

INSTYTUT PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI
POLSKA AKADEMIA NAUK



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Biodegradowalne dwuskładnikowe materiały polimerowe
formowane metodą elektroprzędzenia – wpływ rozpuszczalnika, sieciowania
i funkcjonalizacji na wybrane właściwości i odpowiedź komórkową**

Biodegradable bicomponent polymer materials formed by electrospinning – influence of solvent, crosslinking, and functionalization on selected properties and cellular response

mgr inż. Judyta Dulnik

Praca wykonana w Samodzielnej Pracowni Polimerów i Biomateriałów

Pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Pawła Łukasza Sajkiewicza

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Dorota Kołbuk-Konieczny

WARSZAWA 2025

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy były częścią trzech projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki – OPUS o numerach 2013/09/B/ST8/03463 i 2016/23/B/ST8/03409, oraz PRELUDIUM o numerze 2015/17/N/ST8/02027.



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

Składam serdeczne podziękowania

Panu Profesorowi Pawłowi Łukaszowi Sajkiewiczowi za życzliwość, opiekę i udzieloną mi wartościową pomoc merytoryczną na każdym etapie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej – poprzez lata badań jak i w trakcie jej pisania.

Pani Doktor Habilitowanej Dorocie Kołbuk-Konieczny za wsparcie merytoryczne, niezliczone cenne wskazówki oraz motywację, które niezmiernie pomogły mi w dążeniu do celu jakim jest obrona doktoratu.

Koleżankom i Kolegom z Samodzielnej Pracowni Polimerów i Biomateriałów, od których w ciągu lat wiele się nauczyłam, którzy ofiarowywali mi pomoc i wsparcie, nie tylko naukowe, oraz tworzyli przyjazną atmosferę sprzyjającą pracy badawczej.

Wszystkim Bliskim, którzy wierzyli we mnie i wspierali mnie na każdym etapie mojej drogi naukowej oraz podczas pisania tej rozprawy doktorskiej.

Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska podsumowuje badania dotyczące biodegradowalnych dwuskładnikowych włóknin formowanych w procesie elektroprzędzenia, zawierających poliester alifatyczny oraz dodatek białkowy – kolagen lub żelatynę, przeznaczonych na rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej. Zakres prac obejmował badania wpływu rozpuszczalnika wykorzystywanego do przygotowania roztworów polimerowych do procesu elektroprzędzenia, sieciowania dodatku białkowego we włóknach oraz funkcjonalizacji powierzchni włókien na wybrane właściwości formowanych włóknin, w tym również na odpowiedź komórkową. Jednym z celów było opracowanie nowego, mniej toksycznego systemu rozpuszczalnikowego, alternatywnego wobec silnie toksycznych alkoholi fluorowanych stosowanych w elektroprzędzeniu tego typu materiałów, umożliwiającego otrzymywanie włóknin o morfologii i właściwościach zbliżonych do uzyskiwanych przy użyciu klasycznych rozpuszczalników. W tym celu z powodzeniem zastosowano mieszankę kwasu octowego i mrówkowego. Zaobserwowana emulsyjność roztworów polimerowych opartych o tę mieszankę była wynikiem słabszych oddziaływań polimer-rozpuszczalnik skutkujących inną konformacją cząsteczek polimeru niż w przypadku zastosowania alkoholu fluorowanego. Konsekwencją tego były słabe oddziaływania polimer-polimer, prowadzące do częściowej segregacji obu polimerów w roztworze, co potwierdzono badaniami lepkości. Szybkie wymywanie dodatku białkowego w warunkach naśladujących fizjologiczne dla materiałów dwuskładnikowych elektroprzędzonych z użyciem nowego systemu rozpuszczalnikowego było następstwem emulsyjnego charakteru roztworu polimerowego. Stało się to punktem wyjścia do badań nad sieciowaniem włóknin dwuskładnikowych w celu poprawienia stabilności dodatku białkowego i jego bioaktywności. Rezultatem badań porównawczych i optymalizacyjnych grupy czterech chemicznych metod sieciowania włóknin zawierających polikaprolakton i żelatynę, było zidentyfikowanie najszybszej i najwydajniejszej z metod, określenie optymalnych czasów reakcji oraz stężeń reagentów koniecznych do zapewnienia stabilności dodatku białkowego w materiale. Ostatnia część badań dotyczyła alternatywnego podejścia do otrzymywania materiałów dwuskładnikowych – nie poprzez elektroprzędzenie mieszanek polimerów, a wykorzystując funkcjonalizację powierzchni materiału z poliestru alifatycznego z użyciem białka. Zbadano trzy metody aktywacji powierzchni materiałów – hydrolizę zasadową, aminolizę i zimną plazmę tlenową i określono wpływ każdej z nich na stabilność przyłączenia żelatyny oraz na szereg innych właściwości tak otrzymanych materiałów dwuskładnikowych.

Abstract

This doctoral dissertation summarizes research on biodegradable bicomponent nonwoven materials formed by electrospinning, containing an aliphatic polyester and a protein additive – collagen or gelatin, intended as cellular scaffolds for tissue engineering. The scope of the research included investigating an influence of the solvent used for preparing polymer solutions for electrospinning, the crosslinking of the protein within the fibers, and the surface functionalization of fibers on selected properties of the resulting nonwovens, including the cellular response. One of the objectives was to develop a new, less toxic solvent system, as an alternative to the highly toxic fluorinated alcohols commonly used in electrospinning of this type of materials, which would enable to obtain nonwovens with morphology and properties comparable to those produced with conventional solvents. For this purpose, a mixture of acetic acid and formic acid was successfully applied. The observed emulsive character of polymer solutions based on this mixture resulted from weaker polymer-solvent interactions, leading to a different polymer chain conformation compared to solutions prepared with fluorinated alcohols. As a consequence, weak polymer-polymer interactions resulted in partial segregation of the two polymers in solution, which was confirmed by viscosity measurements. The rapid leaching of the protein additive under physiological-like conditions from bicomponent electrospun materials obtained using the new solvent system was a direct consequence of the emulsive character of the polymer solution. This observation served as the starting point for studies on crosslinking bicomponent nonwovens in order to improve the stability of the protein component and its bioactivity. As a result of comparative and optimization research of four chemical crosslinking methods applied to polycaprolactone and gelatin nonwovens, the fastest and the most efficient method was identified, and the optimal reaction times and reagent concentrations necessary to ensure the stability of the protein additive within the material were determined. The final part of the research focused on an alternative approach to obtaining bicomponent materials – not by electrospinning polymer blends, but by functionalizing the surface of an aliphatic polyester material with a protein. Three surface activation methods were investigated – alkaline hydrolysis, aminolysis, and cold oxygen plasma and their effects on the stability of gelatin immobilization as well as on a range of other properties of the resulting bicomponent materials were determined.

Spis treści

1. Wstęp	9
2. Wprowadzenie merytoryczne	10
3. Cele pracy	14
4. Hipoteza badawcza	15
5. Materiały	16
5.1. Polimery.....	16
5.1.1. Poliestry alifatyczne	16
5.1.2. Białka	17
5.2. Rozpuszczalniki	18
5.2.1. Alkohole fluorowane	18
5.2.2. Rozpuszczalniki alternatywne	19
5.3. Lista materiałów	21
6. Metodologia	23
6.1. Formowanie materiałów włóknistych – proces elektroprzędzenia	23
6.2. Analiza wymywania biododatku	25
6.3. Sieciowanie biododatku	26
6.4. Funkcjonalizacja powierzchni włókien	30
6.4.1. Aktywacja powierzchni włókien	30
6.4.2. Oznaczenie ilości grup –COOH na powierzchni materiału	32
6.4.3. Przyłączenie białka na powierzchni włókien	32
6.4.4. Oznaczenie ilości przyłączonego białka	33
6.5. Charakterystyka roztworów polimerowych	34
6.6. Charakterystyka materiałów włóknistych	35
6.6.1. Mikroskopia optyczna i elektronowa	35
6.6.2. Kalorymetria różnicowa	36
6.6.3. Rozpraszanie promieni rentgenowskich w zakresie szerokokątowym.....	36
6.6.4. Spektroskopia w podczerwieni	37
6.6.5. Badania właściwości mechanicznych	37
6.6.6. Zwilżalność	38
6.6.7. Chromatografia żelowa	39
6.6.8. Badania odpowiedzi komórkowej in vitro	39
7. Publikacje włączone w cykl	41
7.1. Praca 1. Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System	42

7.2. Praca 2. Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system	45
7.3. Praca 3. The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibers	50
7.4. Praca 4. Crosslinking of gelatin in bicomponent electrospun fibers	54
7.5. Praca 5. A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization	58
8. Podsumowanie i wnioski	64
9. Elementy wkładu oryginalnego	66
10. Literatura.....	68
11. Publikacje naukowe włączone do rozprawy	74

Skróty

AA	kwasy octowe (<i>ang. acetic acid</i>)
ATR	osłabione wewnętrzne odbicie (<i>ang. attenuated total reflection</i>)
BCA	kwasy bicianchinowe (<i>ang. bicianchinic acid</i>)
BDDGE	eter diglicydylowy 1,4-butanediolu (<i>ang. 1,4-Butanediol diglycidyl ether</i>)
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa (<i>ang. differential scanning calorimetry</i>)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (<i>ang. extracellular matrix</i>)
EDC	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (<i>ang. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>)
FA	kwasy mrówkowe (<i>ang. formic acid</i>)
FTIR	fourierowska spektroskopia w podczerwieni (<i>ang. Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
FWHM	szerokość poławkowa (<i>ang. Full Width at Half Maximum</i>)
GPC	chromatografia żelowa (<i>ang. gel permeation chromatography</i>)
HF	linia komórkowa fibroblastów ludzkich
HFIP	heksafluoroizopropanol (1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanol)
L929	linia komórkowa fibroblastów mysich
NHS	N-hydroksysukcynimid (<i>ang. N-hydroxysuccinimide</i>)
PBS	buforowana fosforanem sól fizjologiczna (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PCL	poli(ε-kaprolakton) (<i>ang. poly(ε-caprolactone)</i>)
PGA	poli(glikolid) (<i>ang. poly(glycolic acid)</i>)
PLA	poli(laktyd) (<i>ang. poly(lactic acid)</i>)
PLCL	poli(laktyd-ko-kaprolakton) (<i>ang. poly(lactide-co-caprolactone)</i>)
RGD	sekwencja aminokwasów: arginina-glicyna-kwas asparaginowy, (<i>ang. arginine (R), glycine (G), aspartic acid (D), Arg-Gly-Asp</i>)
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa (<i>ang. scanning electron microscopy</i>)
TFE	trifluoroetanol (2,2,2-trifluoroetanol)
THF	tetrahydrofuran
WAXS	szerokokątowe rozpraszanie rentgenowskie (<i>ang. wide-angle X-ray scattering</i>)

1. Wstęp

Przygotowanie i napisanie rozprawy doktorskiej a następnie jej obrona są istotnymi krokami w karierze naukowej. Jest to idealny moment, aby zastanowić się nad tym, czym sam w sobie jest doktorat. Słownik języka polskiego PWN zawiera takie oto definicje: 1. «stopień doktora w jakiejś dziedzinie nauki», 2. «praca naukowa napisana w celu uzyskania stopnia doktora». O ile obie definicje są jasne i zrozumiałe, to pozostawiają we mnie niedosyt. Tym, czego definicje te nie ujmują, jest cały ogrom pracy naukowej niepisanej i niematerialnej. Czy można by zatem zaproponować definicję nr 3. «setki godzin wytężonej pracy naukowej prowadzącej do uzyskania wyników koniecznych do napisania rozprawy doktorskiej» i uznać, że temat został wyczerpany? Nie sądzę i już spieszę z moją prywatną definicją.

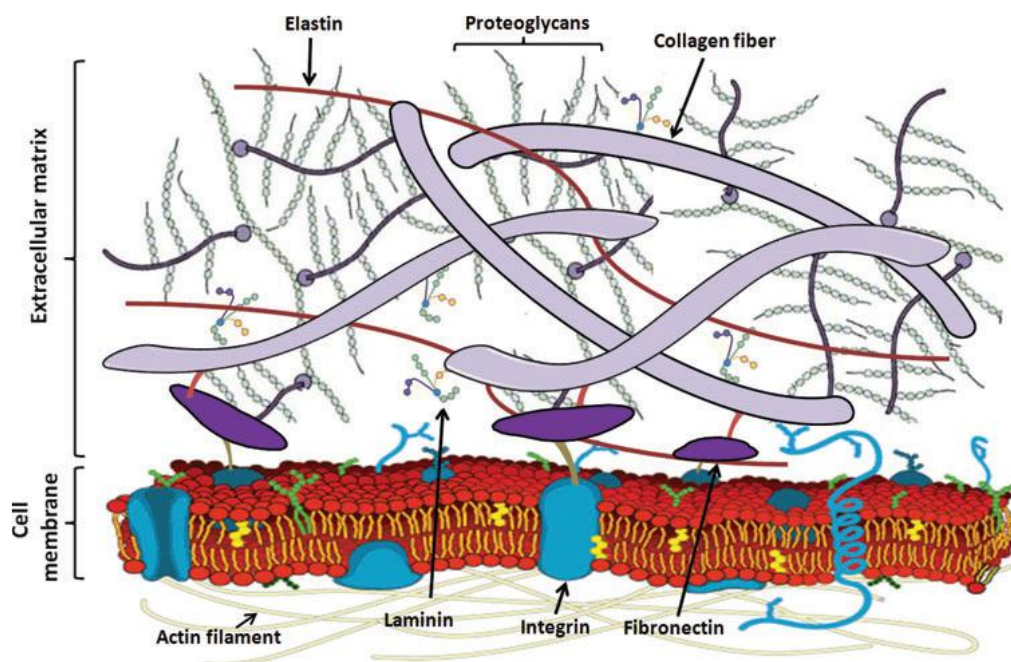
Dla mnie doktorat to cała ta zawiła i ciekawa droga, którą trzeba pokonać, zanim postawi się „dr” przed nazwiskiem, bardziej niż finalna praca w formacie PDF czy wydrukowana i oprawiona. Obrona doktoratu to też nie żadna meta czy wierzchołek góry, choć sypią się gratulacje i uściski rąk. Można by powiedzieć, że to takie półpiętro na klatce schodowej, gdzie przystaję na chwilę i mogę wyjrzeć przez okno, zobaczyć jak wysoko już jestem. Mogę też popatrzeć na wszystko z większego dystansu i zanim ruszę dalej, docenić siebie, bo tu zaszłam, ale i wszystkich tych, którzy mniej lub bardziej świadomie dołożyli się do tego sukcesu.

Doktorat to nauka przeobrażania siebie – to proces nabywania długiej listy umiejętności metodą prób i błędów, bo mało kto zaczyna tę drogę z pełnym zestawem potrzebnych narzędzi. Dla mnie była to nauka organizacji pracy i planowania, cierpliwości i dokładności, a także bolesna lekcja tego, że zaplanowanie w eksperymencie zarówno za mało, jak i za dużo próbek się na mnie zemści. To nauka radzenia sobie z niepowodzeniami, wyciągania wniosków, modyfikowania planu A i ruszania ponownie do pracy z wiarą w siebie – mając w zanadrzu plan B.

Wiele nauczyła mnie praca w zespole – słuchania, wyrozumiałości oraz siły w przekazywaniu swoich racji i idei. Radzenia sobie z nieporozumieniami i współpracy opartej na tym, że każdy daje od siebie to w czym jest najlepszy. Moje doświadczenia z dydaktyką pokazały mi, jaką satysfakcję może dawać dzielenie się wiedzą, jak niezwykle istotna jest rola edukacji. Uczenie innych to uczenie siebie cierpliwości i zrozumienia. Te wszystkie lekcje od moich opiekunów, współpracowników i studentów niezmiernie doceniam i jestem za nie ogromnie wdzięczna.

2. Wprowadzenie merytoryczne

Według definicji sformułowanej przez Roberta Langerę i Josepha P. Vacanti na łamach magazynu Science **inżynieria tkankowa** jest dziedziną mającą umożliwić wykorzystanie osiągnięć nauk przyrodniczych oraz nowoczesnych technologii do rozwoju materiałów biologicznych mogących przywrócić, utrzymać bądź usprawnić funkcje poszczególnych tkanek lub narządów [1]. Prace w tej dziedzinie zaczęły się pojawiać na początku lat 90. XX wieku jako odpowiedź na ograniczenia tradycyjnych metod takich jak przeszczepy czy alloplastyka w leczeniu ubytków tkanek. Wykorzystanie do tego celu innowacyjnych technologii i materiałów sprawia, że inżynieria tkankowa jest obszarem dynamicznego rozwoju, stawiającym przed badaczami nowe wyzwania i otwierając coraz większe możliwości.



Rys. 1. Schemat przedstawiający strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej i jej interakcje z błoną komórkową [2].

Inżynieria tkankowa opiera się na tworzeniu rusztowań naśladujących naturalną macierz zewnątrzkomórkową (ECM), które służą jako tymczasowe wsparcie dla komórek, umożliwiając im adhezję, proliferację, syntezę białek naturalnej ECM i ostateczne formowanie nowych, funkcjonalnych tkanek. Wzorując się na tej strukturze, naukowcy opracowują syntetyczne rusztowania, które mają imitować właściwości biologiczne macierzy naturalnej. Macierz zewnątrzkomórkowa jest kluczowym komponentem niemal każdej tkanki, a jej

złożoność wynika z unikalnego trójwymiarowego układu włókien kolagenowych, elastynowych oraz polisacharydów, co determinuje specyficzne właściwości mechaniczne i biochemiczne. Naturalnie występujące w macierzy białka zawierają sekwencje sygnałowe takich jak trójpeptyd arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD), które łączą się z białkami błonowymi – integrzynami (Rys. 1). Wiedza na temat interakcji pomiędzy komórkami a ECM jest niezwykle istotna przy projektowaniu biomimetycznych materiałów na rusztowania dla inżynierii tkankowej.

Skuteczne rusztowania muszą spełniać szereg wymagań, które zapewnią ich funkcjonalność oraz bezpieczeństwo stosowania. Przede wszystkim, muszą być biokompatybilne, co oznacza, że ani materiały, z których się składają, ani produkty ich rozkładu nie wykazują cytotoksyczności oraz nie wywołują reakcji alergicznych czy stanów zapalnych, a właściwości mechaniczne odpowiadają tkankom, jakie mają zastąpić. Kluczowe są także właściwości fizykochemiczne, takie jak odpowiednia porowatość, topografia i zwilżalność powierzchni oraz zdolność do kontrolowanej degradacji. Zrozumienie zależności między strukturą rusztowania a reakcją komórek jest konieczne dla osiągnięcia optymalnych efektów regeneracyjnych. Niemniej istotna jest bioaktywność rusztowania, która może być uzyskana poprzez obecność na powierzchni materiału wspomnianych wyżej sekwencji RGD występujących na przykład w żelatynie lub fibronektynie i odpowiedzialnych za interakcje komórek z macierzą zewnątrzkomórkową. W przypadku rusztowań przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej, efekt bioaktywności może być także osiągnięty poprzez zastosowanie hydroksyapatytu, który stymuluje różnicowanie się komórek oraz ich adhezję. Spełnienie jednocześnie szeregu wymagań wymusza interdyscyplinarne podejście przy projektowaniu rusztowań, dobór odpowiedniej technologii produkcji i precyzyjnej optymalizacji parametrów procesu otrzymywania.

Jedną z technik formowania rusztowań dla inżynierii tkankowej o strukturze zbliżonej do naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej jest elektroprzędzenie. Metoda ta, pozwalająca na otrzymywanie nano- i mikrowłókien, choć znana od XIX wieku, ma nadal wiele do zaoferowania (bardziej szczegółowo o elektroprzędzeniu w podrozdziale 6.1). Właściwości w ten sposób formowanych włókien, takie jak średnica i orientacja włókien, można kontrolować poprzez dobór parametrów procesu elektroprzędzenia, co umożliwi dostosowanie struktury rusztowania do specyficznych potrzeb inżynierii tkankowej. Materiały otrzymywane tą metodą mogą być następnie poddawane dalszym modyfikacjom takim jak funkcjonalizacja powierzchni czy sieciowanie.

Ze względu na szerokie możliwości procesu elektroprzędzenia oraz biomimetyzm rusztowań otrzymywanych tą metodą, technika ta została wybrana jako sposób formowania materiałów analizowanych w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Wśród wielu polimerów wykorzystywanych w elektroprzędzeniu na potrzeby inżynierii tkankowej, układ oparty na polikaprolaktonie i żelatynie cieszy się szczególnym zainteresowaniem w literaturze naukowej ze względu na potencjał aplikacyjny, co znajduje odzwierciedlenie w czterech z pięciu prac wchodzących w skład niniejszego cyklu.

Polikaprolakton jest syntetycznym, biogodnym i biodegradowalnym poliestrem alifatycznym o dobrych właściwościach mechanicznych oraz stosunkowo wolnym tempie degradacji. Jego wadami są jednak hydrofobowość i brak bioaktywności. Rozwiązaniem obu tych problemów jednocześnie jest zastosowanie w procesie elektroprzędzenia roztworu polimerowego zawierającego poza polikaprolaktonem dodatek żelatyny, czego rezultatem są włókniny dwuskładnikowe. Zawartość hydrofilowej żelatyny pozwala uzyskać materiały o dobrej zwilżalności, a znajdujące się w niej sekwencje RGD poprawiają właściwości adhezyjne rusztowań, co przekłada się na lepszą odpowiedź komórkową. Połączenie tych dwóch polimerów w rusztowaniach elektroprzędzonych pozwala na uzyskanie materiałów atrakcyjnych z punktu widzenia inżynierii tkankowej (więcej o tych polimerach w podrozdziale 5.1).

Rozpuszczalnik, konieczny do przygotowania roztworów wykorzystywanych w procesie elektroprzędzenia takich dwuskładnikowych materiałów, musi być odpowiednio dobrany, pod kątem zarówno rozpuszczalności obu polimerów, jak i szeregu właściwości fizykochemicznych m.in. przewodności elektrycznej, napięcia powierzchniowego czy temperatury wrzenia. Standardowo wykorzystywane rozpuszczalniki dla mieszanki polikaprolaktonu z białkami takimi jak żelatyna czy kolagen, alkohole fluorowane – heksafluoroizopropanol czy trifluoroetanol, są silnie toksyczne i bardzo kosztowne. Choć ich niska temperatura wrzenia jest korzystna z punktu widzenia procesu elektroprzędzenia, to powoduje wysoką lotność i zagrożenie dla zdrowia oraz bezpieczeństwa operatora procesu. Ponadto, istnieje ryzyko, że fluorowane alkohole mogą denaturować natywną strukturę dodatku białkowego w przypadku wykorzystania kolagenu, niwecząc cel tworzenia biomimetycznych rusztowań z tym kosztownym składnikiem.

W związku z tym, prowadzone są intensywne badania nad zastąpieniem tych silnie toksycznych rozpuszczalników alternatywnymi, mniej szkodliwymi układami opartymi na kwasach octowym i mrówkowym. Wśród nich prace ujęte w niniejszej rozprawie, należą do jednych z pierwszych systematycznych opracowań w tym obszarze. Oprócz potwierdzenia

możliwości efektywnego zastosowania układów kwasowych w procesie elektroprzędzenia, wykazano w nich również nowe zjawiska dotyczące struktury roztworu, m.in. tworzenie stabilnych emulsji polimerowych oraz ich wpływ na morfologię i właściwości powstających włóknin. Wykorzystanie mieszaniny kwasów pozwala znacząco obniżyć koszty i toksyczność procesu elektroprzędzenia, stanowiąc istotny krok w kierunku tworzenia bezpieczniejszych i bardziej przyjaznych dla środowiska materiałów dla inżynierii tkankowej (więcej na temat rozpuszczalników w podrozdziale 5.2).



Cykl artykułów, na których opiera się niniejsza rozprawa, prezentuje wyniki badań przeprowadzonych w ramach trzech projektów naukowych. Projekty te następowały po sobie w czasie i stanowiły logiczną kontynuację wcześniejszych prac w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania oraz rozwiązania problemów zidentyfikowanych na poprzednich etapach badań.

Prace 1-3 prezentują wyniki projektu badawczego skoncentrowanego na optymalizacji parametrów elektroprzędzenia dwuskładnikowych włókien z polikaprolaktonu i żelatyny z zastosowaniem alternatywnych układów rozpuszczalnikowych. Badania te podejmowały wówczas nowatorski temat, jakim było zastąpienie powszechnie stosowanych, toksycznych rozpuszczalników układami mniej szkodliwymi, przy jednoczesnym zachowaniu jakości materiałów porównywalnej do włókien wytwarzanych z wykorzystaniem klasycznych rozpuszczalników.

W toku badań ujawniono jednak istotny problem związany ze separowaniem obu składników polimerowych w zastosowanym układzie rozpuszczalnikowym, skutkujący szybkim wmywaniem żelatyny z włókien, co stało się punktem wyjścia do kontynuacji prac, skoncentrowanej na ograniczeniu wmywania żelatyny w tego typu układach poprzez jej sieciowanie. Wyniki tych badań przedstawiono w pracy 4.

Ostatnia z ujętych w cyklu publikacji (praca 5) prezentuje rezultaty kolejnego etapu badań, którego przedmiotem były metody funkcjonalizacji powierzchni biodegradowalnych włókien polimerowych z wykorzystaniem żelatyny. Stanowi to alternatywne podejście do otrzymywania włóknin dwuskładnikowych, nie poprzez elektroprzędzenie mieszaniny dwóch polimerów, lecz poprzez immobilizację bioaktywnego dodatku na powierzchni włókien, co pozwala na uzyskanie zbliżonych korzyści wynikających z jego obecności w rusztowaniu.

3. Cele pracy

- Optymalizacja procesu formowania dwuskładnikowych włókien metodą elektroprzędzenia z wykorzystaniem innowacyjnego systemu mniej toksycznych i tańszych rozpuszczalników stanowiących alternatywę dla tradycyjnie wykorzystywanych silnie toksycznych alkoholi fluorowanych
- Zbadanie wpływu opracowanego, alternatywnego systemu rozpuszczalników, na morfologię, strukturę, proces wymywania biododatku oraz na odpowiedź komórkową dwuskładnikowych włókien z polikaprolaktonu z dodatkiem biopolimeru w odniesieniu do układu z heksafluoroizopropanolem.
- Ocena skuteczności wybranych metod sieciowania biopolimeru we włóknach dwuskładnikowych, celem określenia optymalnych warunków umożliwiających zachowanie składnika bioaktywnego w materiale i niezmienionej morfologii włókniny.
- Badania porównawcze trzech metod aktywacji powierzchni elektroprzędzonych włókien pod kątem efektywności funkcjonalizacji z użyciem biopolimeru. Ocena wpływu tych metod na właściwości materiału – morfologię, masę cząsteczkową oraz odpowiedź komórkową.

4. Hipoteza badawcza

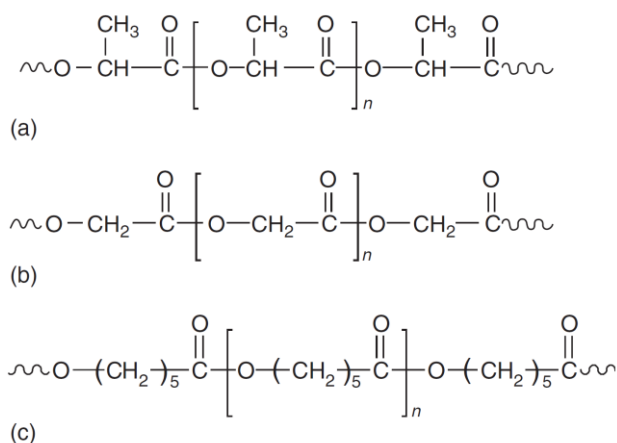
- Zastosowanie alternatywnych, mniej toksycznych i tańszych rozpuszczalników opartych na kwasie octowym i mrówkowym pozwala na uzyskanie biodegradowalnych dwuskładnikowych elektroprzędzonych materiałów polimerowych o strukturze i właściwościach porównywalnych lub lepszych niż w przypadku użycia tradycyjnego heksafluoroizopropanolu.
- Możliwa jest optymalizacja metody sieciowania biopolimeru we włóknach dwuskładnikowych, która przy minimalnym wpływie tego procesu na strukturę materiału pozwala zachować jego obecność we włóknach.
- Aktywacja powierzchni elektroprzędzonych materiałów poprzez zwiększenie ilości grup funkcyjnych umożliwia ich efektywną funkcjonalizację z użyciem biopolimeru.

5. Materiały

5.1. Polimery

5.1.1. Poliestry alifatyczne

Wśród polimerów syntetycznych wykorzystywanych do otrzymywania materiałów metodą elektroprzędzenia dla zastosowań inżynierii tkankowej powszechnie stosowane są poliestry alifatyczne. Ich cechą charakterystyczną jest liniowa budowa łańcucha oraz obecność grup estrowych [3-5]. Dzięki temu są podatne na hydrolizę, co warunkuje ich degradację w środowisku wodnym, a tym samym również w fizjologicznych warunkach ludzkiego organizmu [6]. Do najczęściej stosowanych poliestrów alifatycznych należą: polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA) oraz polikaprolakton (PCL) (Rys. 2) oraz ich kopolimery, np. poli(laktyd-co-kaprolakton) (PLCL). W zależności od wykorzystywanych w syntezie monomerów, polimery z tej grupy różnią się właściwościami termicznymi i mechanicznymi, jak również tempem degradacji. Różnorodność cech poliestrów alifatycznych pozwala na ich dobór jako surowca dla konkretnego zastosowania.



Rys. 2. Poliestry alifatyczne: a) polilaktydu, b) poliglikolid, c) polikaprolakton [7].

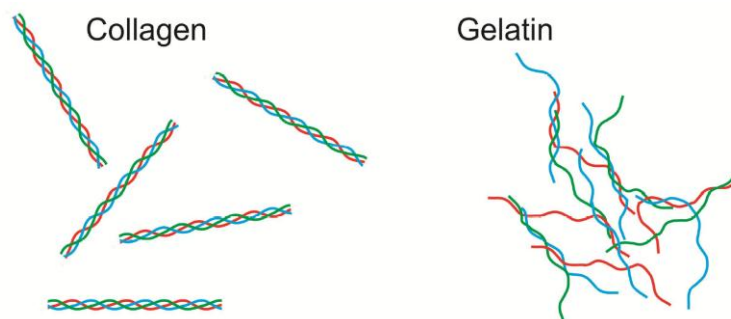
Poliestrem alifatycznym wykorzystywanym w pracach 1-4 tworzących tę rozprawę był polikaprolakton. Chociaż na stopień krystaliczności polikaprolaktonu wpływa szereg parametrów, takich jak masa cząsteczkowa lub metoda formowania, to zasadniczo jest to polimer o umiarkowanej krystaliczności, co razem z niską temperaturą zeszklenia (-60°C) [8], wpływa korzystnie na jego właściwości mechaniczne w kontekście zastosowania w inżynierii materiałowej – niską sztywność i kruchość elektroprzędzonych włókien. Istotną zaletą polikaprolaktonu jest jego długi czas degradacji w porównaniu do innych polimerów biodegradowalnych [9]. Dzięki temu może być stosowany jako materiał na rusztowania dla

tkanek wolniej regenerujących się, oraz w sytuacjach, gdzie konieczne jest długotrwałe wsparcie mechaniczne. Powolna degradacja zmniejsza również ryzyko obniżenia pH w miejscu implantacji, które występuje przy szybszej degradacji polimerów, takich jak PLA i PGA, co może nasilać stan zapalny [10].

Zarówno PCL, jak i PLCL wykorzystywany w pracy 5, są materiałami hydrofobowymi, co wymusza ich modyfikację – poprzez udział dodatku lub funkcjonalizację w celu uzyskania zwilżalnego i bioaktywnego materiału, odpowiedniego do zastosowania jako rusztowania w inżynierii tkankowej [11].

5.1.2. Białka

Jak wspomniano powyżej, zastosowanie samodzielne poliestrów alifatycznych jako surowca do otrzymywania biodegradowalnych materiałów włóknistych jest problematyczne ze względu na ich hydrofobowość oraz brak bioaktywności. Jeśli celem projektowania rusztowań w inżynierii tkankowej jest jak najwierniejsze odwzorowanie naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej, materiał musi nie tylko zapewniać odpowiednie warunki strukturalne, ale także aktywnie wspierać komórki – sprzyjać ich adhezji, a następnie stymulować do wzrostu i proliferacji. Kluczowe w tym kontekście są tzw. chemiczne sygnały (*ang. chemical cues*), czyli specyficzne struktury molekularne obecne w materiale, które są rozpoznawane przez receptory komórkowe. To właśnie te sygnały czynią rusztowanie atrakcyjnym środowiskiem dla komórek.



Rys. 3. Struktura potrójnej helisy kolagenu (po lewej) i żelatyny (po prawej) [12].

W tym celu w materiałach będących przedmiotem badań w tym doktoracie, wykorzystane zostały kolagen oraz żelatyna. Razem z poliestrem alifatycznym tworzą dwuskładnikowy materiał, który w postaci elektroprzędzonych włókien spełnia powyższe założenia. Kolagen jest białkiem, które występuje w największej ilości w ludzkim organizmie, będąc istotnym, strukturalnym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej wielu tkanek

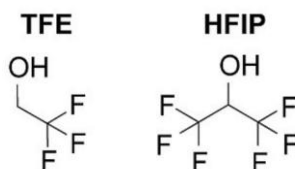
i organów, takich jak skóra, chrząstki, kości czy naczynia krwionośne. Składa się z trzech łańcuchów polipeptydowych ułożonych w potrójną helisę, zbudowanych głównie z glicyny, proliny i hydroksyproliny [13].

Z uwagi na to, iż kolagen jest kosztowny i ulega przynajmniej częściowej denaturacji pod wpływem rozpuszczalników stosowanych do otrzymywania roztworów do elektroprzędzenia [14], dobrym zamiennikiem jest żelatyna – jego łatwiej rozpuszczalna i znacznie tańsza pochodna otrzymywana w wyniku częściowej hydrolizy/denaturacji. Proces ten prowadzi do zaniku struktury nadmolekularnej – potrójnej helisy, przy jednoczesnym zachowaniu sekwencji RGD oraz właściwości hydrofilowych (Rys. 3), choć literatura podaje, że w pewnych warunkach może dojść do jej częściowej renaturacji [15]. W związku z powyższym żelatyna została wykorzystana jako biododatek we wszystkich pracach w cyklu, jednakże włókniny z udziałem zarówno żelatyny, jak i kolagenu były badane w pracach 2 i 3 w celu porównania ich podatności na wypłukiwanie w warunkach modelujących fizjologiczne oraz pod kątem odpowiedzi komórkowej na materiał w zależności od wykorzystanego białka.

5.2. Rozpuszczalniki

5.2.1. Alkohole fluorowane

Najczęściej spotykanymi w literaturze rozpuszczalnikami wykorzystywanymi do sporządzania roztworów polimerowych do elektroprzędzenia są alkohole fluorowane – 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) i 1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanol (HFIP). Są powszechnie używane do otrzymywania włókien z mieszanek poliestrów alifatycznych i białek, gdyż ze względu na swoją budowę chemiczną są silnie polarne [16] i rozpuszczają oba typy polimerów jednocześnie [17, 18] (Rys. 4).



Rys. 4. Wzory strukturalne TFE i HFIP [19].

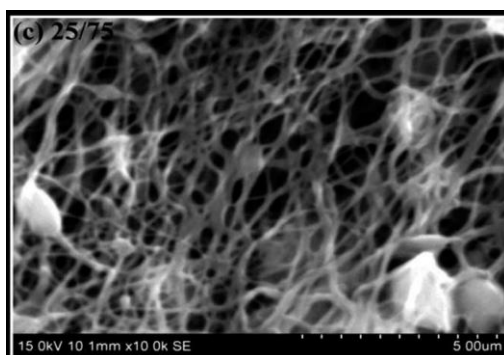
Rozpuszczalniki fluorowane cechują się niską temperaturą wrzenia [20], dzięki czemu łatwo odparowują podczas procesu elektroprzędzenia. Niskie napięcie powierzchniowe sprzyja formowaniu włókien pozbawionych defektów w postaci koralików, a ich odpowiednia przewodność czyni je szczególnie atrakcyjnymi rozpuszczalnikami do tej metody [18, 21].

Niestety, alkohole fluorowane są szkodliwe dla zdrowia – żrące i toksyczne przy kontakcie ze skórą oraz w formie oparów, powodują silne podrażnienia błon śluzowych, co stanowi zagrożenie dla operatora zarówno podczas przygotowywania roztworu, jak i w trakcie elektroprzędzenia [22]. Zarówno HFIP, jak i TFE są dodatkowo podejrzewane o działanie reprotoksyczne [23, 24]. Mimo że alkohole fluorowane są lotne, ich silne oddziaływanie z cząsteczkami białek utrudnia całkowite usunięcie pozostałości z włókien zawierających żelatynę lub kolagen [25]. Z tego samego powodu mogą powodować denaturację struktury drugorzędowej kolagenu, co obniża jego aktywność biologiczną.

Pomimo swojej funkcjonalności, wady stosowania alkoholi fluorowanych w elektroprzędzeniu skłoniły nas do poszukiwania alternatywnych rozpuszczalników. W niniejszej rozprawie, w celach porównawczych z badanymi układami alternatywnymi wykorzystano HFIP.

5.2.2. Rozpuszczalniki alternatywne

Podobnie jak klasycznie stosowane w elektroprzędzeniu alkohole fluorowane, rozpuszczalniki, które miałyby je zastąpić, muszą jednocześnie rozpuszczać polimery alifatyczne oraz białka. W czasie, kiedy powstawała koncepcja tych badań, w 2013 roku, w literaturze można było znaleźć prace, w których jednoskładnikowe włókniny z PCL albo żelatyny były otrzymywane z wykorzystaniem kwasu octowego [26] lub mieszanki kwasu octowego i mrówkowego [27] jako próby odejścia od HFIP i TFE. Wedle naszej wiedzy, ukazała się tylko jedna praca [28], w której podjęto się elektroprzędzenia dwuskładnikowych włókien PCL + kolagen z wykorzystaniem kwasu octowego jako rozpuszczalnika, gdzie w rezultacie otrzymano jedynie bardzo cienkie (<200 nm) włókna z defektami w postaci koralików (Rys. 5).



Rys. 5. Obraz SEM włókien składających z PCL i kolagenu w proporcji 75:25 w pracy opublikowanej przez Chakrapani et al. [28]

Umieszczone w niniejszej rozprawie prace 1-4 zawierają wyniki porównawcze różnego rodzaju badań dotyczących dwuskładnikowych materiałów z PCL i żelatyny/kolagenu, w których jako alternatywa dla alkoholi fluorowanych w roli rozpuszczalnika zastosowane zostały kwas octowy i kwas mrówkowy.

Kwas mrówkowy (FA) i octowy (AA) są najprostszymi i zarazem najkrótszymi (pod względem długości łańcucha węglowego) przedstawicielami szeregu alifatycznych kwasów karboksylowych. Kwas octowy uznawany jest za nietoksyczny, natomiast kwas mrówkowy zaliczany jest do substancji o niskiej toksyczności [29, 30]. W kontakcie bezpośrednim ze skórą, błonami śluzowymi lub drogą wziewną wykazują działanie drażniące. Ich stosowanie nie wiąże się z ryzykiem emisji silnie toksycznych oparów do atmosfery przez wyciąg laboratoryjny, jak ma to miejsce w przypadku użycia HFIP lub TFE. Są zdecydowanie tańsze i łatwiej dostępne niż alkohole fluorowane.

Do istotnych cech kwasu octowego i mrówkowego, z punktu widzenia ich zastosowania w elektroprzędzeniu, należy to, że oba kwasy rozpuszczają jednocześnie polikaprolakton oraz żelatynę/kolagen, jednak w roztworze dwuskładnikowym tworzą emulsję, co wpływa na właściwości otrzymywanych z nich włókien (zostało to pokazane w pracy 1). Są polarne – kwas mrówkowy silnie, natomiast kwas octowy działa łagodniej na cząsteczki polimerów, w przeciwieństwie do FA, który w wyższych stężeniach może prowadzić do ich degradacji w roztworze, co pokazały badania lepkości roztworów obu polimerów rozpuszczonych w mieszkankach AA/FA w różnych proporcjach (wyniki niepublikowane). Mimo niższego napięcia powierzchniowego kwasu octowego problemy z jego samodzielnym zastosowaniem wynikają z niskiej przewodności oraz stałej dielektrycznej (Tab. 1).

Tab. 1. Zestawienie wybranych właściwości kwasów mrówkowego i octowego dla procesu elektroprzędzenia [31].

Właściwość	Kwas mrówkowy (FA)	Kwas octowy (AA)
Stała dielektryczna (ϵ , 25°C)	58	6.2
Przewodnictwo elektryczne (S/m)	6.4×10^{-3}	6.0×10^{-7}
Napięcie powierzchniowe (mN/m)	37.7	27.4

Połączenie kwasu octowego i mrówkowego w proporcji 9:1, zastosowane w niniejszej rozprawie, pozwala uzyskać rozpuszczalnik, który dzięki zrównoważeniu właściwości obu kwasów umożliwia otrzymanie dwuskładnikowych włókien o poprawnej morfologii, bez defektów w postaci tzw. koralików, czyli zgrubień na włóknach, najczęściej przybierających formę kulistą.

5.3. Lista materiałów

Polimery

Polikaprolakton (PCL), $M_n = 80$ kDa – *Sigma-Aldrich, USA*

Poli(laktyd-co-kaprolakton) (PLCL 70:30), Resomer® LC703S, – *Evonik, Niemcy*

Żelatyna ze skóry świńskiej, Typ A, Bloom ~300 g – *Sigma-Aldrich, USA*

Kolagen liofilizowany ze skóry cielęcej, Typ I – *Elastin Products Company Inc., USA*

Rozpuszczalniki

1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) – *Iris Biotech GmbH, Niemcy/Sigma-Aldrich, USA*

Kwas octowy lodowaty cz.d.a. 99,5% (AA) – *Chempur/POCH, Polska*

Kwas mrówkowy cz.d.a. 99-100% (FA) – *Avantor PM, Polska*

Siecowanie biododatku/funkcjonalizacja

Chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

N-hydroksysukcynimid (NHS) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Eter diglicydylowy 1,4-butanodiolu (BDDGE) – *Sigma-Aldrich, USA*

Genipina 98% – *Challenge Bioproducts Co., Ltd, Taiwan*

Transglutaminaza (1490 U/g) – *P.M.T. Trading, Polska*

Ethylenediamina 99,5% (EDA) – *Sigma-Aldrich, USA*

Izopropanol 99,8% – *Sigma-Aldrich, USA*

Aldehyd glutarowy 25% – *Sigma-Aldrich, USA*

Wodorotlenek sodu (NaOH) – *Sigma-Aldrich, USA*

Kwas solny 1M – *POCH, Polska*

Błękit toluidyny – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Kwas bicynchoninowy (BCA), QuantiPro™ – *Sigma-Aldrich, USA*

Badanie wymywania biododatku

Bufor fosforanowy w tabletkach, pH 7,4 (PBS) – *Sigma-Aldrich, USA*

Azydek sodu 99,5%, ReagentPlus® – *Sigma-Aldrich, USA*

Hodowle komórkowe/badania in vitro

Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™ (DMEM) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Penicylina i streptomycyna (10,000 U/mL) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Bydłęca surowica płodowa, Gibco™ – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Bufor fosforanowy, pH 7,4, Gibco™ (PBS, sterylny, bez jonów wapnia i magnezu) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Trypsyna 0,25%, Gibco™ – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Błękit trypanu – *Sigma-Aldrich, USA*

CyQuant, Invitrogen™ – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

PrestoBlue, Invitrogen™ – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

CellTiter-Glo® – *Promega GmbH, Niemcy*

Błękit tiazolilowy bromek tetrazoliowy (odczynnik MTT) – *Sigma-Aldrich, USA*

NucBlue, Invitrogen™ (Hoechst 33342) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

ActinGreen, Invitrogen™ (Alexa Fluor 488) – *Thermo Fisher Scientific Inc., USA*

Paraformaldehyd – *Sigma-Aldrich, USA*

Hexametyldisilazane (HMDS) – *Sigma-Aldrich, USA*

Triton X-100 – *Sigma-Aldrich, USA*

Alkohol etylowy cz.d.a. 99,8% – *Chempur, Polska*

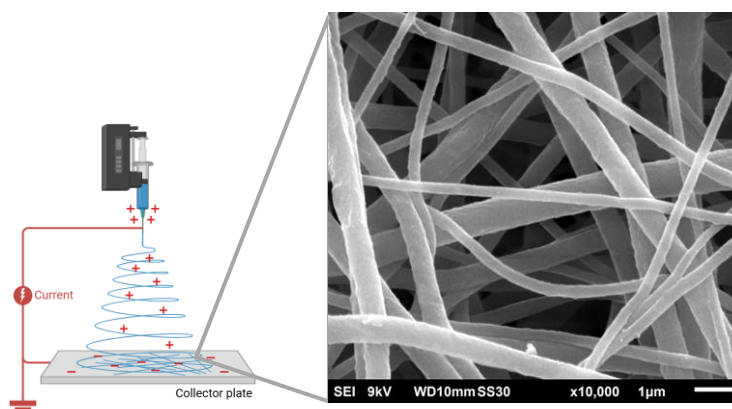
Chromatografia żelowa

Tetrahydrofuran (THF) – *Sigma-Aldrich, USA*

6. Metodologia

6.1. Formowanie materiałów włóknistych – proces elektroprzędzenia

Elektroprzędzenie to metoda, której początki sięgają XIX wieku, a pierwszy patent opisujący ten proces został zarejestrowany przez A. Formhalsa w 1934 roku w Stanach Zjednoczonych [32]. Pomimo wczesnych odkryć, dopiero w latach 90. XX wieku technika ta zyskała znaczące zainteresowanie środowiska akademickiego, w dużej mierze za sprawą badań prowadzonych przez grupę Renekera, a jej pierwsze zastosowania komercyjne dotyczyły materiałów filtracyjnych w przemyśle włókninowym [33]. Obecnie, ze względu na wyjątkowe podobieństwo strukturalne elektroprzędzonych włókien do naturalnej, włóknistej macierzy zewnątrzkomórkowej, materiały otrzymywane tą metodą są intensywnie badane jako potencjalne rusztowania w inżynierii tkankowej, systemy kontrolowanego uwalniania leków oraz materiały opatrunkowe.



Rys. 6. Schematyczne przedstawienie procesu elektroprzędzenia oraz typowa morfologia elektroprzędzonych włókien (rysunek wykonano z pomocą programu Biorender).

Elektroprzędzenie pozwala na otrzymywanie bardzo cienkich włókien – zarówno mikro-, jak i nanometrycznych. W procesie tym roztwór polimerowy, podawany z użyciem pompy strzykawkowej, wypływa przez cienką dyszę (kapilarę lub tępo zakończoną igłę), do której przyłożone jest wysokie napięcie, naprzeciwko której znajduje się uziemiony kolektor. Wraz ze wzrostem natężenia pola elektrycznego pomiędzy dyszą a kolektorem, półkulista powierzchnia kropli na końcu igły wydłuża się, tworząc stożek zwany stożkiem Taylora. Po dalszym zwiększaniu natężenia pola osiągnięta jest wartość krytyczna, przy której siła elektrostatyczna przewyższa napięcie powierzchniowe roztworu polimerowego i z końca stożka Taylora wyrzucany jest naładowany strumień cieczy. Strumień ten początkowo porusza się liniowo, a następnie ulega dynamicznym niestabilnościom, prowadzącym do dalszego

rozciągania i zmniejszania średnicy powstającego włókna. W drodze do kolektora rozpuszczalnik odparowuje, a na kolektorze osadzają się stałe włókna (Rys. 6) [33, 34].

Choć proces ten może wydawać się nieskomplikowany, a jego przeprowadzenie wymaga jedynie kilku elementów aparatury, to efekt elektroprzędzenia jest uzależniony od wielu czynników i wymaga starannej kontroli parametrów nastawy urządzeń, właściwości roztworu oraz warunków otoczenia.

W pracach zawartych w niniejszej rozprawie wszystkie badane materiały otrzymywane były z wykorzystaniem samodzielnie wykonanej komory do elektroprzędzenia (Rys. 7 A, B) lub komercyjnie dostępnego urządzenia LE-50 Fluidnatek firmy Bioinicia (Hiszpania), które umożliwia kontrolę temperatury i wilgotności wewnątrz komory (Rys. 7 C, D).



Rys. 7. Komory do elektroprzędzenia wykorzystywane w pracach w niniejszej rozprawie: A i B – samodzielnie wykonana, C i D – komora LE-50 Fluidnatek z regulacją temperatury i wilgotności firmy Bioinicia.

Wszystkie roztwory polimerowe przygotowywano wagowo, pod dygestorium, a następnie mieszano przez 24 godziny przy użyciu mieszadła magnetycznego. Roztwory oparte na HFIP przygotowywano jednoetapowo, podczas gdy dwuskładnikowe, zawierające PCL i biopolimer, oparte na rozpuszczalniku kwasowym – dwuetapowo. W tym przypadku każdy z polimerów rozpuszczano osobno w mieszance AA/FA przez 24 godziny, a następnie łączono je w odpowiednich proporcjach i ponownie mieszano przez kilka godzin. Gotowy

roztwór podawano z igły ze stali nierdzewnej o rozmiarze 23G (średnica wewnętrzna 0,34 mm), a włókna odbierano na uziemionym kolektorze w postaci obrotowego walca lub nieruchomej płyty. Gotowe włókniny były umieszczane pod dygestorium lub w suszarce próżniowej w celu odparowania pozostałości rozpuszczalnika. Dokładne parametry, takie jak stężenia roztworów, prędkość podawania roztworu, odległość igły od kolektora, napięcie, wymiary oraz prędkość obrotowa kolektora, można znaleźć w rozdziale 7 (7.1-7.5) w dołączonych publikacjach.

6.2. Analiza wymywania biododatku

Termin „biodegradation”, po polsku biodegradacja, został użyty w pracach 2 (*Biodegradation of bicomponent PCL+gelatin and PCL+collagen nanofibres electrospun from alternative solvent system*) i 4 (*Crosslinking of Gelatin in Bicomponent Electrospun Fibers*) w odniesieniu do wypłukiwania biododatku z dwuskładnikowych materiałów elektroprzędzonych, prowadzonego w warunkach *in vitro* modelujących środowisko fizjologiczne.

Choć w świetle obowiązującej terminologii badania te nie spełniały kryteriów biodegradacji *sensu stricto*, czyli rozkładu materiału pod wpływem mikroorganizmów [35], to użycie terminu „biodegradacja” miało na celu podkreślenie, iż badana jest zmiana zawartości dodatku „bio”, a co za tym idzie też utraty przez materiał właściwości, jakie ten dodatek mu nadawał. Z perspektywy czasu należy uznać to określenie za niefortunne i mogące prowadzić do nieporozumień. Niniejsza praca konsekwentnie rozróżnia pomiędzy biodegradacją, degradacją fizykochemiczną i wymywaniem dodatku polimeru białkowego.

Należy przy tym podkreślić, że w kontekście tej rozprawy termin degradacja stosowany jest również w szerszym ujęciu – jako proces obejmujący zmiany fizyczne i strukturalne w materiale kompozytowym, wynikające z selektywnego usuwania jednego z jego składników. Takie zjawisko, mimo że nie jest biodegradacją w sensie biologicznym, prowadzi do rozdzielenia składników, utraty integralności strukturalnej i modyfikacji właściwości materiału, co w praktyce może zostać uznane za formę degradacji strukturalnej.

Konieczność przeprowadzenia badań nad wymywaniem dodatku białkowego wynikała bezpośrednio z zakładanej funkcjonalności opracowywanych przeze mnie materiałów dwuskładnikowych oraz ich potencjalnych zastosowań. W kontekście inżynierii tkankowej, gdzie materiały te mogą pełnić funkcję rusztowania tkankowego, oczywiste jest, że będą one eksponowane na warunki panujące w środowisku fizjologicznym, w którym może dochodzić

do zmian ich struktury, m.in. w wyniku wypłukiwania biododatku. Zarówno żelatyna, jak i w mniejszym stopniu kolagen, rozpuszczają się w środowisku wodnym, co oznacza możliwość ich stopniowej utraty z rusztowania i związanej z tym zmiany jego właściwości. Aby ocenić podatność materiałów na ten proces, przeprowadzone zostały badania modelowe w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Celem było także określenie wpływu alternatywnego systemu rozpuszczalników, zastosowanego w procesie elektroprzędzenia, na tempo i zakres wymywania białkowego składnika, a tym samym wartość aplikacyjną materiału.

We wszystkich eksperymentach dotyczących wymywania biododatku jako medium zastosowano bufor fosforanowy o pH 7,4 z dodatkiem 0,1% (wag.) azydku sodu, pełniącego funkcję środka bakterioobójczego i grzybobójczego. Upřednio zważone próbki materiałów włóknistych umieszczano w medium w taki sposób, aby były całkowicie zanurzone, przy zachowaniu nadmiaru objętości cieczy, co najmniej stukrotnego, w stosunku do masy próbki. Następnie próbki inkubowano w wytrząsarce orbitalnej, w temperaturze 37°C, przez czas określony w protokole danego eksperymentu. Po zakończeniu inkubacji materiały były dokładnie płukane wodą demineralizowaną i suszone w suszarce próżniowej przed ponownym ważeniem oraz dalszą analizą.

Ze względu na to, że polikaprolakton charakteryzuje się bardzo powolnym tempem degradacji, założono, że ubytek masy próbki wynika wyłącznie z ubytku składnika białkowego. Dla potwierdzenia tego założenia równolegle prowadzono również badania kontrolne na próbkach zawierających wyłącznie PCL.

6.3. Sieciowanie biododatku

Wyniki badań nad wymywaniem biododatku białkowego, opisane w pracy 2, stały się punktem wyjścia do realizacji projektu pt. „*Wpływ warunków sieciowania na strukturę i właściwości dwuskładnikowych nanowłókien PCL/żelatyna formowanych z wykorzystaniem rozpuszczalników alternatywnych*”. W ramach tego projektu przeprowadzono porównawcze badania czterech różnego typu związków chemicznych, mające na celu usieciowanie żelatyny w strukturze włókien dwuskładnikowych. Wyniki tych analiz zostały przedstawione w pracy 4 (szczegółowy opis znajduje się w podrozdziale 7.4).

Spośród różnych metod sieciowania żelatyny, ze względu na to, że znajduje się ona w układzie dwuskładnikowym z polikaprolaktonem – termoplastycznym poliestrem o niskiej temperaturze topnienia, istotne było wykluczenie metod, które mogłyby prowadzić do jego

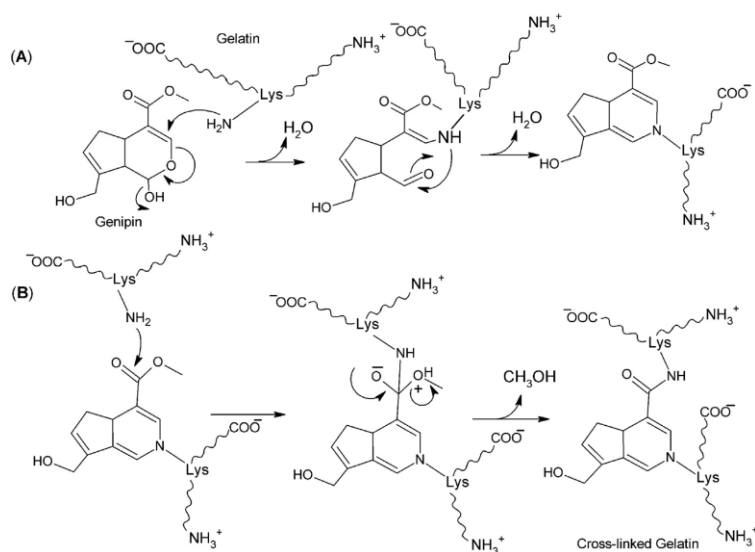
stopienia lub degradacji molekularnej, takich jak naświetlanie promieniowaniem UV czy działanie wysoką temperaturą (dehydrothermal treatment – DHT) [36-38]. Z tego względu zdecydowano się na zastosowanie metod sieciowania chemicznego, kierując się dodatkowymi kryteriami niskiej toksyczności reagentów oraz potencjałem innowacyjności.

Zastosowanie aldehydu glutarowego nie było rozważane z uwagi na jego szerokie zastosowanie w dotychczasowych pracach i dobrze udokumentowaną cytotoksyczność [39-41], co nie odpowiadało celowi niniejszej pracy, jakim było poszukiwanie alternatywnych, mniej eksploatowanych metod sieciowania. Do badań porównawczych wybrano cztery związki chemiczne:

- genipina,
- chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) z dodatkiem N-hydroksysukcynimidu (NHS),
- eter diglicydylowy 1,4-butanodiolu (BDDGE),
- transglutaminaza.



Genipina to naturalnie występujący irydoid, pozyskiwany z owoców gardenii, charakteryzujący się niską toksycznością. Choć sama jest bezbarwna, w wyniku reakcji z pierwszorzędowymi aminami tworzy stabilne połączenia o intensywnie niebieskiej barwie [42, 43]. Związek ten znajduje szerokie zastosowanie w sieciowaniu biopolimerów, takich jak chitozan, kolagen czy żelatyna, gdzie reaguje z grupami aminowymi obecnymi w resztach bocznych lizyny i argininy [44, 45].

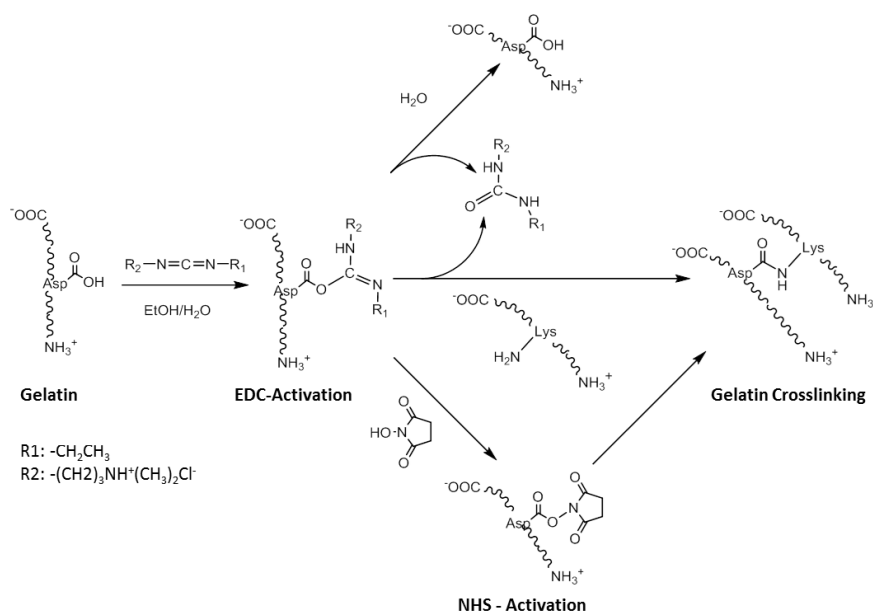


Rys. 8. Mechanizm sieciowania żelatyny z użyciem genipiny. (A) pierwszy etap reakcji – addycja Michaela tworząca stabilny związek pośredni i (B) drugi etap reakcji – nukleofilowa substitucja z grupą aminową drugiej lizyny [46].

Mechanizm sieciowania (Rys. 8) opiera się na tworzeniu kowalencyjnych wiązań między cząsteczkami polimeru, co prowadzi do powstania trwałej sieci przestrzennej o zwiększonej stabilności chemicznej i mechanicznej.



EDC to związek sieciujący, chętnie stosowany w materiałach dla inżynierii tkankowej, ze względu na niską toksyczność [47, 48]. Podczas reakcji sieciowania z jego udziałem powstają wiązania amidowe pomiędzy grupami karboksylowymi i aminowymi. Ponieważ EDC nie zostaje wbudowany w miejsce tworzącego się wiązania, zaliczany jest do grupy tzw. „zero-length crosslinker” [49]. W celu zwiększenia stabilności i wydajności reakcji, często stosuje się go w połączeniu z NHS [50, 51]. Dokładny mechanizm sieciowania z użyciem EDC/NHS przedstawia Rysunek 9.



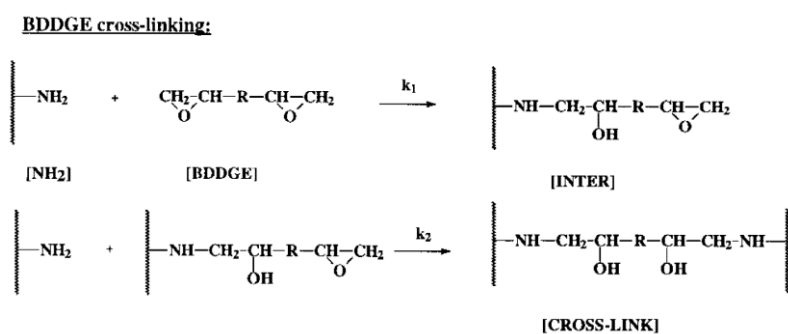
Rys. 9. Mechanizm sieciowania z użyciem EDC/NHS. Wiązanie amidowe tworzy się bezpośrednio pomiędzy dwiema resztami aminokwasowymi żelatyny, bez udziału dodatkowego łącznika [49].

Są publikacje sugerujące, że sieciowanie żelatyny lub kolagenu z wykorzystaniem układu EDC/NHS może ograniczać dostępność sekwencji sygnałowych istotnych dla adhezji komórek, takich jak motyw RGD. Wynika to z faktu, że w reakcji sieciowania wykorzystywane są grupy funkcyjne $-\text{COOH}$ i $-\text{NH}_2$, które mogą wchodzić w skład miejsc rozpoznawanych przez integryny. Jednocześnie prace te podkreślają znaczenie stężenia EDC – negatywny wpływ obserwowano przy standardowo wykorzystywanym stężeniu 11,5 mg/ml, natomiast przy niższych stężeniach efekt ten był wyraźnie słabszy [52, 53]. W pracach ujętych w niniejszej rozprawie stosowane stężenia EDC były w granicach 0,2-2 mg/ml.

W literaturze można znaleźć różne proporcje wykorzystywanych stężeń molowych EDC do NHS, najczęściej 2,5:1 [52-54] lub 2:1 [55-59]. W niniejszej pracy EDC/NHS zostały zastosowane w proporcji 2:1.



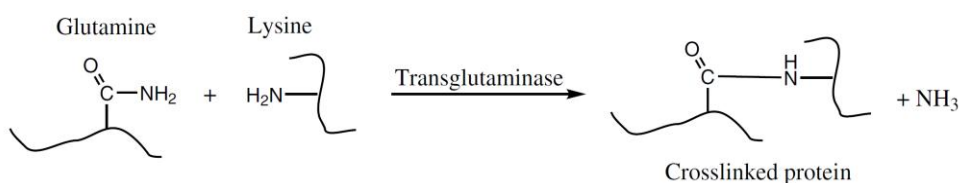
BDDGE należy do związków organicznych o dwóch grupach epoksydowych, które podczas reakcji z grupami $-NH_2$ tworzą wiązanie kowalencyjne (Rys. 10), poprzez co następuje sieciowanie żelatyny [60, 61]. Z uwagi na swoją biodegradowalność i niską toksyczność jest z powodzeniem od lat wykorzystywany w kosmetologii [62, 63].



Rys. 10. Dwuetapowy mechanizm reakcji BDDGE z grupami aminowymi [64].



Transglutaminaza to enzym umożliwiający tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy grupami aminowymi, podobnie jak EDC, należy do związków sieciujących typu „zero-length crosslinker” (Rys. 11) [65]. Nietoksyczność transglutaminazy wynika z faktu, że naturalnie występuje ona w organizmie człowieka – jest wydzielana przez fibroblasty w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek, wspomagając procesy gojenia [66]. Może być pozyskiwana zarówno z tkanek zwierzęcych, jak i produkowana przez bakterie. Potwierdzono jej korzystny wpływ na adhezję i rozprzestrzenianie się komórek w warunkach in vitro [67], [68]. Enzym ten jest również szeroko stosowany w przemyśle spożywczym, między innymi w produkcji pieczywa oraz wędlin [69, 70].



Rys. 11. Mechanizm sieciowania lizyny i glutaminy przez transglutaminazę [65].

6.4. Funkcjonalizacja powierzchni włókien

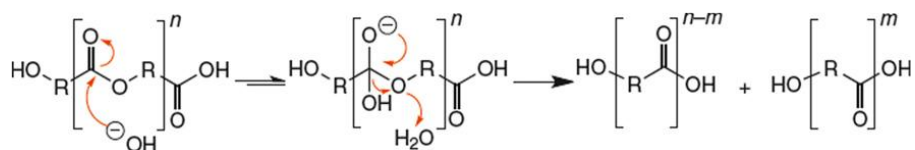
Alternatywnym podejściem do uzyskania dwuskładnikowych materiałów mikrowłóknistych, w stosunku do elektroprzędzenia mieszanek polimerowych, jest funkcjonalizacja powierzchni włókien jednoskładnikowych – w omawianym przypadku wykonanych z alifatycznego poliestru – z użyciem żelatyny. W ramach realizacji tej części badań wybrane zostały metody funkcjonalizacji oparte na różnych sposobach aktywacji powierzchni, stanowiącej pierwszy kluczowy etap procesu immobilizacji żelatyny. Praca 5, włączona do niniejszej rozprawy, miała na celu porównanie wpływu wybranych metod aktywacji na właściwości końcowe materiałów oraz efektywność kolejnego etapu, jakim była immobilizacja żelatyny. Podrozdziały 6.4.1-6.4.4 przybliżają metodykę kluczową dla tej pracy.

6.4.1. Aktywacja powierzchni włókien

Aktywacja powierzchni materiału włóknistego rozumiana jest jako działanie mające na celu zwiększenie liczby dostępnych grup funkcyjnych, niezbędnych do przeprowadzenia immobilizacji żelatyny. Do badań porównawczych wybrano trzy metody aktywacji powierzchni włókien: hydrolizę zasadową, zimną plazmę tlenową oraz aminolizę. Polimerem zastosowanym w tej części badań był PLCL – kopolimer kwasu mlekowego i ϵ -kapolaktonu.



Hydroliza zasadowa to dobrze opisana w literaturze metoda umożliwiająca zwiększenie liczby grup $-\text{COOH}$ na powierzchni materiałów poliestrowych podatnych na ten proces [71, 72]. Choć hydroliza poliestrów może zachodzić również w środowisku kwaśnym, to ze względu na konieczność zastosowania silnych kwasów, reakcja ma charakter objętościowy i prowadzi do degradacji całego materiału. Z kolei w warunkach zasadowych hydroliza przebiega na drodze nukleofilowego ataku jonów OH^- na atom węgla grupy estrowej (Rys. 12), co sprzyja modyfikacjom ograniczonym do powierzchni materiału [73].



Rys. 12. Mechanizm zasadowej hydrolizy poliestrów [74].

W niniejszej pracy do aktywacji powierzchni metodą hydrolizy zasadowej zastosowano roztwory NaOH o różnych stężeniach (0,05-1 M) oraz zmiennym czasie reakcji (10-180 min). Dodatkowo w celu oceny efektów skrajnych warunków jedną próbkę poddano działaniu 1 M NaOH przez 360 min. Po zakończeniu reakcji próbki zanurzano w 0,01 M roztworze kwasu solnego (HCl) w celu protonacji powstałych grup $-\text{COO}^-$, a następnie płukano wodą demineralizowaną i suszono w temperaturze pokojowej w suszarce próżniowej. Ze względu na obserwowany ubytek grubości materiału po aktywacji wybrane próbki poddano pomiarom masy i grubości przed i po modyfikacji.

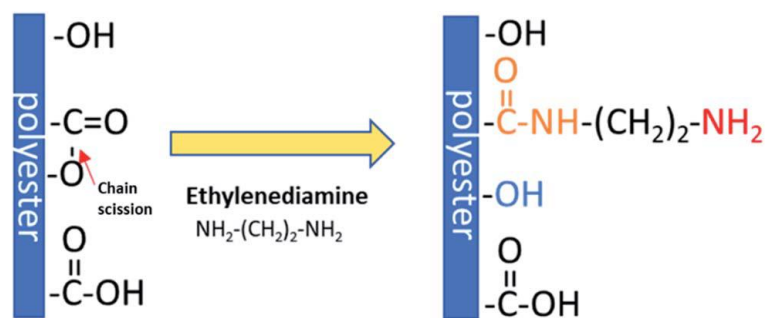


Plazma tlenowa powstaje w wyniku wyładowania elektrycznego w obecności gazu, w komorze o obniżonym ciśnieniu. Zastosowane napięcie powoduje przyspieszenie elektronów, które zderzają się z cząstkami gazu, prowadząc do powstania mieszaniny obojętnych cząsteczek, jonów, cząstek wzbudzonych i elektronów [75], które oddziałują na umieszczony w komorze materiał. W wyniku tych oddziaływań może dochodzić do fragmentacji łańcuchów polimerowych oraz wprowadzania nowych grup funkcyjnych, takich jak $-\text{COOH}$ czy $-\text{OH}$, co przekłada się na zwiększenie zwilżalności powierzchni poliestrów [76]. Wykazano, że modyfikacja powierzchni folii PLGA przy użyciu plazmy tlenowej sprzyja adhezji, rozprzestrzenianiu się i proliferacji fibroblastów [77].

Na potrzeby pracy 5 aktywację powierzchni zimną plazmą tlenową przeprowadzono przy użyciu urządzenia Plasma Cleaner (Diener, ZEPTO PCCE). Wszystkie próbki poddano działaniu plazmy przy niskiej mocy (1% mocy urządzenia) i ciśnieniu tlenu 0,1 mbar, w szerokim zakresie czasów ekspozycji, od 5 do 60 s.



Aminoliza jest jedną z metod wykorzystywanych w inżynierii biomateriałów poliestrowych w celu wprowadzenia na ich powierzchnię grup aminowych ($-\text{NH}_2$), które mogą następnie posłużyć do immobilizacji cząsteczek nadających materiałowi bioaktywność [78]. Reakcja zachodzi w wyniku nukleofilowego ataku jednej z grup $-\text{NH}_2$ cząsteczki diaminy na karbonylowy atom węgla w grupie estrowej, co prowadzi do przzerwania wiązania estrowego i utworzenia wiązania amidowego (Rys. 13) [79]. We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w ramach projektu OPUS wykazano, że aminoliza może powodować degradację molekularną w całej objętości włókien, jednak zastosowanie łagodnych warunków reakcji umożliwia skuteczne wprowadzenie grup $-\text{NH}_2$ przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych właściwości mechanicznych materiału [80].



Rys. 13. Mechanizm reakcji aminolizy [80].

Część eksperymentalna dotycząca aminolizy została oparta na wynikach opublikowanych w pracy Jeznach et al. [80], w której opisano wzrost stężenia grup -NH_2 w zależności od stężenia diaminy i czasu reakcji. Do dalszych analiz wybrano trzy warianty warunków reakcji, pozwalające uzyskać zróżnicowaną zawartość grup aminowych na powierzchni materiału. Aminolizę przeprowadzono poprzez zanurzenie próbek w roztworze etylenodiaminy w izopropanolu w temperaturze 30°C , w inkubatorze z wytrząsaniem orbitalnym. Po zakończeniu reakcji próbki trzykrotnie płukano wodą dejonizowaną i suszono próżniowo przez noc.

6.4.2. Oznaczenie ilości grup -COOH na powierzchni materiału

W celu oceny skuteczności modyfikacji powierzchni metodą hydrolizy zasadowej oraz za pomocą zimnej plazmy tlenowej przeprowadzono test z użyciem błękitu toluidyny, pozwalający na oznaczenie ilości grup -COOH . Metoda opiera się na barwieniu zjonizowanych grup karboksylowych na powierzchni włókien poprzez oddziaływania jonowe. Zastosowano zmodyfikowany protokół według Gupta et al. [80]. Próbki inkubowano przez 5 godzin w roztworze błękitu toluidyny o stężeniu $0,5 \text{ mM}$ i $\text{pH } 10$ w temperaturze 37°C , następnie płukano roztworem NaOH ($\text{pH } 9$) w celu usunięcia nadmiaru nieprzyłączonego chromoforu. Zabarwione próbki poddano następnie ekstrakcji z użyciem 50% roztworu kwasu octowego. Stężenie uwolnionego barwnika oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 630 nm (The MultiskanTM GO, Thermo Fisher Scientific, USA).

6.4.3. Przyłączenie białka na powierzchni włókien

Immobilizacja żelatyny została przeprowadzona w trzech etapach. W pierwszym z nich materiały z włókniny PLCL poddano jednej z trzech metod aktywacji powierzchni: hydrolizie

zasadowej, plazmie tlenowej lub aminolizie, przy czym parametry reakcji dobrano na podstawie wcześniejszych badań optymalizacyjnych: dla hydrolizy – od 0,1 M do 1 M NaOH przez 3 godziny; dla plazmy – 10 s i 40 s; dla aminolizy – trzy zestawy stężeń etylenodiaminy i czasów reakcji: 2% przez 5 minut, 2% przez 10 minut oraz 6% przez 5 minut, zgodnie z wcześniejszymi badaniami [81].

Następnie przeprowadzono reakcję z czynnikiem sieciującym. W tym celu próbki po hydrolizie i plazmie, ze zwiększoną ilością dostępnych na powierzchni grup $-COOH$, umieszczono przez 1 godzinę w roztworze EDC/NHS o stężeniach 0,23%/0,12% wag. rozpuszczonych w mieszance alkoholu etylowego i wody w proporcji 7:3 wag., a próbki poddane wcześniej aminolizie, z grupami $-NH_2$, na 2,5 godziny w 1% roztworze aldehydu glutarowego (GTA).

Finalnym etapem było zanurzenie wszystkich próbek w 0,2% roztworze żelatyny na 20 godzin w temperaturze $37^{\circ}C$ w celu jej immobilizacji na powierzchni materiałów. Aby upewnić się, że w materiale nie pozostała nieprzyłączona żelatyna, próbki płukano w wodzie demineralizowanej przez 24 godziny w temperaturze $30^{\circ}C$ w wytrząsarce orbitalnej.

Przygotowano również dwie próbki kontrolne z PLCL bez aktywacji powierzchni: jedną umieszczoną w roztworze EDC/NHS, a następnie w kąpeli żelatynowej; drugą poddaną jedynie końcowemu etapowi zanurzenia w żelatynie.

6.4.4. Oznaczenie ilości przyłączonego białka

W celu porównania efektywności różnych metod funkcjonalizacji powierzchni włókien z PLCL z wykorzystaniem żelatyny przeprowadzono oznaczenie ilości białka za pomocą testu BCA (Bicinchoninic Acid, zestaw QuantiPro™), umożliwiającego ilościowe oznaczenie białek w próbce. Pomiar ilości żelatyny obecnej na powierzchni włókien wykonano zarówno bezpośrednio po funkcjonalizacji, jak i po 1 oraz 7 dniach inkubacji w warunkach analogicznych do opisanego w podrozdziale 6.2 badania wymywania biododatku. W tym przypadku oceniano jednak nie zmianę masy próbki, lecz ilość białka pozostającego w materiale na podstawie testu BCA.

Dla każdego z analizowanych materiałów wykonano trzy powtórzenia, wykorzystując próbki o masie 1 mg. Każdą próbkę umieszczano w probówce typu Eppendorf, dodając 0,5 ml wody dejonizowanej oraz 0,5 ml roztworu BCA. W celu przygotowania krzywej kalibracyjnej sporządzono roztwory żelatyny o stężeniach z zakresu 5-30 $\mu g/ml$. Zarówno próbki badawcze,

jak i kalibracyjne inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Absorbancję mierzono przy długości fali 560 nm, wykorzystując spektrofotometr UV-Vis. Wyniki przedstawiono jako ilość żelatyny na powierzchni materiału, wyrażoną w µg na mg próbki włóknistej.

6.5. Charakterystyka roztworów polimerowych

Badania struktury i właściwości roztworów polimerowych były wykonywane w ramach prac 1 (*Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System*) i 3 (*The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibers*), należących do cyklu stanowiącego niniejszą rozprawę.



Przeprowadzenie optymalizacji nowego systemu rozpuszczalnikowego dla mieszaniny polikaprolaktonu i żelatyny wymagało systematycznego określenia wpływu proporcji kwasu octowego i mrówkowego, a także stężenia obu polimerów, na przewodność roztworu. Badano mieszanki rozpuszczalników w zakresie od 100% kwasu octowego do mieszaniny w proporcji 1:1, a także roztwory polimerowe zawierające PCL i żelatynę w proporcjach od 100% PCL do mieszaniny 75:25 (PCL:żelatyna) w rozpuszczalniku AA/FA o stosunku 9:1. Wszystkie pomiary przewodności elektrycznej rozpuszczalników i roztworów zostały wykonane za pomocą konduktometru polskiej firmy Elmetron CC-401.



Kolejnym istotnym parametrem roztworu polimerowego z punktu widzenia elektroprzewodzenia jest jego lepkość. Określa ona opór roztworu wobec przepływu, stabilizując tym samym strumień podczas procesu. Lepkość zależy zarówno od stężenia roztworu, jak i masy cząsteczkowej polimeru. Kluczowe znaczenie ma również rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika – analiza lepkości może dostarczyć informacji na temat interakcji pomiędzy cząsteczkami polimeru a cząsteczkami rozpuszczalnika.

W pracy 1 przeprowadzono badania porównawcze lepkości roztworów w dwóch układach rozpuszczalnikowych: HFIP oraz mieszaninie kwasu octowego i mrówkowego (AA/FA 9:1). Pomiarów dokonano dla różnych prędkości ścinania w przypadku roztworu PCL:żelatyna w stosunku 75:25, a także dla różnych proporcji PCL i żelatyny przy stałej prędkości ścinania 40 s⁻¹, odpowiadającej oszacowanej wartości szybkości ścinania wewnątrz igły.

W pracy 3 kontynuowano badania porównawcze roztworów w dwóch wcześniej wspomnianych układach rozpuszczalnikowych, dla różnych proporcji PCL i żelatyny, przy stałej prędkości ścinania. W celu oceny wpływu rodzaju rozpuszczalnika na lepkość roztworu porównano próbki o jednakowym całkowitym stężeniu polimeru wynoszącym 5%. Dodatkowo, w celu oceny różnic w konformacji cząsteczkowej obu badanych polipeptydów w zależności od zastosowanego układu rozpuszczalnikowego, zbadano lepkość zestawu roztworów żelatyny i kolagenu w obu typach rozpuszczalników w kilku stężeniach od 1,6% do 6,8%. Ze względu na niskie stężenia polimerów, we wszystkich przypadkach zastosowano prędkość ścinania wynoszącą 300 s^{-1} . Wszystkie pomiary lepkości przeprowadzono za pomocą wiskozymetru rotacyjnego Brookfield HADV-III Ultra w konfiguracji stożek/płytki.



W związku z zaobserwowanym zmętnieniem roztworów PCL/żelatyna w mieszaninie kwasów AA/FA, co może być związane z bardzo ograniczoną mieszalnością PCL i żelatyny wykazaną przez Kołbuk et al. [82] przeprowadzono ocenę struktury roztworu za pomocą mikroskopu interferencyjno-polaryzacyjnego Pluty (Biolar PI), wyprodukowanego przez Polskie Zakłady Optyczne (PZO).

6.6. Charakterystyka materiałów włóknistych

6.6.1. Mikroskopia optyczna i elektronowa

Wspomniany mikroskop interferencyjno-polaryzacyjny Pluty był wykorzystany również w badaniach wewnętrznej struktury elektroprzędzonych włókien dwuskładnikowych PCL/żelatyna. Badaniu poddano próbki zbierane na kolektor będący nieruchomą płytą. Ze względu na słabe uporządkowanie molekularne otrzymywanych w ten sposób włókien [83], oczekiwano, że zmiany jasności przy skrzyżowanych polaryzatorach będą odzwierciedlać możliwą segregację krystalizujących obszarów PCL i niekrystalizujących obszarów żelatyny.

Do oceny morfologii włókien oraz analizy ich średnicy wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (SEM), z użyciem mikroskopów JEOL JSM-6010PLUS/LV InTouchScope™ oraz JEOL JSM-6390LV. Obserwacja różnic w morfologii włókien uzyskanych z różnych układów rozpuszczalnikowych, poddanych wymywaniu biododatku białkowego, sieciowaniu lub funkcjonalizacji, stanowi podstawowe i istotne badanie w ramach oceny właściwości materiału.

6.6.2. Kalorymetria różnicowa

W celu analizy wpływu rodzaju rozpuszczalnika na krystaliczność oraz temperaturę topnienia PCL, zarówno po procesie elektroprzędzenia jak i po 90 dniach badania wymywania biododatku, zastosowano różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) z wykorzystaniem aparatu Perkin-Elmer Pyris-1. Próbkę o masie około 2 mg były ogrzewane z szybkością 10°C/min. Podczas pomiarów jako gaz ochronny stosowano azot. Krystaliczność PCL została oszacowana według równania (Eq. 1):

$$x_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \quad (1)$$

gdzie x_c to krystaliczność PCL, ΔH_f – entalpia topnienia próbki znormalizowana do masy PCL, natomiast ΔH_f^0 to entalpia topnienia w 100% krystalicznego PCL. Kalibrację urządzenia wykonywano przy użyciu wzorca z indu.

6.6.3. Rozpraszanie promieni rentgenowskich w zakresie szerokokątowym

Komplementarnym badaniem dla DSC, wykorzystanym do analizy krystaliczności włókien dwuskładnikowych, było rozpraszanie promieni rentgenowskich w zakresie szerokokątowym (WAXS, *ang. Wide Angle X-ray Scattering*). Zostało ono przeprowadzone w celu oceny zmian krystaliczności PCL oraz struktury żelatyny/kolagenu we włóknach, w zależności od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika oraz w funkcji czasu dla próbek poddanych badaniu wymywania biododatku. Detekcja pików charakterystycznych dla żelatyny/kolagenu w konformacji potrójnej helisy może wskazywać na renaturację żelatyny. Analizowane były położenia pików krystalicznych i halo amorficznego, ich przesunięcia względem siebie oraz wielkość kryształów PCL i ich doskonałość wyrażana przez szerokość połówkową pików (FWHM, *ang. Full Width at Half Maximum*).

Pomiary WAXS wykonano za pomocą dyfraktometru Bruker D8 Discover (promieniowanie $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Wszystkie badania zostały wykonane w trybie odbiciowym, przy użyciu szczeliny o szerokości 0,6 lub 1 mm oraz dwóch kolimatorów – jednego po stronie pierwotnej i jednego po stronie wtórnej. Zastosowano skanowanie typu „coupled theta-2-theta”, co oznacza, że źródło promieniowania i detektor jednowymiarowy poruszały się symetrycznie, podczas gdy próbka pozostawała nieruchoma, umieszczona

w centrum koła goniometrycznego. Profile WAXS zostały następnie poddane dekonwolucji numerycznej przy użyciu funkcji Pearson VII.

6.6.4. Spektroskopia w podczerwieni

Badania z użyciem spektroskopii w podczerwieni wykonane metodą całkowitego odbicia wewnętrznego ATR-FTIR (*ang. Attenuated Total Reflection, Fourier Transform Infrared*) były wykorzystane w dwóch celach – do oceny struktury molekularnej polipeptydów, żelatyny i kolagenu we włókninach dwuskładnikowych, zarówno wyjściowych, jak i poddanych badaniom wmywania biododatku oraz do analizy zmian zachodzących w materiałach poddanych aktywacji powierzchni za pomocą hydrolizy i plazmy, a następnie oceny skuteczności immobilizacji żelatyny. W pierwszym przypadku dodatkowo wykonano pomiary również na wyjściowych próbkach kolagenu i żelatyny w formie proszku oraz na foliach z obu białek odlewanych z roztworu 0,1 M kwasu octowego, które miały posłużyć jako materiały odniesienia.

Pomiary wykonano w zakresie $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, a analiza koncentrowała się na pasmach amidowych I i II, które są głównymi pasmami charakterystycznymi w widmie w podczerwieni dla białek, a także na paśmie, które odpowiada wibracjom grup karbonylowych w cząsteczkach PLCL. Przesunięcia maksimów pasm amidowych mogą świadczyć o zmianach konformacyjnych: przesunięcie ku niższym liczbom falowym sugeruje denaturację, a ku wyższym renaturację białka. Analogicznie, przesunięcie maksimum piku dla wiązania C=O pochodzącego z grupy estrowej ku niższym liczbom falowym świadczy o jej rozpadzie do grupy karboksylowej [84].

6.6.5. Badania właściwości mechanicznych

Celem przeprowadzonych badań mechanicznych było określenie wpływu zastosowanych rozpuszczalników, wmywania biododatku w warunkach symulujących środowisko fizjologiczne, jak również modyfikacji powierzchni na właściwości wytrzymałościowe uzyskanych włóknin, co może rzutować na ich przydatność jako materiałów przeznaczonych na rusztowania komórkowe.

W przypadku materiałów porowatych, takich jak włókniny, obliczanie modułu Younga obarczone jest pewną niejednoznacznością – otrzymana wartość odnosi się do całej struktury, a nie do litego materiału polimerowego ani pojedynczego włókna. W niniejszej pracy moduł

traktowany jest jako parametr porównawczy, opisujący funkcjonalne właściwości mechaniczne całej włókniny. Takie podejście pozwala na ocenę porównawczą spodziewanego zachowania materiału w warunkach aplikacyjnych, mimo że uzyskiwane wartości nie odpowiadają klasycznej definicji modułu Younga.

Właściwości mechaniczne elektroprzędzonych materiałów badano przy pomocy testu rozciągania jednoosiowego, korzystając z maszyny wytrzymałościowej Lloyd EZ-50 (USA), wyposażonej w gumowe uchwyty przystosowane do cienkich i delikatnych próbek oraz głowicę pomiarową o zakresie 50 N. Pomiarów prowadzono na suchych próbkach, przy prędkości rozciągania wynoszącej 5 lub 10 mm/min, w zależności od etapu badań. Dla każdego rodzaju materiału przygotowano po trzy próbki o kształcie prostokątnym, o wymiarach 50 mm × 5 mm lub 50 mm × 10 mm, z czego odpowiednio 20-25 mm długości było rzeczywiście rozciąganych pomiędzy uchwytami. Grubość próbek, mieszcząca się w zakresie 50-80 μm, była mierzona dla każdej na obu końcach z użyciem mikrometru analogowego, a wartość uśredniona uwzględniana była w dalszej analizie. Na podstawie uzyskanych krzywych naprężenie-odkształcenie wyznaczano moduł Younga, wytrzymałość na rozciąganie oraz wydłużenie przy zerwaniu.

6.6.6. Zwilżalność

Zwilżalność jest jedną z kluczowych cech materiałów przeznaczonych do zastosowań jako rusztowania komórkowe. Wprowadzenie alternatywnego systemu rozpuszczalników do elektroprzędzenia włókien z PCL i biopolimeru białkowego wymaga oceny wpływu tego systemu na właściwości powierzchniowe materiału, w tym na jego zwilżalność – zarówno bezpośrednio po otrzymaniu, jak i w funkcji czasu dla eksperymentu wypłukiwania biododatku odpowiedzialnego za nadanie materiałowi charakteru hydrofilowego. Ponieważ kąt zwilżania jest właściwością ściśle zależną od charakterystyki powierzchni, istotne było również jego oznaczenie po zastosowanych modyfikacjach powierzchniowych włókien.

Pomiar kąta zwilżania przeprowadzono metodą kropli siedzącej, z wykorzystaniem goniometru OCA 15EC (Data Physics, Niemcy), stosując wodę demineralizowaną jako ciecz kontaktową. W zależności od etapu badań, pomiary wykonywano w jednym (praca 2) lub w kilku punktach czasowych (prace 3 i 4), rejestrując kąt zwilżania od 0,2 s do 30 s po naniesieniu kropli na powierzchnię próbki. Modyfikacja metodyki w późniejszych etapach badań była wynikiem obserwacji, że część analizowanych materiałów, choć wykazywała podobne wartości kąta zwilżania w jednym ustalonym punkcie czasowym, charakteryzowała

się odmiennym przebiegiem zmian tego parametru w czasie. Wprowadzenie pomiarów w kilku punktach czasowych umożliwiło dokładniejszą charakterystykę zwilżalności materiałów oraz identyfikację subtelnych różnic pomiędzy badanymi wariantami, co ma szczególne znaczenie w przypadku materiałów włóknistych. W takich strukturach na zwilżalność wpływają nie tylko właściwości chemiczne powierzchni włókien, ale również ich morfologia oraz porowatość, w tym zjawiska kapilarne zachodzące wewnątrz matrycy włóknistej.

6.6.7. Chromatografia żelowa

Analiza zmian masy cząsteczkowej została przeprowadzona dla próbek poddanych aktywacji powierzchni, stanowiącej pierwszy etap procesu funkcjonalizacji. Zastosowane metody – aminoliza, hydroliza zasadowa oraz zimna plazma tlenowa w różny sposób oddziałują na włókna poliestrowe, a w zależności od czasu działania i/lub stężenia reagentów mogą prowadzić do zmian masy cząsteczkowej o zróżnicowanym nasileniu – od nieznacznych po istotne. Charakter oraz zakres tych zmian wpływają mierzalnie na właściwości mechaniczne włókien, a tym samym mogą decydować o ich funkcjonalności aplikacyjnej.

Do oznaczenia masy cząsteczkowej próbek polimerowych zastosowano chromatografię żelową (GPC, *ang. gel permeation chromatography*) z użyciem urządzenia Nexera (Shimadzu, Japonia), wyposażonego w kolumnę Phenogel™ (5 μm , 10^5 Å, Phenomenex) oraz detektor załamania światła RID-20A. Próbki o stężeniu 2 mg/mL przygotowywano poprzez rozpuszczenie w tetrahydrofuranie (THF), mieszanie przez 24 godziny, a następnie filtrację próbek z użyciem hydrofobowego filtra PTFE o porach 0,22 μm . Pomiar prowadzono w temperaturze 40°C, przy przepływie fazy ruchomej (THF) wynoszącym 1 ml/min. Krzywą kalibracyjną oparto na standardzie polistyrenowym, a do obliczenia mas cząsteczkowych zastosowano równanie Marka-Houwinka, według parametrów dla PLCL ustalonych przez Nuuttilla [85].

6.6.8. Badania odpowiedzi komórkowej in vitro

Badania odpowiedzi komórkowej stanowią nieodzowny etap w procesie oceny nowych materiałów przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkankowej. Choć pełną ocenę bezpieczeństwa i funkcjonalności rusztowania umożliwiają dopiero badania in vivo, ze względu na złożoną odpowiedź całego organizmu, w tym istotny udział układu immunologicznego, to modelowe badania in vitro mają kluczowe znaczenie na wczesnym

etapie rozwoju materiału. Ocena cytotoksyczności oraz analiza morfologii komórek hodowanych na powierzchni materiału umożliwiają szybką identyfikację niekorzystnych formułacji, ograniczenie kosztów dalszych badań oraz redukcję liczby niezbędnych eksperymentów na zwierzętach.

Badania odpowiedzi komórkowej przedstawione w niniejszej rozprawie obejmują zarówno analizy ilościowe, jak i jakościowe. Wszystkie testy ilościowe przeprowadzono z użyciem standardowej dla tego typu badań linii mysich fibroblastów L929. W badaniach jakościowych, w zależności od etapu badań, zastosowano również linię L929 lub poza nią, dodatkowo ludzkie fibroblasty (HF, *ang. human fibroblasts*).

Do grupy analiz ilościowych zaliczają się badania cytotoksyczności oparte na ekstraktach oraz testy żywotności komórek prowadzone w bezpośrednim kontakcie z materiałem. Wykorzystano w nich testy aktywności metabolicznej: MTT (redukcja soli tetrazolowej do formazanu przez mitochondrialną dehydrogenazę), PrestoBlue (redukcja resazuryny do resorufiny) oraz CellTiter-Glo® (pomiar emisji światła powstałego w reakcji utlenienia lucyferyny), a także test proliferacji CyQuant (ilościowy pomiar DNA komórkowego).

Badanie cytotoksyczności zostało przeprowadzone w sposób zbliżony do protokołu zamieszczonego w normie ISO 10993-5, toteż do oceny toksyczności zastosowano proponowany w normie próg, poniżej którego stwierdza się działanie cytotoksyczne, a mianowicie 70% wyniku testu kontrolnego.

Badania jakościowe polegały na ocenie zagęszczenia, morfologii i rozwinięciu cytoszkieletu komórek hodowanych na powierzchni materiałów włóknistych po 3-7 dniach inkubacji. Analizie poddano obrazy uzyskane za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikroskopii fluorescencyjnej. W przypadku tej drugiej zastosowano barwienie jąder komórkowych oraz włókien aktynowych budujących cytoszkielet.

Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli, gęstości wysiewu, czasu trwania eksperymentów, protokołów testów oraz przygotowania próbek znajdują się w pracach 3 (*The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres*) oraz 5 (*A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization*).

7. Publikacje włączone w cykl

1. Denis P., **Dulnik J.**, Sajkiewicz P., *Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System*, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, Vol.64, No.7, pp.354-364, 2015
2. **Dulnik J.**, Denis P., Sajkiewicz P., Kołbuk D., Choińska E., *Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system*, Polymer Degradation and Stability, Vol.130, pp.10-21, 2016
3. **Dulnik J.**, Kołbuk D., Denis P., Sajkiewicz P., *The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres*, European Polymer Journal, Vol.104, pp.147-156, 2018
4. **Dulnik J.**, Sajkiewicz P., *Crosslinking of gelatin in bicomponent electrospun fibers*, Materials, Vol.14, No.12, pp.3391-1-13, 2021
5. **Dulnik J.**, Jeznach O., Sajkiewicz P., *A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization*, Journal of Functional Biomaterials, Vol.13, No.4, pp.272-1-23, 2022

Tab. 2. Dane bibliograficzne publikacji włączonych do rozprawy na dzień 16 października 2025.

Numer publikacji	Rok wydania	IF (2025)	Punkty MNiSW (2025)	Liczba cytowani (Scopus)	Liczba cytowań (Web of Science)
1	2015	2,5	70	65	60
2	2016	7,4	100	114	107
3	2018	6,3	100	64	63
4	2021	3,2	140	14	14
5	2022	5,2	100	5	5

7.1. Praca 1. Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System

Motywacją do podjęcia badań, których wyniki przedstawiono w artykule otwierającym cykl publikacji zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej, była potrzeba znalezienia alternatywy dla silnie toksycznych alkoholi fluorowanych wykorzystywanych powszechnie w procesie elektroprzędzenia biodegradowalnych dwuskładnikowych włókien z udziałem polimeru syntetycznego oraz biopolimeru białkowego.

W dostępnej literaturze do otrzymywania roztworów polimerowych zawierających polikaprolakton z dodatkiem żelatyny lub kolagenu, przeznaczonych do elektroprzędzenia, wykorzystywano jedynie alkohole fluorowane. Nieliczne próby zastosowania innych układów rozpuszczalnikowych ograniczały się do przędzenia włókien zawierających tylko jeden z tych polimerów, prowadząc do otrzymania włókien o defektach strukturalnych, niespełniających wymagań stawianych materiałom przeznaczonym na rusztowania komórkowe.

Głównym celem badań było opracowanie alternatywnego układu rozpuszczalników do elektroprzędzenia włókien z polikaprolaktonu i żelatyny, który byłby bezpieczniejszy dla operatora, mniej toksyczny oraz tańszy w porównaniu do stosowanych powszechnie alkoholi fluorowanych. Istotnym założeniem było, że włókniny otrzymywane z użyciem alternatywnych rozpuszczalników nie mogą odbiegać znacząco zarówno pod kątem morfologii, jak i funkcjonalności od tych uzyskanych z roztworów opartych o alkohole fluorowane.

Ze względu na to, że analizowany system rozpuszczalnikowy (mieszanka kwasu octowego i mrówkowego) był nowatorskim podejściem, konieczne było rozpoczęcie prac od przeprowadzenia charakterystyki otrzymywanych roztworów polimerowych pod kątem ich struktury, lepkości oraz przewodnictwa elektrycznego. Drugim ważnym zadaniem była ocena morfologii i krystaliczności włókien PCL/żelatyna uzyskanych przy użyciu nowo opracowanego układu rozpuszczalników w porównaniu z materiałami otrzymywanymi z wykorzystaniem wybranego przedstawiciela alkoholi fluorowanych – HFIP.

W tym celu przeprowadzono testy optymalizacyjne z wykorzystaniem różnych proporcji obu kwasów oraz stężeń polimerów, dążąc do uzyskania jak najbardziej stabilnych warunków elektroprzędzenia. Na podstawie wyników tej części badań ustalono, że optymalnym układem rozpuszczalnikowym jest mieszanka składająca się w 90% z kwasu octowego i w 10% z kwasu mrówkowego (AA/FA 9:1). Dzieje się tak ze względu na dobrą rozpuszczalność obu polimerów w tych kwasach oraz odpowiednie przewodnictwo elektryczne

i niskie napięcie powierzchniowe uzyskane poprzez niewielki dodatek kwasu mrówkowego do kwasu octowego, który w takiej ilości nie wywołuje szybkiej degradacji molekularnej polimerów, co obserwowane było przy jego wyższych stężeniach. Zastosowanie mieszaniny AA/FA 9:1 umożliwia prowadzenie powtarzalnego i stabilnego procesu elektroprzędzenia, w wyniku którego otrzymuje się wolne od defektów (tzw. koralików) włókna.

Kolejnym etapem badań była charakterystyka otrzymanych roztworów polimerowych. Pierwszą zauważalną różnicą pomiędzy roztworami przygotowanymi w HFIP a tymi opartymi na mieszaninie kwasu octowego i mrówkowego było ich zmętnienie. Obserwacje prowadzone za pomocą mikroskopu optycznego potwierdziły emulsyjną strukturę roztworów PCL/żelatyna otrzymanych z użyciem kwasów, przy czym struktura ta okazała się stabilna w czasie.

W dalszej części przeprowadzono pomiary przewodnictwa elektrycznego oraz lepkości roztworów. Wykazano, że wzrost zawartości żelatyny względem PCL powoduje wzrost przewodności elektrycznej w układzie opartym na kwasach oraz przyczynia się do obniżenia lepkości roztworu niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika – kwasowego czy alkoholu fluorowanego. Porównanie lepkości roztworów przygotowanych w układzie AA/FA 9:1 oraz w HFIP w funkcji szybkości ścinania, wykazało nieznaczny spadek lepkości w przypadku układu kwasowego, przy praktycznie stałej wartości tego parametru dla roztworów na bazie HFIP.

Na potrzeby otrzymania materiałów włóknistych przygotowano zestaw roztworów zawierających oba polimery, polikaprolakton i żelatynę, w proporcjach wagowych: 90:10, 85:15, 80:20 oraz 75:25. Roztwory w układzie AA/FA miały stężenie całkowite 15%, a w HFIP 5%. Jako kontrolę przygotowano także roztwory zawierające wyłącznie PCL.

Proces elektroprzędzenia wszystkich roztworów prowadzono w ustalonych warunkach pod względem prędkości przepływu, odległości igły od kolektora, temperatury oraz wilgotności powietrza. Jedynym parametrem różniącym procesy była wartość napięcia, 10 kV dla roztworów z AA/FA oraz 12,5 kV dla roztworów z HFIP.

Następny etap badań obejmował charakterystykę porównawczą uzyskanych włókien. Obserwacje przeprowadzone za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) potwierdziły, że elektroprzędzenie roztworów obu typów pozwala na uzyskanie włókien o zbliżonej morfologii, z izotropowo ułożonymi włóknami o gładkiej powierzchni, pozbawionymi defektów. Taki wynik sugeruje stabilność procesu elektroprzędzenia oraz brak widocznych śladów struktury emulsyjnej. Analiza rozkładów średnic włókien wykazała, że w przypadku włókien z czystego PCL obserwuje się bimodalny rozkład średnic, natomiast dodatek żelatyny prowadzi do przejścia w rozkład jednomodalny.

Różnice wynikające z zastosowanego rozpuszczalnika ujawniły się podczas obserwacji mikroskopowej włókien przy skrzyżowanych polaryzatorach, pozwalającej na ujawnienie struktur optycznie dwójłomnych, jakimi są kryształy. Badanie to wykazało mniej jednorodne ułożenie kryształitów PCL we włóknach otrzymanych z mieszaniny kwasów w porównaniu do włókien elektroprzędzonych z HFIP, co wskazuje na wpływ emulsyjnego charakteru roztworów kwasowych – separację krystalicznego PCL i amorficznej żelatyny. Podobnie badanie krystaliczności włókien za pomocą DSC pokazało różnice dla obu grup włókien – większą krystaliczność materiałów formowanych z kwasów, co jest wynikiem znacząco niższej temperatury wrzenia HFIP w porównaniu do obu kwasów. Decyduje to o szybszym odparowaniu HFIP z włókien podczas procesu elektroprzędzenia, a tym samym kryształy PCL mają mniej czasu na wzrost.

Ostatnim przeprowadzonym badaniem była analiza struktury żelatyny w otrzymanych materiałach włóknistych. Wyniki uzyskane metodą rozpraszania rentgenowskiego (WAXS) nie wykazały obecności pików dyfrakcyjnych charakterystycznych dla żelatyny w konformacji helikalnej, niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika. Zaobserwowano jedynie szerokie halo odpowiadające strukturze amorficznej.

Osiągnięcia:

- Opracowano mniej toksyczny, przyjazny dla środowiska i tańszy system rozpuszczalników jako alternatywę dla HFIP do formowania elektroprzędzonych włókien PCL/żelatyna.
- Po raz pierwszy przeprowadzono z powodzeniem, innowacyjne na tle ówczesnej literatury, elektroprzędzenie dwuskładnikowych włókien PCL i żelatyny z zastosowaniem mieszaniny AA/FA jako rozpuszczalnika.
- Potwierdzono, że nowo opracowany układ rozpuszczalnikowy pozwala formować włókniny o korzystnej, zbliżonej morfologii do tych otrzymywanych z użyciem tradycyjnych rozpuszczalników.

Wykazano:

- Roztwory PCL i żelatyny otrzymane z użyciem mieszanki kwasów jako rozpuszczalnika, charakteryzowały się stabilną, emulsyjną strukturą (w przeciwieństwie do klarownych roztworów HFIP).

- Przewodnictwo elektryczne roztworów wzrastało przy zwiększeniu zawartości żelatyny w roztworze.
- Elektroprzędzenie dwuskładnikowych roztworów sporządzonych z użyciem obu typów rozpuszczalników przy zbliżonych parametrach procesu, pozwoliło na otrzymanie materiałów o porównywalnej morfologii włókien. Włókniyny dwuskładnikowe charakteryzowały się jednomodalnym rozkład grubości włókien, zaś formowane z czystego PCL – bimodalnym.
- Ułożenie kryształów PCL we włóknach z AA/FA było mniej jednorodne niż w tych z HFIP.
- Stopień krystaliczności materiałów formowanych z mieszanki kwasów octowego i mrówkowego był większy ze względu na wolniejsze odparowywanie tych rozpuszczalników ze strugi roztworu w trakcie procesu elektroprzędzenia.
- Niezależnie od zastosowanego typu rozpuszczalnika, nie wykryto obecności kryształów żelatyny, które świadczyłyby o jej helikalnej strukturze we włóknach.

7.2. Praca 2. Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system

Druga praca ujęta w cyklu stanowi kontynuację badań nad dwuskładnikowymi materiałami włóknistymi otrzymywanymi z wykorzystaniem alternatywnego układu rozpuszczalników. Wcześniejsze badania włókien otrzymanych z użyciem mieszanki kwasów jako rozpuszczalnika, mimo uzyskania zbliżonej morfologii elektroprzędzonych materiałów do tych otrzymanych z HFIP, ujawniły różnice w strukturze wewnętrznej włókien wynikające z emulsyjności roztworu. Z uwagi na perspektywę aplikacji badanych materiałów w inżynierii tkankowej, konieczne było przeprowadzenie dalszych badań, w celu oceny jak różnice pomiędzy materiałami otrzymywanymi z użyciem różnych rozpuszczalników mogą rzutować na właściwości włókien w warunkach żywego organizmu.

Głównym celem badań ujętych w pracy było zbadanie wpływu rozpuszczalnika wykorzystanego w procesie elektroprzędzenia na szybkość wymywania dodatku biopolimeru oraz na zmiany szeregu właściwości materiałów włóknistych z polikaprolaktonu z dodatkiem żelatyny i kolagenu, w zależności od czasu, w środowisku symulującym warunki fizjologiczne. Dodatkowym celem było porównanie wyników uzyskanych dla różnych wyjściowych zawartości biododatku we włóknach oraz dla dwóch typów dodatku białkowego: kolagenu i jego zdenaturowanej formy – żelatyny.

Na potrzeby zaplanowanych badań otrzymano serię włókien z zastosowaniem analogicznych warunków procesu elektroprzędzenia, jak w poprzedniej pracy. Z roztworów opartych na obu typach rozpuszczalników – mieszaninie kwasów AA/FA 9:1 oraz HFIP elektroprzędzono włókniny PCL/żelatyna w proporcjach wagowych 9:1, 8:2 i 7:3, a dla układu PCL/kolagen w proporcji 9:1. Włókniny zawierające 100% PCL zastosowano jako materiał odniesienia.

Badanie wymywania biododatku białkowego (szczegółowy opis procedury znajduje się w podrozdziale 6.2) polegało na umieszczeniu próbek każdego z materiałów włóknistych w szklanych pojemnikach zawierających bufor fosforanowy z dodatkiem azydku sodu (pełniącego funkcję środka bakteriobójczego i grzybobójczego), a następnie inkubacji w temperaturze 37°C przez 1, 3, 7, 14, 30 i 90 dni.

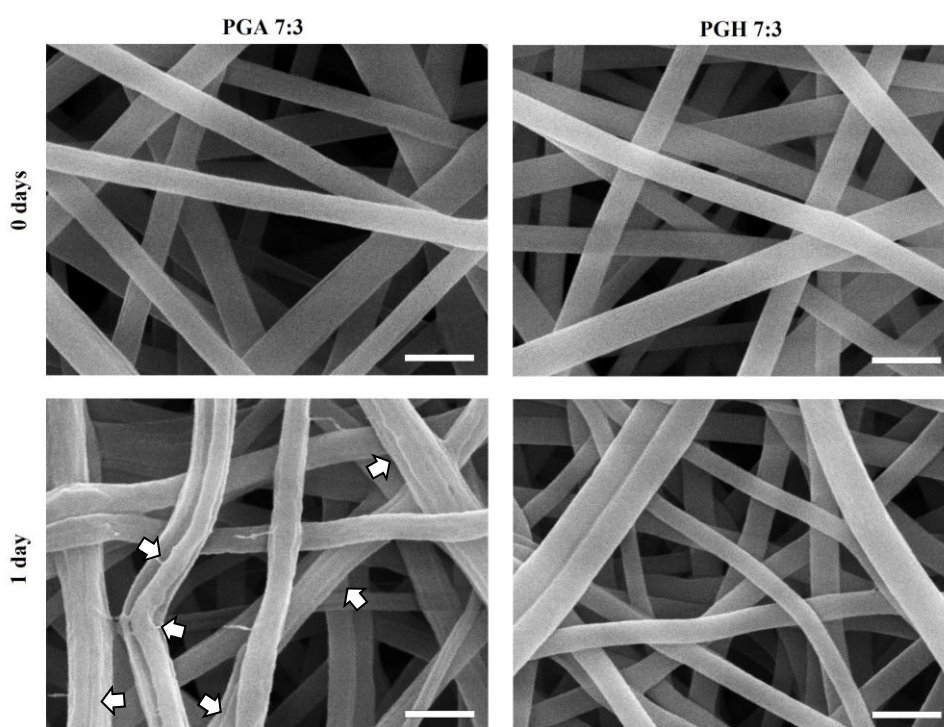
W związku z brakiem zmian masy próbek czystego PCL nawet po 90 dniach inkubacji, ubytki masy zarejestrowane dla materiałów PCL/żelatyna oraz PCL/kolagen przypisano wymywaniu biopolimeru. Zaobserwowano istotnie większe ubytki masy w tych samych punktach czasowych dla materiałów otrzymanych z roztworów kwasowych w porównaniu do analogicznych włókien uzyskanych z HFIP. Dodatkowo, stwierdzono, że szybkość wymywania biopolimeru wzrastała wraz z jego początkową zawartością w materiale, a największy spadek masy zachodził w ciągu pierwszej doby eksperymentu.

Różnicę w szybkości wymywania biopolimeru w zależności od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika przypisano emulsyjnemu charakterowi roztworu opartego na kwasach, który wpływał na nierównomierne rozmieszczenie obu polimerów wewnątrz włókien, a im większy procentowy udział biododatku tym bardziej nierównomierne było jego rozmieszczenie. Największy ubytek masy w ciągu pierwszych 24 godzin wynikał z wypłukania łatwo dostępnych cząsteczek białka zlokalizowanych bliżej powierzchni włókien, a późniejsze zaobserwowane spowolnienie tego procesu w czasie można tłumaczyć mniejszą dostępnością białka znajdującego się w głębszych warstwach włókien.

Badania DSC wykazały wzrost krystaliczności PCL w miarę postępującej degradacji materiałów, sięgający nawet 10%, a tendencja ta była bardziej wyraźna dla włókien o niższej zawartości biododatku. Równocześnie, niezależnie od składu materiału, odnotowano wyraźny wzrost temperatury topnienia kryształów PCL – średnio o około 6%. Zmiany te świadczą o reorganizacji strukturalnej polimeru zachodzącej w temperaturze 37°C – istotnie powyżej temperatury zeszklenia, co sprzyja ruchliwości molekularnej polegającej na wzroście oraz doskonaleniu się struktury istniejących krystalitów. Zjawisko to zostało potwierdzone również

za pomocą analizy rozpraszania rentgenowskiego, gdzie obserwowano zmniejszenie szerokości połówkowej refleksów dyfrakcyjnych PCL.

Analiza wyników spektroskopii uzyskanych metodą FTIR koncentrowała się na położeniu pasm amidowych I i II – charakterystycznych dla żelatyny i kolagenu. Zaobserwowano, że wraz ze zmniejszeniem udziału biopolimeru w materiale dochodziło do przesunięcia obu pasm w kierunku wyższych liczb falowych. Zjawisko to można tłumaczyć rosnącym udziałem sygnału pochodzącego od cząsteczek białka silniej związanych z PCL. Ograniczona mieszalność PCL i biopolimeru białkowego sprawia, że przy wyższej zawartości białka rośnie również udział cząsteczek słabo związanych z PCL, które ulegają łatwiejszemu wymywaniu, co wpływa na pozycję rejestrowanych pasm. Podobne przesunięcia mogą również wynikać z częściowej renaturacji struktury białka, której udziału nie można wykluczyć, jednak efekt ten – jeśli występował – był na tyle subtelny, że nie został potwierdzony za pomocą WAXS.



Rys. 14. Porównanie morfologii włókien PCL/żelatyna z kwasów (PGA 7:3) oraz z HFIP (PGH 7:3) zawierających wyjściowo 30% żelatyny przed i po 1 dniu badania wymywania biododatku. Strzałki wskazują rowki na powierzchni, wzdłuż włókien. Fragment Rys. 11. z pracy 2. Pasek skali wynosi 1 μm .

Obrazowanie SEM ujawniło istotne różnice w morfologii dwuskładnikowych włókien otrzymanych z użyciem obu typów rozpuszczalników. Szczególnie w przypadku materiałów z AA/FA o najwyższej wyjściowej zawartości żelatyny (30%) już po jednej dobie eksperymentu obserwowano bruzdy biegnące wzdłuż włókien, będące pozostałością po

wypłukanym biododatku (Rys. 14). Pomimo mniejszych, lecz wciąż istotnych ubytków żelatyny w przypadku włókien opartych na HFIP, nie stwierdzono widocznych zmian powierzchni włókien.

Potwierdza to hipotezę o wpływie emulsyjności roztworu na rozmieszczenie biododatku we włóknach – w przypadku zastosowania rozpuszczalników kwasowych dochodzi do jego pasmowego rozkładu. Z kolei brak wyraźnych śladów wypłukania biododatku i jego wolniejsze wmywanie w materiałach uzyskanych z HFIP wskazują na bardziej jednorodne rozmieszczenie obu polimerów w strukturze włókna.

Zgodnie z oczekiwaniami, ubytek żelatyny i kolagenu z włókien prowadził do wzrostu hydrofobowości materiałów w czasie, co zostało potwierdzone pomiarami kąta zwilżania. Początkowo, im wyższa była zawartość biododatku we włókninie, tym niższe wartości kąta zwilżania wykazywał materiał. Dla tych samych proporcji PCL do biopolimeru, włókniny otrzymane z HFIP charakteryzowały się wyższą zwilżalnością niż te z mieszaniny AA/FA 9:1. Po 90 dniach eksperymentu jedynie włókniny PCL/żelatyna 70:30 uzyskane z HFIP utrzymały niższy kąt zwilżania w porównaniu do materiału z czystego PCL. Różnice te można tłumaczyć lepszą homogennością rozproszenia biododatku w strukturze włókien otrzymanych z HFIP, co z jednej strony zwiększa początkową hydrofilowość materiału, a z drugiej – spowalnia proces jego wmywania w czasie.

Przeprowadzone badania właściwości mechanicznych potwierdziły brak degradacji molekularnej PCL w czasie 90 dni trwania eksperymentu, niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika. Świadczy o tym brak istotnych zmian w wartości wydłużenia przy zerwaniu dla próbek z czystego PCL, co pozostaje zgodne z danymi literaturowymi [86], [87].

Podczas gdy obliczony moduł Younga dla materiałów z czystego PCL również nie ulegał zmianie w czasie, dla włókien zawierających żelatynę lub kolagen zaobserwowano tendencję spadkową w późniejszych punktach czasowych eksperymentu. Mimo że naprężenie przy zerwaniu nie zmieniało się istotnie w zależności od czasu degradacji, widoczne były wyraźne różnice pomiędzy materiałami otrzymanymi z użyciem różnych rozpuszczalników – włókniny z HFIP wykazywały dwukrotnie wyższe wartości tego parametru w porównaniu do włókien z AA/FA.

Spadek modułu Younga należy tłumaczyć jako efekt wmywania biopolimeru, którego moduł jest znacznie wyższy niż w przypadku PCL. Z kolei różnice w wartościach naprężenia przy zerwaniu pomiędzy obiema grupami materiałów można wiązać z odmienną strukturą włókien.

Osiągnięcia:

- Przeprowadzone badania pokazały istotne różnice między dwuskładnikowymi włókninami PCL/żelatyna i PCL/kolagen elektroprzędzonymi z roztworów opartych na AA/FA 9:1 oraz z HFIP pod kątem wymywania biododatku na przestrzeni 90 dni eksperymentu symulacji warunków fizjologicznych.
- Rezultaty badań ujawniły znaczący wpływ emulsyjności roztworów z kwasów nie tylko na szybkość wymywania biopolimeru, ale i na szereg innych właściwości wynikających z różnic strukturalnych będących jej następstwem.

Wykazano:

- Biododatek wypłukiwał się szybciej z włóknin otrzymanych z roztworów opartych na mieszaninie AA/FA oraz z materiałów o wyższej jego wyjściowej zawartości.
- Największa szybkość wymywania występowała w pierwszej dobie eksperymentu, a następnie zwalniała.
- Zaobserwowano wzrost krystaliczności i temperatury topnienia kryształów PCL, co wskazuje na reorganizację struktury polimeru w trakcie trwania eksperymentu.
- Na powierzchni włókien zaobserwowano bruzdy biegnące wzdłuż ich długości, będące pozostałościami po wypłukanym biododatkem w materiałach otrzymanych z użyciem alternatywnych rozpuszczalników, co świadczy o pasmowym rozmieszczeniu biododatku w strukturze włókna.
- Podczas trwania badania stwierdzono wzrost hydrofobowości materiałów, co jest konsekwencją wypłukiwania żelatyny. Wyjściowe wartości kąta zwilżania były niższe w przypadku materiałów uzyskanych z HFIP.
- Niezmienione naprężenie przy zerwaniu materiałów z czystego PCL po inkubacji w środowisku symulującym warunki fizjologiczne, potwierdziło brak degradacji molekularnej PCL.
- Dla wszystkich materiałów dwuskładnikowych zaobserwowano spadek modułu Younga w miarę upływu czasu trwania badania oraz niższe wartości naprężenia przy zerwaniu w przypadku materiałów otrzymanych z wykorzystaniem układu AA/FA.

7.3. Praca 3. The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibers

Kolejna praca w cyklu prezentuje wyniki dalszych badań nad dwuskładnikowymi, elektroprzędzonymi materiałami włóknistymi otrzymanymi z użyciem alternatywnego systemu rozpuszczalników. Głównym celem tej pracy było określenie wpływu rodzaju rozpuszczalnika zastosowanego w procesie elektroprzędzenia włókien PCL/żelatyna oraz PCL/kolagen, jak również typu wykorzystanego biopolimeru, na odpowiedź komórkową *in vitro*, w szczególności na cytotoksyczność materiałów – żywotność, proliferację, morfologię oraz rozwinięcie cytoszkieletu komórek hodowanych na ich powierzchni. Pomimo wcześniej wykazanej efektywności otrzymywania morfologicznie jednorodnych i wolnych od defektów włókien, nieznanym pozostawał wpływ zastosowanego rozpuszczalnika na bioaktywność uzyskanych materiałów. Z perspektywy zastosowań w inżynierii tkankowej kluczowe jest, aby powierzchnia rusztowania wspierała adhezję i rozwój komórek, co zależy nie tylko od składu włókniny, ale również od struktury molekularnej polimerów. Dlatego w ramach prowadzonych badań przeanalizowano również dokładniej roztwory polimerowe, koncentrując się na oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami biopolimerów białkowych a rozpuszczalnikami oraz na ich konformacji zależnej od składu układu rozpuszczalnikowego, co bezpośrednio wpływa na dostępność sekwencji RGD odgrywających istotnych dla odpowiedzi komórkowej.

Badania struktury roztworów polimerowych skupiły się na pomiarach wiskozymetrycznych. W pracy 1 analizowano roztwory o całkowitym stężeniu polimeru równym 5% w HFIP i 15% w AA/FA 9:1 – odpowiadające stężeniom wykorzystywanym w procesie elektroprzędzenia. W tej pracy, w celu oceny rzeczywistego wpływu zastosowanego rozpuszczalnika na lepkość, porównano roztwory PCL i żelatyny o identycznym stężeniu 5% (w/w), sporządzone w obu układach rozpuszczalnikowych. Wykazano istotne różnice – lepkość roztworu czystej żelatyny w układzie kwasowym była 12-krotnie niższa niż w HFIP, a dla roztworu czystego PCL różnica ta była aż 16-krotna.

Kolejne pomiary wykonano dla roztworów żelatyny i kolagenu w zakresie stężeń od 1,6% do 6,8% (w/w), w obu układach rozpuszczalnikowych. Niezależnie od stężenia, lepkość obu biopolimerów była istotnie wyższa w HFIP niż w mieszaninie kwasów. W obrębie każdego z rozpuszczalników roztwory kolagenu wykazywały nieco wyższą lepkość niż roztwory żelatyny. Większa lepkość roztworów sporządzonych w HFIP wskazuje na silniejsze oddziaływania między cząsteczkami rozpuszczalnika a łańcuchami polimerów, co sprzyja przyjęciu przez nie bardziej rozprostowanej konformacji („rozplątaniu łańcucha”). Odwrotnie,

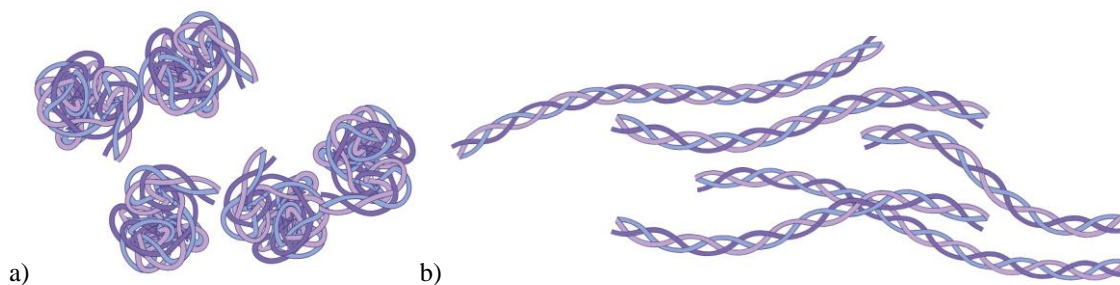
słabsze oddziaływania z rozpuszczalnikiem kwasowym skutkują przyjmowaniem przez cząsteczki bardziej zwiniętej konformacji przypominającej kłębek, jak przedstawiono przykładowo dla kolagenu na Rys. 15.

Potwierdzono tę zależność, pośrednio oceniając siłę oddziaływań między polimerem a rozpuszczalnikiem za pomocą analizy lepkości właściwej i wyznaczenia różnic wykładnika „a” z równania Mark-Houwinka (Eq. 2):

$$[\eta] = KM^a \quad (2)$$

gdzie M to masa cząsteczkowa polimeru, K i a są stałymi zależnymi od oddziaływań polimer-rozpuszczalnik oraz temperatury, a $[\eta]$ to lepkość właściwa.

Analiza różnicy wartości parametru a w równaniu Mark-Houwinka wykazała, że wartości a są wyższe przy użyciu HFIP, co wskazuje na silniejsze oddziaływania molekularne z kolagenem i żelatyną, skutkujące bardziej rozprostowaną konformacją cząsteczek w porównaniu do układu AA/FA. Taki efekt działania rozpuszczalnika jest bardziej wyraźny (większa różnica wartości a) w przypadku kolagenu niż żelatyny.



Rys. 15. Konformacje kolagenu w zależności od rozpuszczalnika:

- a) w roztworze AA/FA – słabe oddziaływanie → konformacja kłęбка → niższa lepkość;
- b) w roztworze HFIP – silnie oddziaływanie → „rozplątane” cząsteczki → wyższa lepkość.

Rysunek wykonano z pomocą programu Biorender.

Choć oba rozpuszczalniki wykazują działanie denaturujące, przeprowadzone badania FTIR ujawniły subtelne różnice w położeniu maksimum pasma amidowego II – wyższe wartości zaobserwowano dla kolagenu, niezależnie od użytego rozpuszczalnika. Może to świadczyć o obecności niewielkich pozostałości struktur helikalnych w roztworze, co tłumaczyłoby drobne różnice w lepkości obu polimerów w obrębie tego samego układu rozpuszczalnikowego.

Na potrzeby badań komórkowych oraz oznaczeń kąta zwilżania wytworzono włókniny PCL/żelatyna oraz PCL/kolagen w proporcji wagowej 9:1 z użyciem obu typów rozpuszczalników, wykorzystując metodę elektroprzędzenia prowadzoną w warunkach analogicznych do tych zastosowanych we wcześniejszych pracach. Jako materiały kontrolne zastosowano włókniny z czystego PCL.

W tej pracy badanie zwilżalności przeprowadzono w sposób rozszerzony – każdy pomiar był rejestrowany w formie filmu, a kąt zwilżania określano w trzech punktach czasowych, począwszy od naniesienia kropli na powierzchnię materiału. Analiza wyników wykazała, że jedynie włókniny otrzymane z HFIP charakteryzowały się istotnym spadkiem kąta zwilżania względem próbki kontrolnej już w ciągu pierwszych trzech sekund. W przypadku włókien elektroprzędzonych z wykorzystaniem układu AA/FA zawierających biododatek, spadek kąta zwilżania obserwowano dopiero po upływie 10 sekund, co sugeruje niejednorodną dystrybucję obu polimerów na powierzchni włókna, a w konsekwencji niższą początkową hydrofilowość, która może mieć wpływ na odpowiedź komórkową. Jest to zgodne z potwierdzoną w pracy 2 pasmowością ułożenia biododatku w tego typu włóknach.

Rozpoczynając badania komórkowe postawiono trzy główne pytania badawcze dotyczące wpływu, jaki na odpowiedź komórkową mają: rodzaj rozpuszczalnika wykorzystanego do przygotowania roztworu do elektroprzędzenia, obecność biopolimeru w porównaniu do materiału z czystego PCL oraz typ wykorzystanego biopolimeru.

Test cytotoksyczności przeprowadzony na pozyskiwanych przez 24 godziny ekstraktach z włókien wykazał, że żadne z materiałów nie były cytotoksyczne. Badania aktywności metabolicznej Presto Blue, MTT oraz CellTiter-Glo, prowadzone były przez 3 dni w kontakcie bezpośrednim z materiałem. W ich przebiegu nie zaobserwowano istotnych różnic w odpowiedzi komórkowej pomiędzy badanymi wariantami materiałów. Odmienne wyniki uzyskano natomiast w teście proliferacji CyQuant, który wykazał wyraźnie większą liczbę komórek porastających próbki włókien zawierających dodatek białkowy w drugim i trzecim dniu hodowli. Najwyższe ilości DNA odnotowano dla materiałów PCL/żelatyna otrzymanych z HFIP oraz PCL/kolagen – niezależnie od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika.

Bardzo zbliżone wyniki uzyskano analizując obrazy SEM oraz wybarwień fluorescencyjnych hodowli komórek L929 oraz HF. Komórki hodowane na włókninach zawierających biododatek wykazywały znacznie lepszą morfologię w porównaniu do próbek z czystego PCL. W przypadku materiałów kontrolnych obserwowano słabe rozpląszczenie i niewielki rozwój cytoszkieletu. Zachowanie komórek sprawiało wrażenie próby ograniczenia kontaktu z materiałem. Z kolei komórki porastające próbki z kolagenem oraz próbki

PCL/żelatyna z HFIP prezentowały najlepszą morfologię – wyraźne rozpląszczenie, liczne wypustki cytoplazmatyczne lamellipodia i filopodia, co jest wyznacznikiem dobrze rozwiniętego cytoszkieletu.

Na podstawie analizy zarówno wyników testu proliferacji, jak i obserwacji mikroskopowych można stwierdzić, że dodatek białka we włóknie (kolagenu lub żelatyny) istotnie zwiększał proliferację oraz poprawiał morfologię komórek względem włókien z czystego PCL, przy czym korzystniejszy efekt obserwowano dla kolagenu – szczególnie wyraźny w przypadku materiałów otrzymanych z rozpuszczalnika kwasowego. Jednocześnie, niezależnie od rodzaju biododatku, lepsze wyniki obserwowano dla włókien wytworzonych z HFIP, co wskazuje na znaczący wpływ rozpuszczalnika na dostępność bioaktywnych sekwencji w materiale. Najprawdopodobniej wynika to z szeregu następstw wyboru rozpuszczalnika: różnej konformacji polipeptydów oraz odmiennego rozmieszczenia biododatku we włóknie, gdzie pasmowe ułożenie oznacza jego dostępność na mniejszej powierzchni niż w przypadku dobrej dyspersji, co pociąga za sobą również różnice w hydrofilowości włókien. Szybkie wymywanie biododatku z włókien otrzymanych z roztworów kwasowych, zwłaszcza w ciągu pierwszych 24 godzin, co zostało pokazane w poprzedniej pracy, również mogło się przyczynić do słabszych wyników dłużej trwających testów i hodowli.

Osiągnięcia:

- Przeprowadzone badania pokazały istotne różnice we właściwościach roztworów polimerowych – wyższa lepkość w HFIP świadczy o silniejszym oddziaływaniu rozpuszczalnika z polimerami, co skutkuje lepszym rozplątaniem cząsteczek, podczas gdy w kwasach cząsteczki przybierają konformację „kłębka”.
- Potwierdzono, że typ rozpuszczalnika wpływa na zwilżalność włókniny, co jest konsekwencją niejednorodnej dystrybucji biododatku we włóknach z AA/FA w odróżnieniu od dobrej dyspersji, jaką daje zastosowanie HFIP.
- Pokazano, że na odpowiedź komórkową korzystny wpływ ma:
 - › Obecność biopolimeru we włóknie w porównaniu do jego braku.
 - › Zastosowanie kolagenu jako biododatku w porównaniu do żelatyny.
 - › Wybór alkoholu fluorowanego jako rozpuszczalnika w porównaniu do mieszaniny kwasowej AA/FA.

Wykazano:

- Znaczące różnice w lepkości roztworów PCL/żelatyna (5% w/w) oraz samych biododatków białkowych w zależności od użytego rozpuszczalnika.
- Brak cytotoksyczności wszystkich materiałów i statystycznie nieistotne różnice w aktywności metabolicznej komórek w hodowli i kontakcie bezpośrednim.
- Większą proliferację komórek na materiałach: PCL/żelatyna z HFIP oraz PCL/kolagen z obu rozpuszczalników. Obserwacje SEM potwierdziły lepsze rozplaszczanie komórek i rozwinięcie cytoszkieletu dla tych materiałów.

7.4. Praca 4. Crosslinking of gelatin in bicomponent electrospun fibers

Zidentyfikowany w poprzednich pracach problem szybkiego wymywania biododatku z dwuskładnikowych włókien otrzymanywanych metodą elektroprzędzenia z roztworów polimerowych opartych na alternatywnych rozpuszczalnikach stał się punktem wyjścia do realizacji kolejnego etapu badań tych materiałów. Wykazano, że w wyniku emulsyjności roztworów z AA/FA biododatek białkowy rozmieszczony jest we włóknach pasmowo, a prowadzone w warunkach symulujących środowisko fizjologiczne badania potwierdziły jego szybkie wypłukiwanie. Prowadzi to do spadku zwilżalności oraz utraty bioaktywności, wynikającej z obecności białka, szczególnie na powierzchni włókien. Ubytek biopolimeru przyczynia się również do strukturalnego osłabienia materiału i spadku jego wytrzymałości mechanicznej. Pomimo zalet, takich jak niższa toksyczność i koszt procesu elektroprzędzenia z wykorzystaniem alternatywnych rozpuszczalników, konsekwencje szybkiego wymywania biopolimeru mogą znacząco obniżać funkcjonalną wartość takich materiałów w kontekście zastosowań w inżynierii tkankowej.

Celem tej części badań było określenie optymalnych warunków sieciowania biododatku białkowego w dwuskładnikowych materiałach włóknistych otrzymanywanych z użyciem rozpuszczalników kwasowych jako sposób ograniczenia wymywania biododatku. Drogą do realizacji tego celu było zbadanie, jakie stężenia wybranych czynników sieciujących oraz czasy reakcji prowadzą do najbardziej efektywnego utrwalenia białka, a także porównanie szybkości działania tych czynników sieciujących, pozwalających na uzyskanie satysfakcjonującego poziomu trwałości bioaktywnego składnika we włóknie. Dodatkowym

wymogiem był możliwie najmniejszy niekorzystny wpływ procesu sieciowania na morfologię włókniń.

Zdecydowano się na chemiczne metody sieciowania, ponieważ zastosowanie termicznych i radiacyjnych sposobów sieciowania może powodować stopienie i degradację molekularną polikaprolaktonu. Dodatkowymi kryteriami doboru związków sieciujących były ich niska toksyczność oraz brak szerokiego udokumentowania zastosowania w odniesieniu do tego typu materiałów, co pozwalało na wniesienie nowej perspektywy badawczej.

Na potrzeby badań sieciowania wybrano jeden typ materiału – włókninę PCL/żelatyna w proporcji wagowej 7:3 otrzymaną z użyciem rozpuszczalnika AA/FA 9:1. Jest to ten sam materiał, dla którego w pracy 2 odnotowano największy i najszybszy ubytek żelatyny w badaniu wmywania biododatku. Włókninę otrzymano metodą elektroprzędzenia, stosując warunki procesu analogiczne do zastosowanych poprzednio.

Pierwszym etapem badań był dobór rozpuszczalników odpowiednich dla wybranych związków sieciujących: genipiny, EDC/NHS, BDDGE (szczegółowe informacje na temat tych związków znajdują się w podrozdziale 6.3). Z wyjątkiem transglutaminazy, która rozpuszcza się wyłącznie w wodzie, pozostałe trzy czynniki sieciujące zazwyczaj rozpuszcza się w alkoholu etylowym lub jego mieszaninach z wodą. Seria wstępnych eksperymentów wykazała, że optymalnym układem rozpuszczalnikowym dla genipiny, EDC/NHS oraz BDDGE jest mieszanina alkoholu etylowego i wody w proporcji wagowej 7:3. Większa zawartość alkoholu etylowego powodowała zahamowanie reakcji sieciowania, natomiast dla większego udziału wody zjawisko wypłukiwania żelatyny dominowało nad reakcją sieciowania.

Zarówno na etapie doboru rozpuszczalnika, jak i w dalszych badaniach, skuteczność sieciowania oceniano na podstawie testu analogicznego z procedurą opisaną w pracy 2 dla badania wmywania biododatku. W tym przypadku trwał on jedynie 24 godziny – jako że właśnie w tym okresie obserwowano największy ubytek polimeru białkowego.

Aby móc porównywać wyniki skuteczności sieciowania żelatyny we włóknach z użyciem wspomnianych czterech metod, określona została arbitralnie wartość procentowa pozostałości żelatyny w materiale po 24-godzinnym teście wmywania, uznawana za satysfakcjonującą. Każdy materiał, dla którego wartość ta wyniosła nie mniej niż 85% był traktowany jako efektywnie usieciowany.

Jedynym czynnikiem sieciującym, przy użyciu którego nie było możliwe osiągnięcie tego poziomu efektywności, była transglutaminaza. Nawet przy maksymalnym możliwym stężeniu (40 U/ml – granica rozpuszczalności) nie uzyskano retencji żelatyny nawet na

poziomie 75%, a próby wydłużenia czasu reakcji przyniosły nawet słabsze rezultaty. W przypadku transglutaminazy konieczność stosowania wody jako rozpuszczalnika powoduje, że wymywanie żelatyny zachodzi szybciej niż proces sieciowania.

W związku z tym transglutaminaza została wykluczona z dalszych, szerzej zakrojonych badań. Pozostałe czynniki sieciujące wykorzystano w serii eksperymentów z zastosowaniem różnych stężeń oraz czasów reakcji, tak aby dla każdego z nich wyznaczyć optymalne parametry sieciowania i umożliwić ich porównanie, w celu wskazania najefektywniejszej metody. Na podstawie wyników wstępnych testów sieciowania określono zakresy parametrów reakcji dla każdego związku. Zestawienie to przedstawiono w Tabeli 3.

Tab. 3. Stężenia oraz czasy reakcji sieciowania.

Czynnik sieciujący	Stężenie (% wagowe)	Czas reakcji (h)
Genipina	0,5-6	6-168
BDDGE	2,5-15	12-168
EDC/NHS	0,02-0,23/0,01-0,08	0,17 (10 min) - 9

W oparciu o wyniki testu wymywania żelatyny, dla każdej z metod wyznaczono dodatkowo punkty odpowiadające zależności czasu reakcji od stężenia czynnika sieciującego, przy których uzyskano co najmniej 85% retencji żelatyny – $f(C) = t_{0,85}$. Na podstawie tych danych dokonano interpolacji z użyciem funkcji wykładniczych, co umożliwiło określenie minimalnego czasu reakcji zapewniającego skuteczne utrwalenie biododatku, dla dowolnego stężenia danego reagenta.

Analiza wszystkich wyników sieciowania wykazała, że w badanym zestawie metod, EDC/NHS cechuje się najwyższą efektywnością. Niezależnie od stężenia, rezultaty osiągnięte dla tego czynnika już po 1 godzinie reakcji były porównywalne z wynikami uzyskiwanymi dopiero po ponad 10 godzinach w przypadku genipiny i BDDGE. Zbliżony poziom usieciowania uzyskano dla 100-godzinnej reakcji z użyciem 10% roztworu genipiny i 1% BDDGE oraz już po 20 minutach dla 0,1/0,04% EDC/NHS.

Wysoka skuteczność EDC/NHS może wynikać z faktu, że nie zostaje on trwale wbudowany w tworzone wiązanie amidowe, dzięki czemu nie wyczerpuje się w toku reakcji w przeciwieństwie do genipiny i BDDGE. Dodatkowo, łączy grupy $-COOH$ i $-NH_2$, które są liczniejsze w żelatynie niż same grupy aminowe, wykorzystywane w reakcji sieciowania przez pozostałe dwa reagenty. Co więcej jako jedyny spośród analizowanych czynników, EDC/NHS

może tworzyć wiązania między grupami $-NH_2$ żelatyny a $-COOH$ obecnymi w PCL, co dodatkowo może ograniczać wymywanie białka ze struktury włókniny.

Z punktu widzenia funkcjonalności materiałów istotna była również ocena ich morfologii po zakończeniu sieciowania oraz po 24-godzinnym teście wymywania biododatku. Porównanie obrazów SEM próbek, które zachowały co najmniej 85% masy żelatyny oraz najlepszego wyniku uzyskanego dla transglutaminazy, potwierdziło przewagę metody EDC/NHS. Włókniny usieciowane za pomocą genipiny i BDDGE wykazywały, w różnym stopniu, zlewanie się i pofalowanie włókien, co prowadziło do redukcji porowatości i trójwymiarowości struktury. Natomiast materiały sieciowane z użyciem EDC/NHS zachowały morfologię zbliżoną do włókniny kontrolnej. Wyniki analizy FTIR-ATR tych samych próbek potwierdziły jedynie większą zawartość żelatyny w próbkach po sieciowaniu w odniesieniu do kontroli.

Osiągnięcia:

- Po raz pierwszy przeprowadzono systematyczną analizę chemicznego sieciowania żelatyny w dwuskładnikowych włóknach PCL/żelatyna otrzymanych z wykorzystaniem alternatywnego systemu rozpuszczalników.
- Potwierdzono, że zastosowana metodologia umożliwia wyznaczenie optymalnych warunków sieciowania żelatyny we włóknach PCL/żelatyna, pozwalających na uzyskanie materiałów o wysokiej trwałości biododatku oraz zachowanej morfologii w warunkach symulujących środowisko fizjologiczne.
- Pokazano, że metoda sieciowania EDC/NHS wyróżnia się dużą szybkością, wydajnością oraz korzystnym wpływem na strukturę materiału.

Wykazano:

- Mieszanina alkoholu etylowego i wody w stosunku wagowym 7:3 stanowi optymalny rozpuszczalnik dla EDC/NHS, BDDGE i genipiny w procesie sieciowania dwuskładnikowych włókien PCL/żelatyna.
- EDC/NHS jest najefektywniejszym czynnikiem sieciującym – umożliwia osiągnięcie wysokiego poziomu usieciowania biododatku przy znacznie niższych stężeniach i czasach reakcji w porównaniu z genipiną i BDDGE.

- Zastosowanie EDC/NHS powoduje najmniejsze deformacje struktury włókniny, podczas gdy genipina, BDDGE oraz transglutaminaza prowadziły w różnym stopniu do pofalowania się włókien i ich łączenia.

7.5. Praca 5. A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization

W poprzednich pracach dwuskładnikowe włókniny zawierające polimer syntetyczny i biododatek otrzymywano poprzez elektroprzędzenie roztworu zawierającego oba te składniki – miało to na celu zapewnienie materiałom hydrofilowości i bioaktywności, których brakuje czystemu poliestrowi alifatycznemu. Alternatywnym podejściem do uzyskania włókien dwuskładnikowych jest immobilizacja dodatku białkowego na powierzchni włókien. Taki typ funkcjonalizacji materiału, dzięki umiejscowieniu biododatku na powierzchni, sprawia, że nawet niewielka jego ilość może nadawać materiałowi pożądane z punktu widzenia inżynierii tkankowej właściwości. Pozwala to również uniknąć konieczności stosowania złożonych układów polimerowych podczas procesu elektroprzędzenia.

Tematem ostatniej pracy ujętej w niniejszej rozprawie było porównanie różnych metod aktywacji powierzchni włókien z biodegradowalnego poliestru alifatycznego, poprzedzającej immobilizację biododatku. Celem aktywacji powierzchni jest wprowadzenie grup funkcyjnych lub zwiększenie ich ilości na powierzchni włókien, co umożliwi skuteczną immobilizację składnika bioaktywnego, co jednak jednocześnie może wpływać na właściwości materiału. Głównym celem pracy była zatem analiza wpływu wybranych metod aktywacji na efektywność immobilizacji, stabilność przyczepionego biododatku, jak również ocena odpowiedzi komórkowej oraz zmian właściwości fizykochemicznych włókien w zależności od zastosowanej metody. Do porównania wybrano trzy podejścia: hydrolizę alkaliczną, zimną plazmę tlenową oraz aminolizę.

Do badań w niniejszej pracy wybrano kopolimer PLCL, a do przygotowania roztworu polimerowego zastosowano HFIP. Ze względu na temperaturę zeszklenia PLCL mieszczącą się w zakresie 32-42°C, proces elektroprzędzenia prowadzono w temperaturze 38°C, co pozwalało uniknąć późniejszej morfologicznej relaksacji włókniny obserwowanej dla materiałów elektroprzędzonych w temperaturze pokojowej (20-25°C). Całość badań podzielono na następujące etapy: aktywację powierzchni włókien, reakcję sieciowania, immobilizację żelatyny oraz analizę właściwości materiałów po funkcjonalizacji.

Etap pierwszy obejmował aktywację powierzchni włókniny z użyciem jednej z trzech wybranych metod. Hydrolizę alkaliczną oraz zimną plazmę tlenową zastosowano w celu zwiększenia stężenia grup -COOH na powierzchni włókien, natomiast aminoliza miała na celu wprowadzenie grup -NH_2 (szczegółowe informacje na temat metod aktywacji znajdują się w podrozdziale 6.4.1). W przypadku aminolizy stężenie etylenodiaminy i czas reakcji dobrano na podstawie wcześniejszych badań [80]. W przypadku hydrolizy i plazmy przeprowadzono wstępną optymalizację czasu i warunków procesu aktywacji, opierając się na oznaczeniu zawartości grup karboksylowych przy użyciu błękitu toluidyny, analizie widm FTIR-ATR, pomiarze kąta zwilżania oraz obserwacjach SEM zmian morfologii włókien.

Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku hydrolizy wzrost ilości grup -COOH na powierzchni włókien PLCL jest proporcjonalny do czasu trwania reakcji i stężenia NaOH, podczas gdy w przypadku obróbki plazmą plateau osiągnęte jest już po 10 sekundach trwania procesu. Potwierdziła to również analiza metodą FTIR – w widmach próbek poddanych hydrolizie o różnym nasileniu zaobserwowano sukcesywne zanikanie pasma przy 1765 cm^{-1} (wiązanie C=O grupy estrowej) oraz pojawianie się pasma przy 1721 cm^{-1} , charakterystycznego dla grup karboksylowych powstałych po rozpadzie wiązania estrowego. Dla próbek poddanych działaniu plazmy nie zaobserwowano podobnego przesunięcia z uwagi na mniejszą skalę efektu, poniżej progu wykrywalności FTIR.

Pomiary goniometryczne pokazały, że już 10 sekund działania plazmy znacząco poprawiało hydrofilowość materiałów z PLCL, podobnie jak 3-godzinna hydroliza z użyciem 0,25 M roztworu NaOH. Obserwacje SEM potwierdziły, że zastosowanie plazmy nie powoduje zmian morfologii włókien, podczas gdy hydroliza prowadziła do widocznych uszkodzeń powierzchni – od delikatnego strzępienia, aż po pofalowanie i łuszczenie się włókien. Może to wskazywać, że hydroliza działa głównie powierzchniowo, w przeciwieństwie do plazmy oraz aminolizy, dla której również nie obserwuje się istotnych zmian morfologii. Przy zastosowaniu skrajnych warunków reakcji aminolizy widoczne są liczne złamania włókien o nadal gładkiej powierzchni, co wskazuje na spadek masy cząsteczkowej w całej objętości włókna.

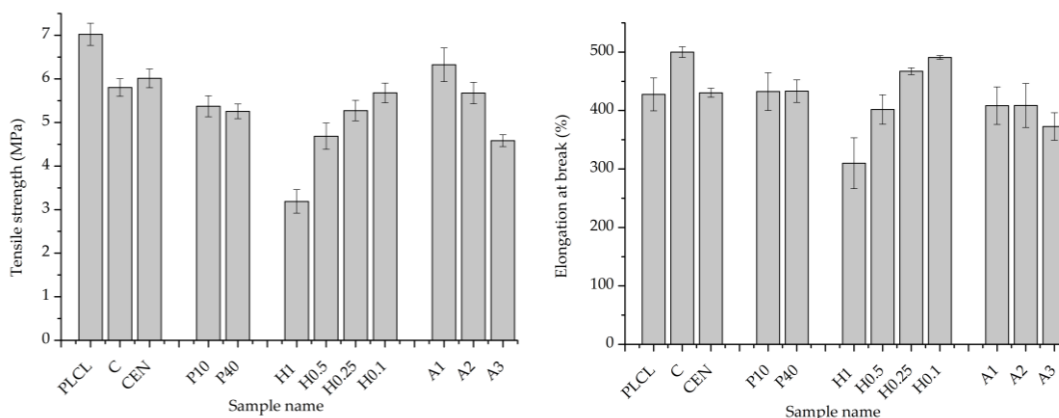
Kolejny etap funkcjonalizacji polegał na zastosowaniu odpowiedniego czynnika sieciującego umożliwiającego późniejszą immobilizację żelatyny. W przypadku materiałów aktywowanych hydrolizą i plazmą, ze względu na zwiększoną ilość grup -COOH , zastosowano układ EDC/NHS. Natomiast włókniny po aminolizie poddano reakcji z aldehydem glutarowym. Następnym etapem była immobilizacja biododatku, przeprowadzona z użyciem 0,2% roztworu żelatyny (szczegółowe informacje na temat sieciowania i immobilizacji znajdują się w podrozdziale 6.4.3). Jako trzy materiały odniesienia zastosowano: 1) próbkę

niczym nie traktowaną, 2) próbkę niepoddawaną aktywacji, lecz traktowaną EDC/NHS i następnie inkubowaną w roztworze żelatyny oraz 3) próbkę, w której żelatynę osadzano wyłącznie fizycznie, bez wcześniejszej aktywacji i sieciowania.

Ocena wpływu metody aktywacji powierzchni na właściwości włókien, oprócz wcześniej opisanych obserwacji SEM, obejmowała również ocenę zmian masy cząsteczkowej polimeru metodą chromatografii żelowej oraz badania właściwości mechanicznych.

Analiza wyników GPC wykazała, że największą degradację łańcuchów polimerowych powodowała aminoliza, mniejszy wpływ miała plazma. W przypadku hydrolizy obserwowano główny pik, pochodzący od polimeru o niemal niezmięnionej masie cząsteczkowej oraz dodatkowe piki odpowiadające bardzo niskim masom (rzędu kilku kDa). Może to świadczyć o tym, że degradacji ulegała jedynie powierzchniowa warstwa włókien, prowadząc do pojawienia się pików od frakcji niskocząsteczkowej, zaś rdzeń pozostawał w dużej mierze niezmienny. Wniosek ten potwierdza również pocienienie włókien, zaobserwowane z użyciem SEM jedynie dla materiałów po hydrolizie.

Badania właściwości mechanicznych wykazały, że materiały po aktywacji powierzchni za pomocą hydrolizy cechowały się obniżonym naprężeniem przy zerwaniu oraz zmniejszonym wydłużeniem przy zerwaniu, przy czym spadki te były proporcjonalne do stężenia roztworu NaOH zastosowanego w procesie. Nieco mniejsze, choć nadal zauważalne, obniżenie parametrów mechanicznych zaobserwowano w przypadku aminolizy. Dla materiałów poddanych działaniu zimnej plazmy tlenowej zanotowano jedynie niewielki spadek naprężenia przy zerwaniu. Zmiany te ilustruje Rys. 16, który pokazano tutaj, gdyż w publikacji omyłkowo nie został zamieszczony wykres obrazujący naprężenie przy zerwaniu.



Rys. 16. Wykresy przedstawiające wyniki rozciągania jednoosiowego: z lewej – naprężenie przy zerwaniu, z prawej – wydłużenie przy zerwaniu.

W przypadku próbek po hydrolizie taki wynik może być związany z narastającą liczbą defektów na powierzchni włókien, których ilość rośnie wraz z intensywnością reakcji. W przypadku aminolizy decydujący wpływ ma degradacja molekularna w objętości materiału, podobnie jak w przypadku plazmy, gdzie jednak spadek masy cząsteczkowej był mniejszy, a obniżenie naprężenia przy zerwaniu mniej wyraźne.

Podobnie jak w poprzednich pracach, stabilność osadzonej warstwy żelatyny oceniano na podstawie testu wypłukiwania biododatku, przeprowadzonego w buforze fosforanowym w temperaturze 37°C. W niniejszym badaniu czas trwania eksperymentu wynosił 1 oraz 7 dni. Obecność przyłączonej na powierzchni żelatyny potwierdzono metodą FTIR, a dokładna analiza ilościowa została przeprowadzona z użyciem testu BCA.

Zarejestrowane widma FTIR, szczególnie w zakresie 1500-1700 cm⁻¹ odpowiadającym pasmu amidowemu I, wykazały wyraźnie zwiększoną absorpcję dla próbek funkcjonalizowanych żelatyną, w porównaniu do próbki kontrolnej z czystego PLCL, z najwyższą wartością dla włókniny po hydrolizie 1 M NaOH. Podobne wnioski płyną z analizy wyników testu BCA, przy czym w tym przypadku różnice były bardziej wyraźne. Największą ilość żelatyny na powierzchni odnotowano również dla próbki po hydrolizie 1 M NaOH, jednak już po jednym dniu zaobserwowano jej znaczny ubytek, podobnie jak w przypadku próbek kontrolnych.

Dla wszystkich pozostałych próbek po aktywacji powierzchni odnotowano dobrą stabilność osadzonej warstwy żelatyny, z niewielkimi spadkami w pierwszej dobie. Najlepszą stabilność wykazała próbka poddana 40-sekundowej obróbce plazmą, nieco słabsze wyniki uzyskano po aminolizie, a najniższe po hydrolizie, choć różnice pomiędzy tymi metodami nie były znaczące. Wyniki te sugerują, że każda z badanych metod aktywacji powierzchni jest skuteczna jako pierwszy etap immobilizacji żelatyny i zapewnia jej wystarczającą stabilność nawet po 7 dniach inkubacji w warunkach modelujących środowisko fizjologiczne.

W celu oceny odpowiedzi komórkowej przeprowadzono zarówno badania ilościowe – test cytotoksyczności na ekstraktach oraz 72-godzinne badanie aktywności metabolicznej w kontakcie bezpośrednim – jak i badania jakościowe w postaci 5-dniowej hodowli fibroblastów L929 na powierzchni materiałów. Testy ilościowe nie wykazały cytotoksyczności żadnego z materiałów ani nie ujawniły znaczących różnic w odpowiedzi metabolicznej w badaniu 3-dniowym. Jedynie w przypadku próbek aktywowanych plazmą oraz hydrolizowanych z użyciem 1 M NaOH zaobserwowano nieznacznie wyższy poziom aktywności metabolicznej w ostatnim dniu badania, co jest zgodne z wynikami testu BCA.

Z kolei obserwacje wykonane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i SEM ujawniły wyraźne różnice w morfologii komórek zasiedlających badane materiały.

Najbardziej okrągłe lub słabo rozpląszczone oraz o nierozwiniętym cytoszkielecie były komórki hodowane na materiałach kontrolnych – czystym PLCL oraz próbce z żelatyną osadzoną jedynie fizycznie. Z kolei w przypadku materiałów po pełnej funkcjonalizacji zaobserwowano poprawną morfologię komórek, zbliżoną do tej na kontrolnej, hydrofilowej powierzchni TCP (*ang. Tissue Culture Plastic/Polystyrene*). Najlepszym stopniem rozpląszczenia i silnie rozwiniętym cytoszkieletem charakteryzowały się fibroblasty porastające materiały po hydrolizie w 1 M roztworze NaOH oraz po 40-sekundowej obróbce zimną plazmą tlenową. Komórki te wyróżniały się dużą liczbą wyraźnych filopodiów i lamellipodiów.

Osiągnięcia:

- Potwierdzono, że wszystkie wybrane do badań metody aktywacji powierzchni włókien PLCL, zastosowane jako pierwszy etap funkcjonalizacji z użyciem żelatyny, skutecznie poprawiają jej stabilność w porównaniu do próbek nieaktywowanych.
- Pokazano, że wybór metody aktywacji powierzchni wpływa istotnie na właściwości fizykochemiczne materiału, takie jak masa cząsteczkowa czy wytrzymałość mechaniczna. Pozwala to na świadomy dobór najbardziej odpowiedniej procedury funkcjonalizacji w zależności od wymagań stawianych rusztowaniom dla określonego typu tkanek i miejsca implantacji.
- Udowodniono, że skuteczna funkcjonalizacja biopolimerem białkowym umożliwia otrzymanie dwuskładnikowych bioaktywnych włókien zawierających biodegradowalny poliester alifatyczny i biododatek, co stanowi alternatywę dla elektroprzędzenia dwuskładnikowych roztworów polimerowych.

Wykazano:

- Aktywacja powierzchni włókien metodą hydrolizy zasadowej prowadzi do postrzępienia i zmniejszenia grubości włókien, natomiast zastosowanie aminolizy oraz zimnej plazmy tlenowej w warunkach optymalnych nie powoduje zmian morfologii.
- Zarówno plazma, jak i aminoliza prowadzą do obniżenia masy cząsteczkowej w całej objętości materiału, podczas gdy hydroliza prowadzi do wyraźnej degradacji

powierzchniowej, co potwierdzają zarejestrowane metodą GPC piki odpowiadające niskim masom cząsteczkowym.

- Wszystkie typy materiałów poddanych funkcjonalizacji są niecytotoksyczne. Ponadto, fibroblasty hodowane przez 5 dni na ich powierzchni charakteryzowały się prawidłową morfologią oraz lepszym rozplaszczaniem i rozwinięciem cytoszkieletu w porównaniu do komórek hodowanych na materiale, w którym żelatynę osadzono wyłącznie fizycznie.

8. Podsumowanie i wnioski

Niniejsza rozprawa doktorska pozwoliła na wykazanie, że:

- Możliwe jest opracowanie mniej toksycznego systemu rozpuszczalnikowego będącego mieszaniną kwasu octowego i mrówkowego jako alternatywę dla silnie toksycznych alkoholi fluorowanych, pozwalającego na formowanie metodą elektroprzędzenia dwuskładnikowych włókien zawierających PCL i biododatek białkowy – żelatynę lub kolagen.
- Nowo opracowany układ rozpuszczalnikowy, mimo emulsyjności roztworów na nich opartych, pozwala uzyskać włókniny o poprawnej, zbliżonej morfologii do tych otrzymywanych z użyciem alkoholi fluorowanych.
- Elektroprzędzone dwuskładnikowe włókniny zawierające PCL i biododatek białkowy formowane z użyciem roztworów polimerowych opartych na HFIP i kwasach AA/FA, różnią się szybkością wymywania dodatku w warunkach naśladujących fizjologiczne.
- Emulsyjność roztworów polimerowych opartych na kwasach AA/FA wpływa znacząco na szybkość wymywania biopolimeru z elektroprzędzonych włókien dwuskładnikowych oraz na szereg właściwości materiału będących następstwem utraty tego składnika.
- Emulsyjność w układach opartych na kwasach AA/FA wynika ze słabszych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami rozpuszczalnika i cząsteczkami polimerów. W konsekwencji tego cząsteczki polimeru przybierają w kwasach konformację „kłębka”, co skutkuje słabszymi oddziaływaniami polimer-polimer. Manifestuje się to mniejszą lepkością tych roztworów niż w przypadku roztworów opartych na HFIP.
- Typ rozpuszczalnika wykorzystanego w procesie elektroprzędzenia wpływa na zwilżalność włókniny, co jest konsekwencją niejednorodnej dystrybucji biododatku we włóknach z AA/FA w odróżnieniu od dobrej dyspersji jaką daje zastosowanie HFIP.
- Na odpowiedź komórkową na elektroprzędzone włókniny korzystny wpływ ma obecność biododatku białkowego, szczególnie kolagenu oraz materiałów otrzymywanych z HFIP w porównaniu z kwasami, z uwagi na lepszą zwilżalność oraz dyspersję biododatku na powierzchni włókien.
- Przeprowadzona optymalizacja sieciowania żelatyny w dwuskładnikowych włóknach PCL/żelatyna otrzymywanych z wykorzystaniem alternatywnego systemu

rozpuszczalników umożliwiła uzyskanie materiałów o wysokiej trwałości biododatku oraz zachowanej morfologii w warunkach symulujących środowisko fizjologiczne.

- Spośród przebadanych chemicznych czynników sieciujących, zastosowanie EDC/NHS jest metodą najwydajniejszą, o największej szybkości reakcji, która jednocześnie nie wpływa niekorzystnie na morfologię włókien.
- Aktywacja powierzchni elektroprzędzonych materiałów poprzez zwiększenie ilości grup funkcyjnych uzyskana metodą hydrolizy zasadowej, aminolizy i obróbki plazmą umożliwia ich efektywną funkcjonalizację z użyciem biopolimeru białkowego. Niezależnie od zastosowanej metody aktywacji powierzchni włókien, warstwa przyłączonej żelatyny jest stabilniejsza niż w przypadku osadzania fizycznego.
- Każda z metod aktywacji powierzchni włókien ma inny wpływ na właściwości materiału, toteż decyzja o wyborze metody powinna opierać się na dopasowaniu właściwości funkcjonalizowanego materiału pod kątem jego zastosowania.
- Skuteczna funkcjonalizacja z użyciem biopolimeru białkowego jest alternatywnym sposobem na uzyskanie dwuskładnikowych elektroprzędzonych materiałów włóknistych w stosunku do elektroprzędzenia dwuskładnikowych roztworów polimerowych.

9. Elementy wkładu oryginalnego

Po raz pierwszy przeprowadzono systematyczne badania rozpuszczalników alternatywnych w stosunku do alkoholi fluorowanych jako rozpuszczalników wykorzystywanych w procesie elektroprzędzenia włókien z poliestru alifatycznego z dodatkiem białkowym. Stosując po raz pierwszy rozpuszczalniki inne niż HFIP lub TFE otrzymano włókniny o morfologii bardzo zbliżonej do uzyskiwanej w procesie formowania z alkoholi fluorowanych. Wcześniejsze, zakończone sukcesem badania rozpuszczalników alternatywnych opisywane w literaturze były prowadzone jedynie na materiałach jednoskładnikowych. Prace dotyczące materiałów dwuskładnikowych prowadziły do uzyskiwania włókien znacznie cieńszych i zdefektowanych [26-28].

Z uwagi na to, iż po raz pierwszy otrzymano elektroprzędzone dwuskładnikowe materiały zawierające PCL i żelatynę oraz PCL i kolagen z użyciem rozpuszczalnika będącego mieszkanką kwasu octowego i mrówkowego, wszystkie dalsze badania mające na celu charakterystykę ich właściwości fizykochemicznych, odpowiedzi komórkowej czy badania wymywania dodatku, w tym charakterystykę porównawczą do materiałów otrzymanych z wykorzystaniem HFIP, są istotnym oryginalnym wkładem w literaturę przedmiotu.

Badania mające na celu znalezienie optymalnej metody sieciowania dodatku białkowego w dwuskładnikowych materiałach włóknistych zostały zaplanowane w oparciu o opisane w literaturze metody sieciowania, ale głównie jednoskładnikowych materiałów białkowych, rzadko w formie włóknistej. W literaturze brak było systematycznych wyników zarówno optymalizacyjnych jak i porównawczych różnych metod sieciowania dla włókien PCL/żelatyna, tym bardziej dla materiałów otrzymywanych z użyciem rozpuszczalników innych niż alkohole fluorowane, co jak potwierdzono wcześniej sprawia, że materiały te mają inne właściwości wyjściowe.

Uzyskano także wyniki stanowiące uzupełnienie istniejących danych literaturowych o analizę porównawczą różnych metod aktywacji powierzchni jako pierwszego etapu funkcjonalizacji włókien z poliestru alifatycznego PLCL. Rezultaty tych badań przeprowadzonych na tym samym materiale elektroprzędzonym pozwalają wyciągnąć wartościowe oryginalne wnioski na temat zarówno optymalnych parametrów przeprowadzania procesu aktywacji powierzchni tego typu materiału, jak również zestawiają te metody ze sobą w kontekście ich wpływu na morfologię materiału, ilość przyłączonych grup funkcyjnych i ich właściwości fizykochemiczne.

10. Literatura

- [1] Langer, R., Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926.
- [2] Xue, M., Jackson, C. J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in wound care*, 4(3), 119–136.
- [3] Zhan, J., Singh, A., Zhang, Z., Huang, L., Elisseeff, J. H. (2012). Multifunctional aliphatic polyester nanofibers for tissue engineering. *Biomatter*, 2(4), 202–212.
- [4] Jiao, Y. P., Cui, F. Z. (2007). Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 2(4), R24–R37.
- [5] Hutmacher, D. W., Goh, J. C., Teoh, S. H. (2001). An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 30(2), 183–191.
- [6] Brannigan, R. P., Dove, A. P. (2016). Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates. *Biomaterials Science*, 5, 9-21.
- [7] Ottenbrite, R. M., Javan, R. (2005). Biological Structures in *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, Elsevier Ltd.
- [8] Mateos-Timoneda, M. A. (2009). Polymers for bone repair in *Bone Repair Biomaterials*, Woodhead Publishing, 231–251.
- [9] Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D., Hutmacher, D. W. (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 9419-9453.
- [10] Agrawal, C.M. Athanasiou, K.A. (1997), Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 38, 105-114.
- [11] Bu, Y., Ma, J., Bei, J., Wang, S. (2019). Surface Modification of Aliphatic Polyester to Enhance Biocompatibility. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 98.
- [12] Shayegan, M., Rezaei, N., Lam, N. H., Altindal, T., A. Wieczorek, A., Forde, N. R. (2013). Probing multiscale mechanics of collagen with optical tweezers in *Optical Trapping and Optical Micromanipulation X*, Proc. SPIE 8810.
- [13] Eastoe J. E. (1955). The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *The Biochemical journal*, 61(4), 589–600.
- [14] Yilmaz, E. N., Zeugolis, D. I. (2020). Electrospun Polymers in Cartilage Engineering-State of Play. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 77.
- [15] Gornall, J. L., Terentjev, E. M. (2008). Universal kinetics of helix-coil transition in gelatin. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 77(3 Pt 1), 031908.

- [16] Shuklov, I. A., Dubrovina, N. V., Börner, A. (2007). Fluorinated alcohols as solvents, cosolvents and additives in homogeneous catalysis. *Synthesis*, 19, 2925-2943.
- [17] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Ramakrishna, S. (2008). Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 29(34), 4532-4539.
- [18] Zhang, Y., Ouyang, H., Lim, C. T., Ramakrishna, S., Huang, Z. M. (2005). Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 72(1), 156-165.
- [19] Nuruzzaman, M., Nizam, Z. M., Ohata, J. (2024). Fluoroalcohols for chemical modification of biomolecules. *Tetrahedron chem*, 11, 100088.
- [20] Khaksar S. (2015). Fluorinated alcohols: A magic medium for the synthesis of heterocyclic compounds. *Journal of Fluorine Chemistry*, 172, 51-61.
- [21] Eren Boncu, T., Ozdemir, N., Uskudar Guclu, A. (2020). Electrospinning of linezolid loaded PLGA nanofibers: effect of solvents on its spinnability, drug delivery, mechanical properties, and antibacterial activities. *Drug development and industrial pharmacy*, 46(1), 109-121.
- [22] Blake, D. A., Cascorbi, H. F., Rozman, R. S., Meyer, F. J. (1969). Animal toxicity of 2,2,2-trifluoroethanol. *Toxicology and applied pharmacology*, 15(1), 83-91.
- [23] Sigma-Aldrich. (2024). *Karta charakterystyki: 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol*. Wersja 7.9. Aktualizacja 09.11.2024
- [24] Sigma-Aldrich. (2024). *Karta charakterystyki: 2,2,2-Trifluoroetanol*. Wersja 6.9. Aktualizacja 27.04.2024
- [25] Nam, J., Huang, Y., Agarwal, S., Lannutti, J. (2008). Materials selection and residual solvent retention in biodegradable electrospun fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 10 (30) 1547-1554.
- [26] Liu, T., Teng, W. K., Chan, B. P., Chew, S. Y. (2010). Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: synthesis, characterization and neural stem cell interactions. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 95(1), 276-282.
- [27] Van der Schueren, L., De Schoenmaker, B., Kalaoglu Altan, Ö. İ., De Clerck, K. (2011). An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European polymer journal*, 47(6), 1256-1263.
- [28] Chakrapani, V. Y., Gnanamani, A., Giridev, V. R., Madhusoothanan, M., Sekaran, G. (2012). Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(4), 3221-3227.
- [29] Sigma-Aldrich. (2025). *Karta charakterystyki: Kwas octowy*. Wersja 6.10. Aktualizacja 12.03.2025
- [30] Sigma-Aldrich. (2024). *Karta charakterystyki: Kwas mrówkowy*. Wersja 7.5. Aktualizacja 20.11.2024

- [31] Luo, C. J., Stride, E., Edirisinghe, M. (2012). Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules*, 45(11), 4669–4680.
- [32] Formhals, A. (1934). Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. Patent no. 1975504.
- [33] Greiner, A., Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46(30), 5670–5703.
- [34] Huang, Z. M., Zhang, Y.Z., Kotakic, M., Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253.
- [35] Payne, L. (2025, January 31). biodegradability. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/technology/biodegradability> - dostęp 10.06.2025.
- [36] Weadock, K. S., Miller, E. J., Keuffel, E. L., Dunn, M. G. (1996). Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of biomedical materials research*, 32(2), 221–226.
- [37] Masutani, E. M., Kinoshita, C. K., Tanaka, T. T., Ellison, A. K., Yoza, B. A. (2014). Increasing Thermal Stability of Gelatin by UV-Induced Cross-Linking with Glucose. *International journal of biomaterials*, 2014, 979636.
- [38] Zhan J., Lan, P. (2012). The Review on Electrospun Gelatin Fiber Scaffold. *Journal of Research Updates in Polymer Science*, 1, 59-71.
- [39] Bigi, A., Panzavolta, S., Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25(25), 5675–5680.
- [40] Damink, L. H. H. O., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J. (1995). Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science*, 6(8), 460–472.
- [41] Mohammadzadehmoghadam S., Dong, Y. (2019). Fabrication and characterization of electrospun silk fibroin/gelatin scaffolds crosslinked with glutaraldehyde vapor. *Frontiers in Materials*, 6, 91.
- [42] Butler, M. F., Ng, Y. F., Pudney, P. D. A. (2003). Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *Journal of Polymer Science. Part A. Polymer Chemistry*, 41(24), 3941-3953.
- [43] Panzavolta, S., Gioffrè, M., Focarete, M. L., Gualandi, C., Foroni, L., Bigi, A. (2011). Electrospun gelatin nanofibers: optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta biomaterialia*, 7(4), 1702–1709.
- [44] Gomes, S. R., Rodrigues, G., Martins, G. G., Henriques, C. M., Silva, J. C. (2013). In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33(3), 1219–1227.

- [45] Nickerson, M. T., Patel, J., Heyd, D. V., Rousseau, D., Paulson, A. T. (2006). Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin. *International journal of biological macromolecules*, 39(4-5), 298–302.
- [46] Khan, H., Shukla, R. N., Bajpai, A. K. (2016). Genipin-modified gelatin nanocarriers as swelling controlled drug delivery system for in vitro release of cytarabine. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 61, 457–465.
- [47] Huang, G. P., Shanmugasundaram, S., Masih, P., Pandya, D., Amara, S., Collins, G., Arinzeh, T. L. (2015). An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 103(2), 762–771.
- [48] Hua, J., Li, Z., Xia, W., Yang, N., Gong, J., Zhang, J., Qiao, C. (2016). Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 61, 879–892.
- [49] Rose, J. B., Pacelli, S., Haj, A. J. E., Dua, H. S., Hopkinson, A., White, L. J., Rose, F. R. A. J. (2014). Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Materials (Basel, Switzerland)*, 7(4), 3106–3135.
- [50] Skopinska-Wisniewska, J., Tuszynska, M., Olewnik-Kruszkowska, E. (2021). Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(2), 396.
- [51] Torres-Giner, S., Gimeno-Alcañiz, J. V., Ocio, M. J., Lagaron, J. M. (2009). Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. *ACS applied materials & interfaces*, 1(1), 218–223
- [52] Davidenko, N., Schuster, C. F., Bax, D. V., Raynal, N., Farndale, R. W., Best, S. M., Cameron, R. E. (2015). Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta biomaterialia*, 25, 131–142.
- [53] Bax, D. V., Davidenko, N., Gullberg, D., Hamaia, S. W., Farndale, R. W., Best, S. M., Cameron, R. E. (2017). Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta biomaterialia*, 49, 218–234
- [54] Sun, L., Li, B., Jiang, D., Hou, H. (2017). Nile tilapia skin collagen sponge modified with chemical cross-linkers as a biomedical hemostatic material. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 159, 89–96.
- [55] Shepherd, D. V., Shepherd, J. H., Ghose, S., Kew, S. J., Cameron, R. E., Best, S. M. (2015). The process of EDC-NHS Cross-linking of reconstituted collagen fibres increases collagen fibrillar order and alignment. *APL materials*, 3(1), 014902.
- [56] Enea, D., Gwynne, J., Kew, S., Arumugam, M., Shepherd, J., Brooks, R., Ghose, S., Best, S., Cameron, R., Rushton, N. (2013). Collagen fibre implant for tendon and ligament biological augmentation. In vivo study in an ovine model. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*, 21(8), 1783–1793.

- [57] Shepherd, J. H., Ghose, S., Kew, S. J., Moavenian, A., Best, S. M., Cameron, R. E. (2013). Effect of fiber crosslinking on collagen-fiber reinforced collagen-chondroitin-6-sulfate materials for regenerating load-bearing soft tissues. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 101(1), 176–184.
- [58] Agheb, M., Dinari, M., Rafienia, M., Salehi, H. (2017). Novel electrospun nanofibers of modified gelatin-tyrosine in cartilage tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 71, 240–251
- [59] Luo, X., Guo, Z., He, P., Chen, T., Li, L., Ding, S., Li, H. (2018). Study on structure, mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nanofibers crosslinked by common agents. *International journal of biological macromolecules*, 113, 476–486.
- [60] Fiorani, A., Gualandi, C., Panseri, S., Montesi, M., Marcacci, M., Focarete, M. L., Bigi, A. (2014). Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 25(10), 2313–2321.
- [61] Shankar, K. G., Gostynska, N., Montesi, M., Panseri, S., Sprio, S., Kon, E., Marcacci, M., Tampieri, A., Sandri, M. (2017). Investigation of different cross-linking approaches on 3D gelatin scaffolds for tissue engineering application: A comparative analysis. *International journal of biological macromolecules*, 95, 1199–1209.
- [62] Cassuto, D., Bellia, G., Schiraldi, C. (2021). An Overview of Soft Tissue Fillers for Cosmetic Dermatology: From Filling to Regenerative Medicine. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 14, 1857–1866.
- [63] De Boulle, K., Glogau, R., Kono, T., Nathan, M., Tezel, A., Roca-Martinez, J. X., Paliwal, S., Stroumpoulis, D. (2013). A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery*, 39(12), 1758–1766
- [64] Zeeman, R., Dijkstra, P. J., van Wachem, P. B., van Luyn, M. J. A., Hendriks, M., Cahalan, P. T., Feijen, J. (2000). The kinetics of 1,4-butanediol diglycidyl ether crosslinking of dermal sheep collagen. *Journal of biomedical materials research*, 51(4), 541-548.
- [65] Duquette, D., Dumont, M. J. (2019). Comparative studies of chemical crosslinking reactions and applications of bio-based hydrogels. *Polymer Bulletin*, 76, 2683–2710.
- [66] Collighan, R. J., Griffin, M. (2009). Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino acids*, 36(4), 659–670.
- [67] Bertoni, F., Barbani, N., Giusti, P., Ciardelli, G. (2006). Transglutaminase reactivity with gelatine: perspective applications in tissue engineering. *Biotechnology letters*, 28(10), 697–702.

- [68] Chau, D. Y., Collighan, R. J., Verderio, E. A., Addy, V. L., Griffin, M. (2005). The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials*, 26(33), 6518–6529.
- [69] Vasić, K., Knez, Ž., Leitgeb, M. (2023). Transglutaminase in Foods and Biotechnology. *International journal of molecular sciences*, 24(15), 12402.
- [70] Amante, P. R., Fante, C. A., Pires, R. L. (2020). Use of Transglutaminase in Bakery Products. *Journal of Culinary Science and Technology*, 18(6), 549–559
- [71] Sadeghi, A. R., Nokhasteh, S., Molavi, A. M., Khorsand-Ghayeni, M., Naderi-Meshkin, H., Mahdizadeh, A. (2016). Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 66, 130–137.
- [72] Atthoff, B., Hilborn, J. (2007). Protein adsorption onto polyester surfaces: is there a need for surface activation? *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 80(1), 121–130.
- [73] Croll, T. I., O'Connor, A. J., Stevens, G. W., Cooper-White, J. J. (2004). Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules*, 5(2), 463–473.
- [74] Murthy, N., Wilson, S., Sy, J. C., Aqida, S. N. (2017). Biodegradation of Polymers in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier.
- [75] Lima Da Silva, R. C., Alves, C., Nascimento, J. H., Neves, J. R. O., Teixeira, V. (2012). Surface modification of polyester fabric by non-thermal plasma treatment in *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing Ltd.
- [76] Morent, R., De Geyter, N., Verschuren, J., De Clerck, K., Kiekens, P., Leys, C. (2008). Non-thermal plasma treatment of textiles. *Surface & Coatings Technology*, 202(14), 3427–3449.
- [77] Esposito, A. R., Kamikawa, C. M., Lucchesi, C., Ferreira, B. M. P., De Rezende Duek, E. A. (2013). Benefits of oxygen and nitrogen plasma treatment in Vero cell affinity to poly(Lactide-Co-Glycolide Acid). *Materials Research*, 16(4), 695–702
- [78] Toledo, A. L. M. M., Ramalho, B. S., Picciani, P. H. S., Baptista, L. S., Martinez, A. M. B., Dias, M. L. (2021). Effect of three different amines on the surface properties of electrospun polycaprolactone mats. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(17), 1258–1270.
- [79] Zhu, Y., Mao, Z., Gao, C. (2013). Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications. *RSC Advances*, 3, 2509-2519
- [80] Jeznach, O., Kołbuk, D., Marzec, M., Bernasik, A., Sajkiewicz, P. (2022). Aminolysis as a surface functionalization method of aliphatic polyester nonwovens: impact on material properties and biological response. *RSC Advances*, 12(18), 11303–11317.

- [81] Gupta, B., Plummer, C., Bisson, I., Frey, P., Hilborn, J. (2002). Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials*, 23(3), 863–871.
- [82] Kolbuk, D., Sajkiewicz, P., Denis, P., Choinska, E. (2013). Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, 61(3), 629–632.
- [83] Kołbuk, D., Sajkiewicz, P., Kowalewski, T. A. (2012). Optical birefringence and molecular orientation of electrospun polycaprolactone fibers by polarizing-interference microscopy,” *European Polymer Journal*, 48(2), 275–283.
- [84] Mistry, B.D. (2009). *A Handbook of Spectroscopic Data Chemistry (UV, IR, PMR, JCNMR and Mass Spectroscopy)*. Oxford Book Company, Jaipur.
- [85] Nuuttila, M., (2018). Gel permeation chromatography methods in the analysis of lactide-based polymers. Praca magisterska: University of Jyväskylä, Department of Chemistry.
- [86] Díaz, E., Sandonis, I., Valle, M. B. (2014). In vitro degradation of poly(caprolactone)/nHA composites. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 802435.
- [87] Ward, I. M., Sweeney, J., Sweeney, W. (2013). *Third Edition Mechanical Properties of Solid Polymers*, John Wiley & Sons, Ltd.

**PUBLIKACJE NAUKOWE
WŁĄCZONE DO ROZPRAWY**

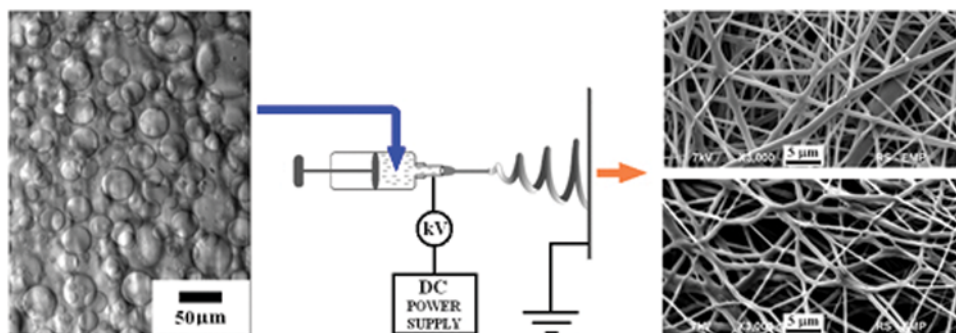
Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System

PIOTR DENIS, JUDYTA DULNIK, and PAWEŁ SAJKIEWICZ

Institute of Fundamental Technological Research, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

Received 21 March 2014, Accepted 13 July 2014

Bicomponent polycaprolactone/gelatin (PCL/Gt) nanofibers were successfully formed for the first time by electrospinning using a novel polymer–solvent system with solvents being alternative to the commonly used toxic solvents like fluorinated alcohols. The mixture of acetic acid (AA) with formic acid (FA; 90:10) was applied. Stable electrospinning was possible despite the fact the mixture of PCL and gelatin in AA/FA solvent showed emulsive structure. From the practical perspective, there is no doubt that it is possible to obtain PCL/Gt fibers using AA/FA mixture with morphology similar to that for fibers spun from hexafluoroisopropanol (HFIP) solutions.



Keywords: Alternative solvents, electrospinning, gelatin, nanofibers, polycaprolactone, structure

1. Introduction

Tissue engineering emerged in the early 1990s to overcome limitations and barriers of tissue grafting and alloplastic techniques of tissue repair. In tissue engineering, scaffolds mimicking natural extracellular matrix (ECM) are used as a temporary support for cells that should adhere, proliferate, and finally form new tissues. The synthetic ECMs or scaffolds must fulfill specific set of requirements, from which the most important is optimal chemical composition providing lack of cytotoxicity, high biocompatibility, high wettability of scaffolds, presence of specific sites for effective

interactions with cells like RGD (Arginine-Glycine-Aspartic) sequences. One of the most promising and flexible techniques of formation of synthetic ECM is electrospinning, allowing formation of structures resembling morphology of native ECMs. Electrospinning is a process that was conceived in the 19th century by Lord Rayleigh followed by the U.S. patent being issued in 1934 to Formhals [1]. Electrospinning essentially consists of the creation of an electric field between a target being usually grounded and a positively charged capillary filled with a polymer solution. When the electrostatic force related to charges overcomes the surface tension of the polymer solution at the capillary tip, a polymer jet is created. After traveling to the grounded target, submicron to nanoscale fibers are collected. It is known that many various factors, starting from chemical composition, topography, porosity, fiber diameter, fiber alignment, and mechanical properties affect the bioactivity of scaffolds as cellular supports. Great parts of them are

Address correspondence to: Paweł Sajkiewicz, Institute of Fundamental Technological Research, Polish Academy of Sciences; Pawińskiego 5B, 02-106 Warsaw, Poland. E-mail: psajk@ippt.pan.pl

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/gpom.

governed by electrospinning parameters. The most important are related to properties of solutions like viscosity, electrical conductivity, and surface tension, which are in turn dependent on polymer concentration, molecular weight of polymer, solvent properties. One of the very promising synthetic polymer for tissue engineering is polycaprolactone (PCL), which is relatively inexpensive, elastic aliphatic polyester, demonstrating a lack of toxicity and a relatively slow degradation. On the other hand, PCL has limited cell affinity due to its hydrophobicity and lack of specific cell recognition sites. One of the possible, natural way to overcome the problem of low cell affinity, is blending of synthetic polymers with biopolymers, particularly those having RGD amino acid sequence, which is recognition sequence for integrin-mediated cell adhesion. The most ideal biopolymer should be the native biomaterial such as collagen or its hydrolyzed form: gelatin. Both of them are supposed to improve significantly adhesion, spreading and proliferation of cells on resulting scaffolds [2]. Additionally, better elasticity and deformation properties is expected to facilitate creating new spaces for cell penetration or enlarging those which already exist. The first successful attempt of electrospinning of PCL/gelatin mixture was done few years ago by the group of Zhang et al. [3]. The undertaken investigation [4] proved that cells proliferation and infiltration improves significantly with additive of gelatin compared to pure synthetic PCL scaffolds.

However in addition to advantages, there are also serious problems related to applications of nanofibers containing natural biopolymers. The most important is related to processability because of difficulties in finding appropriate solvents for most of biopolymers and thus blends with synthetic polymers. It is evident from literature that most of electrospinning processes of synthetic/biopolymers nanofibers, including very promising pairs PCL/gelatin and PCL/collagen, were performed using fluorinated alcohols, in particular 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-iso-propnaol (HFIP) and trifluoroethanol (TFE). Such solvents provide strong dissolving capability to various polymers, including biopolymers such as collagen and gelatin [3,5]. However, there is literature information about serious problems generated by fluorinated alcohols (e.g., HFIP and TFE). First of all, they are generally classified as toxic and corrosive, being volatile with vapors causing serious respiratory system problems and eyes damage. TFE is also said to be toxic for blood and reproductive system. It penetrates skin and even at concentration of 0,12 mg/L, can cause chronic poisoning [6]. According to the literature [7–9], it is highly probable that fluorinated alcohols cause denaturation of the native structure of collagen, resulting in defeating its original purpose of creation biomimetic scaffolds emulating the native collagen structure and function of ECM. The change in secondary structure of collagen after electrospinning using HFIP was reported [7,10–12]. In addition, it is expected that the retention of the fluoroalcohols is harmful (toxic) for cells seeded onto scaffolds [13]. Nam et al. [13] showed that even relatively low HFIP content of order of 500 ppm is toxic for *in vitro* cell culture. In vacuum untreated scaffolds such a content remains even one week after electrospinning in

PCL/gelatin scaffolds containing 25% of gelatin and is much higher for greater content of gelatin because of higher affinity of HFIP to gelatin. Vacuum treatment of scaffold leads to reduction of HFIP content, however it is anticipated that in porous scaffolds there is possibility for gradients of concentration and thus local elevation of concentration resulting in local cytotoxic effects. The last but not least important problem relates to harmful effects on operators during solution preparation and electrospinning.

Existing attempts to replace such toxic solvents by alternative substances are observed primarily in relation to one-component systems containing gelatin, collagen, or PCL. In the case of PCL various solvents such as toluene, dimethylformamide, and methyl chloride are used [14], but they are also not free of toxic characteristics. The first work, which attempted to electrospin of PCL using lower toxicity solvents, acetic acid, comes from the year 2010 [15]. The authors emphasized that in case of need, acetic acid used by them for electrospinning can be easily neutralized and washed away from the fibers without leaving any residues. Van der Schueren et al. [16] used in turn successfully solvent mixture of formic acid/acetic acid for electrospinning of PCL, obtaining bead-free fibers with diameters in the nanoscale range. In the case of collagen, which is usually spun using HFIP and TFE as a solvent [17,18], Liu et al. [12] successfully used a diluted acetic acid getting biologically effective scaffold. On the other hand, in the case of electrospinning of pure gelatin, attempts to replace toxic fluorinated alcohols by low-toxic alternative solvents are taken for several years [19–21]. Examples of alternative solvents for electrospinning of gelatin were acetic acid, either concentrated or diluted with water [19,21], mixture of ethyl acetate-acetic acid in water [20]. In the case of blend systems (i.e., PCL/gelatin and PCL/collagen), there is practically only few papers describing attempts of electrospinning from other solvents instead of fluoroalcohols. It seems that very promising alternative solvent is acetic acid. In comparison to fluorinated alcohols, acetic acid do not generate any serious problems to operators. For bicomponent PCL/collagen fibers, known to the authors is currently only one attempt of electrospinning using alternative solvents made by Chakrapani et al. [22]. They carried out electrospinning of PCL and collagen blends in acetic acid with various ratios of PCL and collagen. As a result they obtained nanofibers, with average diameters below 200 nm, irrespective of blend composition. However, the fibers obtained in Chakrapani et al. [22] were not beads-free and the morphology of scaffolds was far from uniformity. The authors did not report concentration of solutions. The most recent publication which concerns bicomponent, PCL/gelatin nanofibers electrospun from alternative solvents was published by Gautam et al. [23], who used chloroform/methanol mixture for PCL, and acetic acid for gelatin. Mixing of both solutions resulting in formation of emulsion, which was further electrospun. Authors paid attention to the important function of gelatin addition in electrospinning process. It is known that gelatin brings properties that are favorable for electrospinning, such as amino and carboxyl groups susceptible to ionization,

resulting in more homogeneous fibers compared to the pure PCL fibers. On the other hand, an excess of gelatin can result in some instability of electrospinning caused by too high concentration of electrical charges [23]. Hence it is expected that there is optimum content of gelatin in blended systems, providing stable electrospinning process. Additionally it is known from our previous results that there is also an optimal gelatin content from the perspective of tissue engineering [24].

The aim of the work is to investigate the possibility of electrospinning of PCL/gelatin fibers using alternative non- or low-toxic solvents, being the same for both polymers. Analysis of morphology and supermolecular structure as a function of gelatin content for nanofibers spun from alternative solvents as compared to commonly used HFIP will be presented.

2. Experimental

2.1 Materials

PCL ($M_n = 80,000$ g/mol), gelatin from porcine skin Type A (Gel Strength ~ 300 g Bloom) and 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) were purchased from Sigma-Aldrich Co. The alternative solvents, acetic acid (AA, glacial pure 99.5%) and formic acid (FA, pure 98–100%) were purchased from Chempur and Avantor PM Poland, respectively.

2.2 Solutions

The mixture of AA/FA with a ratio 90/10 w/w was used as a solvent. This content of FA is high enough to obtain reasonable electrical conductivity for electrospinning without causing essential reduction of solution viscosity over time which was observed by us for higher FA content (20% and higher). According to Mindru et al. [25], FA causes degradation of gelatin (Gt) while addition of AA slows down this process. The total polymer concentration in AA/FA system was fixed at 15% w/w. It is worth to mention that FA's dielectric constant is significantly higher than for AA (58 and 6.2, respectively) [26]. Dielectric effect of solvent used for electrospinning process should not be neglected since higher permittivity usually facilitates electrospinning, reducing beads formation and fiber diameters [26].

Taking into account that PCL and Gt are practically immiscible or their miscibility is very limited [27], preparation was initiated by making separate solutions of either PCL or gelatin in a mixture of AA/FA as a solvent. PCL as well as Gt solutions with concentration of 15% w/w were prepared. Separate solutions were prepared due to problems with dissolving polymers together—swelled gelatin was accumulating around PCL pieces preventing the dissolution process.

After ~ 4 h of stirring, which was sufficient for completely dissolution of each polymer, PCL and Gt solutions were mixed in such proportions to obtain a set of different PCL/Gt w/w ratios, namely 100:0, 90:10, 85:15, 80:20, and 75:25. Considering our previous results using HFIP as a solvent, showing optimal gelatin content of 20% w/w from the

perspective of tissue engineering [24], we decided to not exceed 25% w/w of gelatin. Time of subsequent mixing of PCL and Gt solutions before electrospinning was 20 h (24 h in total).

In order to prepare reference solutions of exact PCL/Gt ratios with HFIP as a solvent, both polymers were mixed together with HFIP to obtain the total concentration of 5% w/w, and then stirred for the following 24 h.

2.2.1 Solution Structure and Properties

Structure of solutions was investigated using Pluta polarizing-interference microscope (Biolar PI) produced by Polish Optical Works (PZO).

Viscosity and electrical conductivity, two crucial for electrospinning process solution parameters were measured. Solution viscosity was measured by rotational viscometer Brookfield HADV-III Ultra with cone/plate configuration. Comparison of viscosity was done at a constant shear rate $\approx 40 \frac{1}{s}$, corresponding to the value estimated for the shear rate, $\dot{\gamma}$, inside our needle (Eq. 1):

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{\pi r^3} \quad (1)$$

where Q is volumetric flow rate (600 μ L/h) and r is inner needle radius (0.17 mm).

Electrical conductivity of solvents and solutions was measured using Elmetron CC-401 conductometer.

2.3 Electrospinning Process

The electrospinning equipment was operated in horizontal mode. It consisted of a single syringe pump (New Era Pump Systems, NE-1000 model), collector and high voltage generator, connected with positive terminal to a stainless steel needle and grounded to the collector (steel plate). Distance between needle and collector was 15 cm, flow rate of solution was 600 μ L/h, and needle with 0.34 mm inner diameter was used.

When using AA:FA as a solvent, electrospinning process was held at the same parameters irrespective of gelatin content. Although the voltage for which fibers could be attained was in a range between 8 and 12 kV for the majority of solutions, the voltage of 10 kV was chosen, providing the most uniform fibers. For HFIP-based solutions, the only difference made was the voltage, which in that case was set at 12.5 kV. Temperature during electrospinning processes varied between 22 and 24°C, and humidity was around 55–60%. This range of ambient conditions seems to be optimal for investigated material system.

Electrospinning was started around 15 min after finishing of solution preparation and held until nonwoven of required thickness was obtained. AA/FA solvent based emulsions were electrospun for around 1 hr and HFIP based solutions for around 3 h. Differences in time of electrospinning process came from different polymer concentration for each solvent system.

2.4 Characterization of Electrospun Nanofibers

2.4.1 Morphology

Quantitative analysis of morphology of electrospun fibers was performed using the scanning electron microscope (SEM JEOL JSM-6390LV instrument at accelerating voltage of 7 kV. Before observations, samples were coated with gold. The mean fiber diameter for particular sample was estimated from 220 measurements done along the line drawn on particular SEM image. Diameter distributions were analyzed using Gaussian function approximation (Origin software).

2.4.2 Structure

Pluta polarizing-interference microscope (Biolar PI) produced by Polish Optical Works (PZO) was used for investigations of internal structure of electrospun fibers. Taking into account relatively weak molecular orientation of fibers collected on a plate [28], it was expected that changes of brightness at crossed polarizers would reflect possible segregation of crystallizing PCL regions and noncrystallizing gelatin areas.

Crystallinity of PCL was analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) - Perkin-Elmer Pyris-1 apparatus. Samples (ca. 2 mg) were heated from 20°C at a rate of 10°C/min. Crystallinity of PCL was estimated using equation:

$$x_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \quad (2)$$

where x_c is crystallinity of PCL, ΔH_f -fusion heat of a sample normalized to the mass of PCL while ΔH_f^0 is the specific heat of fusion of 100% crystalline PCL taken as 135 J/g [29,30]. Temperature and heat calibration was performed using indium as a reference material.

Taking into account overlapping of diffraction peaks from both components, wide angle X-ray scattering (WAXS) technique was applied only for detection of structure of gelatin. WAXS measurements were performed using Bruker D8 Discover diffractometer operated at the voltage 40 kV, and current 40 mA. CuK_α radiation (wavelength of 0.1542 nm) was used. All measurements were performed in reflection mode, using Bragg-Brentano geometry, with a 0.6 mm slit and two Soller collimators applied on both sides. Highly sensitive Lynx Eye 1-D silicon strip detector was used. The angular range of measurements, 2θ , was between 5° and 30°, with a step of 0.01° and a time of data accumulation at particular angular point of 0.2 s. WAXS radial profiles were deconvoluted using Pearson VII function.

3. Results and Discussion

3.1 Structure of Solutions

Optical investigations of PCL/Gt blends clearly show the emulsion nature when using AA or mixture of AA/FA as solvent. This fact may be related to the lack or very limited miscibility of PCL and Gt [27] together with relatively weak interactions with both acids, resulting in separation of both polymers. Figure 1 illustrates microstructure of PCL:Gt blend using AA/FA mixture. Regardless of applied Gt content,

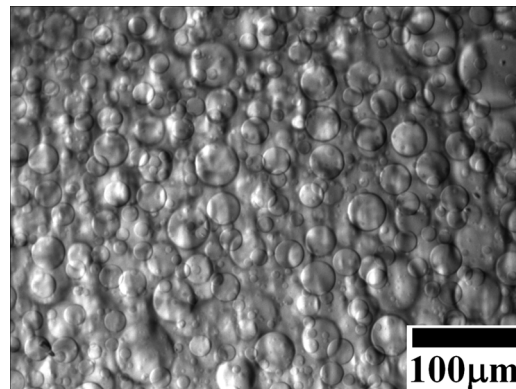


Fig. 1. Typical optical microscope image of PCL/Gt emulsion in AA/FA solvent system (85:15 PCL:Gt ratio).

typical image shows two-phase structure, with one phase being dispersed, and the second one being continuous matrix. Additional observation of crystallization during solvent evaporation indicates that it is most probable that dispersed phase is PCL reach component, while matrix is Gt reach phase.

In the case of PCL/Gt solutions in HFIP there is homogeneous structure without any traces of phase separation. This behavior can be explained by much stronger interactions with HFIP molecules (stronger solvent).

3.2 Solutions Conductivity

Figures 2 and 3 show the dependence of electrical conductivity measured for the blend of AA and FA on composition of solvents and polymers, respectively.

It is evident from Figure 2 that there is strong, nonlinear increase of conductivity with FA content in the AA/FA blend. In the case of pure AA, the electrical conductivity is very low, hindering the process of electrospinning.

Addition of a polymer to a solvent, either AA/FA or HFIP, leads to changes of electrical conductivity. In the case of PCL only, there is slight reduction of electrical conductivity because of nonpolar nature of PCL molecules (Figures 2 and 3). Such a trend was observed by us also

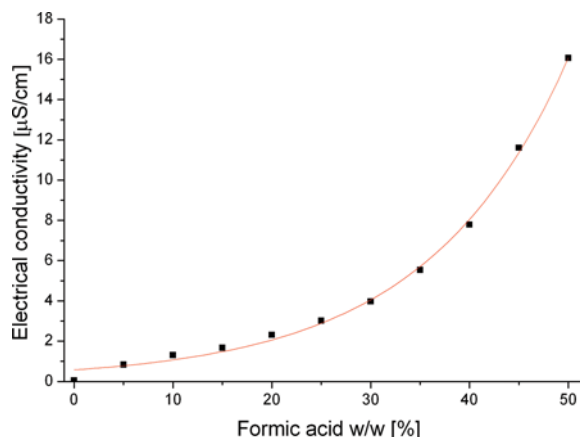


Fig. 2. Electrical conductivity of AA/FA solvent system versus FA content.

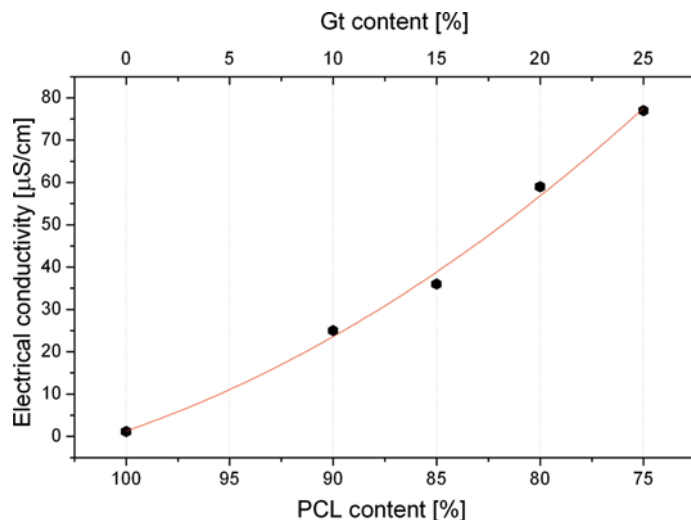


Fig. 3. Electrical conductivity of AA/FA solvent system (AA:FA 90:10) with PCL/Gt additives.

for HFIP solutions [24]. On the contrary, it is seen in Figure 3 that gelatin increases considerably electrical conductivity of AA/FA solvent system. This is due to the fact that gelatin is highly polar, containing amino and carboxyl groups, which are susceptible to ionization.

3.3 Solutions Viscosity

The second material parameter that is important for electrospinning is viscosity. It defines the resistance of the fluid to flow, thus stabilizing the jet. Viscosity is directly proportional to the concentration of the solution and to the molecular weight of the polymer. In the case of constant total concentration of polymers, it is expected that the only parameter affecting viscosity will be ratio of PCL to Gt.

Figure 4 illustrates viscosity as a function of shear rate, measured for PCL:Gt 75:25 in AA:FA 90:10 solvent.

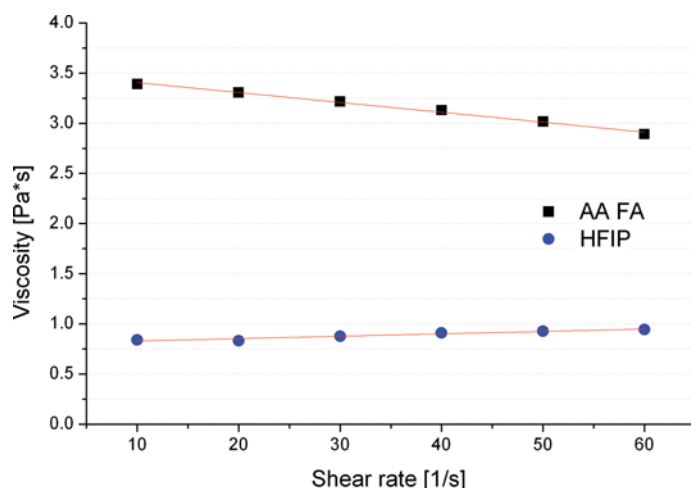


Fig. 4. Viscosity as a function of shear rate for PCL:Gt 75:25 composition in AA:FA 90:10 and in HFIP.

Changes in viscosity as a function of shear rate in investigated range of rates are more evident for composition in AA:FA solvent. The most significant difference in Figure 4 is related to the applied solvent being a result of three times lower total polymer concentration in the case of HFIP (5% w/w) as compared to AA/FA system (15% w/w). For further systematic analysis of the effect of gelatin content on solution viscosity, measurements were performed at the rate 40/s. (Figure 5), which approximately corresponds to shear rate inside the needle during electrospinning process. Even if deformation rate of solution during electrospinning slightly differs from this value, the practical insensitivity of viscosity on the shear rate allows to treat the results shown in Figure 5 as representative.

It is evident from Figure 5 that irrespective of the solvent used, viscosity decreases with increasing content of gelatin. Nevertheless, for AA/FA solutions at the applied 15% w/w of total polymer concentration addition of Gt brings more considerable and consistent decrease in viscosity compared to HFIP 5% w/w solutions.

3.4 Electrospinning and Morphology of Fibers

In the case of emulsions appearing when using AA/FA mixture, their structure during the time of electrospinning (1–3 h) is stable with one phase being dispersed within continuous matrix of the second phase. Nonwoven distribution on the collector was always similar – diameter of area covered with fibers was around 7–8 cm. Electrospinning on a plate - static collector results in formation of nonwovens with random orientation of fibers (Figure 6).

SEM images of fibers spun using both solvents do not indicate any inhomogeneity along fibers which could be treated as traces of emulsion structure or instability of the electrospinning process. Analysis of fiber diameter distributions (Figures 7 and 8) indicates that for pure PCL solutions at the applied conditions of electrospinning, they can be treated as bimodal. Addition of gelatin at any content leads to reduction of mean value of fiber diameter compared to

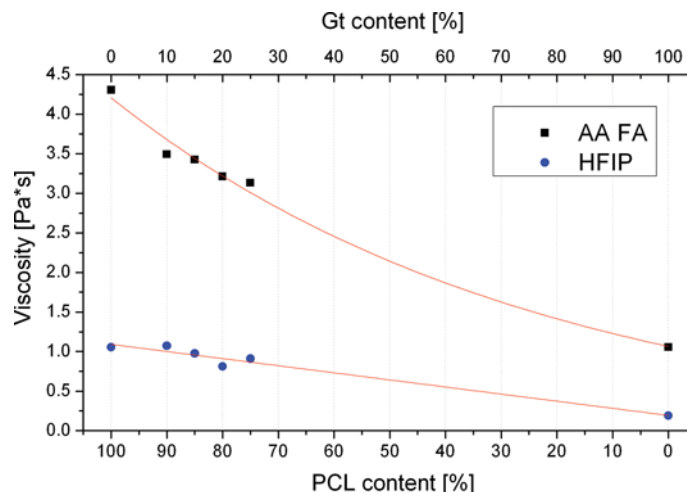


Fig. 5. Viscosity of PCL/Gt solutions using AA:FA 90:10 or HFIP as a solvent at shear rate 40/s versus Gt content.

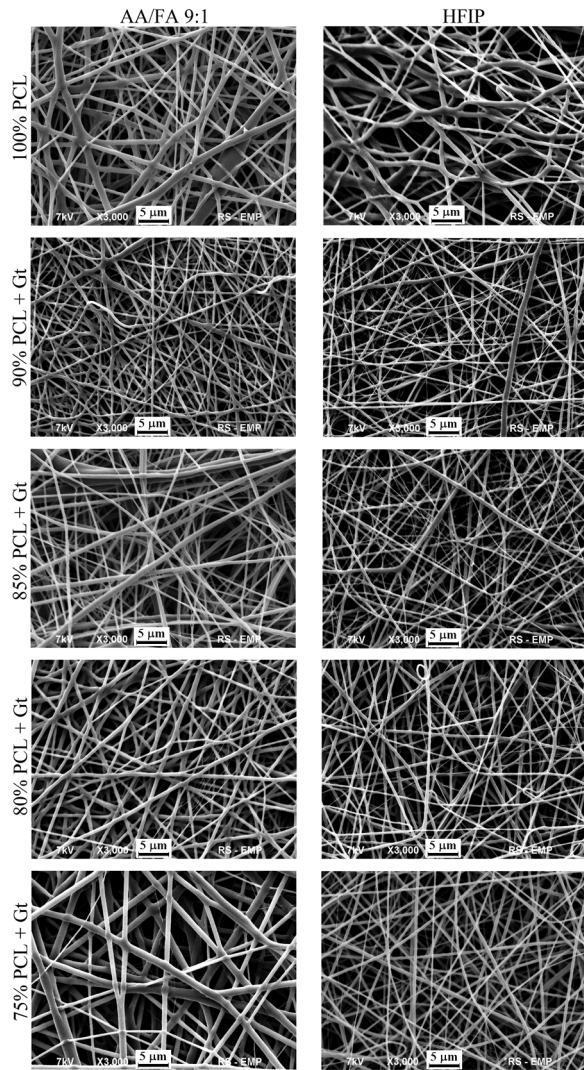


Fig. 6. SEM images of electrospun nonwovens.

pure PCL nonwovens (for HFIP only; Table 1) and fiber diameter distributions can be treated as unimodal (both for AA/FA and HFIP). It is seen from Figures 5 and 3 that addition of gelatin does introduce noticeable decrease of viscosity and increase of electrical conductivity. Both effects lead to reduction of fiber diameter. Analysis of fiber diameter as a function of gelatin content indicates that the average diameter increases with Gt content for AA/FA system while being relatively constant for HFIP (Table 1). This quite unexpected increase of fiber diameter of PCL/Gt fibers with increasing Gt content can be most probably explained by the presence of emulsion, which can be stronger at higher Gt content.

From the very practical perspective, it can be concluded that for both solvent systems, electrospun fibers diameters are on average similar level. There is no doubt that it is possible to obtain PCL/Gt fibers using alternative solvents with morphology being similar to that for fibers spun from HFIP solutions.

3.5 Structure

Figure 9 illustrates images of electrospun fibers, both from AA/FA system and HFIP, registered by optical microscope at crossed polarizers. Taking into account relatively weak molecular orientation of fibers collected on a plate [28], it is expected that changes of brightness along fibers observed at crossed polarizers for fibers spun from AA/FA solvents reflect segregation of crystallizing PCL regions and noncrystallizing gelatin areas. This structure reflects to two-phase (emulsion) structure observed before electrospinning when using AA/FA (Figure 9a).

On the contrary, in the case of fibers spun from HFIP their internal structure is much more homogeneous as observed by polarizing microscope (Figure 9b).

Investigations of supermolecular structure of fibers spun from AA/FA was concentrated on crystallinity using DSC method. Figure 10 illustrates thermograms of pure PCL as well as PCL/Gt fibers with relatively high content of gelatin during heating in a broad temperature range. It is seen that for pure PCL there is only one endothermic peak with a maximum at $\sim 57^\circ\text{C}$ being related to the melting of crystal phase. In the case of PCL/Gt fibers there is additional broad endotherm with a maximum at around 90°C related to evaporation of water from gelatin as it was shown previously using thermogravimetry for PCL/Gt fibers spun from HFIP [24]. It is seen in Figure 10 that there is no evidence of transition of helix to coil conformation of gelatin in the high temperature range, indicating coil conformation of gelatin molecules irrespective of used solvents. Additionally, there is no traces of endothermic peak at lower temperatures which can be attributed to melting of gelatin crystals (s.c. denaturation) in the case of existence of triple-helix structure. It is known from literature that depending on external condition, for instance pH of solution, molecules of gelatin can exist either in coil or helix conformation [31]. For helix conformation, formation of crystalline aggregates (triple-helix structure) is possible which is not the case of coil conformation. It is known from previous experiments [32], that the existence of helix conformation of gelatin molecules can be manifested by helix to coil transition at $\sim 225^\circ\text{C}$ as observed by DSC, which is not our case.

Figure 11 shows DSC scans registered during heating in the temperature range of melting of PCL crystals. In the case of PCL/Gt fibers, thermograms seen in Figure 11 were obtained by subtraction of the peak related to water evaporation from gelatin. It is seen in Figure 11 that melting of PCL crystals starts at low temperatures, ca. 35°C , and approaches maximum of transition rate at around 57°C . Comparison of melting temperatures of PCL crystals for various fibers indicates that temperatures of the start of melting as well as maximum rate of melting (peak temperature) are slightly higher for pure PCL fibers than for fibers containing gelatin. This fact indicates that PCL crystals are smaller and/or more defective when gelatin coexists. It is highly probable that this is due to partly incorporation of gelatin molecules into PCL crystals, disturbing thus crystal structure of PCL. The limited miscibility of PCL and gelatin was evidenced in Kolbuk et al. [27].

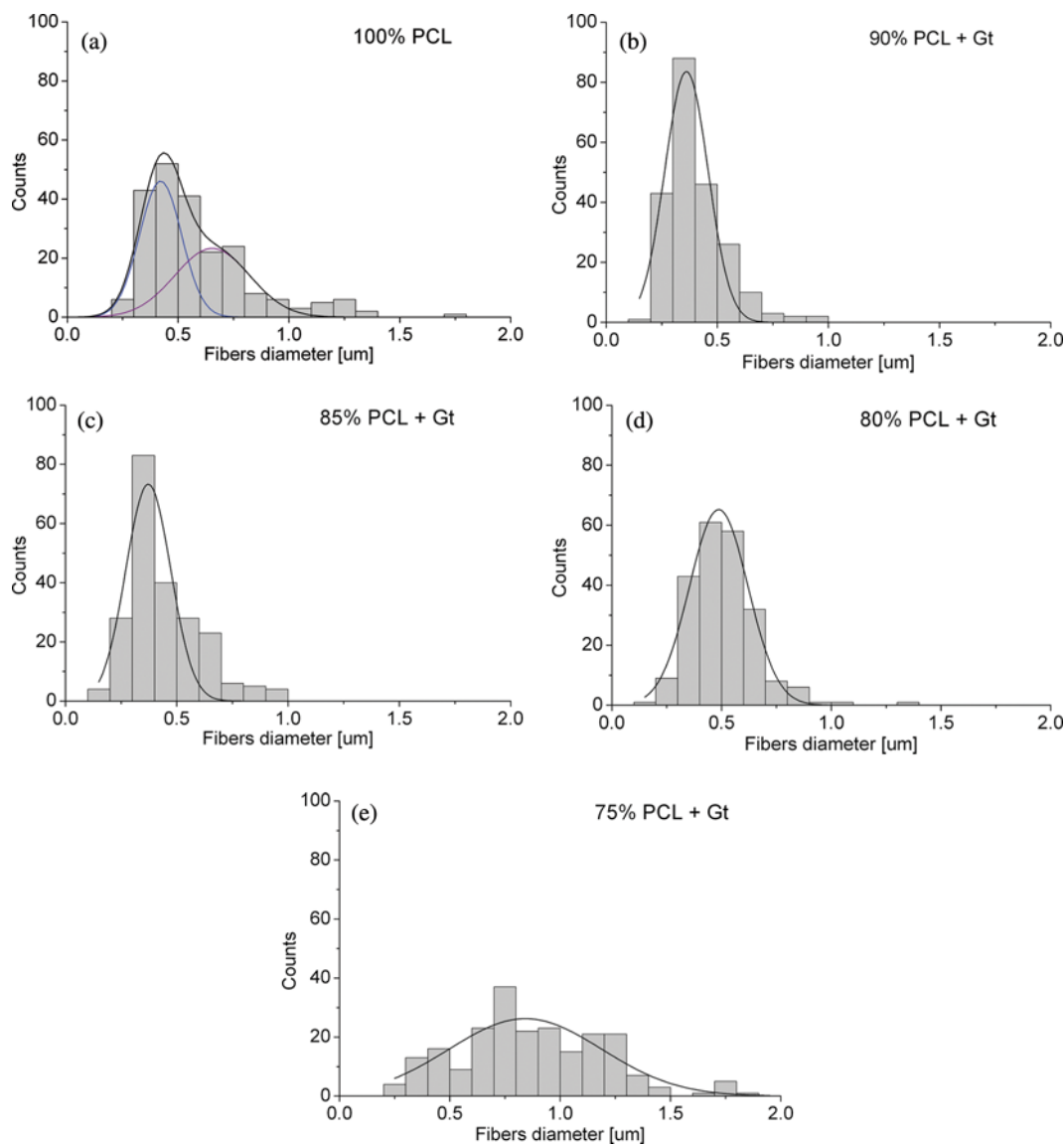


Fig. 7. Fiber diameter distribution approximated with Gauss functions for PCL/Gt fibers spun from AA/FA 90:10, for various PCL/Gt ratios: (a) 100/0, (b) 90/10, (c) 85/15, (d) 80/20, (e) 75/25.

On the other hand, comparison of thermograms of fibers spun from various solvents do not indicate any differences in temperatures of melting of PCL crystals related to type of used solvent.

It is evident from Figure 12 that the PCL crystallinity of fibers spun using AA/FA solvent system is in general higher than for fibers spun using HFIP. This is most probably related to much higher boiling temperature of AA and FA (118 and 100.8°C, respectively) than for HFIP (58.2°C), resulting in longer time of evaporation allowing hence higher crystallinity progress. Additionally, maximum crystallinity is observed for the lowest applied content of gelatin for both solvents.

Depending on the external conditions, the molecules of gelatin can take either random coil or helix conformation. In the case of helices, they are associated by hydrogen bonds in junction zones, resulting in partial renaturation of

triple-helix structure of native collagen with peptide residues still in the random coil conformation. This kind of transition leads to formation of crystal aggregates, which can be evidenced as two narrow peaks on wide-angle X-ray scattering patterns. According to literature data, they are related to the distance ca. 1.1 nm (strong reflection at $2\theta = 8.0^\circ$ using CuK_α radiation) which is attributed to the diameter of the triple helix and to the distance ca. 0.29 nm ($2\theta = 30.8^\circ$ using CuK_α radiation) which in turn is attributed to the distance between amino acids residues along the helix [33,34]. It is evident from Figure 13 that in the registered range of diffraction angles 2θ between 5° and 30° , there is no gelatin crystal peak at 8° . The only scattering from gelatin is amorphous halo with maximum at ca. 19.5° in addition to PCL scattering from amorphous ($2\theta = 20.81^\circ$) and crystal structures (two strongest reflections at 21.19° and 23.54° , and three weaker reflections at 15.51° , 21.82° , and 24.12°). The lack

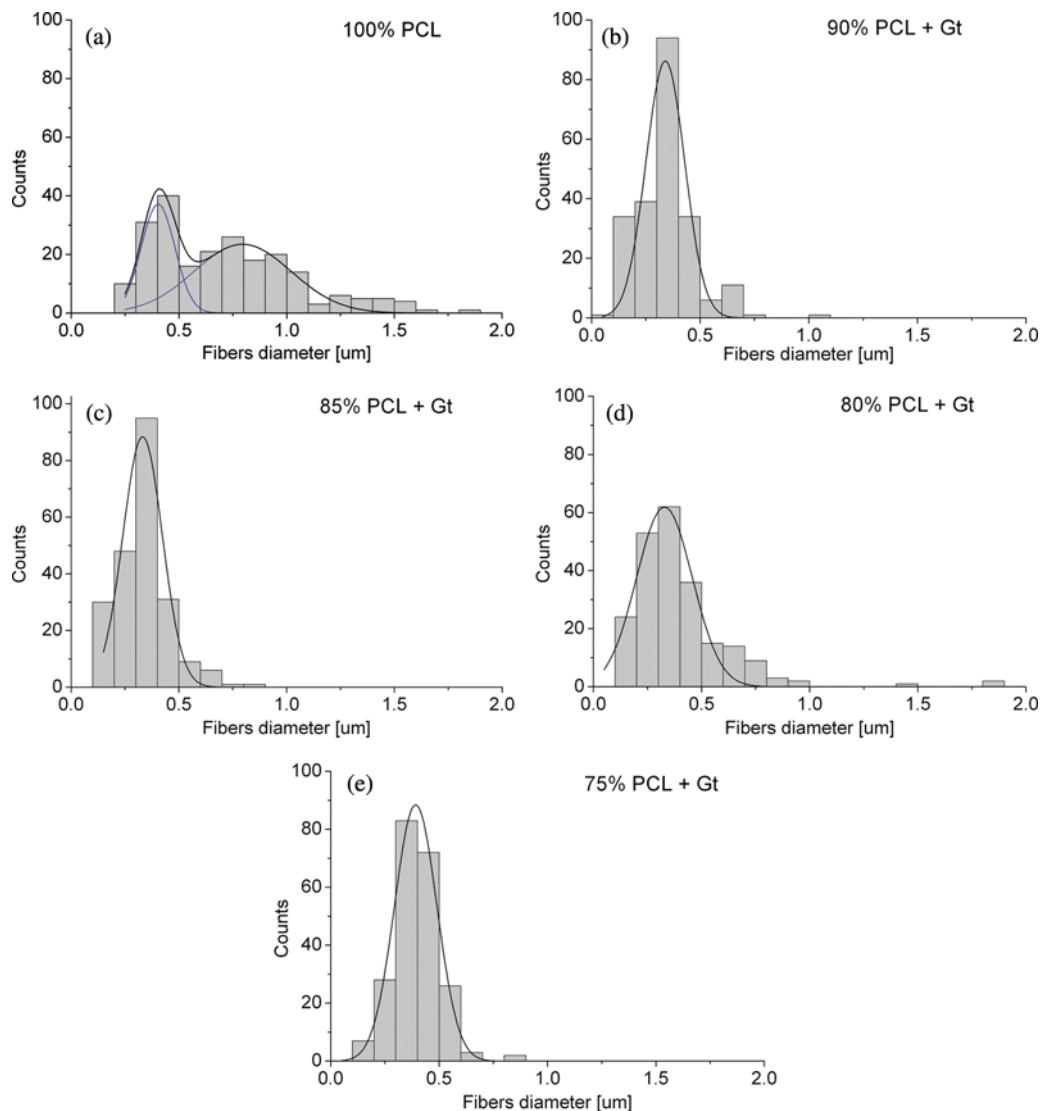


Fig. 8. Fiber diameter distribution approximated with Gauss functions for PCL/Gt fibers spun from HFIP, for various PCL/Gt ratios: (a) 100/0, (b) 90/10, (c) 85/15, (d) 80/20, (e) 75/25.

Table 1. Mode (diameter at the peak) and mean values of fiber diameters

Solvent	Sample	Mode 1 (μm)	Mode 2 (μm)	Mean diameter (μm)	
AA:FA	100% PCL	0.421	0.654	0.614	
	90:10	90% PCL + Gt	0.361	—	0.400
		85% PCL + Gt	0.372	—	0.442
		80% PCL + Gt	0.487	—	0.505
		75% PCL + Gt	0.842	—	0.877
HFIP	100% PCL	0.403	0.796	0.707	
	90% PCL + Gt	0.340	—	0.341	
	85% PCL + Gt	0.332	—	0.335	
	80% PCL + Gt	0.328	—	0.399	
	75% PCL + Gt	0.392	—	0.396	

of Gt crystallites is related to the acidic conditions of Gt preparation, resulting in random coil conformation. It is evident from literature that crystalline Gt structures formed on the basis of helix conformations may occur in water-based solutions or neutralized to some degree acidic solutions. For instance, Song et al. [32], observed DSC peak at 225°C which can be attributed to helix-coil transition in gelatin prepared using ethyl acetate to neutralize acidic conditions. On contrary, such peaks do not appear for Gt prepared in acidic conditions or solvent-systems, which contain fluorinated alcohols (e.g., HFIP), indicating coil conformation of Gt molecules. The effect of pH on Gt structure is clearly evident from additional WAXS patterns registered for Gt casted films prepared using distilled water (pH ~7) and AA:FA solvent system (pH ~1; Figure 14). In the case of Gt casted from water in addition to broad amorphous peak with maximum at $2\theta = 20^\circ$, there is relatively

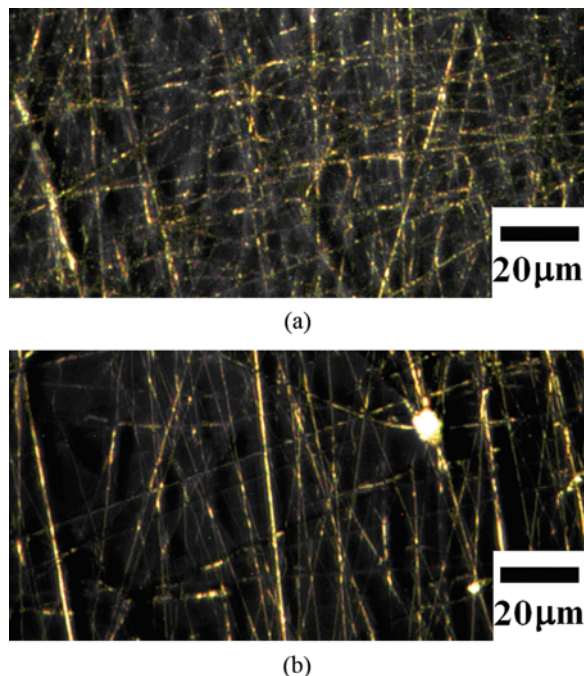


Fig. 9. Optical micrographs of fibers with PCL:Gt ratio 75:25 electrospun from (a) AA/FA and (b) HFIP registered at crossed polarizers.

narrow peak at around 8° , indicating the existence of crystals formed on the basis of helix conformation. For Gt from AA:FA solvent system there is only amorphous part of scattering, indicating random coil conformation. The asymmetric shape of amorphous scattering together with the shift toward lower angles observed for gelatin casted from water is most probably attributed to strong molecular interactions between water and polar part of Gt molecules.

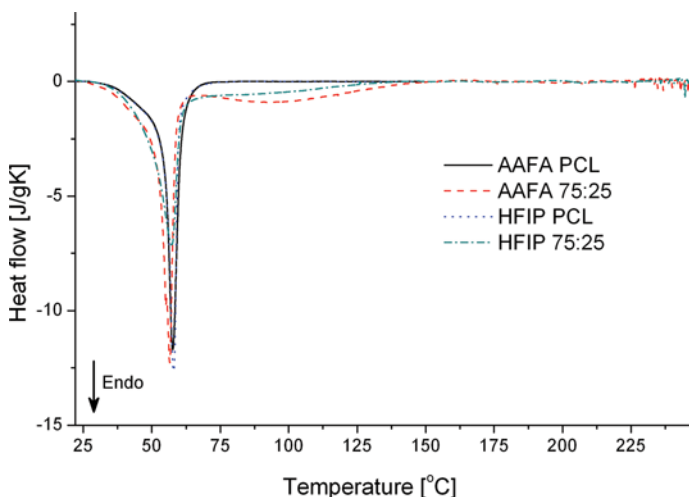


Fig. 10. Illustration of DSC scans during heating of PCL and PCL/Gt fibers spun from HFIP and AA/FA solvents. Broad temperature range.

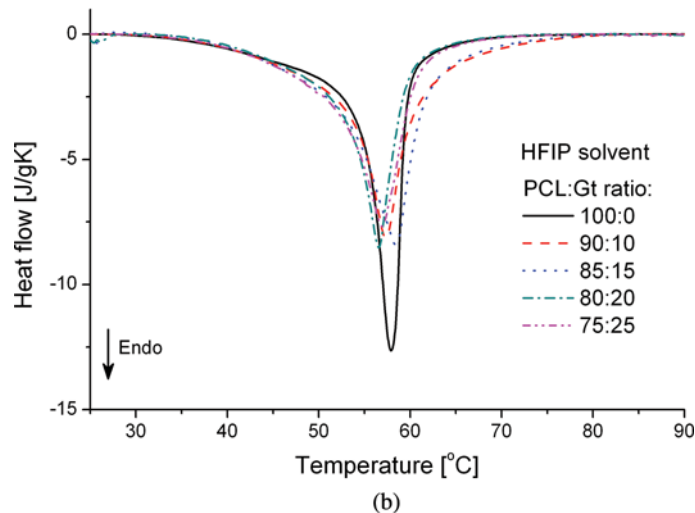
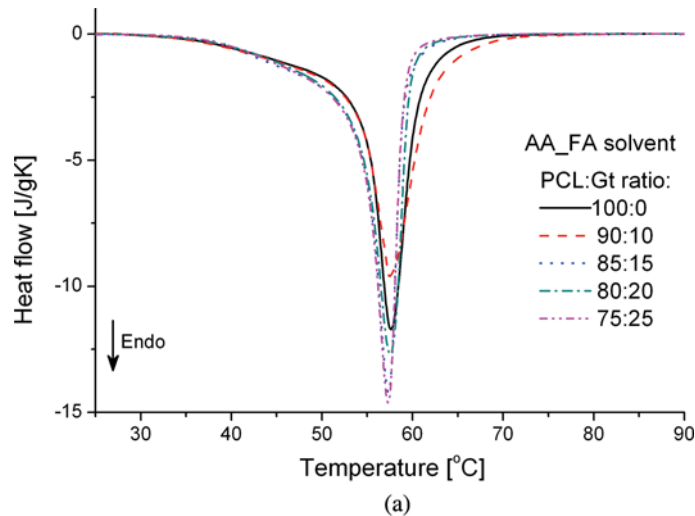


Fig. 11. DSC scans during heating of PCL/Gt fibers spun from (a) AA/FA solvent system and (b) HFIP, for various PCL:Gt ratios.

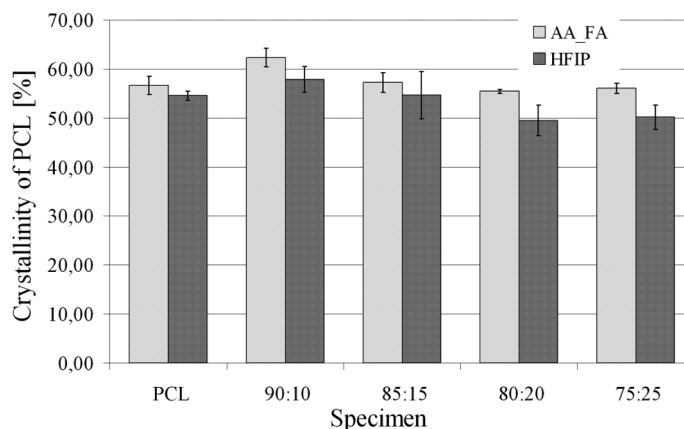


Fig. 12. Crystallinity of PCL determined from melting heat (Eq. 2) for electrospun nonwovens.

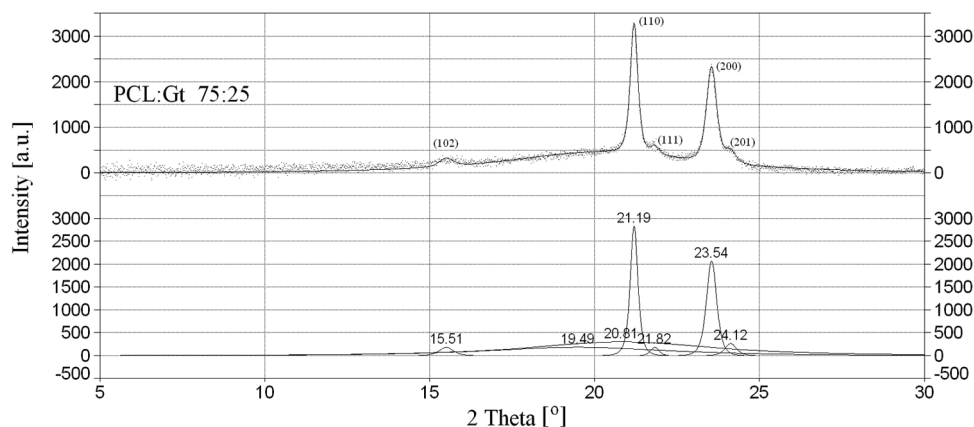


Fig. 13. WAXS pattern of nonwoven with 25% Gt w/w and its fitting.

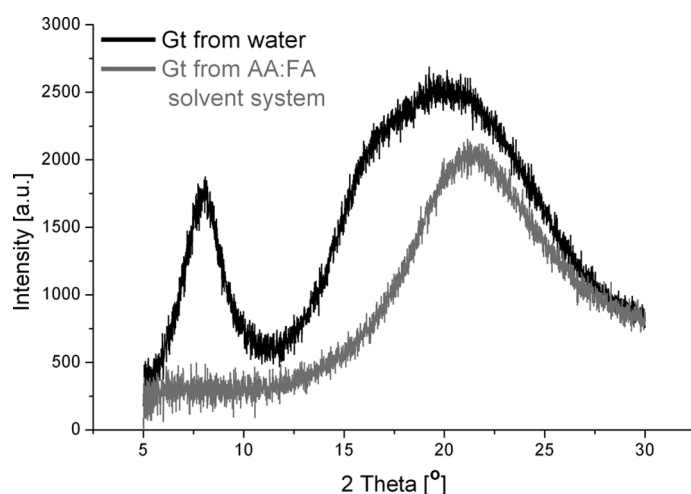


Fig. 14. WAXS patterns (without background correction) of Gt casted films prepared from water and AA:FA 90:10 solvent system.

4. Conclusions

Bicomponent polycaprolactone/gelatin nanofibers were successfully formed by electrospinning using a novel polymer–solvent system with solvents being alternative to the commonly used toxic solvents like fluorinated alcohols. The mixture of acetic acid (AA) with formic acid (FA; 90:10) was applied with the total polymer concentration of 15% w/w. To the best of our knowledge, these solvents were applied for the first time to dissolve both polymers in order to electrospin bicomponent fibers. Stable electrospinning was possible at the voltage ranging between 8 and 12 kV, providing most uniform fibers at 10 kV. From the very practical perspective, there is no doubt that it is possible to obtain PCL/Gt fibers using AA/FA mixture with morphology similar to that for fibers spun from hexafluoroisopropanol (HFIP) solutions. The mixture of PCL and gelatin either in AA or AA/FA solvents shows emulsive structure, being relatively stable during the time of electrospinning. This kind of structure does not affect external uniformity (morphology) of fibers, however the

internal inhomogeneity along the fibers can be deduced after spinning using optical microscope with crossed polarizers. According to DSC and WAXS results, gelatin molecules adopt random coil conformation resulting in amorphous superstructure while polycaprolactone crystallizes, reaching even higher crystallinity than for commonly used hexafluoroisopropanol. This higher crystallinity of PCL is due to higher boiling temperature of AA and FA than for HFIP, providing longer time for crystallite formation.

The investigated material system with alternative solvents seems to be very promising for further applications as scaffolds. Investigations of biological properties in vitro of the electrospun scaffolds are in progress and will be published in a future article.

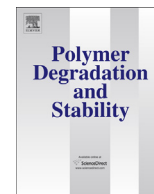
Funding

This work was funded by the Polish National Science Center (NCN) under the Grant No.: 2013/09/B/ST8/03463. Part of investigations was carried out with the use of CePT infrastructure financed by the European Union—the European Regional Development Fund within the Operational Programme “Innovative economy” for 2007–2013.

References

- Formhals, A. U.S. Patent No. 1,975,504, 1934.
- Jeong, S. I.; Lee, A.-Y.; Lee, Y. M.; Shin, H. J. *Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, *19*, 339–357.
- Zhang, Y.; Ouyang, H.; Lim, C. T.; Ramakrishna, S.; Huang, Z.-M. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* **2005**, *72B*, 156–165.
- Zhang, Y. Z.; Su, B.; Venugopal, J.; Ramakrishna, S.; Lim, C. T. *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 623–638.
- Matthews, J. A.; Wnek, G. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 232–238.
- Nikitenko, T. K.; Tolgskaya, N. S. *Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, AMS USSR* **1969**, *13*, 29–33.
- Zeugolis, D. I.; Khew, S. T.; Yew, E. S. Y.; Ekaputra, A. K.; Tong, Y. W.; Yung, L. Y. L.; Hutmacher, D. W.; Sheppard, C.; Raghunath, M. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2293–2305.
- Hong, D. P.; Hoshino, M.; Kuboi, R.; Goto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8427–8433.

9. Cort, J. R.; Andersen, N. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *233*, 687–691.
10. Doillon, C. J.; Drouin, R.; et al. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 212–221.
11. Stankus, J. J.; Guan, J.; et al. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2004**, *70*, 603–614.
12. Liu, T.; Teng, W. K.; Chan, B. P.; Chew, S. Y. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *95*, 276–282.
13. Nam, J.; Huang, Y.; Agarwal, S.; Lannutti, J. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *107*, 1547–1554.
14. Gholipour Kanani, A.; Hajir Bahrami, S. *J. Nanomater.* **2011**, Article ID 724153.
15. Borges, J. P.; Gomes, S. R.; Henriques, C. R.; Silva, J. C. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – EU Meeting, Galway, Ireland, **2010**.
16. Van der Schueren, L.; De Schoenmaker, B.; Kalaoglu, O. I.; De Clerck, K. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 1256–1263.
17. Zhong, S. P.; Teo, W. E.; Zhu, X.; Beuerman, R. W.; Ramakrishna, S.; Yung, L. Y. L. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79*, 456–463.
18. Zhang, Y. Z.; Venugopal, J.; Huang, Z. M.; Lim, C. T.; Ramakrishna, S. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2583–2589.
19. Choktaweasap, N.; Arayanarakul, K.; Aht-Ong, D.; Meechaisue, C.; Supaphol, P. *Polym. J.* **2007**, *39*, 622–631.
20. Song, J. H.; Kim, H. E.; Kim, H. W. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, *19*, 95–102.
21. Gu, S. Y.; Wang, Z. M.; Ren, J.; Hang, C. Y. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 1822–1828.
22. Chakrapani, V. Y.; Gnanamani, A.; Giridev, V. R.; Madhusoothanan, M.; Sekaran, G. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *125*, 3221–3227.
23. Gautam, S.; Dindab, A. K.; Mishra, N. C. *Mater. Sci. Eng.* **2013**, *33*, 1228–1235.
24. Kołbuk, D.; Sajkiewicz, P.; Maniura-Weber, K.; Fortunato, G. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2052–2061.
25. Mindru, T. B.; Mindru, I. B.; Malutan, T.; Tura, V. *J. Optoelect. Adv. Mater.* **2007**, *9*, 3633–3638.
26. Luo, C. J.; Stride, E.; Edirisinghe, M. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4669–4680.
27. Kołbuk, D.; Sajkiewicz, P.; Denis, P.; Choińska, E. *Bull. Polish Acad. Sci.: Tech. Sci.* **2013**, *61*, 629–632.
28. Kołbuk, D.; Sajkiewicz, P.; Kowalewski, T. A. *Eur. Polym. J.* **2012**, *48*, 275–283.
29. Siparsky, G. L.; Voorhees, K. J.; Dorgan, J. R.; Schilling, K. *J. Environ. Polym. Degr.* **1997**, *5*, 125–136.
30. Garle, A.; Kong, S.; Ojha, U.; Budhlall, B. M. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 645–657.
31. Mel'nichenko, Y. B.; Gomza, Y. P.; Shilov, B. B. *Polym. Int.* **1991**, *25*, 153–157.
32. Song, J. H.; Kim, H. E.; Kim, H. W. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 95–102.
33. Bigi, A.; Panzavolta, S.; Rubini, K. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5675–5680.
34. Gioffre, M.; Torricelli, P.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; Bigi, A. *J. Bioact. Compat. Pol.* **2012**, *27*, 67–77.



Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system



J. Dulnik^a, P. Denis^{a,*}, P. Sajkiewicz^a, D. Kołbuk^a, E. Choińska^b

^a Institute of Fundamental Technological Research, Polish Academy of Sciences, 5b Pawińskiego St., 02-106 Warszawa, Poland

^b Faculty of Materials Engineering, Warsaw University of Technology, 141 Wółoska St., 02-507 Warszawa, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2016

Received in revised form

17 May 2016

Accepted 23 May 2016

Available online 24 May 2016

Keywords:

Bicomponent nanofibers

Biodegradation

Biopolymer

ABSTRACT

Bicomponent polycaprolactone/gelatin and polycaprolactone/collagen nanofibers formed by electrospinning using various solvents were subjected to biodegradation and compared. Hexafluoroisopropanol (HFIP) was used as a reference solvent, while the second, alternative solvent system was the mixture of acetic acid (AA) with formic acid (FA). Biodegradation of investigated materials was manifested mainly by the gelatin leaching, including collagen which is indeed denaturated to gelatin during electrospinning, leading to nanofibers erosion. There was no molecular degradation of PCL during 90 days of biodegradation procedure as deduced from no change in the elongation stress at break. The rate of biopolymer leaching was very fast from all materials during the first 24 h of biodegradation, being related to surface leaching, followed by a slower rate leaching from deeper material layers. Mass measurements showed much faster biopolymer leaching from nanofibers electrospun from AA/FA than from HFIP because of strongly emulsive nature of the solution in the former case. Irrespective of the solvent used, the leaching rate increased with initial content of gelatin. The analysis of Young modulus during biodegradation indicated complex mechanism of changes, including biopolymer mass loss, increase of PCL crystallinity and partial gelatin renaturation.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is a fact that tissue engineering is dynamically evolving research area, whether we think of cellular stimulation methods, novel multifunctional materials or cutting edge technologies. The trend toward biomimeticism has been observed for years, making electrospinning, though not a new idea itself, a technique that has still a lot to offer, considering a remarkable structural similarity of electrospun materials to extracellular matrix.

Materials made of polycaprolactone have been present in scientific literature focusing on scaffolds for tissue engineering for a couple of years now [1–4]. Polycaprolactone belongs to a group of biodegradable aliphatic polyesters, has good mechanical properties and is not cytotoxic. In comparison to other materials from this group it has lower mechanical stiffness and its degradation products do not cause a decrease in pH in an area surrounding a graft, what has been reported for polylactide or polyglycolide and may

increase inflammation [5,6].

As any other aliphatic polyester, polycaprolactone is hydrophobic, what is the disadvantage for materials used in scaffolds. This problem can be solved by an addition of highly hydrophilic substance. Gelatin is a biopolymer derived from collagen, the major extracellular matrix building protein. Incorporating gelatin or collagen into polycaprolactone scaffold, not only allows to decrease significantly hydrophobicity, but also has a favourable influence on cellular response of a material. Electrospun nonwovens from PCL/gelatin and PCL/collagen structurally mimic native extracellular matrix and also provide cells with chemical cues affecting them. Collagen and gelatin contains Arg-Gly-Asp (RGD) amino acid sequences that can be found in many naturally occurring proteins. Integrins (cell binding proteins) recognize those sequences and promote cell adhesion [7]. This way biopolymer addition increases cell attachment and spreading to the surface of a material. Furthermore, nanofiber materials from PCL/biopolymer exhibit better mechanical properties than the ones made of any of them individually.

Electrospinning of bicomponent nanofibers requires the use of a solvent which dissolves both of the polymers. To date, the most common compounds used in such systems were perfluorinated

* Corresponding author.

E-mail addresses: jdulnik@ippt.pan.pl (J. Dulnik), pdenis@ippt.pan.pl (P. Denis), psajk@ippt.pan.pl (P. Sajkiewicz).

Table 1
Abbreviated names of all investigated materials.

PCL content [% w/w]	Biopolymer content [% w/w]	Abbreviation	
		A – AA/FA	H – HFIP
100	0	PA	PH
90	G – gelatin	10	PGA 9:1
80		20	PGA 8:2
70		30	PGA 7:3
90	C – collagen	10	PCA 9:1

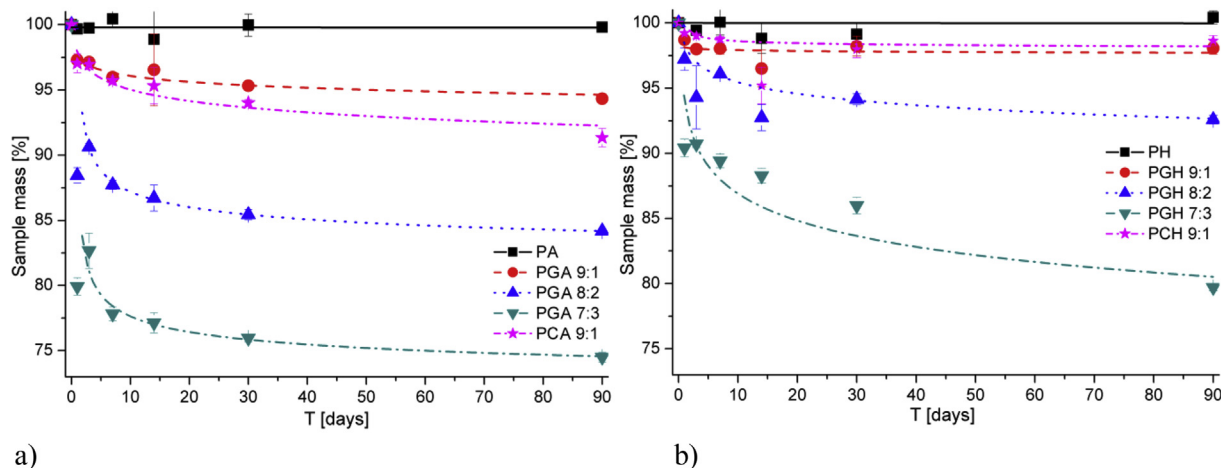


Fig. 1. Sample mass loss after biodegradation normalized to the total sample mass a) AA/FA and b) HFIP.

alcohols such as 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and 2,2,2-trifluoroethanol (TFE). These solvents are expensive and classified as highly toxic. We have optimized the process of electrospinning of PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers based on the use of alternative, relatively non-toxic solvents system composed of 90% of acetic acid and 10% of formic acid [8].

The application of the mixture of these acids reduces costs and toxicity of electrospinning. The disadvantage of this solvent system is the fact that polymer solution becomes emulsive, which is not observed in solutions from perfluorinated alcohols.

The aim of this work was to investigate whether the solvent used in electrospinning influences the kinetics of biopolymer

leaching from bicomponent nanofibers and how the properties of electrospun material are affected by this process.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PCL (Mn = 80,000 g/mol) and gelatin from porcine skin Type A (gel strength ~ 300 g Bloom) were purchased from Sigma-Aldrich Co., as well as 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and phosphate buffered saline tablets (pH 7,4). Collagen Type I lyophilized from calf skin was purchased from Elastin Products Company, Inc.

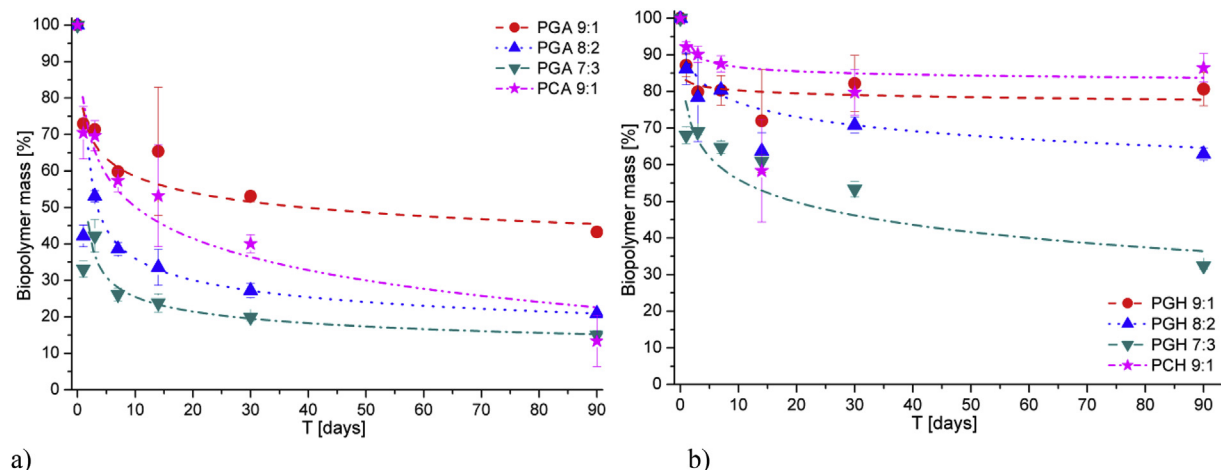


Fig. 2. Sample mass loss after biodegradation normalized to the biopolymer mass (biopolymer mass loss) a) AA/FA and b) HFIP.

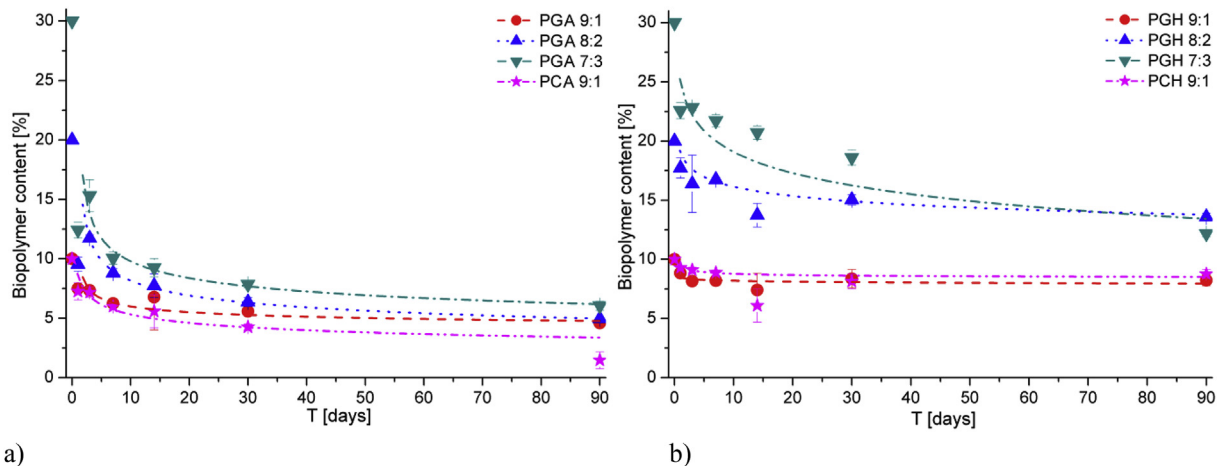


Fig. 3. Biopolymer mass content in materials from a) AA/FA and b) HFIP.

Acids (glacial acetic acid pure 99,5–99,5%, formic acid pure 98–100%) and sodium azide were purchased from Avantor PM Poland and Chempur respectively.

2.2. Solutions preparation

Two sets of polymer solutions which differed in used solvent were prepared. One with HFIP and the other with acetic acid and formic acid mixed in 9:1 ratio (AA/FA) being an alternative for fluorinated alcohols. Total polymer concentration were set on 5% w/w for solutions based on HFIP and 15% w/w for AA/FA mixture as optimized previously [8]. Each set consisted of solutions with PCL to gelatin weight content ratios 9:1, 8:2, 7:3, PCL to collagen 9:1, as well as pure PCL. All solutions were prepared by dissolution at room temperature by stirring for approximately 24 h on magnetic stirrer before electrospinning process.

2.3. Electrospinning process

The electrospinning equipment was operated in horizontal mode. It consisted of two syringe pumps (New Era Pump Systems, NE-1000 model and KD Scientific KDS-100-CE model) placed on the opposite sides of a grounded rotating drum collector (4 cm radius and 12 cm length). Two high voltage generators were connected with positive terminal to stainless steel needles. Distance between needles and collector was 15 cm, flow rate of solution on both sides was 600 $\mu\text{l/h}$

and inner diameter of needle was 0.34 mm. Regardless of a type of polymer solution being electrospun, voltage in a range 12–14 kV was used to obtain uniform fibers and to maintain stable electrospinning process. All materials were electrospun at similar temperature (22–24 °C) and humidity (50–55%). After electrospinning, all materials were placed under fume hood for 7 days to ensure no residual solvent remains in fibers before next experimental steps.

Table 1 clarifies abbreviated names of different types of investigated materials.

2.4. Biodegradation procedure

All materials were cut into large (3 × 5 cm) and small (1 × 2 cm) pieces. For each of time points: 0, 1, 3, 7, 30 and 90 days, sets consisted of 3 large and 1 small pieces of all material types were prepared. For 14 days biodegradation test 4 small samples were taken. Each piece of nonwoven was then inserted in separate glass bottle filled with PBS solution with 0,1% sodium azide concentration (to prevent bacterial and fungal activity), capped, secured with parafilm and placed in incubator in 37 °C.

After each time interval, samples were removed from incubator, rinsed briefly in demineralized water, then for thorough rinsing, they were put in glasses with demineralized water on shaker for 1 h. Next, samples were placed in vacuum dryer for at least 72 h to dry and those samples which were intended for mass loss analysis (three from each

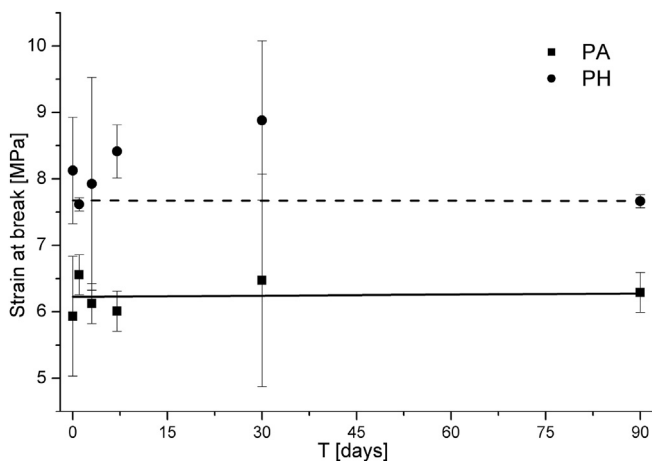


Fig. 4. The elongation stress at break for PCL samples vs. time of biodegradation experiment.

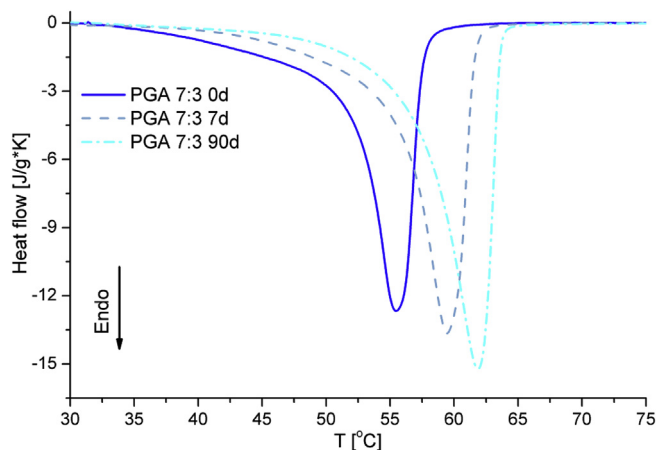


Fig. 5. Typical DSC thermograms of bicomponent fibers after various time of biodegradation.

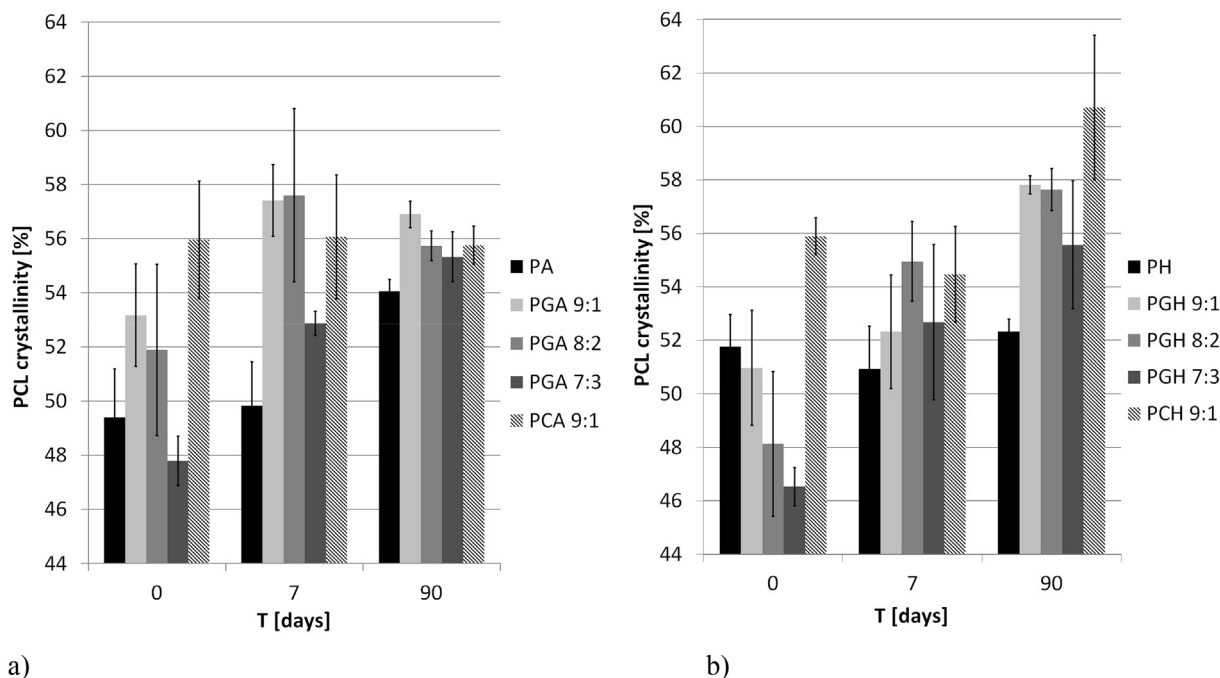


Fig. 6. DSC crystallinity of PCL throughout biodegradation of materials a) from AA/FA, b) from HFIP.

time point) were weighted immediately afterwards. All dried samples were stored in refrigerator until used for further tests.

A biodegradation process was determined by the degree of erosion estimated from measurements of polymer weight loss in PBS solution at 37 °C. The percentage of weight loss, $W_L\%$, was computed (eq. (1)):

$$W_L\% = \frac{100(W_0 - W_T)}{W_0} \quad (1)$$

where W_0 and W_T are the initial and the residual weight of the

specimen, respectively.

A molecular degradation was estimated only roughly from the elongation stress at break, considering the empirical formula derived by I. Ward [9] from which it is evident that the fracture strength of polymers can be related to the number-average molecular weight of the polymer, M_n (eq. (2)):

$$\sigma = \frac{\sigma_\infty - B}{M_n} \quad (2)$$

where σ is the fracture strength, σ_∞ is the fracture strength at

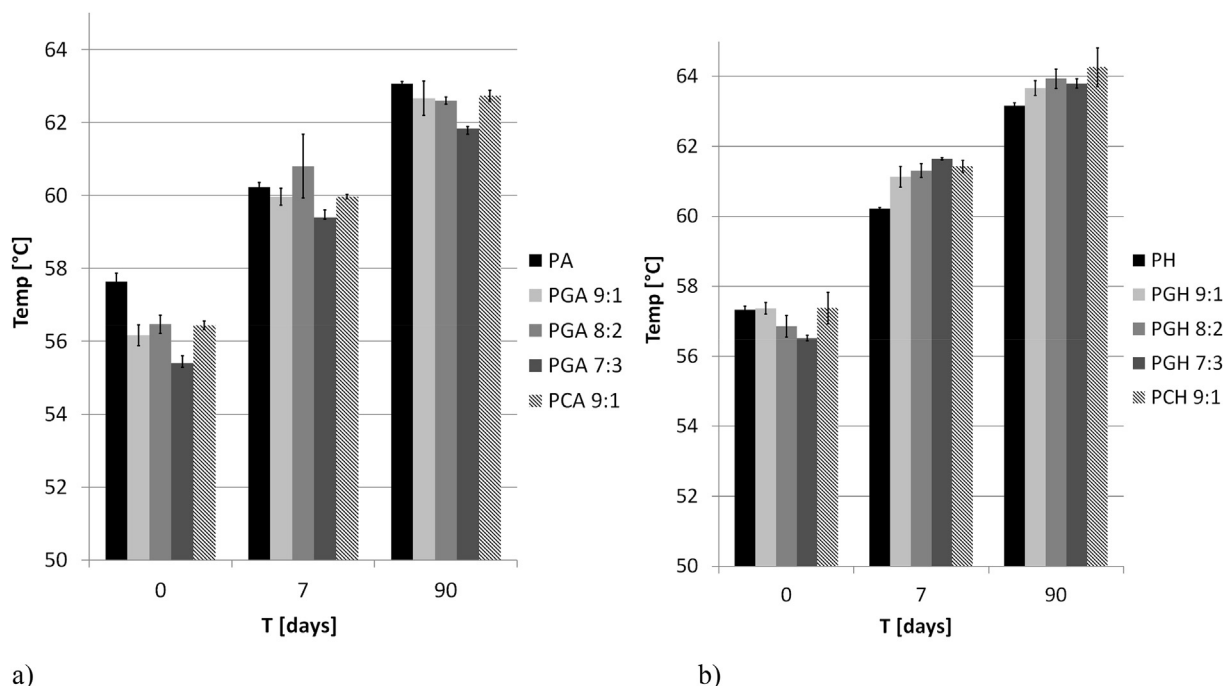


Fig. 7. DSC melting temperature at the peak throughout biodegradation of materials a) from AA/FA, b) from HFIP.

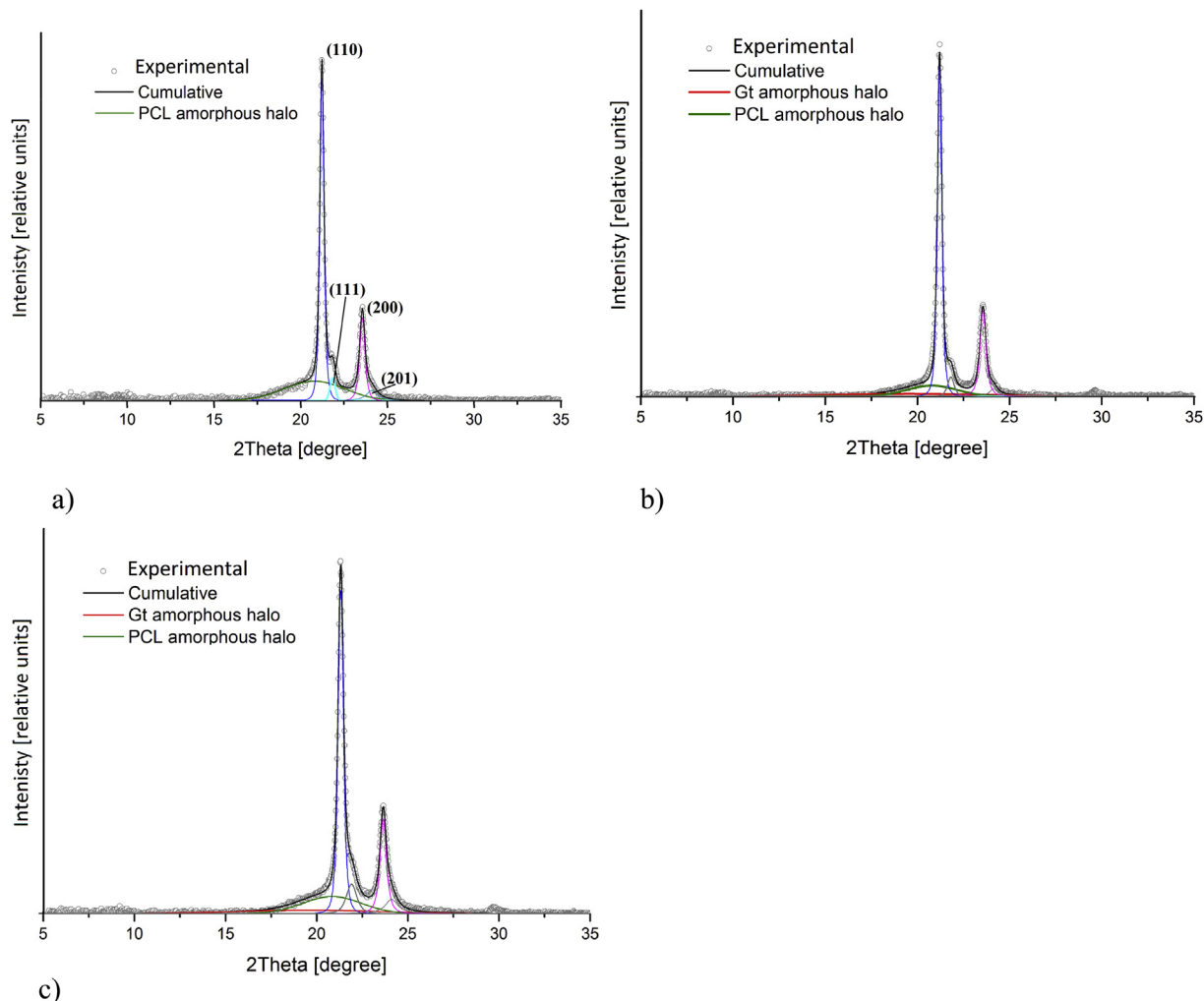


Fig. 8. WAXS profiles of PA (a), PGA 9:1 (b), and PCA 9:1 (c) nanofibers before biodegradation together with numerical deconvolution using Pearson VII function.

infinite molecular weight, and B is a constant. It has been evidenced experimentally that the measured fracture strength follows the same trend as the molecular weight [e.g. [10]].

2.5. DSC and WAXS analysis

Differential scanning calorimetry (DSC, Perkin-Elmer Pyris-1 apparatus), was used to determine PCL crystallinity. Samples weighted ca. 2 mg were heated at the rate 10 °C/min. Gas nitrogen was used as protective medium during measurements. Crystallinity of PCL was estimated (eq. (3)):

$$x_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \quad (3)$$

where x_c is crystallinity of PCL, ΔH_f – heat of a sample normalized to the mass of PCL while ΔH_f^0 is the specific heat of fusion of 100% crystalline PCL taken as 151.7 J/g [e.g. [11]].

Wide angle X-Ray scattering (WAXS) analysis was performed in order to provide supplementary information on a trend of changes of size of PCL crystals as a function of biodegradation time. WAXS measurements were done using Bruker D8 Discover diffractometer (CuK α radiation, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), “coupled theta – 2 theta” scans were done (source and detector were moving symmetrically while sample was fixed in the center of goniometric circle). In this type of scan,

divergent beam optics was used, with 1 mm primary linear slit and axial divergence Soller 2.5° on primary beam side. On the secondary beam side axial divergence Soller 2.5° was used as well, and Ni filter to exclude CuK β component. The results were initially analyzed using Bruker Evaluation software. The “empty” scan (scan of measuring table without sample) was subtracted and the default function of subtracting background was applied. Then the WAXS profiles were deconvoluted numerically with Pearson VII functions using Origin software. The half width of particular peaks was determined as full width at half maximum without subtraction of instrumental (beam) width.

2.6. FTIR analysis

Molecular conformation of gelatin and collagen in the fibers was analyzed by ATR-FTIR method using Thermo Scientific Nicolet 8700 spectrophotometer. Scans were performed in the range 400–4000 cm^{-1} . The analysis was focused on amide I and amide II bands, which are two major bands of the protein infrared spectrum, as well as band appearing at 1725 cm^{-1} for which carbonyl stretching of PCL molecules is responsible.

2.7. Surface characterization

Two major surface characteristics important to the scope of this research were hydrophilicity and morphology of materials. Water

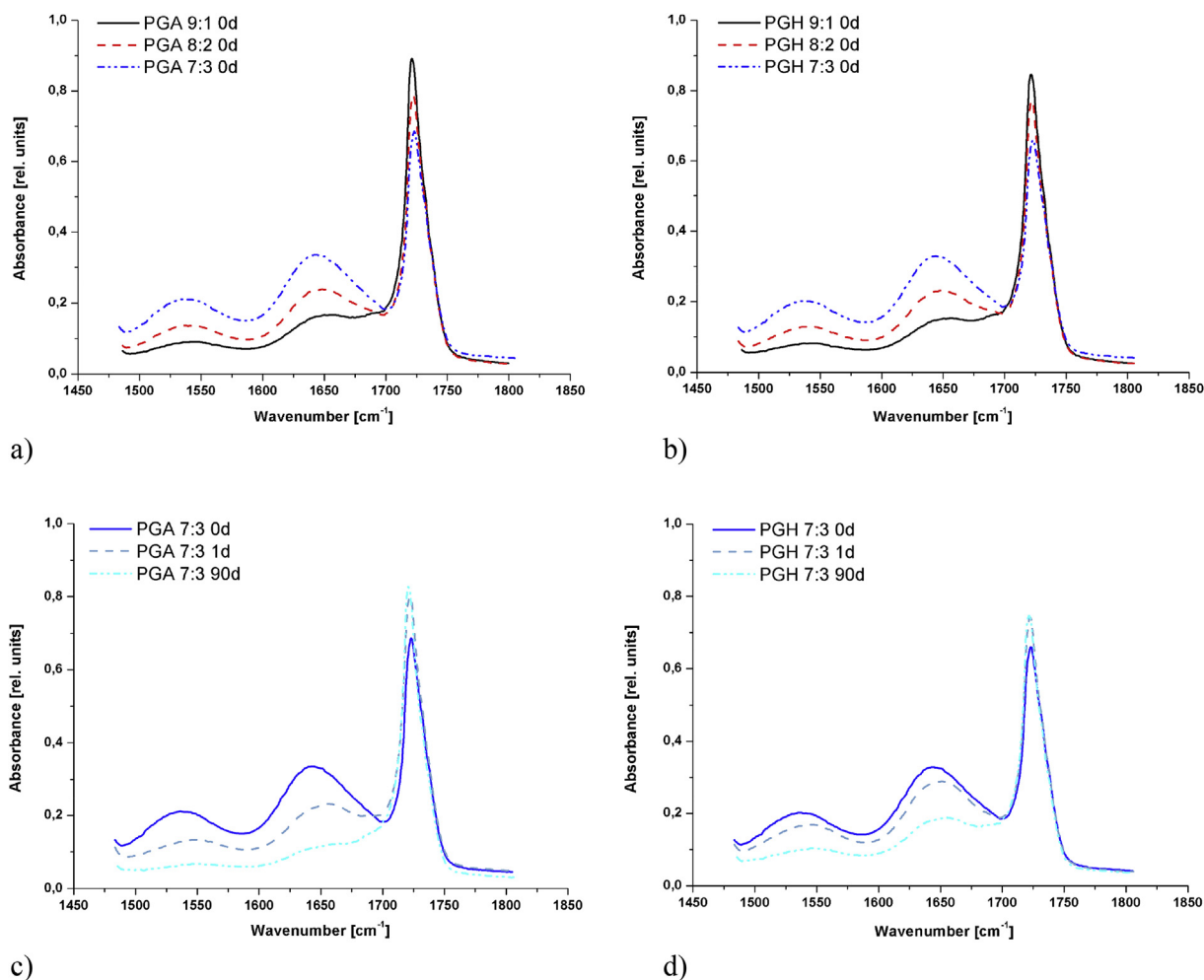


Fig. 9. FTIR spectra of PCL/gelatin samples, before (a, b) and during biodegradation (c, d).

contact angle was measured with goniometer (Contact Angle System OCA). Morphology of fibers was observed using scanning electron microscope imaging (JSM-6010PLUS/LV InTouchScope™ Jeol).

2.8. Mechanical tests

The mechanical properties of the materials were measured by a uniaxial testing machine (Lloyd EZ-50 equipped with handles for thin and delicate samples) with a 50 N load cell under a cross-head speed of 10 mm/min. Three 10 mm × 50 mm samples (10 mm × 25 mm outspread between handles being actually subjected for testing) were prepared for each material type. They thickness ranged from 50 to 80 μm, which was measured for each sample and included in further analysis. From the stress strain curves, Young's modulus, tensile strength, and elongation at break were determined. All measurements were performed on dry samples.

3. Results and discussion

3.1. Mass loss measurements

Considering no mass loss for pure PCL (Fig. 1 a, b) it is clear that the mass decrease observed for PCL/biopolymer samples comes from gelatin or collagen leaching only. Having that in mind several observations were made. First it is evident that regardless of the material, the rate of biopolymer leaching is the highest at the very

beginning and then decreases slowly under logarithmic law. It is naturally anticipated that the very fast biopolymer leaching is due to surface erosion following by much slower bulk erosion from the inner part of material. In general, the mass loss is faster for fibers spun from AA/FA than from HFIP which is most probably related to much stronger tendency to phase separation when using AA/FA solvent systems, as it was described in our previous paper [8], providing better exposition of gelatin to the PBS solution. Another interesting fact, which is evident when making normalization in eq. (1) to the biopolymer mass, is that for both solvent types, the higher the initial biopolymer content is, the faster is its leaching (Fig. 2 a, b). After 90 days of biodegradation, for PGH 9:1 there is 81% of gelatin mass left, while for PGH 7:3 it is only 32%. For PGA 9:1 and PGA 7:3 it is 43% and 15% respectively. While for PGH 9:1 and PCH 9:1 the rate of biopolymer degradation is similar, PCA 9:1 loses collagen much faster than PGA 9:1 does gelatin (13%–43% after 90 days) as Fig. 2 a shows clearly. From the point of view of a prospective application, where the presence of biopolymer is crucial for material's bioactivity and functionality, it is important to take notice of its overall content in a scaffold after prolonged biodegradation periods. Confrontation between materials electrospun from these two solvents shows higher content of retaining biopolymer of those from HFIP (Fig. 3 a, b). Both PGH 9:1 and PCH 9:1 end up after 90 days of experiment with not less than 8% of biocomponent overall mass in a sample, PGH 8:2 and PGH 7:3 with 12% and 14% respectively, while none materials from AA/FA are left with more than 6%.

Taking into account the leaching of biopolymer, estimation of molecular degradation from the stress at break was limited to the PCL. It is known that in general, polyesters molecular degradation occurs easily by hydrolysis of ester bounds [e.g. [12]]. However, in our time-scale of biodegradation experiment we did not observe any essential reduction of the stress at break of PCL (Fig. 4) indicating no molecular degradation of PCL. This result is consistent with previous observation done by Ref. [13] demonstrating no noticeable changes in molecular mass during 12 weeks of PCL immersion in PBS at similar conditions.

3.2. DSC and WAXS analysis

Fig. 5 illustrates typical DSC thermograms for some of the investigated compositions.

DSC thermograms of investigated materials show an endothermic peak in the temperature range between 30 and 65 °C, depending on a specific polymer content and type of solvent with no noticeable traces from phase transitions in gelatin as well as water evaporation. Figs. 6 and 7 show PCL crystallinity and melting temperature at the peak, respectively. It is evident from Fig. 6 that PCL crystallinity both for pure PCL samples and blended with gelatin increases in general with time of biodegradation approaching even 10% increase after 90 days of biodegradation. We explain this trend with the effect of time at elevated temperature (37 °C), providing conditions for higher molecular mobility allowing rearrangement of structure toward more equilibrium state. The question whether this crystallinity increase is realized by formation of new crystallites, usually small as a consequence of spatial restrictions, or by growth and perfecting of existing crystallites, can be answered using the results of melting temperature analysis (Fig. 6). It is seen in Fig. 6 that the temperature of melting increases consequently with time of biodegradation, which indicates according to the Hoffman-Weeks equation [Chan, C. H., Chia, C. H., & Thomas, S. (Eds.). (2014). *Physical Chemistry of Macromolecules: Macro to Nanoscales*. CRC Press.] an increase of size and/or perfection of crystallites. Similarly as for crystallinity, the change of melting temperature at the peak was consistent, all values gaining about 6° for all types of materials (AA/FA from around 56 °C–62 °C and for HFIP from 57 °C to about 63 °C). It should be aware that the conclusion about crystal size drawn from registered melting temperature can be loaded with an error related to thickening of crystals during heating.

In the case of PCL blended with collagen there is practically no tendency for increase of DSC crystallinity with biodegradation time (Fig. 2). We associate this fact with higher crystallinity of PCL before biodegradation when blended with collagen, providing thus smaller margin for possible increase of crystallinity during biodegradation. In our opinion, relatively high PCL crystallinity in the presence of collagen can be explained by higher hydrophobic interactions in this system as compared to PCL/gelatin system. Hydrophobic interactions are in general responsible for formation of more compact molecular

forms or aggregation of hydrophobes, in our case PCL, in order to minimize their exposition to hydrophilic molecules, in our case gelatin or collagen, naturally bounded with water. Such possible effect of strong hydrophobic interactions on PCL crystallinity in bicomponent fibers was discussed in our earlier paper [4]. It is seen in Fig. 5 that there is general tendency to approach the maximum PCL crystallinity at particular gelatin content, around 10%. Similar tendency to approach the local maximum of PCL crystallinity was observed in Ref. [4]. This particular content of gelatin corresponds with previously observed by us the limit of miscibility with PCL [14].

Fig. 8 illustrates typical WAXS profiles of pure PCL, PCL/gelatin as well as PCL/collagen nanofibers electrospun from AA/FA before biodegradation together with numerical deconvolution.

It is evident from Fig. 8 that diffraction from crystals comes only from PCL component, while both gelatin and collagen remain amorphous providing broad scattering with a maximum, respectively at $2\theta = 21$ deg for PCL and 17 deg for gelatin and collagen. The lack of diffraction from crystal structure of collagen indicates the denaturation in the solvents used. An increase of size/perfection of PCL crystals with biodegradation time as observed by DSC is supported by the analysis of the full width at half maximum (FWHM) of PCL (110) and (200) peaks for pure PCL nanofibers. Numerical deconvolution into particular components allows to estimate the full width at half maximum (FWHM) for PCL (110) and (200) peaks. For instance the reduction of FWHM, which is inversely proportional to the size/perfection of crystals in directions perpendicular to particular planes extends from 0.38 deg at 0 days to 0.33 deg at 3 months for (200) plane of PGH 7:3 samples. In the case of blended fibers this trend as observed from WAXS is not so evident, most probably because of additional effect of molecular interactions of PCL with biopolymer molecules.

3.3. FTIR results

There are three main bands in the range 1500–1800 cm^{-1} related to the amide I (1600–1700 cm^{-1}), amide II (1510–1580 cm^{-1}) and carbonyl vibrations of PCL molecules (1700–1750 cm^{-1}) (Fig. 9). The effect of the solvent on a structure of gelatin and collagen as deduced from FTIR spectra was within the scope of our recent investigations.

If we compare samples with various biopolymer content, both for AA/FA and HFIP, we can notice that with the increase of gelatin content, positions of both amides (I and II) shift towards lower values of wavenumber. Differences are small but consistent for both solvent systems (Table 2). We anticipate that this shift in amide I and II positions is related to the molecular interactions between polypeptides and polycaprolactone. Our previous results indicate very limited miscibility of gelatin and PCL [14]. Therefore, at the lowest gelatin content all molecules interact with PCL molecules resulting in a shift of amide peaks to higher values. An increase content of non-interacting gelatin molecules is expected with increasing gelatin content leading to lower amide positions.

Table 2
Positions and areas of amides I and II for bicomponent fibers at the starting point.

Sample at starting point (0d)	Amide I		Amide II	
	Position [cm^{-1}]	Area	Position [cm^{-1}]	Area
PGA 9:1 0d	1649,1	14,37	1536,6	11,87
PGA 8:2 0d	1647,5	22,09	1535,7	18,31
PGA 7:3 0d	1645,4	29,9	1534,2	25,7
PGH 9:1 0d	1649,4	13,05	1534,5	10,92
PGH 8:2 0d	1648,0	21,3	1534,4	17,36
PGH 7:3 0d	1646,1	29,2	1533,3	24,75

Table 3

Changes of the positions and areas of amides I and II for PGA 7:3 and PGH 7:3 in time function.

Sample in function of time	Amide I		Amide II	
	Position [cm^{-1}]	Area	Position [cm^{-1}]	Area
PGA 7:3 0d	1645,4	29,9	1534,2	25,7
PGA 7:3 1d	1651,0	18,33	1539,5	14,35
PGA 7:3 90d	1650,1	8,94	1540,1	7,96
PGH 7:3 0d	1646,1	29,2	1533,3	24,75
PGH 7:3 1d	1649,1	25,6	1536,3	20,84
PGH 7:3 90d	1649,6	15,52	1537,8	12,05

Fig. 9 c,d that characterize only PCL/gelatin 7:3 nonwovens proves faster gelatin leaching from AA/FA samples what is evident from more rapidly diminishing areas of amide I and II with time of biodegradation. This result correlates with results of mass loss tests (Fig. 1). Additionally, we can deduce slight renaturation of gelatin during biodegradation. This conclusion is drawn from the slight shift of amide II position to higher wavenumbers with time of biodegradation (Table 3). The decrease of wavenumber of amide II band was observed first by Bradbury et al. during denaturation of collagen [15].

3.4. SEM imaging

SEM imaging shows that all of nonwovens electrospun from both solvents have similar morphology. For pure PCL samples it does not change even after 90 days of biodegradation experiment (Fig. 10) which is consistent with no mass reduction. The comparison between images of bicomponent nanofibers spun from alternative solvents and from HFIP during biodegradation for which biopolymer leaching is observed, shows distinctive differences on their surface (Fig. 11).

The images shown in Fig. 11 reveal linear groove-like sites visible on the surface of PGA fibers after just 1 day of biodegradation being most probably vestiges left by leached gelatin. Such

outcome can be explained by non-uniform distribution of biopolymer, that is present in a form of strings within fibers, due to emulsive character of solution from alternative solvent mixture as it was evidenced previously [8]. Contrary to this, the surface of PGH fibers stay smooth and unaffected even after 90 days and substantial gelatin loss (only 32% of biopolymer mass remaining), which can be attributed to molecular dispersion of both components. While Fig. 11 compares samples with the highest amount of gelatin, materials with lesser biopolymer content exhibit smaller surface erosion caused by biopolymer leaching, which reflects the extent gelatin/collagen loss.

3.5. Contact angle

Gelatin and collagen loss from the fiber surface results in increasing hydrophobicity in time, what was measured by water contact angle tests (Fig. 12). Although the data scattering is high, the tendency of increasing hydrophobicity is clear. The nonwovens with higher gelatin content in the beginning of biodegradation experiment exhibit lower contact angles, that increase over time. This trend is more pronounced for PCL/gelatin and PCL/collagen from HFIP, because of lower contact angles before biodegradation. After 90 days of experiment all materials, except for PGH 7:3 have contact angle around 130° .

3.6. Mechanical tests

Fig. 13 illustrates stress/strain curves for some of the investigated samples under uniaxial drawing.

Irrespective of the nonwovens, the general shape of stress/strain curves of investigated materials contains two stages - the first one is a linear elastic Hookean response followed by a non-linear plastic behavior finished with a sample rupture. Further analysis was focused on the Young modulus determined from the initial portion of the plot, approximated with linear function. This is because of the expected effect of the mechanical stiffness on the behavior of cells during further cultivation on scaffolds as deduced from literature [e.g. 16, 17].

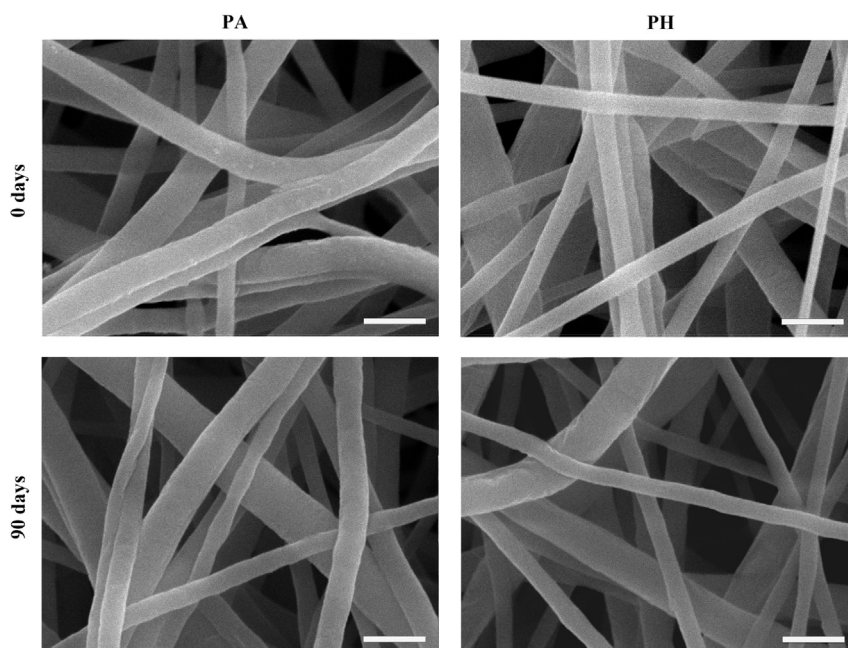


Fig. 10. SEM images of pure PCL nonwovens from AA/FA (PA) and HFIP (PH), before (0d) and after 90 days of biodegradation. 1 μm marker.

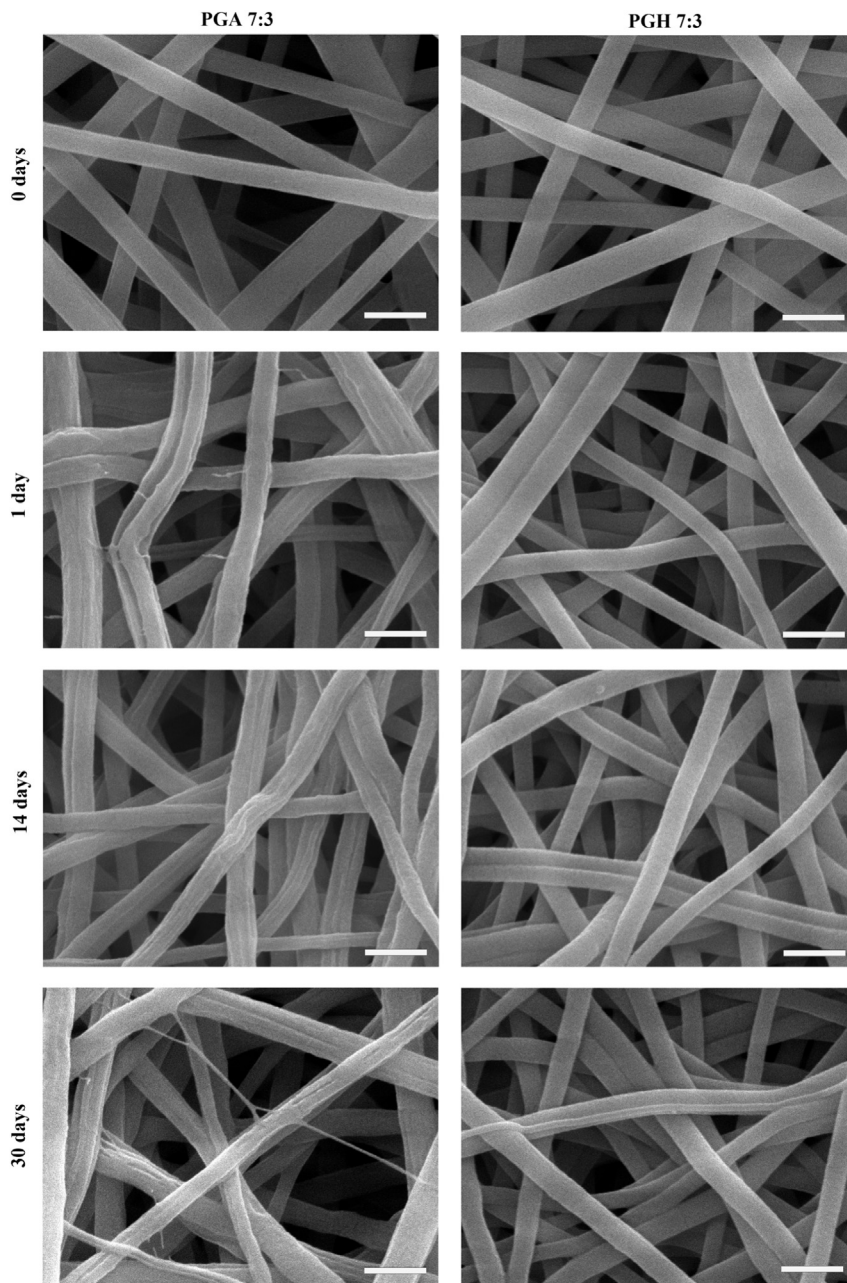


Fig. 11. SEM images of PGA 7:3 and PGH 7:3 before (0 days) and after 1 day, 14 and 30 days of biodegradation. 1 μm marker.

The analysis of Young's modulus values (Fig. 14) shows that the general trend for bicomponent fibers is the local maximum at a very short time of biodegradation followed by a slight decrease at longer time. Such trends were observed for both PCL/gelatin and PCL/collagen samples. We suppose that collagen is most probably hydrolyzed to gelatin, at least partially, during electrospinning. Such collagen denaturation during electrospinning in various solvents was reported previously in the literature [e.g. 18, 19]. Our FTIR results show clearly a reduction of wavenumber of amide II band from 1542 cm^{-1} for collagen as received (lyophilized) or in 0.1 M AA to 1522 cm^{-1} for collagen electrospun from HFIP and AA/FA. According to Bradbury et al. [15] this shift is an evidence of collagen denaturation. Additionally as it was mentioned earlier we do not register for electrospun samples any X-ray diffraction from crystal structure typical for triple-helix collagen arrangement

(Fig. 8c).

We see several processes being responsible for the observed changes of Young's modulus. Two of them are expected to reduce modulus during biodegradation experiment while the two others act in the opposite direction. The factors responsible for modulus reduction is the loss of the biopolymer which has higher modulus than PCL as well as the molecular degradation of PCL. Since there is practically no molecular degradation of PCL in the time-scale of our experiment, the biopolymer leaching factor is the only one responsible for the modulus reduction during biodegradation. On the other hand, two factors acting toward increase of modulus is a renaturation of gelatin in aqueous environment, as deduced preliminary from our FTIR experiments, as well as increase of PCL crystallinity as registered by DSC. The significance of crystallinity for increase of modulus is evident for pure PCL for which general

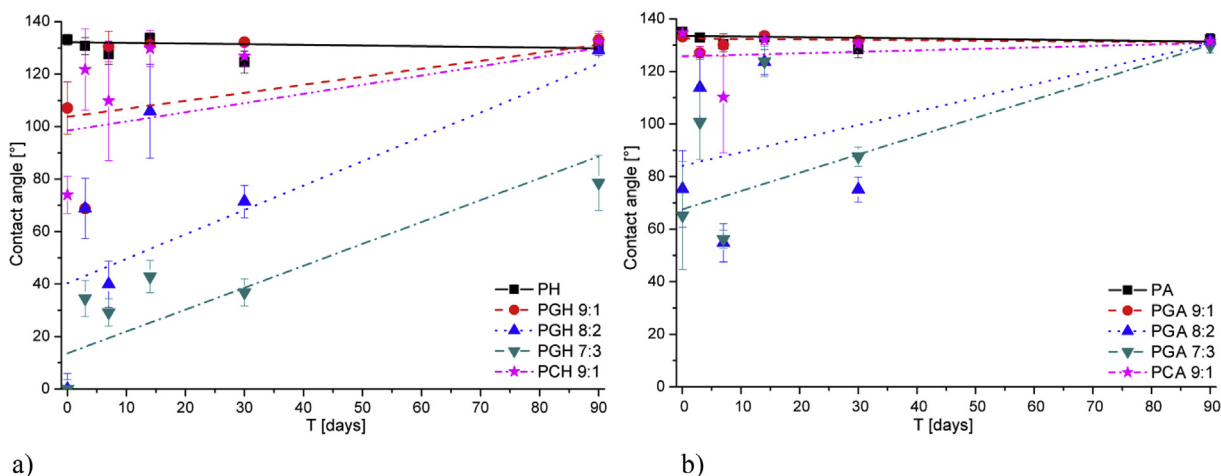


Fig. 12. Water contact angle of samples from a) AA/FA, b) HFIP vs. time of biodegradation.

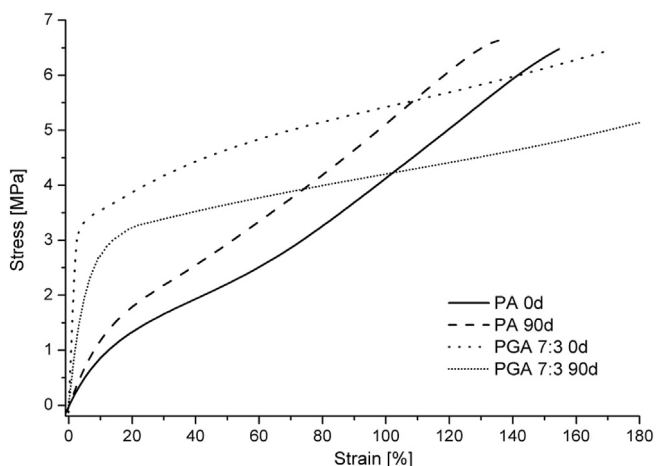


Fig. 13. Exemplary stress/strain curves of pure PCL and PCL/gelatin blends from AA/FA samples before (0d) and after biodegradation (90d).

tendency to increase modulus with time of biodegradation (crystallinity) is observed (Fig. 14).

The contribution of the gelatin renaturation was estimated from

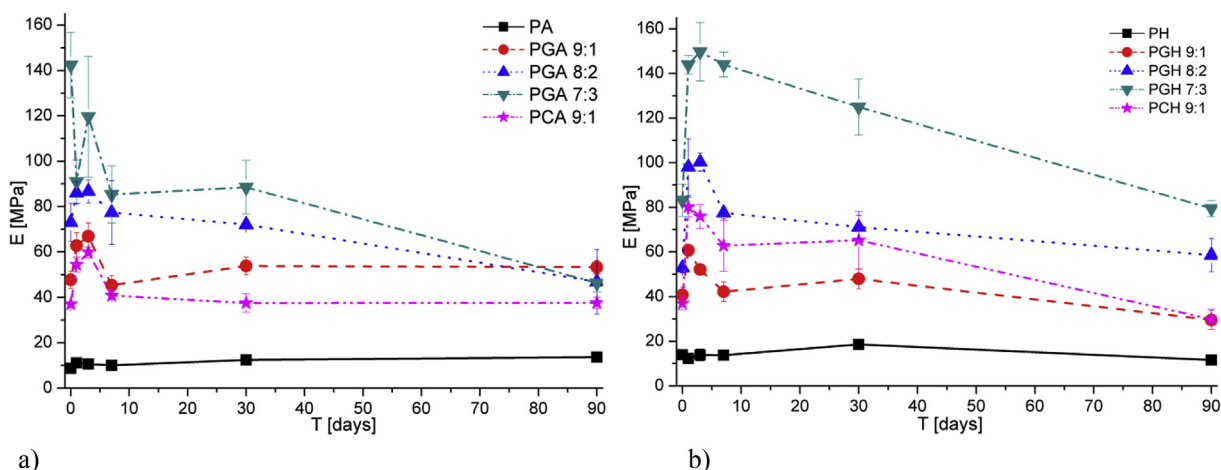


Fig. 14. Young's modulus of samples from a) AA/FA, b) HFIP vs. time of biodegradation.

the comparison of experimental modulus of bicomponent fibers with the modulus calculated excluding renaturation process during biodegradation, E_{hyp} . The value of E_{hyp} was determined using the modulus of PCL measured experimentally directly for pure PCL fibers at particular time of biodegradation, E_{PCL} , the modulus of biopolymer determined from the modulus of bicomponent fibers before biodegradation, E_{bio} , and the actual content of both components, x_{PCL} and x_{bio} , determined from the mass loss experiment. The calculation of hypothetical modulus, E_{hyp} , without renaturation of biopolymer was performed assuming the Voigt model (rule of mixture):

$$E_{hyp} = E_{PCL}x_{PCL} + E_{bio}x_{bio} \quad (4)$$

which is usually used for estimation of modulus of composite materials made up of continuous fibers. Our nonwovens are composed of nanofibers arranged randomly at the start of elongation, however it is clear from Fig. 11 that single nanofibers can be treated as a composite consisting of strands of two components – crystalline PCL and amorphous biopolymer. This is particularly evident for bicomponent nanofibers spun from AA/FA for which clear component separation leading to macro-emulsion is observed. So, the Voigt model seems to be some simplification which is sufficient for the sake of analysis of modulus with the time

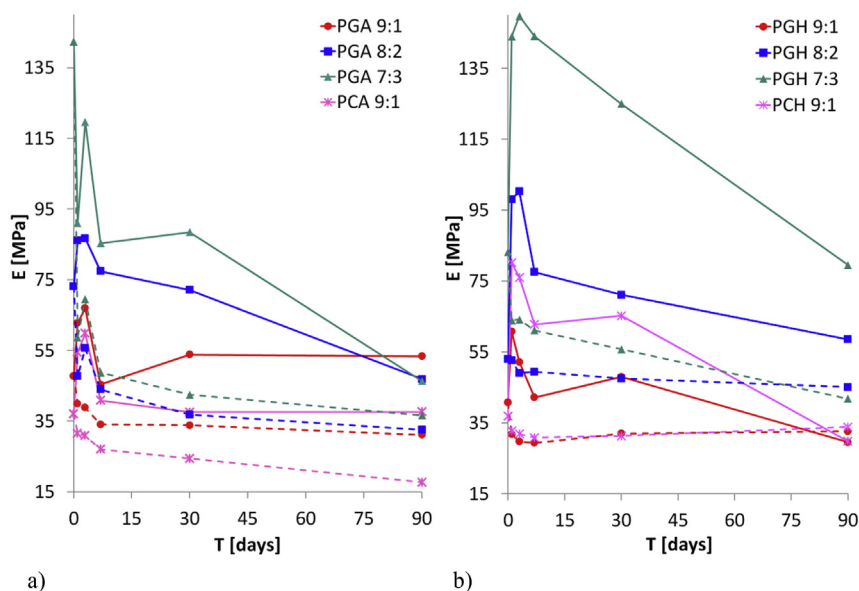


Fig. 15. Experimental Young's modulus (solid lines) and calculated values without considering the renaturation process (dashed lines) of bicomponent fibers a) from AA/FA, b) HFIP.

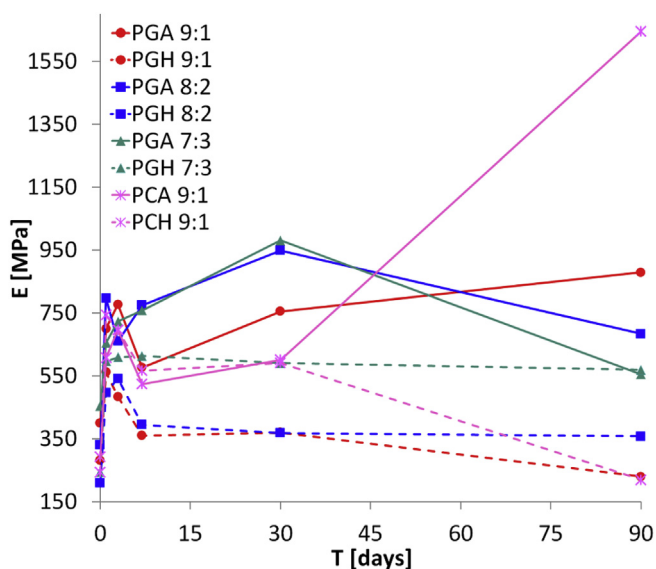


Fig. 16. Young's modulus of gelatin calculated using Voigt model from the experimental modulus of bicomponent fibers taking the actual PCL modulus and polymer content.

of biodegradation.

The value of E_{bio} (eq. (4)) was determined using Voigt model for the material before biodegradation and taking the experimental values of the modulus of bicomponent fibers on the left side of eq. (4) at the appropriate x_{PCL} and x_{bio} . Fig. 15 shows the experimental Young's modulus of bicomponent fibers and that calculated without the renaturation process. We include the data for collagen considering its former denaturation during contact with solvents used for electrospinning.

It is seen from Fig. 15, that the experimental modulus is much higher than the modulus calculated using the modulus of gelatin before the start of biodegradation. We claim that this difference is caused by renaturation of gelatin in water environment. Fig. 16 shows the changes of the modulus of gelatin determined using the Voigt model from the experimental modulus of bicomponent

fibers with the actual PCL modulus and polymer content. We added data for collagen as in Figs. 14 and 15.

It is evident from Fig. 16 that the modulus of gelatin increases about three times during biodegradation experiment most probably because of renaturation. At the moment, we leave without additional comments the larger increase of biopolymer modulus in nanofibers with relative low biopolymer content spun from AA/FA, particularly at very long biodegradation time of PCA fibers (Fig. 16). It is seen in Fig. 16 that the average value of gelatin modulus was higher for fibers spun from AA/FA solvent than from HFIP. Based on our previous investigations, it can be explained by differences in a structure of polypeptides formed from various solvents.

Additional examination of values of the stress at break (not shown) from both solvents shows no significant changes over biodegradation time. The only large difference in stress at break was observed as a function of the solvent systems, being even two times higher for bicomponent fibers spun using HFIP as compared to those formed from AA/FA. This difference is most probably related to different fibers structure, being more irregular for materials treated with AA/FA and rather homogeneous when using HFIP as a solvent.

4. Conclusions

Despite the fact that bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvents (AA/FA) have similar morphology to those electrospun from commonly employed perfluorinated alcohols, they differ in the internal structure which seriously affects biodegradation process. Comparative analysis of long-term biodegradation brought understanding of how properties of bicomponent materials' formed from different solvents change in time under in-vitro conditions. Used environment is supposed to mimic living organism, so our investigations can be easily related to specific fibers application (eg. as wound healing, scaffolds, drugs delivery.)

Biodegradation of investigated materials is manifested mainly by the gelatin leaching (also in the case of original collagen which is denaturated to gelatin during electrospinning) leading to nanofibers erosion, particularly large for nanofibers spun from AA/FA. There is no molecular degradation of PCL during 90 days of

biodegradation procedure as deduced from the elongation stress at break. The rate of biopolymer leaching is very fast from all materials during the first 24 h of biodegradation, being related to surface leaching, followed by a slower rate stage from deeper material layers. The observation that the collagen mass loss is comparable with gelatin loss supports conclusion on collagen denaturation during electrospinning. Mass measurements show much faster biopolymer leaching from nanofibers electrospun from AA/FA than from HFIP leading to the higher water contact angles and lower Young's modulus values than for nanofibers spun from HFIP. As it appears from SEM analysis, in the case of nanofibers spun from AA/FA biopolymer is present in a form of strings being more exposed for leaching than in the case of molecular dispersion for nanofibers electrospun from perfluorinated alcohols. Such structure of fibers is a result of emulsive character of solutions from alternative solvent mixture (AA/FA). As a result of fast biopolymer leaching, the fibers from alternative solvents have more developed surface due to the local erosion of the original surface. It cannot be excluded that such extra-development of surface will be beneficial for cell adhesion during in vitro experiments. However, from the other side higher loss rate of biopolymer from AA/FA materials leads to lower content of biopolymer. The results of mechanical analysis indicate the complex mechanism of changes of Young modulus during biodegradation experiment. The general trend of reduction of modulus with time of the experiment is dominated by the loss of biopolymer which has modulus tens of times larger than PCL modulus. However this modulus reduction is lower than expected from the biopolymer loss because of partial renaturation of gelatin.

Acknowledgement

This work was funded by the Polish National Science Center (NCN) under the Grant No.: 2013/09/B/ST8/03463.

References

- [1] N.S. Binulal, A. Natarajan, D. Menon, V.K. Bhaskaran, U. Mony, S.V. Nair, PCL-gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid-ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering, *J. Biomat. Sci.-Polym. E* 25 (4) (2014) 325–340.
- [2] S. Heydarkhan-Hagvall, K. Schenke-Layland, A.P. Dhanasopon, F. Rofail, H. Smith, B.M. Wu, R. Shemin, R.E. Beygui, W.R. MacLellan, Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering, *Biomaterials* 29 (19) (2008) 2907–2914.
- [3] S. Gautam, A.K. Dinda, N.C. Mishra, Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (3) (2013) 1228–1235.
- [4] D. Koibuk, P. Sajkiewicz, K. Maniura-Weber, G. Fortunato, Structure and morphology of electrospun polycaprolactone/gelatin nanofibres, *Eur. Polym. J.* 49 (8) (2013) 2052–2061.
- [5] K. Ceonzo, A. Gaynor, L. Shaffer, K. Kojima, C.A. Vacanti, G.L. Stah, Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation, *Tissue Eng.* 12 (2) (2006) 301–308.
- [6] H.J. Sung, M. Carson, C. Johnson, Z.S. Galis, The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis, *Biomaterials* 25 (26) (2004) 5735–5742.
- [7] E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12 (1996) 697–715.
- [8] P. Denis, J. Dulnik, P. Sajkiewicz, Electrospinning and structure of bicomponent polycaprolactone/gelatin nanofibers obtained using alternative solvent system, *Int. J. Polym. Mater.* 64 (7) (2015) 354–364.
- [9] I. Ward, *Mechanical Properties of Solid Polymers*, second ed., Wiley & Sons, Chichester, UK, 1983.
- [10] A.C. Vieira, J.C. Vieira, J.M. Ferra, F.D. Magalhães, R.M. Guedes, A.T. Marques, Mechanical study of PLA-PCL fibers during in vitro degradation, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4 (3) (2011) 451–460.
- [11] A. Wurm, E. Zhuravlev, K. Eckstein, D. Jehnichen, D. Pospiech, R. Androsch, B. Wunderlich, C. Schick, Crystallization and homogeneous nucleation kinetics of poly(*ε*-caprolactone) (PCL) with different molar masses, *Macromolecules* 45 (9) (2012) 3816–3828.
- [12] M.A. Woodruff, D.W. Huttmacher, The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (10) (2010) 1217–1256.
- [13] E. Diaz, I. Sandoniz, M.B. Valle, Vitro degradation of poly(caprolactone)/nHA composites, *J. Nanomater.* 2014 (2014). Article ID 802435, <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2014/802435/>.
- [14] D. Koibuk, P. Sajkiewicz, P. Denis, E. Chojińska, Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility, *Bull. Pol. Acad. Sci. Tech. Sci.* 61 (3) (2013) 629–632.
- [15] E.M. Bradbury, R.E. Burge, J.T. Randall, G.R. Wilkinson, The polypeptide chain configurations of native and denatured collagen fibres, *Discuss. Faraday. Soc.* 25 (1958) 173–185.
- [16] B.N. Mason, J.P. Califano, C.A. Reinhart-King, Matrix stiffness: a regulator of cellular behavior and tissue formation, in: *Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine*, 2011, pp. 19–37. Chapter 2.
- [17] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, L. Tian, E. Shamirzaei-Jeshvaghani, L. Dehghani, S. Ramakrishna, Structural properties of scaffolds: crucial parameters towards stem cells differentiation, *World J. Stem Cells* 7 (4) (2015) 728–744.
- [18] D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S. Yew, A.K. Ekaputra, Y.W. Tong, L.Y. Yung, D.W. Huttmacher, C. Sheppard, M. Raghunath, Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* 29 (15) (2008) 2293–2305.
- [19] T. Liu, W.K. Teng, B.P. Chan, S.Y. Chew, Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: synthesis, characterization and neural stem cell interactions, *J. Biomed. Mater. Res. A* 95 (1) (2010) 276–282.



Macromolecular Nanotechnology

The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres

Judyta Dulnik, Dorota Kołbuk, Piotr Denis*, Paweł Sajkiewicz

Laboratory of Polymers and Biomaterials, Institute of Fundamental Technological Research, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5B, 02-106 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cellular tests
Electrospinning
Biopolymers
Viscosity
Solvents

ABSTRACT

Bicomponent polycaprolactone/gelatin and polycaprolactone/collagen fibres were formed by electrospinning using two kinds of solvents: a representative of commonly used solvents with this polymer composition, highly toxic hexafluoroisopropanol (HFIP) and alternative, less harmful one, the mixture of acetic (AA) and formic (FA) acids. Both material types were subjected to investigations of structure and in-vitro cellular activity. Viscosity and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements shown that the type of solvent used influences the structure of solution and conformation of polymer molecules. In-vitro quantitative tests as well as cell culture morphology observations proved that materials electrospun with the use of ‘green’ solvents can yield similar results to those obtained by made with toxic ones. Slightly better cellular response to materials electrospun from HFIP can be explained by relatively well dispersed components within the fibre and more expanded conformation of molecules, resulting in better exposition of RGD (Arg-Gly-Asp) binding sites to cells’ integrin receptors.

1. Introduction

Electrospinning is an effective method for the formation of nano- and submicron fibres from many polymers, which offers much diversity of results depending on a number of variables. Electrospun materials are used for a variety of applications, among which creation of scaffolds for tissue engineering is one of the most important.

It might seem that the main advantage of nanofibrous materials is their morphological similarity to the extracellular matrix, but without mimicking mechanical and chemical characteristics of the tissue they are employed to replace or support we only waste our resources. Choosing a material pair consisting of a synthetic biodegradable polymer and a polypeptide is a good starting point, from where only a systematic and careful optimization can lead to a desired goal.

In the most common case of electrospinning from polymer solutions, a solvent is a component which is as much important in the whole material system as polymer composition is. The choice of a solvent is significant for a few reasons.

The first one is related to the effect of a solvent used in electrospinning on solution spinnability. It is well recognized that the properties of solvents, such as dielectric constant or boiling temperature, can strongly affect both the electrospinning process, as well as material final morphology, fibre roughness and diameter. There is relatively a large number of papers devoted to such effects [1–6].

The second implication, which is much less described in the literature, is related to the effect of a solvent on the viability of cells cultured on scaffolds. Most of the papers indicating such relationship focus directly on the effect of possible solvent residues on cells’ behaviour, suggesting supposed cytotoxicity of materials with even ppm traces of some solvents like HFIP [e.g. 7,8]. In the case of bicomponent materials, the understanding of solvent interaction with both polymers’ molecules, which may affect cells’ response to the resulting scaffold material, is yet to be covered.

The last aspect worth taking into consideration, is that the right choice of a solvent may substantially reduce the cost or/and operators’ exposure to harmful, toxic fumes.

The aim of this paper is to both investigate what influence a solvent used for electrospinning of bicomponent fibres has on their biological activity as well as explain the mechanisms that stand behind it. To do so, we compare the results of two material types, blends of polycaprolactone with either gelatin or collagen, one obtained with the use of a conventional perfluorinated alcohol solvent, the other with an alternative, less toxic one. A set of quantitative in-vitro cellular studies, scanning electron microscopy (SEM) morphology observations and fluorescence imaging will provide us with enough information to achieve the first goal. Analysis of viscosity measurements of polymer solutions and with FTIR results will let us understand the origin of the outcome of cellular experiments.

* Corresponding author at: Institute of Fundamental Technological Research, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5B, 02-106 Warsaw, Poland.

E-mail addresses: jdulnik@ippt.pan.pl (J. Dulnik), dkolbuk@ippt.pan.pl (D. Kołbuk), pdenis@ippt.pan.pl (P. Denis), psajk@ippt.pan.pl (P. Sajkiewicz).

Our investigation is motivated by the fact that every solvent interacts on a molecular level with polymer molecules determining not only solubility of polymers but also their molecular conformations. This fact can be crucial for biological activity of molecules which contain specific sequences for cell attachment like collagen or gelatin with their Arg-Gly-Asp (RGD) sequences. We suppose that the availability of RGD sequences for integrin ligands from cell membranes will depend strongly on molecular conformation of polypeptides. Additionally, in the case of polypeptides, there is a problem of denaturation with the extent which could depend also on a solvent used.

When dealing with bicomponent fibres situation becomes even more complex because of mutual molecular interactions not only between polymer and a solvent but also between both polymers. It was shown in one of our previous papers [9] that the internal structure of a system depends greatly on a strength of a solvent leading to relatively homogeneous blend in the case of strong solvent (HFIP) and to components separation (emulsion) when relatively weak solvent is used (mixture of acetic and formic acid). This fact has additionally significant implications for the kinetics of polypeptides leaching from fibres what was shown previously [10].

We hope to answer the question of how the replacement of conventionally used solvents with the alternative one in electrospinning of fibres of such material composition affects their possible use in tissue engineering. To resolve this issue, it is necessary to balance not only the raw numerical results, but also convenience, utility and environmental aspect of employment of a particular solvent.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Acids (glacial acetic acid pure 99.5–99.9% (AA), formic acid pure 98–100% (FA)) were purchased from Avantor PM Poland and Chempur, respectively. Collagen Type I lyophilized from calf skin was purchased from Elastin Products Company, Inc. PCL (Mn = 80,000 g/mol), gelatin from porcine skin Type A (gel strength ~ 300 g Bloom), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), Triton X-100, trypan blue solution, paraformaldehyde, glutaraldehyde, hexamethyldisilazane (HDMS) and Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT reagent) were purchased from Sigma-Aldrich Co. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS, no calcium, no magnesium), penicillin-streptomycin antibiotic (10,000 U/mL), fetal bovine serum, trypsin, NucBlue and ActinGreen (Molecular Probes, fluorescent dyes), CyQuant and PrestoBlue (DNA and cell viability tests) were purchased from Thermo Fisher Scientific. CellTiter-Glo® Luminescent Assay was purchased from Promega.

2.2. Samples names

Samples were named as follows:

P stands for polycaprolactone, G for gelatin, C for collagen, H for hexafluoroisopropanol, and A for a mixture of acetic and formic acid (AA/FA) that were used. As an example, PGA indicates a sample consisting of polycaprolactone and gelatin prepared using acids. If necessary, additional information is provided in text or in descriptions of figures.

2.3. Solutions preparation

Polymer solutions for electrospinning materials for cell studies were prepared by dissolution at room temperature by stirring for approximately 24 h on magnetic stirrer before electrospinning process. Total polymer concentrations were set on 5% w/w for solutions based on HFIP and 15% w/w for AA/FA mixture as optimized previously [9]. Each set consisted of solutions with PCL to gelatin content ratios 9:1, PCL to collagen 9:1 and pure PCL as a reference material. For FTIR

measurements, solutions of pure gelatin and collagen for electrospinning were made with polymer concentrations alike stated above.

2.4. Electrospinning

The electrospinning equipment was operated in horizontal mode. It consisted of two syringe pumps (New Era Pump Systems, NE-1000 model and KD Scientific KDS-100-CE model) placed on the opposite sides of a grounded rotating drum collector (4 cm radius and 12 cm length). Two high voltage generators were connected with positive terminal to stainless steel needles to provide doubled efficiency of electrospinning process. Distances between needles and collector were 15 cm, flow rate of solution on both sides was 600 $\mu\text{l/h}$ and inner diameter of needles was 0.34 mm. Except for pure gelatin and collagen, which required higher voltage during electrospinning, around 17 kV, solutions were electrospun with voltage in a range 11–14 kV, which was optimal to obtain uniform fibres and to maintain stable electrospinning process. All materials for cell studies were electrospun at similar temperature (22–24 °C) and humidity (45–55%). Pure gelatin and collagen, being more sensitive to changes in ambient conditions than PCL or its blends with biopolymers, required temperature stabilized at 24 °C and humidity not lower than 55%. Right after electrospinning all materials were placed under a fume hood to ensure no residual solvent remains in fibres before next experimental steps.

2.5. Solution viscosity measurements

For viscosity measurements, performed using rotational viscometer Brookfield HADV-III Ultra with cone/plate configuration, a series of solutions were prepared with polymer concentrations 5% and 15% w/w for AA/FA and 5% w/w for HFIP. Polymer ratios ranged from 100% PCL to PCL to gelatin 3:1 with an increment of 5% with an addition of 100% gelatin solution. A detailed information concerning polymer concentrations and PCL to gelatin ratios can be found in Table 1.

Additionally a set of biopolymer solutions with both types of solvents were prepared in four concentrations: 1.6%, 3.3%, 5% and 6.8%. Relatively low concentrations of gelatin and collagen in both acids and HFIP had very low viscosities. To measure it, much higher rotation speeds were required which meant higher shear rates in cone-plate configuration, compared to normally used 40 s^{-1} , chosen previously and explained in details in authors earlier publication [9]. That was the reason to use 300 s^{-1} shear rate, which applied to all gelatin and collagen solutions.

In the case of pure collagen and gelatin which are biologically active polymers, we tried to deduce the differences in molecular conformation of both polypeptides in both solvent systems. Such comparison is possible using Mark-Houwink (M-H) equation:

$$[\eta] = KM^a \quad (1)$$

in which M is the polymer molecular mass, K and a are constants dependent on polymer-solvent interactions and temperature, $[\eta]$ is the intrinsic viscosity defined as the limit of the reduced viscosity, η_{red} at

Table 1
Viscosity of PCL/Gt solutions using AA/FA (5% and 15% w/w) and HFIP (5% w/w) at the shear rate 40/s.

PCL content, %	Viscosity, Pa s		
	AA/FA 15%	HFIP 5%	AA/FA 5%
100	4.305	1.056	0.0642
95	4.187	1.081	0.0606
90	3.492	1.073	0.0557
85	3.424	0.977	0.0509
80	3.212	0.812	0.0472
75	3.131	0.91	0.0412
0	1.056	0.192	0.0157

zero polymer concentration, c :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{red}) = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \cdot c} \quad (2)$$

where η is viscosity at various polymer concentrations, while η_0 is solvent viscosity, taken as 1.65 cP for HFIP [11] and calculated from additivity rule as 1.25 cP for applied AA/FA blend, assuming $\eta_0 = 1.19$ cP for AA [12] and 1.79 cP for FA [13]. This value was confirmed by direct viscosity measurements of acids, resulting in 1.26 cP for this particular AA/FA mixture. Intrinsic viscosity was determined by numerical extrapolation of experimental points to zero polymer concentration using linear function. Deduction of molecular conformation differences of polypeptides in both solvent systems was based on the value of exponent a in M-H equation, which is strongly dependent on polymer-solvent interactions. Considering that the parameter a has better correlation with molecular conformation than K parameter in M-H equation, K was assumed as constant. In such case, Eq. (1) for both solvent systems, can be subtracted one from the other, resulting in Eq. (3) allowing determination of a difference of the exponents a for both solvents, 1 and 2:

$$(a_1 - a_2) = \frac{\ln([\eta]_1 / [\eta]_2)}{\ln M} \quad (3)$$

The exponent a in M-H equation has well defined physical meaning. Its value varies from 0 to 2, depending on the molecular conformation of polymers which in turn is affected by polymer-solvent interactions [14]. In a good solvent the molecule is exposed to the solvent resulting in fairly loosely extended conformation with the M-H a constant between 0.5 and 0.8 and high intrinsic viscosity. In a poor solvent, segments of a polymer molecule attract each other more strongly than the surrounding solvent molecules. As a consequence, the polymer molecule assumes more compact conformation, resulting in lower intrinsic viscosity and lower values of a in M-H equation, approaching 0 for spherical conformation. For a rigid rod like polymer molecule that is greatly extended in solution, the M-H a constant is high tending to approach a value of 2.0.

We suppose that the conformation of polypeptides deduced from the above procedure should be independent of whether the polypeptides molecules are alone or they are mixed with PCL molecules. According to our previous results [16] the molecular interactions between PCL and polypeptides are rather weak, resulting in a very limited miscibility.

2.6. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR analysis was performed in order to deduce molecular structure of polypeptides, including possible denaturation of collagen. ATR-FTIR Thermo Scientific Nicolet 8700 spectrophotometer was used. For each sample 32 scans in the range 400–4000 cm^{-1} were performed and averaged. FTIR investigations were performed on collagen and gelatin samples in a form of fibres electrospun at conditions described above. Additional FTIR measurements were done on collagen and gelatin samples in powder form as received, as well as on collagen and gelatin films cast from 0.1 M acetic acid solution.

2.7. Wettability

Water contact angle of all nonwoven materials was measured with Data Physics OCA 15EC. Measurements were done at three time points after placing the drop of distilled water (2 μl volume) on the material. In addition to the time point of 0.2 s (immediately after putting drop on the material) which can be considered as typical for such measurements, contact angle was measured after 3 s and after 10 s. Such approach has shown that wettability kinetics vary and some samples should be considered as hydrophilic even though the measurement after 0.2 s indicates hydrophobicity.

2.8. Cellular studies

In order to determine cellular response to the prepared set of nonwoven materials, a series of different studies were performed including cytotoxicity on material extracts as well as tests with cells in direct contact with materials. MTT, PrestoBlue and CellTiter-Glo® are assays evaluating viability and proliferation of cells by measuring their mitochondrial metabolic activity. In MTT assay, yellow water-soluble tetrazolium salts are reduced to purple insoluble formazan crystals and in PrestoBlue test weakly-fluorescent blue resazurin is reduced to red, highly fluorescent resorufin. Bioluminescence assay CellTiter-Glo® is a sensitive method of determining the number of viable cells in culture based on quantitation of the adenosine triphosphate (ATP) present. ATP is an energy storage molecule, therefore can be used as an indicator of metabolically active cells. This assay measure the light that is emitted during luciferin-luciferase reaction. Cellular ATP provides energy for this reaction and the light intensity is linearly related to ATP concentration and subsequently to the cell number. During CyQuant test fluorescent dye is bound to DNA, what enables direct measurement of proliferation of cells.

Additionally, scanning electron microscopy and fluorescent nuclei and cytoskeleton staining were performed to assess cells adhesion and spreading on the surface of materials. All fluorescent and luminescent readings were done with Fluoroscan Ascent™ FL Microplate Fluorometer and Luminometer (ThermoScientific).

2.8.1. Cell cultures

Biological studies were performed using two cell lines, mouse fibroblasts L929 and human primary fibroblasts (HF). Mouse fibroblast L929 were purchased from Sigma-Aldrich (ATTC). In case of human fibroblasts, skin biopsy specimens were obtained by punch biopsies (6 mm^3) from healthy donors undergoing corrective abdominal reduction (plastic) surgery. The study was approved by the ethics committee (ethical approval no. 13/NE/0089) and written informed consent was obtained from all patients. All methods were carried out in accordance with the approved guidelines. Dermal fibroblasts were cultured as described before [16,17] in RPMI (Invitrogen) medium supplemented with penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), L-glutamine (2 mM) and 10% FBC in 37 °C and 5% CO_2 .

Both types of cells, prior to tests, were cultured on 75 cm^2 flasks in culture medium consisting of 89% DMEM (phenol red, L-glutamine, high glucose, no sodium pyruvate), 10% FBS and 1% antibiotic and held in an incubator in 37 °C, 5% CO_2 . Culture medium was changed every three days. For seeding, cells were harvested by washing them with PBS, adding 5 ml of 0.05% (0.25%, diluted 5-fold with PBS) trypsin solution to the flask and placed for 5 min in incubator. After that time, gentle tapping on the side of the flask ensured cells being lifted from the bottom of the flask. Harvested cells with an addition of 5 ml of culture medium were then centrifuged for 5 min at 100g. Collected pellet was resuspended with culture medium and diluted to required cell density.

2.8.2. Sample preparation

All materials were cut into circles of 5 mm and 10 mm in diameter suitable for 96 and 48 well plates respectively. Cut samples were sterilized in 85% ethanol solution and in UV light for 30 min on each side.

2.8.3. Cytotoxicity on extracts

In order to obtain extracts for cytotoxicity test, 5 samples of each material type (5 mm in diameter) were placed in 96-well plate. They were immersed in 200 μl of culture medium per well, kept in 37 °C and gently stirred for 24 h. For reference, along wells with samples, 5 wells without material were filled with medium as well.

At the same time L929 cell suspension of was seeded into another 96-well plate in the same amount of wells as sample extracts plus control with density 1×10^4 cells/well and put in an incubator for 24 h.

After that time culture medium from cell seeded wells was replaced with material extracts and the plate was placed in the incubator for another 24 h.

In the next step extracts were removed and 200 μ l MTT solution (1 mg/ml in PBS) was added to each well and incubated for 4 h. Then MTT solution was replaced with 100 μ l of acidic isopropanol (0.04 M HCl) and gently stirred for a couple of minutes to dissolve formazan crystals.

Absorbance was read at 570 nm on Multiskan GO Microplate Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific.

2.8.4. Viability and proliferation quantitative tests

In order to compare the results of different quantitative viability with proliferation tests, unified setting was implemented including cell seeding density (with an exception for CyQuant test), the number of samples of each material per day and time frame of all the experiment.

For each of the 3 days of experiment 3 samples of all 6 types of materials that underwent tests were prepared as previously described. Discs of 10 mm in diameter were placed in 48-well plates. A separate plate was used for each day as well as for the reference “0 day” plate with no samples. Culture medium containing 1×10^4 cells in the volume (5×10^3 in case of CyQuant test) of 0.6 ml was added to each well with material and 3 empty wells per plate for the control. Each plate was then placed in an incubator in 37 °C, 5% CO₂. After 5 h (“0 day” where cells just managed to adhere but not to divide), 1, 2 and 3 days the respective plates were taken out of the incubator and were subjected to further procedure according to the type of test being conducted.

MTT: The procedure was similar to that applied in cytotoxicity on extracts. Here, culture medium was replaced with 250 μ l of MTT solution. After 4 h in incubator and removing MTT solution, 200 μ l of acidic isopropanol was added to each well. Dissolved formazan solution was then transferred, 150 μ l from each well, to 96-well plate for absorbance reading.

PB: To make sure no residues of culture medium are present after its removal, before further steps, all wells were washed with PBS. Afterwards, each well was filled with 180 μ l of PBS and 20 μ l of Presto Blue reagent and then the plate was returned to the incubator for 40 min. This step completed, 100 μ l from each well was transferred to 96-well plate. Fluorescence was read with excitation/emission 530/620 nm filters.

CyQuant: Presto Blue procedure likewise, wells were washed with PBS to begin with. PBS solution was then blotted with tissue paper and thus prepared plates were stored in a freezer in –76 °C for at least 24 h. An hour prior to next steps all plates were taken out of the freezer at the same time to thaw in room temperature. 200 μ l of reagent solution consisting of cell lysis buffer and CyQuant GR reagent in 1:400 ratio was added to each well. After 5 min 150 μ l was pipetted from each well to 96-well plate, followed by fluorescence reading with excitation/emission 460/538 nm filters.

CellTiter-Glo 3D: Without removing any medium 100 μ l of the CellTiter-Glo3D assay was added to each well (1:1 assay:DMEM). The plate was placed on a plate shaker for 10 min, followed by incubation for 30 min at room temperature. After this time 150 μ l of the solution was transferred to 96-well plate and luminescence was measured.

2.8.5. Cell morphology and spreading

To assess how different types of our materials affect the morphology of cells cultured on their surface, two experiments in direct contact were performed resulting in SEM and fluorescence images taken.

For each kind of experiment as well as time point, 2 samples (10 mm in diameter) prepared as described before (one for SEM and one for fluorescence) from each type of material were placed in separate 48-well plate. L929 mouse fibroblasts seeded with cell density 2.5×10^3 /cm² were subjected to 3, 5 and 7 days long culture. Human fibroblasts proliferate slower than L929 and were seeded in cell density 1×10^4 /cm² and only for 3 and 7 days.

SEM imaging was performed on dried samples with fixed cells. After taking out a plate from incubator, samples with cells were washed with PBS and fixed with 2.5% GTA for 3 h. Then they were washed 3 times with PBS to get rid of any GTA residues and subjected to dehydration with a series of ethanol solutions with increasing concentration (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% x 2) followed by ethanol:HDMS solutions (1:2, 2:1) and as a final step 100% HDMS in which they were left to dry under fume hood. In each solution samples were kept for 20 min. Thus prepared samples were sputter coated with 7 nm of gold. SEM imaging was done with JEOL JSM-6390LV.

For fluorescent microscope imaging, samples were fixed and their nuclei and cytoskeleton were stained. Before fixing and after each following step samples were washed with PBS. Firstly, samples were immersed in 3% formaldehyde for 20 min for fixing and then in 0.1% Triton X 100 for 5 min to permeabilize cell membranes. After that they were placed for 30 min in mixed staining solution of ActinGreen and NucBlue which molecules bind to cytoskeleton and nuclei DNA respectively. Samples were placed wet on the standard glass plates and they were covered with another very thin glass to prevent drying. Images were taken with Leica AM TIRF MC.

3. Results

The results of viscosity measurements indicated large difference between viscosity of polymer solutions using both solvent systems. This difference forced three time higher polymer concentration in AA/FA solutions than in HFIP in order to achieve similar solution viscosity and morphology of electrospun nanofibres as it was shown in our previous paper [9]. Fig. 1 illustrates viscosity measured at polymer concentrations of 5% w/w in HFIP and 15% w/w in AA/FA, which were applied in electrospinning compared with non-spinnable viscosity at polymer concentration of 5% w/w in AA/FA. Looking at Fig. 1 and Table 1, it is apparent that the viscosity of solutions with the same polymer concentration (5%) differed greatly depending on solvent used. 12 times lower viscosity was measured for AA/FA solution of pure gelatin (0% PCL content) compared to HFIP, and 16 times for pure PCL (100% PCL content).

Similar trends in viscosity were observed when using collagen. For instance, viscosity of 10% w/v collagen solution in HFIP after 1 h of stirring was 0.719 Pa*s while at the same concentration in AA/FA, viscosity was only 0.186 Pa*s.

For deduction of conformational differences of gelatin and collagen in AA/FA and HFIP solutions, viscosity measurements performed for polymer concentrations in the range 1.6–6.8% w/v are presented in Fig. 2.

We tried to estimate the compactness of molecular conformations of pure polypeptides using M-H equation and the procedure described in the methodology (Eqs. (1)–(3)).

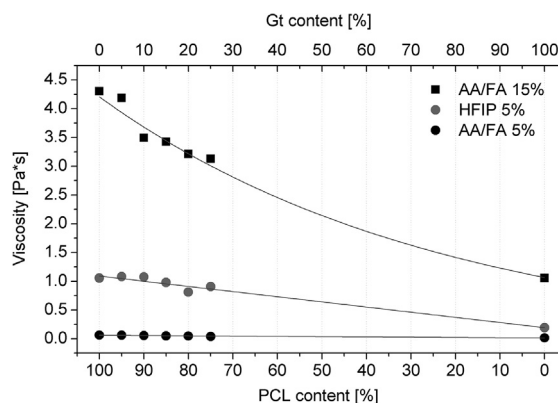


Fig. 1. Viscosity of PCL/Gt solutions using AA/FA (5% and 15% w/w) and HFIP (5% w/w) at the shear rate 40/s.

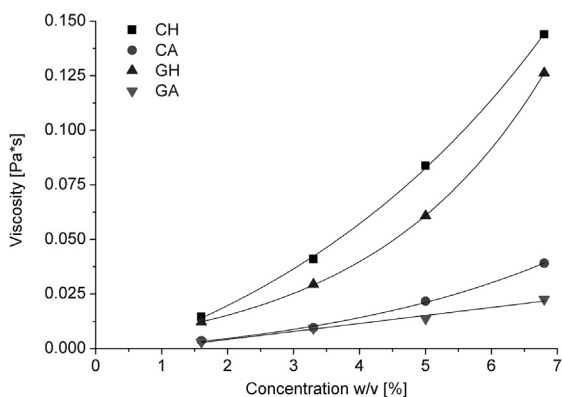


Fig. 2. Viscosity vs. polymer concentration for collagen and gelatin in HFIP (CH and GH) and in AA/FA (CA and GA) at the shear rate 300 s⁻¹.

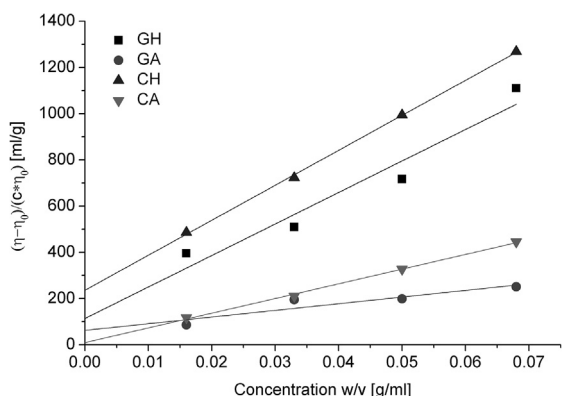


Fig. 3. The reduced viscosity, $\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{c - c_0}$, vs. polymer concentration for collagen and gelatin using HFIP (CH and GH) and AA/FA (CA and GA) at the shear rate 300 s⁻¹.

Fig. 3 shows the reduced viscosity, $\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{c - c_0}$, as a function of concentration, c , for investigated polypeptides in both solvent systems. Considering relatively low polymer concentrations, linear approximation of experimental data in a form of Huggins equation [18] was applied:

$$\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{c - c_0} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (4)$$

where k_H is the Huggins constant. In the plot of η_{red} vs. concentration, intrinsic viscosity was determined as the intercept of linear approximation while the slope divided by second power of intrinsic viscosity provides the value of Huggins constant (not used for the apparent interpretation). Table 2 shows the intrinsic viscosity and the difference of a parameters in M-H equation determined for polypeptides in both solvent systems.

The analysis of the difference of a parameters of M-H equation showed (Table 2) that the a values are higher when using HFIP, which indicates stronger molecular interactions with collagen and gelatin resulting in more expanded molecular conformation compared to AA/FA

Table 2

Intrinsic viscosity, $[\eta]$, and the difference of a parameters for collagen and gelatin using both solvent systems.

Sample	$[\eta]$, (intercept) ml/g	$a_{HFIP} - a_{AA/FA}$
CH	236.3	0.23
CA	9.7	
GH	114.0	0.05
GA	62.7	

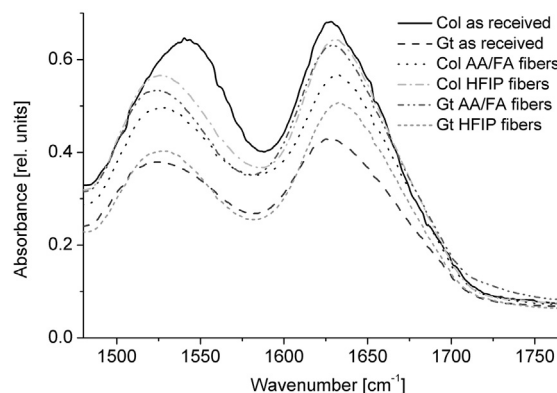


Fig. 4. FTIR absorbance bands in the range of amide I and amide II for investigated samples.

system. Such effect of a solvent is more pronounced (larger difference of a parameters) for collagen than for gelatin.

3.1. Fourier transform infrared spectroscopy

The major conclusion is related to the possible collagen denaturation – it was drawn from the comparison of the position of the maximum of amide II (Table 2). Fig. 4 illustrates FTIR absorbance bands for collagen and gelatin in the amide I and amide II wavelength range. According to Doyle [19], collagen denaturation is manifested by decrease of the wavelength of amide II band. An attempt to deduce the extent of collagen denaturation using numerical deconvolution of the amide I and II bands, being two major infrared bands of the protein was neglected. The important reason is that there is still a lot of controversy over the physical meaning of particular FTIR components of amide I and amide II bands. For instance, the amide I component at 1690 cm⁻¹ which seems to be crucial for determination of denaturation from FTIR has been attributed by Muyonga [20] to helices of aggregated collagen-like peptides while the authors of [21] show that this band is related to β -sheet structure.

It is evident from Table 3 that the wavelength of the maximum of amide II band for collagen in cast and lyophilized form from very weak water solution of AA (0.1 M AA) is ca. 20 cm⁻¹ higher than for gelatin as received and gelatin treated with HFIP or AA/FA. This is an evidence that this shift is a very good indicator of collagen denaturation. Additionally, it is apparent from Table 3 that for gelatin treated with weak water solution of AA (0.1 M AA) the position of maximum of amide II band shifts toward collagen position, most probably because of partial renaturation. This renaturation is caused by stabilization of helices via intramolecular hydrogen bonds from water molecules. The amide II position for collagen treated either with HFIP or AA/FA shifts to lower wavenumber being typical for gelatin as received. This shift in position of amide II bands indicates denaturation of collagen in HFIP and AA/FA. The data from Table 3 indicate that the level of collagen

Table 3

Positions of maximum of amide II band.

Sample (solution)	Sample (form)	Position of maximum of amide II band, cm ⁻¹
Collagen as received	Powder (lyophilized)	1542.0
Collagen from 0.1 M AA	Film	1544.3
Collagen from AA/FA	Fibres	1525.3
Collagen from HFIP	Fibres	1526.1
Gelatin as received	Powder	1526.3
Gelatin from 0.1 M AA	Film	1532.6
Gelatin from AA/FA	Fibres	1523.8
Gelatin from HFIP	Fibres	1525.2

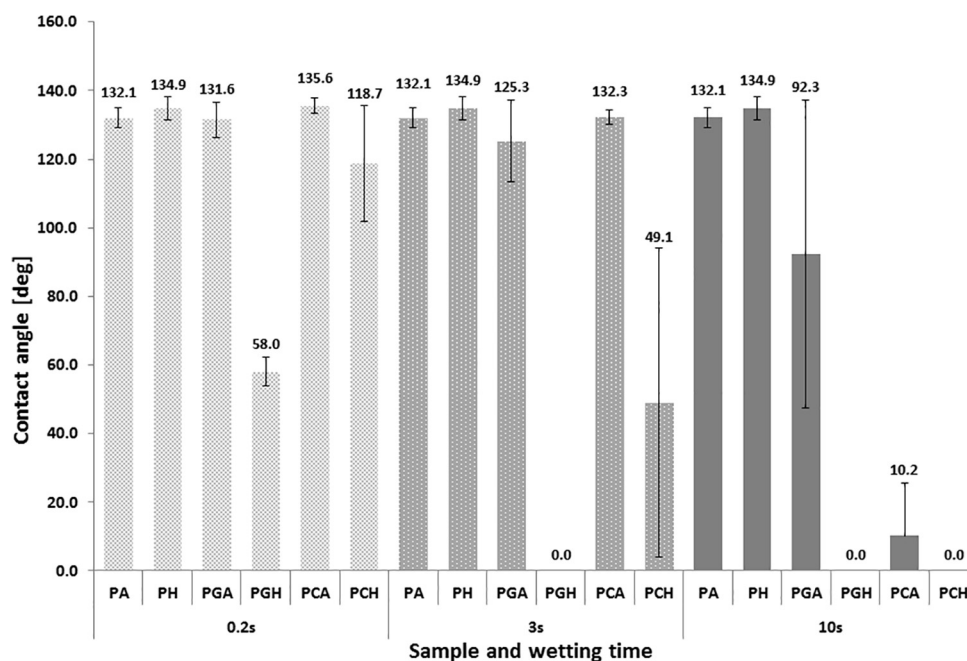


Fig. 5. Water contact angle measurements for all electrospun nonwoven materials. P stands for PCL, G for gelatin, C for collagen, A for acids (solvent) and H for HFIP (solvent).

denaturation is similar for both solvent systems. The denaturation by both solvent systems is evidently seen for gelatin. The analysis of position of amide II peaks for gelatin indicates that the wavelength of the maximum of amide II band is slightly lower for gelatin treated with HFIP or AA/FA compared to gelatin as received (Table 3). It suggests that the part of triple-helix structure remaining in gelatin powder is denaturated under the influence of HFIP or concentrated acids (AA/FA). As a result, the level of denaturation of collagen samples by applied solvents is a little bit lower than for gelatin samples.

3.2. Wettability

PCL samples, electrospun using both HFIP (PH) and acids (PA), were highly hydrophobic and the shape of a drop and contact angles did not change over the time of observation. Bicomponent nonwovens containing polypeptides were much more hydrophilic, however an increase of wettability over pure PCL samples was mostly evident at longer time of observation (10 s). Taking a look on the effect of a solvent on wettability of bicomponent fibres (Fig. 5), it is evident that it was considerably higher for samples spun from HFIP than from AA/FA solvent. This trend was seen irrespective of the time of observation. On the other hand, there was practically no effect of the type of polypeptide on nonwoven wettability; the essential difference was seen only at the longest time of observation (10 s) with higher wettability of samples with collagen spun from AA/FA than with gelatin.

3.3. Cellular studies

The results of cellular investigations were analysed from three perspectives. The most important one was related to the effect of a solvent on cellular activity while the two additional deal with the influence of polypeptide as well as its type (collagen vs. gelatin) on cellular activity of bicomponent scaffolds.

3.3.1. Cytotoxicity on extracts

Cytotoxicity 24-h test on extracts (Fig. 6) shown that none of the samples were cytotoxic, with slightly higher viability observed for samples containing polypeptides. Although for pure PCL materials the result values were below control (TCP – tissue culture polystyrene),

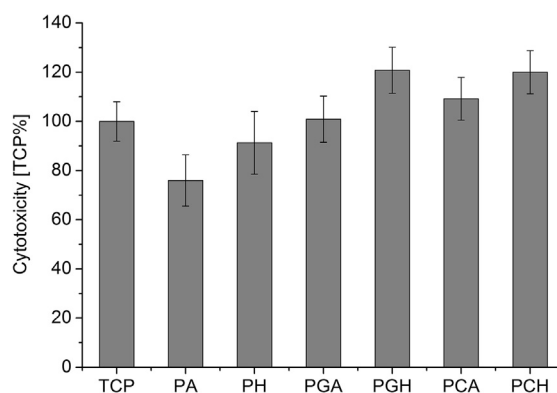


Fig. 6. Cytotoxicity test conducted on extract of materials. TCP stands for control test, P for PCL, G for gelatin, C for collagen, A for acids (solvent) and H for HFIP (solvent).

they did not drop lower than 75% of control and we do not consider them as cytotoxic. It is worth noting that for PGH, PCA and PCH samples obtained values were slightly higher than for control.

In each pair of the same composition materials, higher values could be observed for materials electrospun from HFIP solutions in comparison to those made using AA/FA.

The response of cells cultured in direct contact with materials was measured using metabolic activity Presto Blue, MTT and CellTiter-Glo assays as well as by quantification of DNA content using CyQuant fluorophores. Considering the results of metabolic tests (Fig. 7a–c), it is noticeable that there was no essential difference in cellular activity for various samples. This observation contrasts with the results of quantification of DNA content using CyQuant assay (Fig. 7d) indicating essentially higher values for PGH, PCA and PCH samples. Discrepancies between metabolic activity and DNA content are known and described in literature [22]. It was demonstrated in [22] that quantification of DNA and therefore cell proliferation using CyQuant is much more reliable and accurate than using metabolic assays which are subject to numerous variables.

Taking CyQuant assay results as representative for cell proliferation

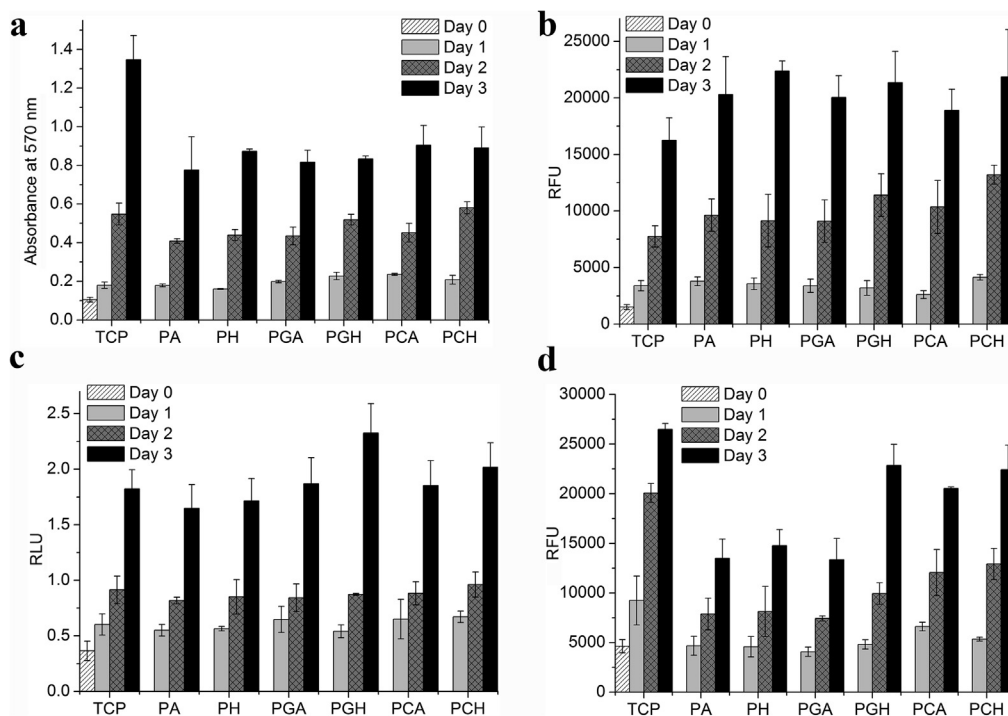


Fig. 7. Cellular response to the materials measured by 3-day assays with L929 cells with direct contact with them. Metabolic activity tests: (a) MTT, (b) Presto Blue (RFU – Relative Fluorescence Unit), (c) CellTiter-Glo® bioluminescence assay (RLU – Relative Light Unit); DNA quantity test: (d) CyQuant. TCP stands for control test, P for PCL, G for gelatin, C for collagen, A for acids (solvent) and H for HFIP (solvent).

activity, several observations can be drawn from our results (Fig. 7d). The most evident one is the fact that proliferation increased with an addition of polypeptide and that it was sensitive to its type, in favour for collagen. The effect of the type of polypeptide on proliferation was mostly visible in the case of AA/FA solvent system, with much higher proliferation for collagen containing samples for all time of observations (Fig. 7d). The effect of the solvent type on proliferation was more clear in the case of samples with polypeptides. Irrespective of the polypeptide used, cellular proliferation was higher for samples formed from HFIP with a distinct contrast between materials with gelatin.

3.3.2. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy

SEM and fluorescence imaging, despite those two methods differing completely in how and what is acquired to create an image, complement each other when used to assess cells behaviour on material surface.

In our experiments SEM and fluorescence images (Fig. 8) shown a stark difference in appearance between L929 cells cultured on pure PCL and on samples with biopolymer. The cells on both PA and PH were rounder, smaller, trying to minimize their contact with the material, while the ones cultured on the rest of the materials were flattened, in greater number and willingly extending their lamelli - and filopodia, especially on PGH, PCA and PCH surfaces. Fibroblasts inhabiting PGH, PCA and PGH nonwovens, compared to those cultured on control TCP surface were similarly well spread, displaying spindle-like healthy morphology. The same trend could be observed for HF cells (Fig. 9). Cells on PA were thin and elongated with limited surface area and number of lamellipodia. On PH and PGA they seemed to be more flattened and comfortable, their behaviour nearing cells on TCP. Alike L929, HF cells presented the best morphology on PGA, PCA and PGH materials.

In case of the influence of solvent used for electrospinning there could be observed a tendency for cells cultured on materials made with HFIP to have superior morphology. It was apparent when comparing cells on each pair of materials that were made of the same components but different solvents. The difference was more pronounced for nonwovens containing gelatin.

4. Discussion

Our discussion focuses on the interpretation of biological results primarily in relation to the molecular background. The role of morphology and nonwovens architecture was reduced by their similarity in all nonwoven types as it was shown in our previous work [9].

Beneficial effect of polypeptides addition on cells' activity is well known and described in the literature. The first reason is related to the presence of RGD sequence in polypeptide molecules – an Arg-Gly-Asp tripeptide that plays an important role in mediating cell adhesion interactions. This sequence, found in many extracellular matrix proteins is recognized by integrins and acts as cell binding site.

Irrespective of the presence of RGD sequence, it is evident from our results that addition of polypeptides increases considerably the sample wettability which is crucial for adhesion of cells to the scaffolds. It is obvious that higher wettability of materials containing polypeptides is due to the presence of polar regions in α -chains of collagen and gelatin.

Our results indicate that there is a difference in cellular behaviour between nonwovens with collagen and gelatin. The results of both cell proliferation and viability were higher for samples containing collagen, particularly in the case of nanofibres formed from AA/FA solution system. This difference cannot be attributed to the wettability which was similar for samples containing both types of polypeptides. This is easily understood, because wettability is governed mostly by the primary structure of single chain, which is the same for both polypeptides and not by higher order of molecular arrangement, which is different for collagen and gelatin. The higher order of chains arrangement, being very different in native collagen compared to its denatured form – gelatin, can be important for interactions with cells on further stages of cellular activity. Our FTIR results imply that collagen denaturation occurs in both solvents, the shift of the maximum of amide II band being a proof of that. However, the extent of collagen denaturation is slightly lower compared to gelatin treated with both solvents. We anticipate that even some traces of the native triple helix superstructure of collagen can lead to higher cellular activity compared to gelatin. Denaturation of investigated polypeptides in HFIP and AA/FA solvents was confirmed by our wide angle X-ray scattering and differential scanning calorimetry analysis. In the first case, no discrete diffraction

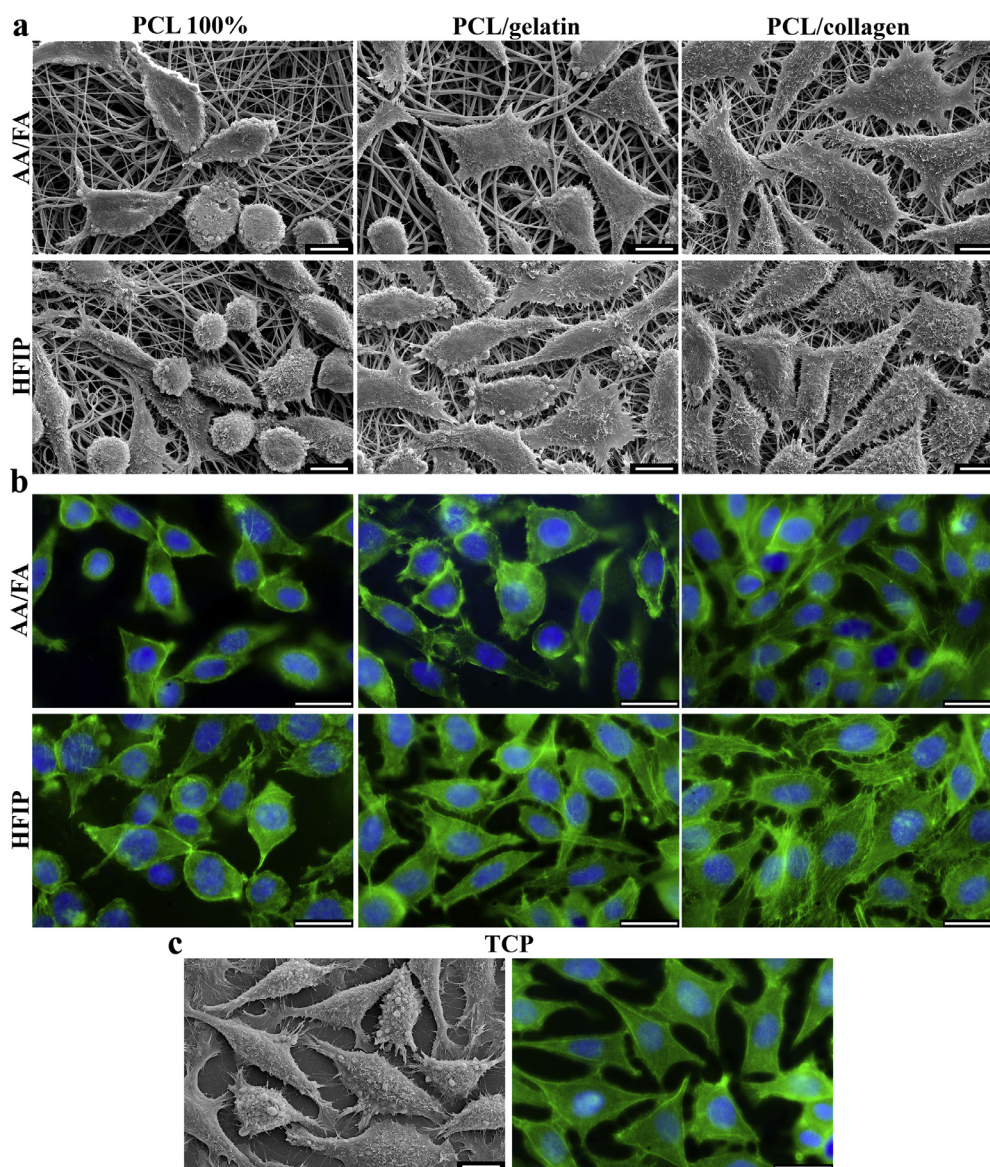


Fig. 8. L929 cells cultured for 5 days on the surface of our materials, (a) SEM images, (b) fluorescence microscopy images (blue nuclei, green cytoskeleton), (c) cells cultured on TCP as a control; on the right: fluorescence microscopy image, on the left: SEM image. For all SEM images marker is 10 μm , for fluorescence microscopy images marker is 25 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

from crystal structure was registered while in the case of DSC practically no endothermic effect related to the melting of triple-helix aggregates during heating was observed.

The most complex and not trivial seems to be an interpretation of the effect of solvent on cellular behaviour, where in case of material compositions, the results are in favour of materials made with HFIP as a solvent. The scheme of our interpretation is stretched over the mutual molecular interactions between both polymers as well as between polymers and a solvent.

The observed viscosity differences (Fig. 2) in both solvent systems reflect mostly various molecular interactions between polymers and solvents, leading to different molecular conformations of investigated polymers in both solvents. In the case of poor solvent like AA/FA mixture, polymer molecules try to minimize their exposition to solvent molecules by adoption more compact conformation with lower hydrodynamic radius, resulting in lower viscosity. The opposite situation is expected for good solvents like HFIP, in which molecular conformation should be more extended in order to increase molecular contact between polymer and a solvent. In the case of polypeptides, there is an

additional mechanism which can lead to more compact conformation in acids and hence to lower viscosity. It is related to the sensitivity of molecular conformation of peptides to the ionic strength of solvents surrounding them. In the case of acids, the polypeptide molecules are dominated by positive charges which can lead to more coiled conformation than in HFIP. This is consistent with observation done in the past [23], when using various acids for collagen dissolution.

It is known from one of our papers [15] that the molecular interactions between PCL and both polypeptides are rather weak resulting in very limited miscibility. In such a case, the crucial role for the structure formation lies on the side of the solvent. With a good solvent like HFIP, where a tendency for component separation is relatively weak, the final structure is quite homogenous with uniform distribution of components. In the case of AA/FA system, weak interactions between polymers and solvent lead to formation of emulsion that result in the separation of PCL and polypeptide in final nanofibres structure.

The direct consequence of such contrast in the structure of nanofibres from both solvent systems are different kinetics of polypeptide leaching in aqueous medium at the temperature 37 $^{\circ}\text{C}$ as it was shown

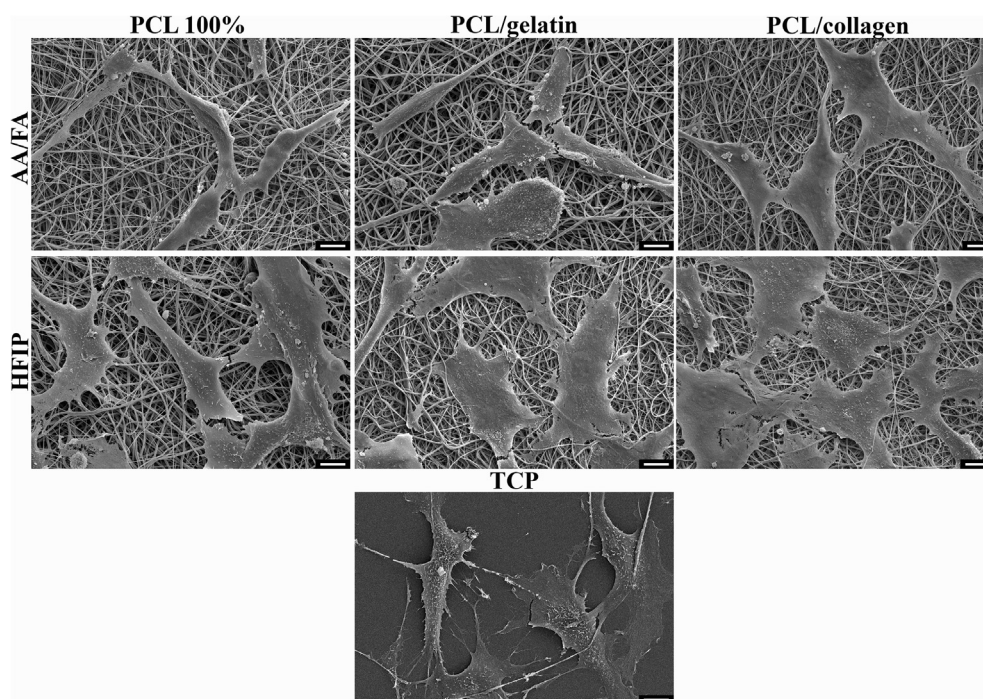


Fig. 9. SEM images of HF cells cultured for 3 days on the surface of our materials and TCP as control, marker is 10 μm .

in our previous paper [11]. For nanofibres spun from HFIP, where distribution of components is uniform, the process of polypeptide leaching was much slower compared to materials spun from AA/FA system. It lead to a noticeable discrepancy in polypeptide content between these two types of materials that increased as the experiment proceeded. For instance, starting from initial 10% of biopolymer mass, after 1 day of biodegradation experiment there was 8.83% left in materials from HFIP and only 7.49% in those from AA/FA (after 30 days 8.36% and 5.57% respectively).

Non-uniform distribution of biopolymer on the surface of materials spun from AA/FA, results in lower wettability from the start, as well as its quicker decrease in an environment mimicking in-vivo conditions, due to faster biopolymer leaching in comparison to materials made of HFIP. This predicament directly translates to a different availability of RGD sequences on material surface for cells to recognize. In case of AA/FA fibres it constitutes for a major factor that is responsible for poorer adhesion of cells [11] and delayed proliferation in the later days of our cellular experiments.

The effect of a solvent on cellular activity on investigated materials can be, in our opinion, related to the direct effect of a solvent on molecular conformation of polypeptides molecules, which can be essential for accessibility of RGD sequence. For a weak solvent (AA/FA), the conformation of polypeptides is expected to be more compact because of prevailing polymer-polymer internal interactions. As a consequence we expect lower exposition of RGD binding sites to integrin receptors leading to lower cellular viability and spreading. Contrary to this, for good solvent (HFIP) conformation of polypeptide molecules should be more extended with easier access of RGD sequences for integrin receptors. Our viscometric results support this explanation - the exponent a in Mark-Houwink equation is lower for both polypeptides in AA/FA solutions than in HFIP indicating lower hydrodynamic radius of molecules in former case, i.e. more compact conformation. Different rheological behaviour of collagen and gelatin solutions can be attributed to slightly lower denaturation of collagen compared to gelatin.

5. Conclusions

Cellular studies are an important tool in determining the application

value of optimized bicomponent PCL/polypeptide materials made with alternative, ‘green’ solvents. Our findings lead us to conviction that, in case of cellular response, these materials present fully satisfactory results in comparison to the ones made with perfluorinated alcohol. They fall behind in regard of cell proliferation and metabolic activity, most probably because of faster polypeptides leaching as well as more compact molecular conformation of polypeptides, but in each case the difference is minimal. What is relevant here, is that even though polymer-solvent interactions are proven by us to be weaker with the use of AA/FA, they still are sufficient to enable the biopolymer to stimulate cell behaviour.

HFIP seems to be slightly better solvent for obtaining functional nonwovens for cellular scaffolds application, but we need to take into consideration its obvious disadvantages of higher costs and toxicity as well as more harmful influence of its fumes on operators and environment, compared to AA/FA.

Weighing all our results, we are convinced that the use of AA/FA mixture as a solvent for electrospinning of bicomponent PCL/polypeptide materials is an option worth consideration and promising in the field of scaffolds for tissue engineering.

Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Science Center (NCN) under the Grant No.: 2013/09/B/ST8/03463. Part of investigations was carried out with the use of CePT infrastructure financed by the European Union – the European Regional Development Fund within the Operational Programme “Innovative economy” for 2007–2013.

References

- [1] N. Choktaweasap, K. Arayanarakul, D. Aht-ong, Ch. Meechaisue, P. Supaphol, Electrospun gelatin fibres: effect of solvent system on morphology and fibre diameters, *Polym. J.* 39 (2007) 622–631.
- [2] A.G. Kanani, S.H. Bahrami, Effect of changing solvents on poly(ϵ -caprolactone) nanofibrous webs morphology, *J. Nanomater.* (2011).
- [3] R. Casasola, N.L. Thomas, A. Trybala, S. Georgiadou, Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter, *Polymer* 55 (2014) 4728–4737.
- [4] O. Gil-Castell, J.D. Badia, A. Ribes-Greus, Tailored electrospun nanofibrous

- polycaprolactone/gelatin scaffolds into an acid hydrolytic solvent system, *Eur. Pol. J.* 101 (2018) 273–281.
- [5] K. Ren, Y. Wang, T. Sun, W. Yue, H. Zhang, Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes, *Mater. Sci. Eng. C* 78 (2017) 324–332.
- [6] J. Yong-Chao, J. Lin, H. An, W. Xiao-Feng, L. Qian, T. Lih-Sheng, Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell–matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* 71 (2017) 901–908.
- [7] J. Nam, Y. Huang, S. Agarwal, J. Lannutti, Materials selection and residual solvent retention in biodegradable electrospun fibres, *J. Appl. Polym. Sci.* 107 (2007) 1547–1554.
- [8] P.D. Dalton, K. Klinkhammer, J. Salber, D. Klee, M. Moller, Direct in vitro electrospinning with polymer melts, *Biomacromolecules* 7 (3) (2006) 686–690.
- [9] P. Denis, J. Dulnik, P. Sajkiewicz, Electrospinning and structure of bicomponent polycaprolactone/gelatin nanofibres obtained using alternative solvent system, *Int. J. Polym. Mater.* 64 (2015) 354–364.
- [10] J. Dulnik, P. Denis, P. Sajkiewicz, D. Kolbuk, E. Choińska, Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibres electrospun from alternative solvent system, *Polym. Degrad. Stab.* 130 (2016) 10–21.
- [11] DuPont Chemicals and Fluoroproducts Technical Information https://www.chemours.com/FluoroIntermediates/en_US/assets/downloads/HFIP_TechSheet.pdf.
- [12] Dortmund Data Bank <http://ddbonline.ddbst.de/VogelCalculation/VogelCalculationCGL.exe?component=Acetic+acid>.
- [13] N.A. Lange, J.A. Dean, *Lange's Handbook of Chemistry*, 10th ed. (1967).
- [14] V.K. Thakur, M.K. Thakur, *Handbook of Sustainable Polymers: Processing and Applications*, CRC Press, 2016.
- [15] D. Kolbuk, P. Sajkiewicz, P. Denis, E. Choińska, Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility, *Bull. Pol. Acad. Sci., Tech. Sci.* 61 (2013) 629–632.
- [16] J. Normand, M.A. Karasek, A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31 (1995) 447–455.
- [17] M. Ciechomska, S. O'Reilly, M. Suwara, K. Bogunia-Kubik, J.M. van Laar, MiR-29a reduces TIMP-1 production by dermal fibroblasts via targeting TGF- β activated kinase 1 binding protein 1, implications for systemic sclerosis, *PLoS One* 9 (12) (2014).
- [18] M.L. Huggins, The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942) 2716–2720.
- [19] B.B. Doyle, E.G. Bendit, E.R. Blout, Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides, *Biopolymers* 14 (1975) 937–957.
- [20] J.H. Muyonga, C.G.B. Cole, K.G. Duodu, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Latesniloticus*), *Food Chem.* 86 (2004) 325–332.
- [21] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.M. Ruysschaert, Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy, III - Secondary structures, *Subcell Biochem.* 23 (1994) 405–450.
- [22] V.M. Quent, D. Loessner, T. Friis, J.C. Reichert, D.W. Huttmacher, Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research, *J. Cell Mol. Med.* 14 (2010) 1003–1013.
- [23] J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont, Y. Tabata, S. Damrongsakkul, Effects of acid type on physical and biological properties of collagen scaffolds, *J. Biomat. Sci.-Polym. E* 19 (2008) 945–952.

Crosslinking of Gelatin in Bicomponent Electrospun Fibers

Judyta Dulnik  and Paweł Sajkiewicz * 

Laboratory of Polymers and Biomaterials, Institute of Fundamental Technological Research Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5b, 02-106 Warsaw, Poland; jdulnik@ippt.pan.pl

* Correspondence: psajk@ippt.pan.pl

Abstract: Four chemical crosslinking methods were used in order to prevent gelatin leaching in an aqueous environment, from bicomponent polycaprolactone/gelatin (PCL/Gt) nanofibers electrospun from an alternative solvent system. A range of different concentrations and reaction times were employed to compare genipin, 1-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS), 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE), and transglutaminase. The objective was to optimize and find the most effective method in terms of reaction time and solution concentration, that at the same time provides satisfactory gelatin crosslinking degree and ensures good morphology of the fibers, even after 24 h in aqueous medium in 37 °C. The series of experiments demonstrated that, out of the four compared crosslinking methods, EDC/NHS was able to yield satisfactory results with the lowest concentrations and the shortest reaction times.

Keywords: crosslinking; gelatin; nanofibers; biodegradable polymers; electrospinning



Citation: Dulnik, J.; Sajkiewicz, P. Crosslinking of Gelatin in Bicomponent Electrospun Fibers. *Materials* **2021**, *14*, 3391. <https://doi.org/10.3390/ma14123391>

Academic Editors: Jānis Andersons and Nektaria-Marianthi Barkoula

Received: 27 April 2021
Accepted: 15 June 2021
Published: 18 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

One of the trends that has been observed for years in tissue engineering is an attempt to mimic mother nature. Many of the approaches can seem revelatory, but until the human body accepts our invention as something familiar and cells recognize the environment we prepared for them as suitable, we are going to miss our goal.

Extracellular matrix (ECM), apart from cells, is a key ingredient that constitutes almost every tissue. In many cases, ECM is a highly fibrillar structure and matching this characteristic can be crucial to the success of our approach. This makes electrospinning, though not a new idea itself, a technique that has still a lot to offer, considering a remarkable structural similarity of electrospun materials to ECM. Electrospinning is a simple and flexible method that enables obtaining nanofibers from an array of polymers with high porosity and tunable properties [1–3].

Previously, we optimized the method of obtaining bicomponent nanofibers made of polycaprolactone (PCL) with an addition of gelatin, through electrospinning is green, cheap, and safe for the operator solvent system—a mixture of acetic and formic acid [4]. Polycaprolactone is a biodegradable aliphatic polyester with good mechanical properties, present in numerous biomedical studies, but it lacks bioactivity that only natural polymers can provide [5,6]. Gelatin, being a derivative of collagen, a protein that is present in abundance in ECM, is a great source of Arg-Gly-Asp (RGD) amino acid sequences that stimulate cell attachment [7–9].

Unfortunately, as our previous studies have shown, gelatin, being soluble in aqueous conditions is prone to be leached from the fibers, which decreases materials' bioactive potential [10]. The solution to this predicament is gelatin crosslinking within the fiber. While various physical methods such as ultraviolet irradiation, dehydrothermal treatment [11–13], as well as chemical ones are used to stabilize scaffold materials made of gelatin, only some of them are suitable in case of PCL/Gt nanofibers.

In this work, we decided to focus on chemical methods and investigate a set of different crosslinking agents. The main concerns were that the methods were of low toxicity and

had innovative potential. While the most widespread and best studied chemical agent is glutaraldehyde, there are works that indicate its detrimental effect on the cellular response and because of that it was not taken into consideration [14–16]. Based on the criteria stated above, four crosslinking agents were chosen: genipin, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride/*N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS), 1,4-butanediol diglycidylether (BDDGE), and transglutaminase.

Genipin is a crosslinking agent of plant origin, considered to be of low toxicity, widely used with natural polymers like chitosan and collagen, reacting with primary amine groups such as lysine and arginine [17,18]. EDC/NHS is a highly efficient method, popular with biomaterials aimed at tissue engineering applications. It is a zero length crosslinker, which forms amide bonds between carboxyl and amine groups, but does not take part in newly formed linkage [19–21]. BDDGE is a widely used crosslinker in cosmetology with hyaluronic acid based dermal fillers. It is biodegradable and of low toxicity [22,23]. Transglutaminase is an enzyme that has become popular in recent years as a crosslinking agent in scaffolds for tissue engineering. It can be of tissue or bacterial origin and it is confirmed to improve adhesion and spreading of cells *in-vitro* [24,25]. Transglutaminase has a beneficial effect on wound healing, as it is an enzyme that is naturally secreted by fibroblasts in response to tissue injury [26]. Both BDDGE and transglutaminase form a bond between two amine groups.

The intention of this work was to establish optimal conditions of gelatin crosslinking within PCL/Gt fibers that ensure a relatively high gelatin amount would still remain in the material even after being subjected to an aqueous environment and that nanofibers' morphology would not be compromised in the process. Such perspective is innovative considering previous results related entirely to crosslinking of pure gelatin fibers.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

PCL (Mn = 80 kDa), gelatin from porcine skin, type A (gel strength 300), phosphate buffer saline tablets and formic acid (98%) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States. Glacial acetic acid (99.5–99.9%) was purchased from POCH, Gliwice, Poland. Ethanol (99.8%) was purchased from Chempur, Piekary Śląskie, Poland. EDC and NHS were purchased from Thermo Scientific, Waltham, MA, United States. Genipin was purchased from Challenge Bioproducts Co., Ltd., Toulieu, Taiwan. Transglutaminase (1490 U/g) was purchased from P.M.T. Trading, Łódź, Poland.

2.2. Electrospinning

Polymer solution for electrospinning was prepared by dissolving PCL and gelatin separately in a mixture of acetic and formic acid (9:1 *w/w* ratio) with *w/w* 15% concentration by stirring for 24 h. Both solutions were then mixed together in a 7:3 ratio (70% PCL, 30% gelatin) and stirred for an additional 2 h. The prepared solution was electrospun on a grounded rotating drum collector with surface linear velocity 0.4 m/s, which ensures no fiber parallelization. The distance from the needle to collector surface was set to 15 cm, flow rate was 1 mL/h, and the voltage used varied from 12 to 14 kV. Humidity was kept at 45–50%.

2.3. Crosslinking Methods

Electrospun material sheets were cut into 1.5 cm × 4.5 cm samples. Before crosslinking, they were placed in a vacuum oven for not less than 24 h to remove any moisture that gelatin within the fibers is prone to attract. Immediately after taking samples out of the vacuum oven, the weight of each sample was measured. Since one of the ways of determining crosslinking degree is calculating gelatin mass change after fiber biodegradation test, this step is important because of the varying ambient humidity in the laboratory.

A series of preliminary studies was performed for all crosslinking methods. It consisted of a “trial and error” approach that led, for each of the compounds, to establishing a

set of conditions to be compared in the main part of the work, as well as an optimal solvent composition. The ranges of the crosslinking reaction conditions that were chosen for the final comparison can be found in Table 1. For EDC/NHS, a molar ratio of 2:1 was kept constant for all tested concentrations.

Table 1. Crosslinking conditions.

Crosslinking Agent	Concentration (% w/w)	Process Duration	Solvent (w/w Ratio)
Genipin	0.5–6%	6–168 h	EtOH:H ₂ O (7:3)
Transglutaminase	10–40 U/mL	24–72 h	H ₂ O
EDC/ NHS	0.02–0.23% 0.01–0.08%	10 min–9 h	EtOH:H ₂ O (7:3)
BDDGE	2.5–15%	12–168 h	EtOH:H ₂ O (7:3)

Every crosslinking experiment was performed on three samples. After each experiment was concluded, samples were thoroughly rinsed for 1 h, while vigorously stirred. In the preliminary step, demineralized water was used as a rinsing medium, but for the final comparison experiments we decided to use the same type of solvent that crosslinking agent was dissolved in instead. The explanation for this change can be found in the Section 3.1. The rinsed samples were placed in a vacuum oven for not less than 24 h and then their weight was measured again.

2.4. Fibre Biodegradation Test

All crosslinked samples, as well as non-crosslinked control, were placed for 24 h in phosphate buffer saline (PBS) solution, with an addition of 0.1% sodium azide to prevent bacterial or fungal growth, at 37 °C and gently stirred. Afterwards they were rinsed for 1 h in demineralized water, while vigorously stirred, to remove any PBS salts residues. Rinsed samples were placed in a vacuum oven for not less than 24 h and their weight was measured once again.

A large part of this discussion will be based on gelatin content, or mass, within the material expressed in ‘%’. These values were concluded from sample weight change that occurs during both crosslinking reaction and subsequent 24 h of biodegradation test. To be able to calculate gelatin mass after any of those steps, an assumption was made that of the two polymers present in the material, any weight decrease will be assigned solely to gelatin. A time range for any weight loss to occur for polycaprolactone, whether it is molecular or absolute, varies from 6 to 24 months [10]. It can be safely said that any material weight change that occurs within the 24 h of immersion in PBS solution has to be related to gelatin leaching. So, the term biodegradation used throughout the text for immersion in PBS solution test has a context of degradation of the fiber structure as a result of gelatin leaching.

The material used in this work consisted of 30% gelatin and 70% polycaprolactone. The recorded change in a sample mass (Δm) was, as reasoned above, attributed to gelatin loss. Gelatin content after biodegradation test (Gt_{C1}) reported in this work was calculated for each sample separately, in relation to a 100% of the sample’s gelatin initial mass (m_{Gt}) following the equations:

$$m_{Gt} + \Delta m = m_{Gt1} \quad (1)$$

$$\frac{m_{Gt1}}{m_{Gt}} * 100\% = Gt_{C1} \quad (2)$$

where m_{Gt1} was gelatin mass after biodegradation test.

2.5. Scanning Electron Microscope (SEM) Imaging

SEM imaging was performed with JEOL JSM6010LV, Japan, Tokio. The samples were examined after crosslinking as well as after biodegradation test. To ensure good conductivity, samples were sputter coated with 10 nm of gold, using JEOL smart coater.

2.6. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy

The FT-IR measurements of the crosslinked samples after biodegradation test as well as non-crosslinked control was performed with FT-IR spectroscopy with attenuated total reflection (ATR) technique using VERTEX 70, Bruker, Billerica, MA, United States.

3. Results and Discussion

3.1. Solvent Optimisation

Apart from transglutaminase that only dissolves in water, the three other crosslinking agents chosen for this research are commonly found in the literature dissolved in ethanol or ethanol/water mixtures [17,19,21,22]. A series of preliminary crosslinking experiments were performed to establish (if possible) one type of solvent for these three compounds.

The first crosslinking agent that underwent solvent optimization was genipin. The experiments were started with 5% concentration over 24 and 48 h with solvent mixtures of ethanol/demineralized water with the latter content of 10, 20, and 30%. Genipin crosslinking is known for the color change that occurs during the course of the reaction [18]. A gradual color transition of the mat, from white to the shades of blue can be observed in Figure 1. Color blue intensity strongly correlated with increasing water content of used solvent and mildly with the reaction time.

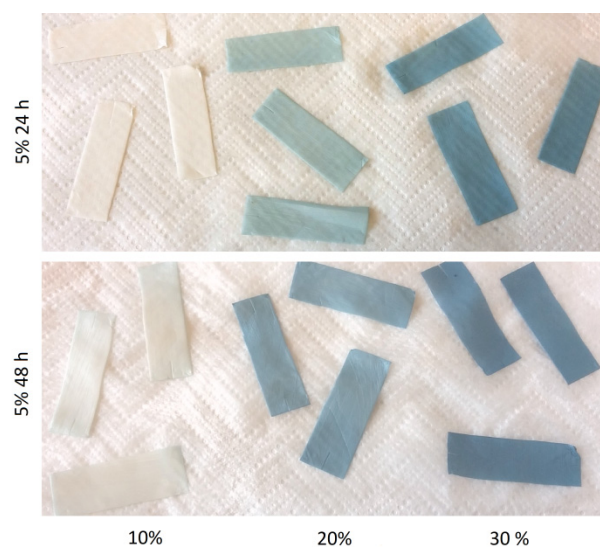


Figure 1. Samples crosslinked with 5% genipin solution for 24 (**up**) and 48 h (**down**) with solvents with increasing water content.

The change in gelatin content showed that with the increased water concentration in the solvent, the more gelatin content was left in the samples. It was true both for the samples weighted after only crosslinking, as well as after the biodegradation test, that followed crosslinking (Figure 2). While the gelatin content of the samples after crosslinking for 24 h and 48 h differed for only 3–6%, a significant difference was observed in the comparison done after biodegradation test. These results showed the need for experiments with different concentrations and reaction times in order to find optimal ethanol to water ratio.

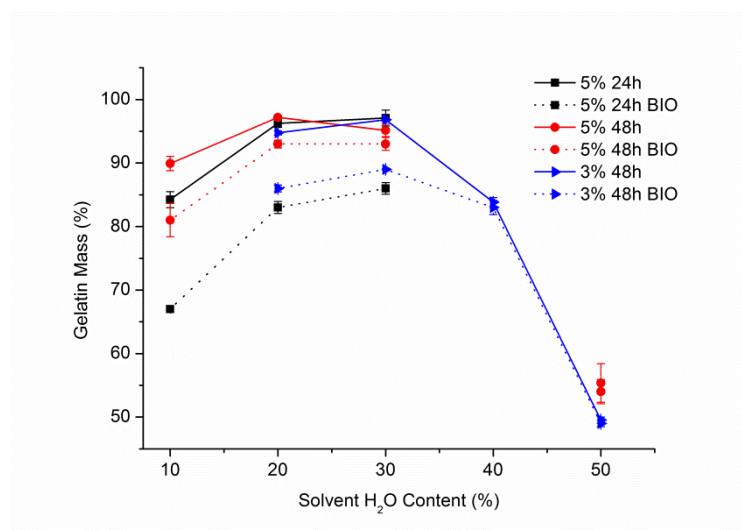


Figure 2. Gelatin content of the samples after crosslinking with genipin solutions and after biodegradation (BIO) test vs. water content in the solvent.

A lower genipin concentration of 3% was used next with reaction time set to 48 h and solutions with water content ranging from 20 to 50%. The results showed that the samples crosslinked with 3% genipin over 48 h reached slightly higher gelatin content, after biodegradation test, than those crosslinked with 5% for 24 h (Figure 2), as well as a significant decrease of gelatin content for samples with more than 30% water in crosslinking solution.

The reduction of gelatin mass for samples crosslinked with solutions containing more than 30% of water can be explained by domination of gelatin dissolution over the crosslinking process. On the other hand, too little water content in solution was insufficient for effective crosslinking, resulting in maximum crosslinking efficiency at around 30% of water in solution. We suppose, that for those samples, the drop in gelatin content after only being subjected to crosslinking can be explained by gelatin dissolving during rinsing for 1 h in demineralized water. For that reason, it was decided that the rinsing medium for all tests from that moment forward would be the same as the solvent used during crosslinking.

A series of EDC/NHS crosslinking tests with increasing water content in the solvent was performed next, in order to compare the results with the observations for crosslinking with genipin.

In the case of EDC/NHS crosslinking (Figure 3), the same trend was confirmed, where gelatin mass measured for samples after biodegradation test was the highest for crosslinking solution with 30% water and 70% ethanol. It was proved that the revision of the rinsing medium resulted in a prevention of gelatin loss during rinsing after crosslinking, that was observed for genipin tests with water content in crosslinking solutions less than 30%. Similarly to the results of tests with genipin, there is an evident decrease in gelatin content after biodegradation for the samples with less than 30% of water in crosslinking solution. The lowest value was recorded for 100% ethanol solvent solution, being almost the same as for the control non-crosslinked samples. It suggests that no, or extremely limited, crosslinking occurred in that solution and that water presence is crucial for the reaction to occur. Preliminary tests done with BDDGE also confirmed the same trend (data not shown) for solutions with water content below 30%. The question regarding the nature of this observation is valid and should be studied further.

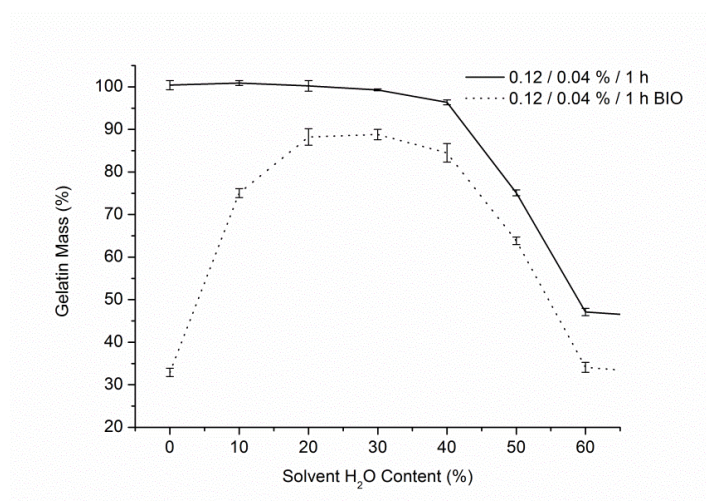


Figure 3. Gelatin content of the samples right after crosslinking with EDC/NHS and after biodegradation test vs. water content in the solvent.

Although gelatin is soluble in water at and above 37 °C, our experience showed that with nanofibrous materials it readily dissolves at lower temperatures. Because of the very large surface area that such materials have, makes it much easier for gelatin to dissolve [27]. Taking this into consideration, we wanted to find a solvent that will make it possible for crosslinking to happen, while not sabotaging the experiment by dissolving gelatin before the reaction can take place. After conducting these series of experiments, we decided to use ethanol/water mixture with a 7:3 *w/w* ratio for all tests planned in the final step (apart from transglutaminase).

3.2. Gelatin Mass Change

To be able to compare crosslinking efficiency in preserving gelatin within the fiber by those four methods, it was decided to arbitrarily define a value of gelatin content, after biodegradation test, that we consider a positive result. We deemed every set of gelatin crosslinking conditions that resulted in at least 85% gelatin retention to be satisfactory and successful.

The only crosslinking agent that failed to reach this value was transglutaminase. Although the samples crosslinked for 24 h with the highest transglutaminase concentration preserved 87% of gelatin, this result did not remain as high after biodegradation (Figure 4). Since transglutaminase is not soluble in organic solvents, there was no other option than to use water as a solvent. As was previously showed, gelatin within the fibers is prone to quick dissolution in aqueous environment, even at room temperature, so it was little to no surprise that the samples after crosslinking for a longer period of time, 72 h, achieved even worse results.

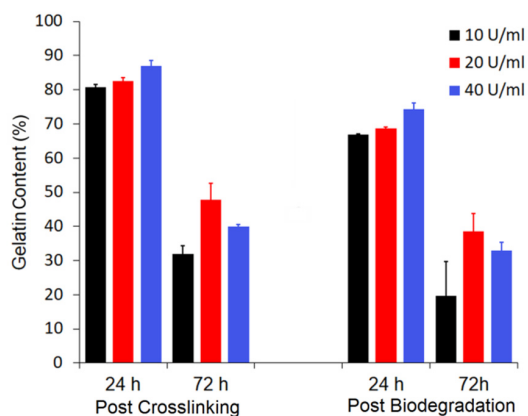


Figure 4. Gelatin content for samples crosslinked with transglutaminase, both after reaction and biodegradation test.

Due to this, transglutaminase was left out of the most comprehensive part of the experiment. The other three crosslinking agents were tested with a vast array of concentrations and reaction times. Gelatin content values for crosslinked samples after biodegradation test are presented in Figure 5a,c,e. To represent zero crosslinking time, there was used a value obtained for control, non-crosslinked samples—for which the gelatin content after biodegradation test was only 27.1%.

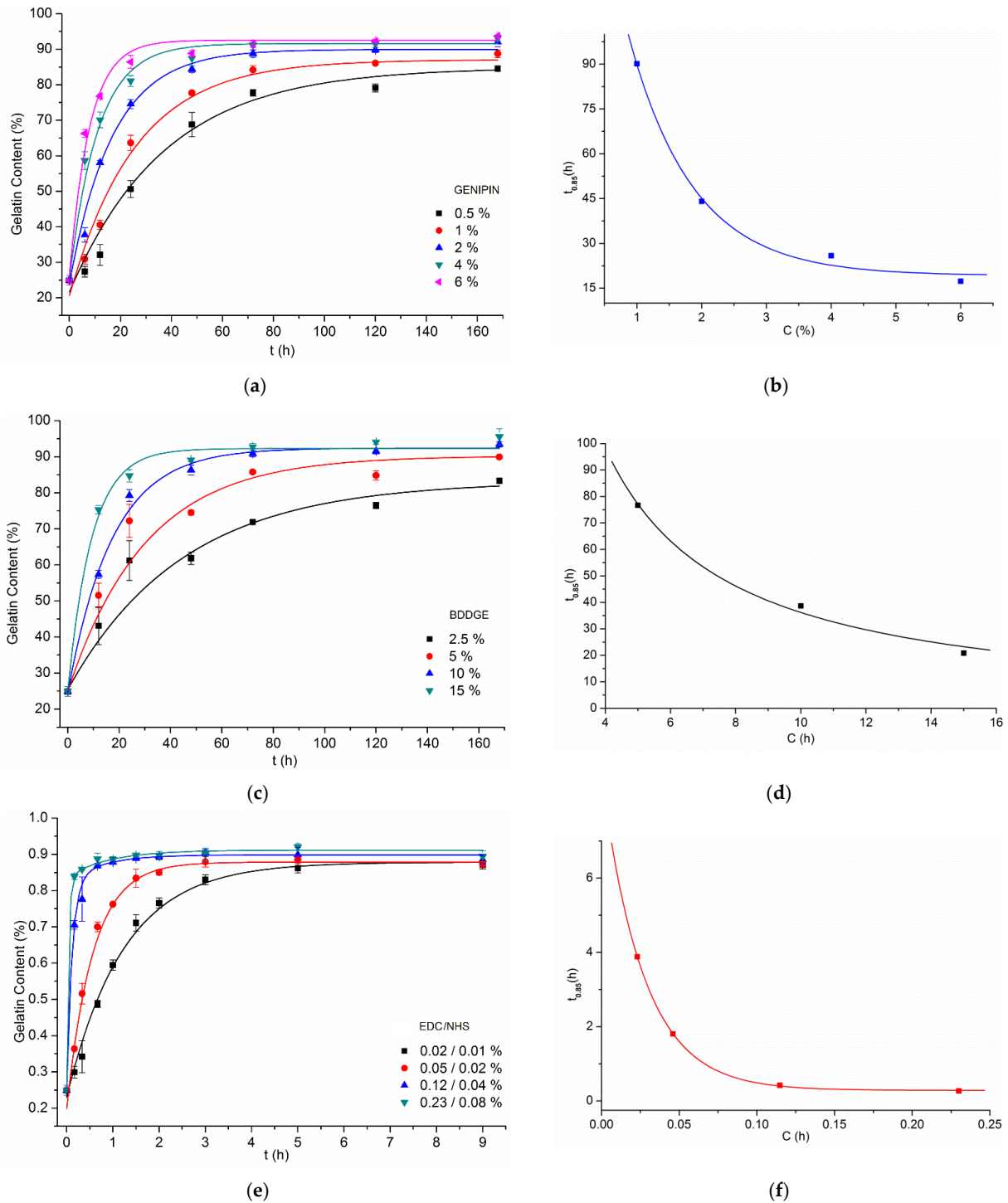


Figure 5. Graphs showing gelatin content after biodegradation test of samples crosslinked with different compounds and with varying conditions (left) and $f(C) = t_{0.85}$ (right) for: (a,b) genipin, (c,d) BDDGE, (e,f) EDC/NHS. In graph (f), C refers to EDC concentration. All presented data were fitted with an exponential function.

From the results of each crosslinking method, a set of points representing crosslinking agent concentration in dependence of time needed to achieve the exact 85% of gelatin content within the fibers, $f(C) = t_{0.85}$ (Figure 5b,d,f) was calculated. This way it is possible to determine a distinct reaction time for any given concentration of crosslinking agent, that will grant 85% gelatin preserved in the material after 24 h of biodegradation. It is also a cut-off line, above which a satisfactory crosslinking efficiency should be expected every time.

Looking at the genipin crosslinking results (Figure 5a), it can be seen that the values of gelatin content above 85% could be achieved for 6% solution in 24 h, for 4% in 48 h, and for 2% in 72 h. Solutions with 0.5% never reached this level, and 1% needed 168 h.

As for BDDGE (Figure 5c), there were needed higher solution concentrations to achieve similar results as for genipin. Solution with the concentration of 15% reached the set threshold of gelatin content in 24 h, 10% needed 48 h, and 5% achieved it in 72 h. Again, the lowest 2.5% concentration was not able to successfully crosslink gelatin during 168 h of experiment. In comparison to genipin, for the examined concentrations, there was needed almost thrice as much time to reach an equal level of crosslinking efficiency, or thrice higher concentration, to achieve this result in the same time.

In the case of EDC/NHS crosslinking method (Figure 5e), even solution with an EDC concentration as low as 0.02% reached 85% gelatin content in 5 h, while 0.23% concentration, which was the highest that was tested, obtained the same result in only 20 min.

The difference in the rate of reaction of EDC/NHS method in comparison to genipin and BDDGE, as well as the gap between the useful concentrations of EDC/NHS and the other two compounds are great. To be able to compare all of these results in one graph a logarithmic scale needed to be used (Figure 6).

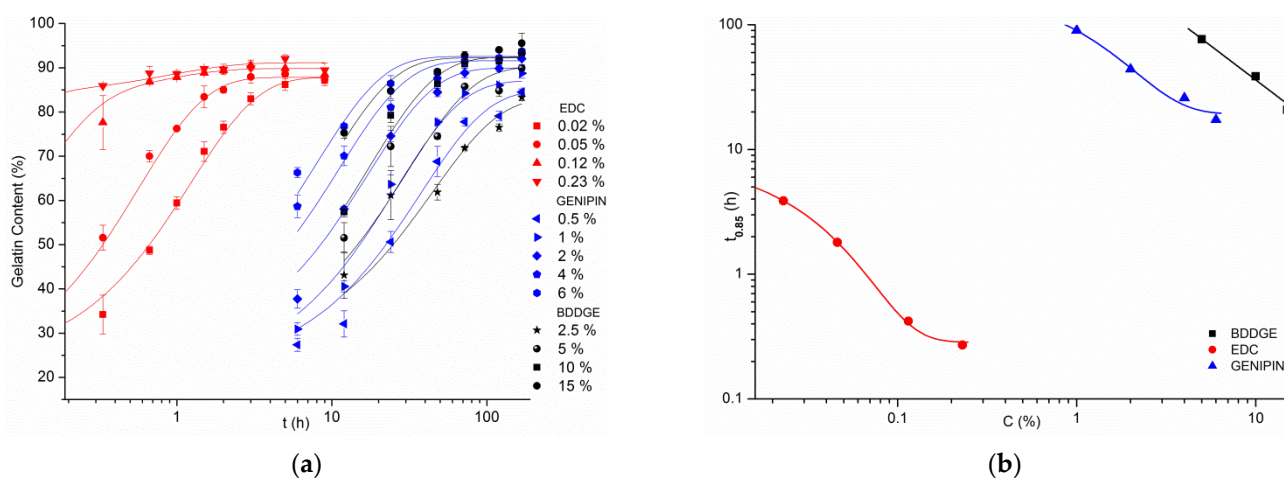


Figure 6. Graphs combining crosslinking results from all experiments: (a) gelatin content after biodegradation test, (b) $f(C) = t_{0.85}$ using logarithmic scales. For EDC/NHS, only EDC concentrations are mentioned, in order not to reduce the transparency of the graphs.

Gathering data from every single crosslinking experiment performed with the use of genipin, EDC/NHS and BDDGE in one graph (Figure 6), can help comprehend how much EDC/NHS method is faster than the other two. It is easy to see that what results can be achieved by EDC/NHS in 1 h corresponds to what is expected from genipin in 10 h, and even more time from BDDGE (Figure 6a). Roughly the same crosslinking efficiency can be obtained for 100 h, lasting experiment by 10% and 1% solutions of BDDGE and genipin, respectively, while we would only need to spend 20 min using 0.1% EDC to get the same result (Figure 6b).

The experimental data of $t_{0.85}$ vs. C were approximated numerically with exponential function, allowing quantitative comparison of the sensitivity of $t_{0.85}$ to the crosslinking agent concentration from the slopes of the double logarithmic plots (Figure 7). It is clear

that the rate of $t_{0.85}$ reduction with increasing crosslinking agent concentration is the fastest for EDC/NHS. Between the other two, BDDGE has a higher slope value than genipin. It may suggest that theoretically, with much higher reagent concentrations, there is a certain concentration for which both would reach the same values of $t_{0.85}$.

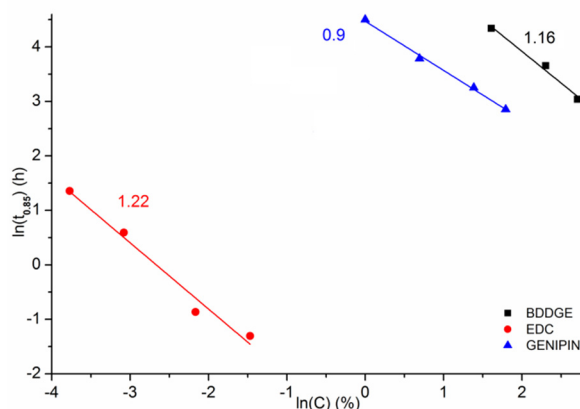


Figure 7. Graph combining $t_{0.85}$ vs. C for all experiments with slope values.

We suppose that two characteristics of EDC crosslinking reaction mechanism may possibly contribute to such a great difference in the rate of gelatin crosslinking reaction with EDC/NHS and the other two compounds.

The first is EDC, being the only zero length crosslinker in the tested group. It means that its concentration in the solution does not decrease during the course of the reaction. EDC molecule after facilitating the formation of a bond, does not become a part of this newly formed linkage, but it is released back into the solution and can be used again in crosslinking reaction for an infinite amount of times. Both genipin and BDDGE embed themselves between the two functional groups that they eventually link, and so their concentration does decrease in time.

The second reason is the fact that, again, EDC is the only crosslinking agent here, that helps create a bond between a COOH and a NH₂ group, when genipin and BDDGE insert themselves between two NH₂ groups. While each gelatin molecule has numerous NH₂ groups from lysine and arginine, it also has an even bigger amount of COOH groups from aspartic and glutamic acid [28]. It alone multiplies the number of possible bonds to be formed within for the same amount of gelatin by two. Simultaneously to a reaction occurring between two gelatin molecules, EDC is also linking COOH groups from polycaprolactone and NH₂ groups from gelatin, creating a strong interface between polycaprolactone and gelatin within the fiber. This may be a factor in prevention of gelatin leaching from the fiber in aqueous environment.

3.3. Morphology of the Fibres

One of the criteria of a good crosslinking agent for the bicomponent PCL/Gt nanofibers is that, apart from the ability to prevent gelatin from leaching in aqueous medium, it at the same time does not damage fiber morphology.

The 24 h biodegradation experiments showed that a control PCL/Gt, non-crosslinked sample is left with only 27.1% of its initial gelatin content. The smooth and uniform fibers (Figure 8a) after most of the gelatin addition is left, become eroded, with clearly visible grooves and elongated holes (Figure 8b).

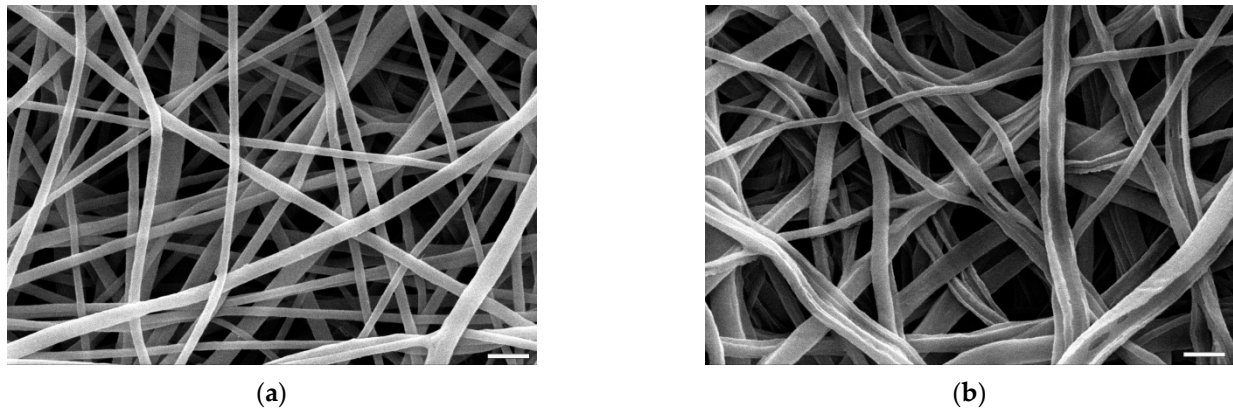


Figure 8. SEM images of control non-crosslinked samples: (a) before, (b) after biodegradation test. The marker equals 10 μm .

For the purpose of comparing the morphology of fibers after crosslinking, there were selected images presenting only materials of which gelatin content after biodegradation test was not less than 85% (Figure 9). This prerequisite was defined in order to establish crosslinking conditions that meet both morphology and gelatin retention simultaneously. The only exception in this comparison is a picture (Figure 9a,b) of a sample crosslinked with transglutaminase that had a gelatin content after biodegradation test of 74% (which was the best result for this method).

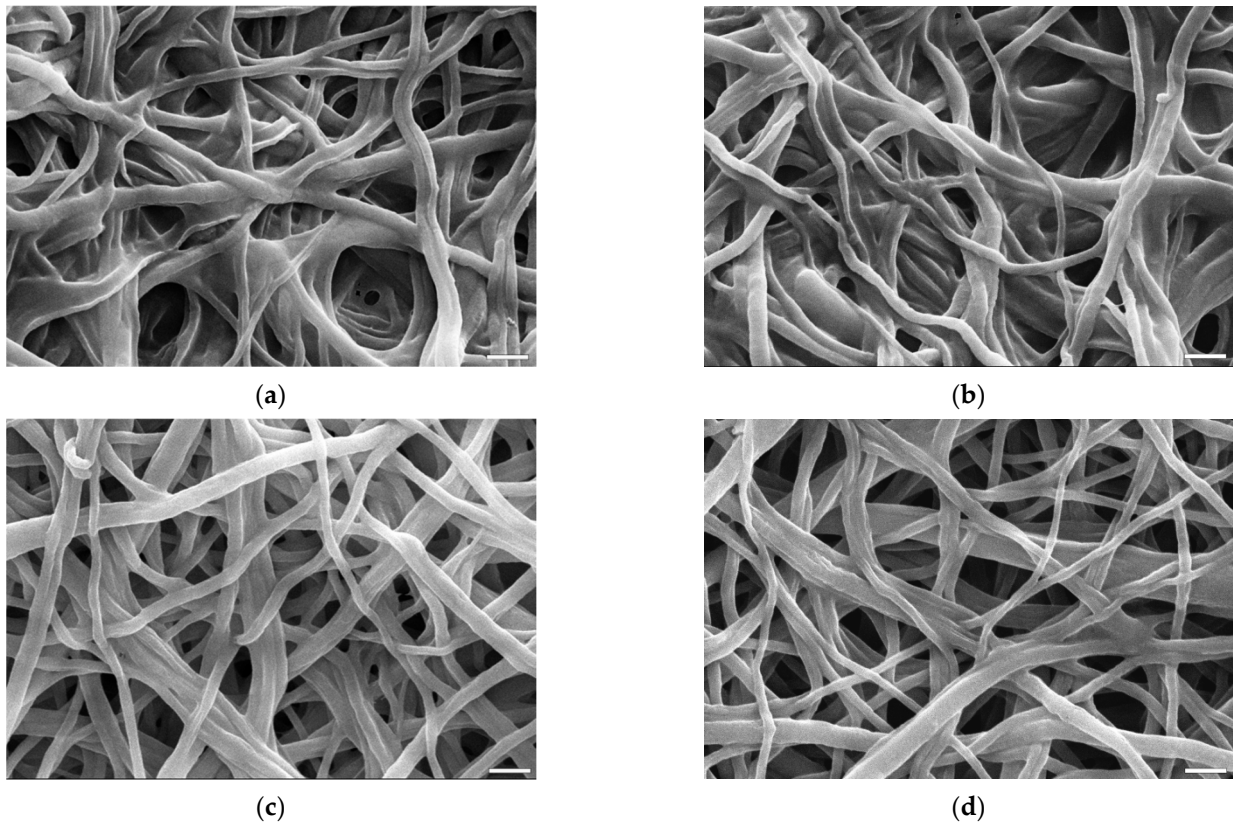


Figure 9. *Cont.*

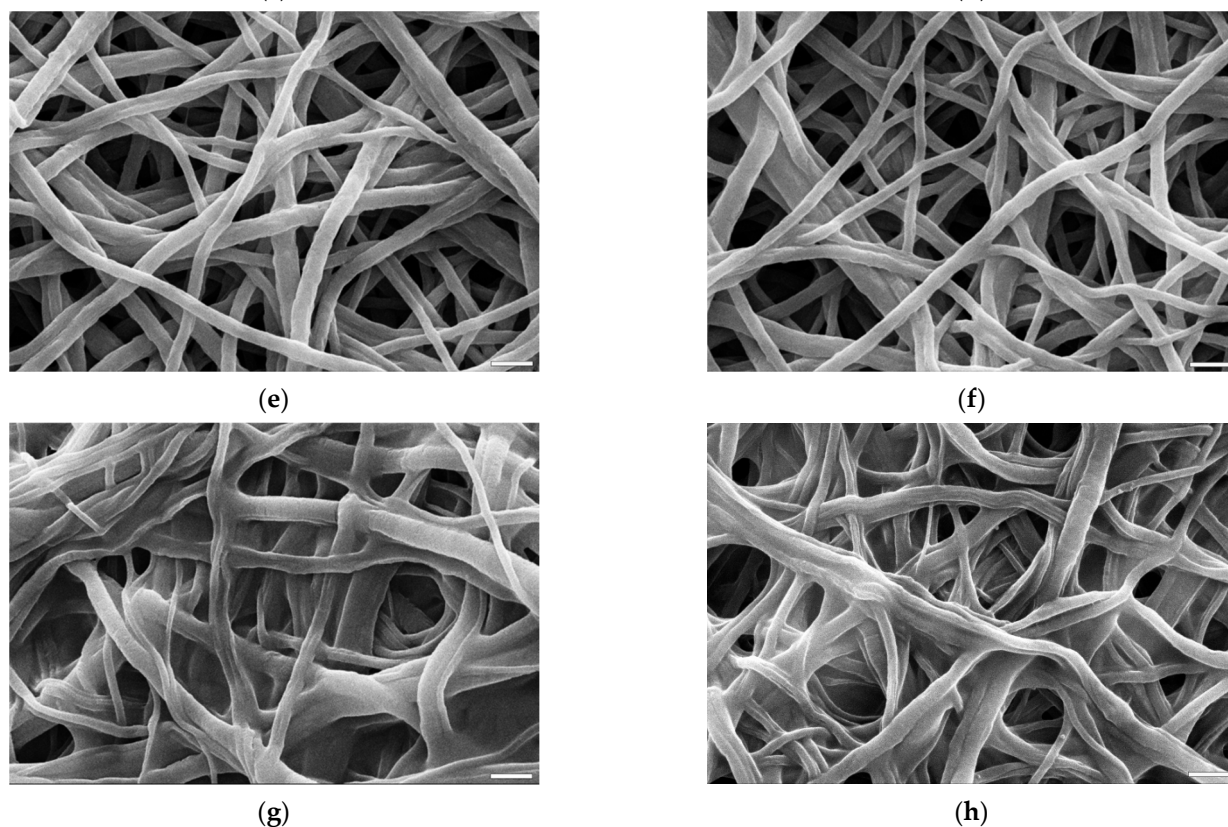


Figure 9. SEM images of samples crosslinked with different methods: before (left) and after (right) 24 h of biodegradation test: (a,b) transglutaminase 40 U/mL, 24 h, (c,d) genipin 4%, 48 h, (e,f) EDC/NHS 0.12%/0.04%, 40 min, (g,h) BDDGE 10%, 48 h. The marker equals 10 μm .

Figure 9 presents SEM images of samples' morphology after crosslinking with all four compounds and after biodegradation test. The differences between these pairs of images for each crosslinking method are minimal, which shows that the majority of the damage to the fibers' shape and nonwoven architecture happened during crosslinking process.

While none of the crosslinking methods preserved every aspect of the fibers' morphology, the results differ in the damage extent. The samples that underwent crosslinking with both EDC/NHS and genipin (Figure 9c–f) maintained, for the most part, the thickness of the fibers. In both cases, fibers were slightly wavy and wrinkled with minimal fusing but overall fiber arrangement was preserved. On the opposite side are the fibers crosslinked with transglutaminase and BDDGE (Figure 9a,b,g,h). In both materials fibers were heavily fused together, the pores irregular in size and in a small number. For transglutaminase, it might be an effect of both insufficiently crosslinked fibers as well as crosslinking reaction taking place in fully water based solution.

3.4. Gelatin FT-IR Analysis

FT-IR analysis of gelatin within the crosslinked materials has been focused on amide I and amide II bands being two major bands of the protein infrared spectrum. The amide I band located between 1600 and 1700 cm^{-1} is mainly associated with the C=O stretching vibration, while amide II band in the range 1510–1580 cm^{-1} results from the N-H bending vibration and from the C-N stretching vibration [29]. Both bands are sensitive to the molecular conformation.

Because of a multicomponent nature of both bands and their relatively large width, particularly for amide I, gelatin content determination in investigated samples from the bands intensity was not reliable, particularly in comparison with the weight change measurement. What is evident from FT-IR spectra in Figure 10 is the shift of the maximum absorbance of amide II band toward higher wave numbers in crosslinked samples com-

pared to non-crosslinked material. This shift is an evidence of the crosslinking process, which affects clearly bending vibrations of N-H and/or stretching vibrations of C-N bonds.

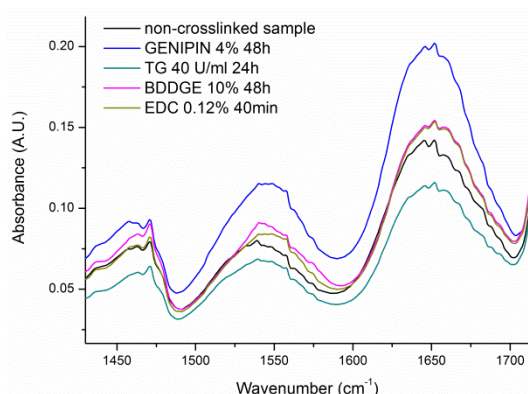


Figure 10. Characteristic FT-IR spectra of PCL/Gt nonwoven samples crosslinked with different methods after biodegradation test (samples in correspondence to SEM analysis). As a control a non-crosslinked sample before biodegradation test was used.

4. Conclusions

The systematic analysis of gelatin crosslinking within PCL/Gt fibers electrospun from acetic and formic acid solution resulted in optimization for the first time of parameters of the crosslinking process for this type of material. The established process conditions with low reagent concentrations and short reaction times lead to PCL/Gt fibers with high gelatin content and stable morphology after 24 h of biodegradation test.

Taking into account low concentrations of the reagents and short reaction times needed for EDC/NHS to perform a successful reaction, the results presented in this work proved that this method meets all criteria mentioned above best. EDC/NHS was also shown to have a small effect on fibers' morphology. It is worth noting that as EDC is a zero-length crosslinker and no reagent is present in the material after it rinsing.

Further optimization studies of EDC/NHS crosslinking conditions will be performed on a group of nonwovens with a varying PCL to gelatin ratios, as well as a different solvent used in electrospinning. Crosslinked samples will undergo biodegradation for up to 30 days, uniaxial tensile testing as well as cytotoxicity and cellular response studies.

Maintaining gelatin presence within the materials as well as preserving fibers' morphology is crucial from the point of view of possible applications of PCL/Gt nonwovens. We believe using EDC/NHS as a crosslinking agent for these bicomponent electrospun nanofibers, elevates greatly their potential in the field of tissue engineering and regenerative medicine therapies.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, analysis and investigation, J.D.; writing—original draft preparation, J.D.; writing—review and editing, P.S. and J.D.; visualization, J.D.; supervision, P.S.; funding acquisition, J.D. and P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Polish National Science Center (NCN) under the Grant No.: 2015/17/N/ST8/02027.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable for this article.



Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Agarwal, S.; Wendorff, J.H.; Greiner, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **2008**, *49*, 5603–5621. [[CrossRef](#)]
2. Ma, P.X. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 184–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Leung, V.; Ko, F. Biomedical applications of nanofibers. *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 350–365. [[CrossRef](#)]
4. Denis, P.; Dulnik, J.; Sajkiewicz, P. Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System. *Int. J. Polym. Mater.* **2015**, *64*, 354–364. [[CrossRef](#)]
5. Woodruff, M.A.; Hutmacher, D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1217–1256. [[CrossRef](#)]
6. Mondal, D.; Griffith, M.; Venkatraman, S.S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *Int. J. Polym. Mater.* **2016**, *65*, 255–265. [[CrossRef](#)]
7. Dulnik, J.; Kołbuk, D.; Denis, P.; Sajkiewicz, P. The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres. *Eur. Polym. J.* **2018**, *104*, 147–156. [[CrossRef](#)]
8. Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415. [[CrossRef](#)]
9. Beamish, J.A.; Fu, A.Y.; Choi, A.; Haq, N.A.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R.E. The influence of RGD-bearing hydrogels on the re-expression of contractile vascular smooth muscle cell phenotype. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4127–4135. [[CrossRef](#)]
10. Dulnik, J.; Denis, P.; Sajkiewicz, P.; Kołbuk, D.; Choińska, E. Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system. *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *130*, 10–21. [[CrossRef](#)]
11. Masutani, E.M.; Kinoshita, C.K.; Tanaka, T.T.; Ellison, A.K., D.; Yoza, B.A. Increasing Thermal Stability of Gelatin by UV-Induced Cross-Linking with Glucose. *Int. J. Biomater.* **2014**, *2014*, 979636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhan, J.; Lan, P. The Review on Electrospun Gelatin Fiber Scaffold. *J. Res. Updates Polym. Sci.* **2012**, *1*, 59–71. [[CrossRef](#)]
13. Weadock, K.S.; Miller, E.J.; Keuffel, E.L.; Dunn, M.G. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *32*, 221–226. [[CrossRef](#)]
14. Bigi, A.; Panzavolta, S.; Rubini, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5675–5680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. OldeDamink, L.H.H.; Dijkstra, P.J.; van Luyn, M.J.A.; van Wachem, P.B.; Nieuwenhuis, P.; Feijen, J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1995**, *6*, 460–472. [[CrossRef](#)]
16. Thi-Hiep, N.; Byong-Taek, L. Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2010**, *3*, 1117–1124. [[CrossRef](#)]
17. Lien, S.-M.; Li, W.-T.; Huang, T.-J. Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28*, 36–43. [[CrossRef](#)]
18. Clercq, K.D.; Schelfhout, C.; Bracke, M.; Wever, O.D.; Bockstal, M.V.; Ceelen, W.; Remon, J.P.; Vervaet, C. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a strategy to prevent postsurgical peritoneal adhesions: In vitro and in vivo characterization. *Biomaterials* **2016**, *96*, 33–46. [[CrossRef](#)]
19. Davidenko, N.; Schuster, C.F.; Bax, D.V.; Raynal, N.; Farnedale, R.W.; Best, S.M.; Cameron, R.E. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomater.* **2015**, *25*, 131–142. [[CrossRef](#)]
20. Goodarzi, H.; Jadidi, K.; Pourmotabed, S.; Sharifi, E.; Aghamollaei, H. Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 620–632. [[CrossRef](#)]
21. Hajiabbas, M.; Alemzadeh, I.; Vossoughi, M. A porous hydrogel-electrospun composite scaffold made of oxidized alginate/gelatin/silk fibroin for tissue engineering application. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *245*, 116465. [[CrossRef](#)]
22. Fiorani, A.; Gualandi, C.; Panseri, S.; Montesi, M.; Marcacci, M.; Focarete, M.L.; Bigi, A. Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 2313–2321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dias, J.R.; Baptista-Silva, S.; Oliveira, C.M., T.; Sousa, A.; Oliveira, A.L.; Bártolo, P.J.; Granja, P.L. In situ crosslinked electrospun gelatin nanofibers for skin regeneration. *Eur. Polym. J.* **2017**, *95*, 161–173. [[CrossRef](#)]
24. Chau, D.Y.S.; Collighan, R.J.; Verderio, E.A.M.; Addy, V.L.; Griffin, M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6518–6529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bertoni, F.; Barbani, N.; Giusti, P.; Ciardelli, G. Transglutaminase reactivity with gelatine: Perspective applications in tissue engineering. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 697–702. [[CrossRef](#)]
26. Collighan, R.J.; Griffin, M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: Biological significance and medical applications. *Amino Acids* **2009**, *36*, 659–670. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, Y.Z.; Venugopal, J.; Huang, Z.-M.; Lim, C.T.; Ramakrishna, S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer* **2006**, *47*, 2911–2917. [[CrossRef](#)]
28. Eastoe, J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem. J.* **1955**, *61*, 589–600. [[CrossRef](#)]
29. Rabotyagova, O.S.; Cebe, P.; Kaplan, D.L. Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2008**, *28*, 1420–1429. [[CrossRef](#)]

Article

A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization

Judyta Dulnik , Oliwia Jeznach and Paweł Sajkiewicz * 

Laboratory of Polymers and Biomaterials, Institute of Fundamental Technological Research Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5b, 02-106 Warsaw, Poland

* Correspondence: psajk@ippt.pan.pl

Abstract: Polyester-based scaffolds are of research interest for the regeneration of a wide spectrum of tissues. However, there is a need to improve scaffold wettability and introduce bioactivity. Surface modification is a widely studied approach for improving scaffold performance and maintaining appropriate bulk properties. In this study, three methods to functionalize the surface of the poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) PLCL fibres using gelatin immobilisation were compared. Hydrolysis, oxygen plasma treatment, and aminolysis were chosen as activation methods to introduce carboxyl (-COOH) and amino (-NH₂) functional groups on the surface before gelatin immobilisation. To covalently attach the gelatin, carbodiimide coupling was chosen for hydrolysed and plasma-treated materials, and glutaraldehyde crosslinking was used in the case of the aminolysed samples. Materials after physical entrapment of gelatin and immobilisation using carbodiimide coupling without previous activation were prepared as controls. The difference in gelatin amount on the surface, impact on the fibres morphology, molecular weight, and mechanical properties were observed depending on the type of modification and applied parameters of activation. It was shown that hydrolysis influences the surface of the material the most, whereas plasma treatment and aminolysis have an effect on the whole volume of the material. Despite this difference, bulk mechanical properties were affected for all the approaches. All materials were completely hydrophilic after functionalization. Cytotoxicity was not recognized for any of the samples. Gelatin immobilisation resulted in improved L929 cell morphology with the best effect for samples activated with hydrolysis and plasma treatment. Our study indicates that the use of any surface activation method should be limited to the lowest concentration/reaction time that enables subsequent satisfactory functionalization and the decision should be based on a specific function that the final scaffold material has to perform.

Keywords: surface activation; functionalization; electrospun fibres; hydrolysis; plasma; aminolysis



Citation: Dulnik, J.; Jeznach, O.; Sajkiewicz, P. A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 272. <https://doi.org/10.3390/jfb13040272>

Academic Editor: Anderson de Oliveira Lobo

Received: 25 October 2022

Accepted: 30 November 2022

Published: 2 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Polymers are frequently used in tissue engineering applications due to the ease of adjusting their mechanical properties, fabrication to the desired shape, and the possibility of chemical modification [1]. Among them, aliphatic polyesters play an important role as they degrade chemically by hydrolysis, or less often, enzymatic processes without toxic products [2,3]. Lactide, caprolactone, and glycolide are the commonly used monomers to synthesise aliphatic polyesters and copolymers that are applied in tissue engineering [4]. Polymers can be manufactured using various techniques, e.g., electrospinning [5], 3D printing [6], and freeze-extraction [7]. Their bulk properties can be tailored via various methods, e.g., copolymerization [8], controlled crystallization [9], or the use of additives [10]. Thanks to the possibility of properties modification, polyester-based scaffolds are of research interest in the regeneration of a wide spectrum of tissues including skin [11], blood vessels [12], neural tissue [13], bladder tissue [14], bone [15], tendon [16], etc.

However, the functionality of polyester scaffolds in tissue engineering applications is limited by their surface properties—hydrophobicity and lack of bioactivity [3].

A few approaches are implemented to introduce missing bioactivity: using a decellularized natural extracellular matrix (ECM) as a scaffold [17–19], fabrication of scaffold from natural polymers containing adequate peptide sequences [20–22], or manufacturing synthetic-natural polymer composites [23–25]. Nowadays, a lot of attention is devoted in particular to the studies on biomolecule immobilisation on the surface of synthetic polymers to impart bioactivity and take advantage of their suitable mechanical properties and manufacturability [3].

It is well-known that cells are connected with the ECM via their receptors—integrins that recognize special peptide sequences. Up to now, a lot of sequences were found in the so-called cell adhesion molecules [26]. The accessibility of peptide sequence for given cell receptors is determined by the conformation of individual proteins and modulated by immediately adjacent amino acids [27]. One of the most examined is the Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD) motif, which is present mainly in fibronectin and the denatured form of collagen. RGD sequence present in gelatin is recognized by various types of cells, and in the case of L929 fibroblast cells via $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins [28]. Gelatin attachment to fibrous materials made of aliphatic polyesters has been shown to improve cell attachment and spreading [29].

The simplest method of surface modification by attaching a bioactive molecule like gelatin is physisorption, which is conducted by immersing the material in a biomolecule solution. In this case, electrostatic interactions, hydrogen bonds, van der Waals forces, and hydrophobic interactions are responsible for binding biomolecules with the surface [30]. Another physical approach is a layer-by-layer technique, which consists of depositing alternating layers of oppositely charged materials [31]. Mild conditions, simplicity, and applicability to a lot of materials are advantages of physical methods [23]. However, weak interactions could result in the instability of the coating. A second concern is the loss of functionality due to the conformational changes of a biomolecule, especially caused by hydrophobic interactions [32]. Chemical immobilisation is an alternative way to introduce bioactive molecules on the scaffold surface. The first step is the addition of functional groups on the surface to provide the binding site with a biomolecule. It is achieved by various methods, e.g., wet chemical methods, such as hydrolysis and aminolysis [33], photographing of poly(acrylic acid) or poly(methacrylic acid) [34], thiol bonding [35], and azide-alkyne click chemistry [36], etc. The main benefit of this kind of functionalization is a stable coating provided by covalent bonding between polymer and biomolecule. However, it should be taken into consideration that some of these methods could be destructive to materials [37,38] and by-products could exhibit cytotoxicity [39], so the method optimization toward specific materials is required.

Among the variety of biodegradable polymers commonly used in tissue engineering, poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) PLCL has been reported to be the most promising candidate for tissue engineering. PLCL surpasses aliphatic polyester-like poly(L-lactic acid) (PLLA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) in some of their properties. The most important disadvantages of PLLA and PCL are related to mechanical properties—PLLA and PLGA exhibit high strength and poor toughness, whereas PCL has good toughness but low strength [40–42].

By the association of PLLA with PCL into PLCL copolymer the advantages of both PLLA and PCL are obtained together with compensation; both the brittle behaviour of PLLA and the low stiffness of PCL [43,44] as well as the local acidification reduction due to the degradation of PLLA [45]. PLCL also offers an adjustable degradation rate adapted to its use in tissue engineering, tailorable by changing the PCL/PLLA ratio [46]. A strong shape-memory effect has also been observed for PLCL, depending on PCL/PLLA ratio [47].

In general, it may be concluded that PLCL is the most suitable polymer for various tissue engineering applications, particularly when adjustable elasticity and degradability are required. For instance, a braided PLCL scaffold (PLLA/PCL ratio = 85/15) has been recently designed for ligament tissue engineering [48].

Therefore, the main objectives of this work were to examine surface activation methods such as hydrolysis, oxygen plasma, and aminolysis acting as a first step in functionalising a

PLCL nonwoven material with gelatin and to compare the resulting material's properties. Our goal was to provide comprehensive data that could be useful to many people while deciding what method to use for their specific needs. Since gelatin has both $-NH_2$ and $-COOH$ groups in abundance [49], in order to form a covalent bond between gelatin and fibres' surface, grafting methods such as 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) coupling and glutaraldehyde crosslinking were used. Additionally, materials after physical entrapment of gelatin and immobilisation using EDC/NHS coupling without previous activation were prepared as controls. All the approaches were compared for their immobilisation effectiveness and stability, impact on fibres morphology, wettability, chemical structure, molecular weight, functionalization stability as well as mechanical properties and L929 cells response.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

PLCL 70:30 (Resomer[®] LC703S, inherent viscosity = 1.3–1.8 dL/g, $T_g = 32\text{--}42\text{ }^\circ\text{C}$) was purchased from Evonik (Essen, Germany). Hexafluoroisopropanol (HFIP) (purity degree 98.5%) was procured from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). Ethylenediamine (EDA) (purity degree 99.5%), sodium hydroxide (NaOH), isopropanol (purity degree 99.8%), glutaraldehyde (GTA, conc. 25%), and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland). Gelatin (G1890, type A, gel strength ~ 300 g Bloom) and bicinchoninic acid (BCA) assay kit (QuantiPro[™], for 0.5–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein conc.) was supplied by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7.4, Foetal Bovine Serum (FBS), Trypsin EDTA, antibiotic (Penicillin-Streptomycin 10,000 U/mL), Presto Blue, NucBlue, and ActinGreen were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Mouse fibroblast L929 were purchased from Sigma-Aldrich (ATTC).

2.2. Electrospinning

All materials were electrospun using a Fluidnatek LE-50 electrospinning machine by Bioinicia (Valencia, Spain). The polymer solution was prepared by dissolving PLCL in HFIP with 7% *w/w* polymer concentration and stirred for 24 h at room temperature. Two needles were fed with polymer solution at a rate of 3 mL/h each and the voltage was kept in a 11–13 kV range. A drum collector (\varnothing 5 cm) was rotating at 300 RPM speed and the distance from a needle tip to a collector's surface was set to 15 cm. Electrospinning took place in monitored air conditions set for 38 $^\circ\text{C}$ temperature and 40% humidity. Temperature elevated to the polymer's glass transition temperature (as provided by the manufacturer $T_{g\text{PLCL}} 32\text{--}42\text{ }^\circ\text{C}$) was used in order to avoid shrinking that happens after electrospinning of PLCL nonwoven at room temperature (20–23 $^\circ\text{C}$).

After electrospinning was completed, to make sure no residual solvent was present in the fibres, nonwoven mats were kept under a fume hood overnight and then transferred to a vacuum oven set to 50 mBar for 24 h at room temperature. All surface activation/crosslinking/functionalization steps were carried out on 4.5 cm \times 4.5 cm squares that electrospun materials were cut into.

2.3. Optimization of Surface Activation Methods

In order to determine the optimal parameters for the chosen surface activation methods, each of them was performed with a set of varying conditions (Table 1). All samples were then subjected to a series of tests to assess their morphology, physicochemical properties, and activation efficiency. This approach enabled the selection of a final set of samples with an already activated surface to undergo the next steps of functionalization.

Table 1. Initial set of surface activation conditions applied in the optimisation step.

Activation Method	Optimisation Conditions	
	Treatment Time	Reagent Concentration
Cold oxygen plasma	5, 10, 15, 40, 60 (s)	-
Alkaline hydrolysis	10, 30, 60, 180 (min)	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 (M NaOH)
Aminolysis	5, 10, 15, 30 (min)	2, 6, 10 (% <i>w/v</i> EDA in isopropanol)

2.3.1. Hydrolysis

Alkaline hydrolysis experiments were performed at room temperature (25 °C). Samples were submerged in NaOH solutions with concentrations 0.05 M, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M, and 1 M for 10 min, 30 min, 60 min, and 180 min as mentioned in Table 1. An additional sample underwent a reaction in 1 M NaOH solution for 360 min to determine changes that occur in material subjected to extreme conditions. After appointed reaction times, samples were transferred to 0.01 M HCl solution for protonation of newly created COO- groups and subsequently to demineralised water for rinsing. Thus prepared samples were dried in a vacuum oven at room temperature. Because of the observed decrease in thickness of samples treated with higher NaOH concentrations, the samples that were chosen for functionalization were also subjected to weight and thickness measurements before and after the surface activation step.

2.3.2. Plasma

Cold oxygen plasma surface activation process was performed using a Plasma Cleaner (Diener, ZEPTO PCCE, Ebhausen, Germany) machine. All samples underwent plasma treatment with the same, low—1%, of instrument's power, with 0.1 mBar oxygen pressure, for a broad range of times: 5 s, 10 s, 15 s, 25 s, 40 s, and 60 s as mentioned in Table 1.

2.3.3. Aminolysis

This part of the experiments was based on the data collected in our previous study on aminolysis, where an increase in the amount of NH₂ groups with the diamine concentration and reaction time was observed and described [50]. Three concentrations—2%, 6%, and 10% *w/v*, and four different times—5 min, 10 min, 15 min, and 30 min were examined, as mentioned in Table 1. For this work, to provide various amounts of NH₂ groups on the materials' surface for the functionalization study, three different reaction conditions were chosen that result in an amount of free NH₂ groups on the surface equal to $1.42 \pm 0.08 \times 10^{-8}$ mol/mg, $5.43 \pm 0.90 \times 10^{-8}$ mol/mg, and $8.63 \pm 1.16 \times 10^{-8}$ mol/mg for A1, A2, and A3 samples, respectively. Aminolysis was conducted by immersing samples in ethylenediamine/isopropanol solution, the temperature of the reaction was set at 30 °C. The process was conducted in an orbital shaker incubator. After aminolysis samples were washed three times in deionized water and dried under a vacuum overnight.

2.4. Functionalization

Gelatin immobilisation was executed via a three-step approach. First, PLCL nonwoven materials cut into 4.5 cm × 4.5 cm squares were subjected to one of the three surface activation processes: hydrolysis, cold oxygen plasma, or aminolysis. The final set of process parameters was chosen for each method based on the results of the optimization step: hydrolysis—0.1 M, 0.25 M, 0.5 M, and 1 M. for 3 h, for plasma—10 s and 40 s of treatment, for aminolysis—three sets of EDA concentration and reaction time: 2%—5 min, 2%—10 min, and 6%—5 min on the basis of the results from a previous study [50].

The next step consisted of gelatin crosslinking. Samples after surface activation with hydrolysis and plasma were placed for 1 h in *w/w* 0.23%/0.12% EDC/NHS solution in ethanol:water mixture with at 7:3 ratio. Simultaneously, a set of samples after aminolysis

were placed in 1% *w/v* GTA in a water solution for 2.5 h at 24 °C to compare cross-linking methods. All of the samples were thoroughly rinsed in demineralized water and right afterwards submerged in 0.2% gelatin solution for 20 h at 37 °C. Gelatin immobilisation was completed to make sure no unattached gelatin was present within the material, and samples were once again placed in demineralized water and stirred, this time for 24 h at 37 °C. Two control samples of PLCL without surface activation were prepared. One placed in an EDC/NHS solution followed by a gelatin bath, the other one only going through the last step. All functionalized sample names are specified in Table 2.

Table 2. Names of all samples that underwent functionalization.

Surface Activation Method	Time	Reagent Concentration	Crosslinking Method	Name
Hydrolysis	3 h	1 M	EDC/NHS	H1
		0.5 M		H0.5
		0.25 M		H0.25
		0.1 M		H0.1
Plasma	10 s	-	EDC/NHS	P10
	40 s			P40
Aminolysis	5 min	2% <i>w/v</i>	GTA	A1
	10 min	2% <i>w/v</i>	GTA	A2
	5 min	6% <i>w/v</i>	GTA	A3
Control (no activation)	-	-	EDC/NHS	CEN
			-	C

2.5. Functionalization

2.5.1. Water Contact Angle

Water contact angle was measured with a goniometer (Data Physics OCA 15EC, Filderstadt, Germany) using the sessile drop method. For each sample, the water contact angle was measured not less than 10 times. For each measurement, the angle was recorded at 0.5 s, 3 s, 10 s, and 30 s after placing the demineralized water drop on the surface of a sample.

2.5.2. Nonwovens Morphology

Scanning electron microscopy images (JSM-6010PLUS/LV InTouchScope™, JEOL, Tokyo, Japan) were taken of each sample in order to assess changes in their morphology after the surface activation process and then again after the functionalization step. Samples were sputter-coated with approx. 10 nm of gold.

2.5.3. Quantification of -COOH Groups

Both plasma and hydrolysis treatments were expected to increase the -COOH group density on the material's surface. Toluidine blue-O test was performed to assess how effective those processes were in various conditions. This colourimetric method works by dye-staining deprotonated carboxyl groups on fibres' surfaces through ionic interaction. Here, an adapted routine proposed by Gupta et al. [51] was used. Briefly, a 0.5 mM solution of toluidine dye with pH10 was prepared. Samples were soaked in it for 5 h at 37 °C. Afterwards, nonwovens were thoroughly rinsed with NaOH of pH 9 to remove any unattached dye. Next, the samples were transferred to acetic acid 50% *w/w* solution to detach the dye in order to measure its concentration with a UV-vis spectrophotometer at 630 nm (The Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.5.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

A series of infrared attenuated total reflectance (ATR) spectroscopy tests were performed for two main purposes. First, during the optimization part of the work, to determine the changes that occur in the materials subjected to hydrolysis and plasma treatment, and later to assess the efficiency of gelatin attachment to the materials functionalized after

surface activation with all three types of treatment. The infrared ATR spectroscopy tests were conducted with a spectrometer Bruker Vertex 70 (Mannheim, Germany).

2.5.5. Molecular Weight

Molecular weight measurements were performed using a Nexera (Shimadzu, Japan) device with THF as eluent. Gel permeation chromatography (GPC) equipment consisted of a pump, column (Phenogel™ 5 μm 10⁵ Å, Phenomenex), refractive index detector (RID-20A, Shimadzu), and LabSolutions GPC software. All samples were dissolved in THF in 2 mg/mL concentration by vortex stirring for 24 h at room temperature and then filtered with hydrophobic polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filters with 0.22 μm pore size. THF was used as a mobile phase with a flow rate equal to 1 mL/min. The temperature was set at 40 °C. The molecular weight results were calculated using a polystyrene standard (number averaged molecular weight from 3470 Da to 2,520,000 Da) calibration curve coupled with the Mark–Houwink equation where $\alpha = 0.7$, $K = 14.1 \times 10^{-5}$ dL/g for polystyrene standard polymer, and α is 0.68, K is 4.84×10^{-4} dL/g for PLCL according to Nuuttilla M. et al. [52] were used.

2.5.6. Mechanical Tests

Mechanical tests were conducted using a Lloyd EZ-50 (United States of America) device. Uniaxial tensile testing was performed with a 5 mm/min extension speed. From each type of material three 50 mm \times 5 mm rectangular samples were cut, their thickness was measured at the ends and the results were averaged. For testing a sample was placed in between two rubber-lined clamps, leaving the 20 mm \times 5 mm part of the sample to be extended.

2.5.7. Functionalization Stability

In order to determine the stability of gelatin coating on fibres' surfaces, all the samples underwent testing in conditions mimicking the environment of a living organism. Each sample (4.5 cm \times 4.5 cm) was immersed in 100 mL of PBS with a pH of 7.4 and placed in an orbital shaker at 37 °C, 100 RPM (revolutions per minute). To prevent bacterial or fungi growth, sodium azide in a concentration of 0.1% was added. After 24 h and 7 days, samples were taken out and washed with demineralized water and dried with a vacuum oven.

2.5.8. Quantification of Gelatin Amount on Fibres' Surfaces

The amount of protein on fibres' surfaces was measured both right away after functionalization as well as after biodegradation using a BCA assay kit (QuantiPro™, for 0.5–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein conc.). For each of the modified materials, three samples of weight $1 \pm \text{mg}$ were investigated. Each sample was put into an Eppendorf vial and 0.5 mL of deionized water with 0.5 mL of BCA solution was added to the vial. To obtain a calibration curve, gelatin solutions of concentrations in the range of 5–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared. The samples, as well as calibration solutions, were incubated for 2 h at 37 °C. Absorbance was measured with a UV-vis spectrophotometer at 560 nm. Results were shown as the amount of gelatin on the surface in μg per mg of fibrous sample.

2.6. Functionalization

The mouse fibroblast L929 cell line that was used to perform all cellular tests was purchased from Sigma-Aldrich (ATTC). The culture medium used consisted of 89% Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 10% foetal bovine serum, and 1% antibiotic (penicillin-streptomycin). For cytotoxicity on extracts and direct contact tests, nonwovens were cut into 5 mm and 10 mm discs, respectively, sterilised with 80% ethanol and UV light for 30 min for each side.

2.6.1. Quantitative Tests: Cytotoxicity on Extracts and Viability Test in Direct Contact

For the cytotoxicity test, material extracts were obtained by placing 5 samples (5 mm in diameter) of each nonwoven type in a 96-well plate, then 200 μ L of culture medium was added to each well, and afterwards the plate was kept at 37 °C and gently stirred for 24 h. At the same time, another 96-well plate was seeded with 10^4 cells/well and placed for 24 h in an incubator (37 °C, 5% CO₂). After 24 h the culture medium in the cell-seeded wells was replaced with material extracts and put in the incubator for another 24 h.

To assess cell viability in direct contact with the materials, for each time point (1, 2, 3 days), 3 samples (10 mm in diameter) were placed in separate 48-well plates and seeded with a density of 10^4 cells/well and the plates were then put into the incubator. For the 0-day control time point, the same number of cells was seeded into 3 empty wells and the viability test was performed after 5 h so that cells had time to attach to the surface of the well bottom.

For both cytotoxicity on extracts and 0–3-day tests in direct contact, the Presto Blue method was used to assess cell metabolic activity. First, the culture medium was removed, then each well was washed with PBS, Presto Blue reagent was added with PBS in the 1:9 ratio and next the plate was put in the incubator for 40 min. After this time, 100 μ L was transferred from each well to a 96-well plate and the fluorescence was read with the excitation/emission 530/620 nm filters.

2.6.2. Qualitative Morphology Tests

For the purpose of assessing the morphology of cells cultured in direct contact with functionalized nonwoven surfaces, two types of qualitative observation methods were employed. The first was scanning electron microscopy (SEM) imaging and the second was observing cells' actin skeleton and nuclei with fluorescence microscopy. For these, a 5-day cell culture was performed where the materials were seeded with 2×10^3 cells/well. Samples for SEM imaging were fixed by immersing 2.5% glutaraldehyde for 2 h and then dehydrated in a series of ethanol solutions (30–100%) followed by ethanol/hexamethyldisilazane (2:1, 1:2) mixtures. For fluorescence microscopy cells were fixed with 3% formaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.01% triton \times 100, and then stained with fluorescent dyes that attach to the cell actin skeleton (ActinGreen) and nucleus (NucBlue).

3. Results and Discussion

3.1. Optimisation of Surface Activation Methods

3.1.1. Water Contact Angle

A nonwoven PLCL material, without any additional treatment, has a water contact angle of $131.43^\circ \pm 1.94^\circ$, which means it is hydrophobic which is typical for aliphatic polyesters [53]. The aminolysis reaction had no effect on this property as the samples A1, A2, and A3 had water contact angles equal to $131.31^\circ \pm 1.37^\circ$, $130.74^\circ \pm 1.63^\circ$, and $131.28^\circ \pm 0.84^\circ$, respectively. Lack of wettability improvement or only a small change after aminolysis was reported earlier by others [54–56]. Both hydrolysis and plasma treatment lowered the water contact angle of PLCL samples.

Cold oxygen plasma proved to be an extremely time-efficient method of making PLCL fibres' surface hydrophilic. All samples treated for at least 15 s had a 0° water contact angle only 10 s after the water drop was placed on its surface (Figure 1a). Because of the nature of fibrous materials, 0° means that the drop was effectively soaked into the material.

For hydrolysed PLCL samples, the decrease in water contact angle was dependent on both reaction time and NaOH concentration. Figure 1b,c shows a comparison of water contact angle measurement results for 180 min reaction time with varying NaOH concentrations (Figure 1b) and for 1 M NaOH solution used for reaction times from 10 up to 180 min (Figure 1c).

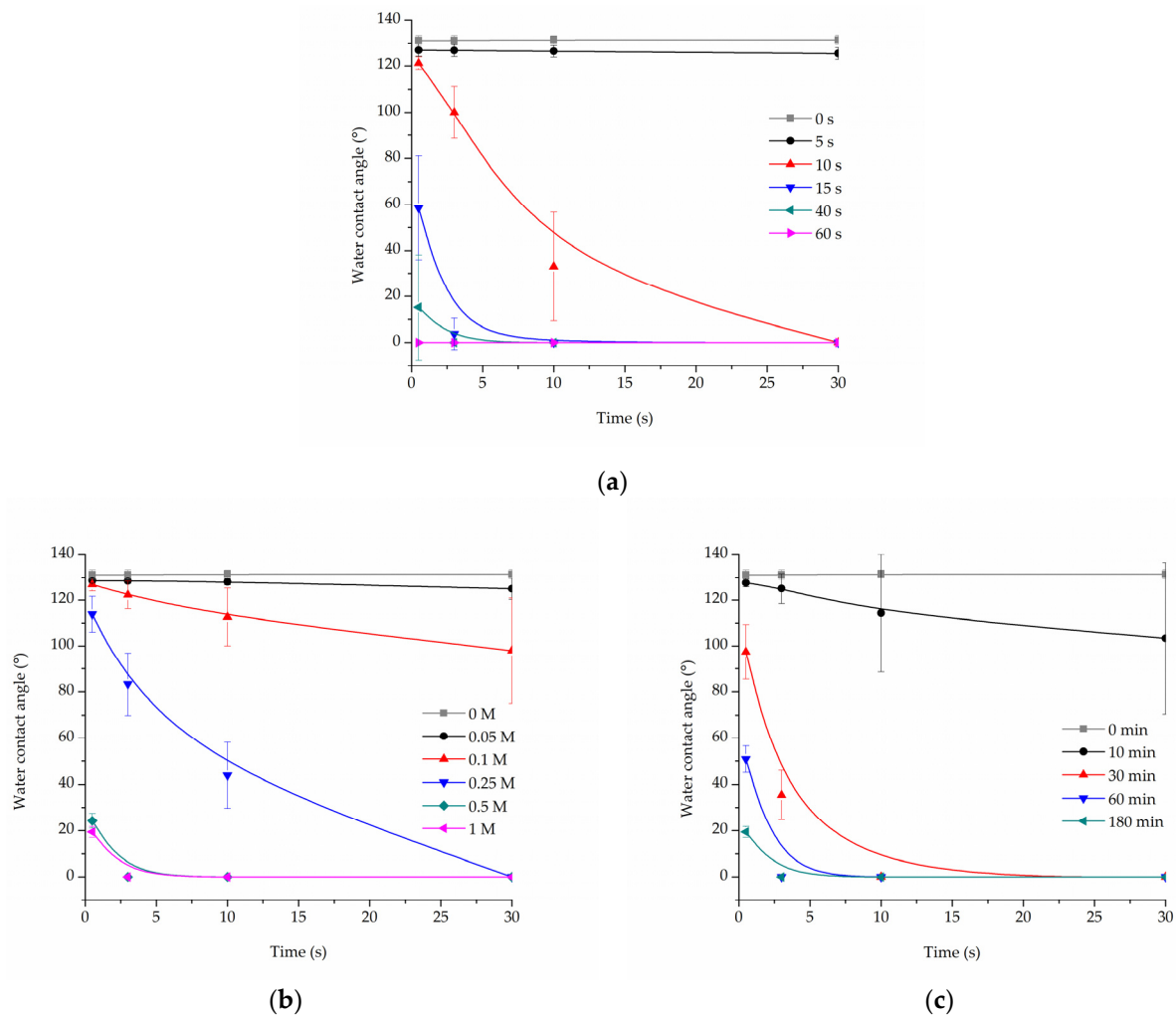


Figure 1. Water contact angle of PLCL nonwoven samples after surface activation with (a) oxygen plasma, (b) NaOH solutions with increasing concentrations for 3 h, (c) 1 M NaOH solution for a set of time periods up to 180 min.

From the group of samples hydrolysed for 3 h, 0.25 M, or higher NaOH concentration was needed to make materials hydrophilic, with 0.5 M and 1 M NaOH enabling a water drop to be soaked into the material within only 3 s (Figure 1b). Looking from the other side, 1 M NaOH had to be used for at least 30 min for the water contact angle to drop below 100° (Figure 1c).

3.1.2. Morphology

Fibres' morphology of all samples after surface activation was compared to untreated PLCL (Figure 2a). All samples treated with oxygen plasma retained the material's initial morphology whereas both hydrolysis and aminolysis did have an effect depending on activation conditions.

For hydrolysis, reaction times shorter than 3 h and concentrations lower than 0.5 M NaOH did not result in any fibres' morphology alteration. A sample placed in 0.5 M NaOH for 3 h had its fibres' surface slightly affected with small surface cracks (Figure 2b) and for the same time in 1 M concentration these changes were more pronounced as the top layer of the fibre surface seemed to be frayed, chipping off the fibres while the overall architecture is still intact (Figure 2c). The sample treated with 1 M NaOH for 6 h showed severe damage with both the surface of the fibres and the nonwoven structure being compromised (Figure 2d).

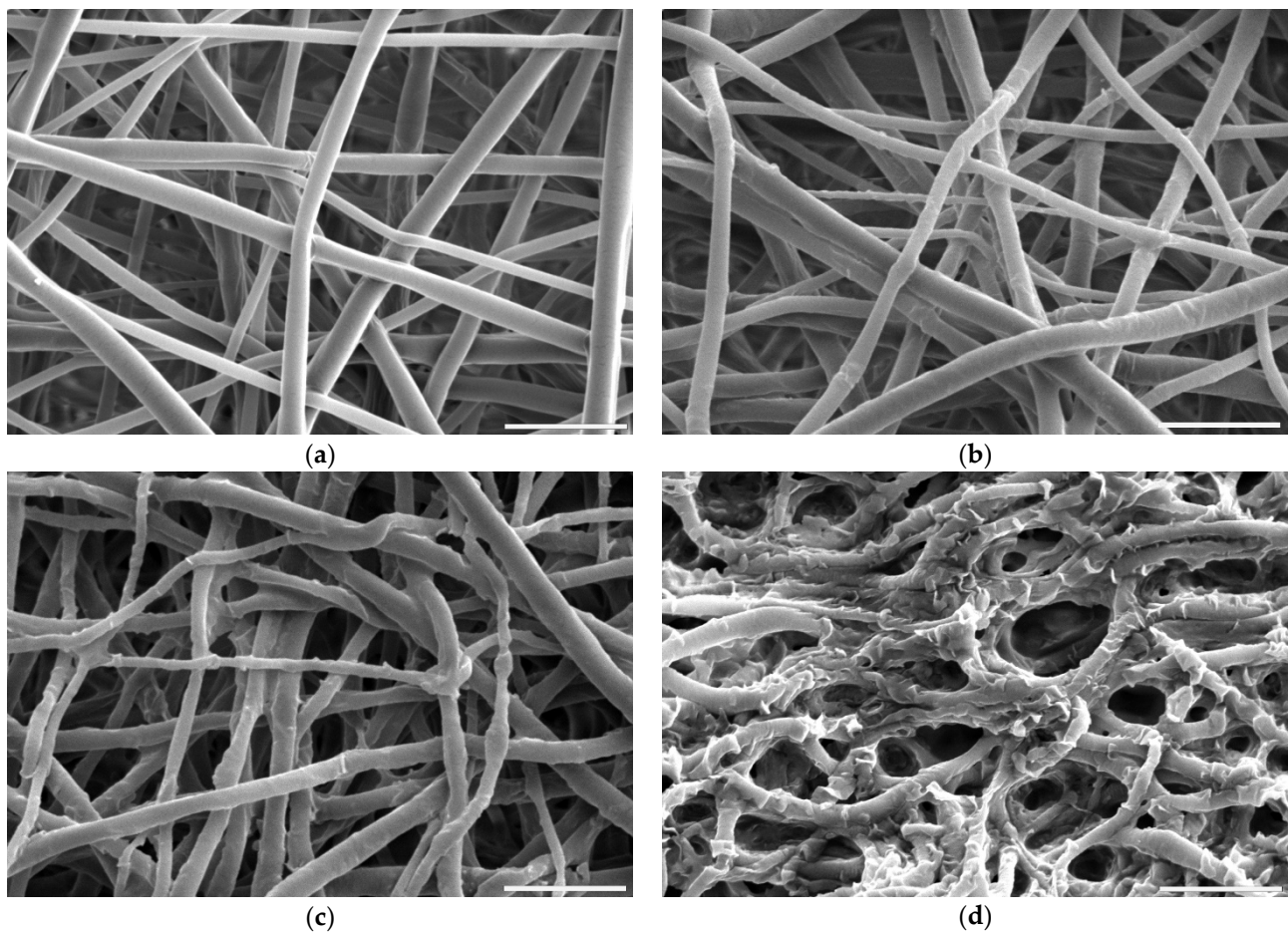


Figure 2. Scanning electron microscope images of PLCL nonwoven sample (a) untreated, after surface activation with (b) 0.5 M NaOH for 3 h, (c) 1 M NaOH for 3 h, (d) 1 M NaOH for 6 h. The marker is equal to 5 μm .

In addition, measurements of both weight and thickness before and after surface activation with NaOH (Figure 3) clearly show that the hydrolysis leads to surface degradation of the polymer severe enough that the thickness and weight of the nonwovens are significantly reduced. This reduction correlates linearly with NaOH solution concentration. However, for the low 0.1–0.25 M NaOH concentrations, the drop in both values did not reach 15%, and the samples that retained 72% and 46% of their initial weight, for 0.5 M and 1 M, respectively, were visibly thinner even for the naked eye.

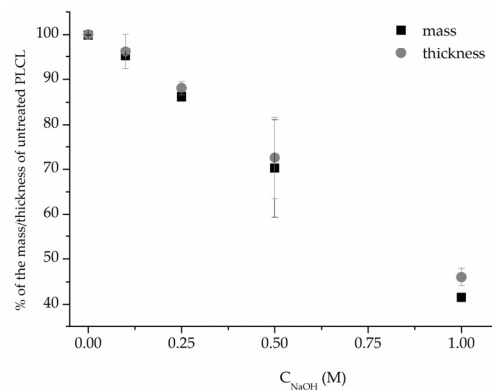


Figure 3. Mass and thickness change after 3 h NaOH surface activation of PLCL nonwoven.

A comparison of the fibre diameter distribution for the control PLCL sample and material treated with 1 M NaOH for 3 h (Figure 2a,c) shows how surface erosion caused by hydrolysis affected fibre thickness (Figure 4a,b). Whereas a bimodal character of the distribution for untreated PLCL is preserved in the hydrolysed sample, both of the local maxima present a lower value: 0.53 μm and 0.95 μm for control and 0.49 μm and 0.78 μm for NaOH treated material. A small percentage of fibres with a diameter below 0.3 μm are not present in the material after hydrolysis.

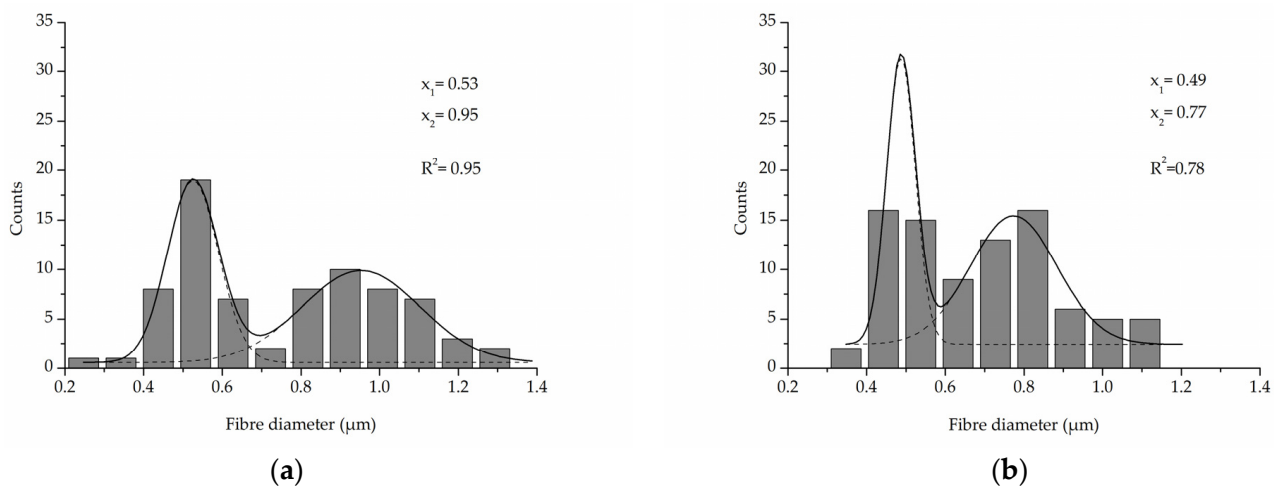


Figure 4. Fibre diameter distribution with local maxima and regression values of (a) an untreated PLCL sample, (b) a sample treated with 1 M NaOH for 3 h. Data were fitted with Gaussian function.

In the case of aminolysis surface activation, within the range of diamine concentration and reaction time that was chosen for this work based on our previous studies [50], no changes in fibres' morphology were observed. It is valid even for treatment with 6% diamine solution for 5 min, which was the highest chosen reaction conditions (Figure 5a). Using higher diamine concentrations and longer reaction times led to fibres being prone to brittle cracking without changing fibre diameter (Figure 5b). This effect is known and utilized to fabricate fibrous fillers, e.g., for application in composite materials [57].

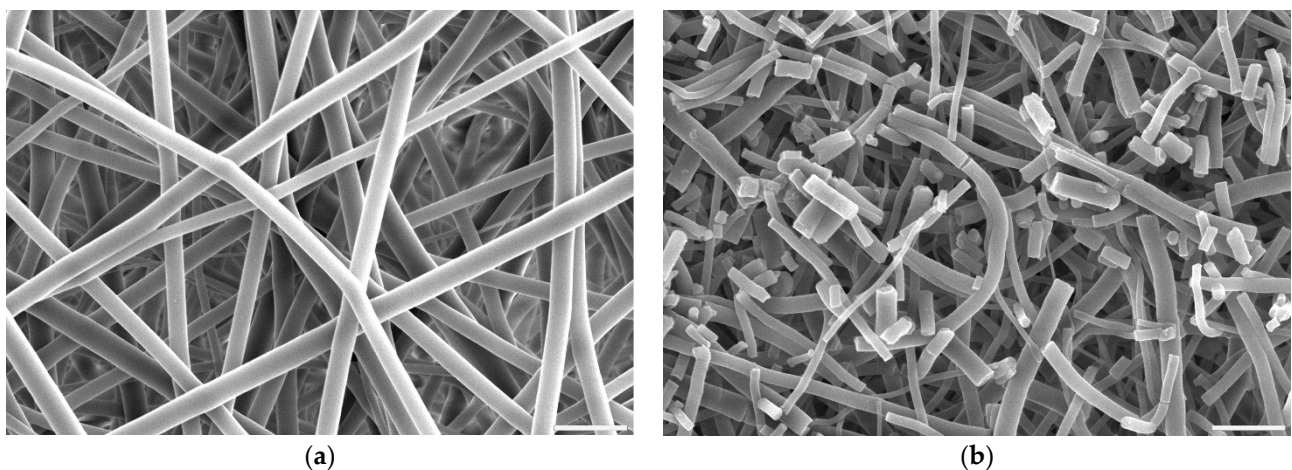


Figure 5. Scanning electron microscope images of PLCL nonwoven samples after surface activation at 30 °C with (a) 6% diamine for 5 min, (b) 10% diamine for 30 min. The marker is equal to 5 μm .

3.1.3. The Efficacy of the -COOH Group Introduction to the Material's Surface

Both alkaline hydrolysis and oxygen plasma treatment were meant to increase -COOH group content on the surface of PLCL material to enable functionalization with gelatin

through crosslinking with EDC. Two tests were performed to assess this—Toluidine Blue O (TBO) staining and ATR-FTIR spectroscopy.

In the TBO experiment, a control untreated sample of PLCL nonwoven obtained an absorbance of 0.3 A.U. (absorbance unit). For the samples with surface activated with oxygen plasma (Figure 6a) this value increased with treatment time, reaching a plateau at 10 s time point with about 0.97 A.U. This result did not change in a significant way with longer exposure to plasma. With this method, the amount of -COOH groups on PLCL fibres' surface can be, at maximum, increased to roughly 300% of its initial content.

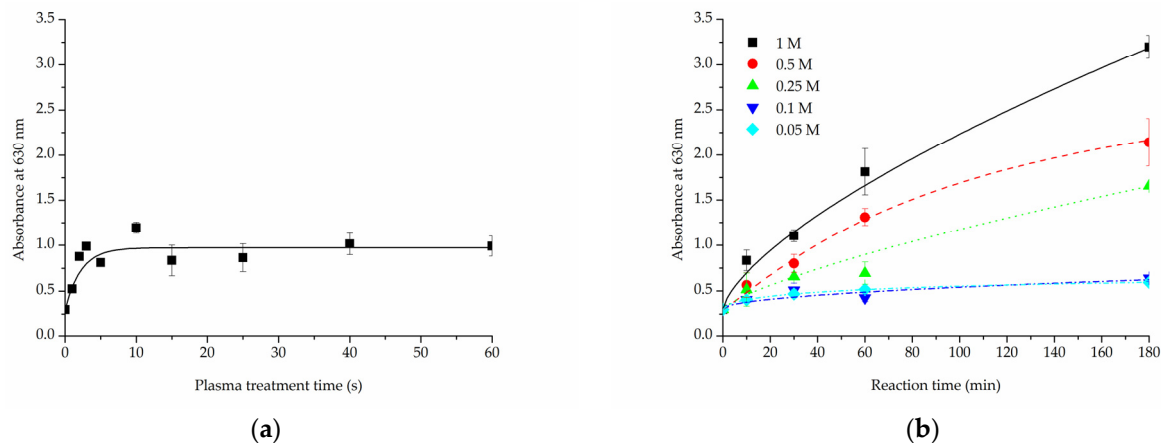


Figure 6. Toluidine Blue O test results for PLCL samples treated with (a) cold oxygen plasma, (b) NaOH with varying concentrations and reaction times.

The increase in -COOH groups detected on the surface of samples that underwent hydrolysis (Figure 6b) was, as predicted, relative to both NaOH concentration and reaction time. For 0.05 M and 0.1 M NaOH solutions the absorbance value increased to 0.4 A.U. after 10 min, it only reached about 0.6 A.U. even for the 3 h experiment. Much better results were achieved with solutions of higher NaOH concentrations for which the increase was more steady and steeper. For 0.5 M and 1 M NaOH solutions the absorbance measured were 7 and 10 fold, respectively, the untreated PLCL value.

For the same purpose of assessing -COOH group content on a material's surface, FTIR spectroscopy analysis was focused on C=O bond stretching vibrations. A very apparent shift can be seen for the PLCL sample subjected to extreme (1 M NaOH, 6 h) hydrolysis conditions (Figure 7). Although such conditions were not included in the final scope of experiments planned for this work, they were useful in indicating a direction of changes that could be observed with FTIR spectroscopy. A peak at 1756 cm^{-1} that comes from the C=O bond that belongs to an ester group, typical for aliphatic polyesters such as PLCL, is replaced by a peak at 1721 cm^{-1} that comes from the C=O bond in the -COOH group [58]. The more hydrolysed the PLCL sample is, the clearer this shift. For a sample treated with 1 M NaOH for 1 h and 3 h, an elevation indicating a 1721 cm^{-1} peak is still apparent, whereas for a 0.5 M/3 h reaction the result is barely visible. Comparing these results to the TBO test it could be concluded that for a sample to show any shift in the FTIR spectrum it needs to reach at least 1.5 A.U in TBO staining. For the same reason, none of the FTIR spectra of the samples treated with oxygen plasma showed any differences in comparison to untreated PLCL material, which means this method is not as sensitive as the TBO test.

3.1.4. Molecular Mass Change

Each of the three surface activation methods has a different effect on the polymer's molecular weight as measured with gel permeation chromatography.

In the case of samples that underwent aminolysis and plasma treatment, a recognizable drop in molecular mass was observed. For the chosen set of reaction conditions, the plasma activation method proved to have a smaller impact on PLCL's molecular weight than

aminolysis. Oxygen plasma treatment also caused a more uniform decrease among both smaller and bigger polymer chains, whereas aminolysis induced more damage to molecules of smaller mass (Table 3, Figure 8a,b). A decrease in molecular weight after aminolysis and plasma treatment was observed by other authors [59,60].

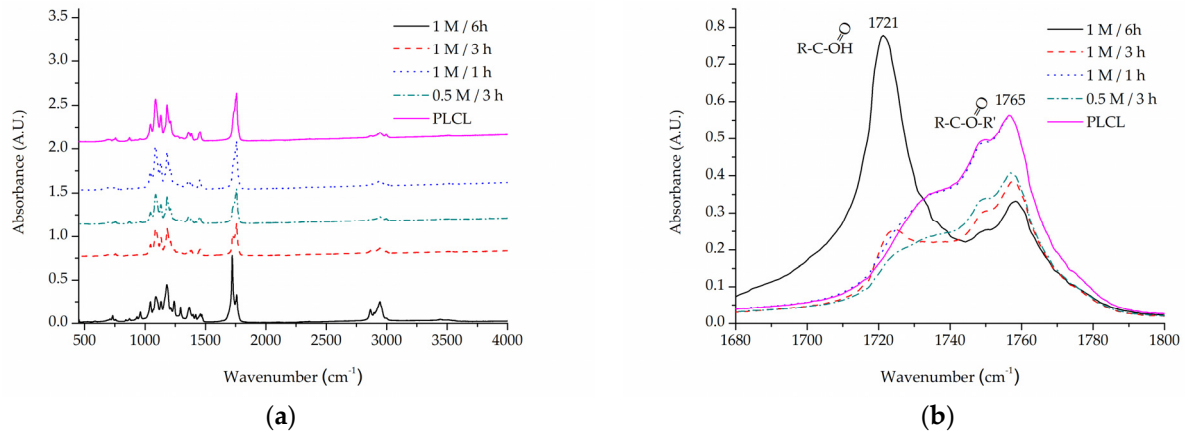


Figure 7. A comparison of IR spectra for PLCL samples after hydrolysis, (a) full spectrum, (b) 1680–1800 cm^{-1} range that shows absorption of C=O bond stretching frequency.

Table 3. The changes in weight (M_w) and number (M_n) average molecular weight of PLCL after surface activation with different methods. Data for samples A1–A3 come from previously published work [50].

Sample	M_n (kDa)	M_w (kDa)	% M_n PLCL	% M_w PLCL	PDI
PLCL	58.7	88.3	100%	100%	1.50
A1	49.8	81.3	85%	92%	1.63
A2	47.8	75.9	81%	86%	1.59
A3	30.6	58.4	52%	66%	1.91
P10	54.5	82.1	93%	93%	1.51
P40	52.5	77.5	89%	88%	1.48
P60	46.0	71.3	78%	81%	1.55
H1	57.7	85.3	98%	97%	1.48
H0.5	57.3	85.9	97%	97%	1.50
H0.25	59.6	87.7	100%	99%	1.47
H0.1	56.4	85.2	96%	97%	1.51
H0.05	57.3	86.2	97%	98%	1.51

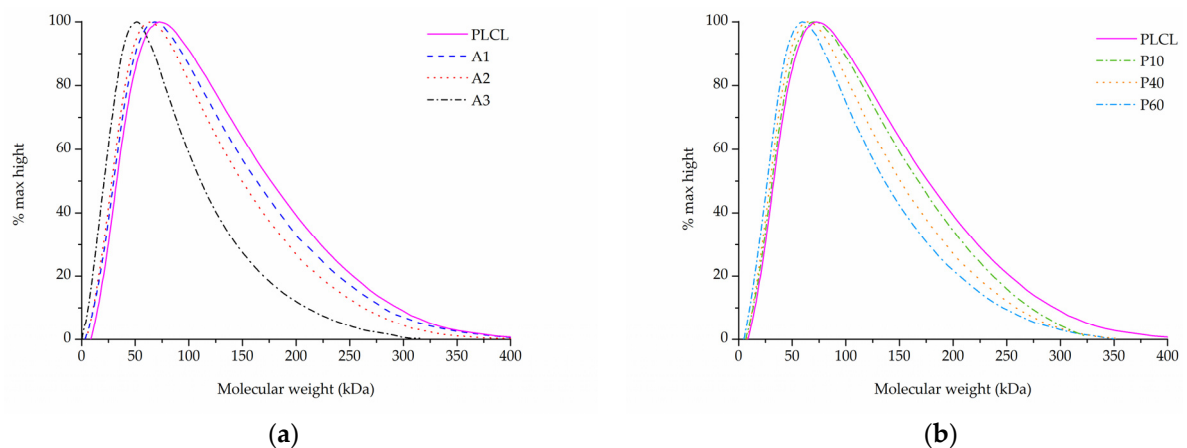


Figure 8. Molecular weight of PLCL treated with (a) aminolysis, (b) oxygen plasma.

In comparison to both of those methods, the surface activation with NaOH was much milder in its detrimental effect on the polymer's molecular weight when looking at the main chromatography peak (Figure 9a). However, it is important to note that hydrolysed samples lost a fraction of their mass during the activation process (Figure 3) and thus the GPC result shows the molecular mass only of the sample remaining after the hydrolysis.

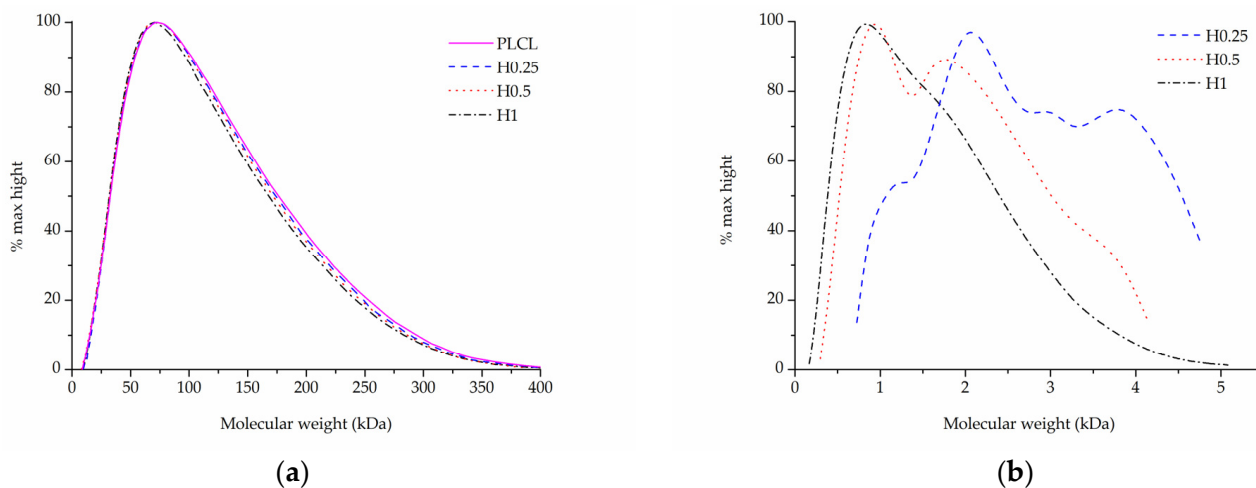


Figure 9. Molecular weight of PLCL treated with NaOH, (a) main peak, (b) small molecular weight peak.

Although for the highest NaOH concentration of 1 M some shortening of longer polymer chains can be seen in Figure 9a, the overall changes for both M_w and M_n are minimal for the material fraction left after hydrolysis (Table 3). Interestingly, a new second peak for very small polymer molecules can be observed for samples treated with NaOH concentrations varying from 0.25 to 1 M (Figure 9b). The higher the NaOH concentration, the smaller the molecular weight of this new peak was. It is believed that this peak shows the residues of heavily severed polymer chains that constituted the outer layers of the fibres that were degraded during hydrolysis.

Combining SEM observation of rough and frayed fibres' surface texture (Figure 2c), the mass and thickness loss of the samples (Figure 3) and a relatively small shift in molecular weight for the main chromatography peak, it was concluded that NaOH mainly affects the material's surface, leaving the core part of the fibre unscathed. In comparison, both aminolysis and oxygen plasma inflict polymer chain severing in the whole mass of the sample. For a material with a substantial molecular mass reduction ($M_w = 11.6$ kDa, $M_n = 6.5$ kDa) [50], fibres are prone to break, rather than fray, as can be seen in the SEM image (Figure 5d) of a sample treated with a high diamine concentrated solution for a prolonged period of time.

3.2. Comparison of Functionalized Materials

3.2.1. Gelatin Attachment and Stability

All samples after completed functionalization underwent FTIR spectroscopy as well as BCA staining to confirm a successful attachment and measure the amount of gelatin of their surface. BCA was used then again after 1 and 7 days of stability test.

A comparison of FTIR spectra in the 1500 – 1700 cm^{-1} range shows a clear difference between the pure PLCL sample and functionalized materials in the Amide I band region 1600 – 1700 cm^{-1} (Figure 10). Apart from the H1 sample that has a distinct peak with a maximum of around 1650 cm^{-1} , all other samples show a significant elevation in that region above the result for a pure PLCL, however, the difference between each sample is negligible. For the H1 sample, a peak in the Amide II band region is also pronounced which further proves the presence of gelatin that is attached to the surface.

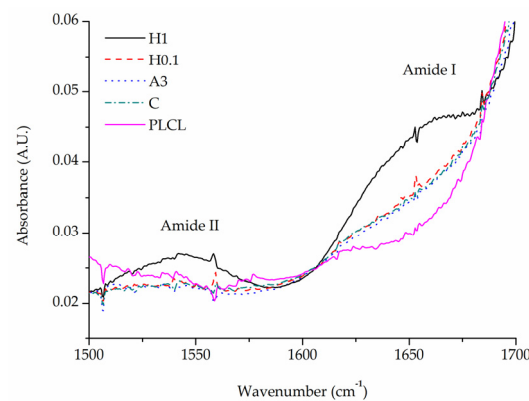


Figure 10. Comparison of FTIR spectra of functionalized samples.

The results of BCA staining present gelatin amounts on the fibres’ surfaces at 0, 1, and 7 days of incubation in PBS and confirm what was observed in FTIR spectra analysis, that the highest gelatin amount was attached for the H1 sample (Figure 11). Much lower values were observed for other hydrolysis-activated samples with the tendency to decrease with a decline in the concentration of the solution. However, such a high value for the H1 sample could be the effect of not only the -COOH group concentration but also the high surface area of the fibre resulting from the surface fraying. There was also a positive correlation between the time of plasma treatment and the amount of gelatin. In the case of aminolysis, results are very similar for all samples without any relation between the amount of -NH₂ groups and the amount of gelatin. The initial amount of the gelatin on the surface of reference samples, C and CEN, was relatively high, being as high as for the P10 and P40 samples, respectively.

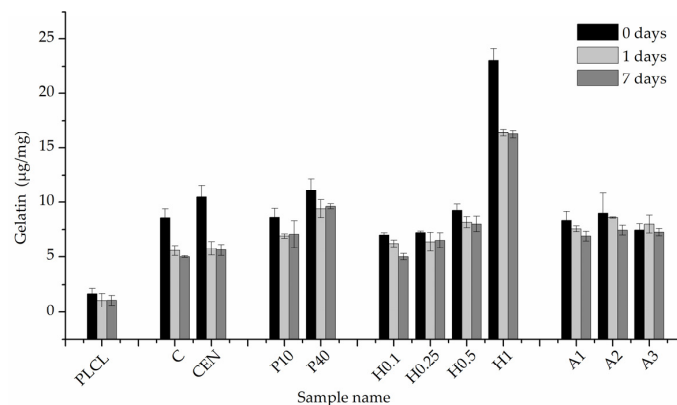


Figure 11. Gelatin amount on the material’s surface after 0, 1 day, and 7 days of incubation in PBS.

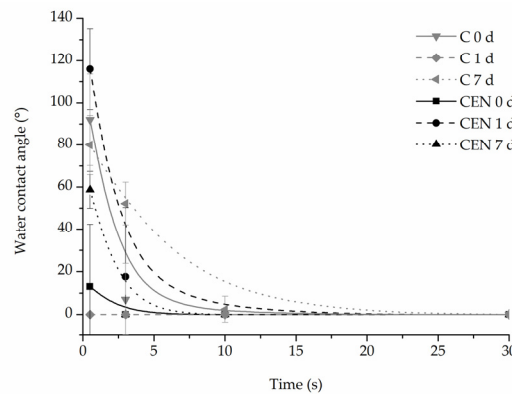
For reference samples as well as for the H1 sample, a burst release of gelatin was observed after one day of incubation in PBS. That indicates a relatively high percentage of weakly bound adsorbed gelatin, most probably due to physical interactions of polymer with gelatin molecules. In the case of the H1 sample, the likely cause of this result is its increased surface area associated with a strongly frayed surface of the fibres. For plasma-activated samples, this effect was much slighter, and even less visible for the other hydrolysed and aminolysed samples.

Results for the 7-day incubation were only slightly lower than for the 1-day incubation for all samples, which indicates the stability of gelatin coating. Except for H0.1, for all chemically modified samples, we observed higher values of gelatin amount than for both reference samples, with the highest amount equal to $9.61 \pm 0.22 \mu\text{g}/\text{mg}$ for the P40 sample. It is worth noting that reference samples C and CEN with physically adsorbed gelatin provide 58% and 53% of the initial gelatin amount, respectively, after 7 days of incubation.

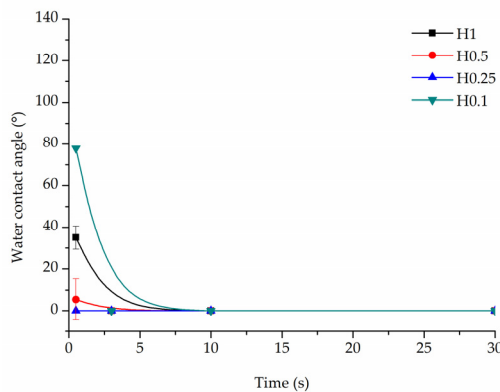
3.2.2. Water Contact Angle

All samples demonstrated complete (0°) wettability after functionalization with gelatin. However, there were some differences observed in the time of water drop absorption into the scaffold depending on the type of modification. The changes in wettability were also observed for some samples after the incubation in PBS.

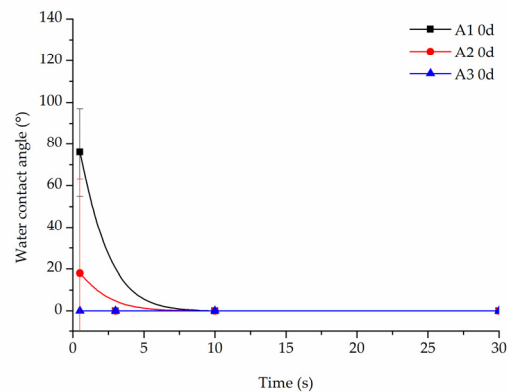
In the case of the reference samples (Figure 12a), the initial values of contact angle were equal to $92 \pm 21.7^\circ$ for the C sample, and $13 \pm 29.3^\circ$ for the CEN sample, and after 7 days of incubation, the initial contact angle was close to the angle before degradation for the C sample being equal to $80 \pm 14.13^\circ$ and increased to $58.65 \pm 8.76^\circ$ for the CEN sample. An increase was then observed in the absorption time after 7 days of incubation for the C sample, which can be related to the degradation of the coating.



(a)



(b)



(c)

Figure 12. Water contact angle of PLCL nonwoven samples after surface functionalization: (a) reference samples after 0, 1, and 7 days of incubation in PBS, (b) hydrolysed samples after 7 days of incubation in PBS, and (c) aminolysed samples after surface functionalization before incubation in PBS.

Water drop on all hydrolysed samples before the degradation test was immediately absorbed, hence there is no dedicated graph. However, after incubation in PBS, the time of absorption slightly increased for hydrolysed samples (Figure 12b). There was no correlation between the amount of gelatin in these samples and the absorption time. At the 10 s time point, all hydrolysed samples have already absorbed the water drop.

In the case of aminolysed samples before the stability test, it was observed that the stronger the aminolysis parameters applied, the lower the initial contact angle value recorded. Interestingly, 7 day-incubation of PBS samples demonstrated higher wettability

with immediate absorption of the water drop, which is in contrast to the reference and hydrolysed samples (Figure 12c).

3.2.3. Mechanical Tests

The initial values of tensile strength and elongation at break for PLCL were equal to 7.0 ± 0.3 MPa and $427.6 \pm 28.0\%$, respectively (Figure 13e,f). For both control samples, a significant decrease in tensile strength was observed after gelatin immobilisation (Figure 13a,e). This could be the effect of the applied temperature during gelatin immobilisation and the resulting change in the polymer structure. The plasma-treated samples demonstrated a slightly lower value of tensile strength in comparison to the reference samples (Figure 13b,e). In the case of the hydrolysed and aminolysed samples (Figure 13c–e), a gradual decrease in maximum load with the intensity of applied reaction conditions was observed. For the H1 sample, a dramatic decrease up to 3.2 ± 0.3 MPa was noticed. In the case of the samples after aminolysis, this is the effect of the change in the molecular weight. It was discussed in our previous study with reference to the theoretical explanation [61]. For hydrolysed samples, this could result from the surface defects generating stress in the material.

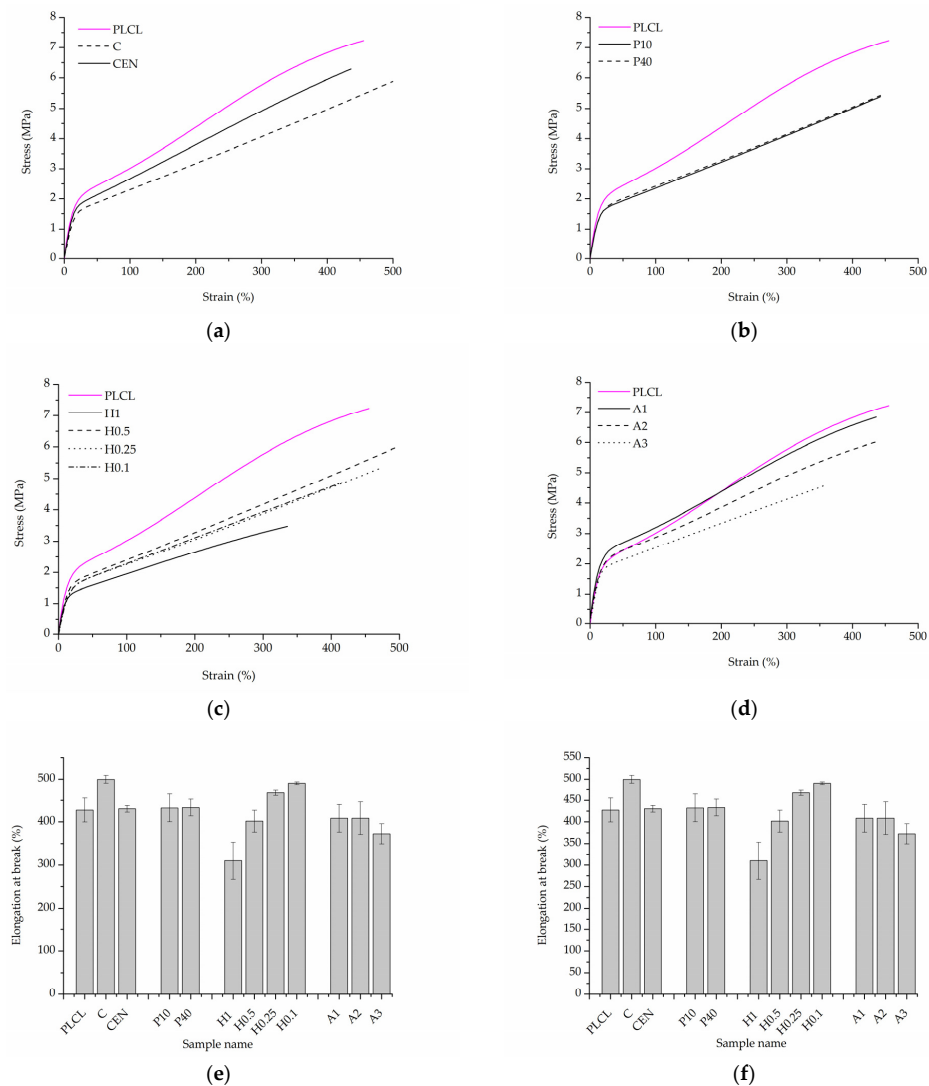


Figure 13. Uniaxial tensile stress test results. Stress–strain curves for: (a) control samples, (b) materials treated with plasma, (c) hydrolysis, and (d) aminolysis. Graphs comparing: (e) tensile strength, (f) elongation at break of investigated samples.

For the control sample with physically adsorbed gelatin, an increase in elongation at a break of $499.8 \pm 9.1\%$ was observed (Figure 13f). However, that was an unexpected result and not the case for the control sample activated with EDC/NHS. In the case of plasma-treated samples, there was no change in elongation at break. The hydrolysed samples showed a slight increase in the elongation at break for lower concentrations of NaOH, and a decrease for higher concentrations, especially for the H1 sample, which is a result of surface defects as in the case of tensile strength. For A1 and A2 aminolysed samples, only a slight decrease was detected. A more significant decrease was observed for the A3 sample; however, the maximum extension value was still high being equal to $372.8 \pm 23.5\%$. Generally, a decrease in strain at break after aminolysis treatment is reported by other authors [62]. This is consistent with the results of the molecular weight change as a decrease in the M.W. results in a decrease in polymer chain entanglements and thus in the lower elongation at break.

3.2.4. Cellular Studies

The results of in vitro cytotoxicity test performed on materials' extracts showed some differences between the materials but did not indicate that any of the investigated samples were toxic to the cells (Figure 14a). All values were above 70% of the control. Plasma and NaOH treated materials (with the exception of the H1 sample) showed values above control which might mean some of the gelatin from the surface migrated to the medium and had a positive effect on the cells, but BCA test results do not prove this hypothesis.

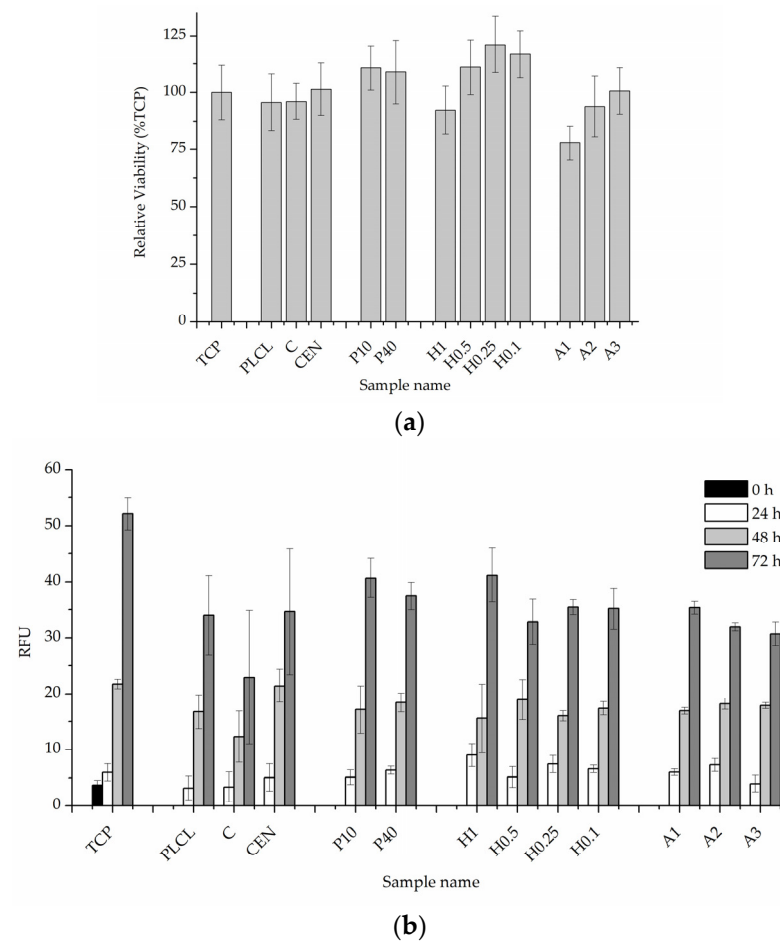


Figure 14. Quantitative in vitro test results, (a) 24-h cytotoxicity on material extracts, (b) 0–3 day viability, and proliferation test in direct contact with the material.

The 0–3 day experiment where cells were cultured directly on the materials' surfaces showed very similar and satisfactory results for all samples (Figure 14b). A slightly lower

value was recorded for a control material with gelatin attached only via physisorption which is difficult to explain while a pure PLCL material without any attached gelatin obtained a result on par with the rest of the functionalized nonwovens.

The observations conducted via both scanning electron and fluorescence microscopy of fibroblast cells cultured on the materials' surface showed some small differences in their morphology (Figures 15 and 16). L929 fibroblasts are a type of adherent, connective cell line that in a living tissue are responsible for the production of an extracellular matrix and a fibrous environment is their natural habitat. The less favourable the surface of the material is, the rounder a fibroblast becomes in order to minimize its contact with it. In contrast, the more native-like the surface they are seeded on is, the more likely they are to spread, extending their filopodia and lamellipodia to attach themselves to the surface [63,64].

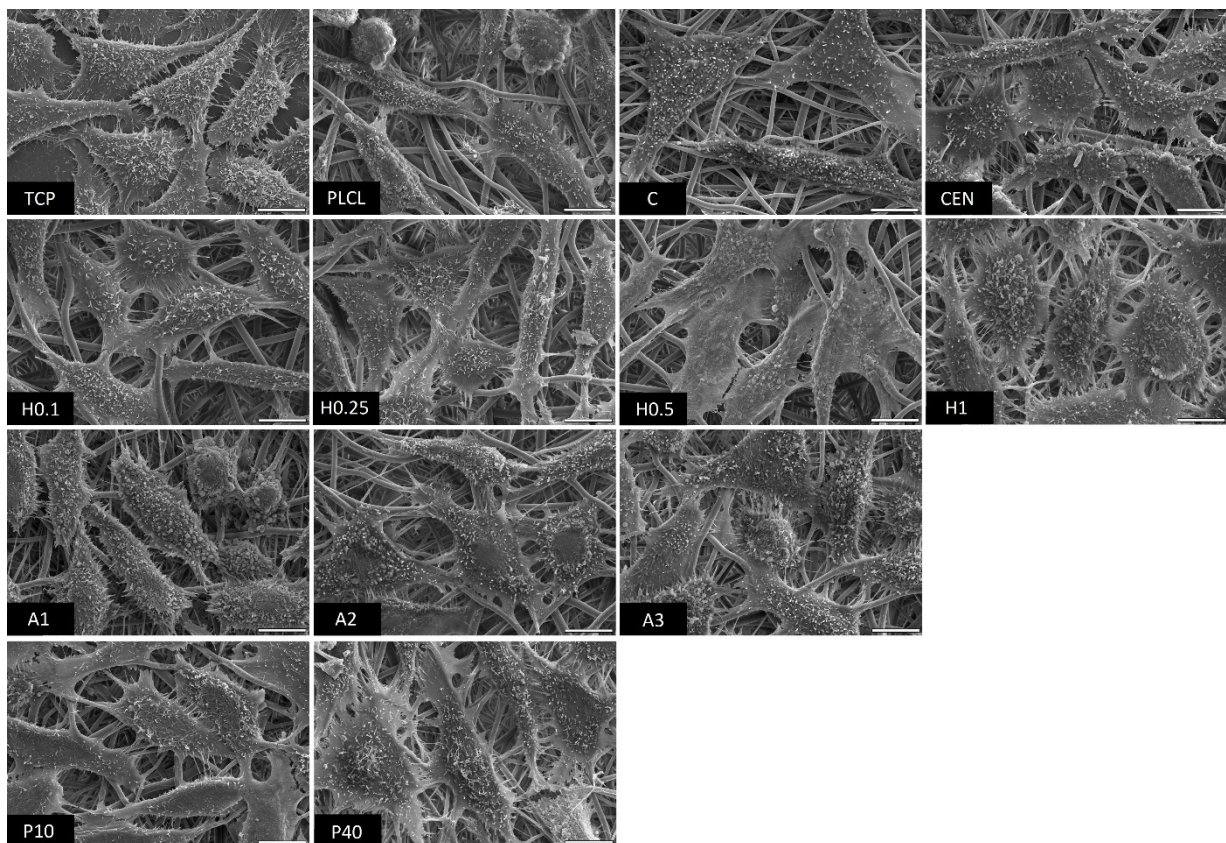


Figure 15. SEM microscopy images of L929 cells cultured the functionalized nonwoven materials and TCP. The marker is equal to 5 μm .

Tissue culture polystyrene/plastic (TCP) that multiwell plates are made of is hydrophilic, and fibroblasts demonstrate flattened, spear-like or triangular, elongated shapes when cultured on its surface. The cells cultured on the PLCL and C control samples, from which one was not functionalized at all, the second had gelatin-only physisorbed and showed inferior cell morphology compared to the CEN sample or TCP. There could be seen cells in round form, or if spread, showing a visibly small number of filopodia. In the case of the rest of functionalized materials, fibroblasts showed an improved morphology and spreading with large numerous filopodia and lamellipodia in comparison to the control materials without gelatin. Among all tested samples, the fibroblast cells cultured on samples H1 and P40 showed the greatest amount of filopodia indicating these materials possessed the most attractive surface properties to the L929 cells. In the case of the H1 sample, it is believed that such a result is a consequence of increased surface area. The surface roughness of the fibres caused by hydrolysis, as was first stated in the last paragraph, is favourable by fibroblasts as it mimics native ECM and provides more sites for attachment.

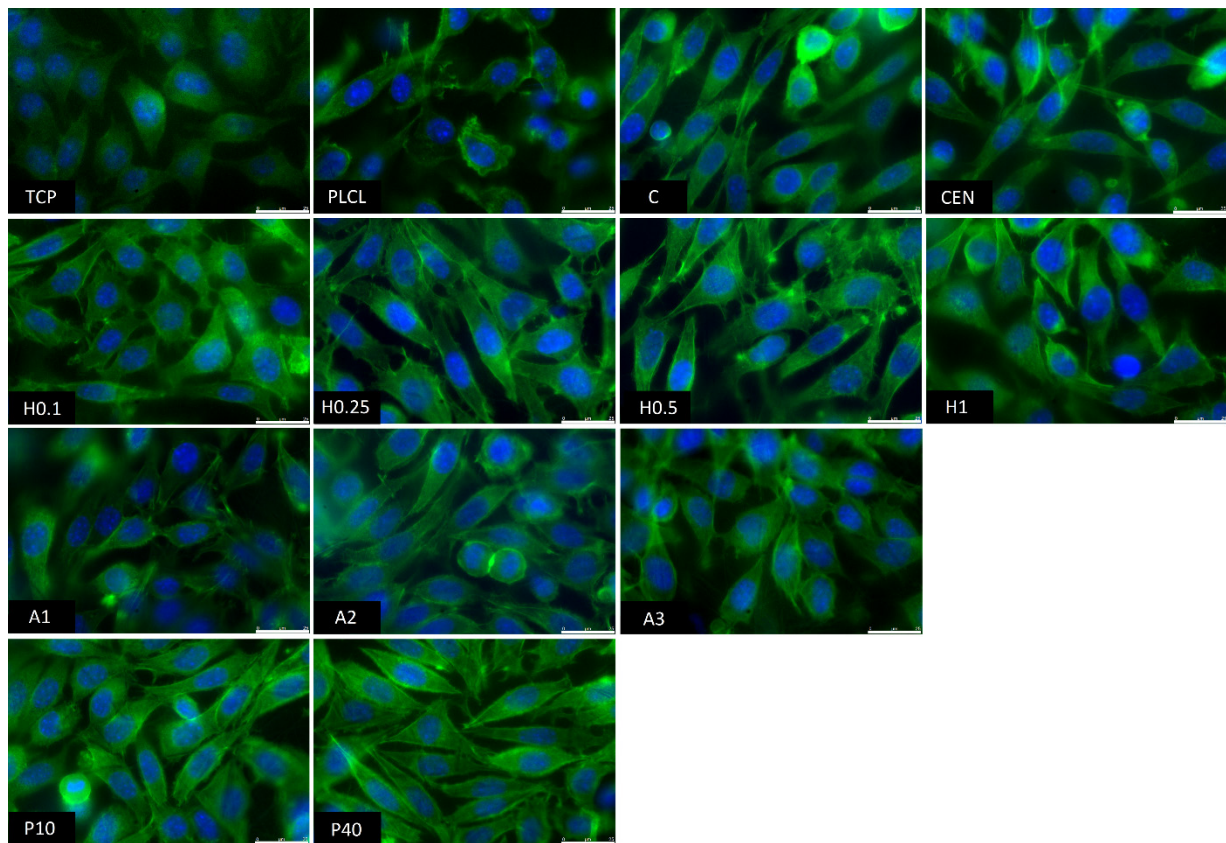


Figure 16. Fluorescence microscopy images of L929 cells cultured the functionalized nonwoven materials and TCP. The marker is equal to 25 μm .

It is experimentally proven that surface chemistry modulates the conformation of adsorbed proteins [65,66]. Vallieres et al. [67] also reported differences in immobilised fibronectin conformation depending on the crosslinking method. In this study, as the $-\text{COOH}$ groups of the polymer were activated during immersion in EDC/NHS solution after plasma and hydrolysis treatment, they were cross-linked with the $-\text{NH}_2$ groups of gelatin. Similarly, in the case of aminolysis and GTA activation, $-\text{NH}_2$ groups of gelatin were also involved in the cross-linking. Another thing to consider is if the $-\text{NH}_2$ group, which is involved in the crosslinking, originates from the RGD sequence, it could affect its further biological activity. Currently, suitable peptide exposure after immobilisation is the topic of many studies [68–70]. The proposed aminolysis-based modification differs from the hydrolysis and plasma-based methods, as in that case there is a spacer between the material surface and protein, consisting of diamine and glutaraldehyde chains. Other authors reported that this could improve the biological efficiency of the biomolecule [71,72]. However, such a positive effect of the spacer presence was not observed in this study.

4. Conclusions

The main goal of this work was to compare three surface activation methods—hydrolysis, aminolysis, and cold oxygen plasma in terms of both their effect on PLCL material, as well as on enabling successful gelatin immobilization. The first part of the work consisted of the optimisation of the conditions of those processes. Discarding all samples with significantly altered morphology of the fibres and choosing the group with hydrophilic ones enabled the main part of the work to be conducted on a set of materials with more uniform properties, which facilitated the comparison of the final results of functionalized materials.

The results of all of the experiments indicated that all investigated surface activation methods were successful in being the first step of the gelatin immobilisation process. A

highly hydrophilic material with attached gelatin, which is more stable compared to the control samples, was achieved for all three tested methods.

Cellular studies showed improved morphology and spreading of cells cultured on functionalized materials compared to the untreated PLCL or the sample with physisorbed gelatin only.

A comprehensive examination of functionalized materials revealed differences in their properties that have to be taken into consideration when selecting which one of them is the most suitable for a specific medical application. A decision should be based on a specific function that the final scaffold material has to perform and the properties it needs to possess.

The most noticeable differences between the three surface activation methods were in how they affected the molecular weight of the polymer. Although both cold oxygen plasma and aminolysis caused polymer chain degradation in bulk, the hydrolysis induced damage on the surface of the material, whereas fibres' cores were barely affected.

The frayed surface of the fibres observed for samples hydrolysed with 1 M NaOH did help with gelatin attachment, as shown in the BCA test, but such harsh treatment resulted in the lack of mechanical properties and the loss of the almost 60% of material mass. Too many defects introduced to fibres' surfaces through hydrolysis weakened the material, making it prone to tearing. Aminolysis and plasma treatment with the loss of molecular weight increased brittleness.

These observations indicate that the use of any surface activation method should be limited to the lowest concentration/reaction time that enables subsequent satisfactory functionalization.

Future work following these findings should be focused on the optimisation of a surface activation method and subsequent attachment of a biologically active molecule for a specific application. Further biological studies conducted on functionalised materials must be performed with the use of cell types relevant to the chosen application.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, analysis, and investigation, J.D. and O.J.; writing—original draft preparation, J.D. and O.J.; writing—review and editing, P.S., J.D. and O.J.; visualization, J.D. and O.J.; supervision, P.S.; funding acquisition, O.J., J.D. and P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the POLISH NATIONAL SCIENCE CENTRE (NCN), grant number 2016/23/B/ST8/03409.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gunatillake, P.A.; Adhikari, R.; Gadegaard, N. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* **2003**, *5*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bassani, F.; Liedl, G.L.; Wyder, P. Biological Structures. In *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*; Ottenbrite, R.M., Javan, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005; pp. 99–108.
3. Richbourg, N.R.; Peppas, N.A.; Sikavitsas, V.I. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13*, 1275–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Qin, Y. A brief description of textile fibers. In *Medical Textile Materials*; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2016; pp. 23–42.
5. Dulnik, J.; Kołbuk, D.; Denis, P.; Sajkiewicz, P. The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres. *Eur. Polym. J.* **2018**, *104*, 147–156. [[CrossRef](#)]
6. Grémare, A.; Guduric, V.; Bareille, R.; Heroguez, V.; Latour, S.; L'heureux, N.; Fricain, J.C.; Catros, S.; Le Nihouannen, D.J. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2018**, *106*, 887–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Budnicka, M.; Kołbuk, D.; Ruśkowski, P.; Gadomska-Gajadhur, A. Poly-L-lactide scaffolds with super pores obtained by freeze-extraction method. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2020**, *108*, 3162–3173. [[CrossRef](#)]

8. Felfel, R.M.; Poocha, L.; Gimeno-Fabra, M.; Milde, T.; Hildebrand, G.; Ahmed, I.; Scotchford, C.; Sottile, V.; Grant, D.M.; Liefelth, K. In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 015011. [[CrossRef](#)]
9. Takayama, T.; Todo, M.; Tsuji, H. Effect of annealing on the mechanical properties of PLA/PCL and PLA/PCL/LTI polymer blends. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 255–260. [[CrossRef](#)]
10. Kolbuk, D.; Jeznach, O.; Wrzeczionek, M.; Gadomska-Gajadhur, A. Poly(Glycerol Succinate) as an Eco-Friendly Component of PLLA and PLCL Fibres towards Medical Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 1731. [[CrossRef](#)]
11. Janmohammadi, M.; Nourbakhsh, M.S.; Bonakdar, S. Electrospun Skin Tissue Engineering Scaffolds Based on Polycaprolactone/Hyaluronic Acid/L-ascorbic Acid. *Fibers Polym.* **2021**, *22*, 19–29. [[CrossRef](#)]
12. Leal, B.B.J.; Wakabayashi, N.; Oyama, K.; Kamiya, H.; Braghioroli, D.I.; Pranke, P. Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *7*, 592361. [[CrossRef](#)]
13. Altun, E.; Aydogdu, M.O.; Togay, S.O.; Sengil, A.Z.; Ekren, N.; Haskoylu, M.E.; Oner, E.T.; Altuncu, N.A.; Ozturk, G.; Crabbe-Mann, M.; et al. Bioinspired scaffold induced regeneration of neural tissue. *Eur. Polym. J.* **2019**, *114*, 98–108. [[CrossRef](#)]
14. Kim, H.Y.; Chun, S.Y.; Lee, E.H.; Kim, B.; Ha, Y.S.; Chung, J.W.; Lee, J.N.; Kim, B.S.; Oh, S.H.; Kwon, T.G. Bladder Regeneration Using a Polycaprolactone Scaffold with a Gradient Structure and Growth Factors in a Partially Cystectomized Rat Model. *J. Korean Med. Sci.* **2020**, *35*, e374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gentile, P.; Chiono, V.; Carmagnola, L.; Hatton, P.V. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3640–3659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Erisken, C.; Zhang, X.; Moffat, K.L.; Levine, W.N.; Lu, H.H. Scaffold Fiber Diameter Regulates Human Tendon Fibroblast Growth and Differentiation. *Tissue Eng. Part A* **2013**, *19*, 519–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Nakayama, K.H.; Batchelder, C.A.; Lee, C.I.; Tarantal, A.F. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 2207–2216. [[CrossRef](#)]
18. Gupta, S.K.; Mishra, N.C.; Dhasmana, A. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1577*, 1–10. [[CrossRef](#)]
19. Taylor, D.A.; Sampaio, L.C.; Ferdous, Z.; Gobin, A.S.; Taite, L.J. Decellularized matrices in regenerative medicine. *Acta Biomater.* **2018**, *74*, 74–89. [[CrossRef](#)]
20. Rhee, S.; Puetzer, J.L.; Mason, B.N.; Reinhart-King, C.A.; Bonassar, L.J. 3D Bioprinting of Spatially Heterogeneous Collagen Constructs for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 1800–1805. [[CrossRef](#)]
21. Choi, D.J.; Park, S.J.; Gu, B.K.; Kim, Y.J.; Chung, S.; Kim, C.H. Effect of the pore size in a 3D bioprinted gelatin scaffold on fibroblast proliferation. *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, *67*, 388–395. [[CrossRef](#)]
22. Irawan, V.; Sung, T.C.; Higuchi, A.; Ikoma, T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15*, 673–697. [[CrossRef](#)]
23. Dai, N.T.; Williamson, M.R.; Khammo, N.; Adams, E.F.; Coombes, A.G.A. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. *Biomaterials* **2004**, *25*, 4263–4271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mishra, R.; Varshney, R.; Das, N.; Sircar, D.; Roy, P. Synthesis and characterization of gelatin-PVP polymer composite scaffold for potential application in bone tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **2019**, *119*, 155–168. [[CrossRef](#)]
25. Theodoridis, K.; Aggelidou, E.; Manthou, M.; Demiri, E.; Bakopoulou, A.; Kritis, A. Assessment of cartilage regeneration on 3D collagen-polycaprolactone scaffolds: Evaluation of growth media in static and in perfusion bioreactor dynamic culture. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *183*, 110403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Huettnner, N.; Dargaville, T.R.; Forget, A. Discovering Cell-Adhesion Peptides in Tissue Engineering: Beyond RGD. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 372–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. D'Souza, S.E.; Ginsberg, M.H.; Plow, E.F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): A cell adhesion motif. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 246–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Khew, S.T.; Tong, Y.W. The specific recognition of a cell binding sequence derived from type I collagen by Hep3B and L929 cells. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3153–3161. [[CrossRef](#)]
29. Ma, Z.; He, W.; Yong, T.; Ramakrishna, S. Grafting of Gelatin on Electrospun Poly(caprolactone) Nanofibers to Improve Endothelial Cell Spreading and Proliferation and to Control Cell Orientation. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1149–1158. [[CrossRef](#)]
30. Paredes, J.A.U.; Polini, A.; Chrzanowski, W. Protein-based Biointerfaces to Control Stem Cell Differentiation. *RSC Smart Mater.* **2015**, *2015*, 3–29. [[CrossRef](#)]
31. He, L.; Shi, Y.; Han, Q.; Zuo, Q.; Ramakrishna, S.; Xue, W.; Zhou, L. Surface Modification of Electrospun Nanofibrous Scaffolds via Polysaccharide-Protein Assembly Multilayer for Neurite Outgrowth. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 13187–13196. [[CrossRef](#)]
32. Katti, D.; Vasita, R.; Shanmugam, K. Improved Biomaterials for Tissue Engineering Applications: Surface Modification of Polymers. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 341–353. [[CrossRef](#)]
33. Croll, T.I.; O'Connor, A.J.; Stevens, G.W.; Cooper-White, J.J. Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 463–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ma, Z.; Mao, Z.; Gao, C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2007**, *60*, 137–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Durrieu, M.C.; Pallu, S.; Guillemot, F.; Bareille, R.; Amédée, J.; Baquey, C.; Labrugre, C.; Dard, M. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15*, 779–786. [CrossRef]
36. Barbosa, M.; Vale, N.; Costa, F.M.; Martins, M.C.L.; Gomes, P. Tethering antimicrobial peptides onto chitosan: Optimization of azide-alkyne “click” reaction conditions. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *165*, 384–393. [CrossRef] [PubMed]
37. Qiu, Y.; Mao, Z.; Zhao, Y.; Zhang, J.; Guo, Q.; Gou, Z.; Gao, C. Polycaprolactone scaffold modified with galactosylated chitosan for hepatocyte culture. *Macromol. Res.* **2012**, *20*, 283–291. [CrossRef]
38. Gong, Y.; Zhu, Y.; Liu, Y.; Ma, Z.; Gao, C.; Shen, J. Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed poly(L-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis. *Acta Biomater.* **2007**, *3*, 677–685. [CrossRef]
39. Korogiannaki, M.; Zhang, J.; Sheardown, H. Surface modification of model hydrogel contact lenses with hyaluronic acid via thiol-ene “click” chemistry for enhancing surface characteristics. *J. Biomater. Appl.* **2017**, *32*, 446–462. [CrossRef]
40. Rasal, R.M.; Janorkar, A.V.; Hirt, D.E. Poly(lactic acid) modifications. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 338–356. [CrossRef]
41. Becker, J.M.; Pounder, R.J.; Dove, A.P. Synthesis of poly(lactide)s with modified thermal and mechanical properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1923–1937. [CrossRef]
42. Salhi, S.; Mahfoudh, J.; Abid, S.; Atanase, L.I.; Popa, M.; Delaite, C. Random poly(ϵ -caprolactone-L-alanine) by direct melt copolymerization. *Polym. Int.* **2020**, *69*, 1161–1168. [CrossRef]
43. Vilay, V.; Mariatti, M.; Ahmad, Z.; Pasomsouk, K.; Todo, M. Characterization of the mechanical and thermal properties and morphological behavior of biodegradable poly(L-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) and poly(L-lactide)/poly(butylene succinate-co-L-lactate) polymeric blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *114*, 1784–1792. [CrossRef]
44. Hiljanen-Vainio, M.; Karjalainen, T.; Seppala, J. Biodegradable lactone copolymers. I. Characterization and mechanical behavior of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *59*, 1281–1288. [CrossRef]
45. Vieira, A.C.; Guedes, R.M.; Marques, A.T. Development of ligament tissue biodegradable devices: A review. *J. Biomech.* **2009**, *42*, 2421–2430. [CrossRef] [PubMed]
46. Hiljanen-Vainio, M.P.; Orava, P.A.; Seppala, J.V. Properties of ϵ -caprolactone/DL-lactide (ϵ -CL/DL-LA) copolymers with a minor ϵ -CL content. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *34*, 39–46. [CrossRef]
47. Lu, X.L.; Cai, W.; Gao, Z.Y. Shape-memory behaviors of biodegradable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *108*, 1109–1115. [CrossRef]
48. Laurent, C.P.; Vaquette, C.; Liu, X.; Schmitt, J.F.; Rahouadj, R. Suitability of a PLCL fibrous scaffold for soft tissue engineering applications: A combined biological and mechanical characterisation. *J. Biomater. Appl.* **2018**, *32*, 1276–1288. [CrossRef]
49. Eastoe, J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem. J.* **1955**, *61*, 589–600. [CrossRef] [PubMed]
50. Jeznach, O.; Kolbuk, D.; Marzec, M.; Bernasik, A.; Sajkiewicz, P. Aminolysis as a surface functionalization method of aliphatic polyester nonwovens: Impact on material properties and biological response. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 11303–11317. [CrossRef]
51. Gupta, B.; Plummer, C.; Bisson, I.; Frey, P.; Hilborn, J. Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: Characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials* **2002**, *23*, 863–871. [CrossRef]
52. Nuuttila, M. Gel Permeation Chromatography Methods in the Analysis of Lactide-Based Polymer. Master’s Thesis, University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland, 2018. Available online: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:juyu-201811054624> (accessed on 15 June 2022).
53. Bu, Y.; Ma, J.; Bei, J.; Wang, S. Surface Modification of Aliphatic Polyester to Enhance Biocompatibility. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 1–10. [CrossRef]
54. Bhattacharjee, P.; Naskar, D.; Kim, H.W.; Maiti, T.K.; Bhattacharya, D.; Kundu, S.C. Non-mulberry silk fibroin grafted PCL nanofibrous scaffold: Promising ECM for bone tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 490–509. [CrossRef]
55. Monnier, A.; Al Tawil, E.; Nguyen, Q.T.; Valleton, J.M.; Fatyeyeva, K.; Deschrevel, B. Functionalization of poly(lactic acid) scaffold surface by aminolysis and hyaluronan immobilization: How it affects mesenchymal stem cell proliferation. *Eur. Polym. J.* **2018**, *107*, 202–217. [CrossRef]
56. Toledo, A.L.M.M.; Ramalho, B.S.; Picciani, P.H.S.; Baptista, L.S.; Martinez, A.M.B.; Dias, M.L. Effect of three different amines on the surface properties of electrospun polycaprolactone mats. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2021**, *70*, 1258–1270. [CrossRef]
57. Polini, A.; Petre, D.G.; Iafisco, M.; de Lacerda Schickert, S.; Tampieri, A.; van den Beucken, J.; Leeuwenburgh, S.C.G. Polyester Fibers Can Be Rendered Calcium Phosphate-Binding by Surface Functionalization with Bisphosphonate Groups. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 2335–2342. [CrossRef]
58. Mistry, B.D. *A Handbook of Spectroscopic Data Chemistry (UV, IR, PMR, JCNMR and Mass Spectroscopy)*; Oxford Book Company: Oxford, UK, 2009.
59. Zhu, Y.; Mao, Z.; Shi, H.; Gao, C. In-Depth Study on Aminolysis of Poly(ϵ -Caprolactone): Back to the Fundamentals. *Sci. China Chem.* **2012**, *55*, 2419–2427. [CrossRef]
60. Weidner, S.; Kühn, G.; Decker, R.; Roessner, D.; Friedrich, J. Influence of Plasma Treatment on the Molar Mass of Poly(Ethylene Terephthalate) Investigated by Different Chromatographic and Spectroscopic Methods. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1998**, *36*, 1639–1648. [CrossRef]
61. Jeznach, O.; Kolbuk, D.; Sajkiewicz, P. Aminolysis of Various Aliphatic Polyesters in a Form of Nanofibers and Films. *Polymers* **2019**, *11*, 1669. [CrossRef]
62. Oliveira, S.; Felizardo, T.; Amorim, S.; Mithieux, S.M.; Pires, R.A.; Reis, R.L.; Martins, A.; Weiss, A.S.; Neves, N.M. Tubular Fibrous Scaffolds Functionalized with Tropoelastin as a Small-Diameter Vascular Graft. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 3582–3595. [CrossRef]

63. Abercrombie, M. Fibroblasts. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* **1978**, *12*, 1–6. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1347118/> (accessed on 15 June 2022).
64. Kurashina, Y.; Miyata, S.; Komotori, J.; Koyama, T. Proliferation and Adhesion of L929 Fibroblasts on Surface with Different Microtopography. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **2014**, *1648*, 101. [[CrossRef](#)]
65. Stephansson, S.N.; Byers, B.A.; García, A.J. Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2527–2534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Keselowsky, B.G.; Collard, D.M.; García, A.J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *66*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Vallières, K.; Chevallier, P.; Sarra-Bournet, C.; Turgeon, S.; Laroche, G. AFM imaging of immobilized fibronectin: Does the surface conjugation scheme affect the protein orientation/conformation? *Langmuir* **2007**, *23*, 9745–9751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Liu, Y.; Mahara, A.; Kambe, Y.; Hsu, Y.-I.; Yamaoka, T. Endothelial cell adhesion and blood response to hemocompatible peptide 1 (HCP-1), REDV, and RGD peptide sequences with free N-terminal amino groups immobilized on a biomedical expanded polytetrafluoroethylene surface. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 1034–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Fischer, N.G.; He, J.; Aparicio, C. Surface Immobilization Chemistry of a Laminin-Derived Peptide Affects Keratinocyte Activity. *Coatings* **2020**, *10*, 560. [[CrossRef](#)]
70. Vida, Y.; Collado, D.; Najera, F.; Claros, S.; Becerra, J.; Andrades, J.A.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimer surface orientation of the RGD peptide affects mesenchymal stem cell adhesion. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 49839–49844. [[CrossRef](#)]
71. Yuan, L.; Yu, Q.; Li, D.; Chen, H. Surface Modification to Control Protein/Surface Interactions. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1031–1040. [[CrossRef](#)]
72. Hern, D.L.; Hubbell, J.A. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 266–276. [[CrossRef](#)]



Oświadczenie doktoranta o udziale w publikacji naukowej

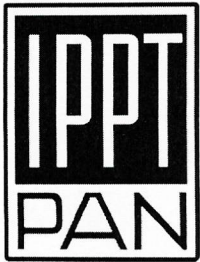
Niniejszym potwierdzam, że mój wkład w przygotowanie **publikacji nr 1**, tj. Denis P., Dulnik J., Sajkiewicz P., Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, Vol.64, No.7, pp.354-364, 2015 obejmował dyskusję i określenie koncepcji badań, opracowanie mniej toksycznego alternatywnego systemu rozpuszczalników dla roztworów polimerowych polikaprolakton/żelatyna do procesu elektroprzędzenia, otrzymanie dwuskładnikowych włóknin polikaprolakton/żelatyna metodą elektroprzędzenia, wykonanie obserwacji struktury roztworów oraz włóknin za pomocą świetlnego mikroskopu polaryzacyjno-interferencyjnego, wykonanie obrazowania próbek za pomocą mikroskopii SEM, przeprowadzenie analizy statystycznej grubości włókien, wykonanie badań krystaliczności metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej, opracowanie i dyskusję wyników powyższych badań, interpretację wyników oraz udział w dyskusji innych wyników badań ujętych w pracy, przygotowanie i redagowanie tekstu manuskryptu.

Podpis doktorantki

Podpisy współautorów

- mgr inż. Piotr Denis

Podpis promotora



Oświadczenie doktoranta o udziale w publikacji naukowej

Niniejszym potwierdzam, że mój wkład w przygotowanie **publikacji nr 2**, tj Dulnik J., Denis P., Sajkiewicz P., Kołbuk D., Choińska E., Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system, Polymer Degradation and Stability, Vol.130, pp.10-21, 2016 obejmował dyskusję i określenie koncepcji badań, wykonanie przeglądu literatury, otrzymanie dwuskładnikowych włókien polikaprolakton/żelatyna oraz polikaprolakton/kolagen metodą elektroprzędzenia, przeprowadzenie badania wymywania biododatku i ocena zmian masy metodą grawimetryczną, wykonanie obrazowania próbek za pomocą mikroskopii SEM, wykonanie badań krystaliczności metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej, wykonanie badań zwilżalności próbek, opracowanie i dyskusję wyników powyższych badań, interpretację wyników oraz udział w dyskusji innych wyników badań ujętych w pracy, przygotowanie i redagowanie tekstu manuskryptu.

Podpis doktorantki

Judyta Dulnik

Podpisy współautorów

- mgr inż. Piotr Denis

Piotr Denis

- dr hab. Dorota Kołbuk-Konieczny

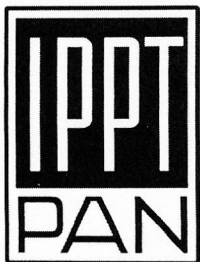
D Kołbuk

- dr inż. Emilia Choińska

Emilia Choińska

Podpis promotora

Bajlic wsc



Oświadczenie doktoranta o udziale w publikacji naukowej

Niniejszym potwierdzam, że mój wkład w przygotowanie **publikacji nr 3**, tj Dulnik J., Kołbuk D., Denis P., Sajkiewicz P., The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres, European Polymer Journal, Vol.104, pp.147-156, 2018 obejmował dyskusję i określenie koncepcji badań, wykonanie przeglądu literatury, otrzymanie dwuskładnikowych włókien polikaprolakton/żelatyna o polikaprolakton/kolagen metodą elektroprzędzenia, prowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie badań komórkowych in vitro – badań cytotoksyczności, badania aktywności metabolicznej oraz hodowli na potrzeby oceny morfologii komórek, wykonanie obrazowania komórek metodą mikroskopii fluorescencyjnej oraz SEM, opracowanie i dyskusję wyników powyższych badań, interpretację wyników oraz udział w dyskusji innych wyników badań ujętych w pracy, przygotowanie i redagowanie tekstu manuskryptu.

Podpis doktorantki

Judyta Dulnik

Podpisy współautorów

- dr hab. Dorota Kołbuk-Konieczny

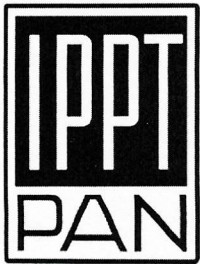
DKołbuk

- mgr inż. Piotr Denis

Piotr Denis

Podpis promotora

Sajkiewicz



Oświadczenie doktoranta o udziale w publikacji naukowej

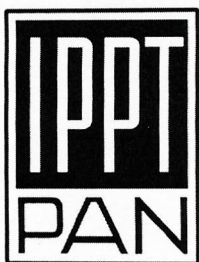
Niniejszym potwierdzam, że mój wkład w przygotowanie **publikacji nr 4**, tj Dulnik J., Sajkiewicz P., Crosslinking of gelatin in bicomponent electrospun fibers, Materials, Vol.14, No.12, pp.3391-1-13, 2021 obejmował dyskusję i określenie koncepcji badań, wykonanie przeglądu literatury, otrzymanie dwuskładnikowych włókien polikaprolakton/żelatyna metodą elektroprzędzenia, optymalizację rozpuszczalnika dla czynników sieciujących, przeprowadzenie reakcji sieciowania żelatyny we włóknach czterema metodami chemicznymi, wykonanie obrazowania próbek za pomocą mikroskopii SEM, wykonanie badań próbek metodą spektroskopii ATR-FTIR, przeprowadzenie badania wymywania biododatku i ocena zmian masy metodą grawimetryczną, opracowanie, analizę i dyskusję wyników powyższych badań, przygotowanie i redagowanie tekstu manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.

Podpis doktorantki

Judyta Dulnik

Podpis promotora

Sajkiewicz



Oświadczenie doktoranta o udziale w publikacji naukowej

Niniejszym potwierdzam, że mój wkład w przygotowanie **publikacji nr 5**, tj Dulnik J., Jeznach O., Sajkiewicz P., A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization, Journal of Functional Biomaterials, Vol.13, No.4, pp.272-1-23, 2022, obejmował dyskusję i określenie koncepcji badań, otrzymanie włókien poliestrowych metodą elektroprzędzenia, przeprowadzenie reakcji hydrolizy alkalicznej i obróbki zimną plazmą tlenową na włókninach oraz określenie wzrostu ilości grup $-COOH$ na powierzchni materiału, przeprowadzenie przyłączania żelatyny do powierzchni włókien poddanych hydrolizie i działaniu plazmy, wykonanie obrazowania próbek za pomocą mikroskopii SEM, wykonanie badań zwilżalności próbek, wykonanie badań zmian średniej masy cząsteczkowej próbek za pomocą chromatografii żelowej, przeprowadzenie jednoosiowej próby rozciągania próbek, wykonanie badań próbek metodą spektroskopii ATR-FTIR, prowadzenie hodowli komórkowej oraz wykonanie badań komórkowych in vitro – badań cytotoksyczności, badania aktywności metabolicznej oraz hodowli na potrzeby oceny morfologii komórek, wykonanie obrazowania komórek metodą mikroskopii fluorescencyjnej oraz SEM, opracowanie i dyskusję wyników powyższych badań, interpretację wyników oraz udział w dyskusji innych wyników badań ujętych w pracy, przygotowanie i redagowanie tekstu manuskryptu.

Podpis doktorantki

Judyta Dulnik

Podpisy współautorów

- dr inż. Oliwia Jeznach

Oliwia Jeznach

Podpis promotora

Sajkiewicz