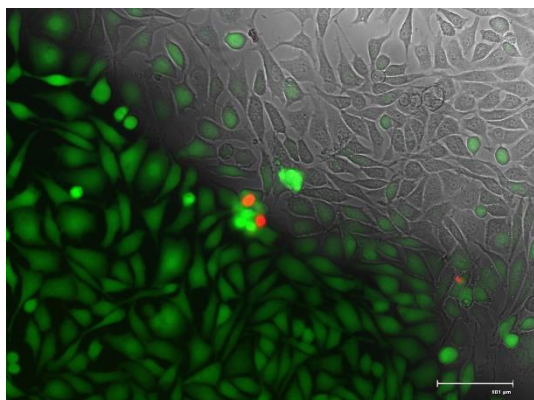
PLLA40



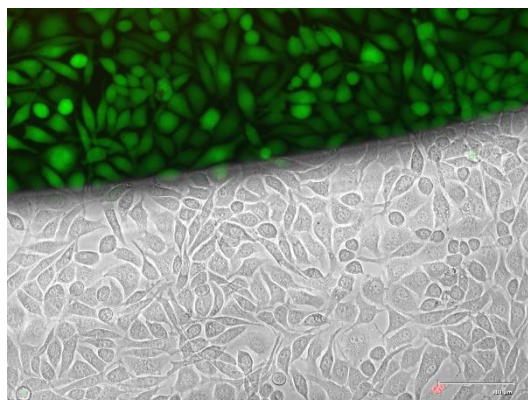
PLLA60



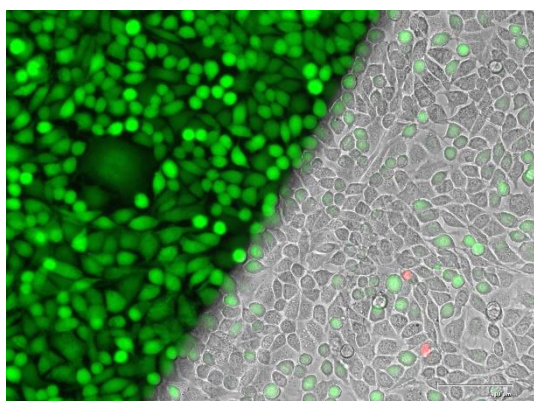
PCAP12



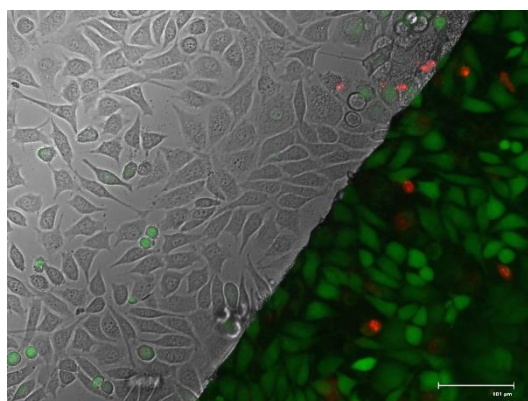
PCAP12S



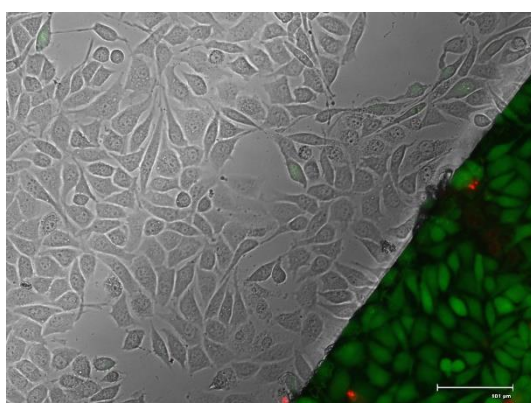
PCAP20



PCAP40

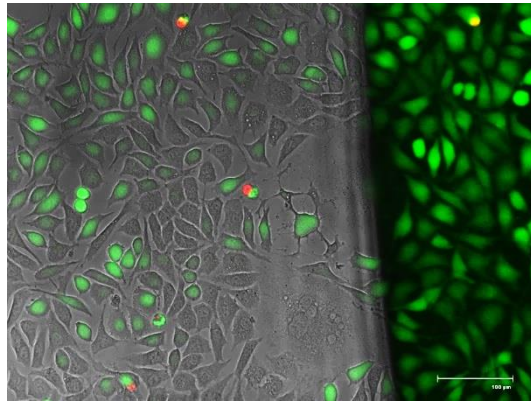


PCAP60

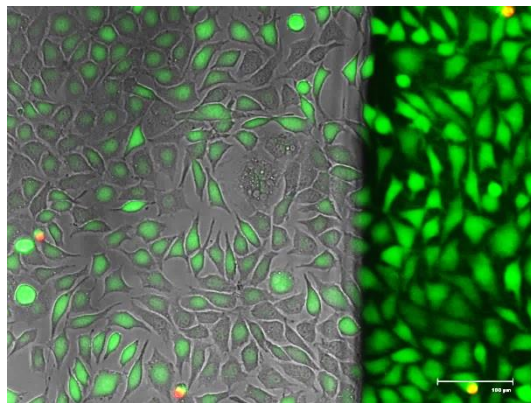


Ryc. 37. Kohodowla komórek linii L929 badanych skafoldów, powiększenie obiektywu 20x, mikroskop FLOID, barwienie InvitrogenReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit Green / Red. Komórki widocznie w białym polu – wzrost obok badanego skafoldu, w obrazie fluorescencyjnym pod skafoldem.

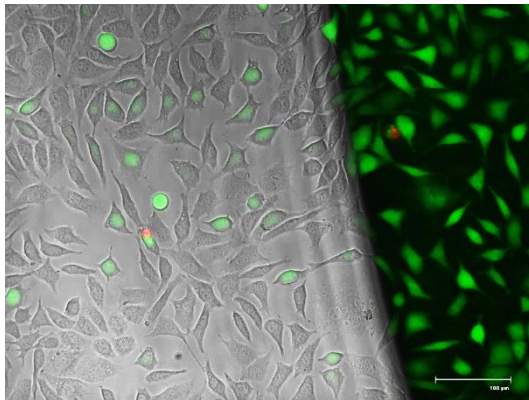
PLLA



PLLA@ nHAp



PLLA@ nHAp MEL



Ryc. 38. Kohodowla komórek linii L929 badanych wydruków, powiększenie obiektywu 20x, mikroskop FLOID, barwienie InvitrogenReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit Green / Red. Komórki widocznie w białym polu – wzrost obok badanego skafoldu, w obrazie fluorescencyjnym pod skafoldem.

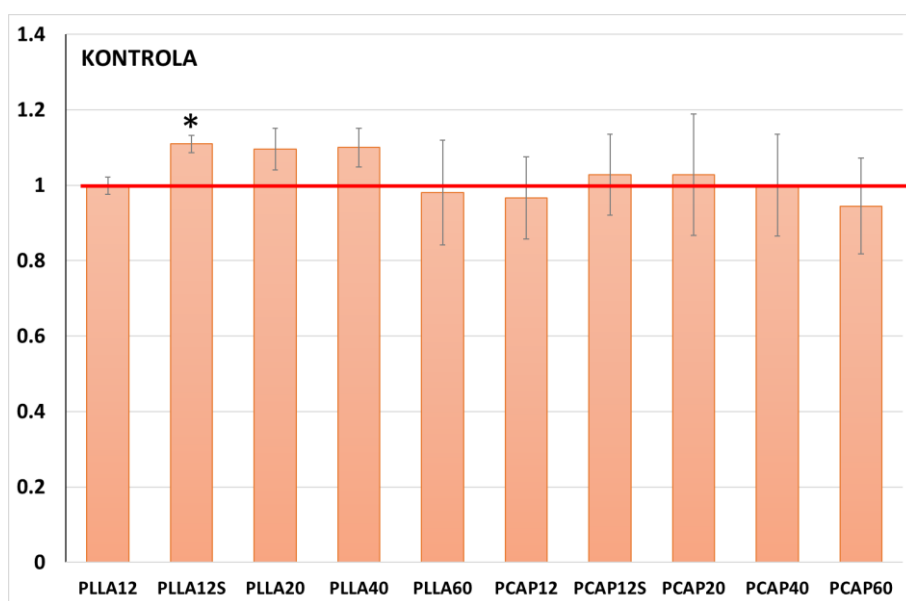
4.2.14. OCENA WZROSTU KOMÓREK NA BADANYCH BIOMATERIAŁACH

Wytworzone w badaniach materiały są przeznaczone do zastosowania w regeneracji tkanki kostnej. Aby mogły prawidłowo pełnić zakładaną funkcję muszą posiadać powierzchnię, która będzie dobrym podłożem do wzrostu komórek. W wyniku badań przeprowadzono ocenę ilościową i jakościową wzrostu opracowanych materiałów. W teście MTT dla komórek NHDF stwierdzono lepsze porastanie materiału w porównaniu do kontroli dla materiału PLLA12S. Wyraźne różnice, lepszy wzrost zaobserwowano dla hodowli osteoblastów – linia 7F2. W przypadku tych komórek zaobserwowano zwiększoną proliferację dla 3 badanych materiałów w porównaniu z kontrolą.

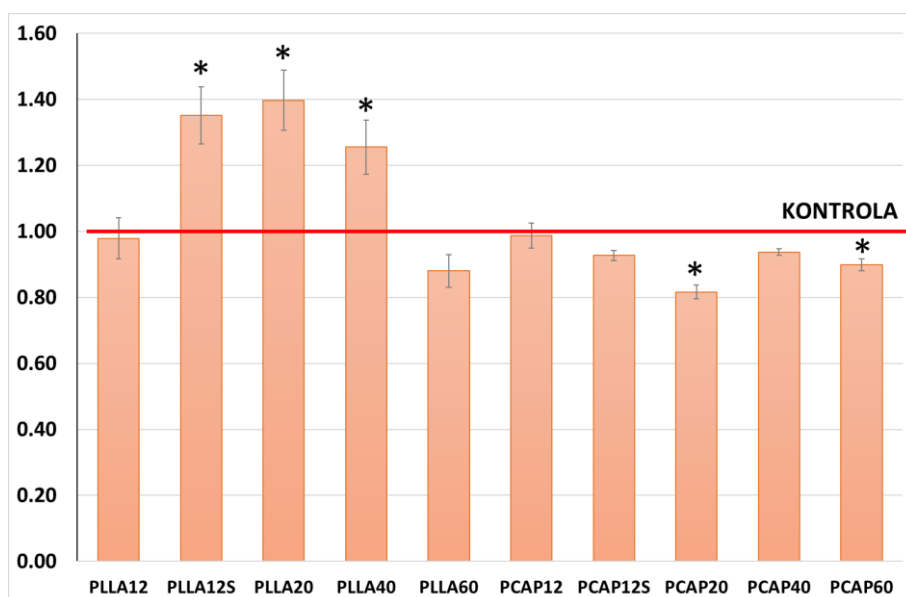
Wynik ten może być spowodowany strukturą powierzchni obu badanych materiałów. Jest to szczególnie dobrze widoczne na Ryc. 39. Materiały serii PLLA mają powierzchnię bardziej nierówną, pofałdowaną, a to może sprzyjać wzrostowi większej ilości komórek.

Zdjęcia wzrostu komórek na wszystkich badanych powierzchniach przedstawia Ryc. 40 i 41.

NHDF

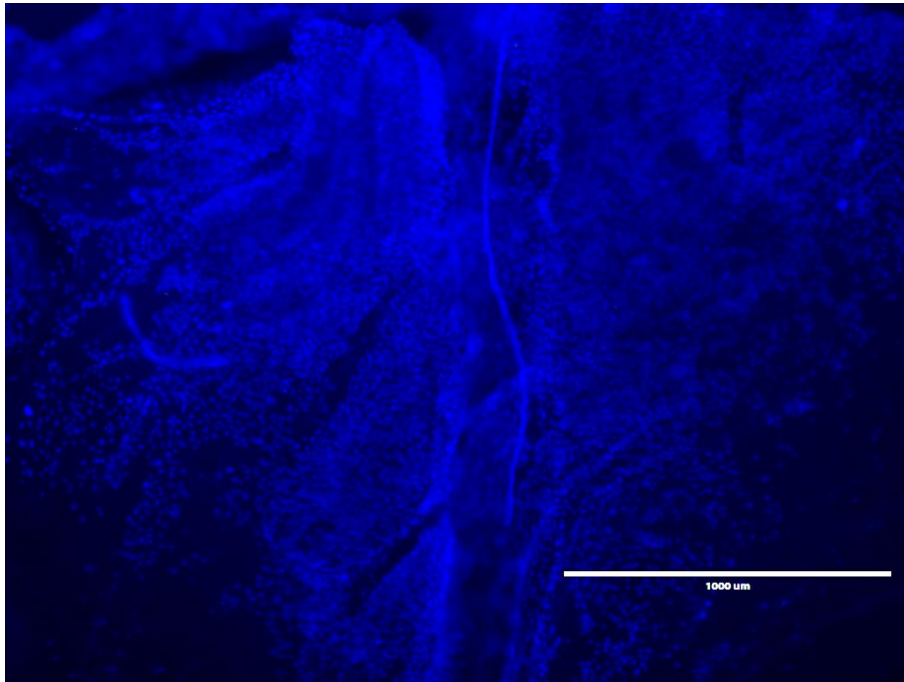


7F2

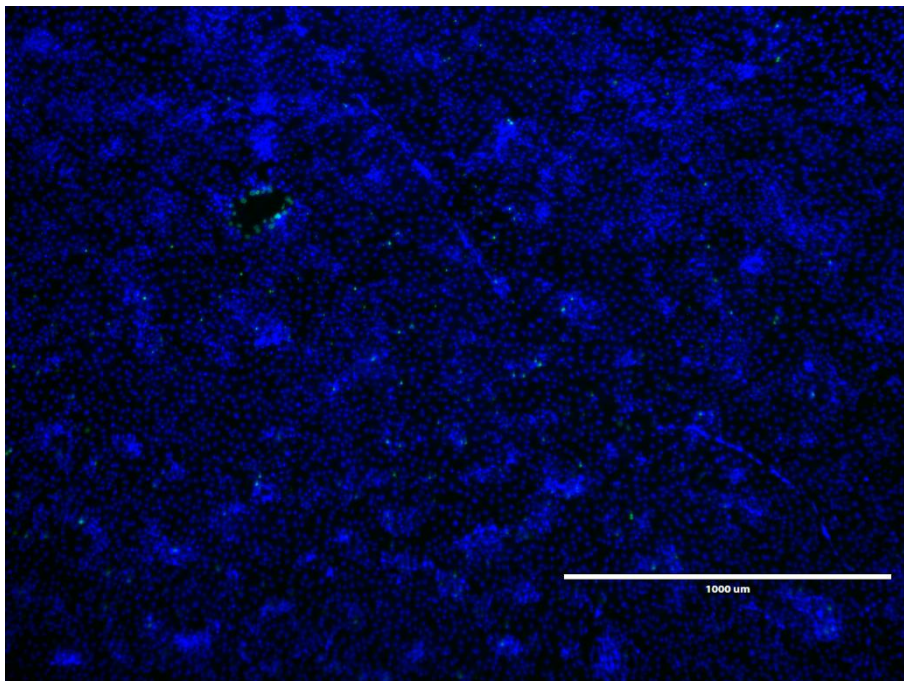


Ryc. 39. Ocena wzrostu komórek na powierzchni badanych materiałów teście MTT. Wyniki po 72 h hodowli komórek na badanej powierzchni. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione jako stosunek wartości uzyskanej w teście do hodowli kontrolnej (E/E_0). Istotność statystyczna w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$).

PLLA

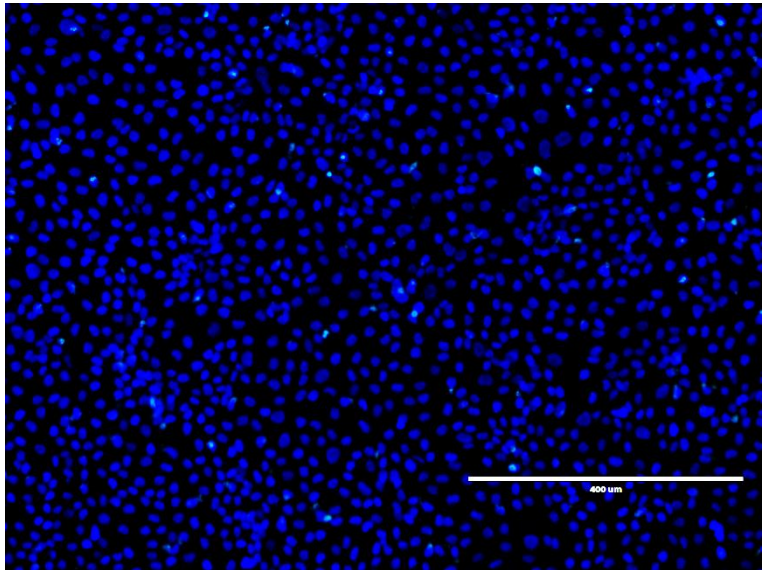


PCAP

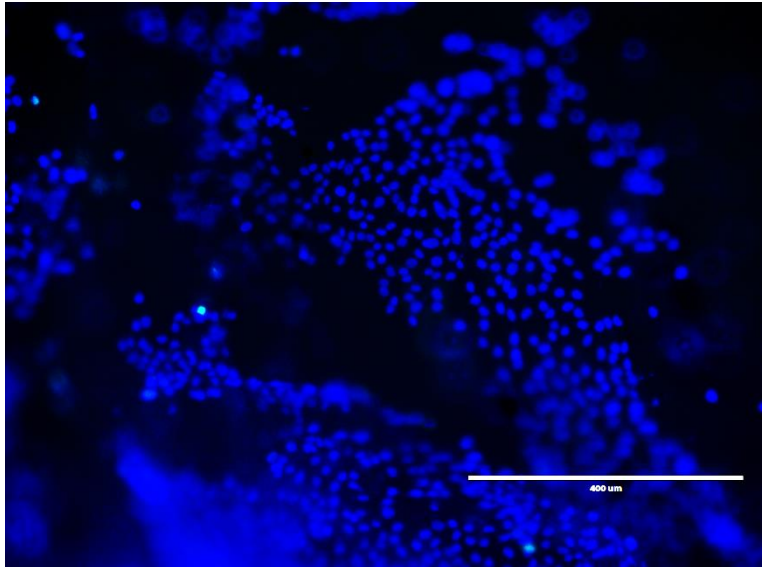


Ryc. 40. Przykładowy wzrost komórek linii L929 na powierzchni PLLA i PCAP, powiększenie obiektywu 4x, mikroskop EVOS FL, barwienie InvitrogenRe, adyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green

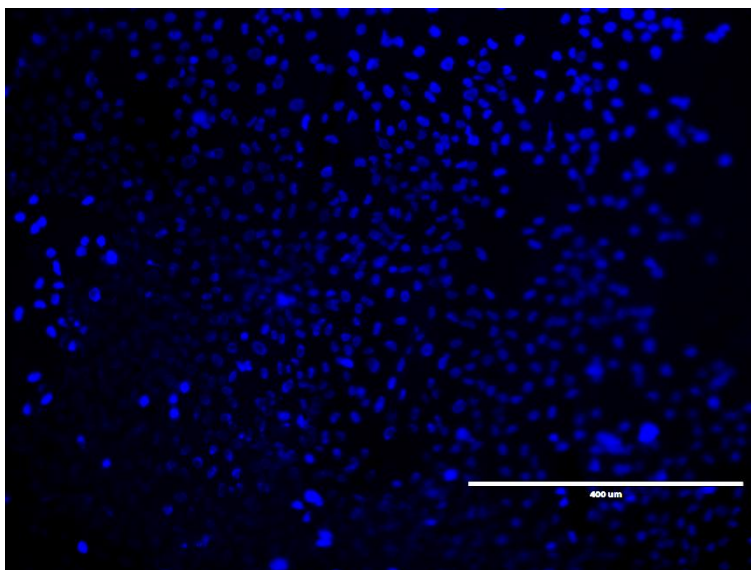
KONROLA



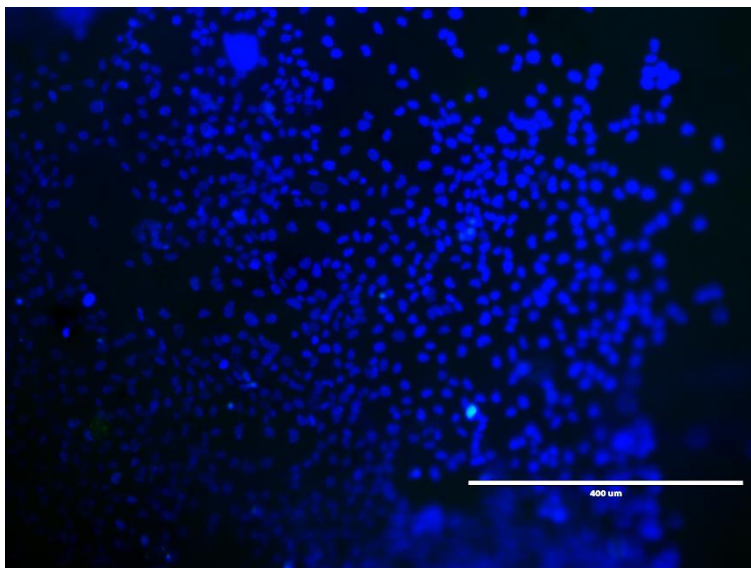
PLLA12



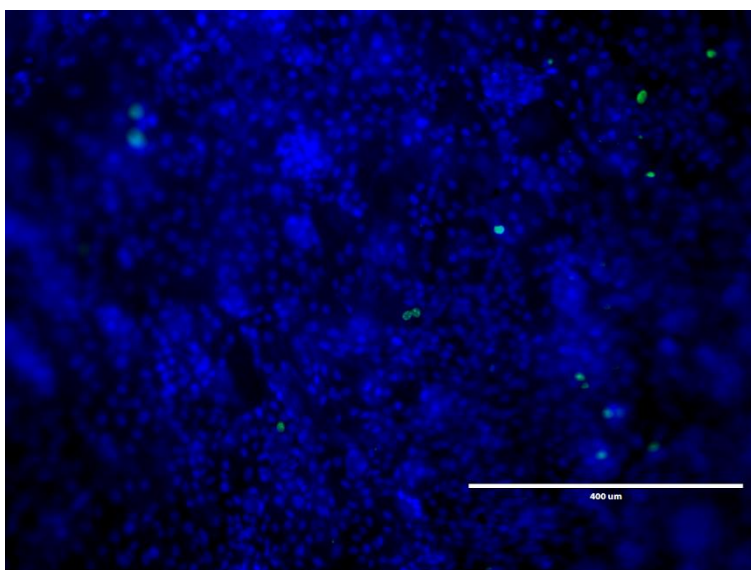
PLLA12S



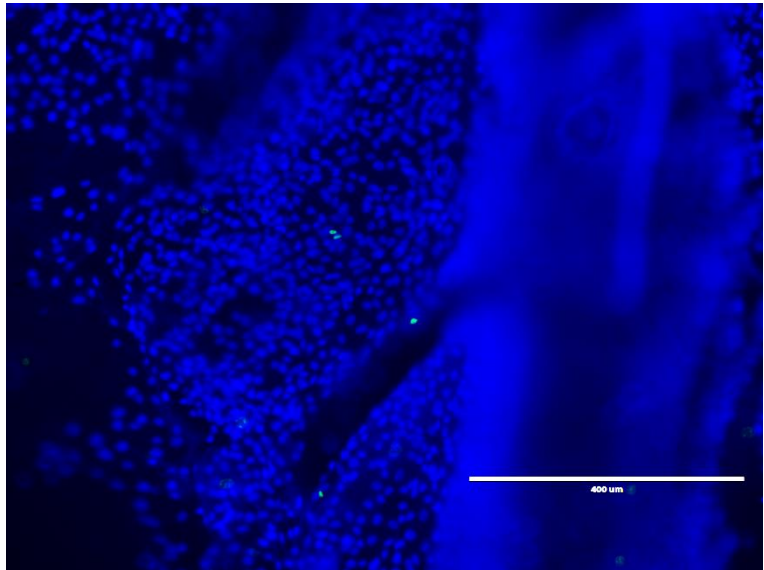
PLLA20



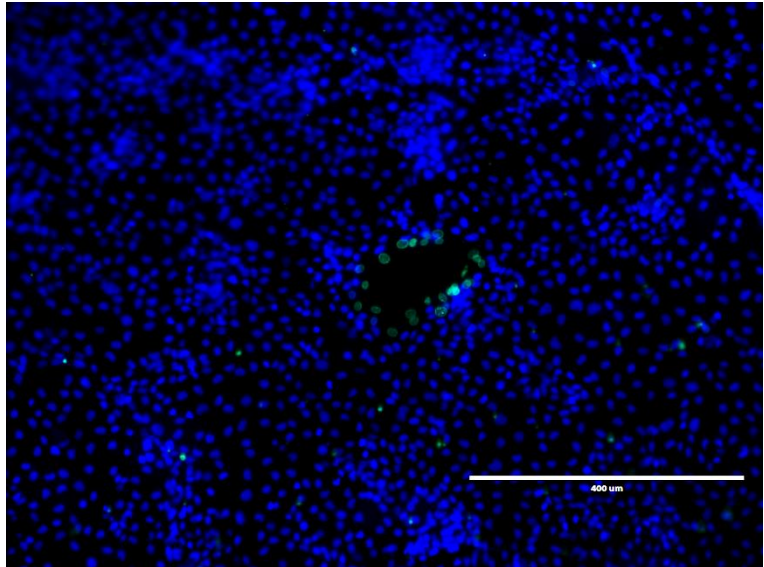
PLLA40



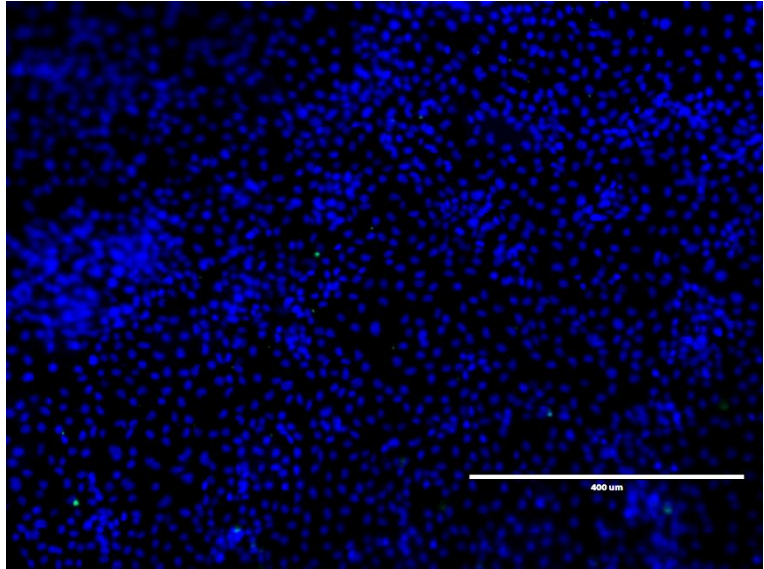
PLLA60



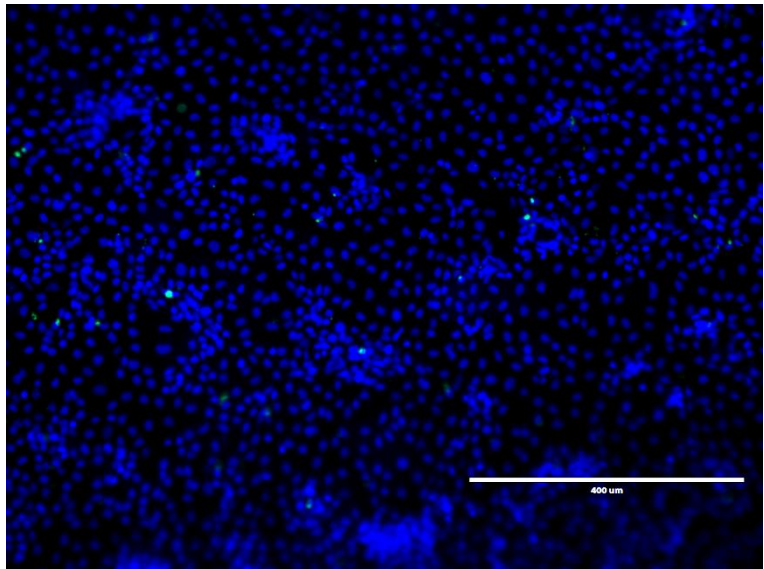
PCAP12



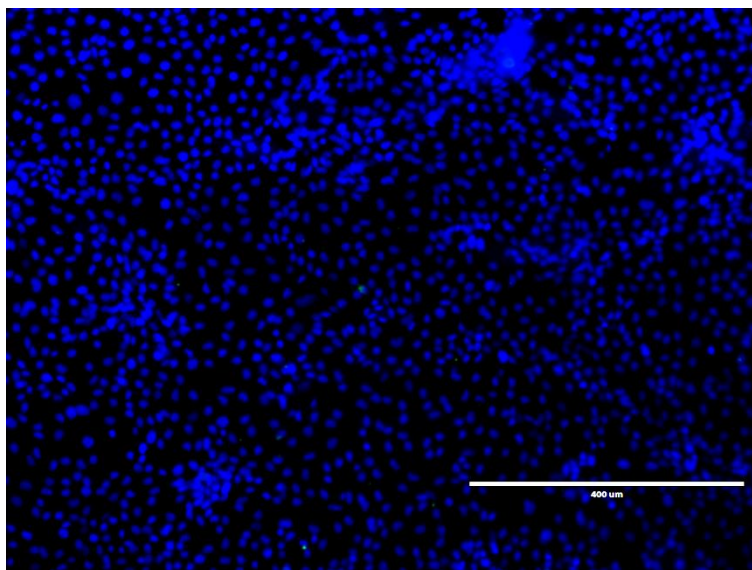
PCAP12S



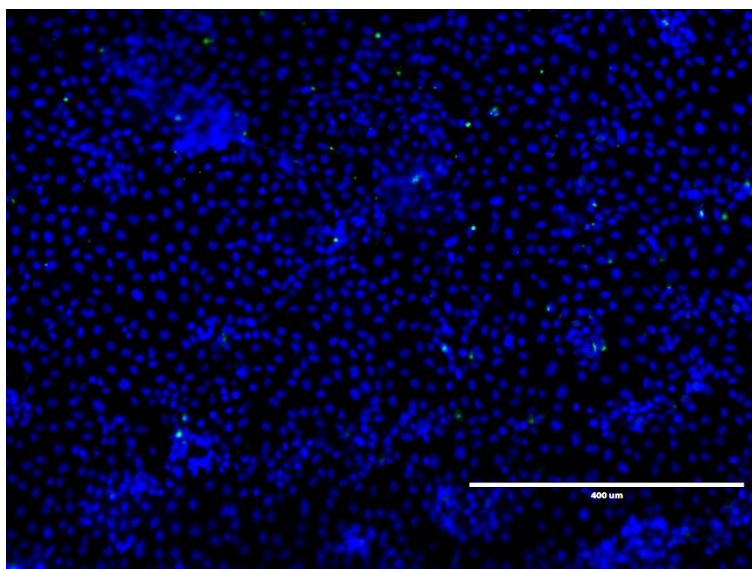
PCAP20



PCAP40



PCAP60



Ryc. 41. Wzrost komórek linii L929 badanych powierzchniach, powiększenie obiektywu 10x, mikroskop EVOS FL, barwienie InvitrogenRe, adyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green

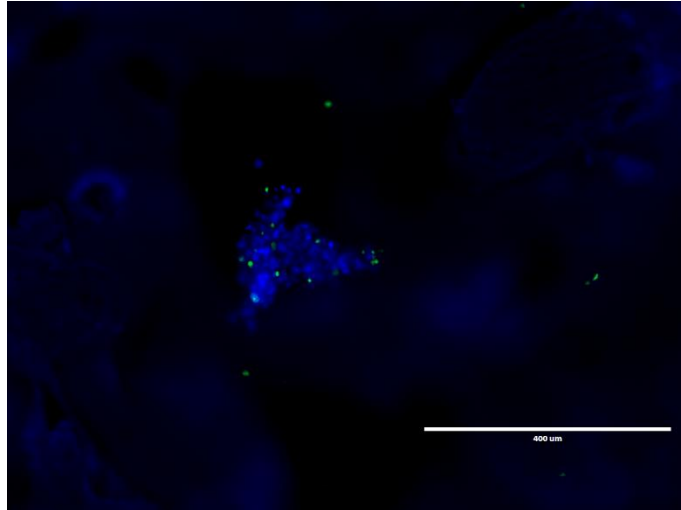
WZROST KOMÓREK NA WYDRUKACH 3D

Podobnie jak w testach oceniających wzrost komórek na krążkach oceniono wpływ otrzymanych powierzchni na wzrost komórek na powierzchniach wydruku. W badaniu oceniono wzrost komórek na powierzchni (barwienie fluorescencyjne) oraz w całym skafoldzie (test MTT). Szczególne znaczenie miało badanie w którym wykorzystano wyizolowane komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej dawców. Zaprojektowany produkt inżynierii tkankowej jest nowoczesnym materiałem umożliwiającym dostarczenie komórek macierzystych w miejsce, które wymaga regeneracji.

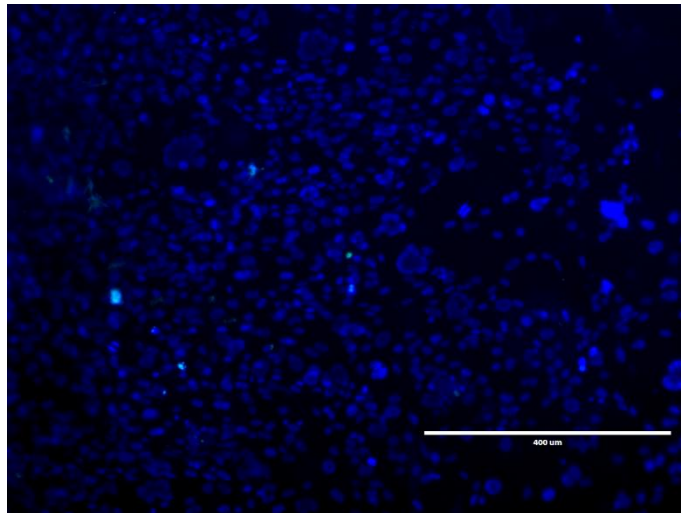
W wyniku badań stwierdzono, że uzyskane połączenie materiałów stanowi idealne podłoże do wzrostu komórek w porównaniu z samym PLLA. Dodatek hydroksyapatytu zmienił właściwości materiału i dzięki temu wszystkie wydruki są dobrym podłożem do wzrostu wszystkich badanych rodzajów komórek (fibroblastów, osteoblastów i komórek macierzystych) Ryc. 42, 43, 44.

Wzrost komórek następuje nie tylko na powierzchni materiału (Ryc. 42), ale rosnące żywe komórki pokrywają cały scaffold powodując redukcję formazanu (Ryc. 43 i 44). Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność zaprojektowanych materiałów jako nośnika komórek do regeneracji ubytków kostnych i mogą znaleźć zastosowanie w personalizowanej medycynie.

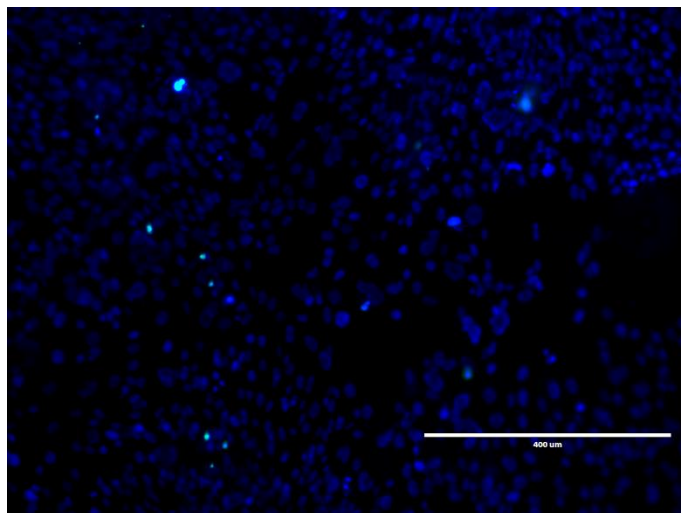
PLLA



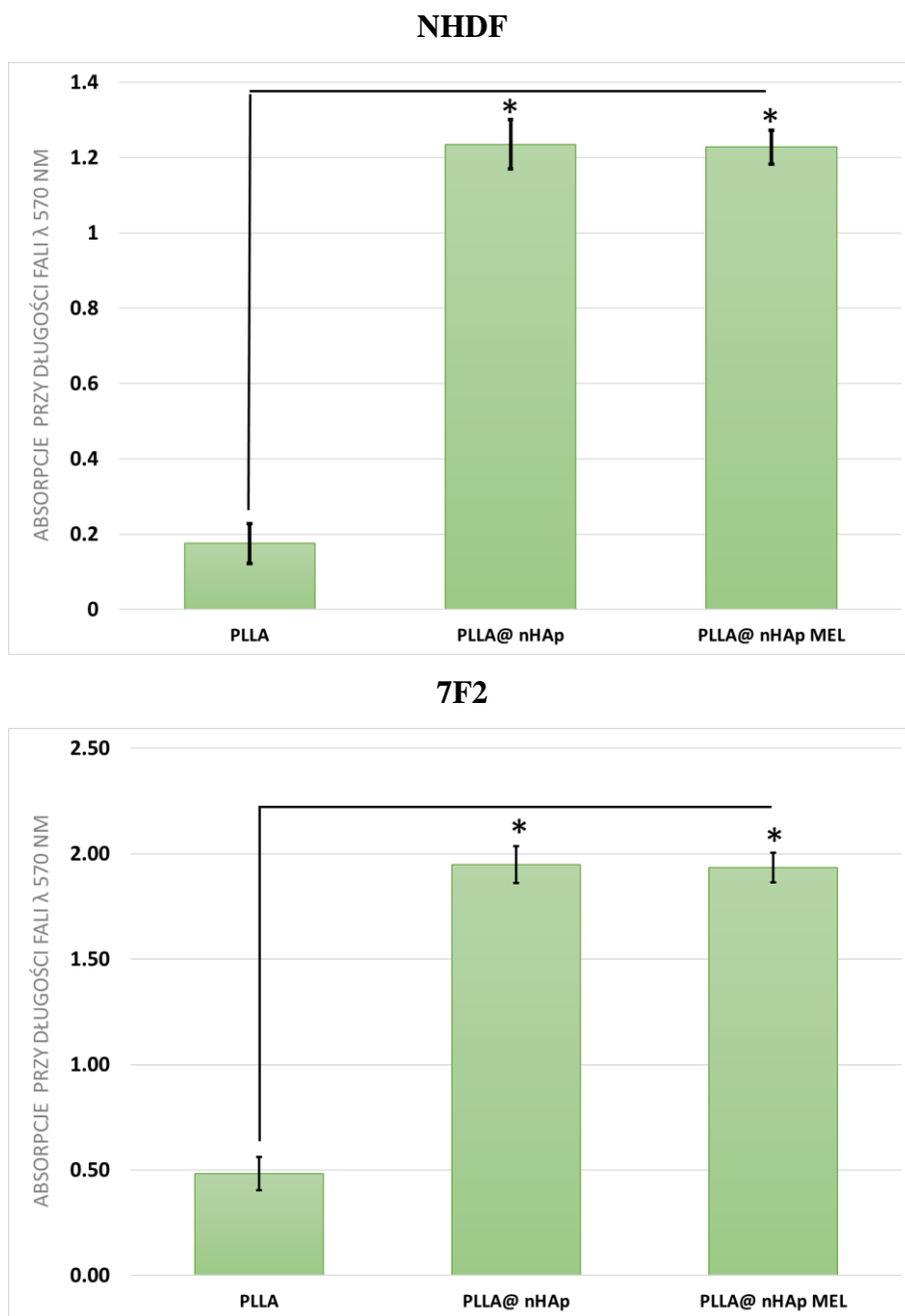
PLLA@ nHAp



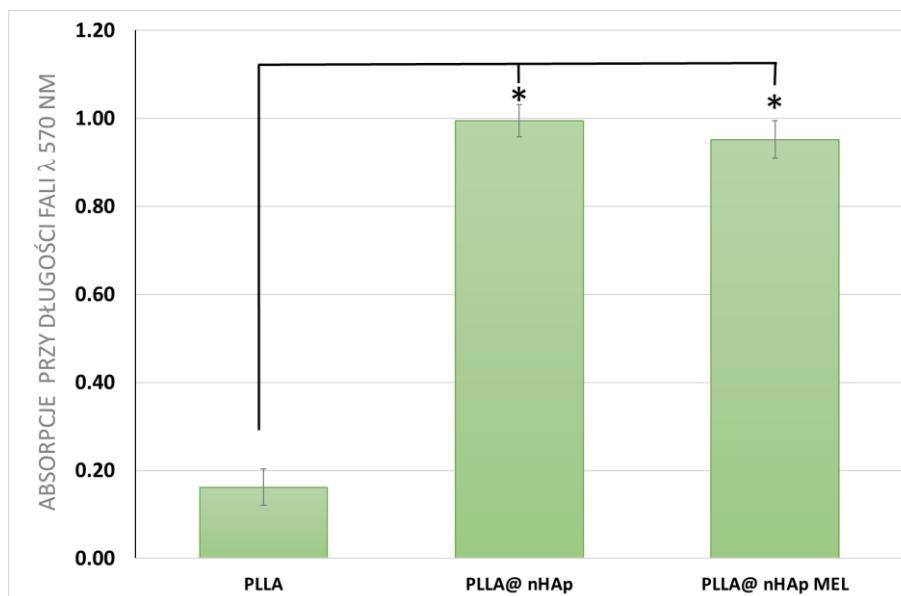
PLLA@ nHAp MEL



Ryc. 42 Wzrost komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej badanych powierzchni wydruku, powiększenie obiektywu 10x, mikroskop EVOS FL, barwienie InvitrogenRe,adyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green



Ryc. 43. Ocena wzrostu komórek w badanych wydrukach teście MTT. Wyniki po 72 h hodowli komórek w badanych wydrukach. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione jako średnia wartość uzyskanej absorpcji. Istotność statystyczna w porównaniu do materiału kontrolnego PLLA ($p < 0,05$).



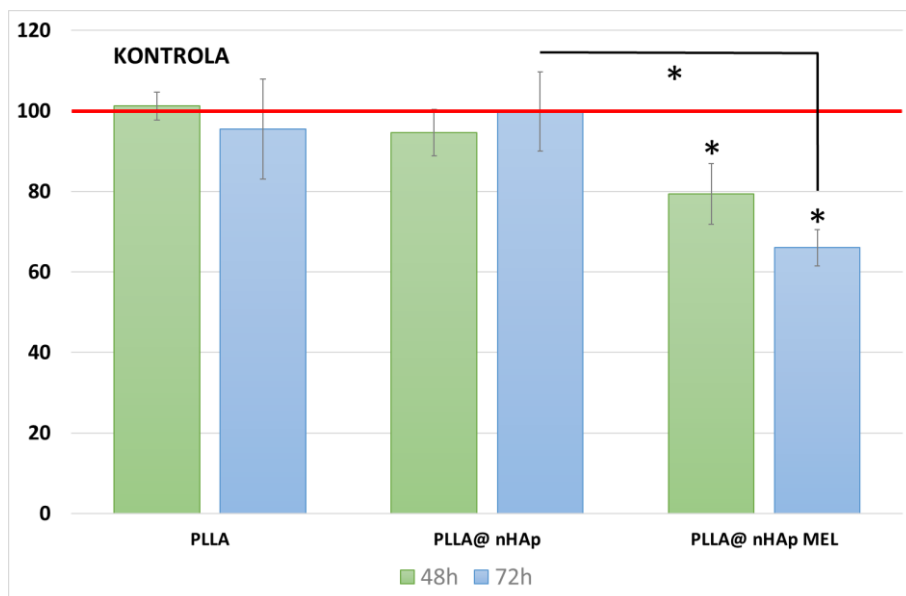
Ryc. 44. Ocena wzrostu hodowli pierwotnych izolowanych z tkanki tłuszczowej od 5 pacjentów w teście MTT. Wyniki po 72 h hodowli komórek w badanych wydrukach. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione jako średnia wartość uzyskanej absorpcji. Istotność statystyczna w porównaniu do materiału kontrolnego PLLA ($p < 0,05$).

4.2.15 AKTYWNOŚĆ PRZECIWPALNA NA MODELU LINII KOMÓRKOWEJ THP1

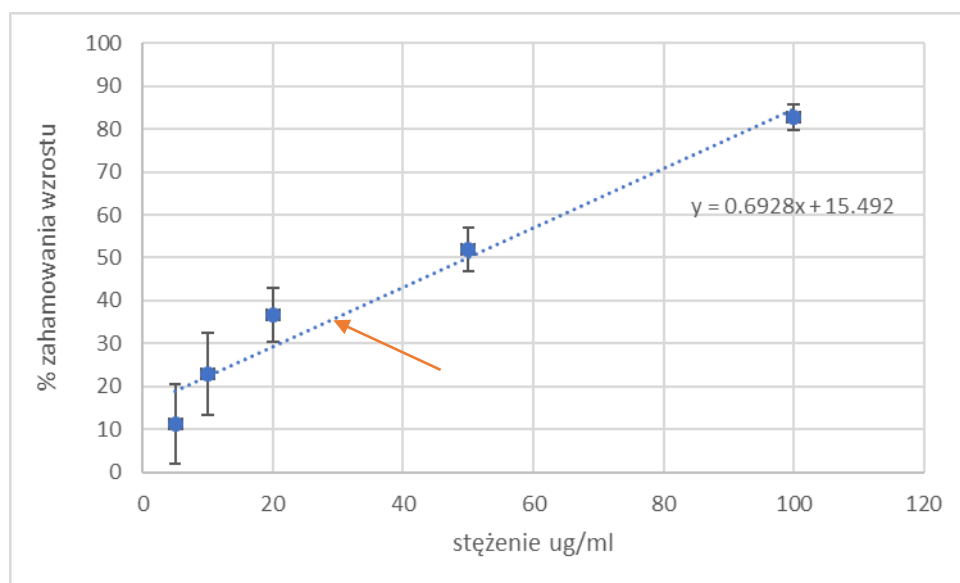
Zastosowanym w prototypie produktu lek – meloksykam jest produktem o aktywności przeciwzapalnej. Celem testu było potwierdzenie jego uwalniania poprzez ocenę wpływu na proliferację komórek linii THP1, która może być wykorzystana jako model badań na procesem zapalnym.

Komórki tej linii były hodowane wraz z badanymi materiałami. Dla PLLA@ nHAp MEL stwierdzono hamowanie wzrostu tych komórek w porównaniu do materiałów bez leku. Hamowanie były widoczne już po czasie 48 godzin, a nasilało się wraz z trwaniem badania. Ryc. 45.

Aby ocenić ilościowo uwalnianie leku wykonano również badanie kontrolne w celu oceny zależności hamowania wzrostu komórek linii THP1 od stężenia leku. Na podstawie wykresu obliczono ilość uwolnionego leku do hodowli poprzez wpływ na hamowanie proliferacji komórek THP1. Z badanego bloczka o wymiarach 0.5x0.5x0.5 cm uwolniło po 72 godzinach około 30 µg/ml leku.



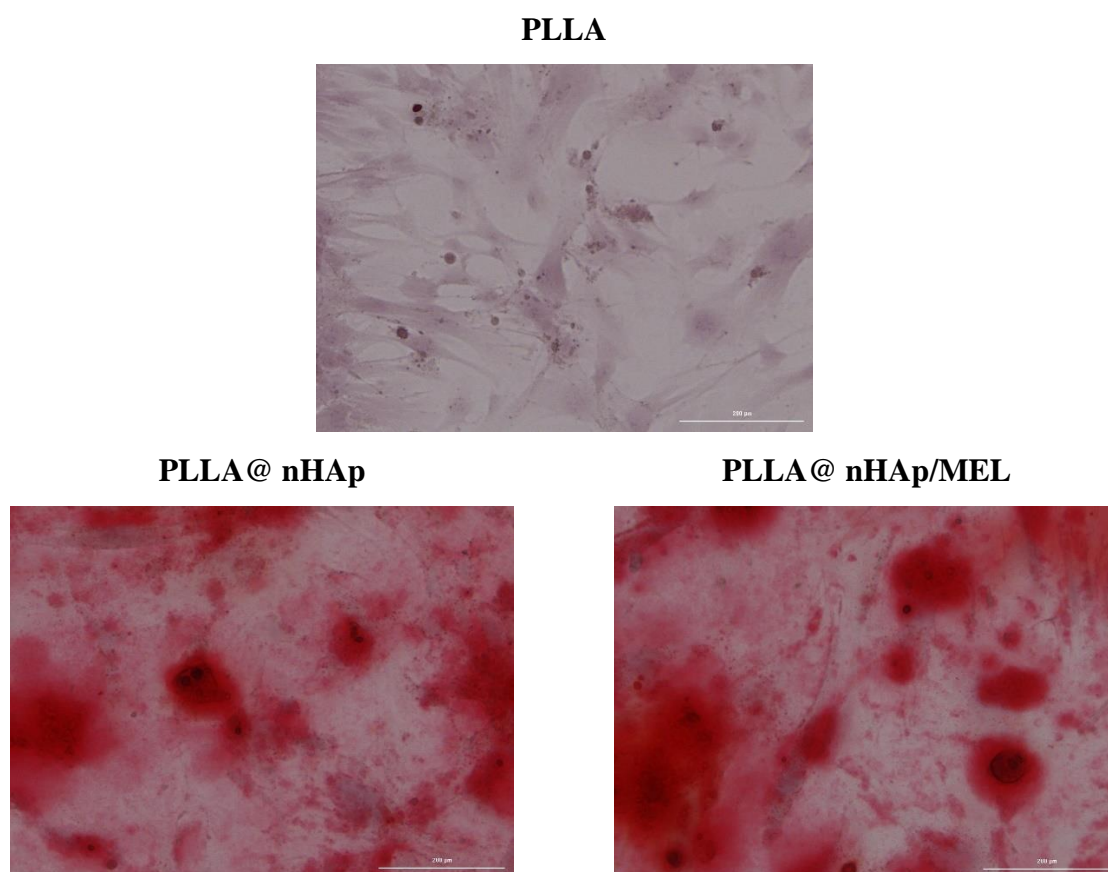
Ryc. 45. Ocena wpływu na wzrost linii THP1 w obecności badanych wydruków (kohodowla komórek w obecności badanego materiału). Wyniki po 48 i 72 h hodowli komórek z badanymi wydrukami. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione jako średnia z eksperymentów w porównaniu do hodowli kontrolnej. Istotność statystyczna w porównaniu do kontroli i materiałów nie zawierających leku (Meloxicam) ($p < 0,05$).



Ryc. 46. Ocena wpływu na wzrost linii THP1 leku Meloxicam. Wyniki po 72 h hodowli komórek z lekiem. Wyniki są średnimi z 5 niezależnych eksperymentów. Wyniki są przedstawione % zahamowania wzrostu. Istotność statystyczna w porównaniu do kontroli i materiałów nie zawierających leku (Meloxicam) ($p < 0,05$).

4.2.16. WPŁYW NA RÓŻNICOWANIE KOMÓREK IZOLOWANYCH Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ W KIERUNKU OSTEOLASTÓW

W celu oceny długotrwałego wpływu badanych wydruków 3D na hodowlę komórek macierzystych wykonano kohodowlę przez okres 10 dni. Po około 7 dniach od rozpoczęcia eksperymentu zaobserwowano zmianę morfologii hodowli, która mogła świadczyć o jej różnicowaniu w kierunku osteoblastów. Po 10 dniach hodowlę ustalono i zabarwiono 2% roztworem alizaryny dla oceny różnicowania komórek w kierunku osteoblastów. Otrzymane wyniki przedstawia Ryc. 47. Różnicowanie w kierunku osteoblastów stwierdzono w przypadku materiałów PLLA@nHAp i PLLA@nHAp/MEL. Otrzymane wyniki należy ocenić jako wstępne, przedmiotem dalszych badań będzie ocena mechanizmu różnicowania.



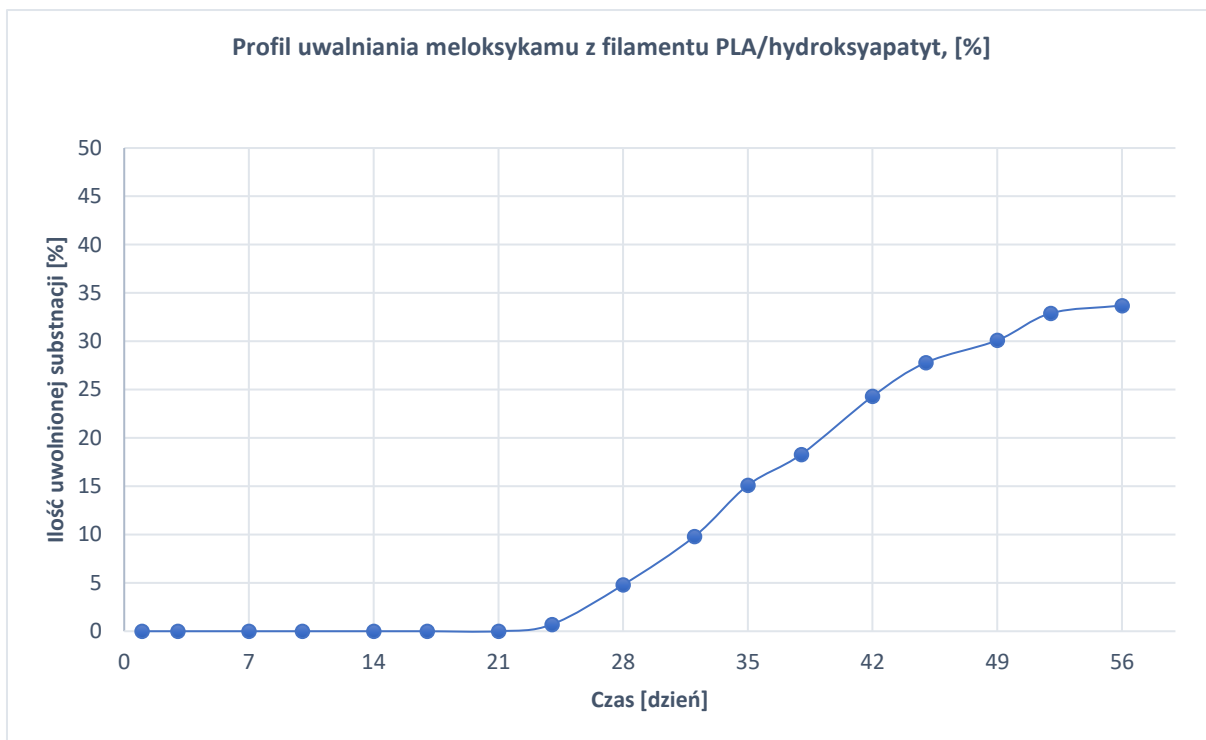
Ryc. 47. Różnicowanie komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej hodowanych w obecności badanych wydruków 3D. Mikroskop EVOS FL, barwieni z wykorzystaniem 2% roztworu Alizaryny.

4.2.16. UWALNIANIE LEKU

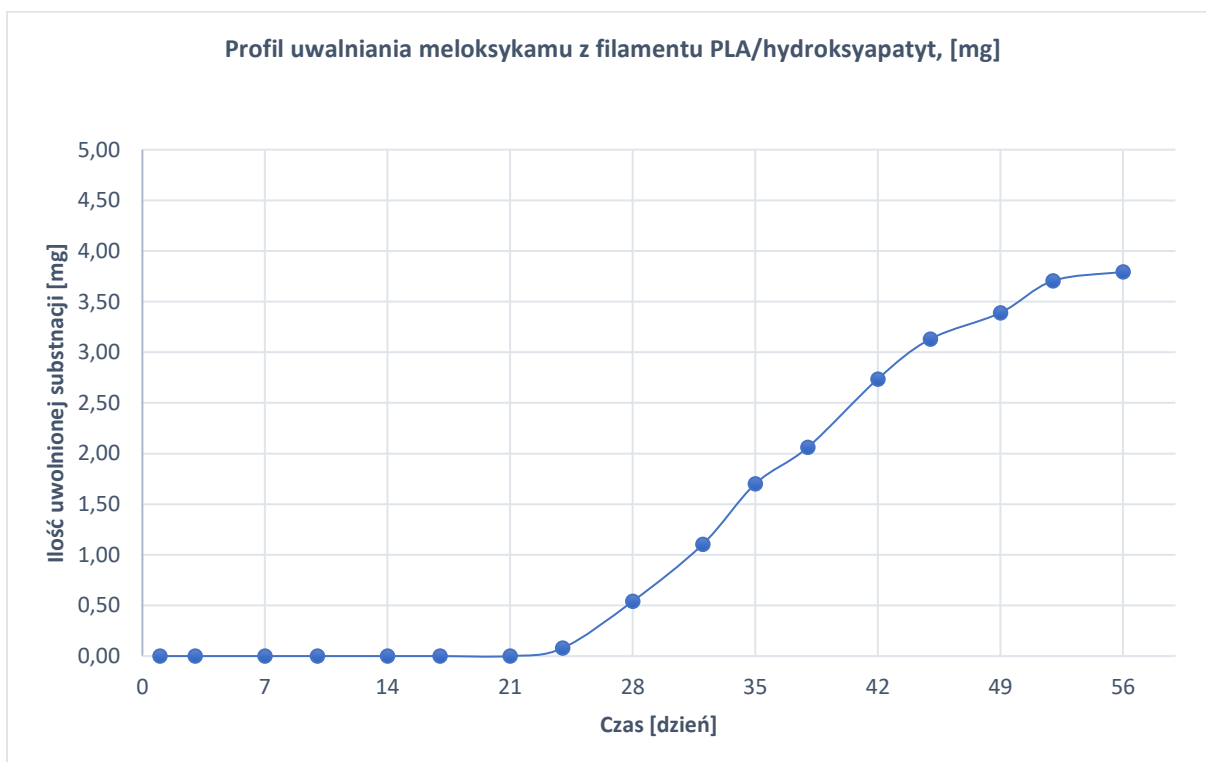
Poniżej przedstawiono uśrednione wyniki uwalniania z 12 jednostek filamentu.

Tab. 17. Profil uwalniania meloksykamu z filamentu wytworzonego z polilaktydu i hydroksyapatytu.

Punk czasowy [dzień]	Ilość uwolnionego meloksykamu [%]	Ilość uwolnionego meloksykamu [mg]
1	0,0	0,0
3	0,0	0,0
7	0,0	0,0
10	0,0	0,0
14	0,0	0,0
17	0,0	0,0
21	0,0	0,0
24	0,7	0,08
28	4,8	0,54
32	9,8	1,10
35	15,1	1,70
38	18,3	2,06
42	24,3	2,74
45	27,8	3,13
49	30,1	3,39
52	32,9	3,70
56	33,7	3,79



Ryc. 48. Profil uwalniania meloksykamu z filamentu wytworzonego z polilaktydu i hydroksyapatytu wyrażony w %.



Ryc. 49. Profil uwalniania meloksykamu z filamentu wytworzonego z polilaktydu i hydroksyapatytu wyrażony w mg.

Ze względu na czas niezbędny do częściowej degradacji polimerowego filamentu substancja czynna zaczęła się uwalniać po okresie około 1 miesiąca. W czasie drugiego miesiąca badania zaobserwowano stopniowe uwolnienie się do poziomu około 30% zawartości meloksykamu w jednostce filamentu (około 3,7 mg).

5 DYSKUSJA

Współczesna medycyna dysponuje dużym zasobem materiałów do rekonstrukcji kości, jednak nadal odbudowa tkanki kostnej stanowi ogromne wyzwanie. Obecnie dostępne materiały i metody leczenia ubytków kostnych nie do końca spełniają oczekiwania pacjentów i lekarzy. (Babak i wsp., 2020; Bao i wsp., 2013).

Inżynieria tkankowa stwarza nowe możliwości w regeneracji tkanki kostnej. Połączenie wiedzy z zakresu inżynierii tkankowej oraz osiągnięć terapii celowanej stwarza możliwość tworzenia nowych „inteligentnych” kościozastępczych rusztowań z kontrolowaną funkcją miejscowego uwalniania leku.

Spśród wielu metod używanych obecnie w rekonstrukcji tkanki kostnej nadal „złotym standardem” jest kość autogenna (Belser i wsp., 2009; Kan i wsp., 2011; Misch, 2011; Rocchietta, Simion, 2016). Jednak ta metoda niesie za sobą szereg niedogodności związanych z samym zabiegiem jak również powikłania, które mogą wystąpić. Generuje dodatkowy ubytek w miejscu biorczym i może prowadzić do komplikacji takich jak ból i/lub zakażenie w miejscu pobrania, porażenia nerwów czy uszkodzenia zębów pacjenta (Leonetti, Koup, 2003; Nissan i wsp., 2011; Guarnieri i wsp., 2006; Ewers, 2005). Nie zawsze też jakość własnej tkanki pozwala na jej wykorzystanie, a dodatkową wadą jest zaobserwowany przez wielu autorów znaczny zanik przeszczepionej kości. Obok wspomnianych przeszczepów autogennych możliwe jest stosowanie kości alloplastycznej, którą jednak cechuje niska aktywność biologiczna.

Do augmentacji wyrostka zębodołowego najczęściej wykorzystywana jest kość ksenogenna. Jednak w procesie przebudowy nie dochodzi do jej całkowitego zastąpienia przez tkankę kostną. Materiał ten ma ograniczone zastosowanie w rozległych zanikach kostnych.

Obok wspomnianych materiałów w zabiegach sterowanej regeneracji tkanek stosuje się również produkty biotechnologii (Ponte i wsp., 2006). W tej grupie znajdują się między innymi materiały ceramiczne, które wykorzystywałam w swoich doświadczeniach.

Wadą materiałów ceramicznych jest ich kruchość, natomiast cechują się znakomitymi właściwościami osteokondukcyjnymi a nawet osteoindukcyjnymi.

Syntetyczny hydrokysapatyt cechuje wysoka cytokompatybilność. Wspomaga adhezję i proliferację osteoblastów. Stosowany jest w stomatologii do leczenia nadwrażliwości zębiny.

Przenikając głęboko do kanalików zębiny nHAp eliminuje nadwrażliwość, przy jednoczesnej remineralizacji i odbudowie uszkodzonego szkliwa. Służy jako dodatek do past oraz preparatów wybielających (system „Prevdent”, Liberdent, Polska) wykorzystywany jest również do leczenia biologicznego miazgi zębowej, hipoplazji szkliwa oraz jako dodatek do cementów stomatologicznych. Związek ten wykorzystywany jest w wielu dziedzinach medycyny w których mamy do czynienia z chorobami tkanki kostnej.

Polimery syntetyczne, takie jak polilaktyd (PLA) wykazują całkowitą degradację w organizmie człowieka oraz łatwość modyfikacji ich powierzchni i wytwarzania kompozytów, co może poprawiać ich właściwości osteokonduktywne. Ze względu na swoje właściwości takie jak elastyczność, biogodność i mały ciężar implantu poliestry zajmują ważną pozycję wśród polimerów stosowanych w regeneracji kości (Słomkowski, 2007).

Do otrzymywania wydruków 3D tkanek i narządów stosuje się liczne filamenty polimerowe. Jednak mają one wady w postaci słabych właściwości mechanicznych, niskiego wskaźnika adhezji komórek i słabej hydrofilowości, gdy są stosowane pojedynczo. (Kankala i wsp., 2018). Wykonane badania potwierdzają, że sam polilaktyd nie jest dobrym podłożem do wzrostu komórek ze względu na jego właściwości hydrofobowe.

Zalety i ograniczenia materiałów z poszczególnych grup spowodowały, że do badań wykorzystano materiał polimerowo- ceramiczny jako platformę dla komórek macierzystych oraz jako nośnik cząsteczki leku. W porównaniu z metalami, które również są stosowane do druku 3D elementów kostnych materiały resorbowalne (tj. ceramika i polimery syntetyczne) zdobywają przewagę, ponieważ są stopniowo zastępowane przez kość gospodarza i nie ma potrzeby ponownej operacji.

Trendem współczesnej medycyny jest spersonalizowana opieka zdrowotna, która nastawiona jest na precyzyjnie określone potrzeby i preferencje pacjenta (Lewandowski i wsp., 2011).

Dlatego przedmiotem badań było opracowanie wielofunkcyjnego bioaktywnego kompozytu, który nie tylko pełniłby funkcję materiału wypełniającego ubytki kostne i indukującego kościotworzenie, ale jednocześnie tworzył matrycę dla komórek macierzystych pozyskanych z tkanki tłuszczowej pacjenta. Wspierałby w ten sposób regenerację uszkodzonej tkanki i przyspieszenie przywrócenia jej funkcji poprzez poprawę proliferacji i żywotności komórek oraz tworzenie właściwej macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wykorzystanie przestrzennego rusztowania, o doskonałych właściwościach mechanicznych oraz dodatków, które sprzyjają mechanizmowi tworzenia się nowej tkanki

kostnej ma ogromny potencjał w inżynierii tkanki kostnej. Rusztowania te mogą kontrolować czasowo-przestrzenne uwalnianie substancji aktywnej w nim zawartych, oraz pozwalają na wykorzystanie wyjątkowych właściwości multipotencjalnych komórek macierzystych. Implementacja technologii druku 3D do wytwarzania hybrydowych materiałów w augmentacji tkanki kostnej o złożonych cechach może rozwinąć spersonalizowane terapie w zakresie chirurgii wyrostka zębodołowego. Proponowane hybrydowe systemy mogą również dostarczać indywidualnie dobrane cząsteczki leków w ramach spersonalizowanego leczenia.

Łącznie w ramach pracy wytworzono 12 materiałów do regeneracji tkanki kostnej. We wstępnych badaniach uzyskano pięć kompozytów w formie monolitu na bazie PLLA i HAp oraz 5 rodzajów materiału na bazie PCL i HAp. Takie bioaktywne kompozyty są zdolne do utworzenia silnego połączenia z kością, tworząc warstwę fosforanową na swojej powierzchni (Wojak-Ćwik i wsp., 2019).

Morfologię wewnętrzną kompozytów określono za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), scharakteryzowano pod względem parametrów fizyko-chemicznych. Wykonano analizę metodą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej (XRPD), w podczerwieni i Ramanna oraz różnicowej kalorymetrii skaningowa (DSC). Przeprowadzono również badania biologiczne. Zbadano podatność biomateriałów na adhezję mikroorganizmów i powstawanie biofilmu jak również wykonano badania cytotoksyczności oraz odpowiedzi komórek osteoplastycznych. W doświadczeniach komórkowych nie zaobserwowano toksyczności materiału. Inni autorzy również wskazują na brak toksyczności PLA i nHAp.

Techniki druku 3D, to szybko rozwijająca się technologia, która przyniosła nowe możliwości wytwarzania złożonych materiałów do regeneracji tkanki kostnej dostosowanych do potrzeb pacjenta. (Bandyopadhyay i wsp., 2020) Przy zastosowaniu tej metody możliwa jest produkcja rusztowań do wypełnienia ubytków o znacznej wielkości i nieregularnych kształtach, wytworzonych na potrzeby konkretnego pacjenta, zwłaszcza w obszarze twarzoczaszki. Inżynieria tkanki kostnej skoncentrowana jest na wymaganiach stawianych substytutom kości m.in. na morfologii i architekturze porów.

Wytwarzanie przyrostowe oparte na modelach CAD (Computer Aided Designed), jest bardzo obiecujące, ponieważ na podstawie tomografii komputerowej umożliwiają otrzymanie szkieletów kostnych o odpowiedniej morfologii oraz kształcie idealnie odzwierciedlającym dany ubytek kostny (Khosravani i Reinicke, 2020).

W kolejnym etapie wytworzono przestrzenną strukturę wykorzystując w tym celu technologie druku 3D. Dynamiczny rozwój technologii 3D oraz wyżej wymienione zalety spowodowały, że do swoich prac wybrałam metodę szybkiego prototypowania.

Na podstawie analizy danych eksperymentalnych, dostępnych danych literaturowych oraz właściwości poszczególnych składowych do wytworzenia przestrzennych rusztowań metodą druku 3D FDM wytypowano polilaktyd i nanohydroksyapatyt. Przy wykorzystaniu metody szybkiego prototypowania opracowany kompozyt zyskał porowatość, która sprzyja regeneracji tkanki kostnej.

Przewagą otrzymanych skafoldów nad obecnie stosowanymi materiałami do augmentacji kości jest kontrola nad architekturą przestrzenną wytwarzanych kompozytów, dopasowanie wielkości porów, jak również ich rozmieszczenie. Dodatkową zaletą jest możliwość wytworzenia substytutu kości na podstawie tomografii komputerowej, sprawiając, że otrzymany element będzie idealnie dopasowany do ubytku kości. Atutem technologii szybkiego prototypowania jest wysoka powtarzalność procesu oraz możliwość otrzymania wydruku idealnie dopasowanego do ubytku kostnego.

W celu poprawy wydajności rusztowań kompozytowych inni autorzy funkcjonalizowali powierzchnie wytworzonych materiałów. Wang i wsp. włączyli HA do matrycy PLA co poprawiło bioaktywność całych rusztowań, a tym samym poprawiło zdolność regeneracji kości (Wang i wsp. 2020). Podobnie Neumann i wsp. drukowali techniką 3D FDM rusztowania kompozytowe do regeneracji tkanek twardych CaCO_3/PCL (Neumann i wsp., 2019).

Saska i wsp. wytworzyli rusztowania tkanki kostnej PHB poprzez SLS, a następnie po adsorpcji osteogennego peptydu wzrostu (Saska i wsp., 2018).

Duan i wsp. zastosowali również technikę SLS do wytworzenia rusztowań Ca-P/PHBV; dalej przeszczepiono powierzchnię rusztowania heparyną do koniugacji rhBMP-2, aby uzyskać przedłużone uwalnianie rhBMP-2. Zarówno wyniki *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że rusztowania Ca-P/PHBV sprzężone z rhBMP-2 mogą znacznie poprawić osteogenezę (Duan i wsp., 2010).

Technika druku 3D wydaje się bardzo obiecująca do wytwarzania rusztowań kostnych jednak sam druk 3D może być niewystarczający. Aby lepiej naśladować biochemie tkanki kostnej i indukować jej regenerację funkcjonalizowanie i tworzenie materiałów złożonych wydaje się dobrym kierunkiem. Dodatkowe komponenty wchodzące w skład hybrydowych układów mogą indukować lepszą regenerację kości. Kankala i wsp. wyprodukowali mikrowłókniste porowate rusztowanie za pomocą drukarki 3D. Rusztowania z PLGA były

najpierw drukowane 3D za pomocą FDM, a następnie zanurzano je kolejno w roztworach żelatyny i nano-HA, tworząc w ten sposób żelatynę/nano-HA/PLGA rusztowania do inżynierii tkanki kostnej (Kankala i wsp., 2018).

Do tej pory opracowano kilka sposobów otrzymywania porowatych polimerowych rusztowań, m.in. sublimacyjne suszenie próżniowe (Xiao i wsp., 2008), ługowanie cząstek (Mikos i wsp., 1993; Mikos i wsp., 1994), spiekanie mikrosfer (Borden i wsp., 2002), spienianie gazowe (Mooney i wsp., 1996; Hutmacher i wsp., 2004; Park, 2010) i prądzenie elektrostatyczne (Andrews i wsp., 2010; Bhardwaj i wsp., 2010; Kankala i wsp., 2017; Kankala i wsp., 2018; Chen i wsp., 2017). Jednak niektóre z tych metod mają pewne ograniczenia w wytwarzaniu wydajnych porowatych rusztowań do inżynierii kości, takie jak pozostałości środka porotwórczego, trudności w kontrolowaniu kształtu porów i złożoność procesu wytwarzania. (Kankala i wsp., 2018) Tutaj przewagę wykazuje technika szybkiego prototypowania druku 3D.

Inni autorzy badając wpływ druku 3D na parametry polimerów wykazali, że piki absorpcji IR surowego PLGA, rusztowań 3D PLGA i nawilżonych rusztowań PLGA były w przybliżeniu takie same. Badania te wykazały, że podczas procesu drukowania nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w grupach funkcyjnych. Wykazali oni również, że temperatura topnienia podczas drukowania rusztowań (200°C) nie miała znaczącego wpływu na strukturę chemiczną i przegrupowanie molekularne PLGA (Kankala i wsp., 2018).

W ostatniej części rozprawy wytworzono hybrydowe trójwymiarowe rusztowania do rekonstrukcji tkanki kostnej. W tym celu wykorzystałam otrzymane wcześniej rusztowania funkcjonalizując je dodatkowo niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym tj. meloksykalem oraz tworząc przestrzenną matrycę dla multipotencjalnych komórek pozyskanych z tkanki tłuszczowej.

Wybór meloksykamu był podyktowany jego właściwościami hamującymi aktywność COX-2 i wysoką temperaturą degradacji, umożliwiającą wykorzystanie tego leku w procesie szybkiego prototypowania 3D.

Opublikowano wiele badań oceniających korzyści i konsekwencje NLPZ w gojeniu kości zarówno tkanki zwierzęcej, jak i ludzkiej *in vitro* i *in vivo* (Farii i wsp., 2021).

Odkrycia Karachalios i wsp. wskazują, że krótkotrwałe podawanie niskich dawek terapeutycznych wysoce selektywnego inhibitora COX-2 miało niewielki negatywny wpływ na gojenie kości. (Karachalios i wsp., 2007).

Stosunkowo słabe ukrwienie tkanki kostnej, jak również właściwości farmakokinetyczne wielu leków takie jak: nieznaczne jego przenikanie do danej tkanki i szybka eliminacja z organizmu powodują, że po systemowym podaniu, wiele substancji leczniczych, w tkankach słabiej ukrwionych, nie osiąga poziomu terapeutycznego (Szymura-Oleksiak i wsp., 2002). W takich przypadkach duże nadzieje wiąże się z tzw. terapią celowaną, której ideą jest uzyskanie optymalnego stężenia leku w określonym miejscu organizmu, przy bardzo małym jego stężeniu ogólnym.

Innym autorom udało się wytworzyć kilka proleków z wykorzystaniem PLA jako nośnika, wykorzystując m.in. droksymetylopirydyne, stosowaną w terapii zaburzeń krążenia. Zespoły podejmowały również próby przyłączenia PLA i pirynidazy o działaniu przeciwbakteryjnym. Udało się połączyć PLA z doksorybicyną, która wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Jednak ze względu na potrzebę dalszych badań nie są one stosowane w leczeniu klinicznym. Wykorzystanie polimeru jako nośnika leków skłoniło mnie do wytworzenia hybrydowej struktury zawierającej meloksykam.

Lek ten z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych stosowany był miejscowo w stomatologii do regulacji procesu zapalnego miazgi (Jing-Yi Li i wsp., 2020). Meloksykam przy podawaniu ogólnoustrojowym działa przeciwzapalnie. Wykazano, że lek ten stosowany miejscowo hamował odpowiedź zapalną miazgi oraz indukował tworzenie się osteodentyny.

Inni autorzy związali cząsteczkę leku z polimerem z formie koniugatu przyłączając lek do końców łańcucha polimerowego, co generowało wcześniejsze uwalnianie cząsteczki substancji czynnej (Han, 2012).

Ze względu na to, że w moich badaniach meloksykam nie tworzył koniugatu z polimerem a jedynie pełnił funkcję leku enkPLLAułowanego, nie obserwowałam szybkiego wyrzutu substancji czynnej a stopniowe jej uwalnianie. Co niewątpliwie może być korzystne w procesie kościotworzenia. Gdyby ilość substancji czynnej była większa, to najprawdopodobniej w początkowej fazie uwalniania w badaniu HPLC byłby widoczny pik pochodzący od meloksykamu. Jednak w założeniach projektując rusztowanie zależało mi na zawieszeniu minimalnej dawki, która działałaby przeciwzapalnie i cytostatycznie na komórki, nie powodując przy tym działania cytotoksycznego, co spowalniałoby proces formowania kości.

Uwalnianie meloksykamu następowało podczas degradacji polimeru gdy dochodziło do hydrolizy wiązań. Kwestia uwalniania leku z polimeru nie była taka oczywista ponieważ lek został zawieszony w polimerze, który charakteryzuje się powolnym rozkładem.

Według doniesień innych autorów istnieje duże prawdopodobieństwo, że niektóre cząsteczki leku mogą być całkowicie uwiecznione wewnątrz rozgałęzionych struktur (John i wsp., 2017).

Uwalnianie leku z koniugatu jest uwarunkowane długością i masą łańcucha polimerowego (Han, 2012). Bufor fosforanowy który odzwierciedla fizjologiczne warunki w organizmie człowieka nie powodował szybkiej hydrolizy wiązań. Stopniowe uwalnianie substancji w badaniu HPLC było widoczne dopiero po okresie 24 dniach, jednak aktywność biologiczna wyrażona hamowaniem wzrostu monocytów była widoczna już po 48 godzinach.

Dodanie meloksykamu spowodowało, że uzyskany scaffold nie był zasiedlany przez drobnoustroje. Otrzymany za pomocą druku 3D hybrydowy biokompozyt posiada działanie osteoindukcyjne, a zawarty w nim lek powoduje utrudnione zasiedlanie przez bakterie oraz działa przeciwzapalnie. Wykazano, że hamuje on wzrost komórek THP1, które są modelem monocytów i stanu zapalnego. Otrzymany materiał stał się rusztowaniem dla multipotencjalnych komórek zrębu z tkanki tłuszczowej i wykazał różnicowanie w kierunku osteoblastów. Badania *in vitro* wykazały duży potencjał otrzymanych materiałów do regeneracji tkanki kostnej.

Ważnym celem badań było wykazanie, że cząsteczki hydroksyapatytu, komórki macierzyste oraz meloksykam stosowany jako napełniacz bioresorbowalnej matrycy polimerowej, stanowią skuteczne narzędzie do kontroli właściwości biologicznych materiałów kompozytowych, istotnych w inżynierii tkanki kostnej i medycynie regeneracyjnej.

W prezentowanej pracy omówiłam szczegółowo właściwości otrzymanych hybryd, skupiając się w dużej mierze na badaniach biologicznych oraz na wpływie dodatku w postaci leku oraz komórek macierzystych na proces kościotworzenia.

Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że wielofunkcyjne materiały hybrydowe otrzymywane za pomocą technologii druku 3D wykazują przewagę nad materiałami z pojedynczą odpowiedzią i mają duży potencjał do zastosowania w inżynierii wyrostka zębodołowego. Kontrolowanie uwalniania leku za pomocą nośnika polimerowego o znanym profilu uwalniania pozwala na analityczne dostosowanie mechanizmu dyfuzji, zapewniając bezpieczniejsze terapie. Dzięki bezpośredniemu transportowi leku do tkanki kostnej ukierunkowane systemy dostarczania leków dają możliwość ulepszonej terapii.

Zastosowanie takiej terapii celowanej pozwala na wyeliminowanie niepożądanych działań ubocznych leku, wynikających z jego obecności w przewodzie pokarmowym przy podaniu tradycyjnym. Dotyczy to zwłaszcza leków, które wpływają niekorzystnie na układ

pokarmowy mają niski indeks terapeutyczny, bądź ulegają szybkiemu metabolizmowi w wątrobie. Ważną rolę odgrywa tu zarówno sam mechanizm, jak i kinetyka uwalniania substancji leczniczej. Opracowanie inteligentnego materiału z funkcją miejscowego uwalniania leku mogącego sprzyjać regeneracji tkanki kostnej.

Taka forma podania substancji czynnej będzie skutkować zmniejszeniem całkowitej dawki podawanego leku do organizmu. Dodatkowo, zmniejszane jest chwilowe stężenie substancji aktywnej, a odpowiednio zaprojektowana forma leku zapewnia większą jej stabilność oraz bardziej efektywne wchłanianie. Wszystkie te czynniki sprawiają, że nowe materiały z kontrolowaną funkcją uwalniania leku mogą stać się przedmiotem intensywnych badań.

W dzisiejszych czasach medycyna regeneracyjna i inżynieria tkankowa stały się najszybciej rozwijającą się dziedziną medycyny. Biorąc pod uwagę zwiększone zapotrzebowanie na spersonalizowaną opiekę medyczną, oraz potrzebę terapii usprawniających procesy regeneracji tkanki kostnej. Połączenie różnych typów materiałów wraz z komórkami progenitorowymi, w tym mezenchymalnymi multipotencjalnymi komórkami zrębu, jest bardzo obiecujące w leczeniu wielu rodzajów chorób. Medycyna regeneracyjna oparta na zastosowaniu terapii komórkowych i inżynierii tkankowej pozwala na przywrócenie funkcji uszkodzonej tkanki poprzez poprawę proliferacji i żywotności komórek, a także tworzenie właściwej macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto pożądane materiały lub rusztowania dla medycyny spersonalizowanej, poza swoją „funkcją pomostową”, powinny również dostarczać bioaktywnych środków wpływających na cytofizjologię komórki i wspomagać tworzenie funkcjonalnej tkanki. Dlatego triadę, czyli komórki progenitorowe w połączeniu z wielofunkcyjnym polimerem jako rusztowaniem i związkami bioaktywnymi, uznano za funkcjonalne składniki inżynierii tkankowej.

Dodatkową zaletą hybrydowych kośćcozastępczych rusztowań jest ich całkowita biodegradacja. W środowisku płynów fizjologicznych w wyniku hydrolizy PLA rozkłada się do kwasu mlekowego. Kwas mlekowy w cyklu kwasu cytrynowego przekształcany jest do CO₂ i H₂O. PLA sprawia, że nie ma konieczności wykonywania kolejnej interwencji chirurgicznej w celu usunięcia implantu. Zastosowany wszczep rozkłada się w organizmie do nietoksycznych produktów, np. kwasu mlekowego i może być swobodnie wydalany z organizmu na drodze szlaków metabolicznych. Implanty polilaktydowe charakteryzują się

dużą wytrzymałością i niską podatnością na rozciąganie, dzięki czemu mogą zastępować ubytki kości. Wielkocząsteczkowy PLA ulega szybkiej resorpcji dlatego doskonale nadaje się do leczenia złamań kostnych, nie zaburzając naturalnego wzrostu komórek.

Niestety w czasie hydrolizy takiego implantu w organizmie uwalniany jest kwas mlekowy, co może prowadzić do stanów zapalnych, gdyż w okolicy implantu może dochodzić do kwasicy. Rozwiązaniem tego problemu są dodatki do PLA czynników regulujących odczyn (np. fosforanów wapnia, NLPZ). Czas degradacji rusztowań biopolimerowych odgrywa istotne znaczenie w projektowaniu scaffoldów do inżynierii tkanki kostnej i powinien pokrywać się z szybkością tworzenia nowej tkanki.

Inżynieria tkanki kostnej opiera się na idei wytworzenia scaffold kościopodobnego o właściwościach osteokonduktywnych lub osteoindukcyjnych, i umieszczenie wewnątrz rusztowania komórek macierzystych. Dzięki temu wprowadzone wraz z implantem komórki mogą podjąć proces kościotworzenia *in vivo*, co może potencjalnie zwiększyć efektywność regeneracji kości.

Wytworzone w ramach doktoratu kompozytowe rusztowania na bazie PLLA i HAp wytworzone metodą druku 3D wspomagają przede wszystkim różnicowanie ADSC do osteoblastów w hodowli *in vitro*.

Struktura przestrzenna otrzymanych scaffoldów sprzyja ukierunkowaniu ADSC do komórek tkanki kostnej, a więc do różnicowania komórek macierzystych do osteoblastów. Ważnym etapem było osadzenie komórek w scaffoldzie, który dzięki swojej architekturze wewnętrznej wspomagał dalszy proces różnicowania *in vitro* oraz prawidłowej odbudowy tkanki.

W ramach pracy możliwość modyfikowania filamentu przeciwzapalnymi dodatkami, umożliwiając otrzymanie bardziej złożonych niż komercyjnie dostępne na rynku materiałów o właściwościach dostosowanych do miejsca implantacji i funkcji jaką materiał powinien spełniać.

Scaffoldy do rekonstrukcji tkanki kostnej z funkcją miejscowego uwalniania leku zawierający dodatkowo w swym składzie komórki macierzyste mogą znacząco wspomóc proces regeneracji tkanki kostnej. Ten cel w szczególności skłania mnie do dalszych badań i wykorzystania nowych pojawiających się technik do ukierunkowanego dostarczania leków w regeneracji tkanki kostnej. Jednak jest potrzeba długoterminowych badań bezpieczeństwa i zoptymalizowania sposobu wytwarzania takich układów. Potencjał zastosowania

innowacyjnych biorusztowań 3D z kontrolowanym mechanizmem uwalniania leku może stać się ekscytującym polem badań, które będzie można obserwować w najbliższej przyszłości.

6. WNIOSKI

Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że wielofunkcyjne materiały hybrydowe otrzymywane za pomocą technologii druku 3D wykazują przewagę nad materiałami z pojedynczą odpowiedzią i mają duży potencjał do zastosowania w inżynierii wyrostka zębodołowego. Kontrolowanie uwalniania leku za pomocą nośnika polimerowego o znanym profilu uwalniania pozwala na analityczne dostosowanie mechanizmu dyfuzji, zapewniając bezpieczniejsze terapie. Dzięki bezpośredniemu transportowi leku do tkanki kostnej ukierunkowane systemy dostarczania leków dają możliwość ulepszonej terapii.

Dodanie meloksykamu spowodowało, że uzyskany skafold nie był zasiedlany przez drobnoustroje. Otrzymany za pomocą druku 3D hybrydowy biokompozyt posiada działanie osteoindukcyjne, a zawarty w nim lek powoduje utrudnione zasiedlanie przez bakterie oraz działa przeciwzapalnie. Wykazano, że hamuje on wzrost komórek THP1, które są modelem monocytów i stanu zapalnego. Otrzymany materiał stał się rusztowaniem dla multipotencjalnych komórek zrębu z tkanki tłuszczowej i wykazał różnicowanie w kierunku osteoblastów. Badania *in vitro* wykazały duży potencjał otrzymanych materiałów do regeneracji tkanki kostnej.

1. Wytworzono 10 modyfikowanych biomateriałów na bazie polimerów: polilaktydu i polikaprolaktonu z hydroksyapatytami o różnej wielkości cząstek. Z otrzymanych kompozytów wytworzono krążki oraz zbadano wpływ wprowadzonego dodatku na morfologię i właściwości fizykochemiczne kompozytów.
2. Wytworzono filament do druku 3D. Zaprojektowano modele rusztowań, dobór parametrów druku w technologii FDM. Opracowano i wytworzono przestrzenne prototypy substytutu kości metodą druku 3D z poli(L- kwasu mlekowego) oraz nHAp o różnej architekturze wewnętrznej.
3. Związano cząsteczki substancji farmakologicznie czynnej (meloksykamu) z biodegradowalnym polimerem PLLA oraz nHAp i wytworzono metodą hot melt extrusion filament wykorzystywany w technologii druku 3D. Wytworzono kolejne prototypy w druku 3D z filamentu modyfikowanego cząsteczką leku.

4. Zbadano właściwości biologiczne otrzymanych materiałów oraz i ich cytotoksyczność. Oceniając ich przydatność do regeneracji ubytków kostnych. Udowodniono, że dodatek meloksykamu będzie sprzyjać regeneracji tkanki kostnej zapewniać lepsze warunki do kościotworzenia. W badaniach zbadano stopniowe uwalnianie leku z nośnika. Hybrydowy szkielet został zasiedlony przez wyizolowane komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej. Wykazano hamujące działanie na wzrost komórek THP1, które są modelem monocytów i stanu zapalnego. Otrzymany materiał zawierający meloksykam wykazywał działanie przeciwzapalne oraz bakteriostatyczne.
5. Uzyskane wyniki pozwolą na przygotowanie wniosku do Europejskiej Agencji Medycznej (EMA), komitet ds. Terapii zaawansowanej (CAT), dotyczącego zakwalifikowania otrzymanego prototypu produktu leczniczego jako produkt leczniczy terapii zaawansowanej – produkt inżynierii tkankowej. Produkt spełnia wymagania zapisane Rozporządzeniu (WE) nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej.
6. W przypadku pozytywnego przejścia procedury rejestracyjnej zaprojektowany produkt będzie pierwszy produktem w Unii Europejskiej przeznaczonym do zastosowania w stomatologii, otwierając nowe perspektywy dla rozwoju medycyny regeneracyjnej.
7. Powyższe badania były przedmiotem zgłoszenia patentowego.

7. PRZYPISY

1. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. *J Dent.* 2014 Aug;42(8):915-28. doi: 10.1016/j.jdent.2014.05.008. Epub 2014 May 28. PMID: 24880036.
2. Al Farii H, Farahdel L, Frazer A, Salimi A, Bernstein M. The effect of NSAIDs on postfracture bone healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *OTA Int.* 2021 Mar 22;4(2):e092. doi: 10.1097/OI9.000000000000092. PMID: 34746650; PMCID: PMC8568409.
3. Allegrini S Jr, Koenig B Jr, Allegrini MR, Yoshimoto M, Gedrange T, Fanghaenel J, Lipski M. Alveolar ridge sockets preservation with bone grafting--review. *Ann Acad Med Stetin.* 2008;54(1):70-81. PMID: 19127813.
4. Andrades J. A., Regenerative Medicine and Tissue Engineering, IntechOpen 2013, Tran Le Bao Ha, To Minh Quan, Doan Nguyen Vu, Do Minh Si, Chapter 11. Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application.
5. Andrews, K.D.; Hunt, J.A.; Black, R.A. Technology of electrostatic spinning for the production of polyurethane tissue engineering scaffolds. *Polym. Int.* **2010**, 57, 203–210.
6. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):212-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x. PMID: 15691354.
7. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):212-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x. PMID: 15691354.
8. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol.* 2000 Jun;71(6):1015-23. doi: 10.1902/jop.2000.71.6.1015. PMID: 10914806.
9. Astbury W. T., Bell F. O., The molecular structure of the fibers of the collagen group. *Nature*, **1940**, 145, 421–422;
10. Atwood DA. Some clinical factors related to rate of resorption of residual ridges. 1962. *J Prosthet Dent.* 2001 Aug;86(2):119-25. doi: 10.1067/mpr.2001.117609. PMID: 11514795.

11. Bandyopadhyay A, Mitra I, Bose S. 3D Printing for Bone Regeneration. *Curr Osteoporos Rep.* 2020 Oct;18(5):505-514. doi: 10.1007/s11914-020-00606-2. PMID: 32748324; PMCID: PMC7541681.
12. Barone A, Covani U. Maxillary alveolar ridge reconstruction with nonvascularized autogenous block bone: clinical results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Oct;65(10):2039-46. doi: 10.1016/j.joms.2007.05.017. PMID: 17884536.
13. Barone A, Varanini P, Orlando B, Tonelli P, Covani U. Deep-frozen allogeneic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Jun;67(6):1300-6. doi: 10.1016/j.joms.2008.12.043. PMID: 19446220.
14. Battezzatore D., Bocchini S, Frache A., *Express Polym. Lett.* 2011, 5, 849–858.
15. Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol.* 1994 Dec;65(12):1128-33. doi: 10.1902/jop.1994.65.12.1128. Erratum in: *J Periodontol.* 1995 Apr;66(4):309. Erratum in: *J Periodontol.* 1995 Apr;66(4):309. PMID: 7877084.
16. Belser UC, Grütter L, Vailati F, Bornstein MM, Weber HP, Buser D. Outcome evaluation of early placed maxillary anterior single-tooth implants using objective esthetic criteria: a cross-sectional, retrospective study in 45 patients with a 2- to 4-year follow-up using pink and white esthetic scores. *J Periodontol.* 2009 Jan;80(1):140-51. doi: 10.1902/jop.2009.080435. PMID: 19228100.
17. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 2010 May-Jun;28(3):325-47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100560.
18. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Baslé MF, Chappard D. Bone loss and teeth. *Joint Bone Spine.* 2005 May;72(3):215-21. doi: 10.1016/j.jbspin.2004.03.007. PMID: 15850992.
19. Borden M, Attawia M, Khan Y, Laurencin CT. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation. *Biomaterials.* 2002 Jan;23(2):551-9. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00137-5. PMID: 11761175.
20. Bottino MC, Thomas V. Membranes for Periodontal Regeneration--A Materials Perspective. *Front Oral Biol.* 2015;17:90-100. doi: 10.1159/000381699. Epub 2015 Jul 20. PMID: 26201279.
21. Brkovic BM, Prasad HS, Konandreas G, Milan R, Antunovic D, Sándor GK, Rohrer MD. Simple preservation of a maxillary extraction socket using beta-tricalcium phosphate with type I collagen: preliminary clinical and histomorphometric observations. *J Can Dent Assoc.* 2008 Jul-Aug;74(6):523-8. PMID: 18644238.

22. Buchanan F., Degradation rate of bioresorbable materials, Prediction and evaluation, W. Paul, C. P. Sharma, Chapter 4. Natural bioresorbable polymers, pp. 67-94.
23. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001 Feb;72(2):215-29. doi: 10.1902/jop.2001.72.2.215. PMID: 11288796.
24. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng.* 2000;122:570–575. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Klokkevold PR, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M, Jancovic S, Orsini M. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Nov;90(5):581-6. doi: 10.1067/moe.2000.110035. PMID: 11077380.
26. Cao W., Hench L. L.: Bioactive materials. *Ceramics International*, 22, 1996, 493–507.
27. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2003 Sep;30(9):809-18. doi: 10.1034/j.1600-051x.2003.00366.x. PMID: 12956657.
28. Ceccarelli G, Presta R, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Lupi SM, Rodriguez Y Baena R. Emerging Perspectives in Scaffold for Tissue Engineering in Oral Surgery. *Stem Cells Int.* 2017;2017:4585401. doi: 10.1155/2017/4585401. Epub 2017 Feb 26. PMID: 28337223; PMCID: PMC5346390.
29. Ceonzo K, Gaynor A, Shaffer L, Kojima K, Vacanti CA, Stahl GL. Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng.* 2006 Feb;12(2):301-8. doi: 10.1089/ten.2006.12.301. PMID: 16548688; PMCID: PMC1769522.
30. Chamy R., Biodegradation – Life of Science, IntechOpen (2013), E. Tamariz, A. Rios-Ramírez, Biodegradation of Medical Purpose Polymeric Materials and Their Impact on Biocompatibility in Biodegradation, pp. 3-29.
31. Chandrasekaran S., Sagadevan, S., Dakshnamoorthy A., *Int. J. Phys. Sci.*, 2013, 8, , 1639-1645.
32. Chen B.K., Shih C. C., Chen A. F., *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 2012, 43, 2289–2295.
33. Chen H., Truckenmüller R., Van Blitterswijk C., Moroni L. Fabrication of nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. University of Twente, The Netherlands 2013; DOI: 10.1533/9780857097231.1.158
34. Chen JP, Chang YS. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011 Aug 1;86(1):169-75. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.038. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21514800.

35. Chen X, Kalish J, Hsu S. L., *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 2011, 49, 1446–1454.
36. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials (Basel)*. 2019 Feb 14;12(4):568. doi: 10.3390/ma12040568. PMID: 30769821; PMCID: PMC6416573.
37. Chung JH, Kim YK, Kim KH, Kwon TY, Vaezmomeni SZ, Samiei M, Aghazadeh M, Davaran S, Mahkam M, Asadi G, Akbarzadeh A. Synthesis, characterization, biocompatibility of hydroxyapatite-natural polymers nanocomposites for dentistry applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;44(1):277-84. doi: 10.3109/21691401.2014.944644. Epub 2014 Aug 11. PMID: 25111051.
38. Chung KM, Salkin LM, Stein MD, Freedman AL. Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 1990 Dec;61(12):732-6. doi: 10.1902/jop.1990.61.12.732. PMID: 2269914.
39. Clayman L. Implant reconstruction of the bone-grafted maxilla: review of the literature and presentation of 8 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Apr;64(4):674-82. doi: 10.1016/j.joms.2005.12.026. PMID: 16546648.
40. Covani U, Ricci M, Bozzolo G, Mangano F, Zini A, Barone A. Analysis of the pattern of the alveolar ridge remodelling following single tooth extraction. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Aug;22(8):820-5. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02060.x. Epub 2010 Dec 29. PMID: 21198897.
41. Cowan PM, Mcgavin S, North AC. The polypeptide chain configuration of collagen. *Nature*. 1955 Dec 3;176(4492):1062-4. doi: 10.1038/1761062a0. PMID: 13272747.
42. Crowley MM, Zhang F, Repka MA, Thumma S, Upadhye SB, Battu SK, McGinity JW, Martin C. Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: part I. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007 Sep;33(9):909-26. doi: 10.1080/03639040701498759. PMID: 17891577.
43. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo KI, Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6737345. doi: 10.1155/2016/6737345. Epub 2016 Feb 21. PMID: 27057174; PMCID: PMC4761677.
44. Darby I, Chen S, De Poi R. Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Aust Dent J*. 2008 Mar;53(1):11-21. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.00008.x. PMID: 18304236.
45. de Groot K.: Hydroxylapatite as coating for implants. *Interceram*, 4, 1987, 38–41.
46. Delgado LM, Bayon Y, Pandit A, Zeugolis DI. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015 Jun;21(3):298-313. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0290. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25517923; PMCID: PMC4442559.
47. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large

- bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med.* 2012 Jul 26;10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81. PMID: 22834465; PMCID: PMC3423057. b)
48. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials (Basel)*. 2013 Sep 6;6(9):3840-3942. doi: 10.3390/ma6093840. PMID: 28788309; PMCID: PMC5452669.
 49. Duan B, Wang M. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. *J R Soc Interface*. 2010 Oct 6;7 Suppl 5(Suppl 5):S615-29. doi: 10.1098/rsif.2010.0127.focus. Epub 2010 May 26. PMID: 20504805; PMCID: PMC3024573.
 50. Dziadek M., Cholewa-Kowalska K., Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomedyczna* 2014; 20(4): 193-202.
 51. Eslami H., Solati-Hashjin M., Tahriri M., *IJPS Spring*, 2008, 4, 127–134.
 52. Evans N. D., Gentleman E., Polak J., Scaffolds for stem cells, *Mater. Today*, **2006**, 9(12), 26-33.
 53. Ewers R. Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: a clinical report of long-term results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Dec;63(12):1712-23. doi: 10.1016/j.joms.2005.08.020. PMID: 16297691.
 54. Fakirov S., *Biodegradable Polyesters*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015, C. Zhang *Biodegradable Polyesters: Synthesis, Properties, Applications*.
 55. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2012 Sep;8(9):3191-200. doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.014. Epub 2012 Jun 15. PMID: 22705634.
 56. Fields GB, Prockop DJ. Perspectives on the synthesis and application of triple-helical, collagen-model peptides. *Biopolymers.* 1996;40(4):345-57. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1996)40:4<3C345::AID-BIP1%3E3.0.CO;2-W. PMID: 8765606.
 57. Gadomska-Gajadhur A., Łojek K., Szymaniak M., Gadomska A., *Materiały porowate do regeneracji tkanki kostnej i chrzęstnej. Wroby Medyczne* 2018; 3: 51-58.
 58. Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, Patel A, Sant S, Reis RL, Marques AP, Gomes ME, Khademhosseini A. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Mater.* 2013 Jun 25;25(24):3329-36. doi: 10.1002/adma.201300584. Epub 2013 May 13. PMID: 23670944.
 59. Gathani KM, Raghavendra SS. Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016 Sep;13(5):379-386. doi: 10.4103/1735-3327.192266. PMID: 27857762; PMCID: PMC5090995.
 60. Gilding D. K., Reed A. M., *Biodegradable polymers for use in surgery—polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1*, *Polymer*, **1979**, 20(12), 1459-1464.

61. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 2008 May;89(5):338-44. doi: 10.1002/bip.20871. PMID: 17941007.
62. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1984 Sep;11(8):494-503. doi: 10.1111/j.1600-051x.1984.tb00901.x. PMID: 6384274.
63. GUANG-MEI C., TIE-MEI Z., LEI C., YI-PING H., *Asian Journal of Chemistry*, 2010, 22, 5902–5912.
64. Guarnieri R, Grassi R, Ripari M, Pecora G. Maxillary sinus augmentation using granular calcium sulfate (surgiplaster sinus): radiographic and histologic study at 2 years. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006 Feb;26(1):79-85. PMID: 16515099.
65. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003 May 20;5:1-16; discussion 16. doi: 10.22203/ecm.v005a01. PMID: 14562275.
66. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003 May 20;5:1-16; discussion 16. doi: 10.22203/ecm.v005a01. PMID: 14562275.
67. Haines P. J., *Thermal Methods of Analysis*, Springer Netherlands, 1995.
68. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol* 2000. 2008;47:172-92. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00251.x. PMID: 18412581
69. Hallman M., Thor A.: Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontology* 2000, 2008, 47:172-192.
70. Han T. Synteza i badania właściwości koniugatów substancji farmakologicznie czynnych z biodegradowalnymi polimerami, 2012.
71. HARKNESS RD. Biological functions of collagen. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1961 Nov;36:399-463. doi: 10.1111/j.1469-185x.1961.tb01596.x. PMID: 13904721.
72. Haugh MG, Murphy CM, McKiernan RC, Altenbuchner C, O'Brien FJ. Crosslinking and mechanical properties significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2011 May;17(9-10):1201-8. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0590. Epub 2011 Jan 17. PMID: 21155630.
73. Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Dec;19(12):1219-25. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01617.x. PMID: 19040436.
74. Hench L. L.: *Bioceramics: from concept to clinic*. *Am. Ceram. Soc. Bull.*, Vol. 72, nr 4, 1993, 93–98.

75. Hu H., Dorset D. L., *Macromolecules*, 1990, 23, 21, 4604–4607.
76. Hua N, Ti VL, Xu Y. Biodegradable effect of PLGA membrane in alveolar bone regeneration on beagle dog. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Nov;70(2):1051-5. doi: 10.1007/s12013-014-0022-5. PMID: 24833431.
77. Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009 Nov 26;462(7272):426-32. doi: 10.1038/nature08601. PMID: 19940912; PMCID: PMC2848528.
78. Hutmacher DW, Sittering M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol*. 2004 Jul;22(7):354-62. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.05.005. PMID: 15245908.
79. Ignjatovic N., Delijic K., Vukcevic M., Uskokovic D., *Z. Metallkd.*, 2001, 92, 145-149.
80. Ignjatovic N., Uskokovic D., *Spectroscopy*, 2004, 18, 553–565.
81. Ikada Y., Tsuji H., Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, 21, 117-132.
82. Jańczuk Z.: *Periodontologia współczesna z nowych badań*. Med Tour Pres,
83. Jing N., Jiang X., Wang Q., Tang Y., Zhang P., *Anal. Methods*, 2014, 6, 15, 5590–5595.
84. Kan JY, Rungcharassaeng K, Lozada JL, Zimmerman G. Facial gingival tissue stability following immediate placement and pro-visualization of
Strona 43 z 60
85. Kankala RK, Xu XM, Liu CG, Chen AZ, Wang SB. 3D-Printing of Microfibrous Porous Scaffolds Based on Hybrid Approaches for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2018 Jul 23;10(7):807. doi: 10.3390/polym10070807. PMID: 30960731; PMCID: PMC6404034.
86. Karachalios T, Boursinos L, Poultsides L, Khaldi L, Malizos KN. The effects of the short-term administration of low therapeutic doses of anti-COX-2 agents on the healing of fractures. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 Sep;89(9):1253-60. doi: 10.1302/0301-620X.89B9.19050. PMID: 17905969.
87. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474-91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002. PMID: 15860204.
88. Kashkarov V. M., Goloshchapov D. L., Romyantseva A. N., Seredin P. V., Domashevskaya E.P, Spivakova I. A., Shumilovich B.R., *J. Synchron. Investig.*, 2011, 5, 1162–1167.
89. Khademhosseini A, Vacanti JP, Langer R. Progress in tissue engineering. *Sci Am*. 2009 May;300(5):64-71. doi: 10.1038/scientificamerican0509-64. PMID: 19438051.
90. Khatoun Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment

- and prevention. *Heliyon*. 2018;4(12):e01067. Published 2018 Dec 28. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01067
91. Kim BS, Yang SS, Lee J. A polycaprolactone/cuttlefish bone-derived hydroxyapatite composite porous scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Jul;102(5):943-51. doi: 10.1002/jbm.b.33075. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24259295.
 92. Kim T., Shin H, Lim D.: Biomimetic scaffolds for tissue engineering, *Advanced Functional Materials*, 2012, 22, 2446–2468.26
 93. Kirschneck C, Meier M, Bauer K, Proff P, Fanghänel J. Meloxicam medication reduces orthodontically induced dental root resorption and tooth movement velocity: a combined in vivo and in vitro study of dental-periodontal cells and tissue. *Cell Tissue Res*. 2017 Apr;368(1):61-78. doi: 10.1007/s00441-016-2553-0. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28044198.
 94. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Okochi H, Asashima M. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct 1;400(4):461-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.029. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20708604.
 95. Kopczyński P., Matthews-Brzozowska T., Flieger R. Odbudowa implantoprotetyczna w przypadku wąskiego wyrostka zębodołowego – opis przypadku. *Mag Stomatol*. 2012; 7-8: 60-63.
 96. Kruk A., Gadomska-Gajadthur A., Ruśkowski P., Chwojnowski A., Dulnik J., Synoradzki L. Preparation of biodegradable semi-permeable membranes as 3D scaffolds for cell cultures, Desalination and water treatment, 2017, 64, 317–323.
 97. Kruk A., Gadomska-Gajadthur A., Ruśkowski P., Chwojnowski A., Synoradzki L.: Otrzymywanie polilaktydowych rusztowań komórkowych o strukturze gąbczastej – badania wstępne i optymalizacja, *Polimery*, 2017, 62(2), 118–126.
 98. Kruk A., Gadomska-Gajadthur A., Sebai A., Ruskowski P., Rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej. *Wyroby Medyczne* 2017; 4: 31-35.]
 99. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529.
 100. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*. 2001 Jun 19;221(1-2):1-22. doi: 10.1016/s0378-5173(01)00691-3. PMID: 11397563.
 101. Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, Weinlaender M, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol*. 1998 Sep;69(9):1044-9. doi: 10.1902/jop.1998.69.9.1044. PMID: 9776033.
 102. Lekovic V, Kenney EB, Weinlaender M, Han T, Klokkevold P, Nedic M, Orsini M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *J Periodontol*. 1997 Jun;68(6):563-70. doi: 10.1902/jop.1997.68.6.563. PMID: 9203100.

103. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent.* 2003;12(3):217-26. doi: 10.1097/01.id.0000078233.89631.f8. PMID: 14560481.
104. Li JY, Wang SN, Dong YM. The effect of topical application of meloxicam on inflamed dental pulp. *J Dent Sci.* 2021 Jul;16(3):915-921. doi: 10.1016/j.jds.2020.11.010. Epub 2020 Dec 2. PMID: 34141105; PMCID: PMC8189887.
105. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J.* 2014 May 16;8:56-65. doi: 10.2174/1874210601408010056. PMID: 24894890; PMCID: PMC4040931.
106. Lymperi S, Ligoudistianou C, Taraslia V, Kontakiotis E, Anastasiadou E. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. *Open Dent J.* 2013 Jul 26;7:76-81. doi: 10.2174/1874210601307010076. PMID: 24009647; PMCID: PMC3750972.
107. Ma Q., Pyda M., Mao B., Cebe P., *Polymer*, 2013, 54, 2544–2554.
108. Maitz M. F., Applications of synthetic polymers in clinical medicine, *Biosurf. Biotribol.*, **2015**, 1, 161-176.
109. Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A.: *Biomateriały w stomatologii*, Wyd. Politechniki Śląskiej, 2008.
110. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004 Feb;22(2):80-6. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.12.001. PMID: 14757042.
111. Marzena Anna Lewandowska^{2,3} „Personalized medicine in oncology:
112. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells.* 2006 May;24(5):1246-53. doi: 10.1634/stemcells.2005-0235. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16410391.
113. Mhanna, A. Hasan. *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*, Published 2017 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2017: 3-34.
114. Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials.* 1993 Apr;14(5):323-30. doi: 10.1016/0142-9612(93)90049-8. PMID: 8507774.
115. Mikos, A.G.; Thorsen, A.J.; Czerwonka, L.A.; Yuan, B.; Langer, R.; Winslow, D.N.; Vacanti, J.P. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid) foams. *Polymer* **1994**, 35, 1068–1077.
116. Miller N, Penaud J, Foliguet B, Membre H, Ambrosini P, Plombas M. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in a rabbit model. *J Clin Periodontol.* 1996 Dec;23(12):1051-9. doi: 10.1111/j.1600-051x.1996.tb01803.x. PMID: 8997647.

117. Mir M., Leite F. L., Herrmann P.S. Junior, Pissetti F. L., Rossi A.M., Malta M. E.; Moreira, Mascarenhas Y.P., *Mat. Res.*, 2012, 15, 4, 622–627.
118. Misch CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Nov-Dec;12(6):767-76. PMID: 9425757.
119. Misch CM. Maxillary autogenous bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 May;23(2):229-38, v. doi: 10.1016/j.coms.2011.01.003. PMID: 21492798.
120. Mohammed Reza Khosravani, Tamara Reinicke, On the Use of X-ray Computed Tomography in Assessment of 3D-Printed Components”*Journal of Nondestructive Evaluation* **volume 39**, Article number: 75 (2020)
121. Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*. 1996 Jul;17(14):1417-22. doi: 10.1016/0142-9612(96)87284-x. PMID: 8830969.
122. Moore W.R., Grsves S.E., Bain G.I.: Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J. Surg.* 2001, 71: 354-361.
123. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater*. 2013 Sep 20;26:120-32. doi: 10.22203/ecm.v026a09. PMID: 24052425.
124. Myerson MS, Neufeld SK, Uribe J. Fresh-frozen structural allografts in the foot and ankle. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jan;87(1):113-20. doi: 10.2106/JBJS.C.01735. PMID: 15634821.
125. Nair L. S., Laurencin C. T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 762–798.
126. Neumann R., Neunzehn J., Hinüber C., Flathm T, Schulze P., Wiesmann H. P., 3d-
127. Neumann R., Neunzehn J., Hinüber C., Flathm T, Schulze P., Wiesmann H. P., 3d-printed poly-ε-caprolactone-caco3-biocomposite-scaffolds for hard tissue regeneration, *Express Polym. Lett.* 13 (1) (2019) 2–17
128. Ngo TD, Kashani A, Imbalzano G, Nguyen KTQ, Hui D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. Vol. 143, *Composites Part B: Engineering*. Elsevier Ltd; 2018. p. 172–196.
129. Nikevi; D. Maravi; N. Ignjatovi; M. Mitri; D. Makovec and D. Uskokovi, *Materials Transactions*, 2006, 47, 12, 2980–2986.
130. Nissan J, Mardinger O, Strauss M, Peleg M, Sacco R, Chaushu G. Implant-supported restoration of congenitally missing teeth using cancellous bone block-allografts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Mar;111(3):286-91. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.042. Epub 2010 Jul 31. PMID: 20674407.
131. Nkenke E., Stelzle F.: Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systemic review. *Clin Oral Impl Res* 2009, 20 (suppl. 4): 124-133.

132. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982 Jul;9(4):290-6. doi: 10.1111/j.1600-051x.1982.tb02095.x. PMID: 6964676.
133. O'Brien F. J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Mater. Today, 2011*, 14(3), 88-95.
134. Okuyama K, Xu X, Iguchi M, Noguchi K. Revision of collagen molecular structure. *Biopolymers.* 2006;84(2):181-91. doi: 10.1002/bip.20381. PMID: 16206128.
135. Oldenkamp HF, Vela Ramirez JE, Peppas NA. Re-evaluating the importance of carbohydrates as regenerative biomaterials. *Regen Biomater.* 2019 Feb;6(1):1-12. doi: 10.1093/rb/rby023. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30740237; PMCID: PMC6362819.
136. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F., Review Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications, *Materials, 2010*, 3, 1863-1887.
137. Park J., Lakes R. S., *Biomaterials An Introduction.* 3rd ed. New York: Springer (2007), pp. 2-13.
138. Park TG. Perfusion culture of hepatocytes within galactose-derivatized biodegradable poly(lactide-co-glycolide) scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res.* 2002 Jan;59(1):127-35. doi: 10.1002/jbm.1224. PMID: 11745545.
139. Pathak V. M., Navneet, Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach, *Bioresour. Bioprocess. 2017*, 4(15), 1-31.
140. Patil H, Tiwari RV, Repka MA. Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation. *APLLA PharmSciTech.* 2016 Feb;17(1):20-42. doi: 10.1208/s12249-015-0360-7. Epub 2015 Jul 10. PMID: 26159653; PMCID: PMC4766118.
141. Peintinger G., Autley K., Wiesler A. Bone defect in the esthetic zone as result of trauma. *Identity.* 2007; 2: 34-37.
142. Pellegrini G, Pagni G, RPLLAerini G. Surgical Approaches Based on Biological Objectives: GTR versus GBR Techniques. *Int J Dent.* 2013;2013:521547. doi: 10.1155/2013/521547. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23843792; PMCID: PMC3697289.
143. Perrotti V., Nicholls B.M., Piatelli A.: Human osteoclast formation and activity on equine spongy bone substitute. *Clin Oral Impl Res* 2009, 20: 17-23. an
144. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004 Feb 10;109(5):656-63. doi: 10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61. Epub 2004 Jan 20. PMID: 14734516.
145. Plunkett NA, Partap S, O'Brien FJ. Osteoblast response to rest periods during bioreactor culture of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Tissue*

- Eng Part A. 2010 Mar;16(3):943-51. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0345. PMID: 19827912.
146. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014 Jan;14(1):15-56. doi: 10.1166/jnn.2014.9127. PMID: 24730250; PMCID: PMC3997175.
 147. Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Greenstein G, Polson AP, Harrold CQ, Laster L. Guided tissue regeneration in human furcation defects after using a biodegradable barrier: a multi-center feasibility study. *J Periodontol.* 1995 May;66(5):377-85. doi: 10.1902/jop.1995.66.5.377. PMID: 7623257.
 148. Ponte A., Hoppe A., Khoury F. The tunnel technique. Procedure for bone grafting before printed poly-e-caprolactone-caco3-biocomposite-scaffolds for hard tissue reimplant placement: a case study. *Identity.* 2006; 3: 247-250.
 149. Puchała P., Kucharski G., Jaremczuk B., Monkas-Jaremczuk E.: Przegląd biomateriałów na podstawie piśmiennictwa. *TPS* 2008, 10:28-36.
 150. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005 Apr;129(1):118-29. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x. PMID: 15801964.
 151. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 2003 Mar;75(3):775-9. doi: 10.1016/s0003-4975(02)04568-x. Erratum in: *Ann Thorac Surg.* 2004 May;77(5):1880. Wei, Eugene Sim Kwang [corrected to Sim, Eugene Kwang Wei]. PMID: 12645692.
 152. Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E., *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine.* Elsevier Academic Press (1996), A. J. Coury, R. J. Levy, B. D. Ratner, F. J. Schoen, D. F. Williams, R. L. Williams, Chapter 6. Degradation of Materials in the Biological Environment, pp. 243-281.
 153. Ratner B. D.: *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine.* Red. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons. Academic Press 1996.
 154. Ratner B.D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E., *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine . 2nd ed.* Elsevier Academic Press (2004), J. Kohn, S. Abramson, R. Langer, 2.7. Bioresorbable and Bioerodible materials, pp. 115-127.
 155. Raucci MG, D'Antò V, Guarino V, Sardella E, Zeppetelli S, Favia P, Ambrosio L. Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2010 Oct;6(10):4090-9. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.018. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20417736.

156. Remigiusz Lewandowski, Krzysztof Roszkowski, Marzena Anna Lewandowska „Personalized medicine in oncology: vision or realistic concept?” 2011
157. Reśliński, A. et al. “Biofilm Detection on the Surface of Hernia Mesh Implants.” *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 19 (2010): 685-690.
158. Reyes-Gasga J, Martínez-Piñeiro EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R, Brès EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013 Dec 1;33(8):4568-74. doi: 10.1016/j.msec.2013.07.014. Epub 2013 Jul 19. PMID: 24094161.
159. Rezaei A, Mohammadi MR. In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013 Jan 1;33(1):390-6. doi: 10.1016/j.msec.2012.09.004. Epub 2012 Sep 23. PMID: 25428086.
160. Rocchietta I, Simion M, Hoffmann M, Trisciuglio D, Benigni M, Dahlin C. Vertical Bone Augmentation with an Autogenous Block or Particles in Combination with Guided Bone Regeneration: A Clinical and Histological Preliminary Study in Humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Feb;18(1):19-29. doi: 10.1111/cid.12267. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25622713.
161. Rodella LF, Favero G, Labanca M. Biomaterials in maxillofacial surgery: membranes and grafts. *Int J Biomed Sci.* 2011 Jun;7(2):81-8. PMID: 23675225; PMCID: PMC3614823.
162. Różalska B, Sadowska B, Więkowska M, Rudnicka W. Detection of bacterial biofilm on medical biomaterials. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 50 (1998):115–122
163. Sarasu J. R., Prudhomme R. E., Wisniewski M., *Macromolecules*, 1998, 31, 3895–3905.
164. Saska S, Pires LC, Cominotte MA, Mendes LS, de Oliveira MF, Maia IA, da Silva JVL, Ribeiro SJL, Cirelli JA. Three-dimensional printing and in vitro evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds functionalized with osteogenic growth peptide for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Aug 1;89:265-273. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.016. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29752098.
165. Sato K., Kumagai Y., Ikoma T., Watari K., Tanaka J., *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2005 113, 112–115.
166. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003 Aug;23(4):313-23. PMID: 12956475.
167. Shaltout AA, Allam MA, Moharram MA. FTIR spectroscopic, thermal and XRD characterization of hydroxyapatite from new natural sources. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011 Dec;83(1):56-60. doi: 10.1016/j.saa.2011.07.036. Epub 2011 Aug 3. PMID: 21903453.

168. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833. PMID: 19344236; PMCID: PMC2846778.
169. Silvipriya K. S., Krishna Kumar K., Bhat A. R., Dinesh Kumar B., Anish John, Panayappan Lakshmanan, Collagen: Animal Sources and Biomedical Application, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2015**, 5(3), pp. 123-127.
170. Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Feb;12(1):35-45. doi: 10.1034/j.1600-0501.2001.012001035.x. PMID: 11168269.
171. Sjöström M, Sennerby L, Nilson H, Lundgren S. Reconstruction of the atrophic edentulous maxilla with free iliac crest grafts and implants: a 3-year report of a prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2007 Mar;9(1):46-59. doi: 10.1111/j.1708-8208.2007.00034.x. PMID: 17362496.
172. Slomkowski S., *Biodegradable Polyesters for Tissue Engineering, Macromolecular*
173. Sobczak-Kupiec A.; Wzorek Z., *Czasopismo Techniczne Politechniki Krakowskiej*, 2010, 107, 309–322.
174. Solis-Velazquez OA, Gutiérrez-Lomelí M, Guerreo-Medina PJ, Rosas-García ML, Iñiguez-Moreno M, Avila-Novoa MG. Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020 Jul 10:S1684-1182(20)30159-6. doi: 10.1016/j.jmii.2020.07.002.
175. Speranza V, Sorrentino A, De Santis F, Pantani R. Characterization of the polycaprolactone melt crystallization: complementary optical microscopy, DSC, and AFM studies. *ScientificWorldJournal.* 2014 Jan 9;2014:720157. doi: 10.1155/2014/720157. PMID: 24523644; PMCID: PMC3913191.
176. Stodulska U., Kruka., Ruśkowski P, Gadomska-Gajadhur A., Otrzymywanie polimerowych rusztowań komórkowych, *WYROBY MEDYCZNE*, 2018, 1(5), 38–40.
177. Suda H., Yashima M., Kakihana M., Yoshimura M., *J. Phys Chem.*, 1995, 99, 6752–6754.
178. Sui G, Yang X, Mei F, Hu X, Chen G, Deng X, Ryu S. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Aug;82(2):445-54. doi: 10.1002/jbm.a.31166. PMID: 17295252.
179. *Symposia*, 253 (2007), s. 47–58
180. Szyszkowska A., Krawczyk P.: Materiały stosowane do odbudowy ubytków kostnych w stomatologii – praca poglądowa. *Implantoprotetyka* 2008, IX, 4(33): 21-24

181. Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials*. 2003 Jan;24(1):181-94. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00276-4. PMID: 12417192.
182. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Jan;234(1):1-9. doi: 10.3181/0805/MR-170. PMID: 19109553.
183. Tas C, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2001, 84, 2, 295–300.
184. Tobita M, Mizuno H. Periodontal disease and periodontal tissue regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun;5(2):168-74. doi: 10.2174/157488810791268672. PMID: 19941449.
185. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008 Jul;35(7):630-9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01246.x. Epub 2008 May 21. PMID: 18498382.
186. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, Li B, Shu W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater*. 2017 Dec 1;3(3):278-314. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001. PMID: 29744467; PMCID: PMC5935790.
187. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2011 Jun 15;49(12):832-864. doi: 10.1002/polb.22259. PMID: 21769165; PMCID: PMC3136871.
188. Uysal AC, Mizuno H. Tendon regeneration and repair with adipose derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun;5(2):161-7. doi: 10.2174/157488810791268609. PMID: 19941450.
189. Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016 Jun;59(3):139-144. doi: 10.1016/j.rehab.2016.03.002. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27079583.
190. Wang C, Huang W, Zhou Y, He L, He Z, Chen Z, He X, Tian S, Liao J, Lu B, Wei Y, Wang M. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater*. 2020 Jan 15;5(1):82-91. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.01.004. PMID: 31956737; PMCID: PMC6962643.
191. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, Wei J. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers (Basel)*. 2016 Mar 29;8(4):115. doi: 10.3390/polym8040115. PMID: 30979206; PMCID: PMC6431950.
192. Wang Y., Li Z., Zhou S., Gao S., Gong M., Li Y., *Polym Eng Sci*, 2011, 51, 341–346.
193. Wilberforce SI, Finlayson CE, Best SM, Cameron RE. A comparative study of the thermal and dynamic mechanical behaviour of quenched and annealed bioresorbable poly-L-lactide/ α -tricalcium phosphate

- nanocomposites. *Acta Biomater.* 2011 May;7(5):2176-84. doi: 10.1016/j.actbio.2011.02.006. Epub 2011 Feb 21. PMID: 21315187.
194. Wojak-Ćwik IM, Rumian Ł, Krok-Borkowicz M, Hess R, Bernhardt R, Dobrzyński P, Möller S, Schnabelrauch M, Hintze V, Scharnweber D, Pamuła E. Synergistic effect of bimodal pore distribution and artificial extracellular matrices in polymeric scaffolds on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Apr;97:12-22. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.012. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30678897.
 195. Wolf H.F., Rateitschak E.M., Rateitschak K.H.: *Periodontologia*, Czelej, Lublin
 196. Wong T. W., Wahit M.U., Abdul K., Mohammed R., Balakrishnan H. *Materials Letters*, 2014, 126, 105–108.
 197. Xiao X, Liu R, Huang Q. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Nov;19(11):3429-35. doi: 10.1007/s10856-008-3499-x. Epub 2008 Jun 24. PMID: 18574674.
 198. Xiao Y., Li D., Fan H., Li X., Gu Z., Zhang X., *Materials Letters*, 2007, 61, 59–62.
 199. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells.* 2006 Nov;24(11):2582-91. doi: 10.1634/stemcells.2006-0228. Epub 2006 Jul 27. PMID: 16873762.
 200. Yang S. I., Wu Z. H., Yang W., Yang M. B., *Polymer Testing*, 2008, 27, 8, 957–963.
 201. Zakharov N. A., Klyuev V.A., Sentsov M. Yu., Toporov Y.P., Yu. P.; M. R Kiselev,. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.*, 2012, 48, 4, 444–448.
 202. Zhou S., Zheng X., Yu X., Wang J., Weng J., Li X., Feng B., Yin M., *Chem. Mater.*, 2007, 19, 247–253.
 203. Zieliński A., Sobieszczyk S., Świeczko-Żurek B., Serwiński W.: A New concept of highly porous bioactive titanium alloys with hydroxyapatite coatings. W: *Developments in Mechanical Engineering. Vol. 2.* Red. J. T. Cieśliński. Gdańsk: Gdańsk University of Technology Publisher 2008, 127–132.
 204. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859. PMID: 11304456

8. SKRÓTY

INDEKS SKRÓTÓW I OZNACZEŃ STOSOWANYCH W PRACY

2D -dwuwymiarowy

3D -trójwymiarowy

ADSC – ang. *adipose-derived stem cells*, mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z tkanki tłuszczowej

API- substancjami aktywnymi farmaceutycznie (API- ang. Active Pharmaceutical Ingredient, substancja lecznicza)

ATIMP – (Advanced Therapy Investigational Medicinal Products) oznacza ATMP który jest stosowany w badaniu klinicznym

ATMP – (Advanced Therapy Medicinal Products), podlega centralnej rejestracji przez Europejską Agencję Leków. Po rejestracji wprowadzenie do obrotu może wystąpić na terenie całej Unii Europejskiej.

ATMP-HE – (Advanced Therapy Medicinal Products – Hospital Exemption) produkt leczniczy terapii zaawansowanej

BSE – Back Scattered Electrons

CAD - projektowanie wspomagane komputerowo (*ang. computer aided design*)

COX-1- cyklooksygenaza 1

COX-2 – cyklooksygenaza 2

COX3- cyklooksygenaza 3

CTN- azotanu wapnia – (*ang calcium nitrate tetrahydrate*)

DAP- fosforanu dwuamoni – (*ang.diammonium phosphate*)

DBBM- całkowicie odbiałczona kość wołową- ang. (deproteinized bovine bone mineral)

DFDBA (decalcified freeze-dried bone allograft)

DSC- różnicowa kalorymetria skaningowa (*ang. differential scanning calorimetry*)

ECM - macierz zewnątrzkomórkowa (*ang. extracellular matrix*)

EDS – Energy Dispersion Spectroscopy

EDX – Energy Dispersive X-ray Analysis

FDA - Food and Drug Administration

FDBA .(freeze-dried bone allograft)

FDM – ang. *fused deposition modeling*, osadzanie topionego materiału – jedna z technologii druku 3D FGF

FDM - osadzanie stopionego materiału (ang. Fused Deposition Modeling)

FTIR- *Spektroskopia* fourierowska w podczerwieni (ang. Fourier-transform infrared spectroscopy)

GBR- sterowana regeneracja kość ang. guided bone regeneration – lub BTR – bone tissue regeneration

HAp - hydroksyapatyt

HME- ekstruzja wysokotemperaturowa (HME- hot melt extrusion).

IR- spektroskopia w podczerwieni (ang. Infrared Spectroscopy)

MSC – ang. *mesenchymal stem cells*, mezenchymalne komórki macierzyste

MSC - mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells)

nHAp- Nanokrystaliczny hydroksyapatyt

NLPZ- niesteroidowe leki przeciwzapalne ang. (ang. NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs)

Numer CAS jest numerycznym oznaczeniem przypisywanym substancjom chemicznym przez amerykańską organizację Chemical Abstracts Service (CAS).

OTC- postaci tabletki OTD (ang. *Orally Disintegrating Tablets*)

PCL - poli(ϵ -kaprolakton)

PLLA - poli(L-laktyd)

SE – Secondary Electrons

SEM- skaningowa mikroskopia elektronowa

SVF –ang *stromal-vascular fraction*, frakcja zrębowo-naczyniowa

TE- inżynierii tkankowej (TE- *Tissue Engineering*)

Tg- temperatura zeszklenia (ang. glass transition temperature)

TGF – ang. *transforming growth factor*, transformujący czynnik wzrostu

Tm- temperatura topnienia(ang. melting temperature)

VEGF- czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego

WDS – Wavelength Dispersion Spectroscopy

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

XRPD- dyfraktometria proszkowa (ang. X-ray powder diffraction)

STRESZCZENIE

Współczesna medycyna dysponuje dużym zasobem materiałów do rekonstrukcji kości, jednak nadal odbudowa tkanki kostnej stanowi ogromne wyzwanie. Obecnie dostępne materiały i metody leczenia ubytków kostnych nie do końca spełniają oczekiwania pacjentów i lekarzy. Inżynieria tkankowa stwarza nowe możliwości w regeneracji tkanki kostnej. Połączenie wiedzy z zakresu inżynierii tkankowej oraz osiągnięć terapii celowanej stwarza możliwość tworzenia nowych „inteligentnych” kościozastępczych rusztowań z kontrolowaną funkcją miejscowego uwalniania leku.

Celem pracy było opracowanie hybrydowych układów kompozytowych do regeneracji tkanki kostnej z funkcją modyfikowanego uwalniania leku oraz ocena właściwości fizykochemicznych, biologicznych i kinetyki uwalniania *in vitro* poprzez opracowanie metodyki badania dostępności farmaceutycznej. W pracy połączono dwie metody wytwarzania biomateriałów (metodę wytwarzania monolitów i metodę druku 3D - techniką FDM). Dzięki zastosowaniu metody druku 3D wytworzone materiały posiadały przestrzenną, porowatą mikrostrukturę naśladującą budowę i funkcje kości na którą naniesione zostały komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej.

W przedstawionej pracy badano materiały kompozytowe, których osnowę stanowił polimer – polilaktyd oraz polikaprolakton, a fazami modyfikującymi były różnej wielkości cząsteczki hydroksyapatytu pochodzenia syntetycznego. Badany materiał wytworzono w formie monolitu. W późniejszych badaniach dzięki metodzie hot melt extrusion udało się wytworzyć filament zawierający cząsteczki leku. Za pomocą druku 3D wytworzono przestrzenne scaffoldy. Wytworzony materiał służył jako rusztowanie dla komórek macierzystych.

W pracy połączono dwie metody wytwarzania biomateriałów (metodę wytwarzania monolitów i metodę druku 3D - techniką FDM). Dzięki zastosowaniu metody druku 3D wytworzone materiały posiadały przestrzenną, porowatą mikrostrukturę naśladującą budowę i funkcje kości na którą naniesione zostały komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej.

We wstępnych badaniach uzyskano dziesięć substytutów kości na bazie PLLA, PCAP i hydroksyapatytu. Morfologię wewnętrzną kompozytów określono za pomocą skaningowej

mikroskopii elektronowej (SEM), scharakteryzowano pod względem parametrów fizykochemicznych. Wykonano analizę metodą rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej (XRPD), w podczerwieni i Ramana oraz różnicowej kalorymetrii skaningowa (DSC), bioaktywności *in vitro* i odpowiedzi komórek osteoblastycznych. Badanie cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z normą 10993-5 ocena cytotoksyczności *in vitro* wyrobów medycznych. Wykonano izolację komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej wraz z ich charakterystyką. Uzyskane hodowle komórkowe wykorzystano do wytworzenia prototypu produktu leczniczego terapii zaawansowanej zawierającego komórki macierzyste. Zbadano również podatność biomateriałów na adhezję mikroorganizmów i powstawanie biofilmu. W doświadczeniach komórkowych nie zaobserwowano toksyczności materiału.

W badaniach wytworzono hybrydowe trójwymiarowe rusztowania do rekonstrukcji tkanki kostnej. W tym celu wykorzystano otrzymane wcześniej rusztowania funkcjonalizując je dodatkowo niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym tj. meloksykalem oraz tworząc przestrzenną matrycę dla multipotencjalnych komórek pozyskanych z tkanki tłuszczowej. Wybór meloksykamu był podyktowany jego właściwościami hamującymi aktywność COX-2 i wysoką temperaturą degradacji, umożliwiającą wykorzystanie tego leku w procesie szybkiego prototypowania 3D.

Dodanie meloksykamu spowodowało, że uzyskany scaffold nie był zasiedlany przez drobnoustroje. Otrzymany za pomocą druku 3D hybrydowy biokompozyt posiada działanie osteoindukcyjne, a zawarty w nim lek powoduje utrudnione zasiedlanie przez bakterie oraz działa przeciwzapalnie. Wykazano, że hamuje on wzrost komórek THP1, które są modelem monocytów i stanu zapalnego. Otrzymany materiał stał się rusztowaniem dla multipotencjalnych komórek zrębu z tkanki tłuszczowej i wykazał różnicowanie w kierunku osteoblastów. Badania *in vitro* wykazały duży potencjał otrzymanych materiałów do regeneracji tkanki kostnej.

Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że wielofunkcyjne materiały hybrydowe otrzymywane za pomocą technologii druku 3D wykazują przewagę nad materiałami z pojedynczą odpowiedzią i mają duży potencjał do zastosowania w inżynierii wyrostka zębodołowego. Kontrolowanie uwalniania leku za pomocą nośnika polimerowego o znanym profilu uwalniania pozwala na analityczne dostosowanie mechanizmu dyfuzji, zapewniając bezpieczniejsze terapie. Dzięki bezpośredniemu transportowi leku do tkanki kostnej ukierunkowane systemy dostarczania leków dają możliwość ulepszonej terapii.

ABSTRACT

OBTAINING AND TESTING NEW BIOCOMPOSITE SYSTEMS FOR DENTISTRY AS COMPLEMENTS TO TISSUE STRUCTURES IN PERSONALISED MEDICINE BASED ON RESORBABLE POLYMERS.

Modern medicine has a large supply of materials for bone reconstruction, but still the reconstruction of bone tissue is extremely challenging. Currently available materials and methods for treating bone defects do not fully meet the expectations of patients and doctors.

Tissue engineering offers new opportunities in bone tissue regeneration. The combination of tissue engineering knowledge and advances in targeted therapy offers the possibility of creating new 'smart' bone-replacement scaffolds with controlled local drug release.

The aim of this study was to develop hybrid composite systems for bone tissue regeneration with modified drug release function and to evaluate the physicochemical, biological properties and in vitro release kinetics by developing a methodology for pharmaceutical availability testing. In this study, two methods for producing biomaterials (the monolith manufacturing method and the 3D printing method - FDM technique) were combined. Thanks to the 3D printing method, the materials produced had a spatial, porous microstructure mimicking the structure and function of bone, onto which they were applied and function of bone onto which stem cells from adipose tissue were deposited.

The work presented here investigated composite materials whose matrix was a polymer - polylactide and polycaprolactone - and whose modifying phases were hydroxyapatite particles of synthetic origin of different sizes. In a later study, the hot melt extrusion method was used to produce a filament containing the drug particles. 3D printing was used to produce spatial scaffolds. The material produced served as a scaffold for the stem cells.

In this study, two methods for producing biomaterials were combined (the monolith manufacturing method and the 3D printing method - FDM technique). Thanks to the 3D printing method, the materials produced had a spatial, porous microstructure mimicking the structure and function of bone onto which stem cells from adipose tissue were applied.

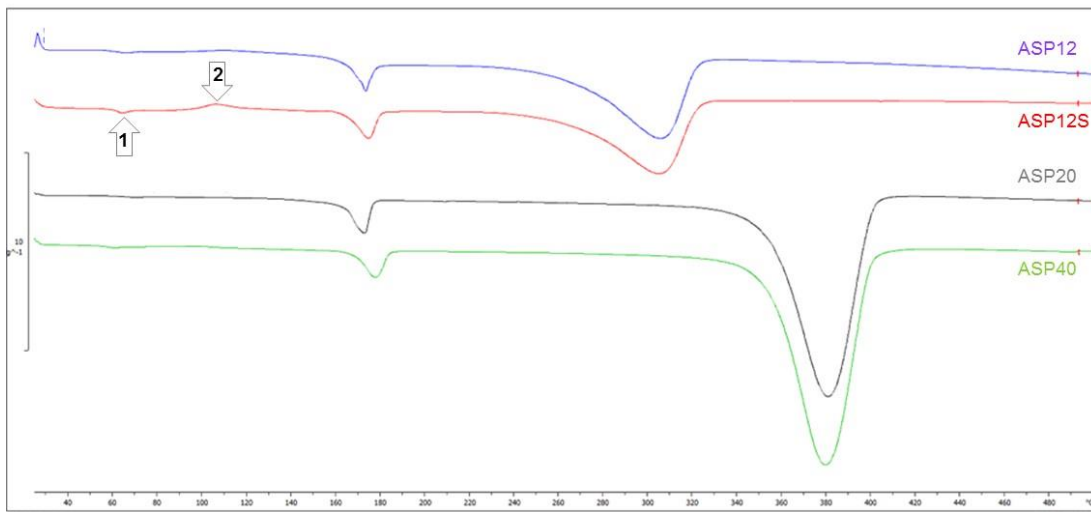
In preliminary studies, ten bone substitutes based on PLLA, PCAP and hydroxyapatite were obtained. The internal morphology of the composites was determined by scanning electron microscopy (SEM) and characterised in terms of physicochemical parameters. Analysis by X-ray powder diffraction (XRPD), infrared and Raman, and differential scanning calorimetry (DSC), in vitro bioactivity and osteoblastic cell responses were performed. Cytotoxicity testing was performed according to standard 10993-5 in vitro cytotoxicity assessment of medical devices. Isolation of stem cells from adipose tissue was performed along with their characterisation. The cell cultures obtained were used to produce a prototype of an advanced therapy medicinal product containing stem cells. The susceptibility of the biomaterials to microbial adhesion and biofilm formation was also investigated. No material toxicity was observed in the cell experiments.

In this study, hybrid three-dimensional scaffolds were produced for bone tissue reconstruction. For this purpose, I used previously obtained scaffolds by additionally functionalising them with a non-steroidal anti-inflammatory drug, i.e. meloxicam, and creating a spatial matrix for multipotent cells obtained from adipose tissue. The choice of meloxicam was dictated by its COX-2 inhibitory properties and its high degradation temperature, enabling the use of this drug in rapid 3D prototyping.

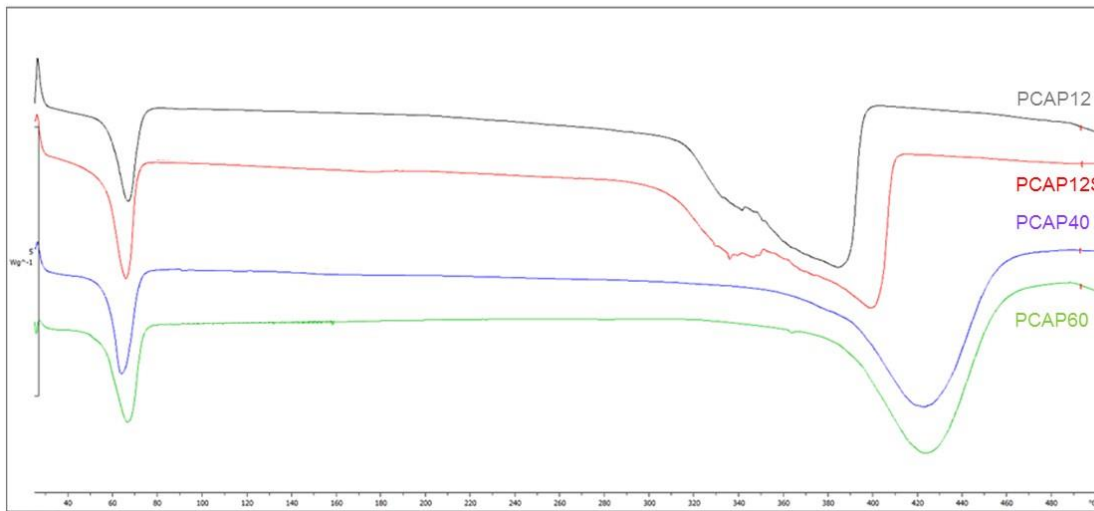
The addition of meloxicam ensured that the obtained scaffold was not colonised by microorganisms. The 3D-printed hybrid biocomposite has an osteoinductive effect, and the drug contained in it causes hindered colonisation by bacteria and has an anti-inflammatory effect. It was shown to inhibit the growth of THP1 cells, which are a model of monocytes and inflammation. The resulting material became a scaffold for multipotent adipose tissue stroma cells and showed differentiation towards osteoblasts. In vitro studies demonstrated the high potential of the obtained materials for bone tissue regeneration.

The results obtained allow us to conclude that multifunctional hybrid materials obtained using 3D printing technology show advantages over single-response materials and have great potential for application in alveolar engineering. Controlling drug release using a polymer carrier with a known release profile allows analytical adjustment of the diffusion mechanism, providing safer therapies. By directly transporting the drug into the bone tissue, targeted drug delivery systems offer the potential for improved therapies.

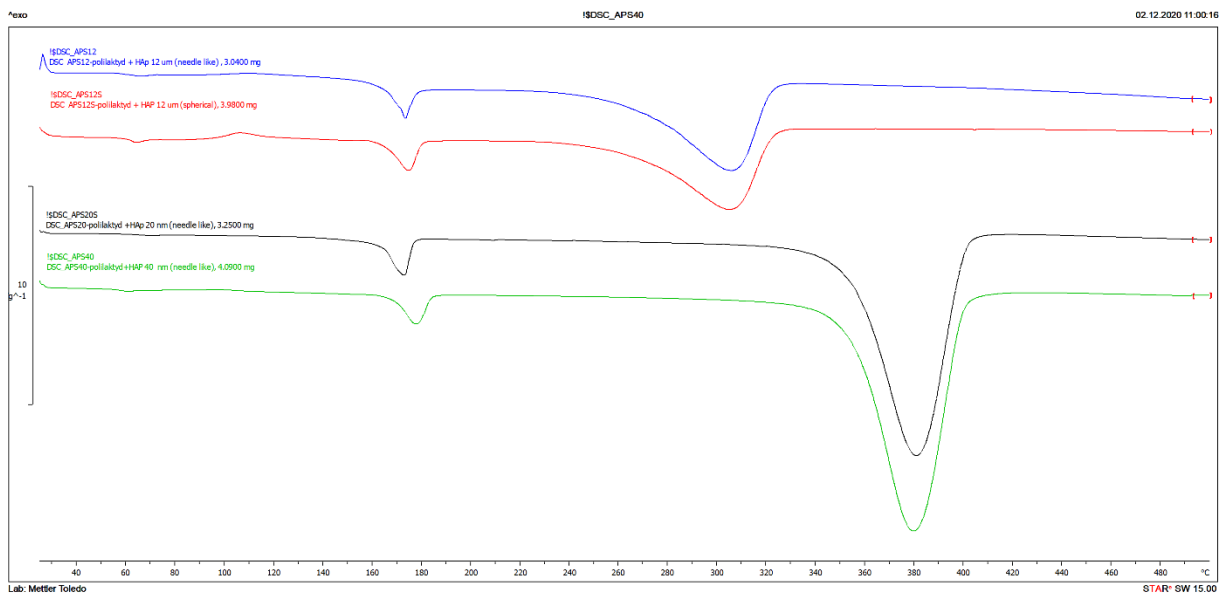
SUPLEMENT



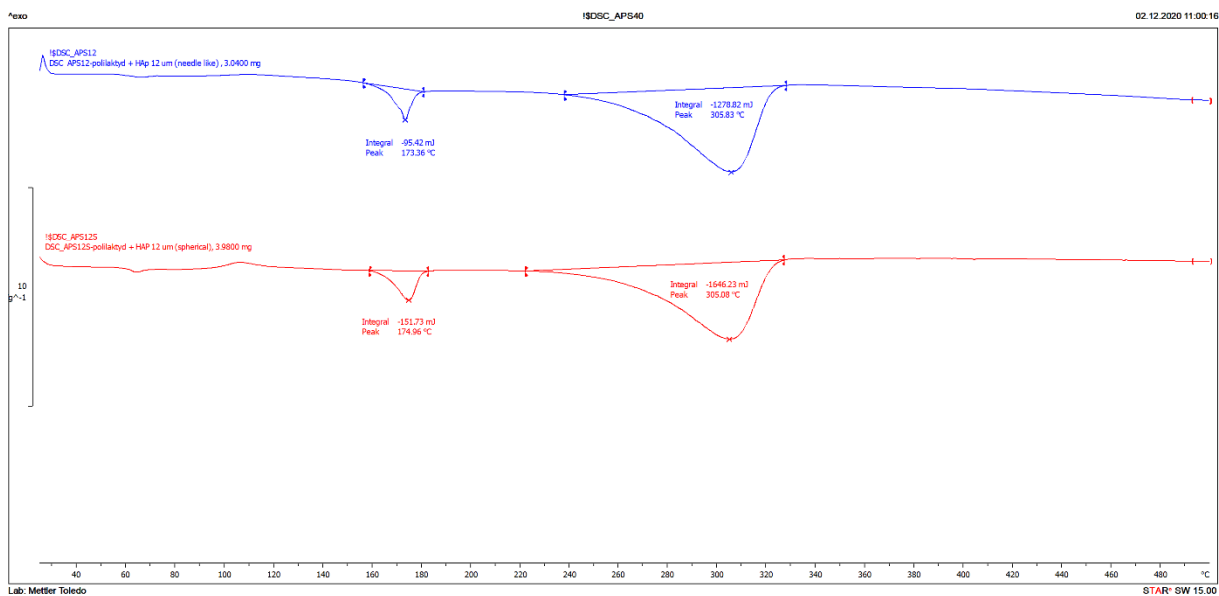
Ryc. S1. Termogramy DSC zarejestrowane dla kompozytów polilaktydu.



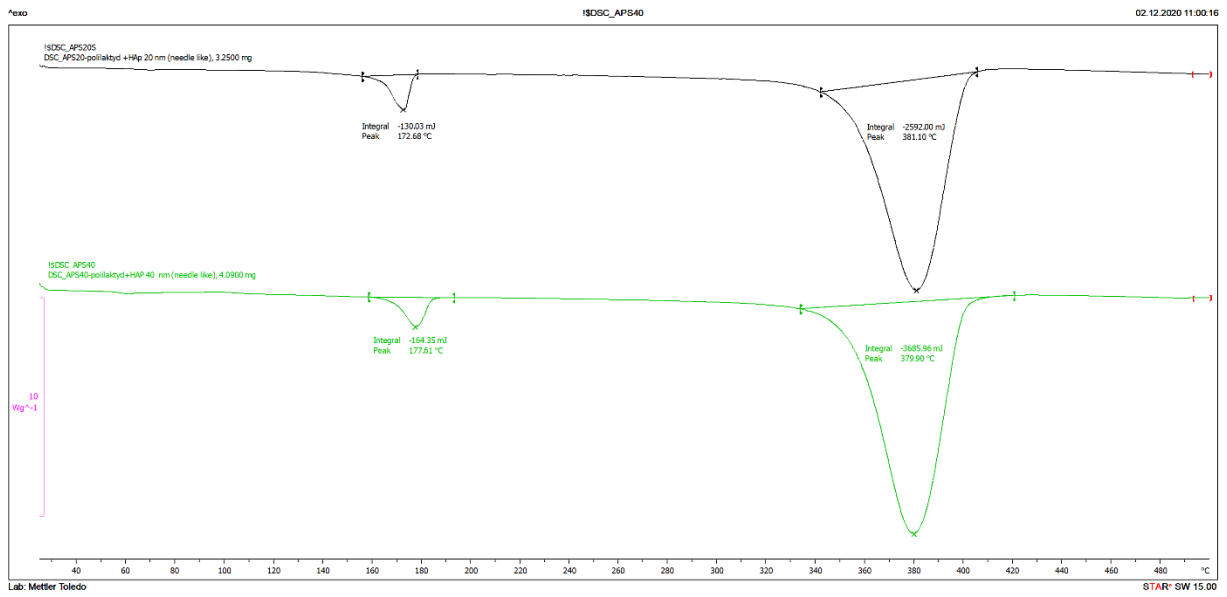
Ryc. S2. Termogramy DSC zarejestrowane dla kompozytów polikaprolaktonu.



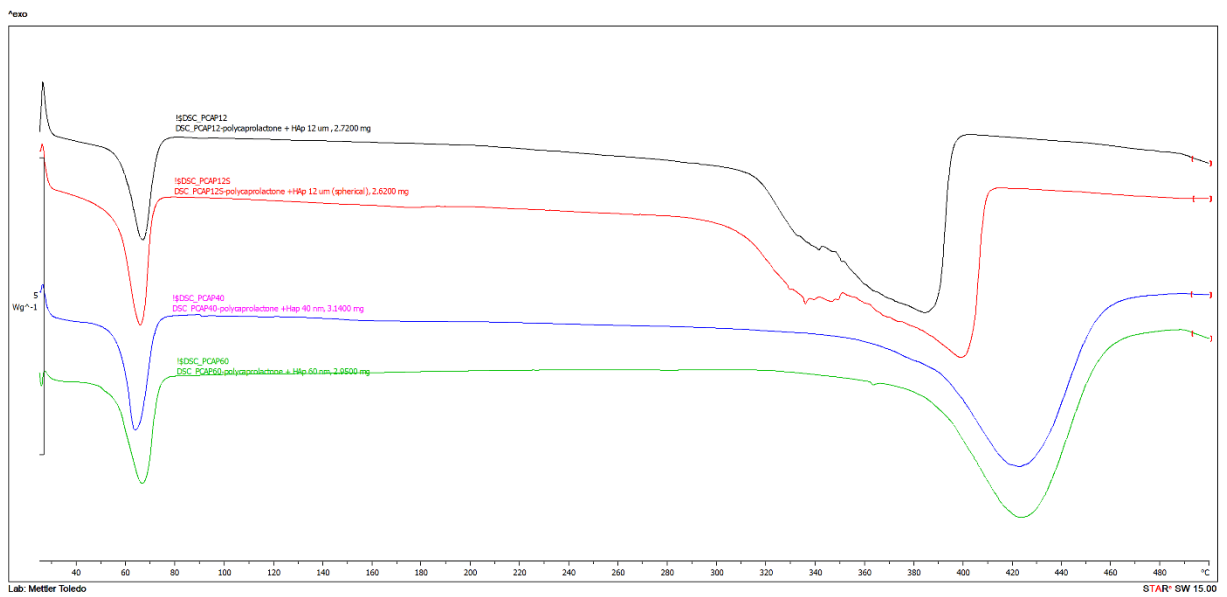
Ryc. S3. Zestawienie termogramów próbek PLLA



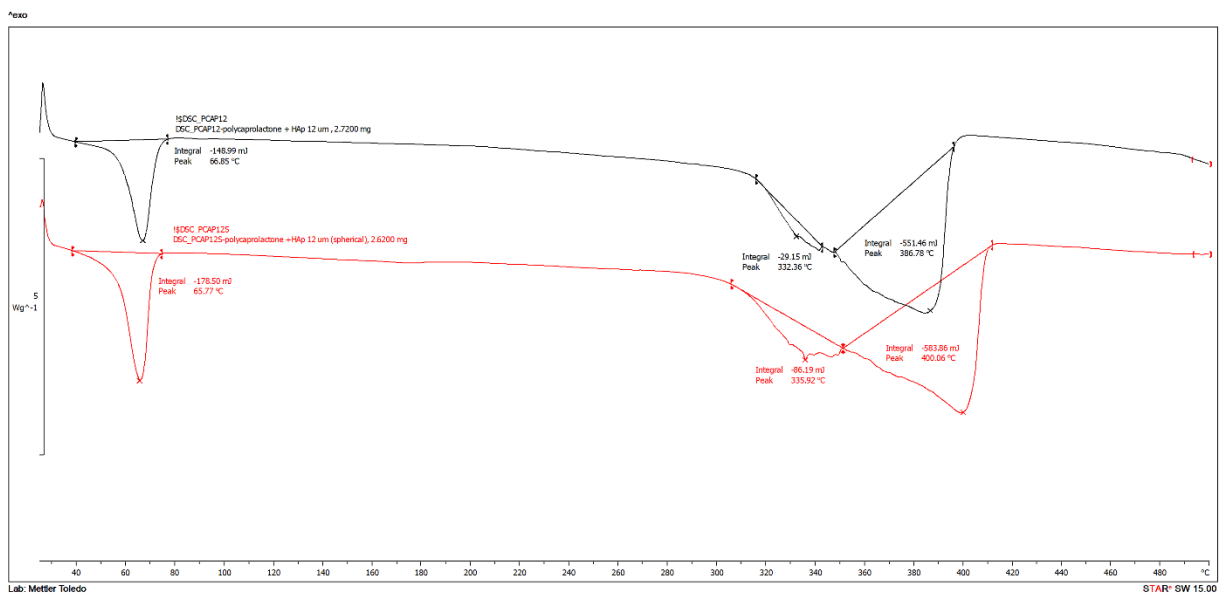
Ryc. S4. Zestawienie termogramów DSC próbek PLLA12



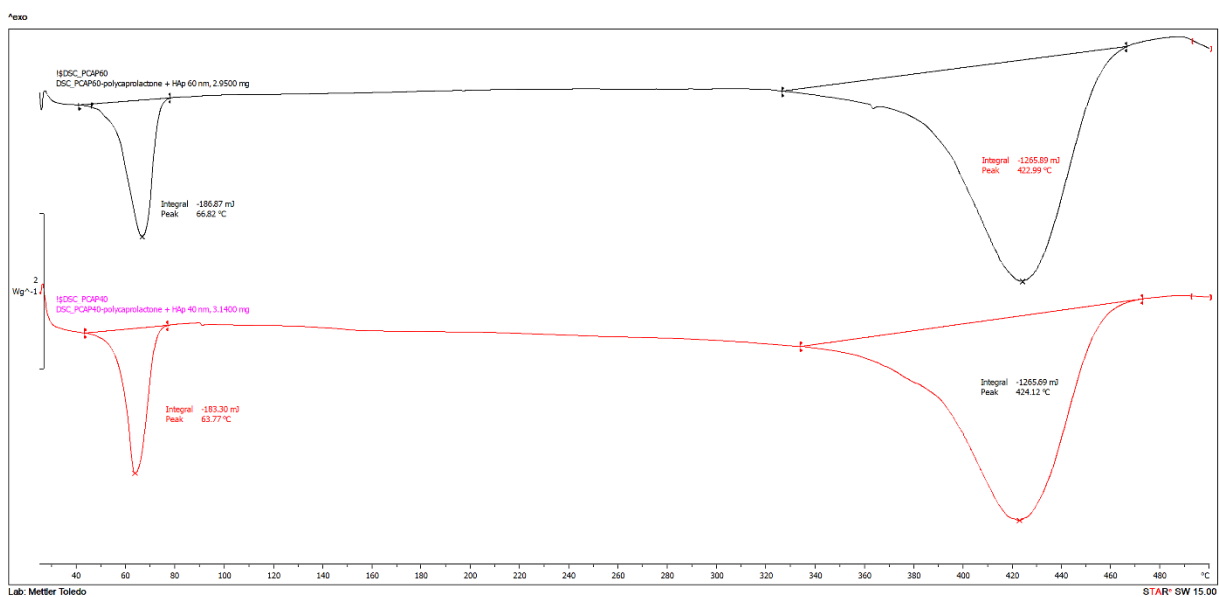
Ryc. S5. Zestawienie termogramów DSC próbek PLLA20 i PLLA40



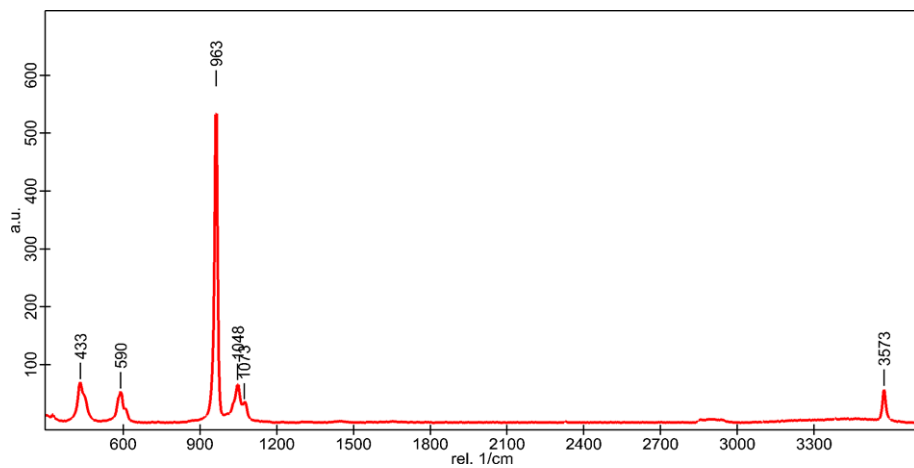
Ryc. S6. Zestawienie termogramów DSC próbek PCAP



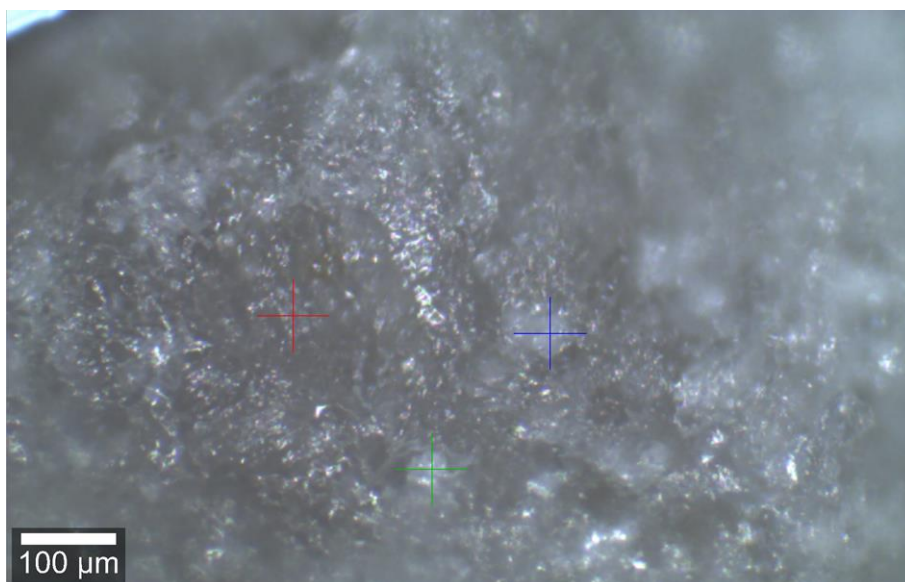
Ryc. S7. Zestawienie termogramów DSC próbek PCAP



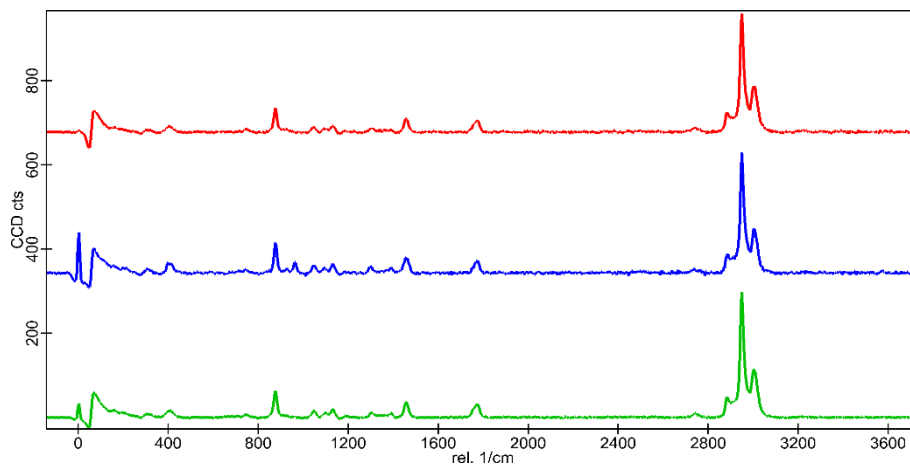
Ryc. S8. Zestawienie termogramów DSC kompozytów z PCL



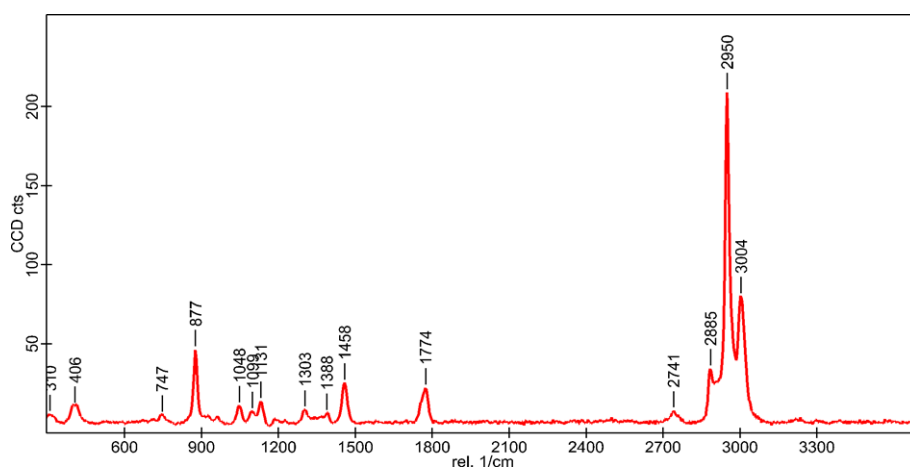
Ryc. S9. Uśrednione widmo ramanowskie próbki hydroksyapatytu, pasmo charakterystyczne 963 rel. cm^{-1}



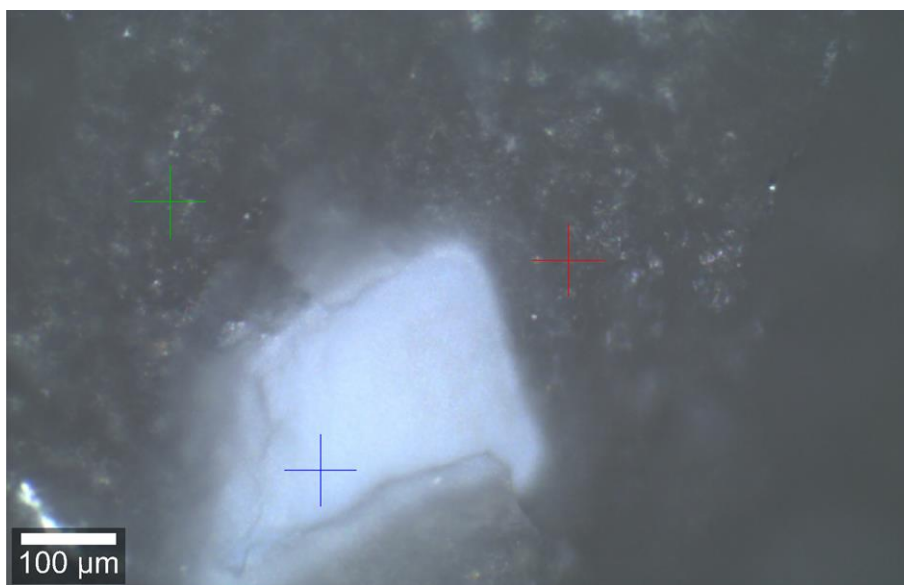
Ryc. S10. Fotografia mikroskopowa próbki PLLA12s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



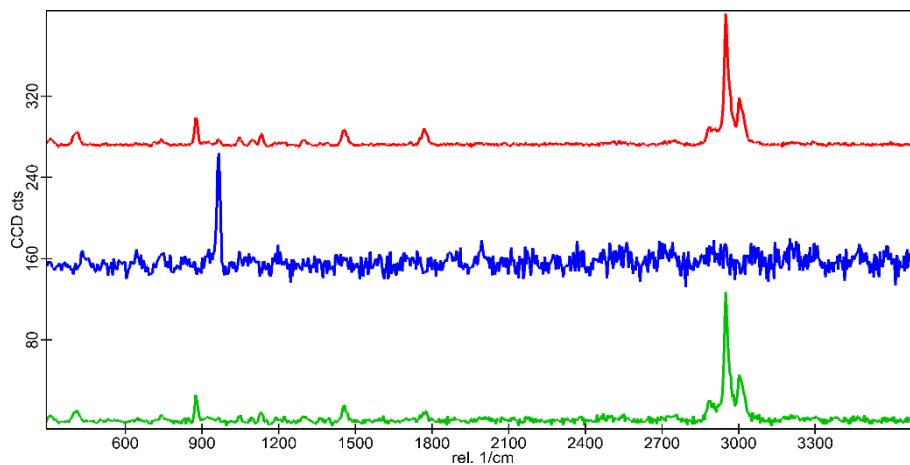
Ryc. S11. Widma punktowe próbki PLLA12s



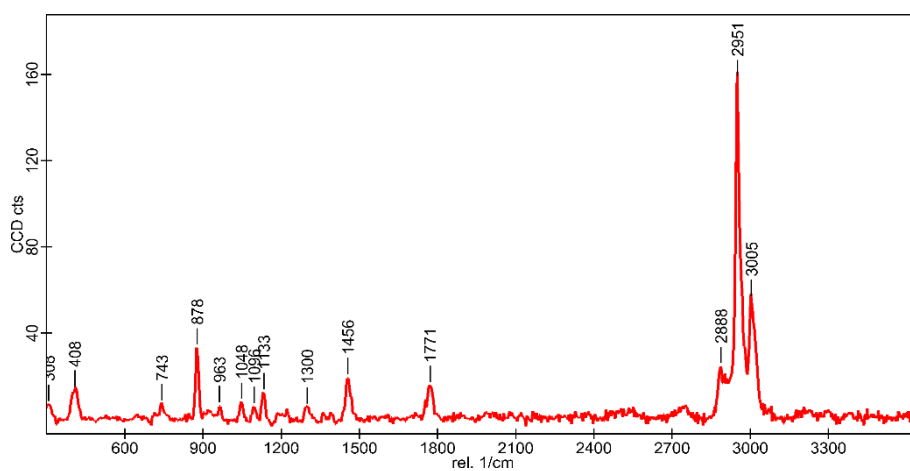
Ryc. S12. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PLLA12



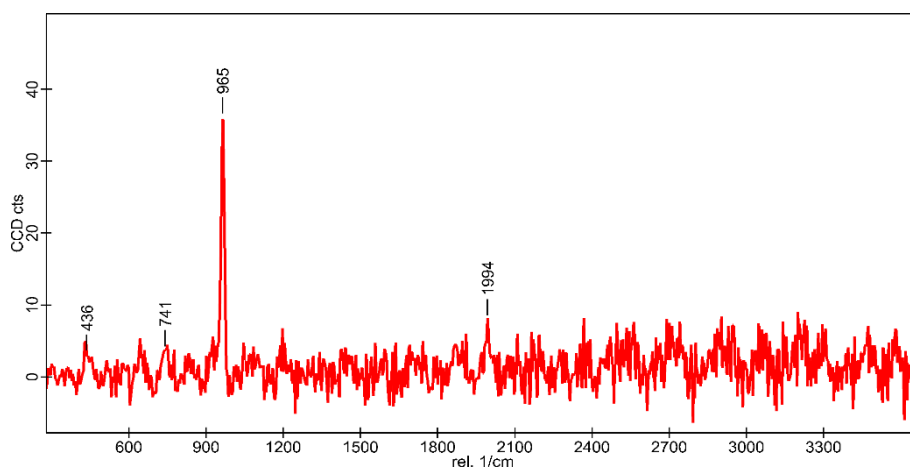
Ryc. S13. Fotografia mikroskopowa próbki PLLA20s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



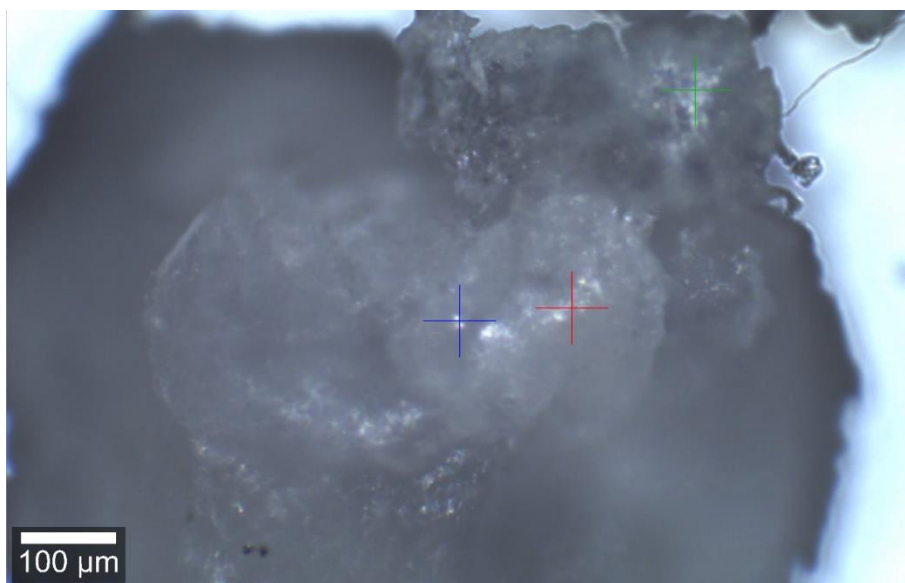
Ryc. S14. Widma punktowe próbki PLLA20s



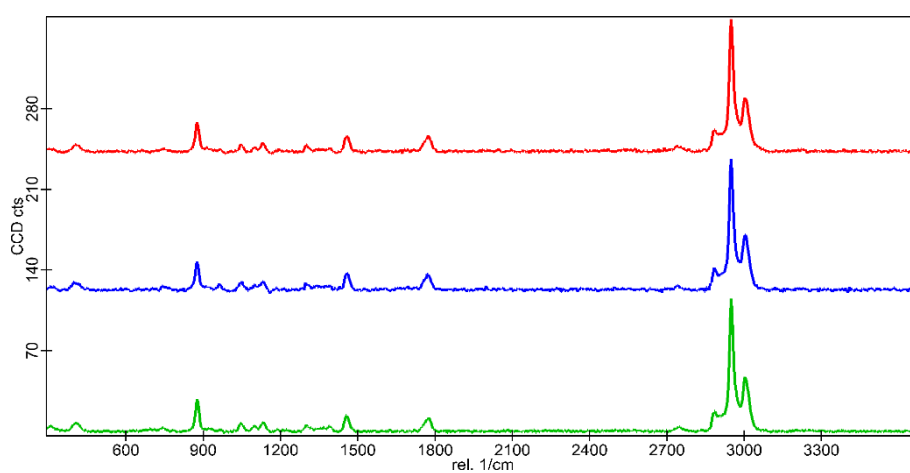
Ryc.S15. Usrednione widmo polimeru próbki PLLA20s



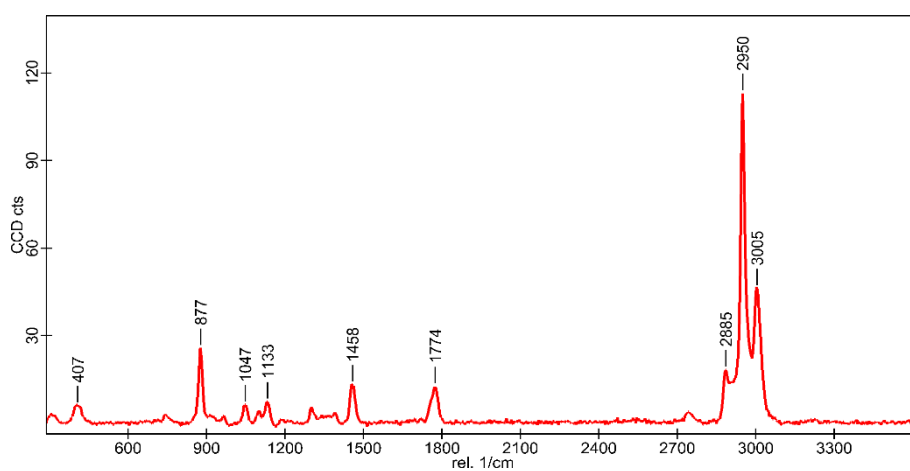
Ryc. S16. Widmo hydroksyapatytu próbki PLLA20s



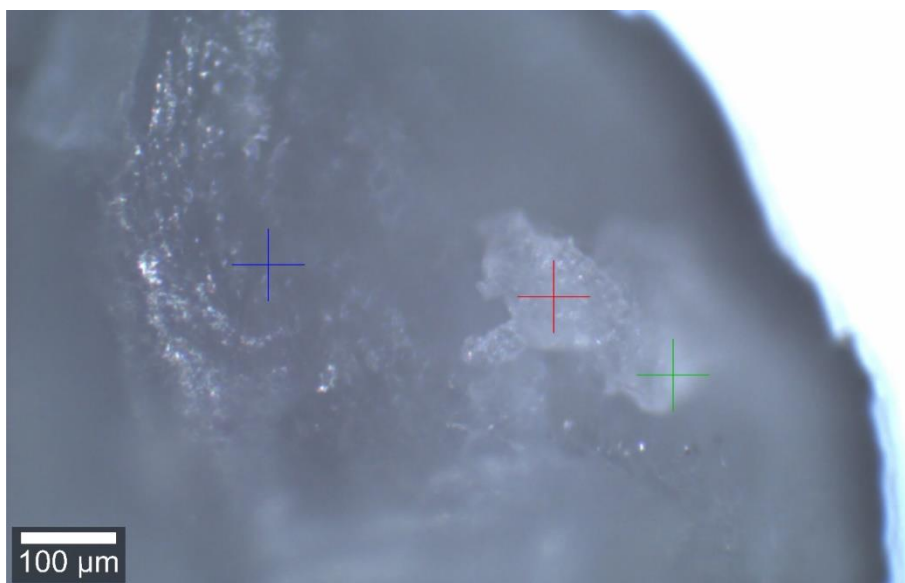
Ryc. S17. Fotografia mikroskopowa próbki PLLA40s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



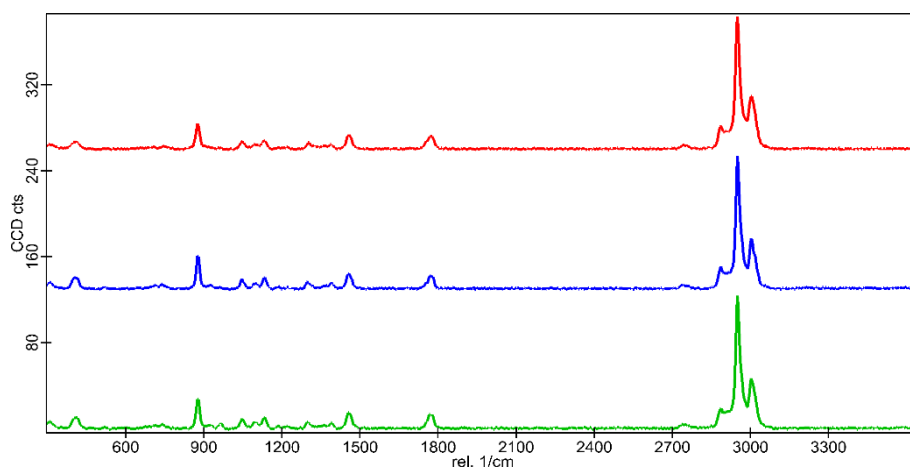
Ryc. S18. Widma punktowe próbki PLLA40s



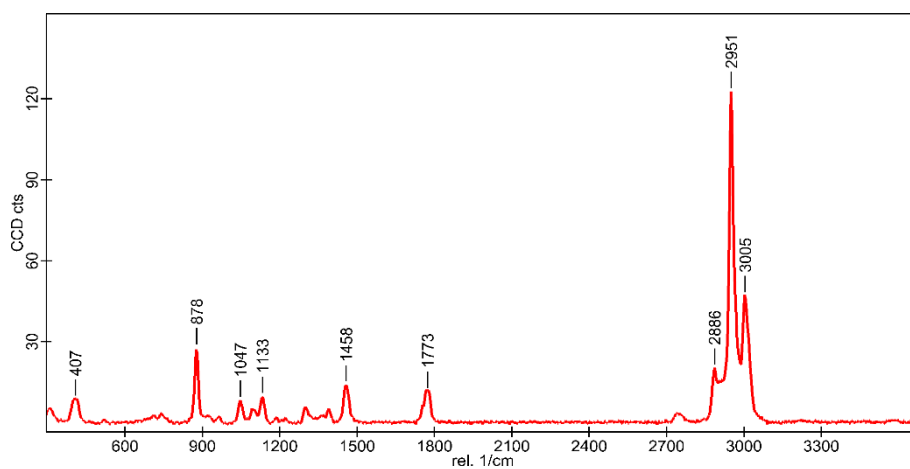
Ryc. S19. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PLLA40s



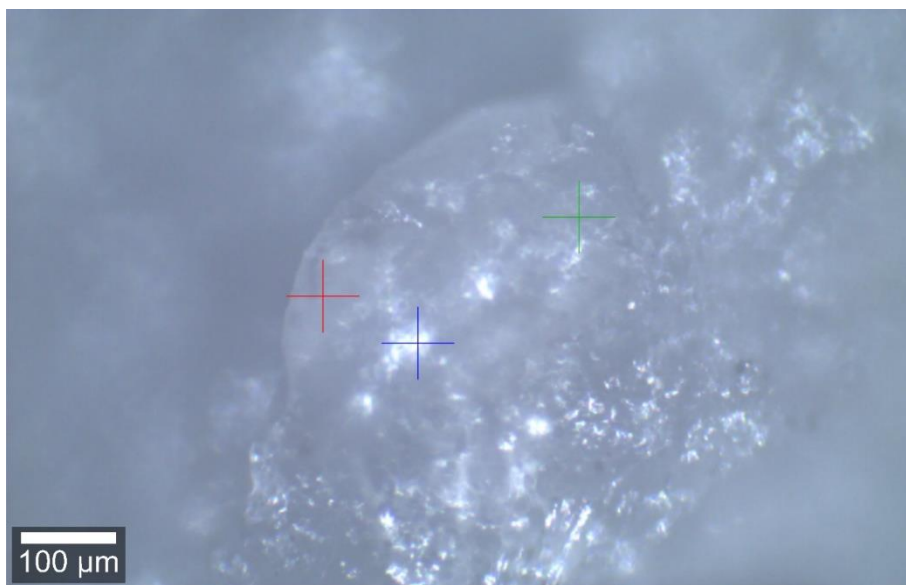
Ryc. S20. Fotografia mikroskopowa próbki PLLA60s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



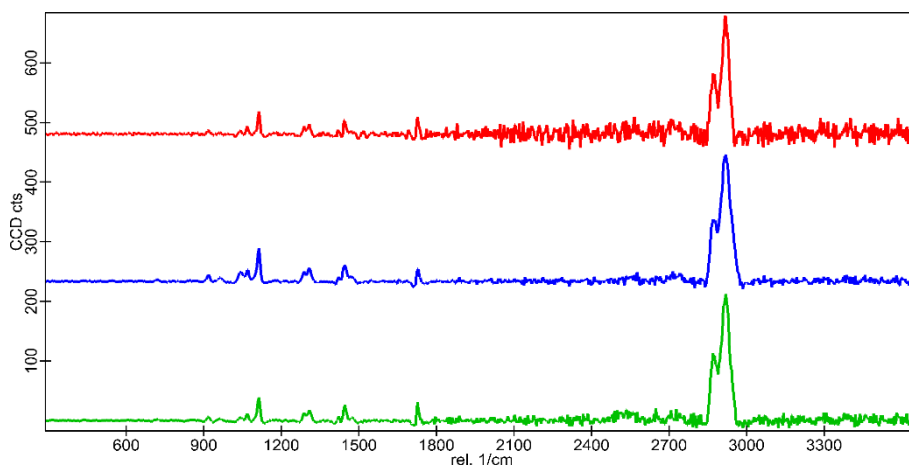
Ryc. S21. Widma punktowe próbki PLLA60s



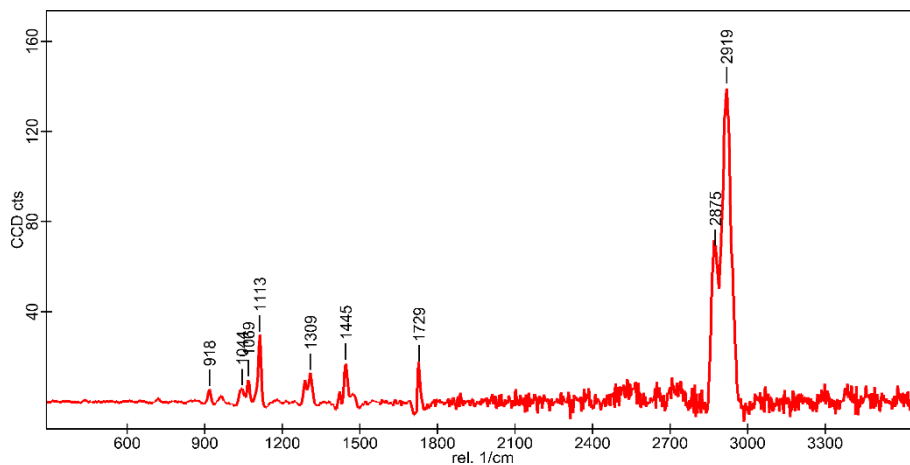
Ryc. S22. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PLLA60s



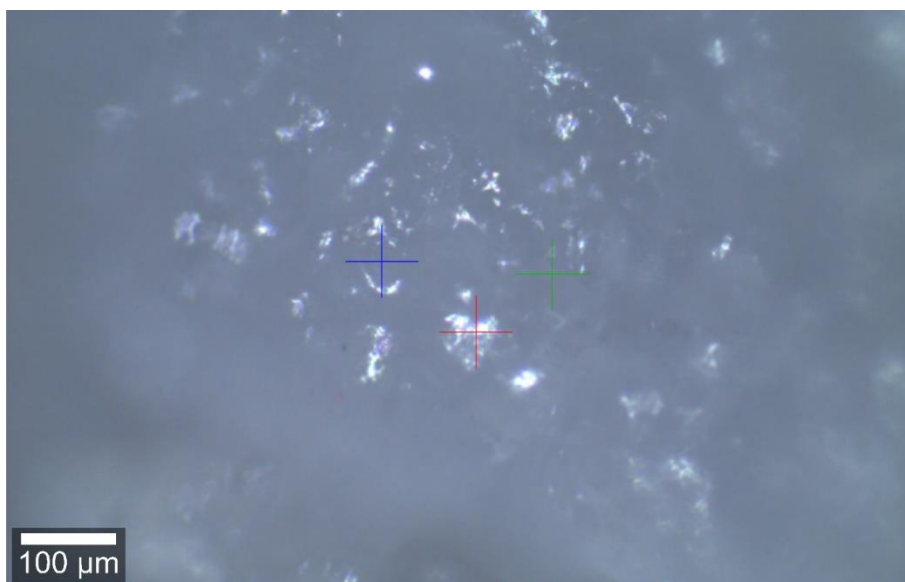
Ryc. S23. Fotografia mikroskopowa próbki PCAP12s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



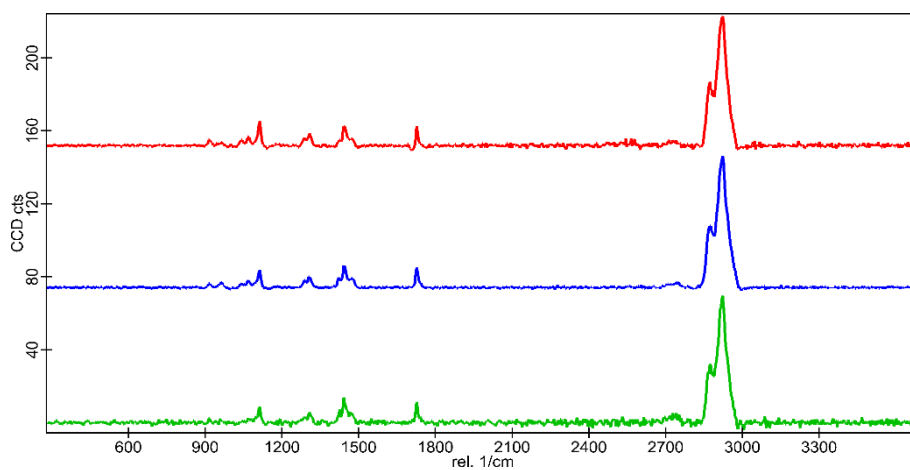
Ryc. S24. Widma punktowe próbki PCAP12s



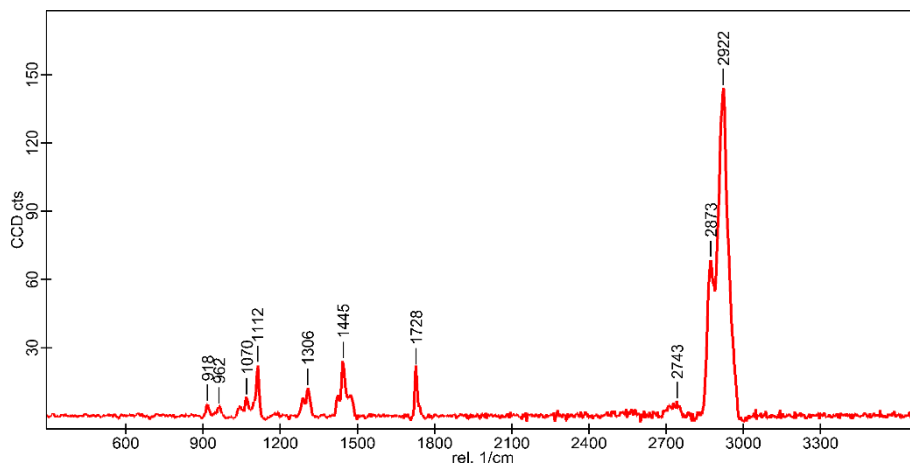
Ryc. S25. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PCAP12s



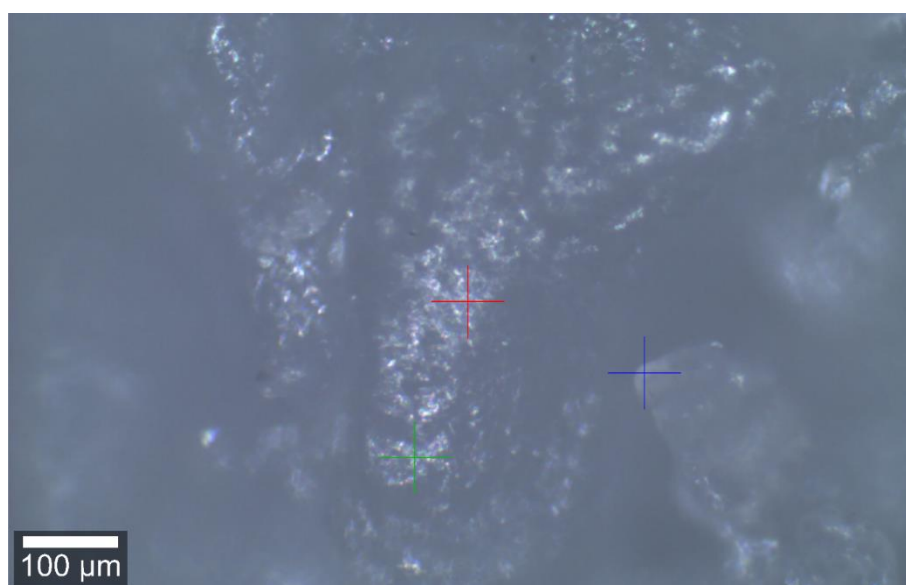
Ryc. S26 Fotografia mikroskopowa próbki PCAP20s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



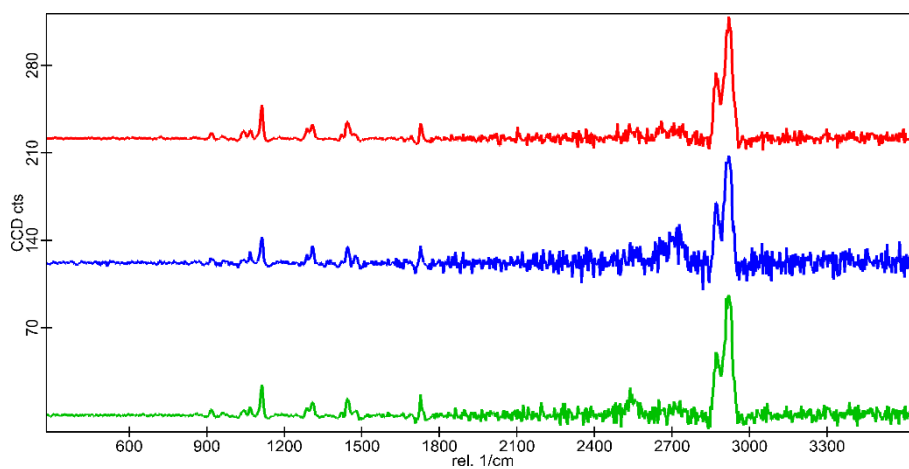
Ryc. S27. Widma punktowe próbki PCAP20s



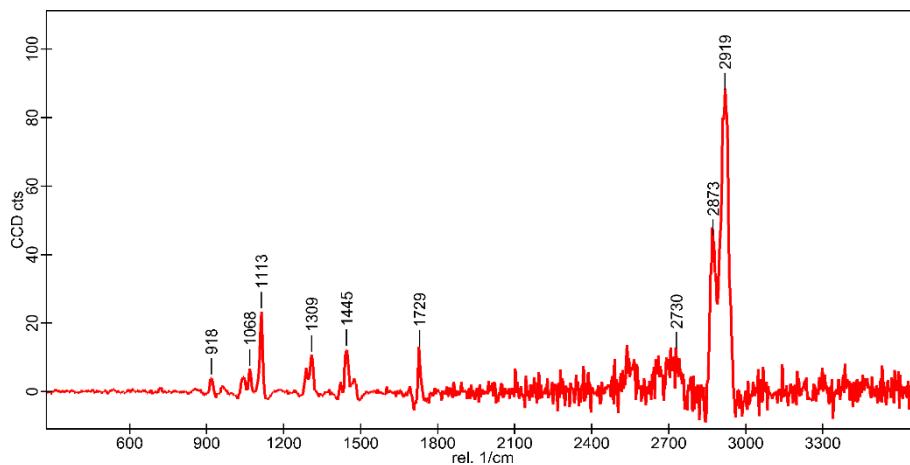
Ryc. S28. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PCAP20s



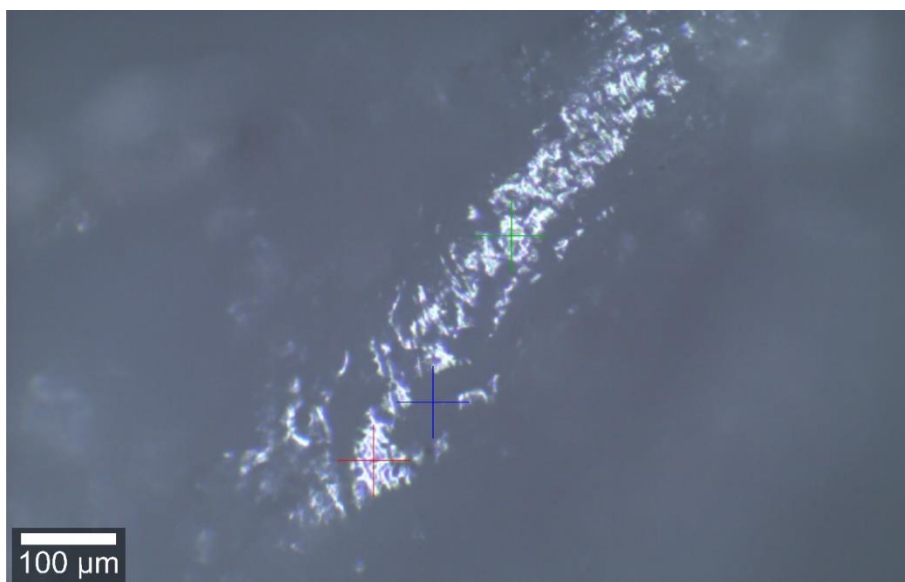
Ryc. S29. Fotografia mikroskopowa próbki PCAP40s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



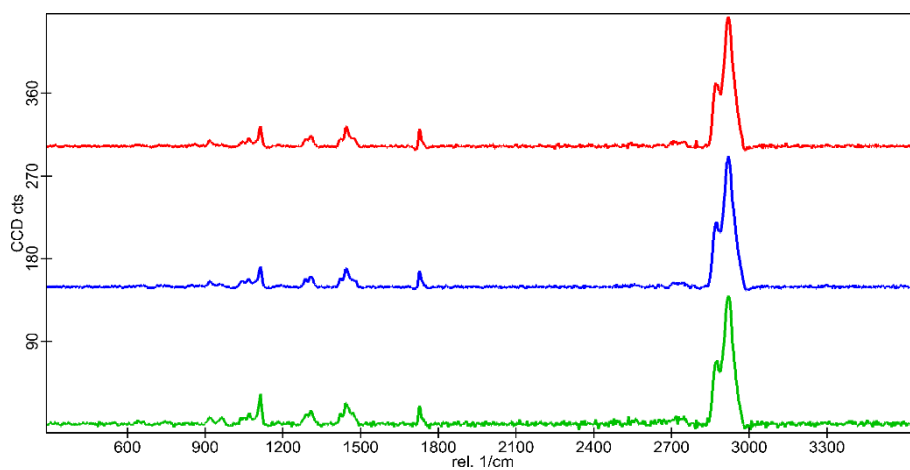
Ryc. S30. Widma punktowe próbki PCAP40s



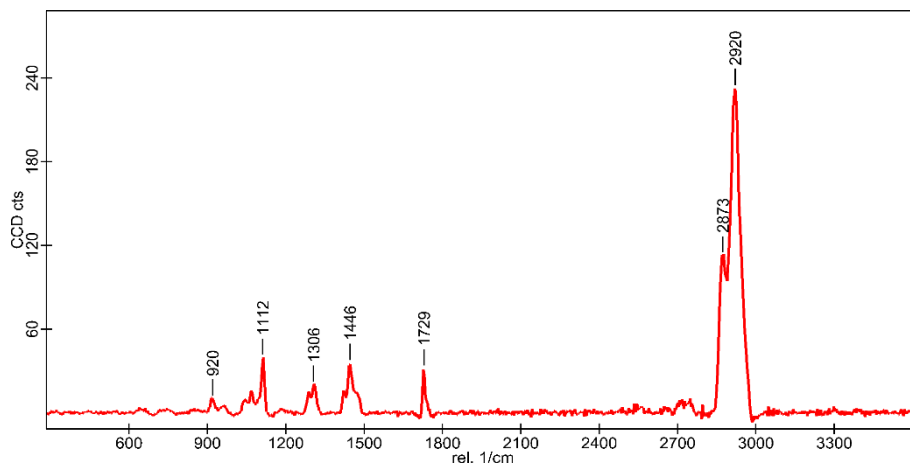
Ryc. S31. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PCAP40s



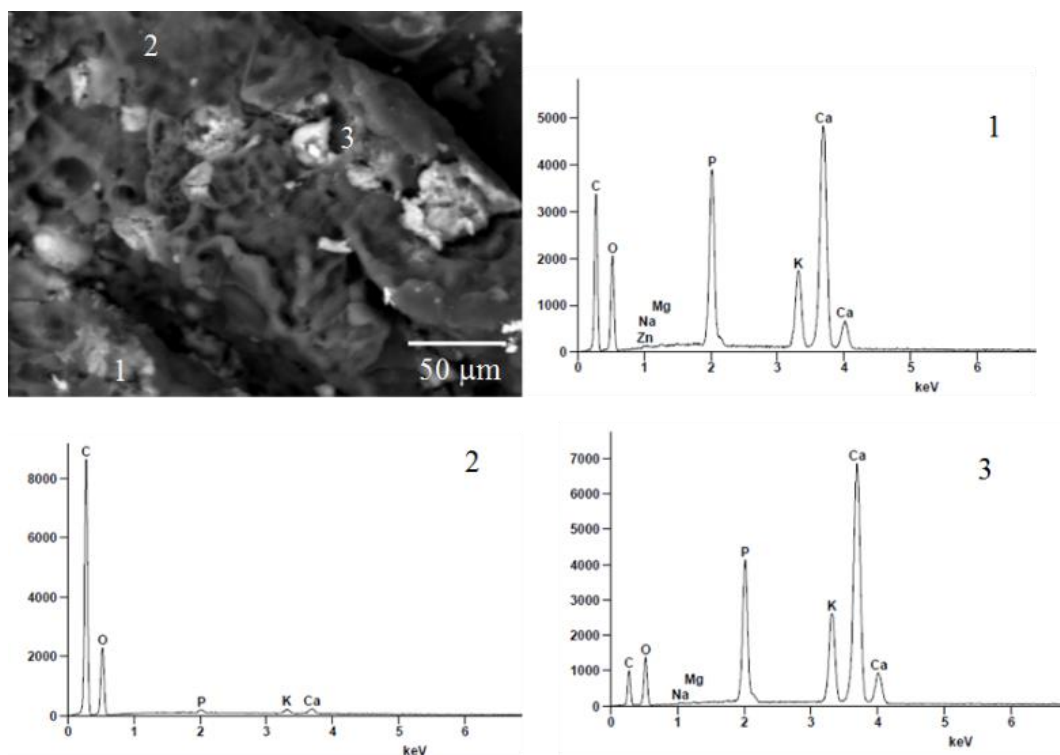
Ryc. S32. Fotografia mikroskopowa próbki PCAP60s z zaznaczonymi miejscami pomiaru widm punktowych



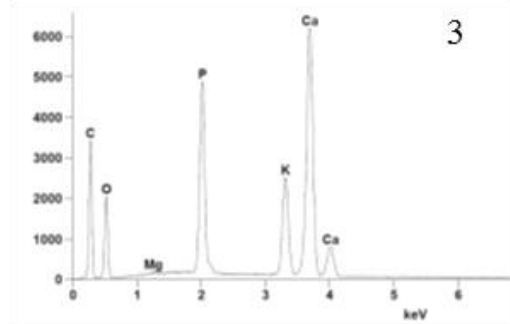
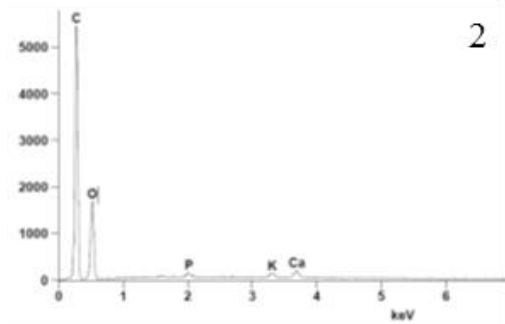
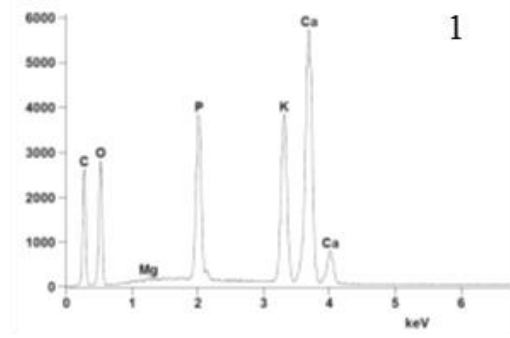
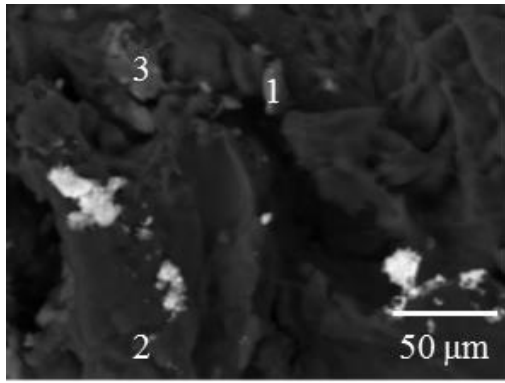
Ryc. S33. Widma punktowe próbki PCAP60s



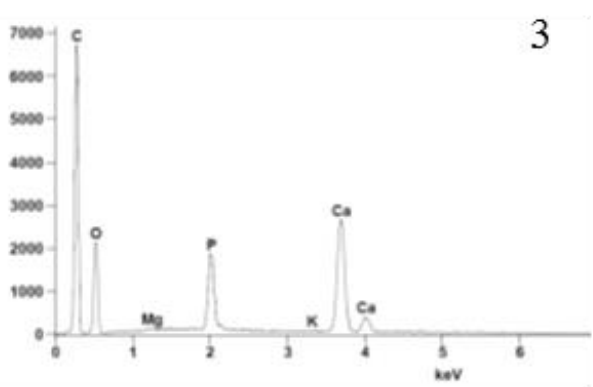
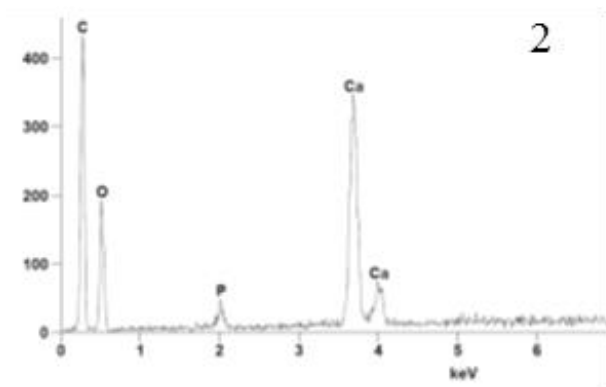
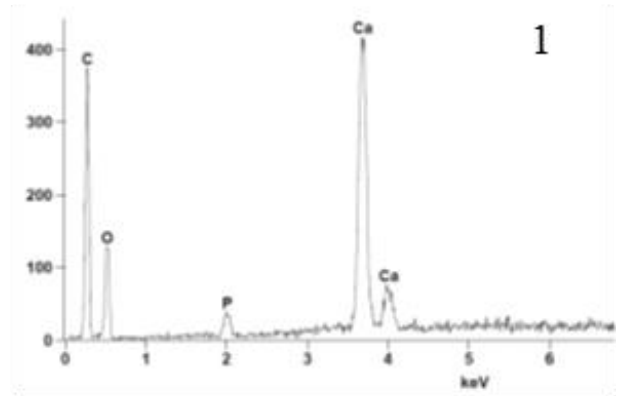
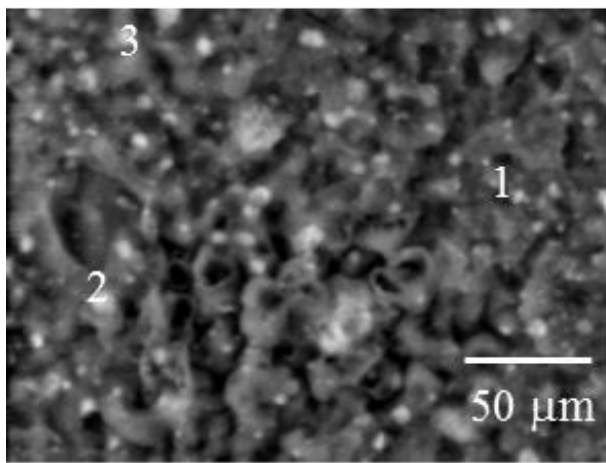
Ryc. S34. Uśrednione widmo ramanowskie próbki PCAP60s



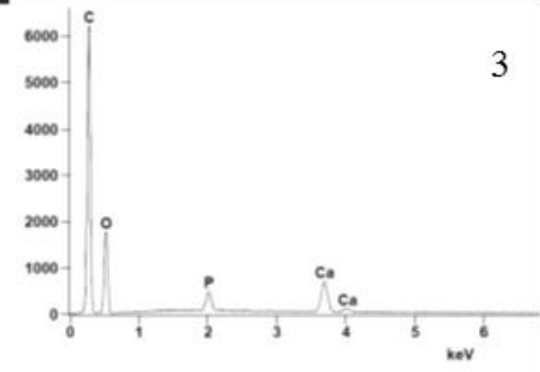
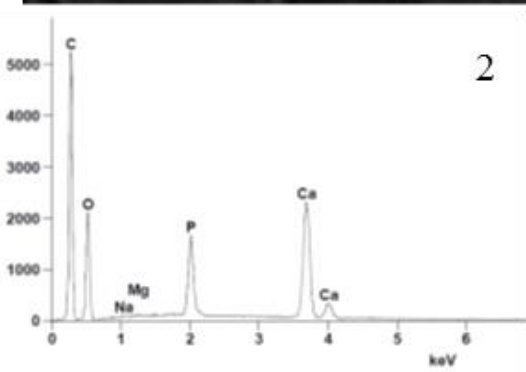
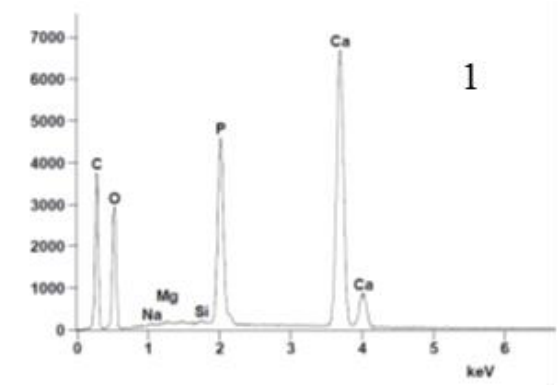
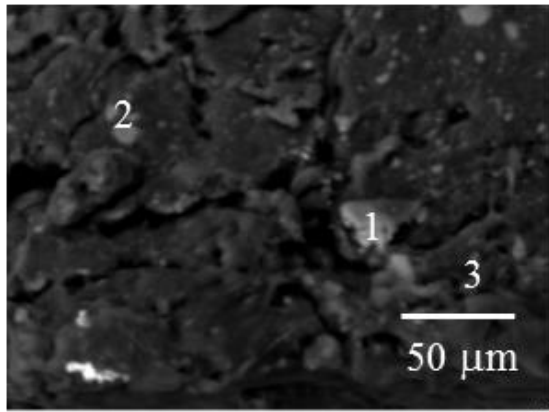
Ryc. S35 Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PLLA12.



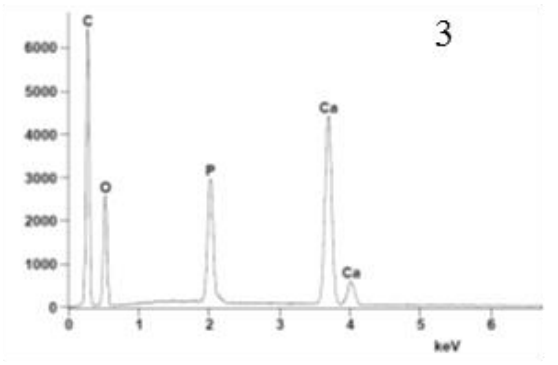
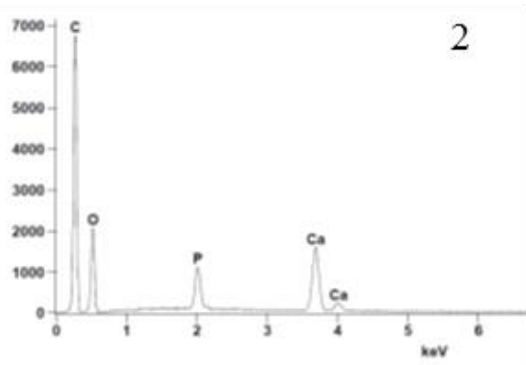
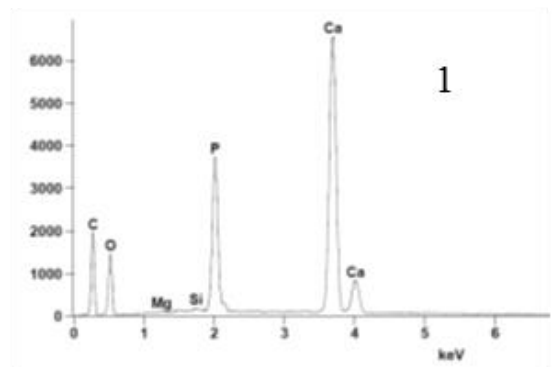
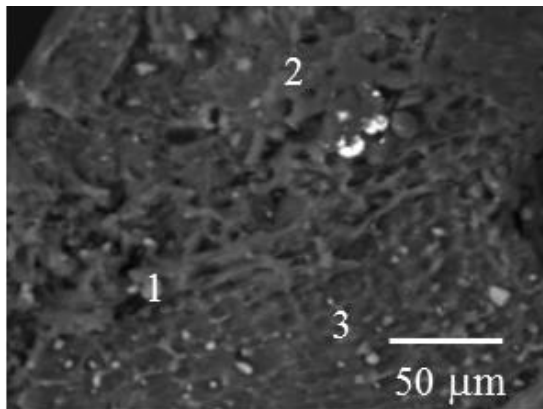
Ryc. S36. Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PLLA12S.



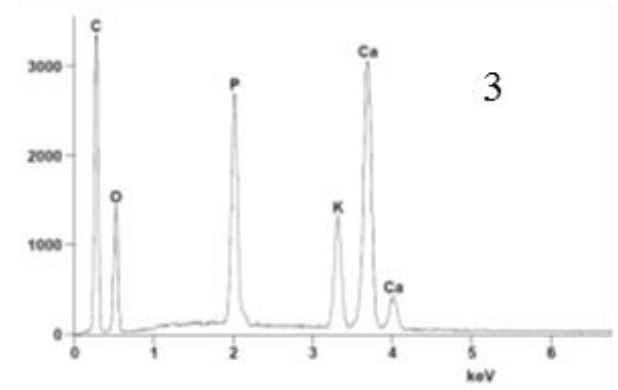
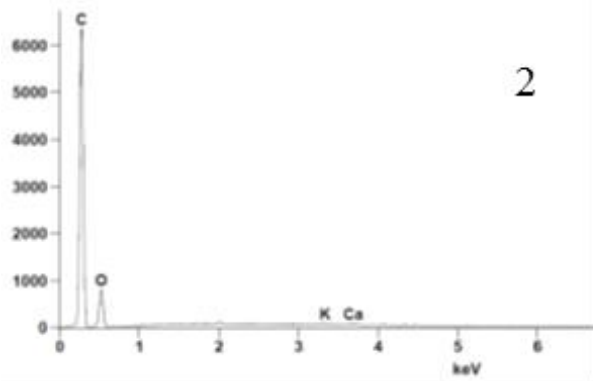
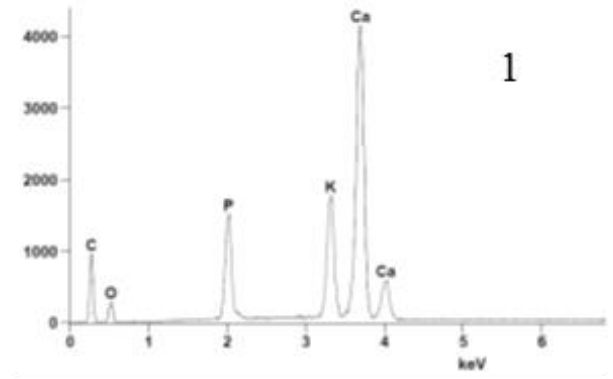
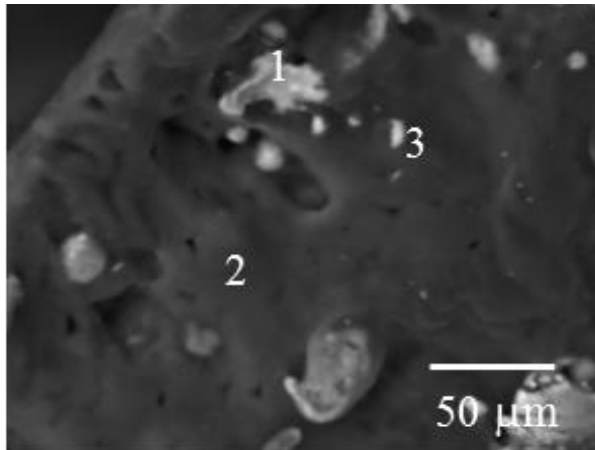
Ryc. S37 Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PLLA12S.



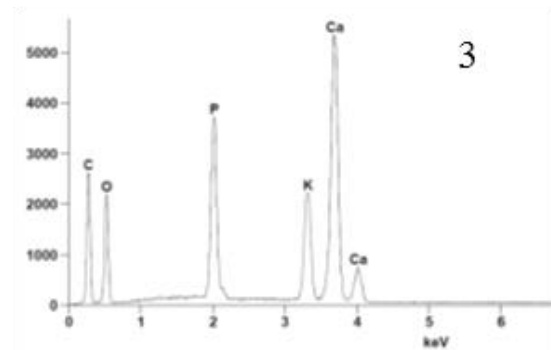
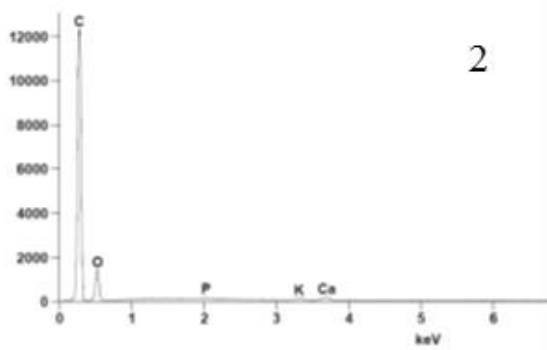
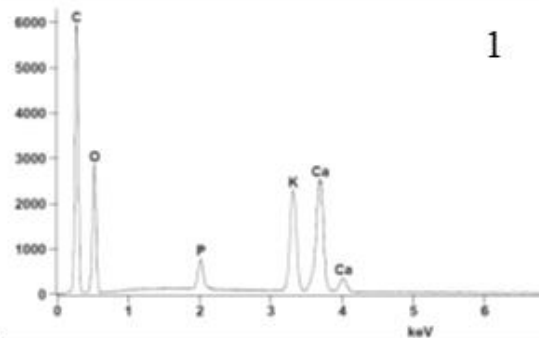
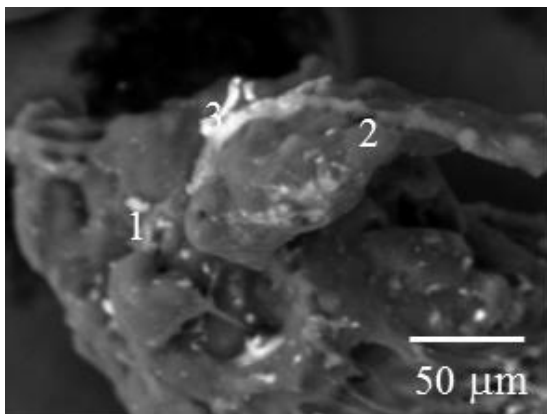
Ryc. S38 Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PLLA40.



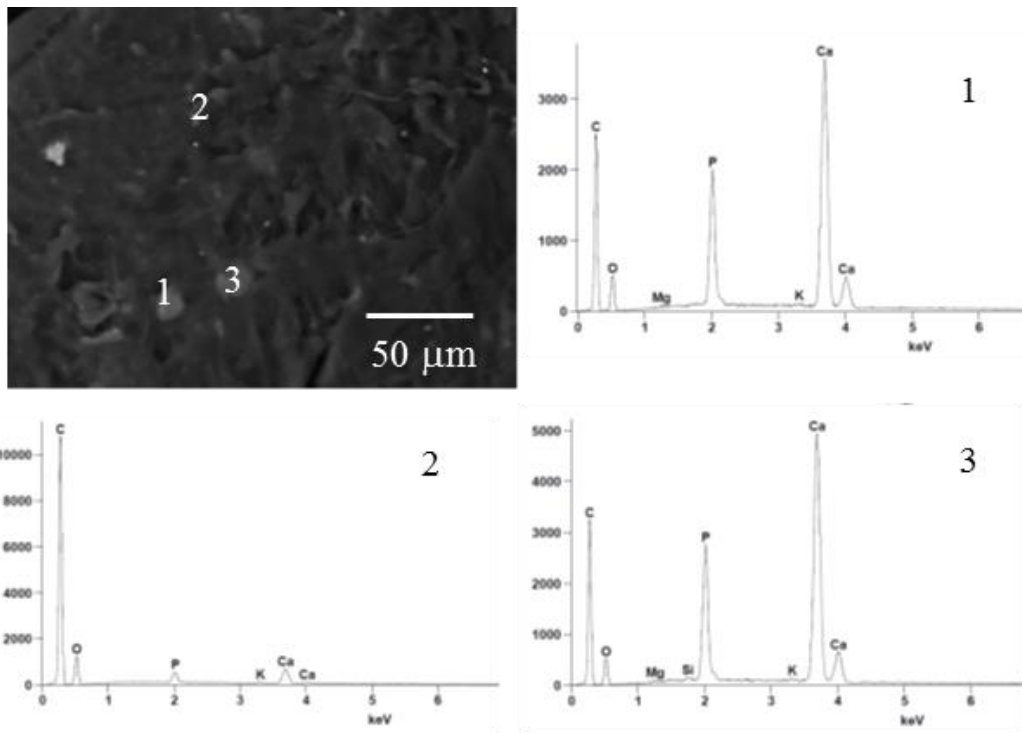
Ryc. S39 Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PLLA60.



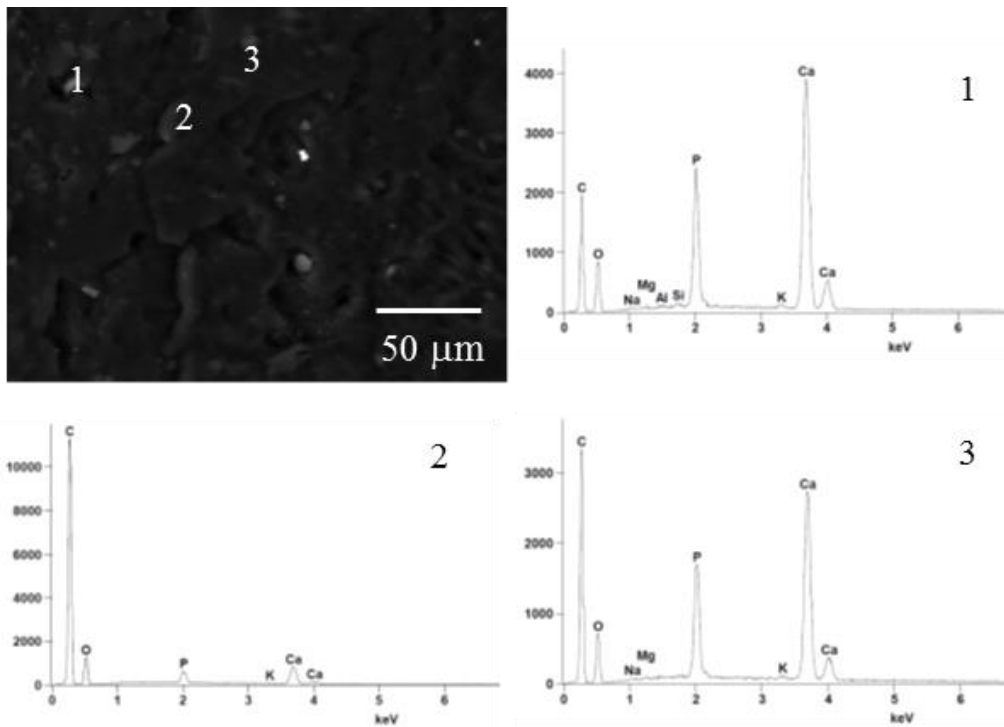
Ryc. S40. Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PCAP12.



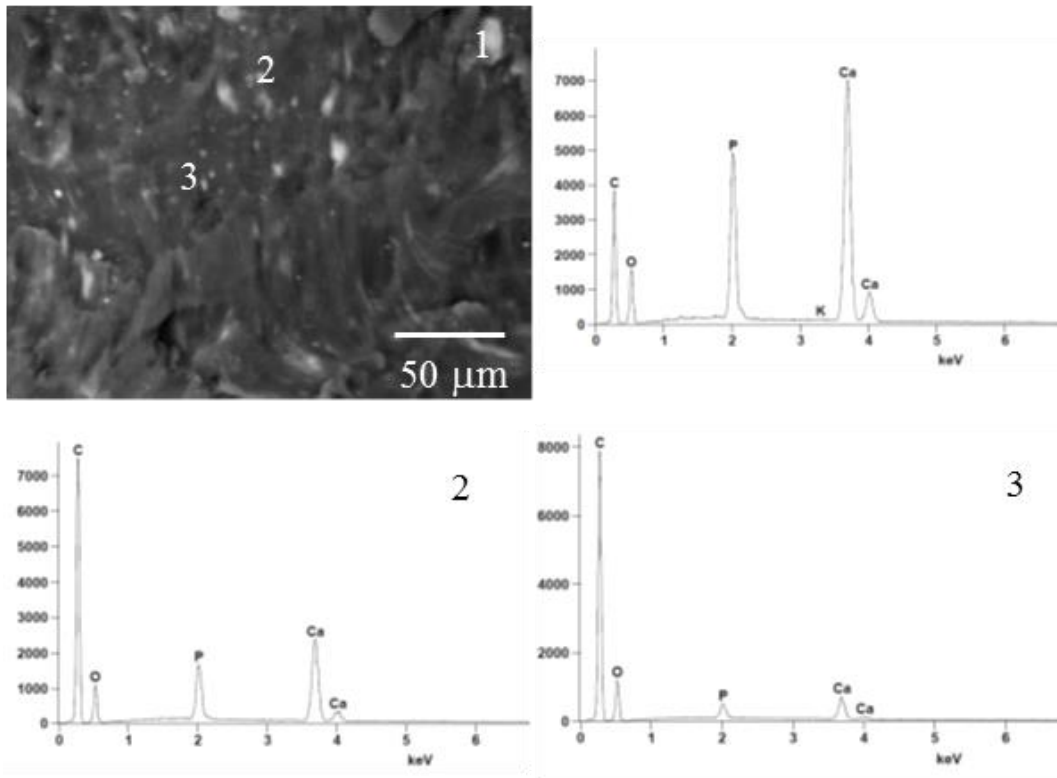
Ryc. S41. Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PCAP12S.



Ryc. S42. Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PCAP20.



Ryc. S43. Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PCAP40.



Ryc. S44. Analiza SEM/EDX powierzchni przelomów dla PCAP60.