



POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii i Technologii Polimerów

Załącznik 3

do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

dr inż. Agnieszka Anna Gadomska-Gajadhur

Warszawa 2020

SPIS TERŚCI

1. Dane osobowe	5
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne	5
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	6
4. Działalność naukowo-badawcza	6
4.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.....	6
4.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	7
5. Osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego	7
5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	7
5.2. Publikacje naukowe oraz inne prace będące podstawą osiągnięcia naukowego	8
5.3. Wprowadzenie	16
5.4. Cel badawczy	24
5.5. Regeneracja tkanki chrzęstnej.....	25
5.5.1. Skafoldy otrzymywane metodą suchej inwersji faz.....	26
5.5.2. Skafoldy otrzymywane metodą „freeze extraction”	28
5.5.3. Skafoldy otrzymywane metodą mokrej inwersji faz.....	29
5.5.4. Skafoldy otrzymywane oryginalną metodą „włókninową”	31
5.5.5. Porównanie właściwości otrzymanych skafoldów.....	33
5.6. Regeneracja tkanki kostnej	34
5.6.1. Opracowanie substytutu kości gąbczastej.....	36
5.6.2. Optymalizacja procesu z wykorzystaniem matematycznych metod planowania eksperymentu	38
5.6.3. Modyfikacja właściwości substytutu kości.....	39
5.6.4. Biomineralizacja substytutu kostnego	42
5.6.5. Porównanie właściwości otrzymanych substytutów kości gąbczastej	43
5.6.6. Zapotrzebowanie na wyniki.....	44
5.7. Inne materiały do regeneracji tkanek	44
5.8. Podsumowanie	46
5.9. Przyszłe cele badawcze.....	48
6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	49
7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	51
7.1. Osiągnięcia dydaktyczne.....	51
7.2. Osiągnięcia organizacyjne	54
7.3. Popularyzacja nauki	55

8. Informacje dodatkowe.....	55
8.1. Uzyskane patenty	55
8.2. Zgłoszenia patentowe.....	56
8.3. Know-how.....	57
8.4. Wdrożenia	57
8.5. Doświadczenie zdobyte poza Uczelnią	57
8.6. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych.....	58
8.7. Aktywność recenzencka.....	58
8.8. Referaty na międzynarodowych i krajowych konferencjach	58
8.9. Międzynarodowe i krajowe nagrody	58
8.10. Projekty badawcze	59
9. Podsumowanie dorobku naukowego i wskaźniki bibliometryczne.....	61

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Agnieszka Anna Gadomska-Gajadhur
Nazwisko rodowe: Gadomska
ORCID: 0000-0001-7686-1745
Scopus ID: 57193241191

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

2010–2014: Studia doktoranckie

Politechnika Warszawska Wydział Chemiczny,
Laboratorium Procesów Technologicznych

dziedzina: Nauki Chemiczne

dyscyplina: Technologia Chemiczna

temat: „Technologia otrzymywania polilaktydu do zastosowań
biomedycznych”

promotor: prof. dr hab. inż. Ludwik Synoradzki

recenzenci:

prof. dr hab. inż. Zbigniew Florjańczyk (Wydział Chemiczny PW)

prof. dr hab. inż. Jacek Gawroński (Wydział Chemiczny Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza w Poznaniu)

2012–2013: Studia podyplomowe

Kolegium Nauk Społecznych i Ekonomicznych Polskiej Akademii
Nauk,

kierunek: Praktyczne metody statystyczne

Ukończone z oceną bardzo dobrą,

2005–2010: Jednolite studia magisterskie

Politechnika Warszawska Wydział Chemiczny,

Zakład Technologii i biotechnologii środków Leczniczych

kierunek: technologia chemiczna, specjalizacja Technologia Związków Biologicznie Czynnych i Kosmetyków

temat: „Kinetyczny rozdział 2-(1-metylo-2-pirolidyno)etanolu z wykorzystaniem lipaz.”

promotor: prof. PW dr hab. inż. Zbigniew Ochal

recenzent: prof. dr hab. inż. Antoni Kunicki (Wydział Chemiczny PW)

Ukończone z oceną bardzo dobrą.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

1.11.2016– Adiunkt naukowo-dydaktyczny na Wydziale Chemicznym Politechniki
chwili obecnej Warszawskiej

1.04.2014– Pracownik naukowo-techniczny (stanowisko: samodzielny technolog)
31.10.2016 w Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w ramach projektu badań stosowanych PBS2/A1/14/2014 „*Chemia i technologia chiralnych kwasów dikarboksylowych i ich pochodnych*”

15.11.2010– Pracownik naukowo-techniczny (stanowisko: samodzielny technolog)
30.09.2013 w Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w ramach projektu POIG 01.01.02-10-025/09 „*Technologia otrzymywania biodegradowalnych poliestrów z wykorzystaniem surowców odnawialnych*”

4. Działalność naukowo-badawcza

4.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Moje zainteresowania naukowe zawsze skupiały się wokół badań o charakterze praktycznym/aplikacyjnym. W swojej pracy magisterskiej opracowywałam nową, chemoenzymatyczną metodę syntezy (2-(1-metylo-2-pirolidyno)etanolu) półproduktu do wytwarzania popularnego leku antyhistaminowego – Klemastyny®. W pracach badawczych wykorzystywałam kinetyczny rozdział enancjomerów katalizowany przez lipazy.

Moja praca doktorska pt. „Technologia otrzymywania polilaktydu do zastosowań biomedycznych” również dotyczyła aspektów aplikacyjnych. Prowadziłam badania syntezy

biozgodnych katalizatorów do polimeryzacji laktydu. Kolejną część badań dotyczyła syntezy proleków wielkocząsteczkowych na bazie popularnych API o działaniu przeciwwzapalnym (paracetamol i kwas gentyzynowy); antyseptycznym (kwas 4-sulfamoiobenzoesowy, chlorofenezyna i 8-hydroksychinolina) oraz przeciwgruźliczym (kwas 4-aminosalicylowy). Prowadziłam badania enkapsulacji tych substancji do nanosfer polilaktydowych. Użyteczność otrzymanych form leku sprawdzałam w badaniach mikrobiologicznych z wykorzystaniem szczepów bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, drożdży *Candida albicans* i grzybów strzępkowych *Aspergillus Niger*, *Colletotrichum coccodis*, *Fusarium oxysporum* i *Fusarium sambucinum*. W ramach współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie zbadałam aktywność otrzymanych form terapeutycznych zawierających kwas 4-aminosalicylowy wobec prątków gruźlicy.

4.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora prowadziłam badania dotyczące wykorzystania poliestrów do regeneracji tkanek słabo ukrwionych (tkanki chrzęstnej i kostnej). We współpracy z wieloma naukowcami, weterynarzami oraz lekarzami, skupiłam się na opracowywaniu biodegradowalnych implantów do regeneracji tkanek. W ramach tych prac powstało 28 artykułów, 21 rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych, 6 patentów oraz 8 zgłoszeń patentowych.

W 2017 roku nawiązałam współpracę z czołowym polskim producentem kosmetyków kolorowych (Bell PPHU, Józefów). W ramach tej współpracy pełnię rolę opiekuna dwóch doktoratów wdrożeniowych oraz prowadzę badania nad nowymi produktami i technologiami dedykowanymi kosmetykom kolorowym. Współpraca przyczyniła się do powstania 6 artykułów naukowych. W 2020 r planowane jest pierwsze wdrożenie wyników naszych prac do produkcji przemysłowej.

Poza głównym obszarem zainteresowania, przedstawionym dotychczas, równolegle prowadziłam prace w ramach innych projektów badawczych realizowanych w naszym zespole. Wyniki prac prowadzonych po uzyskaniu stopnia doktora (lata 2015–2020) są przedmiotem łącznie 46 artykułów naukowych (41 opublikowanych i 5 w recenzji), 28 monografii pokonferencyjnych, 12 patentów, 9 zgłoszeń patentowych i 84 wystąpień konferencyjnych. Szczegółową listę dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora przedstawiam w **Załączniku 4**.

5. Osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Biodegradowalne, porowate materiały do regeneracji tkanki chrzęstnej i kości gąbczastej”

5.2. Publikacje naukowe oraz inne prace będące podstawą osiągnięcia naukowego

Dorobek będący przedmiotem postępowania habilitacyjnego stanowi 15 oryginalnych artykułów (A1-15), 7 rozdziałów w monografiach (B1-7) oraz 6 przyznanych patentów (P1-6). Wszystkie te prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora w latach 2015–2020. Sumaryczny IF wynosi **34,162**, natomiast liczba punktów MNiSW₂₀₁₈₋₂₀₁₉ = **1870** (zgodnie z rokiem opublikowania =1 765).

* podano punktację MNiSW z roku opublikowania pracy oraz ujednoliconą punktację MNiSW 2018/19

(☒ - oznacza autora korespondencyjnego)

[A1]	A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u> [☒] , I. Rykaczewska, P. Ruśkowski, J. Dulnik, L. Synoradzki, Influence of liquid pore precursors on morphology and mechanical properties of cells scaffolds obtained by dry inversion phase method . Journal of Biomedical Materials Research Part B. Applied Biomaterials 2019, 107(4), 1079–1087. IF ₂₀₁₉ = 2,831 MNiSW ₂₀₁₉ = 140 pkt <i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie metodyki badawczej, wykonanie analizy wyników, ocena statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i> <i>wkład habilitantki 55%</i>
[A2]	A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u> [☒] , P. Ruśkowski, A. Chwojnowski, L. Synoradzki, Otrzymywanie polilaktydowych rusztowań komórkowych o strukturze gąbczastej – badania wstępne i optymalizacja . Polimery 2017, 62(2), 118–126. IF ₂₀₁₇ = 0,713 MNiSW ₂₀₁₇ = 15 pkt MNiSW ₂₀₁₉ = 40 pkt <i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy statystycznej wyników, opracowanie wyników doświadczalnych i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i> <i>wkład habilitantki 55%</i>
[A3]	A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u> [☒] , J. Dulnik, I. Rykaczewska, P. Ruśkowski, A. Sebai, L. Synoradzki Ocena właściwości użytkowych rusztowań komórkowych o strukturze gąbczastej oraz wzrostu na nich fibroblastów . Polimery 2018, 63(4), 270–274. IF ₂₀₁₈ = 1,121 MNiSW ₂₀₁₈ = 40 pkt <i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie metodyki badań, opracowanie procedury laboratoryjnej wytwarzania skafoldów, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i> <i>wkład habilitantki 50%</i>

[A4]	<p>A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], J. Dulnik, P. Ruśkowski, The influence of the molecular weight of polymer on the morphology, functional properties and L929 fibroblasts growth on polylactide membranes for tissue engineering. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials 2020, opublikowany online DOI: 10.1080/00914037.2020.1798440</p> <p>IF₂₀₁₈= 1,982 MNiSW₂₀₁₈= 70 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, synteza polimerów do wytworzenia skafoldów, wyznaczenie temperatur charakterystycznych i stopnia krystalizacji polimerów, opracowanie wyników doświadczalnych, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 70%</i></p>
[A5]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, L. Synoradzki, P. Ruśkowski[✉], Poly(Lactic Acid) (PLA) for biomedical application – synthesis of biocompatible Mg catalyst and optimization of its use in polymerization of lactide with aid of DOE. Organic Process Research & Development 2018, 22(9), 1167–1173.</p> <p>IF₂₀₁₈= 3,327 MNiSW₂₀₁₈= 100 pkt</p> <p><i>zaplanowanie badań optymalizacyjnych, synteza polimerów, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie części manuskryptu artykułu.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 35%</i></p>
[A6]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, Paweł Ruśkowski[✉], Biocompatible catalysts for lactide polymerization – catalyst activity, racemization effect and optimization of the polymerization based-on Design of Experiments. Organic Process Research & Development 2020, 24(8), 1435–1442.</p> <p>IF₂₀₁₉= 3,023 MNiSW₂₀₁₉= 100 pkt</p> <p><i>zaplanowanie badań optymalizacyjnych, synteza polimerów, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie części manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 40%</i></p>
[A7]	<p>A. Kruk[✉], <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, P. Ruśkowski, A. Chwojnowski, J. Dulnik, L. Synoradzki, Preparation of biodegradable semi-permeable membranes as 3D scaffolds for cell cultures. Desalination and Water Treatment 2017, 64, 317–323.</p> <p>IF₂₀₁₇= 1,383 MNiSW₂₀₁₇= 20 pkt MNiSW₂₀₁₉= 100 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 55%</i></p>

[A8]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], A. Kruk, P. Ruśkowski, P. Sajkiewicz, J. Dulnik, A. Chwojnowski, Original method of imprinting pores in scaffolds for tissue engineering. Polymers For Advanced Technologies 2020, opublikowany online, DOI: 10.1002/pat.5091</p> <p>IF₂₀₁₉= 2,578 MNiSW₂₀₁₉= 70 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie badań wytrzymałościowych, analiza nasiąkliwości masowej rusztowań, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 60%</i></p>
[A9]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], A. Kruk, J. Dulnik, A. Chwojnowski, New polyesters biodegradable scaffolds for chondrocytes culture – preparation, properties and biological activity. Journal of Applied Polymer Science 2020, opublikowany online DOI: 10.1002/app.50089</p> <p>IF₂₀₁₉= 2,520 MNiSW₂₀₁₉= 70 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, opracowanie procedury laboratoryjnej wykonania skafoldów, analiza wyników hodowli komórkowych, wykonanie analizy pomiarów wytrzymałościowych, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 65%</i></p>
[A10]	<p>M. Budnicka, J. Trzaskowska, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], P. Ruśkowski, L. Synoradzki, Preparation of polylactide scaffolds for cancellous bone regeneration – preliminary investigation and optimization of the process. Pure Applied Chemistry 2019, 91(9), 1509–1519.</p> <p>IF₂₀₁₉= 1,919 MNiSW₂₀₁₉= 140 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników i ich interpretacja, przeprowadzenie badań optymalizacyjnych, obliczenie modeli matematycznych procesów, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 50%</i></p>
[A11]	<p>M. Budnicka, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], P. Ruśkowski, Manufacturing of substitutes for spongy bone with increased absorbability. Chemical And Process Engineering – Inżynieria Chemiczna i Procesowa 2019, 40(4), 411–423.</p> <p>IF₂₀₁₉= 0,759 MNiSW₂₀₁₉=40 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, sporządzenie przeglądu literatury, opracowanie metod analitycznych, opracowanie procedury laboratoryjnej wprowadzania dodatków, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 60%</i></p>

<p>[A12]</p>	<p>M. Budnicka, D. Kołbuk, P. Ruśkowski, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], Poly-L-lactide scaffolds with super pores obtained by freeze-extraction method. Journal of Biomedical Materials Research Part B – Applied Biomaterials 2020, 108(8), 3162–3173.</p> <p>IF₂₀₁₉= 2,831 MNiSW₂₀₁₉= 140 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, sporządzenie przeglądu literatury, opracowanie metod analitycznych, opracowanie procedury laboratoryjnej wprowadzania dodatków, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 51%</i></p>
<p>[A13]</p>	<p>M. Budnicka, M. Szymaniak, D. Kołbuk, P. Ruśkowski, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], Biom mineralization of poly-L-lactide spongy bone scaffolds obtained by freeze-extraction method. Journal of Biomedical Materials Research Part B – Applied Biomaterials 2020, 108(3), 868–879.</p> <p>IF₂₀₁₉= 2,831 MNiSW₂₀₁₉=140 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, opracowanie nowej procedury biomineralizacji, przygotowanie metod badania składu powłoki, wykonanie analizy wyników i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 51%</i></p>
<p>[A14]</p>	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], M. Wrzecionek, G. Matyszczyk, P. Piętowski, M. Więclaw, P. Ruśkowski, Optimization of poly(glycerol sebacate) synthesis for biomedical purposes with the Design of Experiments. Organic Process Research & Development 2018, 22(12), 1793–1800.</p> <p>IF₂₀₁₈= 3,327 MNiSW₂₀₁₈= 100 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników i ich interpretacja, przeprowadzenie modelowania matematycznego, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 45%</i></p>
<p>[A15]</p>	<p>G. Matyszczyk, M. Wrzecionek, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>[✉], P. Ruśkowski, Kinetics of polycondensation of sebacic acid with glycerol. Organic Process Research & Development 2020, 24(6) 1104–1111.</p> <p>IF₂₀₁₉= 3,023 MNiSW₂₀₁₉= 100 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 40%</i></p>

[B1]	<p>A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, P. Ruśkowski, Zastosowanie bioresorbowalnych rusztowań w inżynierii tkankowej, w: Nowoczesne trendy w medycynie, red. Olszówka M., Maciąg K., Wydawnictwo Tygiel, Lublin 2015, s. 91–102, ISBN 978-83-65272-10-2.</p> <p>MNiSW₂₀₁₅= 5 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie przeglądu literatury, wykonanie analizy wyników literaturowych, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 60%</i></p>
[B2]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, A. Kruk, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, Wpływ dodatku porofora na morfologię skafoldów polilaktydowych, w: Modyfikacja Polimerów. Stan i perspektywy w roku 2015, red. Steller R., Żuchowska D., Wydawnictwo TEMPO s.c., Wrocław 2015, s. 94–97, ISBN 978-83-86520-22-0.</p> <p>MNiSW₂₀₁₅=5 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników, wykonanie obrazów SEM otrzymanych skafoldów, przygotowanie manuskryptu artykułu, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 65%</i></p>
[B3]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, P. Ruśkowski, K. Łojek, A. Kruk, K. Wierzchowski, M. Pilarek, Biodegradowalne, polimerowe rusztowania komórkowe do proliferacji chondrocytów, w: Modyfikacja Polimerów. Stan i perspektywy w roku 2019, Wydawnictwo TEMPO s.c., Wrocław 2019, s. 210–213, ISBN 978-83-86520-24-4.</p> <p>MNiSW₂₀₁₉= 5 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przeprowadzenie sterylizacji rusztowań, analiza właściwości mechanicznych przed i po sterylizacji, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 65%</i></p>
[B4]	<p>A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, P. Ruśkowski, K. Łojek, U. Stodulska, L. Synoradzki, The influence of the classic pore precursors on the morphology of polyesters membranes for tissue engineering, w: EYEC 2017 - 6th European Young Engineers Conference, red. Nowak B., Werner Ł., Wierzbę P., Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Warszawa 2017, s. 87–99, ISBN 978-83-936575-4-4.</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, opracowanie wyników doświadczalnych, wykonanie analizy statystycznej wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 65%</i></p>

[B5]	<p>A. Kruk, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, P. Ruśkowski, Modyfikacja powierzchni membran półprzepuszczalnych przeznaczonych do hodowli komórkowych, w: Postępy w naukach technicznych i informatycznych oraz współczesne metody nauczania, red. Szala M., Czyż Z., Wydawnictwo Tygiel, Lublin 2016, s. 106–122, ISBN 978-83-65598-21-9.</p> <p>MNiSW₂₀₁₅=5 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie przeglądu literatury, wybór czynników modyfikujących powierzchnię, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 55%</i></p>
[B6]	<p>M. Budnicka, J. Mazurek, M. Szymaniak, <u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, Otrzymywanie porowatych, biodegradowalnych implantów kości gąbczastej z polilaktydu, w: Biomedycyna i zagadnienia pokrewne tom 1, red. Danielewska A., Wrzyszczyk B., Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o., Lublin 2019, s. 66–79, ISBN 978-83-65932-69-3.</p> <p>MNiSW₂₀₁₉=5 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, opracowanie procedury laboratoryjnej otrzymywania substytutów, wyznaczenie wpływu poroforów, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 55%</i></p>
[B7]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, M. Budnicka, P. Ruśkowski, Dynamiczny substytut kości gąbczastej, w: Modyfikacja Polimerów. Stan i perspektywy w roku 2019, Wydawnictwo TEMPO s.c., Wrocław 2019, s. 23–27, ISBN 978-83-86520-24-4.</p> <p>MNiSW₂₀₁₉= 5 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników, konsultacja założeń z lekarzami, przygotowanie manuskryptu artykułu, pozyskanie środków na badania.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 60%</i></p>
[P1]	<p><u>A. Gadomska-Gajadhur</u>, P. Ruśkowski, A. Kruk, L. Synoradzki, A. Chwojnowski, Sposób wytwarzania trójwymiarowych rusztowań polilaktydowych, PL 229497, zgłoszenie 2015, przyznany 2018.*</p> <p>MNiSW₂₀₁₈=75 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie treści zgłoszenia patentowego, opracowanie zastrzeżeń patentowych, dyskusja z rzecznikiem patentowym.</i></p> <p><i>wkład habilitantki 28% (zgodnie z wnioskiem złożonym do Urzędu Patentowego RP)</i></p> <p>* Tytuł patentu został zmieniony przez rzecznika patentowego, pierwotne brzmienie tytułu: „Sposób wytwarzania trójwymiarowych polilaktydowych dwuwarstwowych skafoldów do hodowli ekwiwalentów skóry”</p>

<p>[P2]</p>	<p>A. Gadomska-Gajadhur, A. Kruk, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, A. Sebai, I. Rykaczewska, M. Łabęcka, Sposób wytwarzania dwufunkcyjnych polilaktydowych skafoldów przeznaczonych do hodowli komórkowych, PL 234640, zgłoszenie 2018, przyznany 2020.</p> <p>MNiSW₂₀₁₈=75 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie stanu techniki, przygotowanie treści zgłoszenia patentowego, dyskusja z rzecznikiem patentowym,</i></p> <p><i>wkład habilitantki 26% (zgodnie z wnioskiem złożonym do Urzędu Patentowego RP)</i></p>
<p>[P3]</p>	<p>A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, A. Kruk, L. Synoradzki, A. Chwojnowski, Sposób wytwarzania polilaktydowych skafoldów gąbczastych do hodowli nabłonka walcowatego, PL 230136, zgłoszenie 2015, przyznany 2018.</p> <p>MNiSW₂₀₁₈=75 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, dyskusja z recenzentami, pozyskanie środków na badania,</i></p> <p><i>Wkład habilitantki 28% (zgodnie z wnioskiem złożonym do Urzędu Patentowego RP)</i></p>
<p>[P4]</p>	<p>A. Gadomska-Gajadhur, A. Kruk, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, A. Chwojnowski, E. Łukowska, C. Wojciechowski, J. Dulnik, P. Denis, P. Sajkiewicz, Sposób otrzymywania szerokoporowatego, poliestrowego rusztowania komórkowego, PL 228884, zgłoszenie 2015, przyznany 2018.**</p> <p>MNiSW₂₀₁₈=75 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników, przygotowanie treści zgłoszenia patentowego, dyskusja z rzecznikiem patentowym</i></p> <p><i>wkład habilitantki 11% (zgodnie z wnioskiem złożonym do Urzędu Patentowego RP)</i></p> <p>**Tytuł patentu został zmieniony przez rzecznika patentowego, pierwotne brzmienie tytułu: „Szerokoporowate rusztowanie komórkowe typu 3D z poliestrów i sposób jego otrzymywania”</p>
<p>[P5]</p>	<p>A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, J. Trzaskowska, A. Kruk, M. Budnicka, Sposób wytwarzania dynamicznego substytutu kości gąbczastej, PL 236111, zgłoszenie 2018, przyznany 2020.</p> <p>MNiSW₂₀₁₈=75 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, przygotowanie stanu techniki, wykonanie obrazowania SEM, analiza nasiąkliwości, przygotowanie treści zgłoszenia patentowego, dyskusja z rzecznikiem patentowym</i></p> <p><i>wkład habilitantki 30% (zgodnie z wnioskiem złożonym do Urzędu Patentowego RP)</i></p>

[P6]	<p>A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, M. Wrzcionek, G. Matyszcak, J. Stadnik, K. Jastrzębska, Sposób wytwarzania prepolimeru poli(sebacynianu glicerolu), PL 234639, zgłoszenie 2018, przyznany 2020.***</p> <p>MNiSW₂₀₁₈=75 pkt</p> <p><i>twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie analizy wyników, opracowanie procedury oczyszczania materiału, przygotowanie treści zgłoszenia patentowego, dyskusja z rzecznikiem patentowym pozyskanie środków na badania.</i></p> <p>wkład habilitantki 32% (zgodnie z wnioskiem złożonym do Urzędu Patentowego RP)</p> <p>*** Tytuł patentu został zmieniony przez rzecznika patentowego, pierwotne brzmienie tytułu: „Sposób wytwarzania prepolimeru poli(sebacynianu glicerolu) i metoda jego oczyszczania”</p>
-------------	--

Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w publikacjach [A1-15, B1-7, P1-6] stanowią treść **Załącznika 5** do wniosku.

5.3. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa (ang. *tissue engineering*, *TE*) to interdyscyplinarna dziedzina, która wykorzystuje wiedzę z zakresu nauk przyrodniczych, chemicznych, medycyny oraz inżynierii materiałowej do wytworzenia biologicznych substytutów tkanek i narządów.¹ Zadaniem substytutów (rusztowań, skafoldów) jest odtworzenie, podtrzymanie lub ulepszenie funkcji uszkodzonych/zniszczonych tkanek i narządów.² Głównym zadaniem substytutów jest czasowe zastępowanie naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, *ECM*).³ Jest to niezbędne do wzrostu, proliferacji i różnicowania się komórek do pełnowartościowych tkanek.⁴

Medycyna regeneracyjna wykorzystuje własne zdolności regeneracyjne organizmu, w celu naprawy i przywrócenia normalnej funkcji tkanek.⁵ Obecnie inżynieria tkankowa jest węższym pojęciem, skupia się na rozwoju tkanki poza organizmem.⁶ Opracowano kilka strategii leczenia uszkodzonych tkanek.⁷ Pierwsza, to implantacja izolowanych komórek lub zastosowanie naturalnej macierzy komórkowej (bogatej w kolagen), wytworzonej przez usunięcie komórek z tkanki. Komórki gospodarza zasiedlają rusztowanie po wszczepieniu.⁸ Druga, to dostarczenie czynników indukujących rozwój tkanki (np. czynniki wzrostu).⁹ Trzecia, to umieszczenie komórek w matrycach (podłożach, skafoldach). Naturalne lub syntetyczne podłoża zasiedla się żywymi komórkami i wszczepia do organizmu. Rusztowania (ang. *scaffolds*), odgrywają kluczową rolę w regeneracji tkanek. Definiuje się je jako trójwymiarowe, porowate, biomateriały, zaprojektowane do spełnienia określonych funkcji.¹⁰ Odpowiadają za:

- (1) sprzyjanie interakcji komórka-biomateriał, adhezji komórek, wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej;
- (2) efektywny transport gazów, substancji odżywczych i substancji sygnałowych, w celu umożliwienia przeżycia komórek, różnicowania się i proliferacji (rozmnażania);
- (3) pełnienie funkcji podporowych nowotworzonej tkanki;
- (4) wywołanie minimalnego stanu zapalnego.¹¹

¹ Langer, R. & Vacanti, J. P. *Tissue Engineering*. *Science* **260**, 920 (1993).

² Dziadek, M. & Cholewa-Kowalska, K. Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomed.* **20**, 193 (2015).

³ Mhaske, M., Kedar, P. & Bansode, S. *Tissue engineering: A review*. *Int. J. Adv. Res. Dev.* **2**, 280 (2017).

⁴ O'Brien, F. J. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. *Mater. Today* **14**, 88 (2011).

⁵ Katari, R., Peloso, A. & Orlando, G. *Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, 57 (2015).

⁶ National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. (2018). Available at: https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Tissue_Engineering_Fact_Sheet_Oct_2018.pdf.

⁷ Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, S. *Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review*. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, 1 (2011).

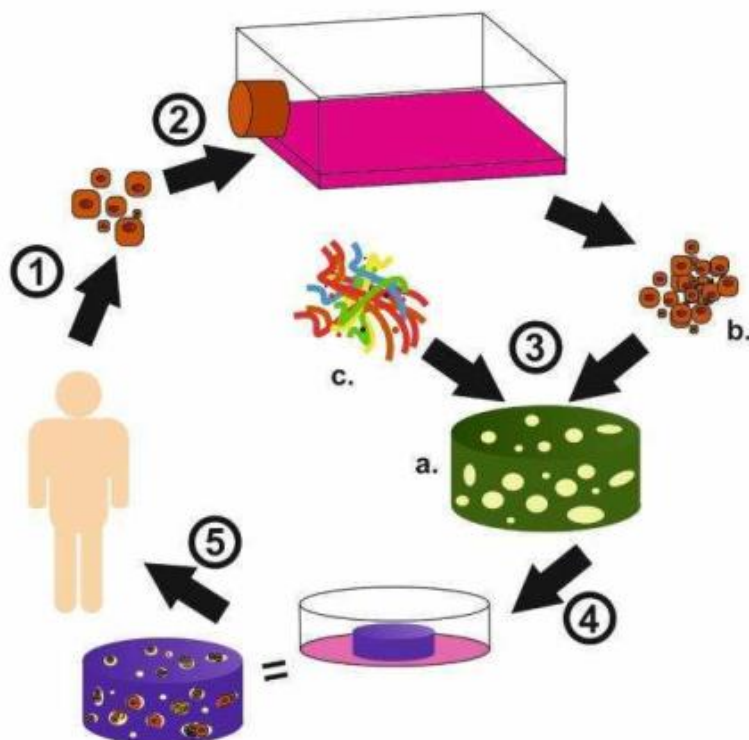
⁸ Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. & Recker, R. *Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. *Instr. Course Lect.* **45**, 371 (1996).

⁹ Do, A., Khorsand, B., Geary, S. M. & Salem, A. K. *3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications*. *Adv. Heal. Mater.* **4**, 1742 (2015).

¹⁰ Jain, A. & Bansal, R. *Applications of regenerative medicine in organ transplantation*. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **7**, 188 (2015).

¹¹ Florencio-Silva, R., Sasso, G., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. & Cerri, P. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors that Influence Bone Cells*. *Biomed Res. Int.* **2015**, 17 (2015).

Rekonstrukcja tkanek w inżynierii tkankowej jest kilkuetapowa. Od pacjenta lub innego dawcy pobiera się fragment tkanki (1). Z tkanki wydziela się komórki i wysiewa na podłożu (2). Wprowadza się substancje przyspieszające proliferację komórek np. czynniki wzrostu (3). Nośnik z komórkami umieszcza się w bioreaktorze w celu namnożenia komórek (4), a następnie w ubytku tkanki (5) (Rysunek 1).¹²



Rysunek 1. Etapy inżynierii tkankowej, a – rusztowanie komórkowe, b – komórki, c – czynniki wzrostu.

Inżynieria tkankowa zakłada, że do prawidłowego przebiegu regeneracji tkanki wymagane są trzy elementy.¹³ Komórki są niezbędne do utworzenia nowej tkanki, biologiczny substytut zastępujący ECM oraz cząsteczki sygnałowe.¹⁴ Cząsteczki sygnałowe odpowiadają za wzrost, różnicowanie i prawidłowy rozwój komórek. Wszystkie te elementy oraz interakcja między nimi są niezbędne do prawidłowej regeneracji tkanki. Często są nazywane triadą inżynierii tkankowej.¹⁵

Obecnie, inżynieria tkankowa skupia się na dwóch strategiach terapeutycznych.¹⁶ Bezpośrednia transplantacja tkanek niesie ze sobą duże ryzyko odrzucenia przeszczepu,

¹² Bianco, P. & Robey, P. G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* **414**, 118 (2001).

¹³ Tatullo, M., Marrelli, M. & Paduano, F. The Regenerative Medicine in Oral and Maxillofacial Surgery: The Most Important Innovations in the Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Med. Sci.* **12**, 72 (2015).

¹⁴ Leiggener, C. S., Curtis, R., Müller, A. A., Pfluger, D., Gogolewski, S. & Rahn, B. A. Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials* **27**, 202 (2006).

¹⁵ Bose, S., Roy, M. & Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* **30**, 546 (2012).

¹⁶ Ficek, K., Filipek, J., Wojciechowski, P., Kopec, K., Stodolak-Zych, E. & Blazewicz, S. A bioresorbable polylactide implant used in bone cyst filling. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 33 (2015).

konieczność terapii immunosupresyjnej oraz ograniczoną liczbę dawców.¹⁷ Pierwsza strategia polega na wszczepianiu substytutów biologicznych bez komórek, które stopniowo będą kolonizowane przez komórki gospodarza. W tym przypadku konieczny jest dodatek substancji wspomagających migrację komórek oraz ich wzrost.¹⁷ Druga strategia, to wszczepienie do organizmu pacjenta rusztowania wraz z komórkami, które są wcześniej pobierane z organizmu dawcy lub biorcy (przeszczep allo- lub autogeniczny). Następnie są namnażane w tradycyjnej hodowli 2D, przenoszone na substytut, gdzie są ponownie namnażane. Tak przygotowany substytut jest wszczepiany w organizm pacjenta. Strategia ta jest najbardziej obiecująca, gdyż zapewnia wszczepienie stabilnego implantu.¹⁸ Nie mniej jednak, hodowla komórek poza organizmem jest czasochłonna.¹⁹

Problemy w regeneracji tkanek

W tkance macierz zewnątrzkomórkowa jest bardzo ważnym elementem. Składa się z formy upostaciowionej (włókna kolagenowe, elastynowe i siateczkowe), formy bezpostaciowej (mieszanka polisacharydów, protein i proteoglikanów)²⁰ oraz płynu tkankowego (roztwór jonów, pierwiastków i związków małocząsteczkowych).²¹ ECM stanowi miejsce przyczepu komórek oraz fizyczny szkielet tkanki, której nadaje wytrzymałość mechaniczną i sprężystość.²² Wraz z uszkodzeniem tkanki ECM ulega zniszczeniu, dlatego konieczne jest jej czasowe zastąpienie.²³

Chrzątka stawowa

Chrzątka stawowa pokrywa powierzchnie stykających się ze sobą kości. Jej główną funkcją jest ochrona kości przed ścieraniem, absorpcja obciążeń, zapewnianie odpowiedniego rozkładu obciążeń oraz amortyzacja ruchów.²⁴ Charakteryzuje się dużą sprężystością i odpornością na ścieranie. Posiada niski współczynnik tarcia (0,01–0,02), który wzrasta ze wzrostem obciążenia. Chrzątka jest zbudowana warstwowo (Rysunek 2). Pierwsza warstwa (łac. *stratum tangentialle*) patrząc od strony jamy stawu stanowi 10% grubości całej chrząstki. Nazywana jest warstwą powierzchniową. Składa się z włókien kolagenowych (typu II, X i XI) ułożonych stycznie do powierzchni stawu oraz komórek, których charakter jest zbliżony do fibroblastów. Zawiera nieduże ilości glikozoaminoglikanów oraz dużo kwasu hialuronowego. Powierzchnia tej warstwy nie

¹⁷ Murphy, C. M., Haugh, M. G. & O'Brien, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 461 (2010).

¹⁸ Vascellari, A., Rebuzzi, E., Schiavetti, S. & Coletti, N. Implantation of matrix-induced autologous chondrocyte (MACT[®]) grafts using carbon dioxide insufflation arthroscopy. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **22**, 219 (2014).

¹⁹ Fernandes, H., Moroni, L., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Extracellular matrix and tissue engineering applications. *J. Mater. Chem.* **19**, 5474 (2009).

²⁰ Kim, Y., Ko, H., Kwon, I. K. & Shin, K. Extracellular matrix revisited: Roles in tissue engineering. *Int. Neurobiol. J.* **20**, 23 (2016).

²¹ Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S. & Demirci, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine* **5**, 469 (2010).

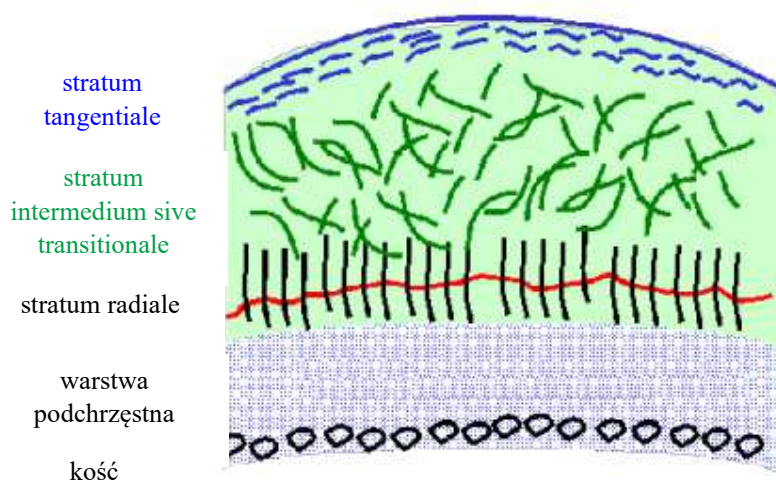
²² Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 4 (2016).

²³ Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* **1**, 461 (2009).

²⁴ Ciszek, B. Morfologia i funkcja chrząstki stawowej. *Acta Clin.* **1**, 10 (2001).

zawiera komórek chondrocytów. W kolejnej warstwie (łac. *stratum intermedium sive transitionale*) (40% grubości chrząstki) znajdują się włókna kolagenowe ułożone skośnie. Dalej znajduje się warstwa (łac. *stratum radiale*), w której włókna kolagenowe przebiegają prostopadle do powierzchni stawu. Najgłębszą warstwą jest zwapniala chrząstka stykająca się bezpośrednio z kością podchrzęstną. Dwie ostatnie warstwy zajmują łącznie 50% grubości chrząstki. Jama stawowa jest wypełniona lepkiem płynnym stawowym pełniącym głównie funkcję ochronną.²⁵ W całej chrząstce chondrocyty zajmują jedynie 1% jej objętości i są zawieszane w ECM. Chondrocyty prowadzą głównie procesy syntezy, katabolizm oraz odpowiadają za ogólną homeostazę chrząstki.²⁶

Chrząstka stawowa nie jest zdolna do samoregeneracji, gdyż nie zawiera ochrzęstnej, która mogłaby ten proces inicjować. Kolejnym problemem jest brak naczyń limfatycznych i żył. Odżywianie chrząstki odbywa się za pośrednictwem dyfuzji od strony jamy stawowej.²⁷



Rysunek 2. Budowa warstwowa chrząstki²⁸

Uszkodzenia chrząstki są dużym problemem zarówno dla lekarzy, jak i pacjentów, ponieważ prowadzą do utrudnienia lub wręcz uniemożliwienia ruchu. Pacjentom często towarzyszy duży ból. Obecnie leczenie chrząstki odbywa się za pomocą metody mikroślamań,²⁹ autologicznego przeszczepu chondrocytów (ang. *autologus cartilage implantation, ACI*)³⁰ i przeszczepu chrząstki.³¹ Metoda mikroślamań polega na wykonaniu

²⁵ Chen, Y.-C., Chen, R.-N., Jhan, H.-J., Liu, D.-Z., Ho, H.-O., Mao, Y., Kohn, J. & Sheu, M.-T. Development and Characterization of Acellular Extracellular Matrix Scaffolds from Porcine Menisci for Use in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* **21**, 971 (2015).

²⁶ Mauck, R. L. & Burdick, J. A. Engineering cartilage tissue. *Tissue Eng. from Lab to Clin.* **60**, 493 (2011).

²⁷ Schulz, R. M. & Bader, A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur. Biophys. J.* **36**, 539 (2007).

²⁸ Kruk, A. Biodegradowalne polimerowe rusztowania przeznaczone do hodowli chondrocytów. *Praca doktorska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej (2018).

²⁹ Mithoefer, K., Williams III, R. J., Warren, R. F., Potter, H. G., Spock, C. R., Jones, E. C., Wickiewicz, T. L. & Marx, R. G. The Microfracture Technique for the Treatment of Articular Cartilage Lesions in the Knee. *J. Bone Jt. Surg. Am.* **87**, 1911 (2005).

³⁰ Niemeyer, P., Albrecht, D., Andereya, S., Angele, P., Ateschrang, A., Aurich, M., Baumann, M., Bosch, U., Erggelet, C., Fickert, S. & Gebhard, H. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group „Clinical Tissue Regeneration” of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). *Knee* **23**, 426 (2016).

mikronawierceń/mikrouszkodzeń w kości podchrzęstnej. Komórki macierzyste są uwalniane ze szpiku, a następnie przekształcają się w naturalnym procesie w chondrocyty. Wadą tej metody jest powstawanie głównie niepożądanego chrząstki włóknistej.³² W Polsce technika mikroślamań jest zdecydowanie częściej stosowana niż wszystkie inne techniki razem. Jej zalety to: niski koszt i krótki czas operacji oraz jednoetapowość (nie wymaga wykonania kolejnej operacji). Metoda nie powinna być jednak stosowana w przypadku ubytków głębszych niż 10 mm.

Głębokie ubytki (powyżej 10 mm) wymagają indywidualnego wyboru metody leczenia. Preferowanymi zabiegami chirurgicznymi są: mozaikowe operacje plastyczne i przeszczepy autologicznych chondrocytów. Istotnym ograniczeniem chirurgii plastycznej mozaiki jest brak możliwości jej zastosowania w leczeniu ubytków powierzchni stawowej kości piszczelowej.

W dwuetapowej metodzie ACI chondrocyty są pobierane z nieobciążanej części chrząstki i wszczepiane w miejsce uszkodzenia. Procedura ta jest długa oraz podobnie jak poprzednia obarczona ryzykiem powstania chrząstki włóknistej oraz przerostów tkanki.³³ Transplantacja chrząstki jest ograniczona przez liczbę dawców oraz możliwość odrzucenia przeszczepu. Biorąc pod uwagę wszystkie ograniczenia i możliwość powikłań poszukuje się metod eliminujących te problemy. Z pomocą mogą tu przyjść rozwiązania inżynierii tkankowej, a szczególnie zastosowanie trójwymiarowych rusztowań (skafoldów).³⁴

Procedura przeszczepiania autologicznych chondrocytów została opracowana prawie 30 lat temu i od tamtego czasu jest zatwierdzona w USA przez FDA. W 1997 roku została tam zastosowana u ponad 10 000 pacjentów.³⁵ Tkanka rosnąca w miejscu ubytku przypomina raczej chrząstkę niż regenerację uzyskaną w wyniku mikropęknięć.

Cena takiej operacji chirurgicznej obecnie wynosi ponad 6 000 euro. Brak odpowiedniego finansowania tego zabiegu przez NFZ sprawia, że jest on praktycznie niedostępny dla ogółu społeczeństwa. Do najbardziej znanych i najczęściej stosowanych rusztowań należą: Chondro-Gide[®] (z kolagenu wieprzowego) oraz Neocart Implant[®] (z kolagenu wołowego). Są to produkty stosunkowo drogie, gdyż ich ceny wahają się od 6 do 8 000 zł. Dostępne są autologiczne chondrocyty w zawieszynie komórkowej dostarczane przez różnych producentów (Carticel[®], ChondroCelect[®], Novocart, B. Braun-Tetec). Ceny tych produktów w Polsce są wysokie. Ostatnio pojawiły się produkty wołowe (BioCartilage[™], Lescarden Inc. USA). Jest to wolna od wody chrząstka stawowa bydlęca, którą wszczepia się z preparatem surowicy bogato-płytkowej po wcześniejszych mikroślamaniach wykonanych

³¹ Buckwalter, J. & Mankin, H. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* **41**, 1331 (1998).

³² Erggelet, C. & Vavken, P. Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint – A golden standard? *J. Clin. Orthop. Trauma* **7**, 145 (2016).

³³ Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, M. R., Motamedian, S. R., Eghbal, M. J., Nadjmi, N. & Khojasteh, A. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **105**, 431 (2017).

³⁴ Jeznach, O., Kołbuk, D., & Sajkiewicz, P. Injectable hydrogels and nanocomposite hydrogels for cartilage regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **106**, 2762 (2018).

³⁵ Giannini, S., Buda, R., Grigolo, B. & Vannini, F. Autologous chondrocyte transplantation in osteochondral lesions of the ankle joint. *Foot Ankle Int.* **22**(6), 513 (2001).

wewnątrz ubytku chrząstki. DeNovo® NT Graft – to kolejny implant chrząstki stawowej będącej stosowany do regeneracji ubytków powierzchni stawowej.

Kość gąbczasta

Kość jest tkanką łączną, zbudowaną z komórek rozproszonych w substancji międzykomórkowej. Substancja międzykomórkowa składa się z substancji podstawowej (osseina), włókien białkowych oraz soli mineralnych.³⁶ Frakcja organiczna (osseina i włókna białkowe) nadaje kości sprężystość, zmniejszając jej łamliwość. Sole mineralne (frakcja nieorganiczna) nadają kości twardość. To przeważnie uwodniony fosforan wapnia oraz wodorowęglany, węglany, cytryniany wapnia, sodu, magnezu, cynku, baru, strontu i fluorki wapnia.³⁷

Kość ma budowę hierarchiczną. Na poziomie makrostruktury wyróżniamy: kość gąbczastą i zbitą. W mikrostrukturze (10–500 µm): kanały Haversa, osteony, beleczki kostne. Wyróżniamy również sub-mikrostruktury (1–10 µm): lamelle, nanostruktury (< 1 µm): fibryle kolagenowe, kryształy minerałów oraz najmniejsze sub-nanostruktury (< 100 nm): molekuly soli nieorganicznych, kolagenu, protein.³⁸

Kość gąbczasta ma konstrukcję ażurową. Jest zbudowana z cienkich blaszek kostnych, między którymi znajduje się szpik czerwony. Występuje w nasadach kości długich i w środku pozostałych kości. Posiada zróżnicowaną morfologię w zależności od miejsca występowania.³⁹

Proces przebudowy i regeneracji kości przebiega w sposób ciągły. Odpowiadają za to cztery typy komórek kostnych: osteoblasty, komórki wyściółki kości, osteocyty i osteoklasty.⁴⁰

Osteoblasty (4–6% komórek) są położone wzdłuż powierzchni kości. Powstają z komórek macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, *MSC*). Pełnią funkcję budulcową kości oraz biorą udział w syntezie frakcji organicznej. Są niezbędne w mineralizacji kości.⁴⁰ Mogą przekształcać się w osteocyty bądź komórki wyściółki kości. Komórki wyściółki kości zapobiegają nadmiernej/niepotrzebnej resorpcji kości.

Osteocyty (90–95% komórek) są dojrzałą formą komórek kostnych. Biorą udział w komunikacji z innymi typami komórek w celu przebudowy kości.⁴¹ Osteoklasty odpowiadają za resorpcję kości.

Uszkodzenia kości wymagają najczęściej unieruchomienia, np. z wykorzystaniem elementów metalowych. Proces odbudowy kości zaczyna się od stanu zapalnego (do 7 dni). Komórki macierzyste z tkanek otaczających miejsce złamania są mobilizowane i rozpoczynają różnicowanie w inne komórki. Powstaje miękka tkanka (kalus). Następnie

³⁶ Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5**(3), 222 (2003).

³⁷ Downey, P. A. & Siegel, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys. Ther.* **86**(1), 77 (2006).

³⁸ Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. P. & Gower, L. B. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng.: R: Reports* **58**(3–5), 77 (2007).

³⁹ Hildebrand, T., Laib, A., Müller, R., Dequeker, J. & Rüegsegger, P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J. Bone Miner. Res.* **14**(7), 1167 (1999).

⁴⁰ Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. & Varanasi, S. S. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.* **61**(5), 577 (2008).

⁴¹ Dallas, S. L., Prideaux, M. & Bonewald, L. F. The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocr. Rev.* **34**(5), 658 (2013).

zachodzi odbudowa naczyń krwionośnych (rewaskularyzacja). Chrzęstny kalus ulega mineralizacji. Ustala się stan homeostazy pomiędzy resorpcją kalusa przez osteoklasty, a tworzeniem lamelli przez osteoblasty (3–4 tydzień). Pełna odbudowa kości jest bardzo długotrwała i może zachodzić nawet przez kilka lat.⁴²

Wśród ubytków kości wyróżnia się tzw. ubytki krytyczne, które nie ulegają samoistnej odbudowie. Do tej grupy zalicza się uszkodzenia kości powyżej 1–2 cm.⁴³ Ich przyczyną są:

- osteoporoza,
- zanik kości,
- resekcja nowotworów,
- zabiegi chirurgiczne wymagające uszkodzenia kości (np. rekonstrukcja więzadła krzyżowego, osteotomia).

Ubytki krytyczne wymagają bardziej złożonej procedury leczenia. Często konieczne jest zastosowanie wypełnienia wspomagającego regenerację, np. przeszczepu autogenicznego. Procedura polega na przeniesieniu fragmentu kości grzebienia biodrowego pacjenta w miejsce ubytku. Niestety ten złoty standard leczenia obarczony jest powikłaniami i niedogodnościami, tj.:

- wydłużony czas operacji (większe ryzyko powikłań spowodowanych znieczuleniem dla pacjenta),
- zwiększony ból pooperacyjny,
- występowanie rozległych blizn,
- uszkodzenie/zabicie czynników komórkowych podczas operacji,
- poważne ryzyko krwawienia, uszkodzenia nerwów, tętnic,
- przeniesienie ewentualnych komórek nowotworu,
- chroniczny ból,
- złamanie kości donorowej,
- zakażenie miejsca przeszczepu.⁴⁴

Stosuje się przeszczepy allogeniczne (od innego człowieka) lub ksenogeniczne (od zwierząt).⁴⁵ W tych metodach konieczne jest pozyskanie materiału z dużą zgodnością tkankową. Jej brak może być przyczyną odrzucenia przeszczepu. Istnieje ryzyko przeniesienia chorób (np. HIV, wirusowe zapalenie wątroby, infekcje bakteryjne) czy toksyn. Obecnie nie stosuje się już świeżych przeszczepów allo- i ksenogenicznych, a jedynie mrożone i sterylizowane.

⁴² Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**(5484), 1504 (2000).

⁴³ Schemitsch, E. H. Size matters: defining critical in bone defect size!. *J. Orthop. Trauma* **31**, S20 (2017).

⁴⁴ Jimi, E., Hirata, S., Osawa, K., Terashita, M., Kitamura, C. & Fukushima, H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *Int. J. Dent.* **2012**, 1 (2012).

⁴⁵ Cypher, T. J. & Grossman, J. P. Biological principles of bone graft healing. *J. Foot. Ankle. Surg.* **35**(5), 413 (1996).

Często wykorzystuje się mozaikę kostną (minerał kostny bez frakcji organicznej). Jest to mieszanina przygotowywana z kości różnych osób. Jest to materiał niepowtarzalny, często o różnej gęstości. Nie występuje tu zgodność tkankowa.⁴⁶

Duże nadzieje pokłada się w materiałach syntetycznych o standaryzowanych parametrach oraz właściwościach osteoindukcyjnych i osteokondukcyjnych. Pomimo wielu wyników badań na zwierzętach i tzw. eksperymentów medycznych, do ortopedii nie wprowadzono żadnej nowej metody leczenia wykorzystującej materiały syntetyczne.⁴⁷

Wymagania stawiane rusztowaniom komórkowym

Rusztowaniom komórkowym stawia się szereg wymagań. Biozgodność jest warunkiem koniecznym. Materiały nie mogą wykazywać toksyczności wobec hodowanych na nich komórek oraz pozostałych komórek występujących w organizmie. Nie mogą wywoływać odpowiedzi układu immunologicznego. Rusztowania muszą mieć odpowiednią strukturę porów. Rozmiar porów musi być dobrany odpowiednio do rodzaju komórek (Tabela 1).³³ Pory powinny być wzajemnie połączone, co umożliwi interakcje międzykomórkowe, tworzenie się tkanki oraz migrację cząsteczek sygnałowych, składników odżywczych i metabolitów.⁴⁸ Istotną funkcję pełni także hierarchiczna struktura porów rozpatrywana na poziomie mili-, mikro- oraz nanometrów. Poziom mili- decyduje o kształcie oraz wymiarach rusztowania i jego właściwościach mechanicznych.⁴⁹ Mikrostruktura determinuje migrację komórek, składników odżywczych i metabolitów.⁵⁰ Natomiast nanometryczne zapewniają adhezję komórek oraz wpływają na ekspresję składników macierzy zewnątrzkomórkowej.⁵¹ Kolejną kluczową cechą są odpowiednie właściwości mechaniczne, odpowiednie do wytrzymałości tkanki, która ma być regenerowana.⁵²

Tabela 1. Pożądany rozmiar porów w zależności od hodowanej tkanki.

Rodzaj tkanki	naczynia, tkanka włóknista	skóra	tkanka chrzęstna	tkanka kostna
Pożądana średnia średnica porów, μm	>25	20–125	70–120	100–500

⁴⁶ Hellekson, K. L. NIH releases statement on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Am. Fam. Physician.* **66**(1), 161 (2002).

⁴⁷ Navarro, M., Michiardi, A., Castano, O. & Planell, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **5**(27), 1137–1158 (2008).

⁴⁸ Teo, A. J., Mishra, A., Park, I., Kim, Y. J., Park, W. T. & Yoon, Y. J. Polymeric biomaterials for medical implants and devices. *ACS Biomater Sci Eng.* **2**, 454 (2016).

⁴⁹ Zohora, F. T. & Azim, A. Y. M. A. Biomaterials As Porous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: a Review. *Eur. Sci. J.* **10**, 186 (2014).

⁵⁰ Kim, B. S., Park, I. K., Hoshiba, T., Jiang, H. L., Choi, Y. J., Akaike, T. & Cho, C. S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 238 (2011).

⁵¹ Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., Ao, Y., Boyan, B. D. & Chen, H. Advances in porous scaffold design for bone and cartilage tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng. Part B: Reviews* **25**, 14 (2019).

⁵² Lai, Y. S., Chen, W. C., Huang, C. H., Cheng, C. K., Chan, K. K. & Chang, T. K. The effect of graft strength on knee laxity and graft in-situ forces after posterior cruciate ligament reconstruction. *PLoS One* **10**, e0127293 (2015).

Określone typy komórek mają swoje preferencje do wzrostu, wymagają określonych właściwości powierzchniowych, które umożliwią im wzrost. Z reguły należy zbadać eksperymentalnie możliwość wzrostu danych komórek na materiale.

Ze względu na hydrofilowe warunki panujące w tkance wymagana jest odpowiednia hydrofilowość/zwilżalność rusztowań. Właściwości hydrofobowe syntetycznych poliestrów (tj. PLA, PCL) stosowanych do otrzymania rusztowań muszą być zatem odpowiednio zmodyfikowane, np. przez zastosowanie odpowiednich dodatków lub modyfikację powierzchni.

Opcjonalnie, rusztowania mogą być biodegradowalne, wtedy dużą zaletą jest brak konieczności usuwania implantu po skończonej terapii. W przypadku stosowania biodegradowalnych materiałów konieczne jest aby degradacja polimeru była skorelowana z odbudową nowej tkanki. Nie mogą tracić zbyt szybko swoich właściwości strukturalnych i mechanicznych.

Rusztowania, a dokładniej materiał z których są wytworzone muszą nadawać się do sterylizacji przed kontaktem z komórkami. Brak tej cechy dyskwalifikuje rusztowanie jako produkt medyczny.

Makrostruktura rusztowań komórkowych

Porowate rusztowania komórkowe stanowią bardzo dużą grupę materiałów stosowanych w regeneracji różnych tkanek. Charakteryzują się homogeną strukturą, zawierającą liczne pory. Wśród nich możemy wyróżnić rusztowania o charakterze siatki, gąbki oraz pianki. Mimo, że pianki i gąbki w porównaniu do siatek mają lepsze właściwości mechaniczne, to ich użycie jest limitowane występowaniem w ich strukturze otwartych przestrzeni, które mogą prowadzić do tworzenia aglomeratów komórek, a następnie martwicy. Z tej grupy rusztowań siatki wydają się być najbardziej obiecującymi rusztowaniami, ze względu na możliwą dużą porowatość (od 30 do >90%) oraz występowanie wzajemnie połączonych porów, które pozwalają na komunikację komórek i zapobiegają tworzeniu się aglomeratów. Rusztowania o pożądanym rozmiarze porów można otrzymać różnymi metodami. Najczęściej stosuje się inwersję faz, spienianie gazem, liofilizację oraz druk 3D. Należy zauważyć, że metody te pozwalają na stosowanie szerokiej gamy materiałów, zarówno z polimerów naturalnych, jak i syntetycznych.⁵³ Rusztowania są najczęściej stosowane w regeneracji tkanki chrzęstnej i kostnej. Są rozwijane w kierunku zwiększenia połączeń pomiędzy porami.⁵⁴

5.4. Cel badawczy

Celem badań było opracowanie dwóch, różnych rusztowań komórkowych do regeneracji tkanek słabo ukrwionych (kości i chrząstki). Każdy z tych materiałów powinien posiadać inne cechy i właściwości. We współpracy z lekarzami ortopedami określono pożądane właściwości i zaproponowano potencjalną metodę implantacji rusztowania.

⁵³ 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.* **3**, 278 (2017).

⁵⁴ Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R. & Pillai, S. R. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1974 (2016).

Implant do tkanki chrzęstnej

Rusztowanie komórkowe do tkanki chrzęstnej powinno mieć formę membrany półprzepuszczalnej. Powierzchnia górna skafoldu powinna być nieporowata. Przełom oraz powierzchnia dolna powinna posiadać liczne, duże oraz wzajemnie połączone pory.

Implant do kości gąbczastej

Implant do kości gąbczastej powinien charakteryzować się porowatością w mikro- i makrostrukturze oraz możliwością nasączenia go czynnikami biologicznymi w warunkach sali operacyjnej.

5.5. Regeneracja tkanki chrzęstnej

Leczenie uszkodzeń chrząstki stawowej to duży problem współczesnej medycyny.⁵⁵ Chrząstka jest jedną z najtrudniejszych tkanek do regeneracji. Chondrocyty, czyli komórki tkanki chrzęstnej, do wzrostu wymagają obecności trójwymiarowego szkieletu. W zdrowej tkance szkielet ten tworzy macierz zewnątrzkomórkowa, która nie występuje w tkance uszkodzonej. Czasowe zastąpienie macierzy zewnątrzkomórkowej można uzyskać przez porowate, przestrzenne (3D) rusztowania komórkowe. Hierarchiczna struktura porów warunkuje właściwości samego rusztowania, możliwość migracji komórek i składników odżywczych oraz adhezji komórek.

Równomierne rozłożenie porów warunkuje powstanie zwartej tkanki, a otwarte i perforowane pory zapewniają wzajemną komunikację międzykomórkową oraz migrację metabolitów i substancji odżywczych.

Odpowiednia porowatość przynajmniej jednej z powierzchni rusztowania oraz występowanie na niej porów o właściwym dla komórek rozmiarze (minimum 20 μm) warunkuje możliwość ich „wejścia” do wnętrza rusztowania.

Właściwa wytrzymałość mechaniczna rusztowania jest niezbędna do pełnienia jego prawidłowej funkcji w stawie i musi być zbliżona do wytrzymałości naturalnej tkanki (moduł Younga chrząstki przy rozciąganiu wynosi około 10 MPa).

Wymagania techniczne

Na podstawie konsultacji z ortopedami i przeglądu literatury określiłam wymagania techniczne opracowywanego wyrobu medycznego. Implant do tkanki chrzęstnej miał mieć postać membrany półprzepuszczalnej o wymiarach 10x10 cm. Powinien cechować się:

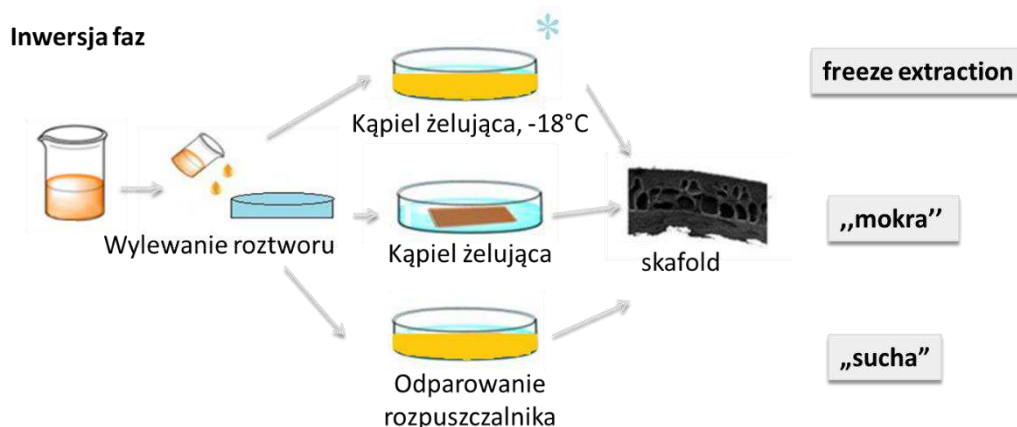
- odpowiednim rozmiarem porów rusztowania (minimum 20 μm),
- hierarchiczną strukturą porów,
- równomiernym rozłożeniem porów we wnętrzu rusztowania,
- występowaniem w przełomie i na warstwie górnej rusztowania otwartych i perforowanych porów,
- dużą porowatością jednej z powierzchni rusztowania,

⁵⁵ Huey, D. J., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* **338**(6109), 917 (2012).

- dobrą wytrzymałością mechaniczną (moduł Younga w statycznej próbie rozciągania >10 MPa),
- właściwą hydrofilowością/hydrofobowością rusztowań,
- biozgodnością (liczba żywych komórek po 24 h testu bezkontaktowego >70%),
- możliwością hodowli chondrocytów.

Wybrane metody i materiały do otrzymywania skafoldów do tkanki chrzęstnej

Badania dotyczące skafoldów do tkanki chrzęstnej prowadziłam wspólnie z ówczesną doktorantką Aleksandrą Kruk, której byłam promotorem pomocniczym oraz zespołami prof. dr hab. inż. Andrzeja Chwojnowskiego (IBIB PAN) i prof. dr hab. Pawła Sajkiewicza (IPPT PAN). Wybrałam metody inwersji faz, które prowadzą do skafoldów o różnych właściwościach i morfologii wewnętrznej (Rysunek 3). Zaletą tych metod jest możliwość sterowania rozmiarem porów, porowatością i właściwościami mechanicznymi poprzez zmianę warunków wytwarzania. Wybrane metody umożliwiają również łatwą ingerencję we właściwości powierzchni skafoldów przez jej fizyczną modyfikację. Ze względu na stosowanie niskich temperatur, nie działają destrukcyjnie na materiał, jak np. druk 3D. Dodatkowo nie wymagają stosowania skomplikowanej aparatury. Przegląd zalet i wad metod wytwarzania skafoldów opublikowałam w postaci rozdziału w monografii pokonferencyjnej.[B1]



Rysunek 3. Porównanie wariantów metod inwersji faz stosowanych do otrzymywania skafoldów.

Wybór materiałów do badań podyktowany był moimi wcześniejszymi doświadczeniami w pracy z poliestrami alifatycznymi. Zdecydowałam się wybrać: polilaktydy o różnych ciężarach cząsteczkowych, polikaprolakton oraz kopolimer polilaktyd-polikaprolakton. Wzięłam pod uwagę dużą liczbę doniesień literaturowych dotyczących wytwarzania skafoldów z tych polimerów.

5.5.1. Skafoldy otrzymywane metodą suchej inwersji faz

W suchej inwersji faz nie występuje etap żelowania skafoldów w nierozpuszczalniku. Zatem używanie stałych prekursorów porów nie ma sensu. Wprowadzone stałe porofory zostałyby w skafoldzie, który nie miałby porów otwartych. Badania zaczęłam stosując ciekłe prekursory porów.

Ciekłe prekursory porów

Do badań wybrałam metanol, *n*-propanol i *n*-butanol jako porofory. Matrycę skafoldów stanowił polilaktyd, polikaprolakton i ich blokowy kopolimer. Użycie kopolimeru PLA-PCL nie przyniosło pożądanego efektu, ponieważ nie otrzymałam porowatych skafoldów tylko lite folie. W przypadku PLA wszystkie badane porofory oraz ich mieszaniny prowadziły do porowatej struktury wewnętrznej skafoldów. W przypadku PCL, tylko użycie *n*-butanolu dawało porowate membrany (Tabela 2).[A1]

Tabela 2. Wpływ poroforu oraz materiału na porowatość skafoldu otrzymanego metodą suchej inwersji faz.

Porofor	PLA	PCL	PLA-PCL
MeOH	lita folia	lita folia	lita folia
<i>n</i> -PrOH	porowaty skafold + gruba warstwa podstawna		
<i>n</i> -BuOH	porowaty skafold		
<i>n</i> -BuOH+ <i>n</i> -PrOH	porowaty skafold	porowaty skafold	nb
<i>n</i> -BuOH + MeOH		lita folia	
<i>n</i> -PrOH + MeOH	porowaty skafold + gruba warstwa podstawna		

Otrzymane skafoldy o porowatej morfologii w przełomie miały zdecydowanie za małe pory do hodowli chondrocytów, <20 µm. Odpowiedni rozmiar porów jest niezbędny komórkom do umiejscowienia się wewnątrz porów, w przypadku chondrocytów wynosi on minimum 20 µm (taki rozmiar najczęściej osiągają chondrocyty). Dodatkowo, pory powinny być większe niż minimalny rozmiar komórek, gdyż tworząca się tkanka musi mieć miejsce do utworzenia swojej struktury. Pory nie mogą osiągać zbyt dużego rozmiaru (150–200 µm), gdyż mogłoby to osłabić strukturę rusztowania.

Drugą negatywną cechą tych skafoldów była gruba, kilkudziesięciu mikrometrowa warstwa naskórkowa. Ta część skafoldów powodowała znaczną sztywność implantu, co jest wadą przy zakładaniu go do stawu. Zbyt sztywny implant nie daje się przykleić ani przyszyć do chrząstki stawowej.

W dalszych badaniach wykazaliśmy, że opracowane skafoldy nie są toksyczne wobec fibroblastów mysich L929. Przeżywalność komórek w 24 h teście bezkontaktowym wynosiła 78%.

Po konsultacji ze specjalistami od hodowli komórek skóry uznaliśmy, że dwuwarstwowa budowa skfoldu (lita – warstwa naskórkowa, porowaty przełom) może być użyteczna w hodowlach komórek skóry. Komórki skóry (fibroblasty + keratynocyty) nie rosną w przestrzennych (3D), tylko w płaskich koloniach. Zatem skafold otrzymany metodą suchej inwersji faz może znaleźć zastosowanie na tym polu. Rozwiązanie opatentowano.[P1]

Samoorganizacja struktury wewnętrznej

Zmniejszenie średniego ciężaru cząsteczkowego polilaktydu z 86 000 do 37 000 powoduje samoorganizację w strukturze wewnętrznej skafoldu.[P2] Staje się ona luźniejsza, pojawiają się wolne przestrzenie, w których można immobilizować składniki

odżywcze dla komórek. Wzrost temperatury wylewania skafoldów o 5°C wpływa na powstawanie kulistych struktur wewnętrznych przypominających pulmosfery. Dalsze zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego PLA do 30 000 powoduje utratę ciągłości struktury skafoldów. Powstają dobrze uformowane porowate kuliste struktury, które mogą służyć jako mikronośniki do hodowli komórek.

5.5.2. Skafoldy otrzymywane metodą „freeze extraction”

Bardzo duże nadzieje pokładałam w metodzie „freeze extraction”. Z przeglądu literatury wynikało, że tą metodą otrzymuje się rusztowania o otwartych, połączonych ze sobą porach.⁵⁶ Typowy ich rozmiar to 40–150 µm. Porowatość rusztowań jest duża (ok. 85%).⁵⁷ Metodę można modyfikować zmieniając stężenie polimeru, rodzaj rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika oraz parametry zamrażania. Wadą metody jest czułość na zmianę warunków otoczenia oraz pozostawianie rozpuszczalników w produkcji, a także długi czas żelowania (kilka dni).⁵⁸

Opracowanie metody

Badania wstępne prowadziłam z użyciem poli-L-laktydu o masie molowej 86 kg/mol. Poroforem była woda oraz poliwinylpirolidon o M_n 10 kg/mol. Uzyskane wyniki porównałam do skafoldów otrzymanych tą metodą, ale bez poroforu.[B2] Rusztowania komórkowe otrzymywane bez poroforu posiadały stosunkowo duże, kuliste pory 50–60 µm, które były ze sobą wzajemnie połączone. Stosowanie PVP jako poroforu prowadziło do mniejszych porów <50 µm. Pory były podłużne ułożone warstwowo. Niestety, w ścianach wewnętrznych nie występowały dodatkowe perforacje. Najlepsze wyniki uzyskałam stosując wodę jako porofor. Powierzchnia górna posiadała regularne, dość duże pory (30–50 µm) przypominające swoją strukturą plaster miodu. Wnętrze rusztowania było bardzo porowate, niestety z mniejszymi porami niż na powierzchni górnej. Natomiast, pojawiły się dodatkowe perforacje w ścianach porów, co uznałam za wynik obiecujący, stwarzający szansę na zwiększenie porowatości i rozmiaru porów w rusztowaniu. Ponadto, stosowanie wody jako poroforu powinno szczególnie korzystnie wpływać na odpowiedź komórkową.

Optymalizacja procesu i jego model matematyczny

Zwiększenie średnicy porów we wnętrzu rusztowania postanowiłam uzyskać stosując matematyczne metody planowania eksperymentów.[A2] Kryterium optymalizacji było otrzymanie porów w przedziale 50–100 µm, a zmiennymi objaśniającymi (procesowymi) stosunek masowy porofor/PLA, stężenie PLA w dioksanie oraz skład kąpieli żelującej (MeOH/H₂O). Po przeprowadzeniu optymalizacji wg planu czynnika 2³ otrzymałam

⁵⁶ Buzarovska, A., Gualandi, C., Parrilli, A. & Scandola, M. Effect of TiO nanoparticle loading on Poly(l-lactic acid) porous scaffolds fabricated by TIPS. *Compos. Part B Eng.* **81**, 189 (2015).

⁵⁷ Prasad, A., Sankar, M. R. & Katiyar, V. State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic Scaffolds Fabrication. *Mater. Today Proc.* **4**, 898 (2017).

⁵⁸ Hao, R., Wang, D., Yao, A. & Huang, W. Preparation and characterization of β-TCP/CS scaffolds by freeze-extraction and freeze-gelation. *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.* **26**, 371 (2011).

matematyczny model procesu, który bardzo dobrze opisywał wyniki doświadczalne. W dwóch eksperymentach otrzymano pory powyżej 100 μm .

W badaniach wykazaliśmy złożoność procesu wytwarzania rusztowań komórkowych metodą „freeze extraction”. Zaobserwowaliśmy dodatnie współdziałanie (synergię) pomiędzy stosunkiem porofor/PLA i stężeniem PLA w rozpuszczalniku. Tego typu efektów nie wykrywa się w klasycznym poszukiwaniu optimum procesu metodą „po jednej zmiennej”. Uzyskanie dużych, wzajemnie ze sobą połączonych porów zostało opatentowane.[P3]

Hodowla komórek fibroblastów mysich L929

Na rusztowaniach otrzymanych w optymalnych warunkach przeprowadziliśmy hodowlę fibroblastów mysich L929.[A3] Wykazaliśmy, że otrzymane rusztowanie jest nietoksyczne dla komórek. Przeżywalność po 24 h w teście bezkontaktowym była zbliżona do próbki referencyjnej i wynosiła $95\pm 13\%$. Oceniliśmy wzrost komórek na obydwu powierzchniach rusztowania (dolnej i górnej). Po 24 h liczby komórek w kontroli i na obydwu powierzchniach były zbliżone. Po 72 h więcej komórek było na powierzchni dolnej.

Wpływ sterylizacji radiacyjnej na odpowiedź komórkową

Badania wstępne odpowiedzi komórkowej przeprowadziłam na skafoldach sterylizowanych etanolem i promieniowaniem UV. Nie jest to najlepsza przemysłowa metoda sterylizacji wyrobów medycznych. Etanol może pozostawać w porach rusztowania, co niekorzystnie wpływa na hodowlę komórek. Preferowaną metodą sterylizacji jest metoda radiacyjna. Zalecaną dawką jest 25 kGy.⁵⁹ Przeprowadziłam takie badania na próbkach otrzymanych z PLLA metodą „freeze extraction”, bez i z wodą jako poroforem.[B3]

Dawka 18 kGy, nie powodowała zmian w morfologii wewnętrznej skafoldów (kształt i wielkość porów). Właściwości mechaniczne praktycznie nie uległy zmianie. Przy zastosowaniu dawki 25 kGy obserwowaliśmy znaczne zmiany w morfologii wewnętrznej. Pory powierzchniowe ulegały zaklejeniu.

Badania komórkowe przeprowadziliśmy względem fibroblastów mysich L929 i komórek chondrocytów CP5. We wszystkich hodowlach uzyskaliśmy wyniki porównywalne z kontrolą.

5.5.3. Skafoldy otrzymywane metodą mokrej inwersji faz

Wpływ poroforów

Badania wykorzystujące mokrą inwersję faz przeprowadziłam z użyciem różnych prekursorów porów. Prace rozpoczęłam wykorzystując polimery jako prekursory porów. Stosowałam poli(glikol etylenowy) (M_n 20 kg/mol), poliwinylpirolidon (M_n 10 kg/mol) i Pluronic® F-127 (M_n 3,6 kg/mol) oraz ich równowagową mieszaninę.[B4] Skafoldy były wykonywane z polilaktydu i polikaprolaktonu.

Skafoldy otrzymane z obu polimerów bez prekursorów porów miały stosunkowo małe pory (<30 μm). Największe pory występowały w przelomie oraz na powierzchni górnej. Powierzchnia dolna była praktycznie pozbawiona porów.

⁵⁹ PN-EN ISO 13485:2016.

Zastosowanie poli(glikolu etylenowego) i Pluronic® nie zwiększyło rozmiaru porów ani ich liczby. W przypadku PVP pory we wnętrzu skafoldów uległy blisko dwukrotnemu zwiększeniu (np. w przełomie z 5–15 μm do 15–30 μm). Niestety, warstwy wierzchnie charakteryzowały się zamkniętą warstwą naskórkową, co jest bardzo niekorzystne ponieważ uniemożliwia przedostanie się komórek do wnętrza skafoldów.

Modyfikacja warstwy naskórkowej

Rusztowania otrzymane metodami inwersji faz z poliestrów alifatycznych często posiadają litą warstwę naskórkową, która uniemożliwia przedostanie się komórek do wnętrza skafoldu. Podjęliśmy próbę trawienia warstwy naskórkowej w celu otwarcia porów na powierzchni rusztowania, za pomocą 0,05 M roztworów kwasów, zasad i soli.[B5] użytymi substancjami były: kwasy siarkowy(VI), solny i octowy, wodorotlenek sodu, woda amoniakalna, węglan i wodorowęglan sodu oraz bufor fosforanowy. Trawienie trwało 15 lub 30 min, żeby nie dopuścić do degradacji polilaktydu. W środowisku kwaśnym nie obserwowaliśmy zmian w morfologii. W środowisku zasadowym również nie występowały znaczne zmiany w morfologii, przy czym w roztworze NaOH na jednej z powierzchni pojawiły się spękania. Druga powierzchnia uległa mniejszym zmianom, natomiast w przełomie zaobserwowaliśmy zerwanie części ścianek porów.

Trawienie membran już przez 5 min w przepływie powodowało zmiany destrukcyjne morfologii wewnętrznej rusztowania. Próby stosowania mieszanin czynników trawiących również nie przyniosły pożądanego efektu. Uznałam, że trzeba opracować nową lub zmodyfikowaną metodę wytwarzania, w której warstwa naskórkowa nie będzie powstawać.

Wpływ ciężaru cząsteczkowego polilaktydu

Założyłam, że za powstawanie warstwy naskórkowej i zaklejanie powierzchni zewnętrznych skafoldów odpowiadają dwie zmienne: szybkość wymywania rozpuszczalnika oraz zdolność polimeru do krystalizacji. Aby potwierdzić tę hipotezę bardzo dokładnie zbadalam proces wytwarzania skafoldów z polimerów o różnych ciężarach cząsteczkowych.[A4]

Niestety, okazało się, że dostępność handlowych PLA o różnych M_n jest bardzo ograniczona, w większości są to materiały o $M_n > 50$ kg/mol. Ponieważ szczególnie zależało mi na zbadaniu polimerów o masie molowej z przedziału 18–86 kg/mol, ze zbliżonymi odstępami między punktami pomiarowymi, musiałam sama zsyntezować materiały do badań. Zadanie okazało się trudniejsze niż początkowo zakładaliśmy. Pojawiły się dwa główne problemy. Po pierwsze, potrzebowaliśmy polimerów o ściśle zdefiniowanym ciężarze cząsteczkowym i małej dyspersyjności. Po drugie, nie dysponowaliśmy aparatem do syntezy o odpowiedniej wielkości. Aby przeprowadzić wytwarzanie skafoldów i kompleksową ich analizę potrzebowaliśmy min. 100–200 g oczyszczonego materiału. Zatem reakcja powinna być wykonana z ok. 300 g laktydu.

Przeprowadziliśmy 2 optymalizacje syntezy PLA w skali laboratoryjnej (reaktor 50 mL), katalizowanej biozgodnymi katalizatorami, magnezowym i cynkowym uzyskując matematyczne modele procesów, które pozwalały na otrzymywanie polilaktydów szytych na miarę.[A5] Mogliśmy projektować syntezy, PLA o konkretnych, M_w i M_n oraz o określonej

zawartości centrów D.[A6] Wykazaliśmy, że modele otrzymane w skali laboratoryjnej dają się dokładnie przenieść do 25-krotnie większej skali i są w niej adekwatne. Finalnie otrzymaliśmy potrzebne polimery w skali ok. 1 kg produktu w aparacie o poj. 2 L [A6], co całkowicie wystarczyło do wykonania z nich skafoldów i ich scharakteryzowania.

Krystalizacja polimeru w skafoldach

Przeprowadziłam badania wytwarzania skafoldów z polimerów o M_n 18–86 kg/mol. Z PLA o M_n 18 kg/mol wytworzenie skafoldów jest możliwe, ponieważ krystalizacja polimeru w kąpieli żelującej prowadzi do sferycznych struktur. Z PLA o M_n 29 kg/mol można już otrzymać skafold, ale na jego powierzchniach i w przełomie widoczne są dobrze zorganizowane struktury, odzwierciedlające krystalizację polimeru. Wraz ze zwiększaniem M_n te struktury zanikają, a stopień krystaliczności ulega zmniejszeniu. W skafoldach otrzymanych z polimerów o $M_n > 54$ kg/mol stopień krystaliczności w skafoldzie nie ulega zmianie, wynosi ok. 30%.

Fibroblasty mysie L929 wykazywały porównywalną szybkość wzrostu do podłoża litych wykonanych z PLA. Zatem porowatość ta była zbyt mała, żeby wpływać znacząco na rozwój komórek.[A4]

5.5.4. Skafoldy otrzymywane oryginalną metodą „włókninową”

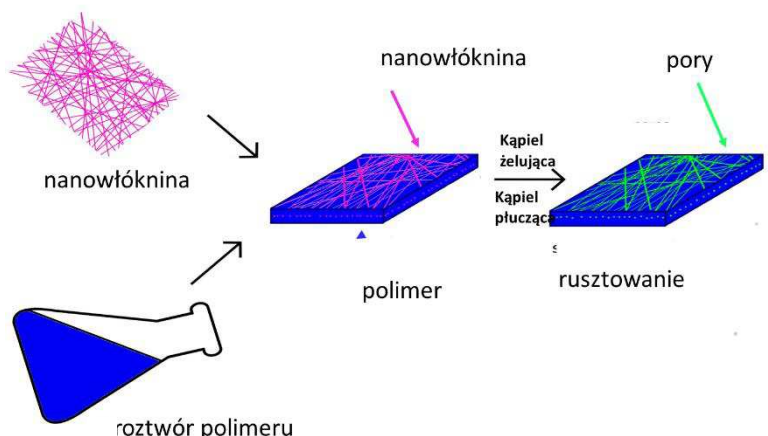
Opracowanymi wcześniej metodami nie udało się wytworzyć rusztowań komórkowych o pożądanych właściwościach. Postanowiliśmy, wspólnie z zespołami prof. Andrzeja Chwojnowskiego i prof. Pawła Sajkiewicza, opracować własną, oryginalną metodę otrzymywania rusztowań komórkowych. W założeniu miała to być metoda, która pozbawi rusztowania warstwy naskórkowej oraz zwiększy liczbę połączeń między porami w jego wnętrzu. Postanowiliśmy użyć tzw. nieklasycznych poroforów jakimi są nanowłókniny polimerowe. Nanowłókniny miały być matrycami rozmieszczenia porów. Dodatkowo miały ułatwić kontrolowanie morfologii wewnętrznej, która miała być „odciskiem” morfologii nanowłókniny.

Zespół prof. Sajkiewicza przygotował trzy rodzaje nanowłóknin: z żelatyny, z poliwinylpirolidonu oraz z poli(glikolu etylenowego). Następnie, wspólnie z prof. Chwojnowskim opracowywaliśmy procedurę otrzymywania skafoldów.

Opracowanie metody laboratoryjnej

Idea zastosowania nanowłóknin polimerowych jako prekursorów porów została przez nas opisana w artykule naukowym[A7] i opatentowana.[P4]

Na początku przygotowuje się roztwór polimeru (np. PLA) w rozpuszczalniku (Rysunek 4). Następnie przygotowany roztwór wylewa się na szklane podłoże i układa się pierwszą warstwę nanowłókniny. Ważne jest aby wybrany rozpuszczalnik polimeru nie rozpuszczał nanowłókniny. Następnie przeprowadza się walcowanie. Opcjonalnie kładzie się kolejną warstwę nanowłókniny i ponownie dociska/walcuje. Liczba warstw nanowłókniny jest dowolna i zależy od grubości rusztowania jakie chcemy uzyskać. Następnie przeprowadza się żelowanie w alkoholu, który nie powinien nie rozpuszczać materiału rusztowania (polimeru), natomiast nanowłóknina powinna się w nim rozpuścić. Na końcu, przeprowadza się kąpiel płuczącą w wodzie aby usunąć pozostałości rozpuszczalnika.



Rysunek 4. Schemat opracowanej metody włókninowej.

W badaniach wstępnych wykluczaliśmy włókninę z poli(glikolu etylenowego), która w temperaturze otoczenia ulegała stopieniu. Dalsze prace prowadziliśmy z wykorzystaniem włókniny żelatynowej i z poliwinylpirolidonu.

Wpływ nanowłókniny z żelatyny

Do badań wykorzystaliśmy polilaktyd (PLA), polikaprolakton (PCL) i kopolimer blokowy PLA-PCL (PCLA).[A8] Morfologia otrzymanych rusztowań była różna i zależała od użytego polimeru.

Rusztowania wykonane z PLA charakteryzowały się dużą porowatością. Powierzchnia dolna miała liczne, pojedyncze pory o rozmiarze 1–30 μm , przełom 20–80 μm , a powierzchnia górna 10–60 μm . W ściankach porów występowały dodatkowe perforacje. Na powierzchni górnej zaobserwowano „odciśnięcia” nanowłókien, których nałożenie, a następnie przyciśnięcie i wypłukanie spowodowało powstanie porów.

Powierzchnia dolna rusztowań z PCLA zawierała nieliczne pory o rozmiarze 1–10 μm . W przełomie występowały pory o wielkości 10–40 μm , a na powierzchni górnej obecne były pory o rozmiarze 5–40 μm . Rusztowania z PCL wykazywały duży skurcz podczas kąpieli płuczającej, zwijały się, a w ich strukturze powstawały liczne fałdy i nieciągłości. Przyczyną tego zjawiska może być niska temperatura zeszklenia PCL, -60°C (PLA $+65^{\circ}\text{C}$), prawdopodobnie nieodpowiednia dla stosowanych w metodzie warunków (-18 i $+40^{\circ}\text{C}$).

Moduł Younga rusztowań otrzymanych z użyciem nanowłókniny z żelatyny był wyższy niż 10 MPa. Pomimo porównywalnej porowatości z rusztowaniami otrzymanymi wobec PVP rusztowania z PLA i PCL miały wyższy moduł Younga. Również ich nasiąkliwość masowa była większa, co świadczy o ich lepszej zwilżalności przez media polarne.

W teście bezkontaktowym wobec limfocytów T (Jurkat) wykazaliśmy, że rusztowania nie są toksyczne. Skafoldy z PLA po 8 dniach hodowli charakteryzowały się przeżywalnością komórek $>90\%$. W teście bezkontaktowym wobec fibroblastów mysich L929 przeżywalność była o ok. 15% wyższa niż dla samego PLA. Obserwacja mikroskopowa komórek wykazała, że po 72 h obie powierzchnie rusztowań z PLA są nimi zasiedlone.

Wpływ nanowłókniny z poliwinylpirolidon (PVP)

Rusztowania otrzymane z nanowłókniny z PVP zostały wytworzone z tych samych polimerów (PLA, PCL, PCLA).[A9] Ich morfologia wyraźnie się różni od otrzymanych z użyciem nanowłókniny żelatynowej. Były zdecydowanie mniej porowate. Na warstwie wierzchniej pojawiała się miejscowo warstwa naskórkowa. Stąd wprowadziliśmy modyfikację tej metody i dodaliśmy do niej klasycznych prekursorów porów (PEG i Pluronic®). Wykazaliśmy, że przy jednoczesnym zastosowaniu tych 3 czynników porotwórczych (PEG + Pluronic® + nanowłóknina PVP) otrzymuje się rusztowanie o morfologii sprzyjającej hodowli komórek. Rusztowanie posiada korzystne właściwości mechaniczne (E 163 MPa) do regeneracji chrząstki.

Rusztowanie otrzymane z wykorzystaniem nanowłókniny z PVP charakteryzuje się bardzo dużą nasiąkliwością. Nasiąkliwość izopropanolem jest niemal dwukrotnie wyższa (545%) niż dla rusztowania otrzymanego z klasycznymi prekursorami porów (315%). Natomiast nasiąkliwość osoczem zwierzęcym jest 3-krotnie większa (779%) niż dla rusztowań klasycznych (258%).

W badaniach komórkowych wobec linii limfocytów T (Jurkat) wykazaliśmy, że przeżywalność komórek, nawet po 192 h hodowli, jest bardzo wysoka (>94%). Zatem zarówno rusztowanie, jak i pozostałości nanowłóknin oraz rozpuszczalników resztkowych są nietoksyczne dla tej linii komórkowej.

Hodowla komórek chondrocytów pierwotnych pobranych od pacjentów charakteryzowała się stałym przyrostem liczby komórek w czasie. Po 3,5 tygodnia komórki osiedliły się w całej objętości rusztowania komórkowego. Jednak badania te wymagają dalszych testów biochemicznych i genetycznych. Konieczna jest dogłębna analiza cech fenotypowych i biochemicznych komórek w celu potwierdzenia czy są to komórki chrząstki czy ich forma fibroblastopodobna. Komórki chrzęstne poza organizmem żywym ulegają odróżnicowaniu do fibroblastów.

5.5.5. Porównanie właściwości otrzymanych skafoldów

Porównałam charakterystykę skafoldów otrzymanych różnymi metodami z wymaganiami technicznymi (Tabela 3). Przeprowadziłam selekcję skafoldów.

Tabela 3. Porównanie najważniejszych właściwości skafoldów do regeneracji chrząstki w zależności od metody wytwarzania.

cecha	wymaganie techniczne	sucha inwersja faz	„freeze extraction”	mokra inwersja faz	metoda „włókninowa”	
					żelatyna	PVP
rozmiar porów, µm	min. 20	<20	50–110	5–30	5–80	5–100
obecność perforacji wewnętrznych	+	–	+	–	+	+
otwarta struktura porów	+	–	+	–	+	+
cytotoksyczność, %	70	78	>95	90	92	>90
hodowla chondrocytów	+	nb	+ (linia CP5)	nb	nb	+ (chondrocyty pierwotne)
moduł Younga, MPa	10	220–400	1–8	60–270	232	161

Analizując otrzymane wyniki uważam, że rusztowania otrzymane metodą „freeze extraction” oraz metodą „włókninową” z użyciem żelatyny, nadają się do dalszych badań nad hodowlą na nich chondrocytów. Dalsze badania in vivo zamierzam przeprowadzić na małym modelu zwierzęcym (królik New Zeland White).

5.6. Regeneracja tkanki kostnej

W terapii ubytków kostnych stale poszukuje się nowych, alternatywnych rozwiązań. Powszechnie jest stosowany autologiczny przeszczep kości (od pacjenta) oraz materiały syntetyczne. W procedurze klinicznej stosuje się cement z poli(metakrylanu metylu).⁶⁰ Niestety, może on powodować lokalną toksyczność⁶¹ lub obrastać tkanką włóknistą. Efektem jest brak integracji przeszczepu z kością.⁶² Wszczepianie syntetycznych materiałów nieresorbowalnych generuje 10–40% ryzyko infekcji lub odrzutu. Stosowanie mrożonego przeszczepu kości, tzw. mozaiki kostnej z banku kości, wiąże się z dużym ryzykiem infekcji (25%). Znane są także przypadki powikłań w formie zaniku płata kości.⁶³

Przytoczone przeze mnie powikłania zmotywowały mnie do podjęcia prac nad poszukiwaniem syntetycznych materiałów resorbowalnych. Po przeglądzie literatury stwierdziłam, że obiecującym materiałem jest polilaktyd i jego kopolimery. Napotkałam

⁶⁰ Topoleski, L. T., Ducheyne, P. & Cukler, J. M. A fractographic analysis of in vivo poly (methyl methacrylate) bone cement failure mechanisms. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**(2), 135 (1990).

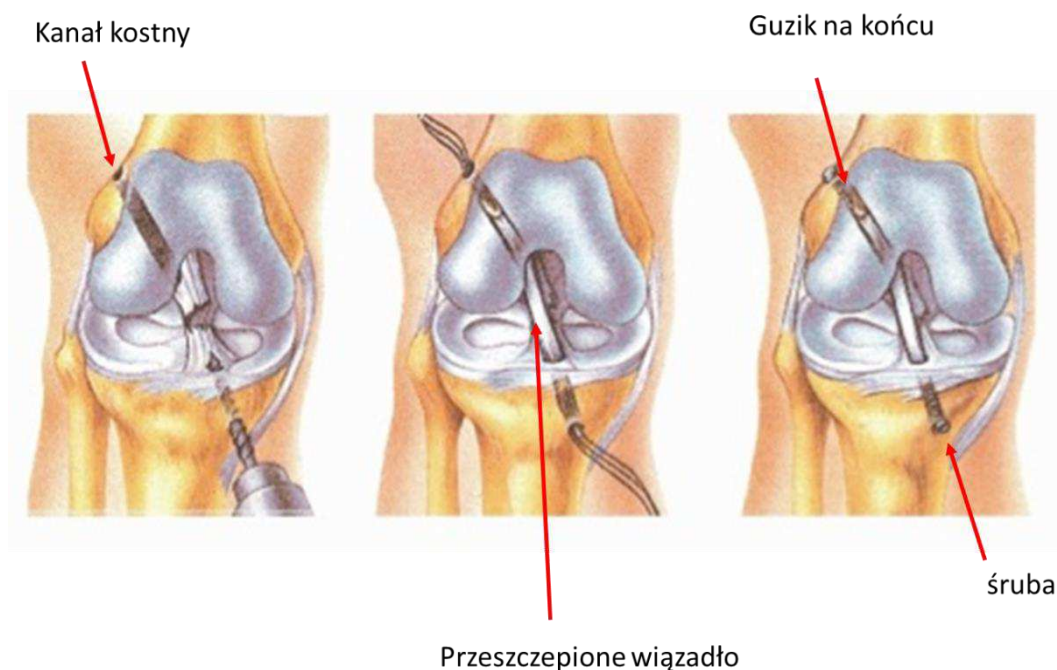
⁶¹ Webb, J. C. J. & Spencer, R. F. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg. Br.* **89**(7), 851 (2007).

⁶² Bobinski, L., Koskinen, L.-O. D. & Lindvall, P. Complications following cranioplasty using autologous bone or polymethylmethacrylate – Retrospective experience from a single center. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **115**, 1788 (2013).

⁶³ Piitulainen, J. M., Kauko, T., Aitasalo, K. M., Vuorinen, V., Vallittu, P. K. & Posti, J. P. Outcomes of Cranioplasty with Synthetic Materials and Autologous Bone Grafts. *World Neurosurg.* **83**, 708 (2015).

na wiele doniesień mówiących o przydatności poliestrów alifatycznych w leczeniu defektów kostnych. Wnioski te były podparte licznymi badaniami *in vivo*.⁶⁴

Opracowany implant miał być odpowiedzią na zgłaszane przez ortopedów zapotrzebowanie na materiał do leczenia dużych ubytków kostnych, przekraczających 1–2 cm.⁶⁵ Problem ten często występuje w zabiegu rekonstrukcji więzadła krzyżowego (ACL). Podczas zabiegu, w zdrowej kości nawiercane są kanały kostne, przez które przewleka się wcześniej spreparowane wcześniej więzadło (Rysunek 5). Wolną przestrzeń pomiędzy więzadłem a brzegiem kanału często pozostawia się pustą lub wypełnia mozaiką kostną. W przypadku nieprawidłowej rekonwalescencji więzadło może zostać ponownie zerwane, wtedy konieczna jest ponowna operacja.



Rysunek 5. Etapy zabiegu rekonstrukcji więzadła krzyżowego.⁶⁶

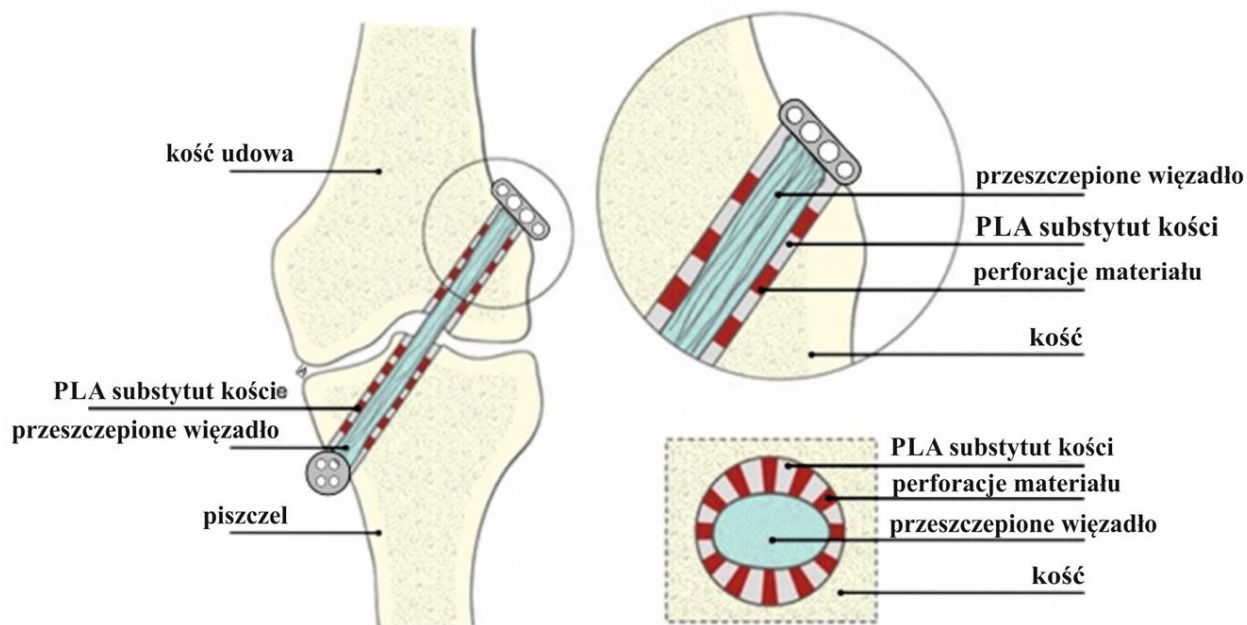
Nawiercona zdrowa kość staje się osłabiona, gdyż kanały nie zarastają się. Bardzo często zachodzi ich samoistne poszerzenie. Stąd pojawił się pomysł materiału, który wypełni tę wolną przestrzeń a dodatkowo obecne w nim czynniki biologiczne wspomogą naturalną odbudowę tkanki (Rysunek 6).⁶⁷

⁶⁴ Gogolewski, S., Pineda, L. & Büsing, C. M. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterials* **21**, 2513 (2000).

⁶⁵ Fernandez de Grado, G., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Wagner, Q., Musset, A. M., Benkirane-Jessel, N., Bornert, F. & Offner, D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J. Tissue Eng.* **9**, 2041731418776819 (2018).

⁶⁶ salusmcm.pl

⁶⁷ Leiggener, C. S., Curtis, R., Müller, A. A., Pfluger, D., Gogolewski, S. & Rahn, B. A. Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials* **27**, 202 (2006).



Rysunek 6. Koncepcja wypełnienia kanału kostnego materiałem kościostanym nasączonym czynnikiem biologicznym.⁶⁸

5.6.1. Opracowanie substytutu kości gąbczastej

Badania dotyczące substytutu do kości gąbczastej prowadziłam wspólnie z drugą doktorantką, której byłam promotorem pomocniczym, Moniką Budnicką oraz zespołem prof. dr hab. Pawła Sajkiewicza (IPPT PAN), szczególnie z dr inż. Dorotą Kołbuk-Konieczny oraz z zespołem dr hab. Krzysztofa Ficka (klinika Galen-Ortopedia, AWF Katowice).

Wymagania techniczne:

Na początku sformułowałam wymagania techniczne dotyczące pożądaných cech wyrobu końcowego.⁶⁹ Opracowywany implant powinien charakteryzować się:

- morfologią wewnętrzną z mikro- i makroporowością;
- jednoczesną obecnością małych i dużych porów (50–500 μm);⁷⁰
- porowością otwartą powyżej 80%;
- nasiąkliwością masową izopropanolem powyżej 300%;
- nasiąkliwością osoczem zwierzęcym powyżej 300%;

⁶⁸ Ficek, K., Rajca, J., Stolarz, M., Stodolak-Zych, E., Wiczorek, J., Muzalewska, M., Wyleżoł, M., Wróbel, Z., Binkowski, M. & Błażewicz, S. Bioresorbable Stent in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Polymers* **11**(12), 1961 (2019).

⁶⁹ O'Connell, K., Knight, H., Ficek, K., Leonska-Duniec, A., Maciejewska-Karlowska, A., Sawczuk, M., Stepien-Słodkowska, M., O'Cuinneagain, D., van der Merwe, W., Posthumus, M. & Cieszczyk, P. Interactions between collagen gene variants and risk of anterior cruciate ligament rupture. *Eur. J. Sport Sci.* **15**(4), 341 (2015).

⁷⁰ Fisher, M. B. & Mauck, R. L. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **19**, 1 (2013).

- sprężystością pozwalającą na łatwe dopasowanie do kształtu i wielkości ubytku w trakcie operacji;
- biogodnością (min. 70% przeżywalnością komórek w 24 h teście bezkontaktowym);
- pozytywnym wynikiem hodowli osteoblastów (liczba komórek i ich kształt).

W przypadku implantów kostnych bardzo istotnym parametrem są właściwości mechaniczne, a szczególnie moduł Younga. Autorzy prac podkreślają, że powinien być zbliżony do modułu Younga zdrowej kości. W przypadku wypełniania ubytków kostnych (p. kanałów kostnych, cyst) cecha ta nie jest tak ważna. Wypełnienie kostne (do kości gąbczastej) nie jest odpowiedzialne za przenoszenie obciążeń mechanicznych, a pełni jest tylko rolę macierzy zewnątrzkomórkowej i nośnika czynników wzrostu komórek.

Procedura laboratoryjna

Prace rozpoczęłam od określenia warunków procesu wytwarzania substytutu kości gąbczastej. Zdecydowałam się zastosować metodę „freeze extraction” (Rysunek 7). Zastosowałam poli-L-laktyd o M_n 86 kg/mol, który był najlepszym materiałem do skafoldów dedykowanych tkance chrzęstnej. Rozpuszczalnikiem polimeru był 1,4-dioksan. Temperatura zamrażania substytutu wynosiła -18°C . Kąpiel żelująca powadzona była w zimnym metanolu, a kąpiel płucząca w wodzie. Warunki początkowe zostały przeniesione z opracowanej wcześniej metodyki dla skafoldów chrzęstnych.

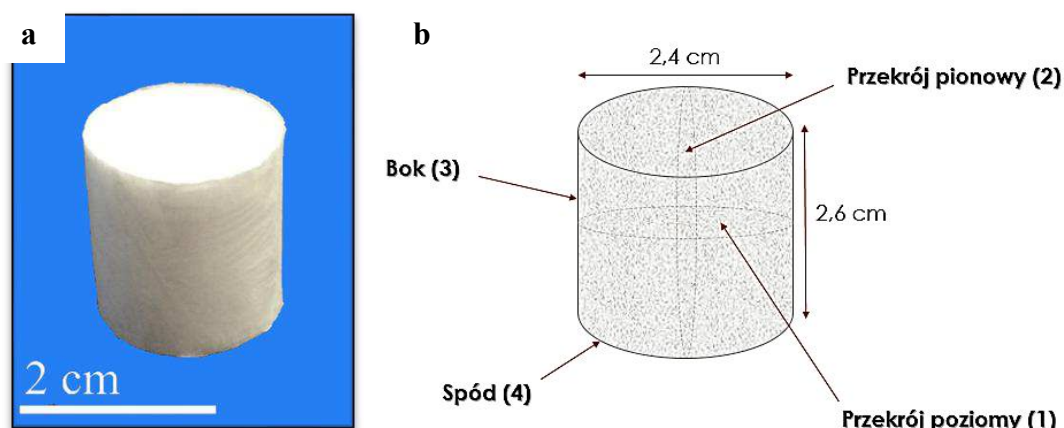


Rysunek 7. Otrzymywanie substytutów kości gąbczastej metodą „freeze extraction”.

Kształt i wielkość substytutu kostnego

Perspektywiczne zastosowanie opracowywanego implantu do wypełnienia kanałów kostnych, bezpośrednio wpłynęło na jego kształt i rozmiar. Stwierdziliśmy, że powinna to być forma walca o wymiarach $d=2,4 \times h=2,6$ cm (Rysunek 8). W przeliczeniu na objętość daje to ok. 10 cm^3 pełnowartościowego wypełnienia kostnego. Powierzchnia górna wymaga ścięcia ze względu na pojawiające się defekty.

Opracowywany substytut był trójwymiarowy w swojej makroporowatości, dlatego konieczne było przeprowadzenie pogłębionej analizy struktury wewnętrznej. W badaniach szczególnie istotna była powierzchnia zewnętrzna substytutu, bo przez nią komórki/osocze dostawały się do środka rusztowania. Jeżeli pory na powierzchni bocznej byłyby zbyt małe, we wnętrzu implantu nie byłoby komórek/czynników biologicznych. Drugim istotnym aspektem było wnętrze implantu. Powinno się ono charakteryzować dużymi, wzajemnie połączonymi porami z dodatkowymi perforacjami w ścianach porów. Żeby móc to wszystko zbadać zdecydowaliśmy analizować zarówno przekrój pionowy, jak i poziomy implantu.



Rysunek 8. Opracowany substytut kostny: a – zdjęcie substytutu, b – analizowane elementy substytutu.

Analiza morfologii w objętości próbki

W badaniach wykazaliśmy, że morfologia wewnętrzna substytutu zmienia się w zależności od miejsca pobrania próbki.[B6] Najbardziej porowate były przekroje wewnętrzne. Posiadały duże ($>100\ \mu\text{m}$) pory o kulistym kształcie. W ścianach porów obecne były dodatkowe perforacje, co jest korzystne w nasączaniu substytutu osoczem bogato-płytkowym oraz podczas transportu składników odżywczych i metabolitów komórkowych. Najmniej porowatą częścią był bok substytutu, nieco większą porowatość posiadał spód. Pory w tej części były mniejsze rzadko przekraczające $100\ \mu\text{m}$.

Wykazaliśmy, że przygotowanie próbki do analizy skaningową mikroskopią elektronową ma bardzo istotny wpływ na uzyskiwany wynik. W literaturze próbki najczęściej przygotowywane są poprzez zamrażanie próbki w ciekłym azocie, a następnie łamanie.⁷¹ W przypadku substytutów o makroporowatości trójwymiarowej, taka metoda jest nieodpowiednia, gdyż prowadzi do zmiążdżenia porów na powierzchni oraz w miejscach o porowatości $>90\%$. W wyniku tych obserwacji zdecydowaliśmy się na cięcie substytutu skalpelem. Po wielokrotnych obserwacjach mikroskopowych stwierdziliśmy, że podczas takiej operacji, struktura wewnętrzna materiału nie ulega zniszczeniu.

5.6.2. Optymalizacja procesu z wykorzystaniem matematycznych metod planowania eksperymentu

Badania wstępne

Prace badawcze miały na celu otrzymanie implantu o jak największej porowatości i maksymalnej nasiąkliwości masowej.[A10] Stwierdziliśmy, że następujące zmienne, wpływają na badane właściwości substytutu: stężenie polilaktydu w dioksanie, zawartość poroforu (wody) oraz temperatura wylewania do formy roztworu polimeru w dioksanie. Dodawanie poroforu zdecydowanie zwiększało nasiąkliwość, prawdopodobnie ze względu na wzrost liczby perforacji wewnętrznych w ścianach porów oraz udział porów otwartych.

⁷¹ Anovitz, L. M. & Cole, D. R. Characterization and analysis of porosity and pore structures. *Rev. Mineral. Geochem.* **80**(1), 61 (2015).

Po badaniach wstępnych wpływ tych zmiennych nie był jednoznaczny, dlatego po raz kolejny zastosowałam matematyczne metody planowania. Założyłam, że uda się ocenić, która z wymienionych zmiennych ma największy wpływ na porowatość i nasiąkliwość substytutu. Oczekiwałam również, że otrzymam dwa adekwatne, matematyczne modele procesu (dla porowatości i nasiąkliwości), na podstawie których będę mogła sterować właściwościami substytutu poprzez zmianę warunków jego wytwarzania.

Optymalizacja procesu

Optymalizację przeprowadzono korzystając z planu czynnikowego 2³. Porowatość substytutu opisano bardzo prostym modelem liniowym, w którym istotne było tylko stężenie PLA w dioksanie. Nasiąkliwość masową substytutu wg *i*-PrOH opisano bardziej skomplikowanym równaniem, w którym istotne były: stężenie PLA w dioksanie, zawartość poroforu oraz synergia zawartości poroforu i temperatury wylewania do formy.

Warunki optymalne

Na podstawie otrzymanych równań i założonego kryterium optymalizacji wyznaczyliśmy warunki optymalne, w których należy prowadzić ten proces. Stężenie PLA w dioksanie 3%, stosunek objętościowy woda/(roztwór PLA/dioksan) 0,08, temperatura wylewania do formy 47°C. W takich warunkach otrzymałam substytut z 96,8% porowatością o nasiąkliwości masowej 1670%.

Jest to zdecydowanie lepszy wynik niż początkowo zakładałam w wymaganiach technicznych, dotychczas nie opisany w literaturze. Opracowaną procedurę laboratoryjną zgłoszono do opatentowania.[P5]

5.6.3. Modyfikacja właściwości substytutu kości

W badaniach klinicznych wykazano już, że PLA posiada bardzo dobre właściwości osteokondukcyjne.⁷² Jednak jego właściwości osteoindukcyjne nie są wystarczające. Na etapie planowania gotowego wyrobu medycznego stwierdziliśmy, że konieczne jest połączenie substytutu z czynnikiem biologicznym o lepszych właściwościach kościotwórczych, jak osocze bogatopłytkowe (PRP).⁷³ Ze względu na hydrofobowość PLA, nie udało się go dotychczas efektywnie połączyć z PRP, bez uszkodzenia struktury wewnętrznej nośnika.^{74,75}

Uznałam, że zwiększenie zawartości hydrofilowych grup funkcyjnych na powierzchni substytutu może poprawić zwilżalność tego materiału. W wyniku takiej modyfikacji powierzchni,

⁷² Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. *Injury* **36**(3), S20 (2005).

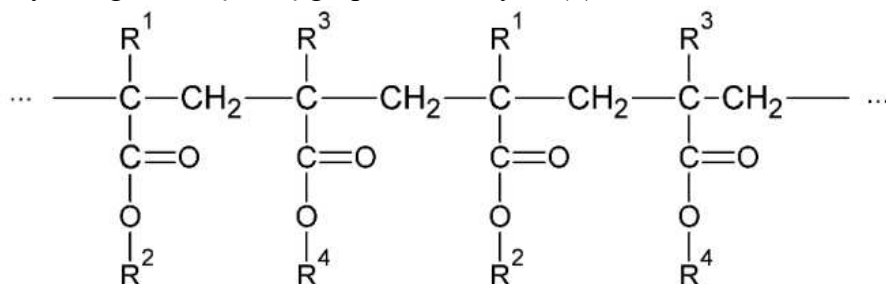
⁷³ Tatullo, M., Marrelli, M. & Paduano, F. The Regenerative Medicine in Oral and Maxillofacial Surgery: The Most Important Innovations in the Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Med. Sci.* **12**, 72 (2015).

⁷⁴ Lu, H. H., Vo, J. M., Chin, H. S., Lin, J., Cozin, M., Tsay, R., Eisig, S. & Landesberg, R. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **86**(4), 1128 (2008).

⁷⁵ Gentile, P. & Cervelli, V. Use of platelet-rich plasma in maxillofacial surgery. *J. Craniofac. Surg.* **23**(5), 1580 (2012).

włoczenie osocza lub zawiesiny komórek do wnętrza substytutu powinno być efektywniejsze i zachodzić wg łagodniejszej dla struktury wewnętrznej procedury, np. statycznie.

Na materiały modyfikujące (hydrofilizujące) właściwości substytutu wybrałam polimetakrylany. Polimetakrylany są polimerami używanymi w ortopedii, przy zabiegu wszczepienia endoprotez. Posiadają właściwości wspomagające integrację wszczepu (implantu) z kością pacjenta. Chciałam je wprowadzać na etapie wytwarzania substytutu, aby uzyskać tzw. blendę polimerową.⁷⁶ Zdecydowałam zastosować handlowo dostępne Eudragity[®], stosowane jako substancje pomocnicze w lekach.⁷⁷ Są to kopolimery kwasu metakrylowego różniące się grupami bocznymi (9).



Rysunek 9. Eudragity[®]: R¹, R³= H, CH₃; R²= H, CH₃, C₂H₅, CH₂CH₂N(CH₃)₂, R⁴= CH₃, C₂H₅, CH₃C₄H₉, CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃Cl⁻.

Eudragit[®] E jest kopolimerem metakrylanu metylu, metakrylanu *N,N*-dimetyloaminoetylu, metakrylanu *n*-butylu (stosunek grup 1:2:1). Eudragity[®] L i S są kopolimerami kwasu metakrylowego i metakrylanu metylu o stosunku grup bocznych odpowiednio 1:1 oraz 1:2.⁷⁸ Eudragity[®] posiadają zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne (Tabela 1).^{79,80}

Tabela 4. Wybrane właściwości Eudragitów[®] E, L, S 100. Średnia wagowo masa molowa (*M_w*), temperatura zeszklenia (*T_g*), temperatura depolimeryzacji (*T_d*).

Rodzaj Eudragitu [®]	<i>M_w</i> , kg/mol	<i>T_g</i> , °C	<i>T_d</i> , °C
E100	47	52	250
L100	125	195	176
S100	125	173	173

Wybór Eudragitu[®]

Eudragity[®] E, S, L 100 były dodawane na etapie wytwarzania do roztworu polilaktydu w dioksanie, jako porofory.[A11] Otrzymałam zbliżoną do siebie nasiąkliwość masową (ok. 1600%) dla wszystkich testowanych Eudragitów[®]. Porowatość otwarta również była

⁷⁶ Hari, B. V., Narayanan, N., Dhevendaran, K. & Ramyadevi, D. Engineered nanoparticles of Efavirenz using methacrylate co-polymer (Eudragit-E100) and its biological effects in-vivo. *Mater. Sci. Eng. C* **67**, 522 (2016).

⁷⁷ Wyszomierski, K. & Sawicki, W. Eudragity – Rodzaje, zastosowanie, stabilność stałych postaci leku. *Farm. Pol.* **66**(3), 221 (2010).

⁷⁸ Van Renterghem, J., Vervaet, C. & De Beer, T. Rheological characterization of molten polymer-drug dispersions as a predictive tool for pharmaceutical hot-melt extrusion processability. *Pharm. Res.* **34**(11), 2312 (2017).

⁷⁹ Evonik Industries AG. Technical information. EUDRAGIT[®] L 100 and EUDRAGIT[®] S 100. 2012.

⁸⁰ Evonik Nutrition & Care GmbH. Technical Information. EUDRAGIT[®] E 100, EUDRAGIT[®] E PO and EUDRAGIT[®] E 12,5. 2015.

do siebie zbliżona (93–96%). Zastosowanie metanolu jako dodatkowego poroforu nie doprowadziło do zwiększenia porowatości ani nasiąkliwości.

Eudragit® L100 odrzuciłam ze względu na dużą rozpuszczalność w wodzie w pH >6 (etap kąpieli żelującej) i w efekcie wymywanie z substytutu. Dodatek EE 100 zwiększył regularność w morfologii, dlatego wybrałam go do dalszych badań. Dodatkowo podejrzewałam, że EE 100 może mieć korzystny wpływ na hydrofilowość i bioaktywność substytutu.

Optymalizacja procesu wytwarzania substytutu z użyciem Eudragit® E 100

Optymalizację procesu prowadziłam tym razem z wykorzystaniem planu rotabilnego typu 2². Jest to plan pozwalający uzyskać bardziej złożony model, w którym mogą występować zmienne kwadratowe. Dążyłam do maksymalizacji porowatości otwartej i nasiąkliwości substytutu. Zmienne optymalizowane to: stosunek masowy EE 100/PLA oraz stosunek objętościowy porofor/(roztwór PLA/dioksan).

W wyniku optymalizacji uzyskałam dwa modele adekwatne statystycznie, zależność porowatości i nasiąkliwości od zmiennych optymalizowanych. Porowatość, podobnie jak poprzednio, opisano modelem liniowym z jedną zmienną, stosunek objętościowy porofor/(roztwór PLA/dioksan). Natomiast nasiąkliwość masową modelem kwadratowym z efektem współdziałania. Obydwa modele bardzo dobrze opisywały dane doświadczalne.

Warunki optymalne

Na podstawie otrzymanych modeli i kryterium optymalizacji określono warunki optymalne. Są to warunki w centrum planu optymalizacyjnego, stosunek masowy EE 100/PLA 1:3, a stosunek objętościowy porofor/(roztwór PLA/dioksan) 1:10. W tych warunkach otrzymano substytut o porowatości otwartej 95,4% i nasiąkliwości masowej względem *i*-PrOH 1732%.

Ocena powierzchni i właściwości substytutu

W dalszych pracach postanowiłam zastosować dodatkowo wodę jako porofor.[A12] Pozytywne efekty uzyskane dla substytutów z samego PLA pozawały sądzić, że synergia stosowania jednocześnie EE 100 i wody powinna jeszcze poprawić wyniki.

W obserwacjach mikroskopowych widoczna była znaczna zmiana w morfologii wewnętrznej. Wraz ze wzrostem zawartości wody rusztowania posiadały coraz większe pory. Liczba perforacji wewnętrznych również ulegała zwiększeniu.

Na podstawie modelu powierzchni otrzymanego za pomocą oprogramowania mikroskopu optycznego stwierdzono, że pory na powierzchni są większe i znacznie głębsze, co powinno pozytywnie wpłynąć na hodowlę komórek, a szczególnie ich wnikanie do wnętrza substytutu.

Po oznaczeniu zawartości azotu i wykonaniu widm IR w próbkach okazało się, że część EE 100 pozostaje we wnętrzu substytutu. Ze względu na hydrofilowy jego charakter powinno to także ułatwiać wprowadzenie komórek do wnętrza.⁸¹

Hodowla komórek kostnych MG 63

Test cytotoxyczności na ekstraktach po 24 h wskazał nieznacznie obniżoną, o ok. 10%, odpowiedź komórkową substytutu z EE 100/PLLA w stosunku do substytutu z PLLA oraz o ok. 5%, w stosunku do kontroli TCP. Żaden z substytutów nie okazał się cytotoksyczny (przeżywalność komórek powyżej 70%). W teście kontaktowym (Presto Blue) wykazaliśmy, że po 3 dniach hodowli, aktywność komórek była niższa dla substytutów z EE 100/PLLA niż z PLLA. Po 5 dniach hodowli odpowiedź komórkowa była zbliżona. Ocena morfologii komórek po 7 dniach hodowli potwierdziła, że komórki były dobrze rozpląszczone na podłożach.

5.6.4. Biomineralizacja substytutu kostnego

Drugą metodą modyfikacji powierzchni substytutu było osadzanie fosforanów wapnia. Do badań wybrałam metodę biomimetyczną, ponieważ umożliwia ona otrzymanie kościopodobnego hydroksyapatytu i może być zastosowana do materiałów polimerowych. Należy przy tym dostosować czas prowadzenia procesu, aby był on nie tylko efektywny, ale także opłacalny technologicznie.[A13]

Opracowanie własnej metody biomineralizacji

Opracowaliśmy modyfikację poli-L-laktydowego substytutu kości gąbczastej za pomocą fosforanów wapnia (CaP). Fosforany osadzaliśmy na powierzchni substytutów metodą biomimetyczną, w wyniku biomineralizacji, z roztworu zawierającego jony fosforanowe oraz jony wapnia. Lokalne przesylenie jonów wapnia i fosforu powodowało wytrącanie się na powierzchni implantu fosforanów wapnia.⁸²

Metoda biomimetyczna jest procesem długotrwałym (do 30 dni), gdyż naśladuje naturalny proces mineralizacji kości, prowadząc do powstania kościopodobnego apatytu. Wprowadzona przez nas modyfikacja w metodyce spowodowała skrócenie tego czasu do 3 dni. Opracowana procedura została zgłoszona do opatentowania.⁸³

Naniesienie powłoki fosforanów wapnia na substytuty

Osadzenie powłoki CaP spowodowało spadek porowatości substytutów (z 94,5 do 91,9%) i nasiąkliwości masowej (z 1380 do 740%) proporcjonalnie do przyrostu masy

⁸¹ Gadomska-Gajadhur, A., Budnicka, M., Ruśkowski, P., Synoradzki, L., Tytman, A. & Szymaniak, M. Sposób wytwarzania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej o zwiększonej hydrofilowości. *Zgłoszenie patentowe P.426819*, 27-08-2018.

⁸² Yuan, X., Mak, A. F. & Li, J. Formation of bone-like apatite on poly (L-lactic acid) fibers by a biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* **57**(1), 140–150 (2001).

⁸³ Gadomska-Gajadhur, A., Budnicka, M., Ruśkowski, P., Synoradzki, L., Szymaniak, M. & Wrzcionek, M. Sposób hydrofilizacji dynamicznego polilaktydowego substytutu kości gąbczastej. *Zgłoszenie patentowe P.426820*, 27-08-2018.

powłoki po procesie i stopnia wypełnienia porów substytutu przez sole powłoki. Rozmiar porów praktycznie nie uległ zmianie (100–400 μm), gdyż kryształy soli były osadzone głównie na litych ścianach porów. Ciężar cząsteczkowy polilaktydu po procesie biomineralizacji nie uległ zmianie. Zatem można stwierdzić, że medium do biomineralizacji nie powoduje degradacji polilaktydu. Zaobserwowaliśmy wzrost modułu Younga po procesie biomineralizacji. Uważam, że poprawi to trwałość struktury wewnętrznej substytutu w etapie nasączania osoczem przez wirowanie.

Hodowla komórek kostnych MG 63 na zmodyfikowanych substytutach

W badaniach komórkowych nie stwierdziliśmy wyraźnego wpływu żadnej z części implantu, na rozwój osteoblastów. Komórki kostne rozwijały się zarówno na powierzchniach o małej porowatości (spód, bok), jak i w bardzo porowatym wnętrzu. Po 3 i 5 dniach hodowli, aktywność komórek (PrestoBlue) na substytutach biomineralizowanych była o 10% większa niż na substytucie z PLA. Po 7 dniach hodowli, na wszystkich powierzchniach substytutów komórki kostne cechowała prawidłowa morfologia. Na żadnej z części substytutu nie uzyskano niższej przeżywalności komórek niż 75%.

5.6.5. Porównanie właściwości otrzymanych substytutów kości gąbczastej

Porównałam otrzymane substytuty kości gąbczastej z opracowanymi na wstępie wymaganiami technicznymi (Tabela 5). Wszystkie otrzymane substytuty spełniają wymagania stawiane implantom do kości gąbczastej. Konieczne są dalsze badania *in vivo* tych materiałów. W najbliższej przyszłości zamierzam przeprowadzić badania *in vivo* z wykorzystaniem dużego modelu zwierzęcego (owcy wrzosówki), w ramach grantu NCBR Lider 11.

Tabela 5. Porównanie właściwości substytutów kości gąbczastej z wymaganiami technicznymi.

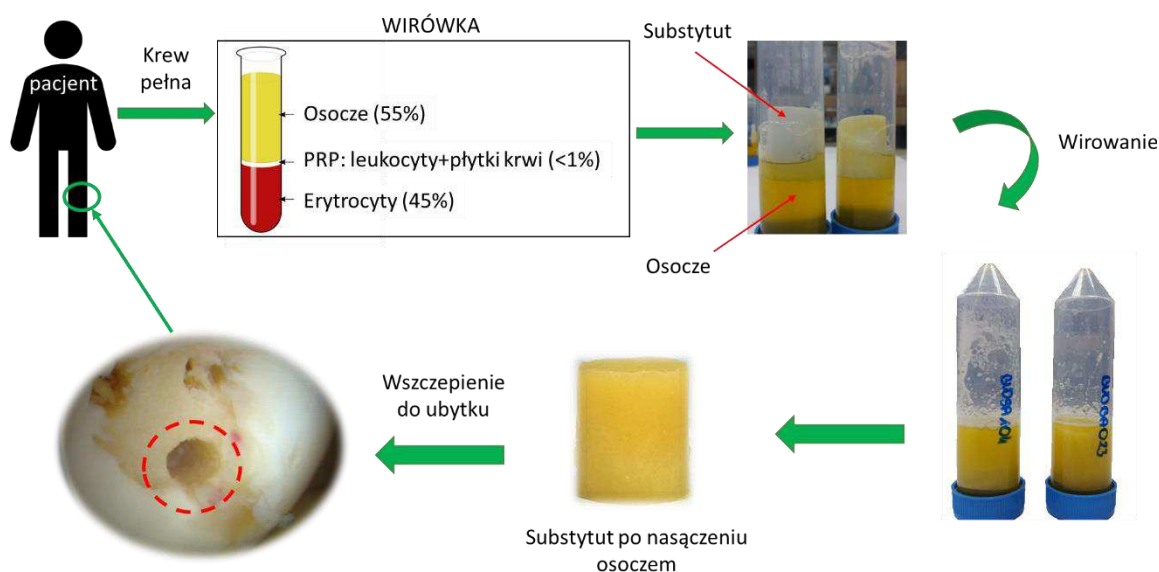
Cecha	wymaganie techniczne	substytut kości gąbczastej		
		PLA	PLA + EE 100	PLA + CaP
porowatość, %	min. 80	96,8	95,4	91,9
rozmiar porów, μm	50–500	50–700	50–300	100–400
nasiąkliwość masowa, %	300	1680	1730	740
obecność perforacji wewnętrznych	+	+	+	+
otwarta struktura porów	+	+	+	+
cytotoksyczność, %	min. 70	>95	ok. 90	pow. 75
hodowla osteoblastów MG 63	+	+	+	+

5.6.6. Zapotrzebowanie na wyniki

Wg danych NFZ rocznie w Polsce wykonuje się 300 tys. zabiegów rekonstrukcji więzadła krzyżowego (ACL) oraz ok. 4,5 tys. resekcji kości gąbczastej w wyniku nowotworów. Ortopedzi zwracają uwagę, że są to dane niedoszacowane, ponieważ nie uwzględniają zabiegów wykonywanych prywatnie.⁸⁴ Statystyki GUS dotyczące Polski podają, że 1 na 1000 mieszkańców doznaje urazu ACL. Zatem można stwierdzić, że istnieje olbrzymie zapotrzebowanie na materiały przyspieszające i poprawiające komfort leczenia tych pacjentów.

Rozwiązaniem może być wykorzystanie opracowanych substytutów jako wypełnienia kanałów kostnych. Szczególnie istotny fragment przygotowania tego materiału, polega na nasączeniu go frakcją bogato-płytkową (PRP), wydzieloną z krwi pobranej od pacjenta (Rysunek 10).^[B7] Po wirowaniu, nasączony osoczem subtytut wkłada się endoskopowo do kanału kostnego. Materiał substytutu z czasem degraduje, a kanał kostny wypełniają komórki gospodarza.

Odbiorcami opracowanych substytutów kości gąbczastej, poza ortopedami, będą stomatolodzy i weterynarze. Odpowiednie implanty mogą wypełniać zębodoły po usunięciu zęba, służyć do odbudowy kości przed założeniem implantów stomatologicznych, wypełniać cysty kostne lub być wykorzystywane w leczeniu zwierząt.



Rysunek 10. Zastosowanie opracowanego implantu kości gąbczastej w rekonstrukcji więzadła krzyżowego.

5.7. Inne materiały do regeneracji tkanek

Równolegle do prac nad implantami chrzęstnymi i kostnymi, poszukiwałam nowych materiałów do regeneracji tych tkanek. W ramach współpracy z IPPT PAN skupiałam się na syntezie materiału, który może być stosowany jako dodatek do opracowanych przeze mnie wcześniej implantów. Jest to poli(sebacynian glicerolu) (PGS), który stale cieszy się

⁸⁴ <https://www.praktycznafizjoterapia.pl/artukul/wspolczesne-poglady-na-temat-leczenia-operacyjnego-i-nieoperacyjnego-zerwanego-wiezadla-krzyzowego-przedniego-kolana>

rosnącym zainteresowaniem wśród naukowców. Szacuje się, że w 2025 r. wartość produkcji PGS przekroczy 81,24 mln \$.⁸⁵

Jest to materiał biodegradowalny i nieimmunogeny. W organizmie ulega biodegradacji do gliceryny i kwasu sebacynowego. Są to pośrednie metabolity w szlakach utleniania kwasów tłuszczowych.

Właściwości tego materiału istotnie zależą od warunków wytwarzania.⁸⁶ Najcenniejszy jest prepolimer, który można następnie przekształcać w inne formy (od wosków po elastomery z pamięcią kształtu). Nie jest on jednak dostępny handlowo.

W ramach badań opracowałam metodę syntezy prepolimeru PGS.[A14] Proces opisano modelami matematycznymi, które pozwalają na otrzymanie, w zależności od temperatury, czasu i stechiometrii reagentów, prepolimeru o pożądanym stopniu estryfikacji oraz polimeru o odpowiednim ciężarze cząsteczkowym. Opracowałam i opatentowałam pierwszą metodę wyodrębniania prepolimeru PGS.[P6] Otrzymywany w ten sposób prepolimer ma postać białego proszku, który może być przechowywany przez długi czas w warunkach bezwodnych.

Na podstawie pomiaru widm w podczerwieni w czasie reakcji wyznaczono kinetykę polikondensacji gliceryny i kwasu sebacynowego.[A15] Wspólnie z pracownikami IPPT PAN wykazaliśmy użyteczność opracowanych przez nas prepolimerów jako dodatków do nanowłóknin wykonanych z PLA i PCL.⁸⁷

⁸⁵ <https://www.gminsights.com/industry-analysis/polyglycerol-sebacate-market>

⁸⁶ Rai, R., Tallawi, M., Grigore, A. & Boccaccini, A. R. Synthesis, properties and biomedical applications of poly (glycerol sebacate)(PGS): A review. *Prog. Polym. Sci.* **37**(8), 1051 (2012).

⁸⁷ Denis, P., Wrzcionek, M., Gadomska-Gajadhur, A. & Sajkiewicz, P. Poly (Glycerol Sebacate)–Poly (L-Lactide) Nonwovens. Towards Attractive Electrospun Material for Tissue Engineering. *Polymers* **11**(12), 2113 (2019).

5.8. Podsumowanie

Regeneracja tkanki chrzęstnej

- 1. Opracowałam i opatentowałam 3 oryginalne warianty metod wytwarzania porowatych rusztowań z polimerów biodegradowalnych do regeneracji tkanki chrzęstnej.**

Opracowane rusztowania mają porowatość powyżej 80%, odpowiadającą wymaganiom dla tkanki chrzęstnej. Rozmiar porów w zależności od metody waha się od 20–150 μm . Charakteryzują się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, modułem Younga powyżej 10 MPa (w większości przypadków), co pozwala na pełnienie funkcji podporowej nowo tworzonej tkanki.

- 2. Wykazałam, że najlepszą morfologię (rozmiar i kształt porów) oraz właściwości mechaniczne mają rusztowania otrzymane metodą „freeze extraction” i dwoma wariantami metody „włókninowej”.**

Wytypowane rusztowania wykazują najlepsze właściwości (moduł Younga, nasiąkliwość masową) i morfologię (rozmiar i kształt porów) do hodowli na nich komórek tkanki chrzęstnej.

- 3. Wykazałam, że w metodzie suchej inwersji faz, w strukturze rusztowania, zachodzi proces samoorganizacji polimeru.**

Struktura wewnętrzna rusztowania zmienia się w zależności od ciężaru cząsteczkowego PLA. Im mniejszy ciężar cząsteczkowy tym bardziej nieregularna morfologia szkieletu. Rusztowania otrzymane z PLA o $M_n < 53 \text{ kg/mol}$ posiadają dodatkowe przestrzenie, w których można immobilizować czynniki wzrostu komórek, np. białka, proteiny lub hormony.

- 4. Wykazałam odporność rusztowań na sterylizację radiacyjną w dawce 18 kGy.**

Dawka 18 kGy jest odpowiednia, gdyż nie powoduje spadku ciężaru cząsteczkowego polimeru, nie zmienia morfologii rusztowania oraz nie wpływa na jego właściwości mechaniczne.

- 5. Wykazałam, że otrzymane rusztowania są nietoksyczne wobec komórek chondrocytów z linii CP5 i pobranych ze stawu biodrowego.**

Wszystkie opracowane rusztowania są nietoksyczne dla badanych komórek. Na wytypowanych do dalszych badań rusztowaniach przeżywalność komórek, po 24 h, wynosi powyżej 90%.

Chondrocyty wyizolowane z głowy stawu biodrowego wykazują intensywny wzrost na opracowanych rusztowaniach z wykorzystaniem nanowłókniny PVP. W ciągu 4 tygodni ich liczba znacznie wzrasta. Rosną zarówno na powierzchniach rusztowania, jak i w jego przelomie.

Regeneracja kości gąbczastej

1. Opracowałam i opatentowałam metodę wytwarzania substytutów kości gąbczastej.

Substytuty charakteryzują się porowatością >90% oraz nasiąkliwością powyżej 1000% (względem i-PrOH i EtOH). Kształt i rozmiar porów (powyżej 80 µm) jest odpowiedni do wzrostu osteoblastów.

2. Opracowałam i zgłosiłam do opatentowania 2 metody hydrofilizacji powierzchni substytutu kości gąbczastej.

W pierwszej metodzie wykorzystuje się kopolimery kwasu metakrylowego (Eudagit®), otrzymując implant(y) o zwiększonej nasiąkliwości (ok. 1600% i-PrOH), ale o niezmienionej porowatości, ok. 95%, w stosunku do próbki referencyjnej.

W drugiej metodzie wykorzystuje się roztwór do biomineralizacji, otrzymując implant(y) o zwiększonej nasiąkliwości (ok. 1300% i-PrOH), ale o nieznacznie zmniejszonej porowatości, ok. 85–90%. Dodatkowo implant zawiera fosforany wapnia osadzone na powierzchniach porów, które mogą zostać wbudowane w nowo tworzącą się kość.

3. Opracowałam oryginalną modyfikację metody biomineralizacji implantów kostnych.

Czas osadzania fosforanów na powierzchni implantu został skrócony z 30 do 7 dni.

4. Wykazałam możliwość nasączenia opracowanego substytutu kości gąbczastej czynnikiem biologicznym, np. osoczem bogato-płytkowym.

W SKG niezależnie od metody wytwarzania można umieścić do 1000% osocza końskiego. Rekomendowaną metodą wprowadzenia czynników wzrostu jest nasączenie implantu a następnie odwirowanie go. Stosując tę metodę można umieścić do 30% więcej substancji niż metodą statyczną.

5. Wykazałam, że na opracowanych materiałach można prowadzić prawidłowe hodowle komórek kostnych (MG 63).

Rusztowania nie są toksyczne dla komórek kostnych. Przeżywalność po 24 h wynosiła >90% w teście bezkontaktowym. W teście kontaktowym komórki kostne rosły w całej objętości substytutu.

6. Opracowałam oryginalną metodę syntezy i oczyszczania prepolimeru poli(sebacynianu glicerolu).

Opracowane modele matematyczne procesu pozwalają na syntezę polimeru „szytego na miarę” do konkretnego zastosowania. Dzięki opracowaniu procedury oczyszczania wydłużono termin korzystania z materiału.

Za moje najważniejsze osiągnięcia naukowe uważam:

1. Opracowanie dwóch rodzajów skafoldów spełniających wymagania do regeneracji tkanki chrzęstnej. Wytypowane skafoldy zostały zakwalifikowane do badań na zwierzętach.
2. Opracowanie substytutu kostnego spełniającego wszystkie wymagania do zastosowania jako wypełnienia kanałów kostnych przy rekonstrukcji więzadła krzyżowego.

5.9. Przyszłe cele badawcze

Dalsze badania zamierzam prowadzić w tematyce biomateriałów. Moje plany naukowe można podzielić na trzy grupy:

1. Regeneracja chrząstki

Wytypowane skafoldy dla chrząstki chcę przebadać z udziałem chondrocytów pozyskanych od pacjentów (hodowla pierwotna). Następnie przeprowadzić badania biochemiczne i fenotypowania komórek namnożonych na skafoldach. Badania te będą prowadzić we współpracy z Poznańskim Uniwersytetem Medycznym (PUM). W efekcie powinnam uzyskać możliwie najlepszą ocenę jakości namnożonych chondrocytów. Na tej podstawie wytypuję rusztowania do badań na zwierzętach (mały model zwierzęcy). W kolejnym etapie będą prowadzone badania odbudowy chrząstki stawowej na dużym modelu zwierzęcym – owca lub koza.

2. Odbudowa kości gąbczastej

Otrzymane substytuty zostały zakwalifikowane do badań na zwierzętach. Ocena została przeprowadzona na podstawie wyników badań na liniach komórkowych i po konsultacjach z ortopedami. Badania te chciałabym zrealizować z udziałem dużego modelu zwierzęcego – owcy wrzosówki. Po wszczępieniu materiału zwierzętom będę wspólnie z weterynarzami przeprowadzić obserwację okołoperacyjną, następnie analizę gojenia oraz analizę pośmiertną. Badania te będę poprowadzić we współpracy z Instytutem Zootechniki PIB oraz Uniwersyteckim Centrum Medycyny Weterynaryjnej UR-UJ w Krakowie. Po wypreparowaniu stawów wykonamy mikrotomograficzną ocenę gęstości i struktury odbudowanej kości gąbczastej (we współpracy ze Śląskim Uniwersytetem Medycznym) oraz badania biomechaniczne połączenia kość-implant (we współpracy z Akademią Górniczo-Hutniczą w Krakowie). Badania będą realizowane w ramach projektu Lider XI „Porowate, biodegradowalne implanty do regeneracji kości gąbczastej” w latach 2021–2023.

Wspólnie z PUM spróbujemy zastosować otrzymane implanty do regeneracji kości gąbczastej w obrębie żuchwy lub twarzoczaszki. W dalszej perspektywie będą wykorzystane do różnicowania komórek macierzystych w kierunku związzków zębowych.

3. Poszukiwanie nowych biomateriałów

Kolejny interesujący mnie temat wiąże się z poszukiwaniem nowych materiałów do odbudowy tkanek. Chciałabym skupić się na polimerach zawierających w swojej

budowie glicerynę oraz nienasycone kwasy wielokarboksylowe. Takie materiały mogą być w łatwy sposób i w łagodnych warunkach wprowadzane w reakcje aza- i tio-Michaela. W wyniku tych procesów można otrzymywać porowate trójwymiarowe sieci polimerowe, do zastosowań w nieinwazyjnej profilaktyce złamań osteoporotycznych. Planuję opracować materiał w formie ciekłego polimeru o małej lepkości, który można wprowadzać nieinwazyjnie (cienką igłą) do kości gąbczastej o obniżonej gęstości. Następnie tym samym otworem byłby wprowadzany czynnik sieciujący z komórkami kostnymi lub macierzystymi. W ubytku kości zachodziłoby sieciowanie i wzmocnienie tego jej fragmentu. Po upływie czasu gojenia, materiał polimerowy ulegałby resorpcji, a komórki w naturalny sposób odbudowywałyby kość gąbczastą.

Drugim zastosowaniem opracowanych przeze mnie materiałów byłaby odbudowa tkanek miękkich, np. naczyń krwionośnych lub mięśnia sercowego.

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Działalność naukową prowadziłam na trzech polach badawczych. Na każdym z nich współpracuję z kilkoma zespołami z różnych instytucji.

1. Współpraca z ośrodkami naukowymi

Obecnie współpracuję i prowadzę badania z dwoma instytutami Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Z zespołem prof. dr hab. Pawła Sajkiewicza (Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN) od 2015 r. prowadzimy bardzo szerokie badania nad nowymi biomateriałami. Warto tutaj wspomnieć o temacie nanowłóknin wytwarzanych przez panią Judytę Dulnik, które wykorzystaliśmy jako nieklasyczne porofory do skafoldów chrzęstnych. W wyniku tych prac powstało kilka artykułów naukowych oraz patent.

Kolejne prace badawcze prowadzę wspólnie z panem Piotrem Denisem w ramach jego grantu Preludium 12 „Elastyczne włókniny z poli(sebacynianem gliceryny) otrzymywane metodą elektroprzędzenia”. Syntezuję i charakteryzuję polimery, które on następnie wykorzystuje do otrzymywania elastycznych nanowłóknin. W efekcie tych prac powstała publikacja. Trzecim zagadnieniem badawczym realizowanym wspólnie są badania z wykorzystaniem komórek kostnych MG 63. Badania prowadzę wspólnie z Panią dr Dorotą Kołbuk-Konieczny. Dzięki tym badaniom powstały dwie publikacje, zgłoszenie patentowe oraz 2 wnioski o granty badawcze (lider 11 oraz sonata 15). Wymiernym efektem naszej aktywności są zrealizowane we współpracy 2 magisterskie prace dyplomowe.

Drugim ośrodkiem, z którym współpracuję jest Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN w Warszawie. Z zespołem prof. dr hab. inż. Andrzeja Chwojnowskiego realizowałam badania dotyczące rusztowań komórkowych do tkanki chrzęstnej. W wyniku tej współpracy powstały liczne patenty oraz publikacje. Dodatkowo zrealizowaliśmy wspólnie interdyscyplinarny doktorat dr inż. Aleksandry Kruk (2019), w którym pełniłam rolę promotora pomocniczego.

Od 2016 r intensywnie współpracuję z dr hab. Krzysztofem Fickiem, prof. AWF Katowice, klinika ortopedii Galen, Bieruń. Nasza wieloletnia współpraca dotyczy

opracowania i wytwarzania nowych produktów dedykowanych ortopedii, m.in. bioresorbowalnym śrubom chirurgicznym o ściśle zdefiniowanym czasie degradacji, nośnikom osocza bogato-płytkowego, stosowanym w regeneracji ubytków kości, czy implantom do zapobiegania złamaniom osteoporotycznym.

Bardzo istotna z punktu widzenia produktów medycznych jest sterylizacja wyrobu. Tutaj nieoceniona okazała się współpraca z Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej. Wspólnie z dr inż. Andrzejem Rafalskim Prowadzimy badania nad odpornością opracowanych przez mnie implantów na promieniowanie radiacyjne.

Od 2015 r współpracuję ze Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Razem z panią dr Beatą Dasiewicz i panią prof. Elżbietą Cichal-Paduch prowadzimy badania nad analizą składu chemicznego olejków pozyskiwanych z różnych rodzajów mięty, werben, tymianku i szalwii. Efektem tej współpracy są 2 artykuły naukowe oraz wniosek o grant badawczy OPUS.

W latach 2015–2018 współpracowałam z mgr Dominikiem Kłudkiewiczem z Narodowego Centrum Badań Jądrowych, OR POLATOM, w Świerku. Nasze prace badawcze skupiały się na otrzymywaniu estrów kwasów fosfonowych stosowanych do przygotowywania radiofarmaceutyków znakowanych technetem. Zestawy te są wykorzystywane w diagnostyce chorób kości. Efektem tej współpracy jest wspólna praca dyplomowa.

2. Współpraca z przemysłem (ośrodki badawczo-rozwojowe)

Współpraca z szeroko rozumianym przemysłem jest dla mnie równie ważna jak współpraca z ośrodkami naukowymi. Niestety wiąże się ona z częstym ograniczeniem w publikowaniu ze względu na umowy o poufności.

Od 2014 r współpracuję z lek. wet. Dariuszem Skrzypkiem z *Lecznicy dla zwierząt Dobre*. Nasza współpraca polega na wykorzystaniu preparatów odzwierzęcych (krwi, osocza, osocza bogato-płytkowego) w badaniach biomateriałów.

Od 2017 r. współpracuję z Firmą *BELL PPHU*. Naszym zadaniem jest opracowanie innowacyjnych otoczek do pigmentów oraz ocena stabilności kosmetyków kolorowych. W efekcie tej współpracy powstały artykuły naukowe, prace dyplomowe oraz pierwsze wdrożenie.

3. Współpraca wewnątrz Politechniki Warszawskiej

Staram się również współpracować z zespołami badawczymi działającymi na terenie Politechniki Warszawskiej. Od 2012 prowadzę badania wspólnie z zespołem *dr hab. Jolanty Mierzejewskiej, prof. PW z Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków (WCh PW)*. Prowadziłyśmy badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej nowych form leków, badanie aktywności nośników leków, proleków wielkocząsteczkowych, wyznaczanie kinetyki uwalniania API z form leków. Efektem są 2 artykuły naukowe oraz patent.

Od 2016 r. współpracuję z *dr inż. Michałem Młotkiem z Katedry Technologii Chemicznej (WCh PW)*. Prowadzimy badania modyfikacji plazmowej porowatych rusztowań komórkowych przeznaczonych do hodowli chondrocytów celem zwiększenia hydrofilowości powierzchni materiału. Efektem współpracy są prace dyplomowe oraz przygotowany artykuł.

Od 2019 r. współpracuję z zespołem *dr hab. Macieja Pilarka, prof. PW z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW*. Wspólnie badamy hodowle komórkowe fibroblastów (L929) i chondrocytów (CP5) na opracowywanych przeze mnie nośnikach. Opublikowaliśmy jeden rozdział w monografii pokonferencyjnej oraz przygotowaliśmy artykuł naukowy, który jest w recenzji. Wspólnie zrealizowaliśmy badania do pracy dyplomowej Karoliny Łojek.

Współpraca międzynarodowa to głównie realizowanie projektów B+R dla firm zagranicznych. Od 2019 r. uczestniczę w projekcie zlecanym przez BASF Ludwigshafen, dotyczącym zaprojektowania nowej linii technologicznej.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

7.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Moja działalność dydaktyczna jest związana z Wydziałem Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W latach 2010–2018 z Laboratorium Procesów Technologicznych, a od 2019 r. z Katedrą Chemii i Technologii Polimerów, gdzie opracowałam i prowadzę następujące zajęcia:

Kierunek Technologia Chemiczna, profil praktyczny:

- Przemysł chemiczny w Polsce i na Świecie – wykład (15 h, kierownik przedmiotu)
- Przemysł chemiczny w Polsce i na Świecie – seminarium (15 h, kierownik przedmiotu)
- Projektowanie procesów technologicznych – projekt we współpracy przemysłowej (60 h, kierownik przedmiotu)

Kierunek Technologia Chemiczna, profil ogólnoakademicki:

- Projektowanie procesów technologicznych – laboratorium komputerowe (30 h, współprowadzący);
- Projektowanie procesów technologicznych – projekt (30 h, współprowadzący);
- Technologia produktów farmaceutycznych – wykład (10 h, współprowadzący);
- Laboratorium technologiczne – laboratorium badawcze (75 h, kierownik przedmiotu);
- Laboratorium technologiczne – projekt (30 h, kierownik przedmiotu);
- Optymalizacja i sterowanie procesami technologicznymi – wykład (15 h, kierownik przedmiotu).

Kierunek Biotechnologia:

- Projektowanie procesów biotechnologicznych – projekt (45 h, współprowadzący).

Kierunek Biogospodarka:

- Naturalne prekursorzy substancji aktywnych biologicznie – wykład (30 h, kierownik przedmiotu);
- Technologie wykorzystujące surowce odnawialne – laboratorium badawcze (30 h, kierownik przedmiotu);

- Projektowanie procesów technologicznych – laboratorium komputerowe (30 h, współprowadzący);
- Projektowanie procesów technologicznych – projekt (30 h, współprowadzący).

Kierowanie pracami dyplomowymi

Jestem kierującym i opiekunem merytorycznym prac inżynierskich i magisterskich realizowanych przez studentów kierunku Technologia Chemiczna i Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej oraz we współpracy w jednostkami zewnętrznymi. Dotychczas zrealizowano następujące prace dyplomowe:

Lp.	Imię i nazwisko dyplomanta	Temat pracy	Rodzaj	Rok obrony
1	Adrianna Padewska	Ocena wybranych właściwości polilaktydowych substytutów kości gąbczastej modyfikowanych polimerami naturalnymi	Magisterska	2020
2	Monika Kotlewska	Wpływ mikrowypełniaczy na strukturę i stabilność sztyftowych produktów kosmetycznych	Magisterska	2020
3	Wiktoria Kolec	Proszkowe produkty kosmetyczne formowane z zawiesin wodnych – otrzymywanie i ocena właściwości	Inżynierska	2020
4	Katarzyna Jagiełło	Optymalizacja właściwości rusztowań komórkowych do regeneracji chondrocytów z wykorzystaniem procesu biomineralizacji	Inżynierska	2020
5	Marta Sikorska	Ocena potencjalnych właściwości kościotwórczych wybranych modyfikacji polilaktydowych substytutów kości gąbczastej	Inżynierska	2020
6	Karolina Łojek	Otrzymywanie i ocena wzrostu chondrocytów na poliestrowych rusztowaniach komórkowych	Magisterska	2019
7	Urszula Stodulska	Otrzymywanie i zbadanie właściwości użytkowych skafoldów z polilaktydu i poli(sebacynianu glicerolu)	Magisterska	2019
8	Karolina Walkowiak	Badanie stabilności sztyftowych produktów kosmetycznych z dodatkiem lecytyny	Magisterska	2019
9	Adrianna Padewska	Modyfikacje substytutów kości gąbczastej za pomocą polimerów naturalnych	Inżynierska	2019
10	Monika Łabęcka	Otrzymywanie rusztowań komórkowych z poli(sebacynianu glicerolu)	Magisterska	2018
11	Marcin Dziedzic	Otrzymywanie kopolimeru poli-L-laktydu i poli-L-lizyny	Magisterska	2018
12	Karolina Łojek	Otrzymywanie skafoldów z poli-ε-kaprolaktonu metodą mokrej inwersji faz	Inżynierska	2018
13	Urszula Stodulska	Otrzymywanie i zbadanie właściwości użytkowych skafoldów polilaktydowych	Inżynierska	2018
14	Justyna Sasiadek	Otrzymywanie kopolimeru poli(sebacynianu glicerolu) i poli(L-laktydu) i wykorzystanie go w metodzie elektroprzędzenia	Magisterska	2018

Załącznik nr 3 do wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego,
dr inż. Agnieszka Anna Gadomska-Gajadur

15	Łabęcka Monika	Otrzymywanie skafoldów polilaktydowych metodą freeze extraction oraz suchej inwersji faz	Inżynierska	2017
16	Łaskowska Magdalena	Otrzymywanie porowatych implantów kostnych	inżynierska	2017
17	Joanna Trzaskowska	Otrzymywanie i ocena właściwości porowatych implantów kostnych	magisterska	2017
18	Monika Wrzosek	Otrzymywanie biodegradowalnych poliestrów zakończonych β-alaniną i kwasem glutaminowym	magisterska	2017
19	Joanna Trzaskowska	Opracowanie technologii wytwarzania kwasu metylenodifosfonowego (MDP) stosowanego do otrzymywania zestawów radiofarmaceutycznych do znakowania technetem (^{99m} Tc)	inżynierska	2016
20	Monika Wrzosek	Synteza polilaktydu modyfikowanego β-alaniną lub kwasem glutaminowym - regulatorów wzrostu komórek	inżynierska	2016

Opieka nad pracami dyplomowymi:

Lp.	Imię i nazwisko dyplomanta	Temat pracy	rodzaj	Rok obrony
1	Michał Wrzecionek	Synteza i wytwarzanie nanowłóknin z poli(bursztynianu glicerolu)	magisterska	2018
2	Agnieszka Pajkowska	Otrzymywanie poli(D,L-laktydu) z wykorzystaniem katalizatorów biozgodnych	inżynierska	2018
3	Vanessa Bijak	Synteza i badania in vitro biodegradowalnych proleków chlorofenezyny	magisterska	2017
4	Monika Budnicka	Otrzymywanie i badania in vitro nanosfer polilaktydowych z izoniazydem	magisterska	2016
5	Monika Łątka	Optymalizacja enkapsulacji izoniazydu – leku przeciwgruźliczego	inżynierska	2015
6	Agnieszka Przybysz	Otrzymywanie hybrydowych nanosfer zawierających chlorofenezynę	magisterska	2015
7	Emilia Wojtkiewicz	Otrzymywanie i ocena aktywności biologicznej systemów leków o kontrolowanym czasie uwalniania zawierających leki przeciwzapalne	magisterska	2015
8	Aleksandra Kruk	Optymalizacja procesu enkapsulacji neomycyny – naturalnego antybiotyku produkowanego przez <i>Streptomyces fradiae</i>	magisterska	2014
9	Vanessa Bijak	Otrzymywanie fungicydostatycznego produktu farmaceutycznego zawierającego chlorofenezynę związaną z matrycą polimerową	inżynierska	2014
10	Agnieszka Przybysz	Otrzymywanie nanosfer polilaktydowych zawierających chlorofenezynę – lek fungicydostatyczny	inżynierska	2014
11	Emilia Wojtkiewicz	Otrzymywanie połączeń lek–polilaktyd metodami enzymatycznymi,	inżynierska	2013

12	Aneta Zajęc	Otrzymywanie połączeń lek-polilaktyd metodami chemicznymi	inżynierska	2013
13	Ilona Warych	Otrzymywanie systemów leków o kontrolowanym czasie uwalniania metodą enkapsulacji	Magisterska	2013

Od 2014 roku pełnię rolę promotorstwo pomocnicze następujących prac doktorskich:

Lp.	Imię i nazwisko doktoranta	Temat pracy	Data /przewidywana data obrony	rodzaj
1	Aleksandra Kruk	Biodegradowalne polimerowe rusztowania przeznaczone do hodowli chondrocytów	18.II.2019	interdyscyplinarny /wieloośrodkowy
2	Monika Budnicka	Otrzymywanie i charakteryzacja rusztowań z polilaktydu do regeneracji kości gąbczastej	27.XI.2020	normalny
3	Michał Wrzecionek	Poliestry glicerolu do zastosowań medycznych Laureat Diamentowego Grantu	X.2022	normalny
4	Anna Laudańska- Maj	Wpływ dodatków na stabilność sztyftowych produktów kosmetycznych	X.2021	wdrożeniowy
5	Magdalena Nalepa	Opracowanie i ocena właściwości nowych, proszkowych produktów kosmetycznych	X.2022	wdrożeniowy

7.2. Osiągnięcia organizacyjne

Funkcje pełnione w miejscu pracy:

- Od 2018 r. jestem członkiem Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej;
- Od 2019 r. jestem członkiem komisji dziekańskiej ds. promocji i informacji Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej;
- Od 2017 r. jestem członkiem komisji ds. utworzenia praktycznego profilu kształcenia na kierunku Technologia Chemiczna, na Wydział Chemicznym PW;
- W 2015 r. byłam uczestnikiem zespołu do opracowania nowego, międzyuczelnianego kierunku studiów „Biogospodarka”, który został wprowadzony od roku akademickiego 2016/17;
- Od 2017 r. członek komisji dziekańskiej ds. utworzenia Warszawskiego Chemicznego Parku Naukowo-Technologicznego na Wydziale Chemicznym PW;
- Ekspert w komisjach ds. obron inżynierskich z zagadnień Technologia II (2015/2016);
- Ekspert w komisjach ds. obron inżynierskich z zagadnień Technologia II (2016/2017, 2017/18, 2018/19, 2019/20) i Technologia na kierunku Biotechnologia.

Organizacja konferencji

- Organizacja konferencji Mikrosymposium "Innowacja jest interdyscyplinarna", 20-05-2016, Warszawa;
- Członek komisji naukowej, w: I Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców - Azymut 2015, 17-06-2015 Warszawa.

7.3. Popularyzacja nauki

- Opiekun wolontariatów naukowych studentów w roku akademickim 2015/16; 2016/17, 2017/18, 2018/19;
- Opiekun stażu licealisty w roku akademickim 2017/18, 2018/2019, 2019/20, 2020/21;
- Opiekun Indywidualnych Programów Studiów (czterech studentów),
- Prowadzący zajęcia dla uczniów w ramach ADAMED SmartUp Academy w latach 2019–2021.

8. Informacje dodatkowe

8.1. Uzyskane patenty

1. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, J. Trzaskowska, A. Kruk, M. Budnicka **Sposób wytwarzania dynamicznego substytutu kości gąbczastej** PL 236111, zgłoszenie 2018, przyznany 2020.
1. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, M. Wrzecionek, G. Matyszczak, J. Stadnik, K. Jastrzębska **Sposób wytwarzania prepolimeru poli(sebacynianu glicerolu) i metoda jego oczyszczania** PL234639, zgłoszenie 2018, przyznany 2020.
2. A. Gadomska-Gajadhur, A. Kruk, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, A. Sebai, I. Rykaczewska, M. Łabęcka **Sposób wytwarzania dwufunkcyjnych polilaktydowych skafoldów przeznaczonych do hodowli komórkowych** PL234640, zgłoszenie 2018, przyznany 2020.
3. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, A. Kruk, L. Synoradzki, A. Chwojnowski, **Sposób wytwarzania trójwymiarowych polilaktydowych dwuwarstwowych skafoldów do hodowli ekwiwalentów skóry** PL 229497, zgłoszenie 2015, przyznany 2018.
4. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, A. Kruk, L. Synoradzki, A. Chwojnowski **Sposób wytwarzania polilaktydowych skafoldów gąbczastych do hodowli nabłonka walcowatego** PL 230136, zgłoszenie 2015, przyznany 2018.
5. A. Gadomska-Gajadhur, A. Kruk, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, A. Chwojnowski, E. Łukowska, C. Wojciechowski, J. Dulnik, P. Denis, P. Sajkiewicz, **Szerokoporowate rusztowanie komórkowe typu 3D z poliestrów i sposób jego otrzymywania**, zgłoszenie: P-414353, zgłoszenie 2015, przyznany 2018
6. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki **Sposób wytwarzania polilaktydu do celów medycznych**, PL 225851, zgłoszenie 2014, przyznany 2016.

7. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, A. Jerzak **Sposób otrzymywania 2-etyloheksanianów wapnia, magnezu i cynku**, PL 225850, zgłoszenie 2014, przyznany 2016.
8. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, E. Wojtkiewicz **Sposób wytwarzania amidu kwasu L-mlekowego i 4-aminofenolu**, PL 224664, zgłoszenie 2014, przyznany 2016
9. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, J. Mierzejewska, E. Wojtkiewicz, A. Parzyszek **Sposób wytwarzania połączeń polilaktydu z pochodnymi fenolu**, PL 409280, zgłoszenie 2014, przyznany 2017.
10. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, I. Warych, A. Przybysz, V. Bijak **Sposób wytwarzania nanosfer polilaktydowych z substancją farmaceutycznie czynną**, PL 225920, zgłoszenie 2014, przyznany 2016.
11. K. Bujnowski, L. Synoradzki, R. Zadrozny, K. Dzień, J. Wisiański, A. Jerzak, M. Strzelec, P. Ruśkowski, R. Przedpełska, M. Koziorowski, A. Gadomska-Gajadhur, J. Sirak **Sposób wytwarzania katalizatora na bazie 2-etyloheksanianu Sn(II)**, PL 225745, zgłoszenie 2014, przyznany 2016.
12. Z. Ochal, A. Gadomska **Sposób otrzymywania enancjomerów 2-(1-metylo-2-pirolidyno)etanolu**, PL 218348, zgłoszenie 2011, przyznany 2014.

8.2. Zgłoszenia patentowe

1. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, M. Łabęcka, K. Łojek, U. Stodulska, M. Wrzecieć, M. Więćław **Sposób wytwarzania rusztowania komórkowego o dużej elastyczności** P.433698, 2020.
2. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, M. Wrzecieć, K. Kolankowski **Atrament do druku 3D w technologii reaktywnego atramentu (RIP), sposób jego wytwarzania i utwardzania oraz jego zastosowanie** P.435351, 2020.
3. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, M. Wrzecieć, E. Dutkowska, M. Więćław **Sposób wytwarzania termowrażliwego materiału na bazie kwasu cytrynowego** P.431368, 2019.
4. A. Gadomska-Gajadhur, M. Budnicka, P. Ruśkowski, A. Padewska **Sposób wytwarzania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej** P.430996, 2019.
5. A. Gadomska-Gajadhur, M. Budnicka, P. Ruśkowski, D. Kołbuk-Konieczny **Sposób otrzymywania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej (2)** P.430802, 2019
6. P. Ruśkowski, A. Sebai, A. Gadomska-Gajadhur, L. Synoradzki, A. Kruk, M. Ezman **Sposób wytwarzania pochodnych morfolino-2,5-dionów przez cyklizację N-(2-haloacylo)-a-aminokwasów** P.424206, 2018.
7. A. Gadomska-Gajadhur, M. Budnicka, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, M. Szymaniak, M. Wrzecieć **Sposób hydrofilizacji dynamicznego polilaktydowego substytutu kości gąbczastej** P.426820, 2018.
8. A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, M. Wrzecieć, D. Kołbuk-Konieczny, O. Jeznach, M. Budnicka, M. Szymaniak **Sposób otrzymywania poli(bursztynianu glicerolu)** P.426830, 2018.

9. A. Gadomska-Gajadhur, M. Budnicka, P. Ruśkowski, L. Synoradzki, A. Tytman, M. Szymaniak **Sposób wytwarzania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej o zwiększonej hydrofilowości** P.426819, 2018.

8.3. Know-how

1. K. Bujnowski, L. Synoradzki, R. Zadrozny, K. Dzienis, J. Wisialski, A. Jerzak, M. Strzelec, P. Ruśkowski, A. Gadomska-Gajadhur, R. Przedpeńska, M. Koziorowski **Procedura technologiczna wytwarzania katalizatora na bazie 2-etyloheksanianu Sn(II) skala laboratoryjna**, WP/11/14, 04.02.2014 r.
2. A. Jerzak, M. Strzelec, P. Ruśkowski, B. Filipiak, L. Synoradzki, J. Wisialski, K. Bujnowski, A. Gadomska-Gajadhur **Sposób oznaczania czystości chemicznej oktanianu wapnia poprzez analizę zawartości wapnia po wcześniejszej mineralizacji próbki**, WP/95/13, 20.12.2013 r.
3. A. Jerzak, M. Strzelec, P. Ruśkowski, B. Filipiak, L. Synoradzki, J. Wisialski, K. Bujnowski, A. Gadomska-Gajadhur **Sposób oznaczania czystości chemicznej oktanianu cynku poprzez analizę zawartości cynku po wcześniejszej mineralizacji próbki**, WP/96/13, 20.12.2013 r.
4. A. Jerzak, M. Strzelec, P. Ruśkowski, B. Filipiak, L. Synoradzki, J. Wisialski, K. Bujnowski, A. Gadomska-Gajadhur **Sposób oznaczania czystości chemicznej oktanianu magnezu poprzez analizę zawartości magnezu po wcześniejszej mineralizacji próbki**, WP/94/13, 20.12.2013 r.
5. P. Ruśkowski, L. Synoradzki, J. Wisialski, Z. Florjańczyk, M. Legocki, S. Czarnocka-Śniadała, U. Bernaś, A. Gadomska, H. Hajmowicz, A. Plichta, K. Bujnowski, A. Jerzak, R. Pindelski, M. Majkowska-Heine, J. Sirak, K. Zawada, P. Domagański, A. Grotkowski, J. Klemczyński, M. Koziorowski, R. Przedpeńska, M. Strzelec, S. Szymczak **Sposób otrzymywania L-polilaktydu**, WP/53/10, 23.12.2010.

8.4. Wdrożenia

Wdrożenie w firmie BELL PPHU szminki z dodatkiem lecytyny. Jest to produkt o poprawionej trwałości i stabilności (2020 r.)

8.5. Doświadczenie zdobyte poza Uczelnią

<i>17.07- 31.07.2019</i>	Staż badawczy w klinice Galen - ortopedia w Bieruniu. Temat stażu: wydruki implantów 3D na podstawie obrazów RTG i Tomografii komputerowej;
<i>1.07.- 31.07.2009</i>	Grodziskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfar”, badanie mikrobiologicznej czystości gotowych produktów farmaceutycznych, monitoring czystości mikrobiologicznej linii produkcyjnej;
<i>1.07.- 31.08.2008</i>	Regionalny Zarząd Gospodarki Wodnej w Warszawie, zasady gospodarowania funduszami Unijnymi w zakresie ochrony środowiska.

8.6. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

Jestem członkiem dwóch krajowych towarzystw naukowych. Od 2017 r. jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Inżynierii Biomedycznej (PTIB). Od 2017 r. jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Membranowego (PTMem). Od 2019 r. pełnię w nim funkcję wiceprzewodniczącego sądu koleżeńkiego.

8.7. Aktywność recenzencka

W latach 2017–2020 wykonałam 15 recenzji na rzecz renomowanych czasopism naukowych, tj:

- Macromolecules (1)
- Polimery (3)
- MDPI Materials (3)
- MDPI Polymers (1)
- MDPI Biomimetics (1)
- MDPI Fibres (1)
- Acta of Bioengineering and Biomechanics (1)
- Journal of Applied Polymer Science (1)
- Biocybernetics and Biomedical Engineering (2)
- Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (1)

8.8. Referaty na międzynarodowych i krajowych konferencjach

Mój dorobek konferencyjny zawiera 118 pozycji. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora uczestniczyłam w 34 konferencjach naukowych, na których wygłosiłam 19 referatów oraz zaprezentowałam 15 plakatów.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora mój dorobek konferencyjny zwiększył się o kolejne 84 pozycje. Wyniki moich prac były prezentowane w formie 1 wykładu na zaproszenie, 53 prezentacji ustnych i 30 plakatów. Dokładna lista konferencji znajduje się w **Załączniku 4**.

8.9. Międzynarodowe i krajowe nagrody

- Nominacja w konkursie Naukowiec Przyszłości 2021 w kategorii Nauka dla lepszego życia w przyszłości za projekt: „Porowate, biodegradowalne implanty do regeneracji kości gąbczastej” zorganizowanej przez Centrum Inteligentnego rozwoju
- Nominacja do nagrody Symbol Synergii Nauki i Biznesu 2020 za realizację projektu pn.: „Porowate, biodegradowalne implanty do regeneracji kości gąbczastej
- Nagroda rektora PW II stopnia za osiągnięcia dydaktyczne w latach 2018/2019
- I miejsce za najlepszy plakat pt: „Biodegradowalne, polimerowe rusztowania komórkowe do regeneracji chondrocytów” na konferencji "Modyfikacja Polimerów 2019”
- Złoty medal za "A method of producing a dynamic spongy bone substitute with related solutions" na International Warsaw Invention Show, IWIS 2019

- Nagroda Rektora PW I stopnia za osiągnięcia naukowe w latach 2017/2018
- **Wyróżnienie** w konkursie Student-Wynalazca 2019 (nagroda zespołowa) za wynalazki pt. „Sposób wytwarzania dynamicznego substytutu kości gąbczastej wraz z powiązаныmi rozwiązaniami”.
- **I nagroda za najlepszy plakat** pt: " Optimization of the process of obtaining biodegradable, porous, polylactide bone implants" podczas XIV Szkoły Membranowej, Od badań podstawowych do wdrożenia, Wilga 22–25.10.2017
- **Najlepszy poster** prezentowany w sesji plakatowej nr III podczas Interdyscyplinarnej Konferencji Młodych Naukowców KO-OPER FIELD 2016, 2016.
- **Najlepszy poster prezentowany** w sesji plakatowej nr IV podczas Interdyscyplinarnej Konferencji Młodych Naukowców KO-OPER FIELD 2016,
- **Nagroda Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, Oddział Katowicki, za najlepszy poster prezentowany podczas IV ogólnopolskiej konferencji naukowej pt. Pomiędzy Naukami - zjazd fizyków i chemików, 2015.
- **Wyróżnienie za najlepszy komunikat** naukowy wygłoszony na VI Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim "Enzymatyczna polimeryzacja laktydu z otwarciem pierścienia", 2012.
- **Stypendium Marszałka Województwa Mazowieckiego** "Rozwój nauki - rozwojem regionu - stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów"2013

8.10. Projekty badawcze

Kierowanie projektami:

- „Porowate, biodegradowalne implanty do regeneracji kości gąbczastej” 0010/L-11/2019, Lider 11 NCBR, 1 499 375 PLN, 1.01.2021–31.12.2023.
- „Otrzymywanie i badanie właściwości rusztowań komórkowych z poli(cytrynianu glicerolu)” 2019/03/X/ST5/01208, Miniatura 3 NCN, 49 500 PLN, 19.12.2019–19.12.2020.
- „Rusztowania komórkowe o zwiększonej hydrofilowości i elastyczności do regeneracji tkanki chrzęstnej - wytwarzanie i ocena właściwości.” 504/03982/1021/42.000100 środki krajowe, własny, 25 000 PLN, 01.08.2018–30.06.2019.
- „Poliestry glicerolu i kwasów dikarboksylowych jako potencjalne biomateriały do zastosowań w inżynierii tkankowej” 514/00155/1020/03.010100, środki krajowe MNiSW, rozwojowy 15 477 PLN, 01.07.2018–30.04.2019.
- „Przeprowadzenie badań charakteryzacji i hodowli chondrocytów ludzkich na otrzymanych biodegradowalnych rusztowaniach komórkowych” 504/03357/1021/42.000100, środki krajowe, własny 25 000 PLN, 01.07.2017–31.12.2017.

Wykonawca

- projekt przemysłowy zlecony przez ORLEN dotyczący procesu ciągłego otrzymywania węglanu etylenu (306 000 PLN)
- projekt przemysłowy zlecony przez BASF Ludwigshafen (utajniony) dotyczący modyfikacji istniejącej linii technologicznej nr 501/250/100/154.
- projekt POIG 01.01.02-10-025/09 „Technologia otrzymywania biodegradowalnych poliestrów z wykorzystaniem surowców odnawialnych” (samodzielny technolog)

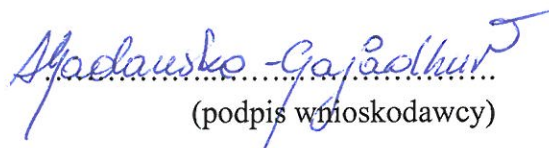
- projekt badań stosowanych PBS2/A1/12/2013 „Technologia wytwarzania laktydów z kwasu mlekowego” (wykonawca)
- projekt badań stosowanych PBS2/A1/14/2014 „*Chemia i technologia chiralnych kwasów dikarboksylowych i ich pochodnych*” (samodzielny technolog)
- projekt w ramach szybkiej ścieżki POIR.01.01.01-00-0044/16 „*Pierwsza polska biodrulkarka dedykowana do implantów wchłaniających (BioCloner)*” (wykonawca)

9. Podsumowanie dorobku naukowego i wskaźniki bibliometryczne

dane naukometryczne	Przed doktoratem (2010–2014)			Po doktoracie (2015–2020)			suma
	liczba	IF	Pkty MNiSW	liczba	IF	Pkty MNiSW	
artykuły	1	0,4	40 (15)	41	51,032	2153 (1893)	42
- z IF	1	0,4	40 (15)	26	51,032	2100 (1840)	27
- inne	0	-	0	15	-	53	15
Podręczniki akademickie	0	-	-	1	-	-	1
rozdziały w monografiach	3	-	10	28	-	90	31
zgłoszenia patentowe	4	-	0	9	-	0	9
patenty	1	-	75(30)	12	-	900	13
know how	5	-	145	0	-	0	5
wdrożenia	0	0	0	1	-	-	1
suma	14	-	270 (200)	92	-	3143 (2936)	102
Wystąpienia konferencyjne	34	-	-	84	-	-	118
projekty badawcze	2	-	-	9	-	-	11
	WOS	Scopus*	GS	WOS	Scopus*	GS	
sumaryczna liczba cytowań	0	0	1	83	66	151	
- bez autocytyowań	0	0	bd	18	-	bd	
indeks Hirscha	0	0	1	6	6	7	

WOS – Web of Science, GS – Google Scholar

* w bazie Scopus brakuje 3 prac z lat 2014-2016 (wskaźniki mogą być zaniżone)


(podpis wnioskodawcy)

Stan na dzień: 8.12.2020