

Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Katedra Chemii Biomedycznej

mgr inż. Agnieszka Kubiś

**Synteza i charakterystyka peptydów
proregeneracyjnych oraz ich kompozytów
z chitozanem do zastosowań
w regeneracji tkanki kostnej**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz–Motowidło

Promotor pomocniczy: dr Natalia Karska

Gdańsk 2025

Badania prowadziłam w ramach projektu pt.: „Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i pro-regeneracyjnych do odbudowy tkanki kostnej – GlassPoPep”, umowa nr TECHMATSTRATEG2/406384/7/NCBR/2019 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.



oraz w ramach projektów Badań Młodych Naukowców:

1. Badanie wpływu różnych warunków na autohydrolizę peptydu o właściwościach proregeneracyjnych p1 oraz badanie aktywności biologicznej produktów jego rozpadu, nr 539-T070-B018-22;
2. Synteza, badania fizykochemiczne oraz zbadanie potencjału do formowania fibryli peptydów stanowiących fragment czynnika wzrostu osteogenego (OGP), nr 539-T070-B889-21;
3. Synteza maleimidu i maleimidowych pochodnych aminokwasów, nr 538-8720-B280-19.



Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania:

prof. Sylwii Rodziewicz–Motowidło za objęcie promotorstwa mojej rozprawy doktorskiej, zainteresowanie mnie realizowaną tematyką badań oraz nieocenioną pomoc, wsparcie i nieustającą motywację do pracy;

dr Natalii Karskiej za cierpliwość i zaangażowanie, z jakim wprowadzała mnie Pani w zagadnienia pracy doświadczalnej. Jestem szczególnie wdzięczna za rzetelne zapoznanie mnie z zasadami prowadzenia badań laboratoryjnych, przekazaną wiedzę, opiekę naukową, cenne wskazówki oraz pomoc w realizacji i redagowaniu pracy;

dr Justynie Sawickiej za pomoc w prowadzeniu badań oraz wsparcie merytoryczne;

prof. Franciszkowi Kasprzykowskiemu za niezastąpioną pomoc w zakresie syntezy organicznej;

pracownikom i doktorantom Katedry Chemii Biomedycznej za życzliwą atmosferę, gotowość do dzielenia się wiedzą, inspirujące rozmowy oraz wsparcie, które towarzyszyło mi na różnych etapach prowadzonych badań;

Mojemu mężowi Krzyśkowi i córeczce Julce za niezachwianą wiarę we mnie, wyrozumiałość, cierpliwość, nieustanne wsparcie i dobre słowo w chwilach zwątpienia.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	6
ABSTRACT	9
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	12
I. WPROWADZENIE	15
1. Hierarchiczna anatomia kości	18
1.1 Makrostruktura (kości zbite i gąbczaste)	19
1.2 Mikrostruktura	20
1.3 Nanostruktura	22
2. Typy komórek kostnych i ich rola w przebudowie oraz homeostazie tkanki kostnej	27
3. Proces odbudowy i gojenia się kości	28
4. Czynniki wzrostu i ścieżki sygnałowe w komórkach kości	32
5. Czynniki bioaktywne wspomagające regenerację kości – rola peptydów	36
5.1 Peptydy ułatwiające adhezję komórek	36
5.2 Peptydy stymulujące osteoindukcję	39
5.3 Peptydy stymulujące angiogenezę	41
6. Inżynieria tkanki kostnej i substytuty tkanki kostnej	42
6.1 Polimery w inżynierii tkankowej kości i implantacji	50
6.2 Chitozan	51
6.3 Wybrane metody koniugacji chitozanu z peptydami	54
6.4 Łączniki maleimidowe – zastosowanie w koniugacji polimerów z peptydami i białkami	58
6.5 Zastosowanie chitozanu w wyrobach medycznych i preparatach terapeutycznych	61
6.6 Wykorzystanie koniugatów chitozanu z peptydami w biomedycynie i inżynierii tkankowej	65
II. CEL PRACY	68
III. MATERIAŁY I METODY	71
1. Synteza peptydów	71
1.1 Synteza peptydów przy użyciu automatycznego syntezyzatora	71
1.2 Odszczepianie peptydów od nośnika	74
2. Oczyszczanie peptydów	75
3. Badanie stabilności peptydów	76
3.1 Badanie stabilności peptydów w wodzie	76
3.2 Badanie stabilności peptydów w pożywce	76
4. Trawienie enzymatyczne peptydów z wykorzystaniem metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 7 (MMP-7)	77

5. Synteza estru aktywnego maleimidoglicyny (ester <i>N</i> -hydroksysukcynimidowy kwasu aminooctowego).....	78
6. Modyfikacja chitozanu przy użyciu estru <i>N</i> -hydroksysukcynimidowego maleimidoglicyny (Mal-Gly-NHS)	79
7. Modyfikacja chitozanu z użyciem peptydu ug4	80
7.1 Modyfikacja chitozanu CH-m4.1 poprzez sprzęganie z peptydem ug4	80
7.2 Modyfikacja chitozanu CH-m4.4 poprzez sprzęganie z peptydem ug4	81
8. Analiza aminokwasów metodą chromatograficzną z derywatyzacją przedanalityczną.....	82
8.1 Przygotowanie próbki do analizy aminokwasowej – hydroliza kwasowa	82
8.2 Derywatyzacja.....	83
8.3 Zastosowanie chromatografii HILIC w analizie stopnia modyfikacji chitozanu	85
8.3.1 Analiza stopnia podstawienia chitozanu pochodną maleimidoaminokwasu metodą chromatografii HILIC	85
8.3.2 Analiza stopnia podstawienia chitozanu peptydem	87
9. Badania agregacyjne peptydów	88
9.1 Analiza konformacji peptydów metodą dichroizmu kołowego	88
9.2 Analiza agregacji fibryli peptydowych metodą fluorescencji tioflawiny T (ThT).....	88
9.3 Obrazowanie fibryli peptydu ug52 za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)	89
9.4 Uwalnianie peptydu ug1 z fibryli ug52 w obecności metaloproteinazy MMP-7	89
10. Otrzymywanie kompozytów chitozanowo-bioszklanych zawierających peptydy.....	90
11. Analiza struktury powierzchni i porowatości kompozytów metodą SEM	91
12. Ocena bioaktywności powierzchniowej kompozytów w warunkach in vitro.....	92
13. Analiza kinetyki uwalniania peptydu z kompozytu	92
14. Analiza termograwimetryczna	93
15. Badania cytotoksyczności i potencjału proliferacyjnego peptydów wobec komórek hFOB.....	94
15.1 Test LDH – test do oceny uszkodzeń błony komórkowej.....	94
15.2 Test WST-1 – ocena aktywności mitochondrialnej i proliferacji komórek.....	94
16. Badania implantacyjne kompozytu chitozanowo-bioszklanego w modelu zwierzęcym	95
16.1 Badania toksyczności układowej	95
16.2 Miejscowa reakcja po implantacji.....	97
IV. BADANIA WŁASNE.....	99
CZĘŚĆ I – Modyfikacja chitozanu pochodną maleimidoaminokwasu i jego kowalencyjna koniugacja z bioaktywnym peptydem	99
1. Projektowanie peptydów o właściwościach proregeneracyjnych.....	99
2. Synteza i analiza peptydów proregeneracyjnych.....	100

3. Stabilność peptydów proregeneracyjnych w wodzie i pożywce hodowlanej.....	106
4. Badania biologiczne peptydów proregeneracyjnych.....	109
4.1 Ocena cytotoksyczności peptydów wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19.....	109
4.2 Ocena wpływu peptydów na proliferację komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19.....	110
5. Wybór optymalnego peptydu proregeneracyjnego do dalszych badań funkcjonalnych	111
6. Analiza miejsca cięcia enzymatycznego peptydu ug4 przez metaloproteinazę 7 (MMP-7) ..	113
7. Synteza estru <i>N</i> -hydroksysukcynimidowego kwasu 2-maleimidooctowego (estru aktywnego maleimidoglicyny – Mal-Gly-OSu).....	116
8. Modyfikacja chemiczna chitozanu estrem aktywnym kwasu 2-maleimidooctowego.....	119
9. Analiza stopnia modyfikacji chitozanu maleimidoglicyną (Mal-Gly) metodą pośrednią	120
10. Oznaczanie stopnia podstawienia chitozanu pochodną maleimidoglicyny (Mal-Gly) metodą bezpośrednią z wykorzystaniem chromatografii HILIC	125
11. Optymalizacja procesu modyfikacji chitozanu pochodną maleimidoglicyny	128
11.1 Wprowadzenie i założenia optymalizacji	128
11.2 Procedura nr 4 – zakładana modyfikacja 10% (optymalna).....	129
12. Modyfikacja maleimidochitozanu (CH-Mal-Gly) peptydem ug4.....	132
CZĘŚĆ II – Projektowanie peptydów fibrylogennych oraz ich zastosowanie w kompozytach chitozanowo-bioszklanych	138
1. Projektowanie peptydów o właściwościach fibrylogennych.....	138
2. Synteza i oczyszczanie peptydów	138
3. Stabilność peptydów o potencjale fibrylogennym w wodzie i pożywce hodowlanej	141
4. Analiza rozpadu peptydu ug51 w wodzie	143
5. Charakterystyka fizykochemiczna peptydów o potencjale fibrylogennym.....	146
5.1 Analiza struktur drugorzędowych peptydów ug51, ug52, ug53 metodą dichroizmu kołowego (CD).....	146
5.2 Analiza fibrylizacji peptydów przy użyciu tioflawiny T	147
5.3 Badanie morfologii fibryli peptydowych metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).....	149
5.4 Badanie enzymatycznego uwalniania peptydu o sekwencji aktywnej z fibryli peptydowej ug52	152
6. Badania biologiczne peptydów o potencjale fibrylogennym	154
6.1 Ocena cytotoksyczności peptydów wobec komórek ludzkich osteoblastów płodowych hFOB 1.19.....	154
6.2 Ocena wpływu peptydów na proliferację komórek ludzkich osteoblastów płodowych hFOB 1.19.....	155

CZĘŚĆ III – Charakterystyka fizykochemiczna oraz ocena bioaktywności in vitro i in vivo kompozytów chitozanowo–bioszklanych	157
1. Analiza właściwości fizykochemicznych kompozytów chitozanowo–bioszklanych	157
2. Badania struktury powierzchni oraz wielkości porów kompozytów	160
3. Badania bioaktywności kompozytów	162
4. Analiza profilu uwalniania peptydu z kompozytu	164
4.1 Uwalnianie peptydu ug4 z kompozytów 1–5	166
4.2 Uwalnianie peptydu ug4 z koniugtu CH–m4.4–ug4	169
4.3 Uwalnianie peptydu ug51 z kompozytów	173
4.4 Uwalnianie peptydu ug52 z kompozytów chitozanowo–bioszklanych	176
4.4.1 Uwalnianie peptydu ug52 z kompozytu 8	176
4.4.2 Uwalnianie peptydu ug52 z kompozytu 9	179
5. Badania biologiczne kompozytów	179
6. Badania implantacyjne	182
6.1 Toksyczność ostra	183
6.2 Badania miejscowej reakcji tkanki kostnej po implantacji biokompozytu	183
V. Dyskusja wyników	185
Wykaz dorobku naukowego autorki	208
Bibliografia	214
Spis załączników	232
Załącznik 1	233
Załącznik 2	234
Załącznik 3	240
Załącznik 4	245

STRESZCZENIE

Choroby kości stanowią istotne wyzwanie zdrowotne o zasięgu globalnym, dotykając osoby w różnym wieku i obu płci. U osób powyżej 50. roku życia odpowiadają za około połowę wszystkich schorzeń przewlekłych. Do najczęstszych należą choroba zwyrodnieniowa stawów i osteoporoza, które dotykają odpowiednio około 7,6% i 2,5% populacji światowej.

Tkanka kostna ulega ciągłej przebudowie dzięki aktywności komórek kostnych, jednak w przypadku złamań patologicznych lub dużych ubytków jej zdolność do regeneracji bywa niewystarczająca. Proces ten dodatkowo utrudniają choroby ogólnoustrojowe, infekcje oraz niedostateczne unaczynienie. Choć przeszczepy autologiczne są uznawane za „złoty standard”, ich stosowanie wiąże się z ograniczeniami, a alternatywne metody nie zawsze zapewniają skuteczną regenerację.

W odpowiedzi na wyzwania współczesnej medycyny regeneracyjnej, w swojej pracy doktorskiej podjęłam się zaprojektowania i wytworzenia koniugatów przeznaczonych do zastosowania jako składniki implantu zastępującego ubytki kostne. Kompozyty te miały pełnić rolę tymczasowej matrycy komórkowej oraz wspomagać regenerację uszkodzonej tkanki.

Celem mojej pracy było opracowanie innowacyjnych materiałów o właściwościach proregeneracyjnych, przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. W tym celu zaprojektowałam, zsyntezowałam i scharakteryzowałam trzy typy koniugatów, które składały się z chitozanu, maleimidoaminokwasu oraz wyselekcjonowanych peptydów stanowiących fragmenty czynników wzrostu, różniły się sposobem integracji peptydów z matrycą chitozanową oraz mechanizmem ich uwalniania.

Pierwszy typ koniugatu zawierał chitozan z kowalencyjnie przyłączonym, biologicznie aktywnym peptydem ug4. Do jego sprzężenia z chitozanem zastosowałam łącznik maleimidowy. Drugi typ stanowiła mieszanina chitozanu z wolnym peptydem ug51, który ulegał powolnej autohydrolizie, stopniowo uwalniając aktywne sekwencje do środowiska tkanki kostnej. Trzeci typ koniugatu zawierał chitozan z fibrylami peptydowymi ug52, cechującymi się wysoką stabilnością i kontrolowanym, długotrwałym uwalnianiem peptydów, co czyni je obiecującym materiałem o przedłużonym działaniu terapeutycznym. Zaprojektowane przeze mnie peptydy zawierały dodatkowo sekwencje

rozpoznawane przez metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 7 (MMP-7), co umożliwiało ich enzymatyczne, kontrolowane uwalnianie w warunkach fizjologicznych, bezpośrednio w miejscu implantacji. Stabilność peptydów w wodzie i medium hodowlanym oraz miejsce degradacji enzymatycznej przez MMP-7 analizowałam za pomocą chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

Badania biologiczne, obejmujące ocenę cytotoksyczności i proliferacji osteoblastów w kontakcie z badanymi związkami, przeprowadziłam we współpracy z Instytutem Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku. Na podstawie wyników biologicznych i analizy ekonomicznej wybrałam peptyd wykazujący najwyższą aktywność, dla którego opracowałam i zoptymalizowałam procedurę syntezy w skali półtechnicznej.

Przeprowadziłam syntezę aktywnego estru maleimidoglicyny oraz opracowałam metodę funkcjonalizacji chitozanu poprzez przyłączenie maleimidoaminokwasu. Stopień podstawienia analizowałam metodą HPLC po uprzedniej optymalizacji warunków chromatograficznych i doborze wzorca zewnętrznego. Na tej podstawie zaprojektowałam i zoptymalizowałam syntezę koniugatu peptyd-chitozan, uzyskanego na drodze kowalencyjnego sprzężenia wybranego peptydu z sfunekcjonalizowanym chitozanem. Skuteczność sprzężenia oceniałam metodą HPLC, uwzględniając walidację warunków analitycznych i dobór wzorca kalibracyjnego.

Uzupełnieniem pracy było otrzymanie fibryli peptydowych o właściwościach proregeneracyjnych oraz ich szczegółowa charakterystyka fizykochemiczna, obejmująca testy agregacyjne, spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), barwienie tioflawiną T oraz transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).

Podsumowując, przeprowadziłam optymalizację procesu syntezy peptydów, funkcjonalizację chitozanu oraz analizę fizykochemicznych i biologicznych właściwości otrzymanych koniugatów i struktur fibrylarnych. Opracowane przeze mnie koniugaty miały na celu stworzenie bioaktywnego środowiska wspierającego proces regeneracji tkanki kostnej oraz kontrolowaną prezentację bioaktywnych komponentów. Krążki kompozytowe zostały przygotowane we współpracy z Instytutem Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Sieć Badawcza Łukasiewicz. Opracowane materiały zostały scharakteryzowane pod kątem właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. Dla kompozytu wykazującego najlepsze właściwości proregeneracyjne

przeprowadzono badania implantacyjne w Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, oceniające toksyczność ostrą oraz miejscową reakcję tkanki kostnej po wszczepieniu biomateriału. Badania przedstawione w niniejszej dysertacji mają charakter interdyscyplinarny, uzyskane wyniki poszerzają wiedzę światową w zakresie materiałów kompozytowych do wypełnień kości.

ABSTRACT

Bone diseases represent a major global health challenge, affecting individuals across all age groups and genders. Among people over the age of 50, these conditions account for nearly half of all chronic illnesses. The most prevalent bone disorders—osteoarthritis and osteoporosis—affect approximately 7.6% and 2.5% of the global population, respectively.

Bone tissue undergoes continuous remodelling driven by the coordinated activity of bone cells. However, in cases of pathological fractures or extensive bone defects, the intrinsic regenerative capacity of bone may be insufficient. This regenerative potential is further compromised by systemic diseases, infections, or poor vascularization. Although autologous bone grafts remain the clinical “gold standard” for bone repair, their use is limited, and alternative methods often fail to ensure predictable and effective regeneration.

In response to these challenges, my doctoral research focused on the design and development of composite materials intended for use in implants for bone defect repair. These composites were engineered to function as temporary cellular scaffolds and to promote the regeneration of damaged bone tissue.

The primary aim of the study was to develop innovative composite materials with pro-regenerative properties for applications in bone tissue engineering. To achieve this, I designed, synthesized, and characterized three types of composites composed of chitosan, a 2-Maleimido acetic acid, and selected peptides derived from growth factor sequences. The composites differed in the mode of peptide integration into the chitosan matrix and in their peptide release mechanisms.

The first composite type consisted of chitosan covalently conjugated with the biologically active peptide ug4 via a maleimide linker. The second was a physical mixture of chitosan and free peptide ug51, which underwent slow autohydrolysis, gradually releasing active sequences into the bone tissue environment. The third composite incorporated chitosan and peptide fibrils of ug52, which exhibited high stability and enabled controlled, sustained peptide release, making them a promising platform for long-term therapeutic application.

The designed peptides included sequences recognized by matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), enabling enzymatically controlled release under physiological conditions

directly at the site of implantation. Peptide stability in aqueous and culture media, as well as enzymatic cleavage sites, were investigated using liquid chromatography and mass spectrometry.

Biological evaluation—including cytotoxicity assays and osteoblast proliferation studies in the presence of the developed materials—was carried out in collaboration with the Institute of Biotechnology and Molecular Medicine in Gdańsk. Based on the biological activity and cost-effectiveness analysis, the most promising peptide was selected, and a pilot-scale synthesis procedure was developed and optimized.

I synthesized an active ester of maleimidoglycine and established a method for chitosan functionalization via conjugation with a maleimidoamino acid. The degree of substitution was quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC), following optimization of chromatographic conditions and selection of an external calibration standard. These results enabled the design and optimization of the peptide–chitosan conjugate via covalent coupling. The efficiency of peptide conjugation was assessed by HPLC under validated analytical conditions.

The project also included the fabrication and detailed physicochemical characterization of pro-regenerative peptide fibrils. This characterization involved aggregation assays, circular dichroism (CD) spectroscopy, thioflavin T staining, and transmission electron microscopy (TEM).

In summary, the work optimized synthetic procedures for bioactive peptides, established a method for chitosan functionalization, and comprehensively evaluated the physicochemical and biological properties of the resulting peptide–chitosan conjugates and fibrillar structures. The developed composites were designed to provide a bioactive environment conducive to bone tissue regeneration and to facilitate the controlled release of therapeutic agents.

Composite discs were prepared in collaboration with the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw, a member of the Łukasiewicz Research Network. The materials were analysed for their physicochemical and biological properties. For the composite exhibiting the highest regenerative potential, implantation studies were conducted at the Centre for Preclinical Research of the Wrocław Medical University, assessing acute toxicity and local tissue response following bone implantation.

This dissertation presents an interdisciplinary research approach and contributes novel findings to the global body of knowledge in the field of bioactive bone-filling composite materials.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

¹ H NMR	– protonowa spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. <i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i>)
3-MPA	– kwas 3-merkaptopropionowy
ACN	– acetonitryl
ADC	– koniugaty przeciwciało–lek (ang. <i>antibody–drug conjugates</i>)
ALP	– fosfataza alkaliczna (ang. <i>alkaline phosphatase</i>)
BBN	– peptyd bombezyna
BG	– bioszkoło (ang. <i>bioglass</i>)
BMP	– białka morfogenetyczne kości (ang. <i>bone morphogenetic protein</i>)
CAD	– detektor wyładowań koronowych (ang. <i>Charged Aerosol Detector</i>)
CD	– dichroizm kołowy (ang. <i>Circular Dichroism</i>)
CH	– chitozan (ang. <i>chitosan</i>)
CH–Mal–Gly	– chitozan z kowalencyjnie przyłączoną pochodną maleimidoglicyny
CH _n	– nanocząstki chitozanu (ang. <i>chitosan nanoparticles</i>)
CPD4	– fragment copine 7
Cpne7	– białko kopina–7 (ang. <i>copine 7</i>)
CSD	– próg wielkości krytycznej (ang. <i>critical size defect</i>)
DCC	– <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DDA	– stopień deacetylacji (ang. <i>degree of deacetylation</i>)
DGR	– peptyd pochodzący z motywu adhezji komórkowej osteopontyny
DMEM	– pożywka hodowlana (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
ECM	– macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
EDC	– 1-etylo-3-dimetyloaminopropylokarbodiimid
EDS	– spektrometria dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>)
EDT	– 1,2-etanoditiol
ELSD	– detektor rozproszenia światła (ang. <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
EMA	– Europejska Agencja Leków (ang. <i>European Medicines Agency</i>)
F-12	– pożywka hodowlana Ham's F-12 (ang. <i>Ham's F-12 Nutrient Mixture</i>)
FBS	– płodowa surowica bydlęca (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	– Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FGF	– czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
FTIR	– spektroskopia fourierowska w podczerwieni (ang. <i>Fourier–Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GCH	– glikolowany chitozan
GF	– czynnik wzrostu (ang. <i>growth factor</i>)
HA	– hydroksyapatyt
HEPES	– kwas 4-(2-hydroksyetylo)–1-piperazynoetanosulfonowy
hFOB 1.19	– linia komórek ludzkich płodowych osteoblastów (ang. <i>human fetal osteoblast cell line</i>)
HILIC	– chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
IGF	– insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>insulin–like growth factor</i>)

LDH	– dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i>)
MALDI-TOF	– desorpcja laserowa w matrycy z analizatorem czasu przelotu (ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>)
Mal-Gly	– maleimidoglicyna (kwas 2-maleimidooctowy)
Mal-Gly-OSu	– chitozan zmodyfikowany <i>N</i> -hydrokssukcynimidowym estrem kwasu aminooctowego
MAPK	– kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MMP-7	– metaloproteinaza 7
MRME	– średnia eliptyczność molowa (ang. <i>mean residue molar ellipticity</i>)
MSCs	– mezenchymalne komórki macierzyste (ang. <i>mesenchymal stem cells</i>)
NAHis	– <i>N</i> -acetylo-histydyna
NCP	– białka niekolagenowe (ang. <i>non-collagenous proteins</i>)
NHS	– <i>N</i> -hydrokssukcynimid
OCN	– osteokalcyna (ang. <i>osteocalcin</i>)
OGP	– osteogenny peptyd wzrostu (ang. <i>Osteogenic Growth Peptide</i>)
OPA	– aldehyd o-ftalowy
OPN	– osteopontyna (ang. <i>osteopontin</i>)
Osx	– Osterix – czynnik transkrypcyjny SP7
P5	– bioszkło o składzie: 70% SiO ₂ , 25% CaO, 5% P ₂ O ₅ i granulacji < 1,0mm
PBS	– bufor fosforanowy
PDA	– detektor fotodiody (ang. <i>Photometric Diode Array</i>)
PDGF	– płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet derived growth factor</i>)
PLA	– polilaktyd
PTH	– parathormon
rh-BMP-2	– rekombinowane ludzkie białko morfogenetyczne kości-2 (ang. <i>recombinant human bone morphogenetic protein-2</i>)
RP-HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>)
SA	– alginian sodu
SBF	– symulowany płyn ustrojowy (ang. <i>simulated body fluid</i>)
SEM	– skaningowy mikroskop elektronowy (ang. <i>Scanning Electron Microscope</i>)
SPDP	– <i>N</i> -sukcynimidylo-3-(2-pirydyloditio)propionian
SPPS	– synteza na nośniku stałym (ang. <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
Sulfo-SANPAH	– sulfosukcynimidyl 6-(4'-azydo-2'-nitrofenyloamino)heksanoan
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TFA	– kwas trifluorooctowy
TGA	– analiza termogravimetryczna (ang. <i>Thermogravimetric Analysis</i>)
TGF	– transformujący czynnik wzrostu (ang. <i>transforming growth factor</i>)
THF	– tetrahydrofuran
ThT	– tioflawina T
TIPS	– triizopropylsilan

t_r	– czas retencji dodać
VEGF	– czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WST-1	– test aktywności mitochondriów/prolifracji
P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_0,8%	– bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 0,8% wagowych do chitozanu
P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_1,6%	– bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu
P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	– bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu
P5Sr/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	– bioszkło P5 domieszkowane SrO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu
P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%_ug46	– bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4 + peptyd ug46 , peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu, ug46 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 29 µg peptydu na 1 krążek
P5Zn/CH-ug51	– bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10µg peptydu na 1 krążek
P5Sr/CH-ug51	– bioszkło P5 domieszkowane SrO + chitozan + peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10µg peptydu na 1 krążek
P5Sr/CH-ug52	– bioszkło P5 domieszkowane SrO + chitozan + peptyd ug52 (лиофилизат) zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100µg peptydu na 1 krążek
P5Zn/CH-ug52(fibr)	– bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + peptyd ug52 w formie fibryli peptydowych zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100 µg na 1 krążek

I. WPROWADZENIE

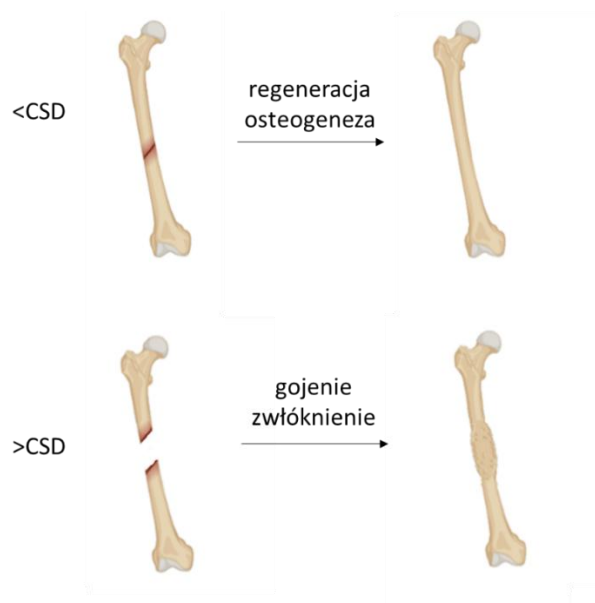
Choroby kości stanowią poważny, globalny problem zdrowotny, dotyczący ludzi we wszystkich grupach wiekowych i niezależnie od płci. Najpowszechniejszą chorobą zapalną kości jest choroba zwyrodnieniowa stawów, która w 2020 roku dotykała około 595 milionów pacjentów na całym świecie, co stanowiło około 7,6% światowej populacji [1]. Inną chorobą kości jest osteoporoza, która dotyka 200 milionów ludzi na całym świecie [2]. Charakteryzuje się układowym upośledzeniem masy kostnej i mikroarchitektury kości, co prowadzi do złamań z powodu kruchości kości [3]. Szacuje się, że osteoporoza jest przyczyną ponad 8,9 miliona złamań rocznie, co oznacza, że co 3 sekundy dochodzi do złamania osteoporotycznego [4]. Stosunek złamań osteoporotycznych u kobiet do mężczyzn wynosi około 2 : 1. Oznacza to, że kobiety stanowią większość pacjentów z tego typu złamaniami. Szacuje się, że 80% złamań przedramienia, 75% złamań kości ramiennej, 70% złamań biodra oraz 58% złamań kręgosłupa dotyczy kobiet. W okresie menopauzy spadek estrogenu ma większe skutki u kobiet niż u mężczyzn w podobnym wieku. Dodatkowo, wcześniejsze złamanie wiąże się z ponad 80% wzrostem ryzyka wystąpienia kolejnego złamania [5]. Jedna na trzy kobiety i co najmniej jeden na sześciu mężczyzn dozna złamania osteoporotycznego w swoim życiu. Co minutę w Unii Europejskiej pojawia się osiem nowych przypadków złamania. Szacuje się, że ponad 23 miliony mężczyzn i kobiet w Unii Europejskiej jest narażonych na wysokie ryzyko złamań osteoporotycznych. Ponadto osteoporoza stanowi znaczne obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej, wyczerpując ważne zasoby ekonomiczne i ludzkie. Roczny koszt leczenia osteoporozy szacuje się na 57 miliardów euro w krajach Unii Europejskiej oraz w Wielkiej Brytanii i Szwajcarii [6]. Całkowita globalna częstość występowania osteoporozy ma osiągnąć szacunkowo 263,2 miliona między rokiem 2030 a 2034 [1].

Na tle tych danych warto również zwrócić uwagę na inne, choć znacznie rzadsze, schorzenia układu kostnego, które mimo niższej częstości występowania mają istotne implikacje kliniczne. Nowotwory pierwotne kości stanowią mniej niż 1% wszystkich nowotworów, jednak złośliwe nowotwory kości stanowią około 6% wszystkich nowotworów u dzieci. Do najczęstszych podtypów nowotworów kości należą kostniakomięsak i mięsak Ewinga [7]. Istotnym problemem klinicznym pozostają przerzuty do tkanek kostnych, które są jednymi z najczęstszych miejsc przerzutów w organizmie. Kość jest dotknięta przerzutami w ponad 70% przypadków u pacjentów z

przerzutowym rakiem piersi oraz w około 30%–40% przypadków u pacjentów z zaawansowanym rakiem płuc. W Stanach Zjednoczonych około 350 000 osób rocznie umiera z powodu przerzutów do kości. Mimo postępu w leczeniu nowotworów pierwotnych, wskaźnik przeżycia pacjentów z przerzutami do kości pozostaje niski, a sytuacja ta nie uległa poprawie w ciągu ostatnich dwóch dekad [8].

Choroby układu kostnego stanowią połowę chorób przewlekłych u osób powyżej 50. roku życia. Starzenie się społeczeństw prowadzi do wyraźnego wzrostu liczby związanych z wiekiem uszkodzeń kości – prognozy dla Stanów Zjednoczonych wskazują na wzrost tych przypadków z 2,1 miliona w 2005 roku do 3 milionów w roku 2025 [9]. Podobny trend obserwuje się w Europie, gdzie przewiduje się wzrost liczby złamań o około 28% w okresie 2010–2025, co wiąże się z rosnącym odsetkiem osób w podeszłym wieku [4, 10, 11].

Wobec rosnącej częstości schorzeń kostnych coraz większego znaczenia nabiera zrozumienie biologicznych właściwości tkanki kostnej, w tym jej unikalnej zdolności do samoregeneracji. Kość jest jedną z nielicznych tkanek w organizmie ludzkim, która potrafi odtworzyć swoją strukturę i funkcję dzięki skoordynowanym mechanizmom naprawy komórkowej [9]. W przypadku niewielkich ubytków kostnych naturalne procesy regeneracyjne są zazwyczaj wystarczające i nie wymagają interwencji medycznej. Jednakże zdolność regeneracyjna kości ma swoje ograniczenia, szczególnie gdy ubytek przekracza tzw. próg wielkości krytycznej (CSD – ang. critical size defect), definiowany jako długość powyżej około 2 cm lub brak obejmujący ponad 50% obwodu kości (Rysunek 1) [12]. W takich sytuacjach mechanizmy endogenne okazują się niewystarczające, a prawidłowy zrost nie zachodzi samoistnie. Złożone i rozległe ubytki kostne mogą wynikać nie tylko z procesu starzenia czy osteoporozy, ale również z urazów komunikacyjnych bądź konieczności chirurgicznej resekcji guzów kości. Tego typu przypadki często charakteryzują się zaburzeniami w przebiegu procesu gojenia, co skutkuje niepełną lub niefunkcjonalną odbudową struktury kostnej. Dodatkowe czynniki, takie jak utrata miejscowego unaczynienia czy obecność infekcji, mogą dodatkowo komplikować regenerację, prowadząc do opóźnienia zrostu, jego nieprawidłowego przebiegu, a w skrajnych przypadkach do całkowitego braku zrostu [10, 13, 14].



Rysunek 1. Kość posiada zdolność do regeneracji ubytków mniejszych niż CSD. Jednak w przypadku, gdy ubytek przekracza ten rozmiar objętościowy, proces gojenia prowadzi głównie do zwłóknienia, a nie do właściwej regeneracji tkanki kostnej poprzez osteogenezę. Opracowanie własne na podstawie [12].

Autologiczne przeszczepy kostne pozostają tzw. „złotym standardem” w leczeniu ubytków kostnych, jednak ich zastosowanie wiąże się z istotnymi ograniczeniami. Do najczęstszych należą: ryzyko wtórnego uszkodzenia, możliwość infekcji w miejscu pobrania, konieczność precyzyjnego dopasowania kształtu przeszczepianej kości oraz potencjalna niewydolność przeszczepu wynikająca z ograniczeń biologicznych materiału autogennego [13]. Alternatywą są przeszczepy allogeniczne i heterogeniczne, których efektywność ogranicza jednak niedostateczna integracja oraz słabe unaczynienie w miejscu ubytku. Dodatkowo ich stosowanie obarczone jest ryzykiem immunologicznego odrzutu oraz możliwością transmisji patogenów. W leczeniu rozległych lub zakażonych ubytków kostnych, zwłaszcza w obrębie kończyn dolnych i w urazach powstałych w wyniku działania znacznych sił mechanicznych, stosuje się także technikę Ilizarowa oraz technikę Masqueleta. Metoda Ilizarowa polega na zastosowaniu zewnętrznego stabilizatora w postaci systemu pierścieni i drutów [10, 15] natomiast technika Masqueleta wykorzystuje tymczasowy cementowy dystanser z polimetakrylanu metylu (PMMA) oraz stabilizację zewnętrzną [11, 15, 16].

W odpowiedzi na ograniczenia tradycyjnych metod coraz większe zainteresowanie budzą syntetyczne substytuty kości. Należy jednak podkreślić, że ich zastosowanie –

zarówno w przypadku materiałów biologicznych, jak i syntetycznych – powinno być indywidualnie dostosowane do charakterystyki ubytku [17].

1. Hierarchiczna anatomia kości

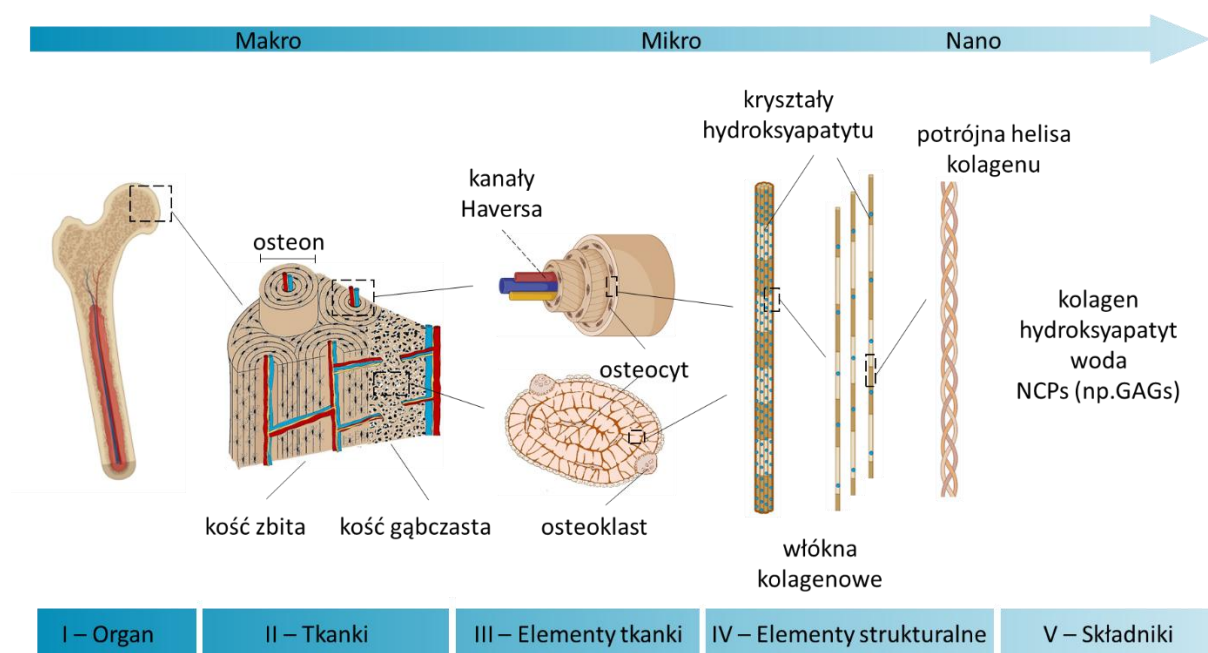
Kość jest wysoce unaczynioną, dynamiczną tkanką podlegającą nieustannej przebudowie. Cechuje się sztywnością, twardością oraz wyjątkową zdolnością do naprawy i regeneracji. W organizmie pełni liczne funkcje [13, 18, 19]:

- mechaniczne – ochrona narządów, nadawanie kształtu, umożliwienie ruchu,
- syntetyczne – udział w hematopoezie (syntezie komórek krwi),
- metaboliczne – magazynowanie minerałów, regulacja poziomu wapnia i fosforanów, a także gromadzenie tłuszczu.

Struktura kości jest wysoce zorganizowana i hierarchiczna. Obejmuje ona:

- makrostrukturę – złożoną z kości beleczkowatej (gąbczastej) i zbitej (korowej),
- mikrostrukturę – obejmującą kanały Haversa, osteony i blaszki,
- nanostrukturę – składającą się z minerałów i kolagenu.

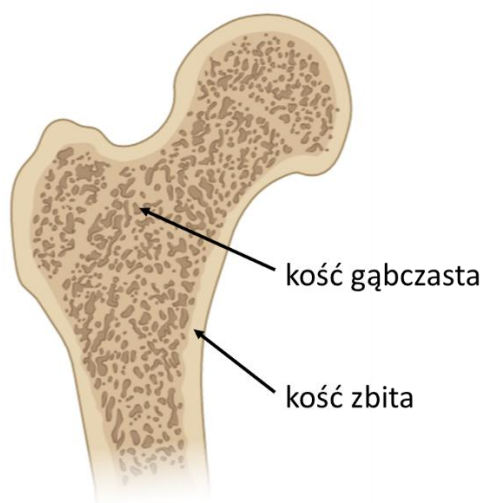
Schemat hierarchicznej budowy kości przedstawiłam na Rysunku 2.



Rysunek 2. Hierarchiczna struktura kości długiej. Opracowanie własne na podstawie [20].

1.1 Makrostruktura (kości zbite i gąbczaste)

W ujęciu makroskopowym kość dzieli się na dwa podstawowe typy: gęstą i zwartą kość zbitą (korową) oraz bardziej porowatą kość gąbczastą (beleczkową) (Rysunek 3). Różnią się one nie tylko stopniem porowatości, ale również lokalizacją w organizmie i pełnionymi funkcjami.

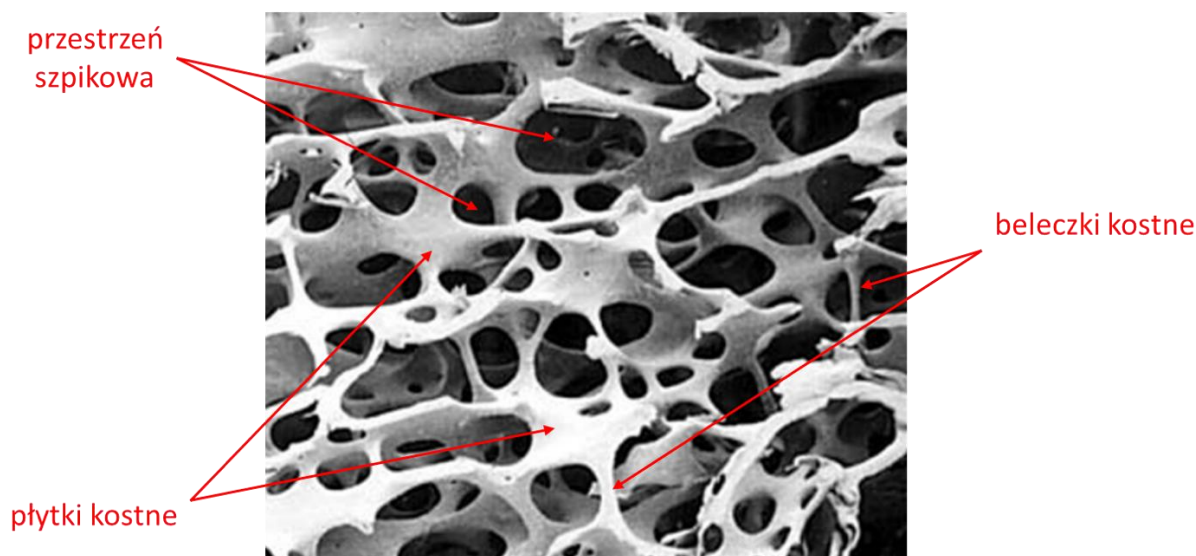


Rysunek 3. Budowa wewnętrzna kości długiej; widoczna jest kość gąbczasta – tkanka o strukturze beleczkowej, dobrze unaczyniona, obecna głównie w nasadach – oraz kość zbita, czyli warstwa zewnętrzna zbudowana z osteonów, nadająca wytrzymałość mechaniczną. Rysunek własny z wykorzystaniem programu BioRender.

Kość zbita stanowi główny składnik trzonów kości długich i krótkich kończyn. Obecna jest także w obrębie trzonów kręgów, końców kości długich, grzebienia biodrowego oraz czaszki, gdzie otacza kość gąbczastą. Porowatość tej tkanki, wynikająca z obecności kanałów Haversa, wynosi około 3–5% i wzrasta wraz z wiekiem oraz postępującymi zmianami osteoporotycznymi [2, 20].

Kość gąbczasta występuje głównie w nasadach kości długich, kręgów, żeber i grzebieniu biodrowym. Tworzy przestrzenną, porowatą sieć o wyższym stosunku powierzchni do objętości w porównaniu do kości zbitej [21] i charakteryzuje się strukturą przypominającą gąbkę [22]. Zbudowana jest z płytek i pręcików kostnych (Rysunek 4), z których każdy osiąga grubość około 200 μm . Łącznie stanowią one 25–30% objętości tkanki, pozostałą część zajmuje przestrzeń szpikowa. W przebiegu osteoporozy dochodzi

do degradacji płytek i ich przekształcenia w strukturę przypominającą pręty beleczkowe [23].



Rysunek 4. Kość gąbczasta składa się z szerszych płytek i cieńszych beleczek [24].

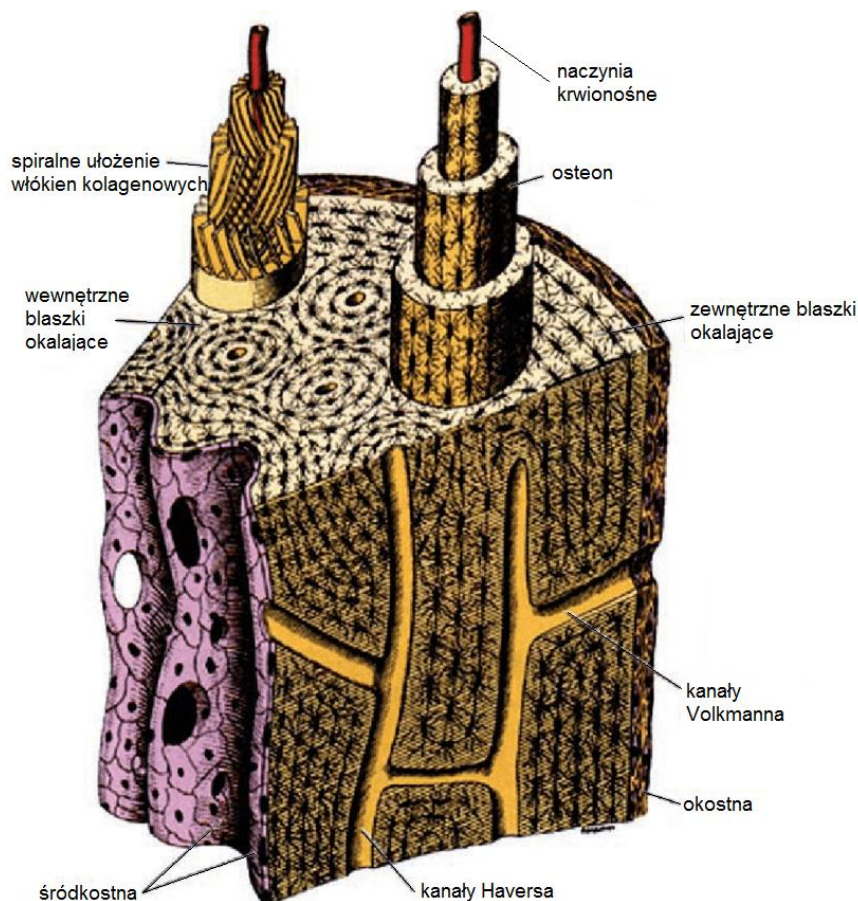
Na poziomie makroskopowym kość może być postrzegana jako kompozyt, w którym gęsta kość zbita tworzy zewnętrzną powłokę, a kość gąbczasta znajduje się w jamie szpikowej. Jej funkcją jest tłumienie obciążeń mechanicznych oraz efektywne przenoszenie sił na bardziej wytrzymałą kość zbitą [24].

1.2 Mikrostruktura

Tkanka kostna grubowłóknista (kość splotowata) zawiera przypadkowo ułożone włókna kolagenowe typu I, które szybko ulegają mineralizacji. Charakteryzuje się wysoką liczbą osteoblastów i komórek osteoprogenitorowych oraz większą gęstością komórek w porównaniu do tkanki kostnej drobnowłóknistej [20, 24]. Choć stanowi dominującą formę tkanki kostnej u rozwijającego się płodu, obszary kości splotowatej występują również u dorosłych, szczególnie w miejscach intensywnej przebudowy. Pełni również funkcję naprawczą – tworzy kalus kostny (pierwotną strukturę łącznotkankową i kostną), który tymczasowo wypełnia przestrzeń złamania. Kość splotowata jest także obserwowana w zębodołach, miejscach przyczepów ścięgien oraz w przebiegu zapalenia kości i szpiku [25, 26].

Tkanka kostna drobnowłóknista (kość blaszkowata) stanowi dojrzałą postać tkanki kostnej i dominuje w szkielecie osób dorosłych. Powstaje na drodze remodelowania z

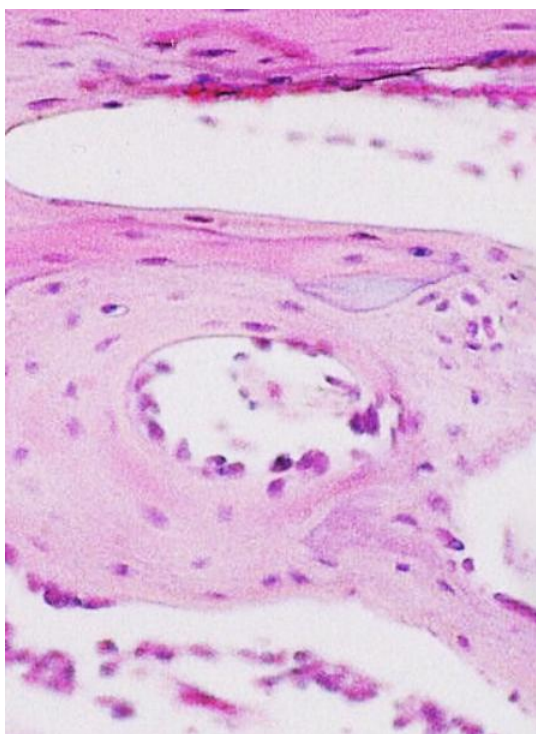
tkanki grubowłóknistej, przy udziale komórek kościogubnych (osteoklastów) i kościotwórczych (osteoblastów). Zbudowana jest z blaszek kostnych, zawierających regularnie rozmieszczone włókna kolagenowe typu I. Stanowi główny składnik zarówno kości zbitiej, jak i gąbczastej (Rysunek 5). Blaszkę w tej tkance mogą tworzyć dwa podstawowe układy przestrzenne: okrężny oraz rurkowy. Ten drugi tworzy osteony, czyli systemy Haversa, w których centralną część stanowi kanał Haversa otoczony przez 5 do 15 koncentrycznych blaszek. Każda z nich ma grubość kilku mikrometrów, a kolagenowe włókna są ułożone spiralnie wokół kanału. W kanałach Haversa obecne są naczynia włosowate, naczynia limfatyczne, drobne żyłki oraz luźna tkanka łączna zawierająca komórki osteoprogenitorowe. Poszczególne kanały Haversa są ze sobą połączone naczyniami poprzecznymi – kanałami Volkmanna – które dodatkowo łączą układ Haversa z naczyniami krwionośnymi biegnącymi w okostnej [25, 26].



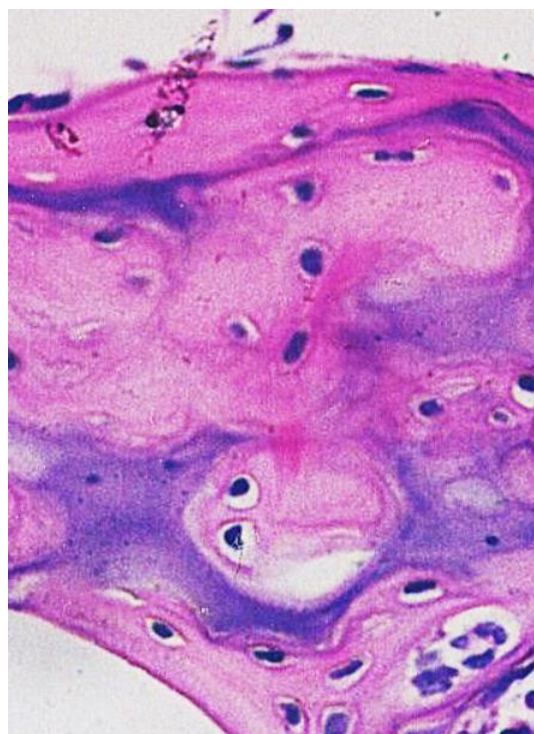
Rysunek 5. Szczegółowa budowa tkanki kostnej drobnowłóknistej z zaznaczonymi kanałami Haversa i kanałami Volkmanna. Opracowanie własne na podstawie [27].

Podsumowując, kość grubowłóknista cechuje się nieuporządkowanym układem warstwowym wynikającym z przypadkowego przebiegu włókien kolagenowych. Komórki kostne, takie jak osteoblasty i osteocyty, rozmieszczone są nieregularnie. W przeciwieństwie do niej, w kości drobnowłóknistej komórki te są uporządkowane koncentrycznie, co odzwierciedla strukturę osteonów w systemie Haversa (Rysunek 6) [26].

a)



b)

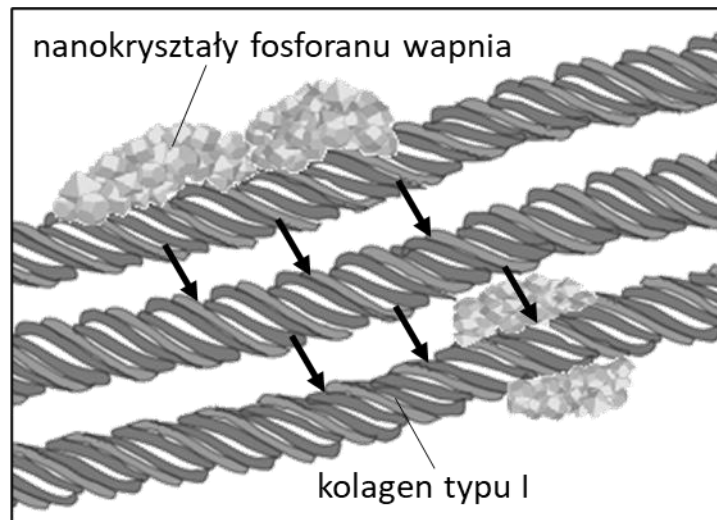


Rysunek 6. Przekrój histologiczny ukazujący szczegóły: a) kości drobnowłóknistej (blaszkowata) zorganizowanej koncentrycznie oraz b) kości grubowłóknistej (splotowatej) współwystępującej z tkanką chrzęstną i jej zwapniałą postacią [28].

1.3 Nanostruktura

Masa kości składa się w około 65% z minerałów nieorganicznych, głównie hydroksyapatytu, który odpowiada za twardość i wytrzymałość mechaniczną tkanki kostnej. Minerale te tworzą sztywną, odporną na ściskanie matrycę, stanowiącą podstawę dla prawidłowego funkcjonowania szkieletu. Około 20–25% masy kości stanowi komponent organiczny, którego dominującym składnikiem jest kolagen typu I (ok. 90%). Kolagen ten tworzy trójwymiarową sieć włókienek, które nadają kości elastyczność i odporność na rozciąganie oraz zginanie. Pozostałą część stanowią białka niekolagenowe

(NCP – ang. *non-collagenous proteins*), takie jak osteokalcyna, osteopontyna, sialoproteiny kostne czy proteoglikany, które pełnią kluczowe role w procesach mineralizacji, przebudowy i regulacji aktywności komórek kostnych. Około 10% masy kości to woda, która występuje zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z macierzą organiczną i mineralną, wpływając na właściwości mechaniczne i transport substancji odżywczych. Dojrzała mineralna matryca kostna zbudowana jest z wydłużonych, cienkich nanokryształów węglanowo-fosforanowych, które lokalizują się w szczelinach między włóknkami kolagenu typu I, szczególnie wzdłuż ich osi. Na wczesnym etapie mineralizacji osadza się amorficzny fosforan wapnia zawierający znaczne ilości węglanu wapnia. W miarę dojrzewania tkanki kryształy ulegają reorganizacji–tracą część węglanu, rosną bocznie i ustawiają się równolegle do włókien kolagenowych. Typowa grubość pojedynczego kryształu nie przekracza 10 nanometrów, natomiast długość waha się od kilkunastu do kilkudziesięciu nanometrów [29–31]. W kolejnych etapach rozwoju struktury te łączą się, tworząc większe polikrystaliczne agregaty, które mogą przekraczać szerokość pojedynczego włókna kolagenowego. Proces ten zachodzi przez całe życie, a wraz z wiekiem kryształy ulegają dalszemu wzrostowi na skutek substytucji jonowych i zmian w ich stechiometrii [21]. Warto podkreślić, że biologiczny minerał kostny, choć zbliżony składem do syntetycznego hydroksyapatytu, różni się od niego nieregularną strukturą i składem chemicznym. Jest niestechiometryczny, zawiera domieszki różnych jonów kationowych (np. Na^+ , Mg^{2+} , K^+) oraz anionowych (np. HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Cl^- , F^-), które częściowo zastępują fosforany (PO_4^{3-}) i grupy hydroksylowe (OH^-) w sieci krystalicznej. Przykładowo, jony węglanowe (CO_3^{2-}) mogą stanowić nawet 5–9% masy mineralnej i zajmować pozycje zarówno anionów fosforanowych jak i hydroksylowych (Rysunek 7). Takie podstawienia jonowe wpływają na rozpuszczalność, wytrzymałość oraz właściwości biologiczne minerału kostnego. [30].

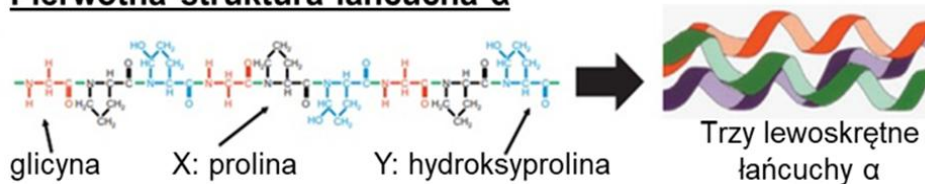


Rysunek 7. Mineralizacja kości, strzałkami zaznaczono miejsca osadzania się minerałów. Rysunek własny z wykorzystaniem programu BioRender.

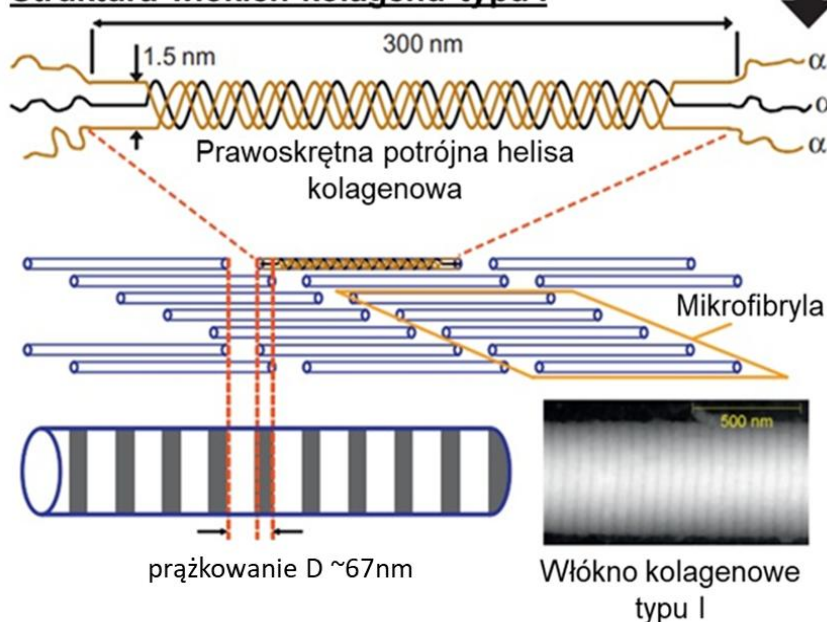
Około 89% części organicznej macierzy kostnej stanowi kolagen typu I, będący głównym białkiem strukturalnym, które nadaje kości wytrzymałość na rozciąganie i elastyczność. Kolageny typu III i V występują w znacznie mniejszych ilościach (około 1%), jednak odgrywają ważną rolę w regulacji organizacji włókien kolagenowych oraz w procesach naprawczych i przebudowie tkanki. Pozostałe 10% to NCP, które pełnią kluczowe funkcje w regulacji fibrylogenezy kolagenu, procesach mineralizacji, adhezji komórek oraz odporności na mikropęknięcia. Spośród nich około 85% występuje w przestrzeni pozakomórkowej, a pozostała część w komórkach kostnych. Na poziomie nanostrukturalnym kość zbudowana jest z włókien kolagenowych wplecionych w płytki mineralne. Taka organizacja zapewnia kości optymalne połączenie wytrzymałości i elastyczności – włókna kolagenowe pochłaniają energię i przeciwdziałają propagacji mikropęknięć, natomiast płytki mineralne odpowiadają za sztywność i odporność na ściskanie. Cząsteczka kolagenu typu I składa się z dwóch łańcuchów $\alpha 1$ i jednego łańcucha $\alpha 2$ – $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$, które zwijają się w stabilną potrójną helisę kolagenową. Każdy łańcuch zawiera około 1000 aminokwasów, w tym liczne powtórzenia motywu –Gly–X–Y–, w którym X i Y najczęściej stanowią prolina i hydroksyprolina. Glicyna, jako najmniejszy aminokwas, umożliwia ciasne upakowanie helisy, a hydroksyprolina stabilizuje ją poprzez tworzenie wiązań wodorowych z wodą i innymi resztami bocznymi. Cząsteczki wody tworzą również otoczkę hydratacyjną, która stabilizuje strukturę potrójnej helisy [23].

Kolagenowa potrójna helisa ma strukturę superskręconą – poszczególne łańcuchy tworzą strukturę lewoskrętnej helisy typu poliproliny II, które wspólnie formują prawoskrętną superhelisę kolagenową. Taka organizacja nadaje cząsteczce wyjątkową odporność mechaniczną i elastyczność – pozwalającą na wytrzymanie obciążeń wielokrotnie przewyższających jej własną masę. Podczas biosyntezy kolagenu, jego końce zawierają niehelikalne propeptydy (*N*- i *C*-propeptyd), które umożliwiają tworzenie poprzecznych wiązań (tzw. cross-links) – najczęściej przez reszty cysteinowe. Taka struktura to prokolagen. Po enzymatycznym usunięciu propeptydów powstaje tropokolagen – podstawowa jednostka włókien kolagenowych. Tropokolagen agreguje w mikrofibrele w sposób przesunięty, tzw. „głowa do ogona”, pozostawiając między cząsteczkami charakterystyczne przerwy o długości około 41 nm – tzw. „dziury” – będące miejscem inicjacji mineralizacji. Ostateczne włókna kolagenowe stabilizowane są przez poprzeczne wiązania, które mają kluczowy wpływ na właściwości mechaniczne i starzenie się tkanki (Rysunek 8) [27].

Pierwotna struktura łańcucha α



Struktura włókien kolagenu typu I



Rysunek 8. Fibryle kolagenowe zbudowane są z wielu cząsteczek kolagenu typu I, z których każda ma długość około 300 nm i średnicę 1,5 nm. Cząsteczki te układają się wzdłuż osi fibryli w charakterystyczny sposób przesunięty o jedną czwartą długości (tzw. „quarter-staggered” arrangement). Taki układ powoduje powstanie naprzemiennych stref gęstszych i mniej gęstych widocznych jako prążkowanie D o okresowości ~ 67 nm. Między cząsteczkami występują również boczne przestrzenie, zwane porami. Opracowanie własne na podstawie [23].

NCP obecne w macierzy kostnej odgrywają kluczową rolę w jej organizacji i homeostazie. Uczestniczą w embriogenezie, regulacji formowania i rozmiaru włókien kolagenowych, kontroli procesu mineralizacji oraz w komunikacji międzykomórkowej poprzez tworzenie kanałów sygnałowych [32].

Na podstawie ich funkcji i struktury, NCP dzieli się na kilka głównych klas, m.in.:

1. proteoglikany i glikozaminoglikany (np. siarczan heparyny, hialuronian) – odpowiadają za utrzymanie uwodnienia macierzy i regulację mineralizacji
2. glikoproteiny (np. fosfataza alkaliczna (ALP – ang. *alkaline phosphatase*), fibronektyna) – biorą udział w adhezji komórek, organizacji włókien kolagenowych oraz procesie mineralizacji,

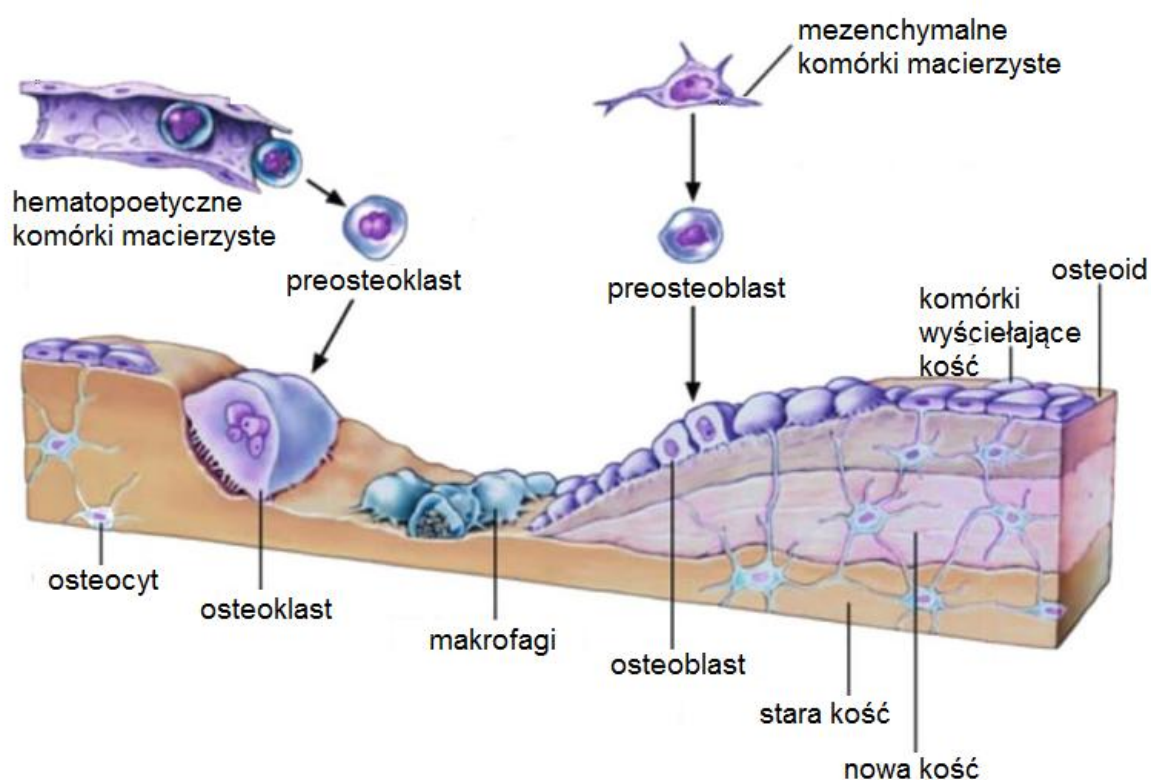
3. białka z rodziny małych ligandów wiążących integryny *N*-glikoprotein (SIBLING), które są związane z mineralizacją kości (fosfoproteina macierzy zębiny (DMP-1), osteopontyna (OPN – ang. *osteopontin*) – odgrywają istotną rolę w mineralizacji i sygnalizacji komórkowej,
4. osteokalcyna (OCN – ang. *osteocalcin*) uczestniczy w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz mineralizacji kości,
5. osteonektyna wiąże kolagen i hydroksyapatyt, pośrednicząc w mineralizacji [23, 32].

Woda w tkance kostnej występuje zarówno w formie związanej – tworząc interakcje z włóknami kolagenowo-mineralnymi – jak i w formie niezwiązanej, swobodnie przemieszczającej się w obrębie systemu porowatego kości. Jej zawartość jest dynamicznie regulowana i wykazuje niemal liniową zależność odwrotną względem mineralizacji: im wyższy stopień mineralizacji, tym mniejsza ilość wody i odwrotnie. Zwiększona mineralizacja zwiększa sztywność kości, jednak nadmierna utrata wody prowadzi do obniżenia jej elastyczności, co skutkuje większą kruchością i podatnością na złamania. W tkance kostnej jest związana z włóknem kolagenowo-mineralnym ale również występuje w postaci niezwiązanej, która swobodnie przepływa przez kanały w kości [23].

2. Typy komórek kostnych i ich rola w przebudowie oraz homeostazie tkanki kostnej

Komórki kostne odgrywają kluczową rolę w przebudowie, utrzymaniu homeostazy oraz organizacji architektury kości. Wyróżnia się cztery główne typy komórek: osteoblasty, osteocyty, komórki wyściełające oraz osteoklasty (Rysunek 9). Osteoblasty to komórki odpowiedzialne za wzrost i przebudowę kości. Ich główną funkcją jest synteza, odkładanie i mineralizacja macierzy kostnej. Produkują kolagen typu I oraz proteoglikany i glikozaminoglikany, które stanowią podstawowy składnik organiczny kości – tzw. osteoid. **Osteoblasty** są komórkami jednojądrzastymi, wykazującymi wysoką aktywność metaboliczną. Po zakończeniu funkcji wydzielniczej część z nich ulega apoptozie, część przekształca się w komórki wyściełające, a część zostaje otoczona przez macierz i różnicuje się w osteocyty. **Osteocyty** to najliczniejsze komórki tkanki kostnej, stanowiące nawet 90–95% wszystkich komórek kości. Powstają z osteoblastów, które zostały uwięzione w

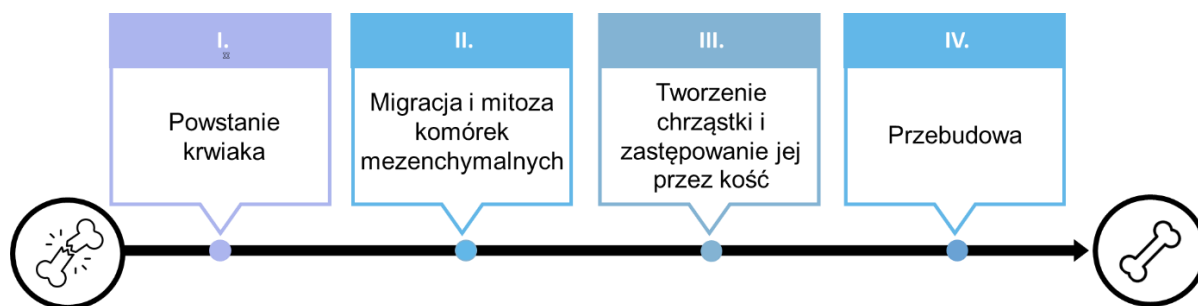
zmineralizowanej macierzy. Pełnią ważną funkcję w komunikacji wewnątrz tkanki kostnej oraz w regulacji homeostazy wapnia i fosforanów. **Komórki wyścielające kość** to również nieaktywne osteoblasty, znajdujące się na powierzchni kości. Uczestniczą w procesach resorpcji i tworzenia kości, biorą udział w regulacji gospodarki wapniowej oraz różnicowaniu osteoklastów. Dodatkowo tworzą barierę chroniącą macierz kostną przed bezpośrednim działaniem osteoklastów. **Osteoklasty** to duże komórki wielojądrowe, których zadaniem jest resorpcja kości. Działają poprzez wydzielanie enzymów i kwasów, które rozpuszczają minerały i trawią macierz kostną. Odgrywają ważną rolę w przebudowie uszkodzonych obszarów kości oraz tworzeniu przestrzeni dla naczyń krwionośnych i nerwów [33].



Rysunek 9. Rodzaje komórek tkanki kostnej. Opracowanie własne na podstawie [33].

3. Proces odbudowy i gojenia się kości

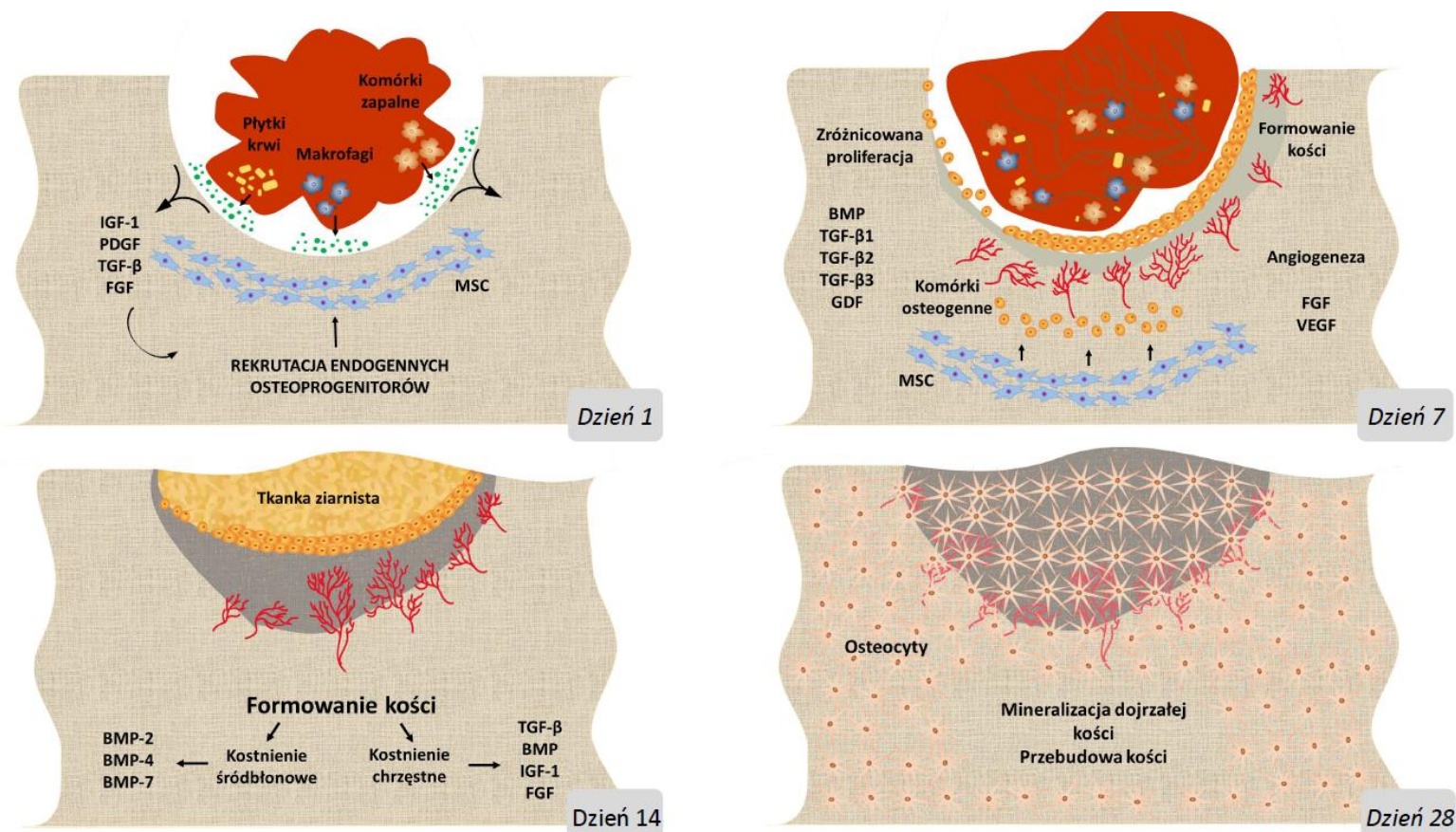
Proces leczenia złamań i urazów jest wielofazowym procesem, który można podzielić na cztery główne fazy (Rysunek 10).



Rysunek 10. Fazy procesu odbudowy kości po złamaniu.

Bezpośrednio po złamaniu kości dochodzi do uszkodzenia lokalnych naczyń krwionośnych, co prowadzi do powstania krwaka lub zakrzepu krwi. Krwiak zawiera produkty krwiotwórcze, takie jak płytki krwi, leukocyty, makrofagi, fibrynę, czynniki wzrostu i cytokiny. Pierwsza faza leczenia, zwana fazą destrukcyjną, trwa około trzech dni i charakteryzuje się stanem zapalnym oraz miejscowym niedotlenieniem (Rysunek 11). Pierwszymi komórkami, które pojawiają się w miejscu urazu, są neutrofile, a następnie makrofagi i limfocyty. Makrofagi nie tylko fagocytują martwicze tkanki, ale również wydzielają czynniki wzrostu i cytokiny inicjujące proces gojenia. Kolejnym etapem jest faza regeneracyjna, której kluczowym elementem jest angiogeneza – tworzenie nowych naczyń krwionośnych wskutek migracji komórek śródbłonna. Niedotlenienie obecne w fazie destrukcyjnej stymuluje ten proces. Nowo powstałe naczynia umożliwiają napływ mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs – ang. *mesenchymal stem cells*), które różnicują się w chondrocyty i osteoblasty. Chondrocyty tworzą macierz chrząstki, a osteoblasty syntetyzują nową kość [34, 35]. Równolegle zachodzi sprzężona aktywność osteoklastów i osteoblastów, umożliwiająca przebudowę kości. Powstaje tzw. kalus miękki – ziarninowa struktura składająca się z chrząstki i kości grubowłóknistej, o większym przekroju poprzecznym niż pierwotna kość, co kompensuje niższą sztywność tych tkanek. Kalus ten stabilizuje miejsce złamania i stanowi rusztowanie dla mineralizacji. W dalszym etapie chondrocyty ulegają apoptozie, a osteoblasty zastępują kalus miękki nową tkanką kostną – odkładając osteoid. W kolejnym etapie, procesie kostnienia śródchrzęstnego, chondrocyty ulegają apoptozie, a osteoblasty zastępują kalus miękki nową tkanką kostną poprzez odkładanie osteoidu. Dochodzi do procesu kostnienia śródchrzęstnego, w którym chrząstka zostaje stopniowo zastąpiona przez kość, a tkanka grubowłóknista przebudowywana jest do dojrzałej kości blaszkowatej. Faza przebudowy (remodellingu)

może trwać miesiące lub lata i przywraca fizjologiczną strukturę kości. Osteoklasty resorbują nowo utworzoną kość pod wpływem cytokin oraz czynników wzrostu, które indukują osteoklastogenezę. Osteoblasty kontynuują odkładanie osteoidu i fosforanu wapnia, zwiększając gęstość mineralną nowej kości. Procesy biologiczne i biomechaniczne leżące u podstaw regeneracji kostnej są niezwykle złożone i wciąż nie są w pełni poznane. Interakcje między wieloma typami komórek (m.in. komórkami układu odpornościowego, komórkami śródbłonna, osteoblastami, osteoklastami, osteocytami) i licznymi sygnałami molekularnymi pozostają w dużej mierze niewyjaśnione. Największym wyzwaniem dla inżynierii tkankowej jest skuteczna regeneracja ubytków przekraczających tzw. rozmiar krytyczny [35–39].



Rysunek 11. Etapy gojenia złamania kości. Etapy gojenia złamania kości przebiegają w czterech fazach: faza zapalna (dzień 1) – aktywacja płytek i komórek zapalnych oraz rekrutacja MSCs i osteoprogenitorów; faza proliferacji (dzień 7) – różnicowanie MSCs, proliferacja komórek osteogennych i angiogeneza (FGF, VEGF); formowanie kalusa (dzień 14) – kostnienie śródchrzęstne i śródbłonowe (BMP, IGF-1, TGF- β); faza przebudowy (dzień 28) – mineralizacja i dojrzewanie nowej kości z udziałem osteocytów. Opracowanie własne na podstawie [39].

4. Czynniki wzrostu i ścieżki sygnałowe w komórkach kości

Homeostaza tkanki kostnej zależy od równowagi pomiędzy osteoblastyczną syntezą macierzy pozakomórkowej a jej osteoklastyczną resorpcją. Dwa główne mechanizmy regulujące procesy kościotwórcze i przebudowę to: regulacja hormonalna (głównie za pośrednictwem kalcytoniny i parathormonu) oraz wpływ lokalnych i systemowych czynników wzrostu (GF – ang. *growth factors*) [37, 40]. Miejscowe (regionalne) czynniki wzrostu wpływają na molekularne i komórkowe szlaki odpowiedzialne za utrzymanie masy kostnej zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w przebiegu chorób (np. osteoporozy) oraz podczas procesu gojenia złamań [41]. Działanie GF może przyjmować formę:

- autokrynną – czynnik oddziałuje na komórkę, która go wytworzyła,
- parakrynną – działa na pobliskie komórki innego typu,
- endokrynną – wpływa na komórki w odległych miejscach organizmu.

Pojedynczy GF może wykazywać plejotropowe (wielokierunkowe) działanie, wpływając na różne typy komórek i wywołując różne odpowiedzi biologiczne. Większość GF to białka lub polipeptydy, które oddziałują poprzez receptory transbłonowe, aktywując specyficzne szlaki sygnalizacyjne [42]. Do najważniejszych GF związanych z metabolizmem kości należą:

- białka morfogenetyczne kości (BMP – ang. *bone morphogenetic proteins*),
 - transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β – ang. *transforming growth factor – β*),
 - czynniki wzrostu fibroblastów (FGF – ang. *fibroblast growth factors*),
 - czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (PDGF – ang. *platelet-derived growth factor*),
 - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF – ang. *vascular endothelial growth factor*),
 - insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF – ang. *insulin-like growth factors*)
- (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka głównych czynników wzrostu zaangażowanych w regenerację kości – pochodzenie i mechanizm działania [42–46].

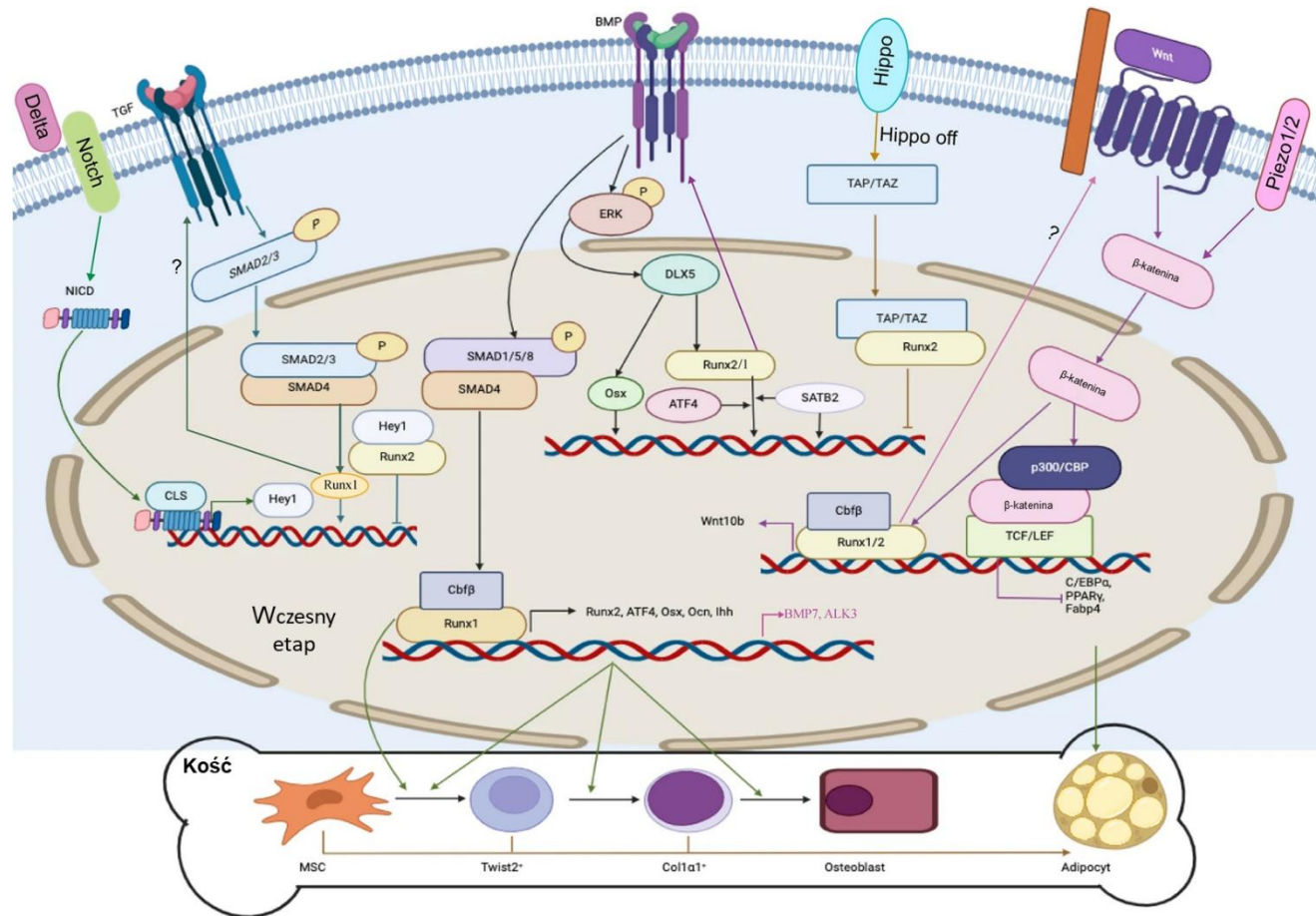
Czynniki wzrostu	Pochodzenie	Działanie na kość
BMP	komórki osteoprogenitorowe, osteoblasty, chondrocyt, komórki śródbłónka (BMP–2). skoncentrowane w macierzy organicznej kości, uwalniane po złamaniu lub podczas resorpcji kości.	– migracja osteoprogenitorów, – indukcja proliferacji, – różnicowanie i synteza macierzy kostnej – BMP–2 promuje ekspresję Runx2 w mezenchymalnych osteoprogenitorach i komórkach osteoblastycznych oraz ekspresję Osx (osterix) w komórkach osteoblastycznych
TGF–β	płytki krwi, osteoblasty, szpik kostny, chondrocyty, komórka śródbłónka, fibroblast, makrofagi	– niezróżnicowana proliferacja komórek mezenchymalnych, – rekrutacja prekursorów osteoblastów i osteoklastów; – różnicowanie osteoblastów i chondrocytów (ale hamowanie różnicowania końcowego), – różnicowanie i synteza macierzy zewnątrzkomórkowej – działanie autokrynne na osteoblasty
FGF	makrofagi, monocyty, szpik kostny, chondrocyty, osteoblasty, komórki śródbłónka	– dojrzewanie chondrocytów (FGF–1) – proliferacja i różnicowanie osteoblastów, – hamowanie apoptozy niedojrzałych osteoblastów, – indukcja apoptozy dojrzałych osteocytów, – resorpcja kości (FGF–2)
PDGF	płytki krwi, osteoblasty, komórki śródbłónka, monocyty, makrofagi syntetyzowany przez megakariocyty, transportowany we krwi przez płytki krwi	– migracja, proliferacja i różnicowanie osteoprogenitorów
VEGF	osteoblasty, płytki krwi, pełni swoją rolę w kostnieniu śródchrzęstnym poprzez ekspresję i uwalnianie przez hipertroficzne chondrocyty	– kluczowy składnik szlaku przeżycia chondrocytów, – przekształcenie chrząstki w kość, – proliferacja i rozróżnianie osteoblastów – reguluje unaczynienie rozwijających się kości i aktywność osteoklastów, – uczestniczy w naprawie kości, kontrola aktywność osteoblastów
IGF	osteoblasty, chondrocyty, hepatocyty, komórki śródbłónka	– proliferacja osteoblastów i synteza macierzy kostnej, resorpcja kości. – IGF 1 pobudza proliferację osteoblastów, zwiększa syntezę kolagenu i zmniejsza degradację kolagenu w kościach. – IGF–1 i IGF–2 promują ekspresję Osx w komórkach osteoblastycznych, powodują indukcję osteoblastów i przejściowy wzrost masy kostnej <i>in vivo</i>.

Procesy różnicowania komórek mezenchymalnych w osteoblasty oraz formowania nowej tkanki kostnej są ściśle regulowane przez skomplikowane mechanizmy sygnalizacji komórkowej. Wśród nich szczególną rolę odgrywa szlak sygnałowy Wnt, który stanowi kluczowy regulator osteogenezy. W klasycznej, kanonicznej wersji tego szlaku ligandy Wnt (takie jak Wnt1, Wnt3a, Wnt10) wiążą się z receptorami Frizzled (FZD) oraz białkami LRP5/6, co prowadzi do akumulacji β -kateniny w cytoplazmie i jej translokacji do jądra komórkowego. Tam β -katenina aktywuje ekspresję genów takich jak *Runx2*, *Axin2* i *Osterix*, odpowiedzialnych za inicjację i progresję różnicowania osteoblastów [44, 47, 48].

Szlak niekanoniczny Wnt działa niezależnie od β -kateniny – aktywuje m.in. białka GTPaz (Rho, Rac), kinazę JNK oraz szlak wapniowy Wnt/ Ca^{2+} , wpływając na reorganizację cytoszkieletu i polaryzację komórek. Obie wersje szlaku Wnt mają istotny wpływ na homeostazę szkieletową i regenerację kości [44, 48].

Drugim kluczowym szlakiem jest oś TGF- β /BMP. Ligandy BMP (np. BMP-2, BMP-4, BMP-7) oraz TGF- β wiążą się z receptorami typu I i II na powierzchni komórki, aktywując wewnątrzkomórkowe białka SMAD. Białka z rodziny BMP są głównymi cząsteczkami osteoindukcyjnymi u ssaków – spośród ponad 20 zidentyfikowanych BMP, właściwości osteogenne wykazują m.in. BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 oraz BMP-9. Szlak TGF- β /BMP może również aktywować niekanoniczne (SMAD-niezależne) ścieżki sygnałowe, takie jak MAPK, PI3K/AKT i mTOR, co rozszerza spektrum jego działania na komórki kostne [47, 49, 50].

Oprócz szlaków Wnt i BMP, w osteogenezie uczestniczy wiele innych regulatorów, takich jak: parathormon (PTH), aktywujący szlak cAMP/PKA i czynnik transkrypcyjny CREB, IGF, aktywujący PI3K/AKT; IGF-1, aktywujący PI3K/AKT; szlak Notch (geny HES i HEY); szlak Hedgehog (Gli1/2/3), szlak Hippo (TAZ/YAP); oraz mechanosensoryczne białka Piezo1/2 (Rysunek 12). Wszystkie te szlaki działają synergistycznie, aby wspierać procesy wzrostu, rozwoju oraz funkcjonowania komórek kości, reagując na zmiany w środowisku komórkowym, w tym sygnały mechaniczne i hormonalne [47, 48].



Rysunek 12. Kluczowe szlaki sygnalizacyjne (Wnt/β-katenina, BMP, TGF-β, Notch, Hippo) oraz czynniki transkrypcyjne (Runx2, Osx, ATF4, SATB2), które regulują różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) do osteoblastów i tworzenie tkanki kostnej. Szlaki te aktywują ekspresję genów osteogennych (m.in. *Runx2*, *Osx*, *Ocn*), promując progresję MSC przez stadia pośrednie aż do dojrzałych osteoblastów. Integracja sygnałów umożliwia precyzyjne sterowanie osteogenezą i równowagę ją względem adipogenezy. Opracowanie własne na podstawie [47].

5. Czynniki bioaktywne wspomagające regenerację kości – rola peptydów

Bioaktywne cząsteczki to szeroka i zróżnicowana grupa związków, które odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów biologicznych zachodzących w tkance kostnej. Obejmują one zarówno czynniki wzrostu, peptydy, hormony, kwasy nukleinowe (np. mRNA i siRNA), oligosacharydy, jony metali, jak i inne związki, które modulują aktywność komórek. Ich działanie polega na stymulacji różnicowania osteogennego oraz proliferacji komórkowej poprzez aktywację kaskad sygnałowych odpowiedzialnych za osteogenezę i angiogenezę.

Terapie oparte na czynnikach wzrostu, mimo wysokiej skuteczności, są kosztowne i obarczone ryzykiem działań niepożądanych – od łagodnych, jak seroma (nagromadzenie płynu surowiczego), po poważniejsze powikłania, takie jak obrzęk szyjnego odcinka kręgosłupa [51]. Szczególne kontrowersje budzi stosowanie białek morfogenetycznych kości (BMP), które – poza stymulacją osteogenezы – mogą wpływać na proliferację i inwazję komórek nowotworowych [52]. U pacjentów leczonych rekombinowanym ludzkim BMP-2 (rh-BMP-2 – ang. *recombinant human bone morphogenetic protein-2*) stwierdzono znacznie wyższy odsetek ektopowego tworzenia kości (70,1%) w porównaniu z grupą kontrolną (12,9%) [51, 53].

Alternatywą dla GF są bioaktywne peptydy, projektowane często na podstawie aktywnych sekwencji regulatorowej. Są łatwiejsze i tańsze w syntezie, stabilniejsze oraz wykazują znacznie niższą immunogenność niż pełne białka [54]. Peptydy stosowane w inżynierii tkanki kostnej dzieli się ze względu na pełnioną funkcję:

- peptydy adhezyjne (wspomagające przyczepianie się komórek) [55],
- peptydy osteoindukcyjne (indukujące różnicowanie osteoblastów) [56],
- peptydy angiogenne (promujące neowaskularyzację) [57].

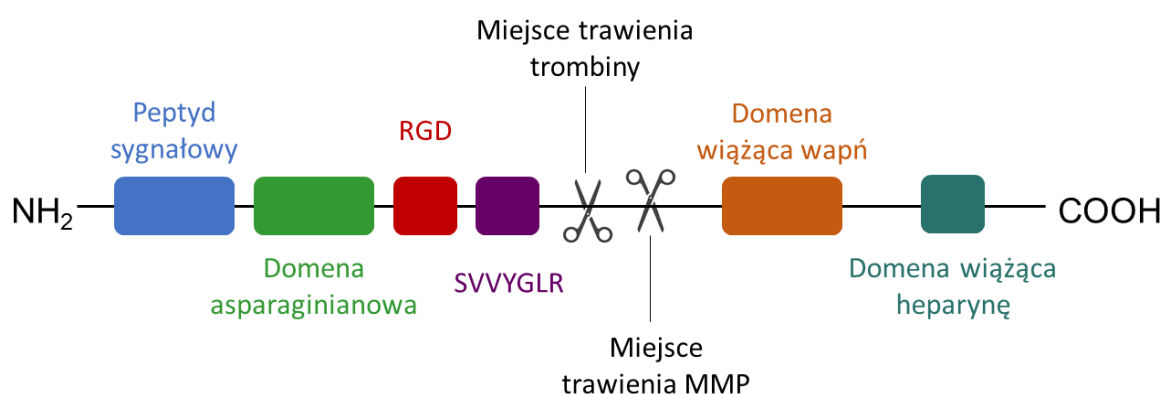
5.1 Peptydy ułatwiające adhezję komórek

Adhezja komórek do biomateriału jest kluczowym etapem regeneracji tkanek, warunkującym przeżycie, proliferację i różnicowanie komórek. Peptydy adhezyjne, najczęściej wywodzące się z sekwencji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – ang. *extracellular matrix*), umożliwiają specyficzne wiązanie z receptorami komórkowymi, poprawiając integrację komórek z rusztowaniem [58]. Cząsteczki tworzące macierz

zewnątrzkomórkową i ich przestrzenna organizacja są istotne w regulacji aktywności komórek kostnych. Frakcję organiczną ECM stanowi głównie kolagen, podczas gdy około 5% składu to białka niekolagenowe: takie jak osteopontyna, osteokalcyna, osteonektyna, witronektyna, fibronektyna czy dekoryna [59]. Białka te, poprzez domeny wiążące komórki, przyłączają się do powierzchniowych receptorów komórkowych (głównie integryn). Aktywują szlaki sygnałowe kierujące przeżyciem osteoblastów, progresją cyklu komórkowego, ekspresją genów czy mineralizacją macierzy. [60].

Najczęściej badany i stosowany do funkcjonalizacji biomateriałów peptydem, o właściwościach adhezyjnych jest tripeptyd o sekwencji RGD. Wiąże się on z integrynami, stymulując adhezję i różnicowanie komórek [61]. Motyw RGD jest obecny w sekwencji wielu białek ECM np. w fibronektynie, witronektynie, fibrynogenie, osteopontynie czy sialoproteinie kości [62]. Peptyd ten znacząco zwiększa przyleganie komórek osteoprogenitorowych, ich różnicowanie oraz proliferację w biomateriałach opłaszczonych peptydami RGD [63, 64].

Jednym z niekolagenowych białek ECM jest osteopontyna (OPN), która bierze udział w mineralizacji kości i adhezji komórek kostnych. OPN w swojej budowie zawiera regiony wiążące wapń i heparynę oraz motyw adhezji komórkowej (Rysunek 13) [65]. Pełni rolę kotwiczącą osteoklasty do powierzchni kości, gdzie jej właściwości wiążące minerały immobilizują białko, umożliwiając oddziaływanie motywu RGD z integrynami dla migracji i przyczepności komórek.



Rysunek 13. Struktura domenowa ludzkiej OPN – białka adhezyjnego i regulatorowego, zaangażowanego w procesy zapalne, przebudowę tkanek oraz migrację komórek. Opracowanie własne na podstawie [66].

Motyw DGR (DGRGDSVVYG), znajduje się w sekwencji ludzkiego białka OPN i obejmuje fragment domeny asparaginowej, sekwencje RGD i SVVYGLR. (Rysunek 13).

Odgrywa istotną rolę w adhezji komórkowej, dzięki wiązaniu się z integrynami, czyli receptorami obecnymi na powierzchni komórek. Ta interakcja z integrynami umożliwia przyleganie komórek do podłoża lub rusztowania, co z kolei sprzyja wielu procesom biologicznym, takim jak proliferacja (namnażanie się komórek) oraz różnicowanie komórek, w tym osteogenne, czyli w kierunku komórek kościotwórczych. Co istotne, motyw DGR jest konserwowany ewolucyjnie i występuje u wielu gatunków, co świadczy o jego fundamentalnej roli w regulacji interakcji komórka–macierz zewnątrzkomórkowa [66, 67]. W badaniach wykorzystano peptyd zawierający motyw DGR (jedną z reszt waliny zastąpioną alaniną – DGRGDSVAYG) i sprzężono go z samoskładającymi się peptydowymi rusztowaniami, takimi jak RADA16 (Ac–RADARADARADARADA) [67] lub ELK8 (Ac–LELELKLK) [68]. Oba te rusztowania tworzą nanowłókna, które mogą pełnić funkcję biomimetycznych nośników – imitujących naturalną macierz zewnątrzkomórkową – wspierając przyczepność komórek oraz ich dalszy rozwój i specjalizację, np. w kierunku tworzenia tkanki kostnej.

Alternatywnym peptydem adhezyjnym jest P–15 o sekwencji GTPGPQGIAGQRGVV, stanowiący syntetyczny 15–aminokwasowy fragment kolagenu typu I. Jest to sekwencja odpowiadająca regionowi kolagenu wiążącemu integryny na powierzchni komórek. Peptyd P–15 promuje przyleganie komórek do biomateriałów i stymuluje produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej. W badaniach wykazano, że dodanie P–15 do rusztowań znacząco zwiększa aktywność ALP oraz ekspresję genów BMP–2 i BMP–7, kluczowych dla osteogenezy [69]. W testach *in vitro* implanty zmodyfikowane peptydem P–15 wykazywały wyższą mineralizację i lepszą osteointegrację w porównaniu z kontrolą [69, 70]. Peptyd P–15 jest składnikiem preparatu i–Factor™, zatwierdzonego przez Agencję Żywności i Leków (FDA – ang. *Food and Drug Administration*) do zastosowania klinicznego. Produkt składa się z peptydu P–15, zaadsorbowanego na mineralnym nośniku (fosforan wapnia), zawieszonym w hydrożelu z karboksymetylocelulozy sodowej (NaCMC) w roztworze glicerolu i wody. W badaniach klinicznych preparat i–Factor™ wykazywał porównywalną skuteczność do autologicznych przeszczepów kości w regeneracji ubytków kostnych [71–74].

5.2 Peptydy stymulujące osteoindukcję

Osteoindukcja to proces inicjowania różnicowania niedojrzałych komórek w kierunku linii osteoblastycznej. Peptydy osteoindukcyjne naśladują działanie białek morfogenetycznych kości (BMP) lub innych czynników wzrostu, aktywując kluczowe szlaki sygnałowe i wspierając tworzenie nowej tkanki kostnej. Są obiecującą alternatywą dla pełnych białek w inżynierii tkanki kostnej [75].

Peptyd P4 (KIPKASSVPTELSAISTLYL) stanowi jedną z pierwszych sekwencji wywodzących się z epitopu BMP-2, dla których wykazano zdolność indukowania różnicowania osteogennego. Peptyd ten wywodzi się z tzw. regionu „knuckle” BMP-2, który wiąże się z receptorem BMP typu II. Włączenie peptydu P4 do rusztowania biomateriałów białkowych, takich jak kolagen, może aktywować receptory BMP na powierzchni komórek mezenchymalnych, co prowadzi do przyspieszenia ich różnicowania osteogenicznego. Peptydy kowalencyjnie związane z hydrożelem alginianowym inicjowały szlak sygnałowy BMP-Smad1/5/8, zwiększały ekspresję osteopontyny (OPN) oraz promowały mineralizację macierzy pozakomórkowej w komórkach mezenchymalnych [76, 77]. W celu zwiększenia aktywności osteoindukcyjnej peptydu P4 zaprojektowano sekwencję P24 (S[PO₄]KIPKASSVPTELSAISTLYLDDD), zawierającą fosforylowaną serynę na N-końcu oraz trzy dodatkowe reszty kwasu asparaginowego na C-końcu. Peptyd ten wykorzystano do funkcjonalizacji kompozytowego rusztowania chitozanowo-hydroksyapatytowego (CH/HA). P24 został sprzężony z tiolowaną formą chitozanu – chemicznie zmodyfikowanym chitozanem zawierającym grupy tiolowe (-SH). Badania *in vivo* w szczurzym modelu ubytku kostnego wykazały, że kompozyt funkcjonalizowany peptydem efektywniej wspierał regenerację kości w miejscu ubytku niż analogiczny materiał pozbawiony peptydu [78, 79]. W kolejnych badaniach opracowano peptyd P28 – rozszerzoną wersję peptydu P4, wzbogaconą na N-końcu o fosforylowaną serynę oraz siedem reszt kwasu asparaginowego (S[PO₄]-DDDDDDD-KIPKASSVPTELSAISTLYL). Taka modyfikacja znacząco zwiększyła powinowactwo peptydu do hydroksyapatytu dzięki naśladowaniu naturalnych białek wiążących minerały. Rusztowania z nanokrystalicznym hydroksyapatytem (nano-HA), w których unieruchomiono peptyd P28, indukowały efektywniejszą regenerację krytycznych ubytków kostnych czaszki szczura po 6 i 12 tygodniach od implantacji, osiągając lepsze rezultaty niż rusztowania zawierające BMP-2 [80].

Osteogeny peptyd wzrostu (OGP – ang. *Osteogenic Growth Peptide*) to endogeny peptyd pochodzący z C–końca histonu H4, o sekwencji ALKRQGRTLYGFGG (14 aminokwasów) [81]. Jego krótszy, proteolityczny fragment – OGP(10–14) (YGFGG) – zachowuje aktywność osteoindukcyjną i działa jako silny stymulator osteogenezy. Mechanizm działania OGP(10–14) obejmuje aktywację szlaku MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) poprzez interakcję z receptorami błonowymi, co prowadzi do fosforylacji kaskady kinaz i ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie osteoblastów. Zarówno OGP, jak i OGP(10–14) wspomagają proliferację, syntezę macierzy pozakomórkowej oraz mineralizację komórek kościotwórczych. W modelach zwierzęcych (królik, szczur) wykazano, że OGP(10–14) zwiększa tempo tworzenia i mineralną gęstość kości [82, 83].

Zastosowano także system dostarczania OGP oparty na supramolekularnym hydrożelu NapFFY (kwas naftalenoctowy–Phe–Phe–Tyr–OH). Funkcjonalizacja tego hydrożelu peptydem OGP (NapFFY–OGP) pozwalała na jego kontrolowane uwalnianie przez około dwa tygodnie. W badaniach *in vivo* na szczurzym modelu regeneracji kości, hydrożel zawierający OGP zwiększał wskaźnik regeneracji tkanki kostnej o 12% w porównaniu do nośnika niezawierającego peptydu [84].

Copine–7 (Cpne7) to białko pochodzące z nabłonka zęba, należące do rodziny kopin – białek zależnych od jonów wapnia (Ca^{2+}), uczestniczących w wiązaniu fosfolipidów błonowych w sposób zależny od wapnia [85]. W badaniach *in vitro* Cpne7 wykazywało właściwości osteoindukcyjne, promując różnicowanie osteoblastów. Na podstawie jego sekwencji zaprojektowano peptyd CDP4 (VNPKYKQKRR), który zachowuje aktywność osteogenną i wykazuje zdolność penetracji komórkowej. W modelu ubytku kości u myszy zastosowano kolagenowy hydrożel zawierający CDP4. W grupie kontrolnej (bez leczenia) obserwowano jedynie obecność cienkiej tkanki włóknistej i minimalną mineralizację. Natomiast implantacja żelu z CDP4 skutkowała znacznym tworzeniem nowej tkanki kostnej. Co istotne, efekt ten był silniejszy niż w przypadku podania pełnej formy białka Cpne7, a także rekombinowanego BMP–2, co sugeruje potencjał peptydów jako skutecznych i bezpieczniejszych alternatyw dla drogich białek rekombinowanych [86].

Teriparatyd (PTH1–34) był pierwszym peptydowym lekiem zatwierdzonym przez FDA oraz Europejską Agencję Leków (EMA – ang. *European Medicines Agency*) do

leczenia osteoporozy. Stanowi on 34–aminokwasowy fragment *N*–końcowy ludzkiego parathormonu (PTH) (SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF), obejmujący jego aktywną domenę biologiczną. Teriparatyd wykazuje działanie anaboliczne wobec komórek linii osteoblastycznej – od mezenchymalnych komórek progenitorowych po osteoblasty i osteocyty. Peptyd aktywuje szlak sygnalizacyjny cAMP/PKA oraz szlak Wnt/ β –kateniny, prowadząc do wzrostu ekspresji genów osteogennych, zwiększonej produkcji macierzy kostnej oraz zahamowania apoptozy osteoblastów. Ponadto, teriparatyd może reaktywować spoczynkowe komórki wyścielające powierzchnię kości (lining cells), konwertując je w aktywne osteoblasty. Dzięki tym mechanizmom lek skutecznie stymuluje tworzenie nowej tkanki kostnej [87].

5.3 *Peptydy stymulujące angiogenezę*

Angiogeneza, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych, odgrywa kluczową rolę w naprawie tkanek. Naczynia dostarczają tlen, składniki odżywcze i jony mineralne, a także wspierają różnicowanie komórek macierzystych. Niedostateczne unaczynienie prowadzi do niedotlenienia biomateriału i ogranicza obecność osteoprogenitorów oraz czynników wzrostu niezbędnych do regeneracji kości. Dlatego łączenie czynników proangiogennych z osteoindukcyjnymi uznaje się za obiecującą strategię w inżynierii tkanki kostnej [88].

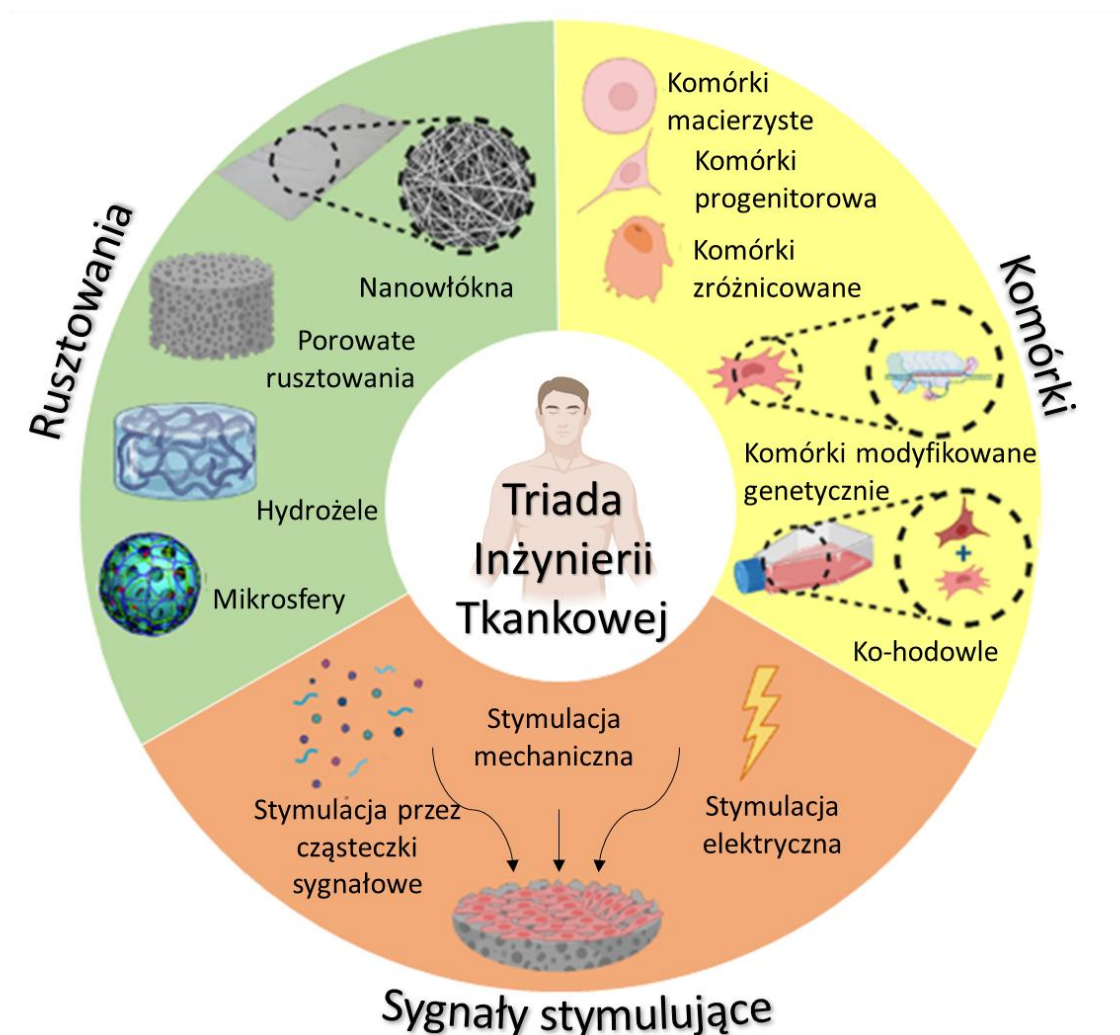
Peptyd QK (Ac–KLTWQELYQLKYKGI) to syntetyczny peptyd proangiogeny, zaprojektowany na podstawie struktury krystalograficznej kompleksu czynnika VEGF z jego receptorem VEGFR2 [89]. Sekwencja QK naśladuje region oddziałujący z receptorem VEGFR2, co umożliwia aktywację szlaku sygnalizacyjnego promującego proliferację komórek śródbłonna i neowaskularyzację. Potencjał angiogeny peptydu QK jest porównywalny z natywnym VEGF [90].

Innym przykładem jest TP508 (AGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFV), znany również jako Chrysalin® [91] – fragment sekwencji receptora trombiny. Początkowo stosowany w leczeniu ran skóry, wykazuje także działanie angiogenne w kontekście regeneracji tkanki kostnej. TP508 wspomaga tworzenie naczyń krwionośnych, poprawia angiogenezę indukowaną przez VEGF i ogranicza skutki niedotlenienia tkanek [92, 93].

Dodatkowo, peptyd KGHK [94], wywodzący się z białka macierzy zewnątrzkomórkowej SPARC, stymuluje angiogenezę i przyspiesza gojenie ubytków kostnych poprzez aktywację komórek śródbłonna i wzrost ekspresji VEGF [95].

6. Inżynieria tkanki kostnej i substytuty tkanki kostnej

Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna to interdyscyplinarne dziedziny, których celem jest przywracanie struktury i funkcji tkanek uszkodzonych w wyniku urazów, chorób lub wad wrodzonych. W kontekście tkanki kostnej szczególnym wyzwaniem są defekty o rozmiarze krytycznym – czyli takie ubytki, które nie ulegają spontanicznemu wygojeniu bez interwencji terapeutycznej. Mogą one wynikać z urazów, rozległych resekcji chirurgicznych lub zaburzeń rozwojowych. Od ponad trzech dekad problem regeneracji dużych ubytków kostnych stanowi inspirację dla badań nad nowymi strategiami terapii. Fundamentem nowoczesnych podejść inżynierii tkankowej jest tzw. triada: komórki (np. MSCs), czynniki sygnałowe (np. peptydy, cytokiny, czynniki wzrostu) oraz rusztowania (biomateriały wspierające adhezję i różnicowanie komórek) (Rysunek 14) [96].



Rysunek 14. Triada inżynierii tkankowej – trzy podstawowe filary regeneracji tkanek: (1) Komórki – w tym komórki macierzyste, progenitorowe, zróżnicowane, genetycznie modyfikowane oraz hodowane w układach ko-kultury; (2) Rusztowania – takie jak nanowłókna, porowate rusztowania, hydrożele i mikrosfery, które zapewniają mechaniczną podporę i środowisko do wzrostu komórek; (3) Sygnały stymulujące – obejmujące czynniki sygnałowe (np. cytokiny, peptydy, czynniki wzrostu), a także bodźce mechaniczne i elektryczne, które wspierają różnicowanie i funkcję komórek. Opracowanie własne na podstawie [97].

Dotychczasowe próby jednoczesnego zastosowania komórek, czynników wzrostu i rusztowań nie przełożyły się jeszcze na jednoznaczny sukces kliniczny, mimo obiecujących wyników badań przedklinicznych. Skuteczna regeneracja tkanek wymaga precyzyjnego doboru odpowiednich typów komórek, cząsteczek sygnałowych oraz komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, a także określenia ich optymalnych dawek i rozkładu czasowo-przestrzennego. Kluczowe znaczenie ma także zrozumienie i

modulacja szlaków sygnałowych regulujących procesy regeneracyjne w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Realizacja tych założeń wymaga prowadzenia interdyscyplinarnych badań na styku biologii komórki, inżynierii biomateriałów, chemii, biofizyki oraz nauk klinicznych. Niezbędna jest również ścisła koordynacja interakcji między komórkami, rusztowaniem a cząsteczkami sygnałowymi w celu odtworzenia złożonego, dynamicznego mikrośrodowiska niszy kostnej [97, 98].

Biomateriały stosowane w inżynierii tkanki kostnej mogą mieć pochodzenie naturalne lub syntetyczne. Zgodnie z definicją National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (NIBIB), są to materiały, powierzchnie lub struktury zdolne do interakcji z systemami biologicznymi [99]. Wśród najczęściej stosowanych materiałów rusztowaniowych wyróżnia się bioceramikę (np. hydroksyapatyt, β -trójwapniowy fosforan, bioszkło), polimery (np. polikaprolakton, polilaktyd, chitozan), metale (np. tytan, stopy tytanu Ti-6Al-4V czy Ti-6Al-4V ELI) oraz kompozyty będące ich kombinacją [100]. Przegląd właściwości tych materiałów, ich zalet i ograniczeń przedstawiono w Tabeli 2 [13, 98–100].

Tabela 2. Zalety, ograniczenia i przykłady biomateriałów stosowanych jako substytuty tkanki kostnej.

Rodzaj materiału	Główne zalety	Główne wady	Przykłady
metale	biokompatybilność, nietoksyczność, odporność na korozję	nie biodegradowalne	– tytan i stopy tytanu [101–103]
biodegradowalne metale	wysoka wytrzymałość na ściskanie	szybka korozja – ryzyko toksyczności spowodowane przez wypłukiwanie jonów lub cząstek	– magnez i jego stopy [104, 105]
polimery naturalne	biomimetyczne, biodegradowalne	słabe właściwości mechaniczne, potencjalna immunogenność, zmienność między partiami	– kolagen [106, 107] – chitozan [108] – żelatyna [109] – jedwab [110] – alginian [111] – kwas hialuronowy [112]
polimery syntetyczne	szeroka gama składów i właściwości; łatwość modyfikacji	możliwe niekorzystne reakcje tkankowe spowodowane degradacją kwasową	– poli(kwas mlekowy–ko–glikolowy) [113] – poli(fumaran propylenu) [114] – poli(ϵ – kaprolakton) [115] – poliuretan [116]
bioceramika	wysoki moduł sprężystości, zdolność do dostarczania jonów bioaktywnych	kruchosc	– hydroksyapatyt [117] – β –fosforan trójwapniowy [118] – szkło bioaktywne (np. skład 45s5) [119]
nanomateriały na bazie węgla	wysoka wytrzymałość na rozciąganie; łatwość funkcjonalizacji za pomocą grup powierzchniowych	ograniczona biodegradowalność; potencjalna cytotoksyczność	– nanorurki węglowe [120] – grafen lub tlenek grafenu [121]

Potencjalne substytuty kości powinny wykazywać szereg właściwości fizykochemicznych i biologicznych, które umożliwią skuteczne wsparcie procesu regeneracji. Do najważniejszych należą: biokompatybilność, odpowiednie właściwości mechaniczne i powierzchniowe, biodegradowalność, bioaktywność oraz zdolność do osteointegracji.

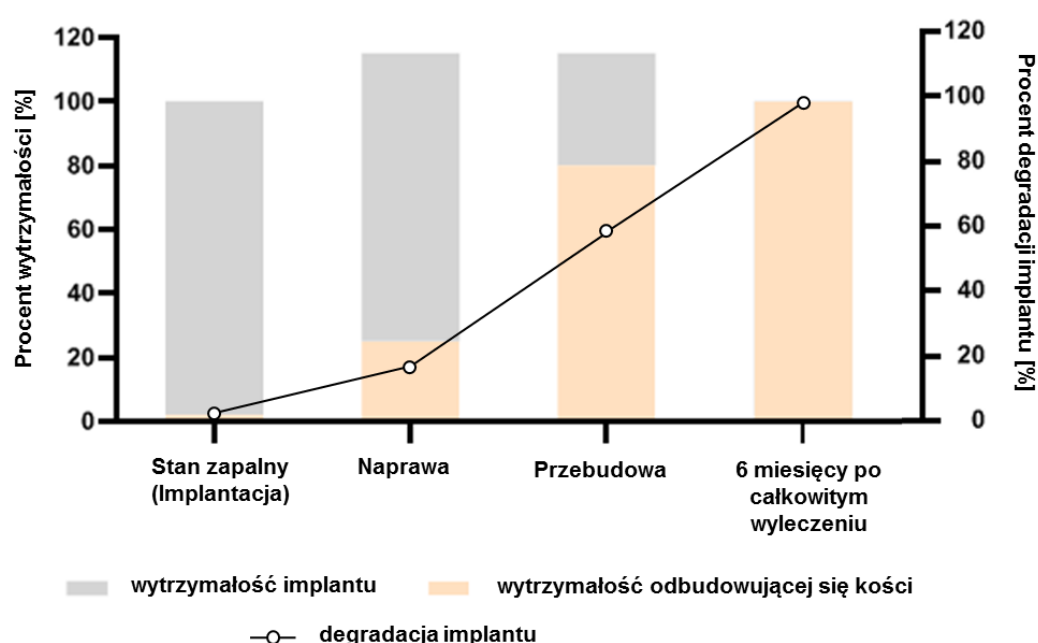
Kluczowym warunkiem bezpieczeństwa materiału jest jego biokompatybilność, czyli zdolność do pełnienia funkcji terapeutycznej bez wywoływania miejscowych lub ogólnoustrojowych reakcji niepożądanych w otaczających tkankach. Ograniczeniem w doborze biomateriałów mogą być niekorzystne efekty, takie jak reakcje zapalne, przedwczesna degradacja materiału czy ryzyko onkogenności [122]. Większość biomateriałów stosowanych obecnie w inżynierii tkanki kostnej wykazuje wystarczającą biokompatybilność do wspomagania procesów naprawczych [123].

Jednym z głównych zadań tkanki kostnej jest zapewnianie wsparcia strukturalnego dla tkanek miękkich, dlatego biomimetyczne implanty kostne muszą cechować się wytrzymałością na ściskanie rzędu 20–200 MPa oraz modułem sprężystości zbliżonym do kości korowej (~20 GPa). Implanty powinny efektywnie przenosić obciążenia mechaniczne i przeciwdziałać zapadaniu się regenerującej się tkanki. Optymalnie ich wytrzymałość powinna nieznacznie przewyższać wytrzymałość tkanki natywnej, by uniknąć zjawiska ekranowania naprężeń (ang. *stress shielding*), prowadzącego do zaniku kości wokół implantu wskutek zmniejszenia bodźców mechanicznych [124].

Implanty metalowe, takie jak stopy tytanu, spełniają wymogi mechaniczne, jednak ich zbyt wysoki moduł sprężystości względem kości często skutkuje osteopenią i poluzowaniem implantu (ang. *implant loosening*) [122, 124]. Z kolei czyste ceramiki są kruche, lecz domieszkowanie ich jonami osteopromotorycznymi (np. Sr^{2+}) poprawia ich właściwości mechaniczne i biologiczne. Ostateczny dobór materiału zależy od wskazań klinicznych i wymaga kompromisu pomiędzy wytrzymałością, bioaktywnością i kontrolowaną degradacją [125].

Biodegradowalność jest jedną z kluczowych właściwości biomateriałów stosowanych w inżynierii tkanki kostnej. Wszczepiony materiał powinien ulegać kontrolowanej degradacji, umożliwiając stopniowe zastępowanie przez nowo tworzącą się tkankę kostną. Tempo degradacji musi być ściśle dopasowane do tempa regeneracji kości, które zależy od lokalizacji ubytku, wieku pacjenta oraz typu tkanki (gąbczasta vs. korowa) i zwykle mieści się w przedziale 6–24 miesięcy. Zbyt wolna degradacja może ograniczać integrację materiału z otaczającą kością i utrudniać jej wrastanie. W miarę postępującej degradacji implantu jego wytrzymałość mechaniczna ulega obniżeniu, podczas gdy równolegle wzrasta odporność mechaniczna odbudowującej się kości. Optymalnie, implant powinien ulec całkowitej resorpcji po zakończeniu funkcjonalnej regeneracji tkanek, nie później niż sześć miesięcy po ustabilizowaniu struktury nowo utworzonej kości [126, 127]

Produkty degradacji muszą być w pełni biokompatybilne – nie mogą wywoływać cytotoksyczności, przewlekłego stanu zapalnego ani zaburzać procesów naprawczych. Na Rysunku 15 przedstawiono koncepcyjny model dynamicznej interakcji między materiałem implantacyjnym a regenerującą się kością, ilustrujący zmiany ich właściwości mechanicznych w czasie [126].



Rysunek 15. Model dynamicznej interakcji między biodegradowalnym implantem a odbudowującą się kością, przedstawiający zmiany wytrzymałości obu komponentów oraz stopień degradacji implantu w czasie. Ilustracja podkreśla konieczność synchronizacji degradacji materiału z postępującą regeneracją tkanki kostnej, aby zachować ciągłość funkcji mechanicznej. Opracowanie własne na podstawie [126].

Bioaktywność to jedna z kluczowych cech nowoczesnych biomateriałów stosowanych w inżynierii tkanki kostnej. Oznacza zdolność materiału do aktywnego oddziaływania z otaczającą tkanką, w tym inicjowania oraz wspierania procesów biologicznych prowadzących do tworzenia nowej kości. W kontekście substytutów kostnych bioaktywność może manifestować się poprzez zmiany powierzchni biomateriału sprzyjające adhezji komórek, ich proliferacji i różnicowaniu osteogennemu [128].

Wyróżnia się trzy kluczowe procesy związane z bioaktywnością biomateriałów kostnych:

- **Osteokondukcja** – zdolność materiału do wspierania wzrostu kości poprzez tworzenie fizycznego rusztowania umożliwiającego migrację komórek kostnych i naczyń krwionośnych. Sam biomateriał nie inicjuje tworzenia kości, ale zapewnia sprzyjające środowisko regeneracyjne. Przykładami materiałów o wysokiej osteokondukcyjności są fosforany wapnia (np. hydroksyapatyt, β -TCP) oraz bioszkła [99, 126, 129]

- **Osteoindukcja** – zdolność materiału do indukowania różnicowania nieodróżnionych komórek mezenchymalnych w osteoblasty. Materiały osteoindukcyjne mogą stymulować tworzenie tkanki kostnej nawet w lokalizacjach, gdzie naturalnie nie występuje kość (np. w tkankach miękkich). Właściwość ta wstępnie oceniana jest *in vitro*, lecz pełna kwalifikacja wymaga potwierdzenia w modelach ektopowych *in vivo*. Osteoindukcję wykazują m.in. materiały zawierające peptydy sygnałowe, czynniki wzrostu (np. BMP-2) lub zmodyfikowane powierzchnie biomateriałów [130].

- **Osteointegracja** – proces biologicznego, bezpośredniego połączenia powierzchni implantu z nowo formowaną kością, bez pośrednictwa tkanki włóknistej. Jest warunkiem długoterminowej stabilności wszczepu i zależy od właściwości chemicznych, topografii i biozgodności powierzchni materiału [123, 130].

Istotną cechą bioaktywnego implantu kostnego jest jego zdolność do indukowania tworzenia warstwy apatytu na powierzchni, strukturalnie zbliżonej do hydroksyapatytu naturalnie występującego w tkance kostnej. Powstała warstwa sprzyja adhezji komórek, wspomaga osteogenezę i istotnie wpływa na proces osteointegracji [128].

Zdolność materiału do nukleacji apatytu może być oceniana *in vitro*, bez konieczności stosowania modeli zwierzęcych, poprzez inkubację w symulowanym płynie ustrojowym (SBF – ang. *simulated body fluid*) – roztworze o składzie jonowym zbliżonym

do ludzkiego osocza. Tabela 3 przedstawia porównanie stężeń głównych jonów w SBF i osoczu krwi.

W 2007 roku Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO 23317 [131]) opracowała standard dotyczący oceny bioaktywności implantów na podstawie ich zdolności do indukowania powstawania apatytu. Norma ta określa skład SBF oraz warunki prowadzenia testu, takie jak temperatura (37°C), czas inkubacji (zwykle 7–28 dni) i metody oceny warstwy apatytu, np. skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM – ang. *Scanning Electron Microscope*), spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS – ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*) czy dyfrakcja rentgenowska (XRD) [128].

Obecność i morfologia utworzonej warstwy apatytowej są uznawane za wskaźniki bioaktywności i potencjału osteointegracyjnego biomateriału.

Tabela 3. Skład jonowy SBF i osocza krwi według normy ISO 23317 (pH 7,2–7,4) [131].

Jon	Stężenie (10^{-3} mol)	
	SBF (pH 7,4)	osocze krwi (pH~ 7,2–7,4)
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	147,8	103,0
HCO ₃ ⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

W zastosowaniach klinicznych, poza wymaganiami materiałowymi, kluczowe znaczenie ma zapobieganie kolonizacji implantów kostnych przez drobnoustroje. Infekcje bakteryjne są jedną z głównych przyczyn niepowodzenia leczenia implantologicznego, prowadząc do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego i konieczności usunięcia implantu [132].

W przebiegu zakażenia dochodzi często do powstania biofilmu – złożonej, adhezyjnej struktury mikroorganizmów otoczonych macierzą polimerową, która chroni je przed działaniem antybiotyków i układu odpornościowego. Biofilm znacząco utrudnia gojenie się tkanek i hamuje regenerację kości. Dodatkowo, kwaśne środowisko,

towarzyszące infekcji, obniża żywotność osteoblastów, co dodatkowo pogarsza efekty leczenia [133, 134].

Aby przeciwdziałać zakażeniom po implantacji, opracowano różnorodne strategie przeciwdrobnoustrojowe, które mogą być stosowane indywidualnie lub w kombinacji:

- **Powierzchnie antyadhezyjne** – powłoki hydrofilowe (np. polimery, hydrożele), które ograniczają przyczepność bakterii do implantu i utrudniają tworzenie biofilmu [135],
- **Antybiotykowe modyfikacje kompozytów** – np. wprowadzenie gentamycyny umożliwia miejscowe, kontrolowane uwalnianie antybiotyku, zwiększając skuteczność przeciwdrobnoustrojową i ograniczając działania niepożądane [136],
- **Modyfikacje jonami metali** – np. jony srebra, miedzi lub cynku wykazujące trwałe działanie przeciwdrobnoustrojowe na powierzchni biomateriału [137],
- **Nanostruktury mechaniczne** – takie jak nanofilary (np. na powierzchni poli(diakrylanu glikolu etylenowego), PLA), które fizycznie utrudniają adhezję bakterii, nie zaburzając jednocześnie integracji z kością [138],
- **Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs)** – np. *Dhvar5* (LLLFLKKRKKRKY), które mogą być immobilizowane na powierzchni implantu, zapewniając selektywną ochronę przeciwbakteryjną bez toksyczności wobec komórek gospodarza [139].

6.1 Polimery w inżynierii tkankowej kości i implantacji

Polimery to związki organiczne zbudowane z długich łańcuchów monomerów połączonych wiązaniami kowalencyjnymi. W inżynierii tkanki kostnej stosuje się zarówno polimery naturalne (biopolimery), jak i polimery syntetyczne, różniące się pochodzeniem, właściwościami oraz potencjałem aplikacyjnym.

Biopolimery, takie jak polisacharydy (np. chityna, chitozan, pochodne kwasu hialuronowego) i białka (np. kolagen, elastyna), charakteryzują się wysoką biokompatybilnością, dobrą biodegradowalnością i niską toksycznością. Ich istotną zaletą jest zdolność do resorpcji w organizmie i rozkładu na nieszkodliwe metabolity, takie jak woda i dwutlenek węgla. Dzięki chemicznemu podobieństwu do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), biopolimery doskonale sprawdzają się jako materiały

rusztowaniowe w medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza w postaci trójwymiarowych rusztowań [138, 139].

Ograniczeniami polimerów naturalnych są m.in.: szybki rozkład w środowisku biologicznym, ograniczona wytrzymałość mechaniczna oraz ryzyko zanieczyszczeń mikrobiologicznych (bakterie, grzyby). Ponadto biopolimery pochodzenia zwierzęcego mogą wywoływać reakcje alergiczne u niektórych pacjentów. Pomimo tych wad, wiele materiałów dostępnych komercyjnie opiera się na naturalnych polimerach, takich jak kolagen, chitozan czy jedwab. W ramach niniejszej pracy zastosowano chitozan, którego właściwości zostały opisane w dalszej części rozdziału [140].

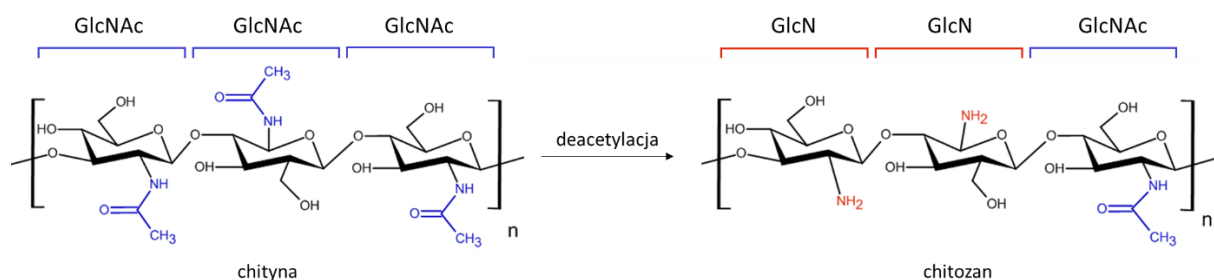
Polimery syntetyczne, takie jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), ich kopolimery (PLGA), polikaprolakton (PCL), polihydroksymaślan (PHB), polidimetylosiloksan (PDMS) czy polipropylenowy fumaran (PPF), cechują się niską immunogennością i nie indukują przewlekłych reakcji zapalnych. Dzięki szerokiemu zakresowi właściwości mechanicznych – od elastycznych elastomerów po sztywne tworzywa termoplastyczne – mogą być dostosowywane do konkretnych potrzeb klinicznych. Ich struktura chemiczna podlega modyfikacjom, a proces syntezy jest stosunkowo prosty i pozwala na uzyskiwanie materiałów o ściśle kontrolowanych parametrach fizykochemicznych [141].

Zarówno naturalne, jak i syntetyczne polimery są dostępne w różnych formach: folii, rusztowań 3D, hydrożeli oraz implantów wytwarzanych metodą druku 3D. Dodatkowo mogą być funkcjonalizowane aktywnymi cząsteczkami, takimi jak peptydy, leki czy czynniki wzrostu, co znacząco zwiększa ich wartość aplikacyjną w regeneracji tkanek. Dzięki swojej wszechstronności, polimery stanowią jeden z najważniejszych materiałów w inżynierii tkanki kostnej [140].

6.2 Chitozan

Chitozan (CH – ang. chitosan) to naturalny, półkrystaliczny polisacharyd wykorzystywany w inżynierii tkanki kostnej ze względu na swoją biogodność, biodegradowalność oraz aktywność biologiczną. Jest zbudowany z powtarzających się jednostek *D*-glukozaminy i *N*-acetylo-*D*-glukozaminy połączonych wiązaniami β -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozydowymi [142].

Chitozan posiada charakter kationowy wynikający z obecności wolnych grup aminowych ($-\text{NH}_2$), co odróżnia go od wielu innych naturalnych polimerów o właściwościach obojętnych lub anionowych [143]. CH otrzymuje się poprzez deacetylację chityny – naturalnego polisacharydu występującego m.in. w egzoszkieletach skorupiaków, owadów oraz ścianach komórkowych grzybów [144]. Chityna zbudowana jest głównie z jednostek *N*-acetyloglukozaminy (Rysunek 16).



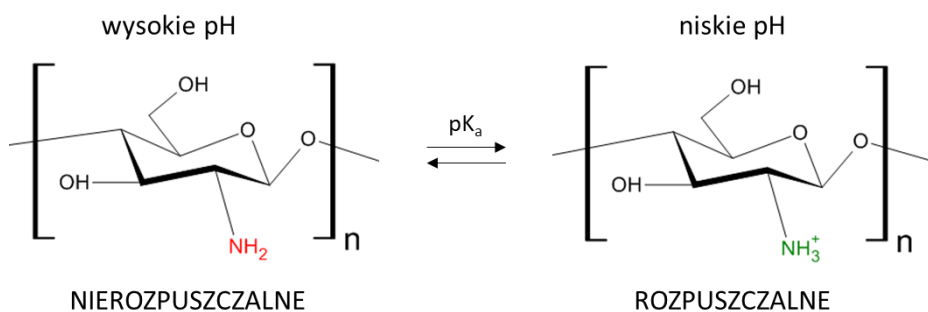
Rysunek 16. Deacetylacja chityny do chitozanu. Po lewej stronie: chityna – wysoki stopień acetylacji (głównie jednostki *N*-acetyloglukozaminy, zaznaczone na niebiesko); po prawej stronie: chitozan – wysoki stopień deacetylacji (przewaga jednostek glukozaminy, zaznaczone na czerwono). Niebieskim kolorem zaznaczono grupy acetylowe ($-\text{COCH}_3$), a czerwonym – wolne grupy aminowe ($-\text{NH}_2$).

Proces deacetylacji polega na usunięciu grup acetylowych, co prowadzi do zwiększenia udziału wolnych grup aminowych i przekształcenia chityny w chitozan. Najczęściej stosuje się w tym celu gorące roztwory alkaliczne (np. NaOH) [145], jednak opracowano również metody alternatywne, takie jak enzymatyczna deacetylacja [146] czy eksplozja parowa (steam explosion) [145, 146]. Kluczowym parametrem opisującym chitozan jest stopień deacetylacji (DDA – ang. *degree of deacetylation*), który określa procentowy udział jednostek glukozaminy w łańcuchu polimerowym. Przyjmuje się, że:

- chityna to polimer o DDA < 50%,
- chitozan to polimer o DDA $\geq$ 50%.

W praktyce chitozan uzyskuje się w szerokim zakresie DDA – od 50% do nawet 95%, przy masie cząsteczkowej od około 300 do ponad 1000 kDa, w zależności od źródła surowca i metody produkcji.

Chitozan (CH) jest nierozpuszczalny w wodnych roztworach o pH obojętnym i zasadowym. W środowisku kwaśnym ($\text{pH} < 6,0$) dochodzi do protonowania wolnych grup aminowych jednostek glukozaminowych, co umożliwia rozpuszczanie się polimeru poprzez powstawanie kationów (Rysunek 17) [147].



Rysunek 17. Wpływ pH na stan jonizacji grup aminowych C i jego rozpuszczalność: przejście. pomiędzy nierozpuszczalną formą zasadową a rozpuszczalną formą kwaśną.

Właściwości funkcjonalne chitozanu – takie jak zdolność do tworzenia filmów, hydrożeli, mikrosfer, a także jego aktywność przeciwbakteryjna – są silnie zależne od masy cząsteczkowej i stopnia deacetylacji. Chitozan o niższej masie cząsteczkowej wykazuje niższą lepkość, natomiast silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe obserwuje się dla polimerów o masie powyżej 100 kDa i wysokim DDA [142, 148].

Dzięki swojemu polikationowemu charakterowi, kontrolowanej biodegradowalności, biokompatybilności, nietoksyczności oraz zdolności do bioresorpcji, chitozan znalazł szerokie zastosowanie w medycynie (Tabela 4).

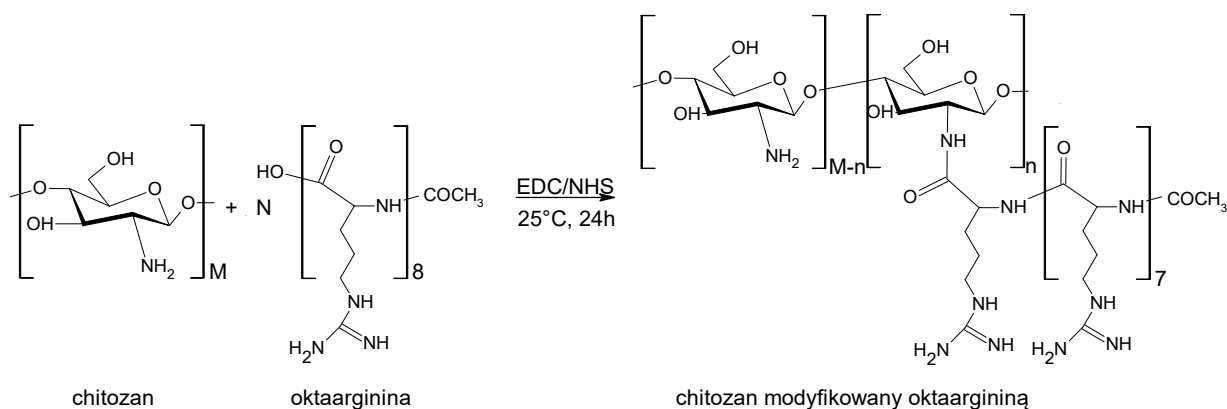
Tabela 4. Zestawienie właściwości biologicznych, fizycznych i chemicznych chitozanu istotnych dla jego zastosowań biomedycznych [149].

Właściwości biologiczne	Właściwości fizyczne	Właściwości chemiczne
– biokompatybilność	– naturalny polimer	– liniowy polisacharyd aminowy
– biodegradowalność	– biały proszek	– reaktywne grupy
– niska toksyczność	– dobór procentu deacetylacji i masy cząsteczkowej chitozanu wpływa na jego właściwości fizykochemiczne, takie jak rozpuszczalność, lepkość, interakcje i wytrzymałość mechaniczną.	– hydroksylowe i aminowe
– mukoadhezja	– nierozpuszczalny w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych	– zdolność do tworzenia wiązań wodorowych
– zdolność wiązania kwasów żółciowych	– rozpuszczalny w rozcieńczonych kwaśnych roztworach	– słaba zasada (silny nukleofil, pKa ~ 6,3)
– zdolność wiązania wapnia/kobaltu	– mierzalny wskaźnik krystaliczności	– przewodnictwo jonowe
– cytocompatybilność	– charakter hydrofilowy	– biopolimer kationowy
– stymulacja angiogenezy		– zdolność filmotwórcza
– osteoindukcyjność		
– właściwości gojące rany		

6.3 Wybrane metody koniugacji chitozanu z peptydami

Jedną z najczęściej stosowanych metod sprzęgania peptydów z chitozanem (CH) jest chemia karbodiimidu, wykorzystująca 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (EDC) w obecności *N*-hydroksysukcynimidu (NHS). W tym procesie grupa karboksylowa peptydu reaguje z EDC, tworząc niestabilny intermediat, który w obecności NHS przekształca się w bardziej trwały ester NHS. Następnie ten półstabilny związek reaguje z wolną grupą aminową CH, tworząc trwałe wiązanie amidowe (Rysunek 18). NHS pełni w tym układzie rolę grupy opuszczającej, ułatwiając przebieg reakcji (NHS jest bardzo dobrą grupą opuszczającą) [150].

Przykładem zastosowania tej technologii jest chitozan modyfikowany oktaargininą (R_8 -CH), opracowany jako nośnik do transferu genów. Wykorzystanie sekwencji R_8 umożliwia poprawę penetracji komórkowej i zwiększenie efektywności wewnątrzkomórkowej dostawy materiału genetycznego [151].



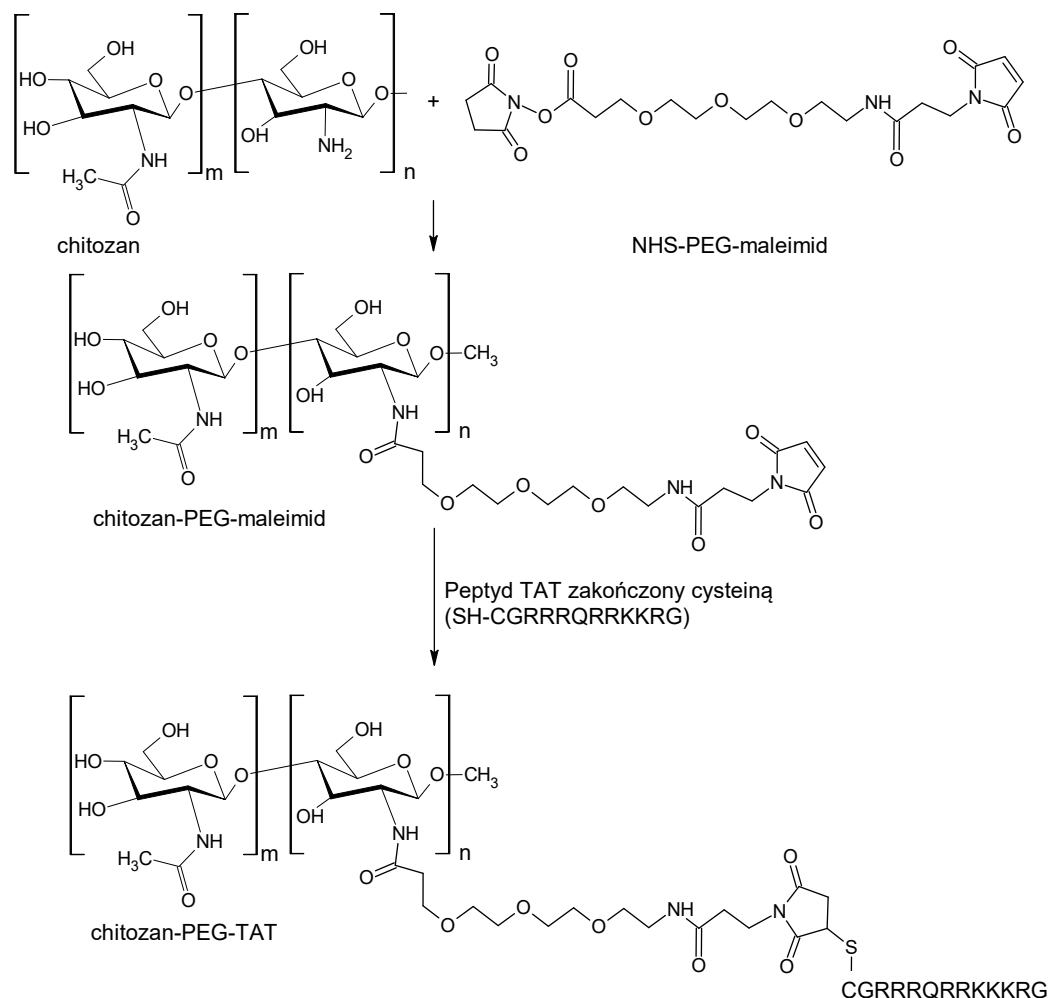
Rysunek 18. Schemat syntezy modyfikowanego chitozanu R_s -CH. Symbol M oznacza średnią liczbę jednostek powtarzalnych CH, N – zaprojektowany molowy stosunek oktaargininy (R_s) do CH, natomiast n – rzeczywisty molowy stosunek R_s do CH w produkcie końcowym po zakończonej reakcji sprzęgania. Modyfikacja przeprowadzana była z użyciem układu EDC/NHS w temperaturze 25 °C przez 24 godziny. Opracowanie własne na podstawie [151].

Innym przykładem koniugacji z użyciem chemii EDC/NHS jest karboksymetylotrimetylochitozan (CM-TM-CH) sprzężony z peptydem adhezyjnym GRGDS. Otrzymany koniugat znalazł zastosowanie w produkcji trójwymiarowych rusztowań do hodowli komórek i regeneracji tkanek. Badania *in vitro* z udziałem ludzkich fibroblastów skórnych (HDF) wykazały, że modyfikowane rusztowania znacząco poprawiały adhezję, proliferację i różnicowanie komórek [152].

Kolejną metodą sprzęgania peptydów z chitozanem (CH) jest reakcja addycji grup tiolowych do podstawników maleimidowych. W tym podejściu peptyd, który ma zostać przyłączony do CH, jest wcześniej modyfikowany poprzez wprowadzenie wolnej grupy tiolowej ($-SH$) – zwykle poprzez podstawienie cysteiną. Następnie tiolowany peptyd reaguje z grupą maleimidową, najczęściej w formie NHS-PEG-maleimid, w której fragment PEG (glikol polietylenowy) pełni funkcję dystansującą, a NHS umożliwia wiązanie z grupami aminowymi CH [153].

Przykładem tej strategii jest cysteinyłowany peptyd TAT, który został przyłączony do części grup aminowych chitozanu za pomocą układu NHS-PEG-maleimid (Rysunek 19) [154]. Otrzymane koniugaty wykorzystano do tworzenia nanocząsteczek do wewnątrzkomórkowego dostarczania siRNA. W badaniach *in vitro* na komórkach neuroblastomy myszy wykazano, że koniugacja znacząco zwiększyła efektywność

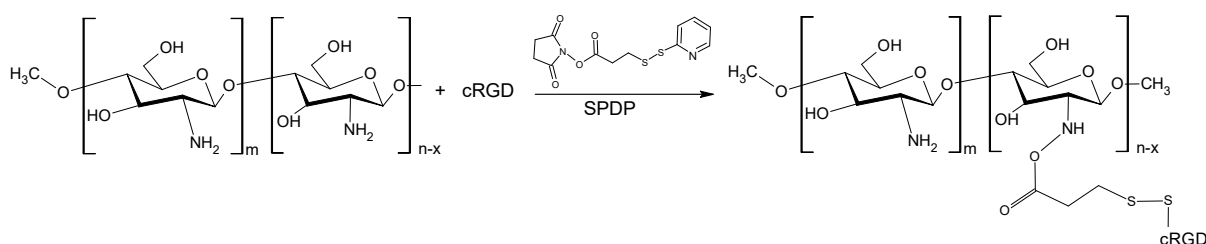
transportu siRNA do wnętrza komórek, nie wpływając jednocześnie na ich żywotność [154].



Rysunek 19. Schemat syntezy kopolimeru chitozanu z glikolem polietylenowym (PEG) oraz peptydem TAT. Proces obejmuje kolejno: sprzężenie PEG–maleimidu z chitozanem oraz modyfikację peptydem TAT zawierającym resztę cysteiny na *N*-końcu. Opracowanie własne na podstawie [154].

Innym odczynnikiem stosowanym do sprzęgania peptydów z chitozanem (CH) jest *N*-sukcynimidylo–3–(2–pirydyloditio)propionian (SPDP) – bifunkcyjny reagent umożliwiający łącznik pomiędzy grupami aminowymi a tiolowymi. SPDP zawiera reaktywną grupę NHS–estrową, która reaguje z aminami (np. na chitozanie), oraz grupę pirydyloditiolową, która tworzy kowalencyzne wiązanie z wolnym tiolem peptydu. Wang i współpracownicy opracowali system dostarczania leków oparty na tlenku grafenu i

chitozanie zmodyfikowanym cyklicznym peptydem RGD (cRGD), mającym na celu zwiększenie specyficzności ukierunkowanego transportu leku do komórek nowotworowych [155]. Do koniugacji cRGD z CH wykorzystano reakcję tiolowania z udziałem SPDP jako odczynnika sieciującego (Rysunek 20). Otrzymany system nanonośnika wykazywał zdolność do enkapsulacji doksorubicyny, a także zwiększone uwalnianie leku w kwaśnym pH, charakterystycznym dla mikrośrodowiska guza. Wyniki te wskazują na potencjał koniugatów chitozanu z peptydami w celowanym dostarczaniu leków przeciwnowotworowych [155].

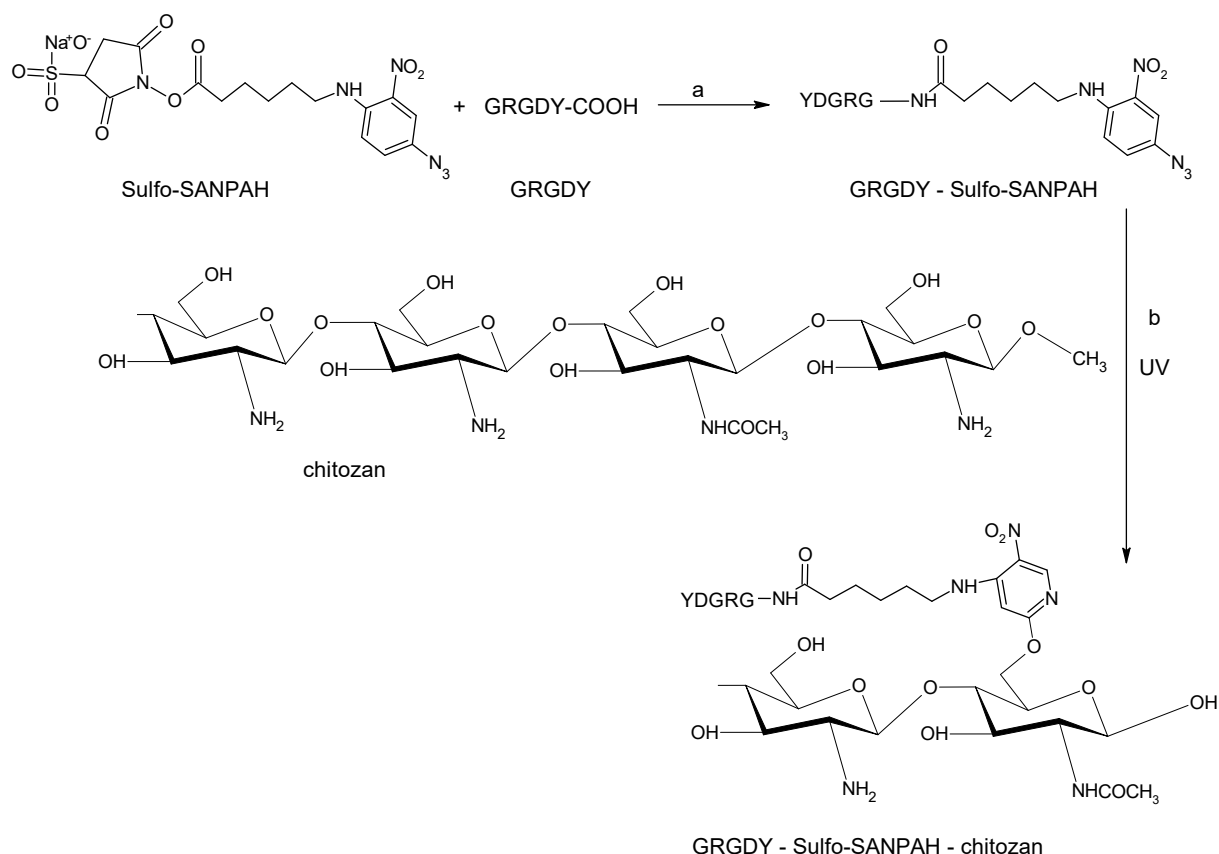


Rysunek 20. Schemat syntezy chitozanu modyfikowanego peptydem cRGD z wykorzystaniem linkera SPDP. Opracowanie własne na podstawie [155].

Stosowanie opisanych wcześniej metod koniugacji napotyka ograniczenia, gdy chitozan (CH) wykorzystywany jest do tworzenia mikro– lub nanonośników do dostarczania leków lub genów. W takich układach protonowane grupy aminowe CH są niezbędne do tworzenia kompleksów z ujemnie naładowanymi polimerami (np. alginianem), dlatego tylko ich część może być użyta do sprzęgania z peptydami. Alternatywnie, możliwe jest wykorzystanie grup hydroksylowych CH.

W tym celu stosuje się światłoczuły bifunkcyjny odczynnik Sulfo–SANPAH, zawierający z jednej strony grupę *N*–hydroksysukcynimidu (NHS) – umożliwiającą reakcję z aminową grupą peptydu – a z drugiej fotoreaktywną grupę aryłazydową, aktywowaną promieniowaniem UV [156].

Yang i współpracownicy wykorzystali Sulfo–SANPAH do koniugacji peptydu adhezyjnego GRGDY z chitozanem. Najpierw peptyd sprzężono z Sulfo–SANPAH poprzez reakcję grupy NHS z aminą peptydu, tworząc wiązanie amidowe. Następnie powstały związek GRGDY–SANPAH aktywowano światłem UV w obecności CH, co umożliwiło wiązanie przez grupy hydroksylowe chitozanu (Rysunek 21) [157].

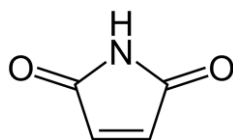


Rysunek 21. Proces jednorodnej syntezy GRGDY–SANPAH–chitozan obejmował dwa etapy reakcji. a) W pierwszym etapie fotoreaktywny czynnik sieciujący Sulfo–SANPAH został sprzężony z peptydem GRGDY w roztworze wodno–etanolowym, prowadząc do powstania pochodnej GRGDY–SANPAH. b) w drugim etapie, otrzymany związek został przyłączony do chitozanu poprzez naświetlanie promieniowaniem UV, co umożliwiło reakcję grupy arylazydowej z powierzchnią polimeru. Opracowanie własne na podstawie [157].

6.4 Łączniki maleimidowe – zastosowanie w koniugacji polimerów z peptydami i białkami

Jedną z powszechnie stosowanych metod koniugacji peptydów z chitozanem (CH) jest wykorzystanie łączników maleimidowych. W niniejszej pracy również zastosowano tę metodę do funkcjonalizacji CH peptydem, ze względu na jej wysoką specyficzność, selektywność oraz efektywność reakcji.

Maleimidy i ich pochodne stanowią istotną klasę związków chemicznych, które od lat znajdują szerokie zastosowanie w chemii i biologii molekularnej [158]. Maleimid (1H–pirol–2,5–dion) to związek chemiczny o wzorze sumarycznym $C_2H_2(CO)_2NH$, zawierający reaktywny pierścień z dwoma grupami karbonyłowymi, który pełni istotną rolę jako reagent w syntezie organicznej (Rysunek 22).

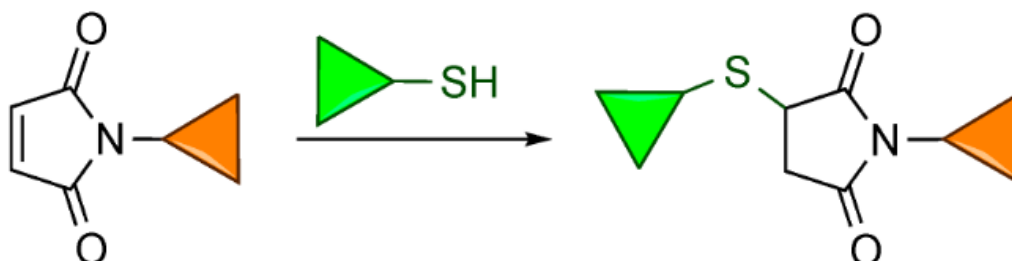


Rysunek 22. Wzór strukturalny maleimidu (1H-pirol-2,5-dion).

W chemii organicznej maleimidy są wykorzystywane m.in. jako dienofile w reakcjach cykloaddycji oraz jako związki akceptorowe w reakcji addycji Michaela [159]. W zastosowaniach biologicznych, ich szybka i selektywna reakcja z wolnymi grupami tiolowymi (–SH), zwłaszcza w resztach cysteinowych, znajduje zastosowanie w sondowaniu struktury białek, stabilizacji struktur przestrzennych oraz w tworzeniu biokoniugatów [160].

Pochodne maleimidów – w tym *N*-maleimidoaminokwasy – są szeroko stosowane w wytwarzaniu nowoczesnych materiałów, takich jak polimery funkcjonalne [161], powłoki bioaktywne [162] czy systemy dostarczania leków [163, 164].

Addycja tioli do wiązania podwójnego układu maleimidowego (reakcja Michaela) należy do klasycznych reakcji „click chemistry” – jest szybka, wydajna, przebiega bezproduktowo i może być prowadzona w środowisku wodnym (Rysunek 23).

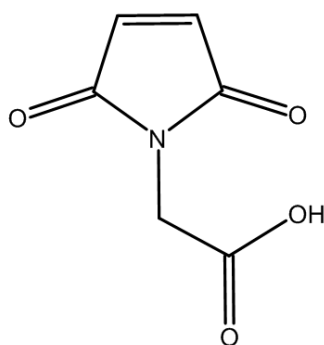


Rysunek 23. Reakcja „click” maleimidu z tiolami prowadząca do powstania koniugatów tioeterowych.

Maleimidy należą do najczęściej wykorzystywanych reagentów do selektywnej modyfikacji reszt cysteinowych w białkach. Ich wartość syntetyczna została szeroko potwierdzona w zastosowaniach klinicznych i przedklinicznych, szczególnie w koniugatach typu przeciwciało–lek (ADC – ang. *antibody–drug conjugates*). Brentuximab vedotin [165] oraz trastuzumab emtansine (KADCYLA) [166] to dwa pionierskie przykłady leków ADC drugiej generacji, w których zastosowano chemię maleimidową. W obu przypadkach modyfikacja reszt cysteiny przebiega szybko i niemal ilościowo w

warunkach fizjologicznych, co umożliwia skuteczne wiązanie ładunku cytotoksycznego z przeciwciałem i poprawia efektywność terapeutyczną [164].

W ramach własnych badań zastosowałam jedną z podstawowych pochodnych maleimidu – kwas 2-maleimidoctowy (2-(2,5-diokso-2,5-dihydro-1H-pirol-1-yl)octowy), dalej określany jako maleimidoglicyna (Mal-Gly) (Rysunek 24).



Rysunek 24. Wzór strukturalny kwasu 2-maleimidoctowego (maleimidoglicyny; Mal-Gly).

Większość metod otrzymywania pochodnych maleimidu opiera się na reakcji amin z bezwodnikiem maleinowym, a następnie kwasowo katalizowanej (np. przez kwasy Lewisa) dehydratacji powstałego kwasu maleamowego. Reakcja ta, prowadzona w podwyższonej temperaturze, prowadzi do cyklizacji i utworzenia *N*-maleimidoaminokwasu [167]. Alternatywą jest bezpośrednie *N*-alkilowanie maleimidu alkoholami w warunkach reakcji Mitsunobu [158].

Obie metody mają jednak istotne ograniczenia – niską wydajność, obecność produktów ubocznych oraz ograniczoną liczbę akceptowalnych substratów. Zarówno bezpośrednia kondensacja, jak i cyklizacja kwasu maleamowego często prowadzą do niskich uzysków, a modyfikacje warunków (np. zmiana polarności rozpuszczalnika) nie przynoszą istotnej poprawy, niezależnie od użycia rozpuszczalników polarnych (np. kwas octowy, woda) lub niepolarnych (np. toluen, ksylen).

Zastosowanie technik alternatywnych, takich jak synteza mikrofalowa w warunkach bezrozpuszczalnikowych, również nie jest optymalne – często skutkuje powstawaniem mieszaniny niepożądanych produktów polimeryzacji [158].

Dostępne w literaturze metody syntezy chemicznej maleimidoglicyny (znanej również jako kwas 2-maleimidoctowy) również cechują się istotnymi wadami: wymagają

użycia toksycznych reagentów, prowadzone są w trudnych warunkach technologicznych, dają niską wydajność, a otrzymany produkt często zanieczyszczony jest znaczną ilością kwasu maleamidowego jako produktu ubocznego [168].

6.5 Zastosowanie chitozanu w wyrobach medycznych i preparatach terapeutycznych

Chitozan, dzięki wysokiej biokompatybilności, niskiej toksyczności oraz dobrej biozgodności, sprzyja gojeniu się ran [169]. Jest powszechnie wykorzystywany w wielu komercyjnych opatrunkach hemostatycznych, stosowanych m.in. w medycynie ratunkowej i chirurgii. Do najpopularniejszych produktów należą: ChitoSam™ (Sammedic), ChitoGauze XR Pro (North American Rescue), ChitoFlex® (HMT Inc.), Axiostat® (AXIO), KytoCel® (Aspen Medical) [170].

Poza opatrunkami, chitozan znalazł zastosowanie także w produktach przeznaczonych do regeneracji chrząstki, takich jak BST–CarGel® (Piramal Healthcare) i JointRep™ (Medicwave), a także w produkcji chitozanowych rurek do regeneracji nerwów (np. Reaxon® firmy Medovent) [171].

W literaturze naukowej opisano liczne zastosowania chitozanu (CH) w medycynie regeneracyjnej. W niniejszej pracy skoncentrowano się na formach CH stosowanych w leczeniu uszkodzeń tkanki kostnej. Najczęściej wykorzystywane formy obejmują m.in. rusztowania, sfery, powłoki, zawiesiny oraz włókna (Rysunek 25).



Rysunek 25. Przykładowe formy CH wykorzystywane w zastosowaniach. biomedycznych i inżynierii biomateriałów: sfery, włókna, zawiesiny, powłoki, rusztowania. Różnorodność fizykochemicznych postaci umożliwia szerokie zastosowanie CH jako nośnika leków, biomateriału do regeneracji tkanek, systemu do kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych oraz biokompatybilnych powłok ochronnych. Rysunek własny z wykorzystaniem programu BioRender.

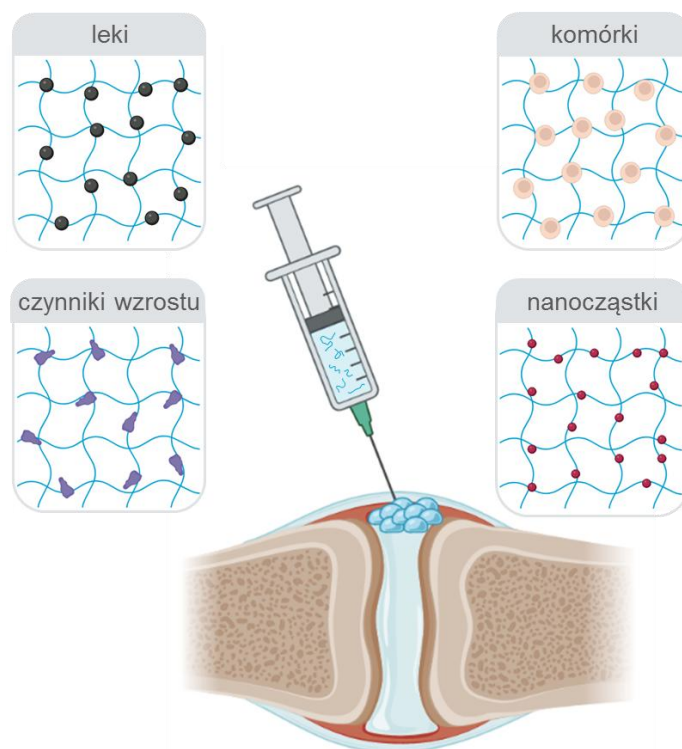
Biokompozyty iniekcyjne. Firma C.D.G. Abueva opracowała iniekcyjny biokompozyt w postaci kriożelu, powstającego przez zamrażanie roztworu (z chitozanem glukonowym) w temperaturze poniżej punktu zamarzania, lecz powyżej temperatury eutektycznej układu. Kriożel zawiera chitozanową macierz oraz dwufazowy fosforan wapnia (HA + β -TCP). Preparat był biozgodny, łatwo przechodził przez cienką igłę i zachowywał integralność strukturalną po aplikacji. Jego sieci polimerowe skutecznie ograniczały dyfuzję fosforanu wapnia, co czyniło go skutecznym wypełniaczem do ubytków kostnych [142, 170, 171].

Chen Zhao i wsp. opracowali hydrożelowy układ iniekcyjny reagujący na zmiany pH, złożony z karboksymetylochitozanu i amorficznego fosforanu wapnia (CMCh-ACP).

Hydrożel wykazał dobrą biogodność, zwiększoną ekspresję markerów osteogennych (osteokalcyna, osteopontyna) oraz stymulował proliferację i adhezję MSCs [172].

Inną grupę stanowią hydrożele termowrażliwe, które są ciekłe w temperaturze pokojowej, lecz żelują w temperaturze ciała. Przykładem jest układ oparty na chitozanie i α,β -glicerofosforanie (α,β -GP), zawierający nanocząstki chitozanu (CHn – ang. *chitosan nanoparticles*) połączone z plazmidowym DNA kodującym białko morfogenetyczne kości-2 (pDNA-BMP-2). Preparat CH/CHn(pDNA-BMP-2)-GP przyspieszał gojenie ubytków kostnych u szczurów i psów rasy beagle [173–176].

Pomimo licznych zalet, wciąż istnieją wyzwania związane z optymalizacją właściwości mechanicznych, kontrolą tempa biodegradacji oraz zapewnieniem długoterminowego bezpieczeństwa stosowania. Wiele z opisywanych systemów znajduje się na etapie badań przedklinicznych, a ich translacja do praktyki klinicznej wymaga dalszych, szeroko zakrojonych badań. Podsumowując polimery iniekcyjne, w tym chitozanowe, zyskują coraz większe znaczenie w medycynie regeneracyjnej kości, umożliwiając dostarczanie leków, komórek, czynników wzrostu lub nanocząstek bezpośrednio do miejsca uszkodzenia (Rysunek 26).



Rysunek 26. Hydrożele jako systemy lokalnego dostarczania bioaktywnych komponentów. Hydrożel może być użyty jako nośnik do kontrolowanego uwalniania leków, komórek, czynników wzrostu oraz nanocząstek bezpośrednio w miejsce uszkodzenia tkanek, np. w obrębie stawu. Taka forma aplikacji wspiera regenerację i odbudowę uszkodzonych struktur. Opracowanie własne na podstawie [175].

Inną formą aplikacyjną chitozanu (CH) są biodegradowalne i bioaktywne implanty, pełniące funkcję trójwymiarowych rusztowań dla regeneracji tkanek. Porowata struktura (zwykle 60–90%) umożliwia adhezję i migrację komórek, dyfuzję substancji biologicznie czynnych, unaczynienie i formowanie nowej tkanki kostnej. Wysoka porowatość poprawia właściwości biologiczne, ale obniża wytrzymałość mechaniczną (często <1 MPa dla samych biopolimerów), dlatego w celu jej poprawy stosuje się kompozyty CH z innymi materiałami [177, 178].

Przykładowo, pianki CH z dodatkiem bioaktywnego szkła (BG – ang. *bioglass*) osiągają porowatość ok. 85% i wytrzymałość na ściskanie rzędu 0,3–0,6 MPa, wykazując lepszą strukturę porów i sztywność w porównaniu do czystego CH [179]. Innym przykładem są rusztowania z dodatkiem mezoporowatego krzemianu cynku (mZS), które poprawiają porowatość, szybkość degradacji, właściwości antybakteryjne oraz wspomagają mineralizację [180].

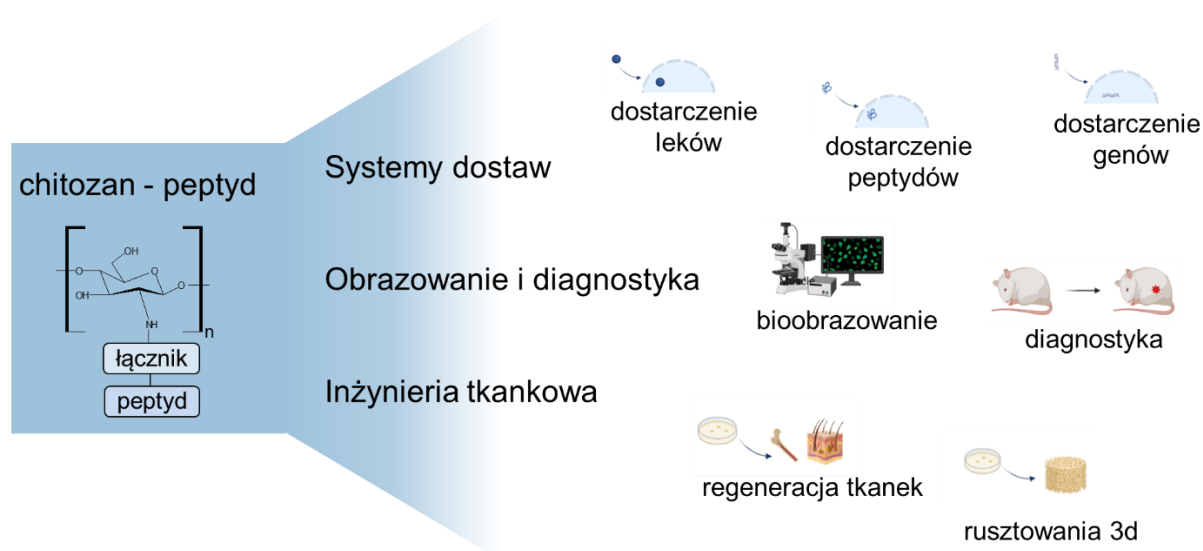
Stopy tytanu (np. Ti-6Al-4V) mają moduł sprężystości ok. 110 GPa, znacznie wyższy niż naturalna kość (15–25 GPa), co sprzyja zjawisku stress shielding. Wprowadzenie porowatej struktury (np. 50–70%) i pokrycie implantów bioaktywną powłoką z krzemianu wapnia, magnezu i CH może poprawić ich integrację z kością, adhezję i różnicowanie komórek oraz wspomóc osteogenezę [181].

Nanowłókna chitozanowe i ich kompozyty z hydroksyapatytem poprawiają właściwości rusztowań – zwłaszcza adhezję, proliferację i ekspresję osteogennych markerów (np. ALP, OCN) [182]. Włókna takie zwykle mają średnicę 100–400 nm i dużą powierzchnię właściwą, sprzyjającą interakcji z komórkami.

Mikrosfery chitozanowe i kompozytowe (np. HA/SA/CH) umożliwiają kontrolowane uwalnianie leków i sprzyjają kolonizacji przez osteoblasty. Mikrosfery HA/SA/CH wykazywały najlepszą zdolność adhezji i proliferacji komórek, a ich porowatość wynosiła ok. 70–80%, z rozkładem porów sprzyjającym migracji komórek [183].

6.6 Wykorzystanie koniugatów chitozanu z peptydami w biomedycynie i inżynierii tkankowej

Obecne trendy w chemii biomateriałów przesuwają się w stronę projektowania materiałów, które efektywnie integrują się z biologicznymi sieciami sygnałowymi. Koniugaty białko/peptyd-polimer stają się nową generacją materiałów hybrydowych, łącząc zalety obu klas związków – bioaktywność peptydów oraz funkcjonalność i podatność na modyfikacje polimerów [184]. Koniugaty chitozanu (CH) z peptydami lub białkami wykazują niską immunogenność, stosunkowo łatwą syntezę, korzystne koszty produkcji oraz dużą elastyczność w dostosowywaniu właściwości. Stosowane są m.in. w systemach dostarczania leków i genów, diagnostyce, obrazowaniu oraz inżynierii tkankowej (Rysunek 27) [185].



Rysunek 27. Schemat zastosowań koniugatów chitozan–peptyd w biomedycynie: systemy dostarczania leków i genów, obrazowanie medyczne oraz inżynieria tkankowa. Opracowanie własne na podstawie [185].

Przykładem takiego systemu może być peptyd o sekwencji CRGDKGPDC, znany jako zinternalizowany RGD (iRGD). Zawiera on motyw RGD, który umożliwia specyficzne wiązanie z receptorami integrzyn na powierzchni komórek nowotworowych, a następnie przenikanie przez barierę śródmięszową. Ułatwia to precyzyjne dostarczanie leków hydrofilowych, takich jak doksorubicyna. Chen i współpracownicy przeprowadzili badanie, w którym iRGD został skoniugowany ze zmodyfikowanym chitozanem–PLA (kwas polimlekowy), z wykorzystaniem łącznika sulfosukcynimidylo–1,4–(*N*–maleimidometylo)cykloheksano–1–karboksylanu (Sulfo–SMCC). Otrzymane koniugaty tworzyły kompleksy amfifilowe zdolne do enkapsulacji doksorubicyny i jej selektywnego dostarczania do komórek docelowych [186].

Innym przykładem są nanocząstki tiolowanego chitozanu koniugowanego z teriparatydem (PTH 1–34) czyli rekombinowanym fragmentem parathormonu stosowanym w leczeniu osteoporozy. Celem było zwiększenie biodostępności leku po podaniu doustnym. Otrzymany system (PEG–CH–PTHNP) charakteryzował się znacząco wydłużonym okresem półtrwania oraz wyższą biodostępnością w porównaniu z wolnym peptydem. Badania *in vivo* na modelu szczurzym potwierdziły skuteczną ochronę substancji czynnej oraz jej efektywne dostarczenie w przewodzie pokarmowym [144, 187].

W obrazowaniu medycznym koniugaty chitozan–peptyd również znajdują zastosowanie. Przykładem są magnetofluorescencyjne nanocząstki wykorzystywane do

obrazowania raka prostaty *in vivo*. Glikolowany chitozan (GCH) został zmodyfikowany chemicznie *N*-acetylohistydyną (NAHis), a następnie sprzężony z peptydem bombezyny (BBN), który wykazuje wysokie powinowactwo do receptorów GRPR, nadekspresjonowanych w nowotworach prostaty. Koniugacja BBN zwiększyła akumulację nanocząstek w obrębie guza u myszy, co wskazuje na potencjalną przydatność tych systemów w obrazowaniu nowotworów [188, 189].

Yu i współpracownicy opisali biomimetyczny koniugat chitozanu do zastosowania w inżynierii i przebudowie tkanki kostnej. Kompozytowe rusztowanie chitozan/hydroksyapatyt (CH/HA) zostało funkcjonalizowane peptydem P24, pochodzącym z białka morfogenetycznego kości BMP-2. Chitozan zmodyfikowano tiolowo za pomocą 2-iminotiolanu, a peptyd P24 zakończono resztą cysteiny, umożliwiając tworzenie mostków disiarczkowych. Tak uzyskany system umożliwiał kontrolowane uwalnianie P24 i wspomagał osteogenezę [78].

II. CEL PRACY

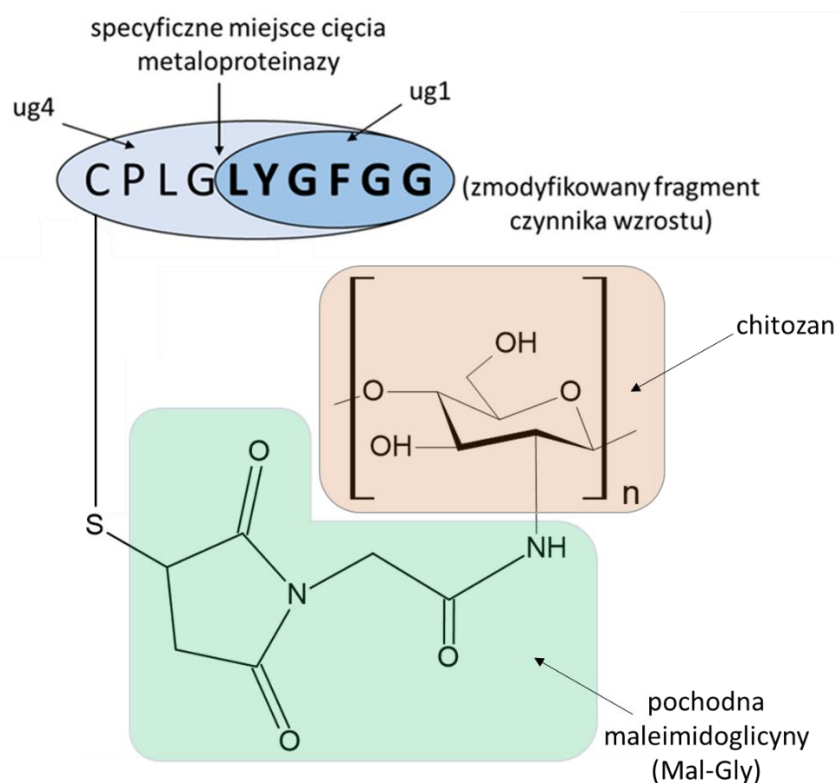
Tkanka kostna podlega ciągłej przebudowie, będącej wynikiem skoordynowanego działania komórek kostnych, obejmujących procesy resorpcji, tworzenia, przebudowy i mineralizacji. Proces ten jest precyzyjnie kontrolowany przez czynniki lokalne (czynniki wzrostu i cytokiny) oraz czynniki ogólnoustrojowe (kalcytonina i estrogeny), co zapewnia homeostazę kości. W przypadku patologicznych złamań lub dużych ubytków kostnych ($>2\text{ cm}^3$), naturalny proces gojenia jest zaburzony, a kość wymaga dodatkowej odbudowy. Czynniki takie jak niedostateczne ukrwienie, infekcje kości lub otaczających tkanek, a także choroby ogólnoustrojowe, takie jak osteoporoza, nowotwory czy cukrzyca, mogą znacznie utrudnić lub uniemożliwić regenerację tkanki kostnej [17]. Mimo dużej liczby dostępnych biomateriałów przeznaczonych do leczenia ubytków kości, tylko niewielka część z nich znalazła zastosowanie w praktyce klinicznej. Główne ograniczenia obejmują opóźnioną osteointegrację oraz niekontrolowane uwalnianie bioaktywnych cząsteczek, prowadzące do krótkotrwałego działania terapeutycznego i efektów ubocznych [19].

W odpowiedzi na te wyzwania, głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie innowacyjnych materiałów kompozytowych do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej. Cel ten postanowiłam osiągnąć poprzez syntezę i charakterystykę peptydów oraz fibryli peptydowych o właściwościach proregeneracyjnych, ich integrację z chitozanem oraz ocenę stabilności, struktury i mechanizmu kontrolowanego uwalniania bioaktywnych peptydów.

Do osiągnięcia celu ogólnego rozprawy doktorskiej wyznaczyłam następujące cele szczegółowe:

1. Zaprojektowanie i synteza peptydów o potencjalnych właściwościach proregeneracyjnych, zawierających sekwencje rozpoznawane przez metaloproteinazę 7, oraz selekcja peptydu wykazującego najwyższą aktywność biologiczną. Dla wybranego związku: opracowanie i optymalizacja warunków jego syntezy w skali półtechnicznej.
2. Synteza *N*-hydroksysukcynimidowego estru maleimidoglicyny (Mal-Gly-NHS) oraz opracowanie i optymalizacja metody jego przyłączenia do chitozanu oraz analiza stopnia podstawienia z wykorzystaniem techniki HPLC. Dodatkowo: optymalizacja warunków chromatograficznych i dobór odpowiedniego wzorca zewnętrznego.

3. Zaprojektowanie oraz optymalizacja warunków syntezy koniugatu maleimidochitozan – (CH–Mal–Gly)–peptyd, poprzez kowalencyjne przyłączenie wybranego peptydu do chitozanu zmodyfikowanego pochodną maleimidoglicyny (Rysunek 29). Ocena skuteczności sprzężenia metodą HPLC wraz z walidacją warunków analizy z wyborem wzorca kalibracyjnego.

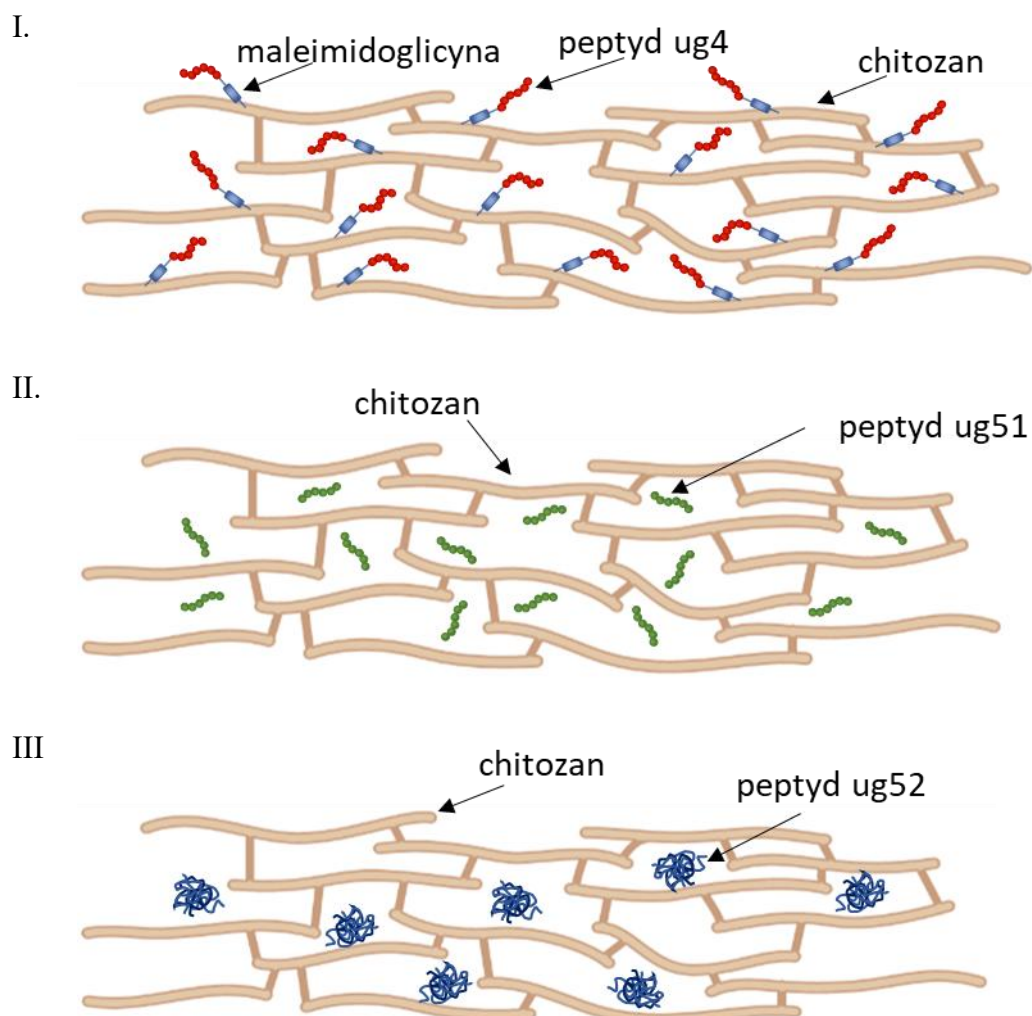


Rysunek 28. Schemat koniugatu chitozanu z peptydem **ug4**, przyłączonym kowalencyjnie za pomocą mostka tioeterowego utworzonego w reakcji grupy tiolowej cysteiny z pierścieniem maleimidowym. Peptyd zawiera sekwencję rozpoznawaną i specyficznie rozszczepianą przez metaloproteinazy (sekwencja CPLG↓LYGF GG), następnie po stronie C–końcowej znajduje się zmodyfikowany fragment czynnika wzrostu. Mal–Gly stanowi element łączący peptyd z chitozanem poprzez wiązanie amidowe.

4. Opracowanie peptydu proregeneracyjnego zdolnego do samorzutnego tworzenia fibryli, które mogą pełnić funkcję nośników bioaktywnych w inżynierii tkankowej. Otrzymanie struktur stanowiących rezerwuar aktywnych peptydów, uwalnianych pod wpływem enzymów proteolitycznych. Zaproponowane fibryle peptydowe w założeniu powinny umożliwić osiągnięcie długotrwałego efektu terapeutycznego bez konieczności integracji z matrycą chitozanową. Przeprowadzenie charakterystyki

fizykochemicznej otrzymanych fibryli, obejmującej testy agregacyjne oraz analizy strukturalne i mikroskopowe.

5. Opracowanie trzech typów koniugatów składających się z chitozanu, pochodnej maleimidoaminokwasu oraz wyselekcjonowanych peptydów (Rysunek 29).



Rysunek 29. Schematy poglądowe przygotowanych przeze mnie koniugatów: I. chitozan z kowalencyjnie przyłączonym peptydem ug4, II. chitozan wymieszany z peptydem ug51, III. chitozan z fibrylami peptydowymi ug52

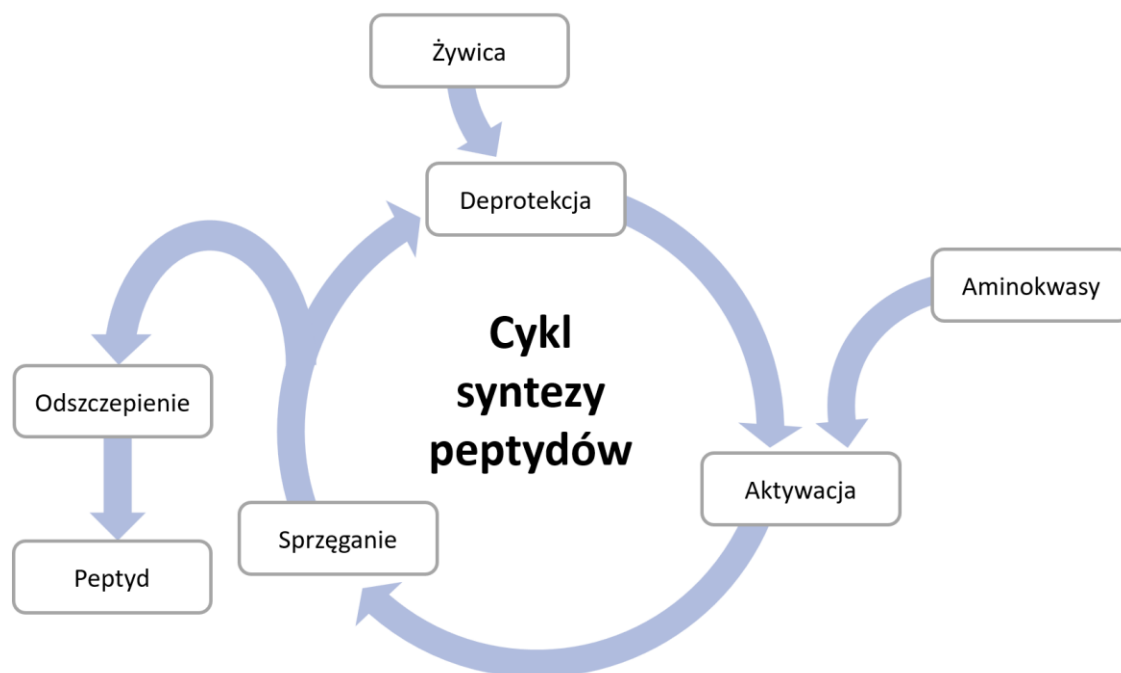
6. Charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna kompozytów chitozanowo-bioszklanych (1–9) o właściwościach proregeneracyjnych, przeznaczonych do odbudowy tkanki kostnej wraz z badaniami nad uwalnianiem aktywnego peptydu z macierzy kompozytowej.

III. MATERIAŁY I METODY

1. Synteza peptydów

1.1 Synteza peptydów przy użyciu automatycznego syntezatora

Syntezę peptydów przeprowadziłam na nośniku stałym, stosując metodologię syntezy peptydów na nośniku stałym (SPPS – ang. *Solid Phase Peptide Synthesis*) z wykorzystaniem strategii Fmoc (Rysunek 30).



Rysunek 30. Schemat syntezy peptydów na nośniku stałym. Proces syntezy przebiega cyklicznie i obejmuje deprotekcję, aktywację, sprzęganie oraz końcowe odszczepienie peptydu od żywicy. Deprotekcja usuwa grupę ochronną z wolnej grupy aminowej, aktywacja przygotowuje kolejny aminokwas do reakcji, a sprzęganie umożliwia utworzenie wiązania peptydowego. Po zakończeniu cyklu syntezy peptyd jest odłączany od nośnika.

Do realizacji procesu użyłam automatycznego syntezatora mikrofalowego Liberty Blue (CEM Corporation), pracującego w atmosferze azotu, co umożliwiało ciągły przepływ reagentów i zapewniało optymalne warunki reakcyjne. Standardowe sprzęganie prowadziłam używając 4 eq Fmoc–aminokwasu, 4 eq DIC oraz 4 eq Oxyma pure w stosunku do stopnia modyfikacji nośnika stałego. Standardowo stosowałam pojedyncze sprzęganie, jednak podczas dołączania Fmoc–Arg(Pbf)–OH zastosowałam podwójne

sprzęganie, aby zwiększyć efektywność reakcji. W przypadku sekwencji aminokwasowych, dla których uzyskiwałam niską wydajność, wprowadziłam dodatkowe cykle sprzęgania, polegające na podwójnym sprzęganiu każdego aminokwasu. Do deprotekcji stosowałam 20% roztwór piperydyny w DMF.

Syntezę prowadziłam w trzech skalach reakcyjnych: 0,1 mmol, 0,25 mmol oraz 1,0 mmol. Do syntez na małą skalę (0,1 mmol) wykorzystywałam żywicę Rink Amide ProTide Resin o stopniu modyfikacji 0,21 mmol/g, natomiast do syntez na większą skalę (0,25 mmol i 1,0 mmol) stosowałam żywicę Rink Amide ProTide Resin o wyższym stopniu modyfikacji, wynoszącym 0,59 mmol/g. Przy przejściu do większej skali syntezy (1,0 mmol) dostosowywałam także objętość naczynka reakcyjnego w syntezaorze Liberty Blue, stosując większy reaktor (125 ml).

Proces syntezy przebiegał cyklicznie, w następujących etapach. W ramach każdego cyklu najpierw następowała deprotekcja grupy Fmoc z grupy aminowej na nośniku stałym, z wykorzystaniem 20% roztworu piperydyny w DMF, wspomagana promieniowaniem mikrofalowym. Po zakończeniu tego etapu żywica była automatycznie odsączana i czterokrotnie przemywana DMF. W kolejnym kroku urządzenie przeprowadzało reakcję sprzęgania, podczas której dołączano kolejne *N*-chronione aminokwasy używając DIC jako czynnika aktywującego oraz Oxyma Pure jako dodatku zapobiegającego racemizacji. Ilość każdego aminokwasu stosowałam w czterokrotnym nadmiarze względem stopnia modyfikacji żywicy. Cały cykl sprzęgania był również wspomagany promieniowaniem mikrofalowym, co znacząco zwiększało efektywność reakcji oraz skracało jej czas trwania.

Dodatkowo wprowadzałam przerywany strumień gazu obojętnego (azotu) do komory reakcyjnej, którego interwały (np. 6 sekund włączony / 2 sekundy wyłączony) dostosowywałam do skali syntezy. Działanie to pełniło funkcję wspomagającą:

- Faza przepływu gazu (ON): wprowadzenie strumienia azotu ułatwiało równomierne mieszanie reagentów, zwiększało dostępność aktywnego czynnika sprzęgającego oraz ograniczało ryzyko racemizacji.
- Faza bez przepływu gazu (OFF): wstrzymanie przepływu pozwalało na stabilizację warunków reakcyjnych, kontrolę ciśnienia w komorze oraz koncentrację reagentów w miejscu reakcji.

Po zakończeniu każdego cyklu sprzęgania syntezy automatycznie odsącał peptydylożywicę i inicjował kolejny etap deprotekcji grupy Fmoc, wykorzystując te same warunki mikrofalowe co wcześniej. Parametry poszczególnych etapów syntezy, takie jak czas reakcji, temperatura oraz czas przepływu gazu obojętnego, były dostosowywane do skali syntezy i zostały zestawione w Tabeli 5.

Po zakończeniu syntezy przenosiłam peptydylożywicę na lejek Schotta, a następnie przemywałam ją czterokrotnie DMF i trzykrotnie metanolem w celu usunięcia pozostałości reagentów i rozpuszczalników.

Tabela 5. Warunki zastosowane w poszczególnych etapach z podziałem na skalę syntezy.

Skala		Sprzęganie	Deprotekcja	Przemywanie
0,1	Reagenty	DIC 0,5M Oxyma Pure 1M Aminokwasy 0,2M	20% roztwór piperydyny w DMF	DMF
	Warunki	Standardowe: 175W/15sek w 75°C 30W/230sek w 90°C Przepływ gazu ON 2sek/ OFF 3sek Reszty cysteiny: 0W/120sek w 25°C 24W/480sek w 50°C	150W/35sek w 70°C 30W/90sek w 89°C	4-krotne przemywanie nośnika stałego
0,25	Reagenty	DIC 0,5M Oxyma Pure 1M Aminokwasy 0,2M	20% roztwór piperydyny w DMF	DMF
	Warunki	175W/15sek w 75°C 30W/230sek w 90°C Przepływ gazu ON 2sek/ OFF 3sek Reszty cysteiny: 0W/120sek w 25°C 24W/480sek w 50°C	150W/35sek w 70°C 30W/90sek w 89°C	4-krotne przemywanie nośnika stałego
1,0	Reagenty	DIC 1M Oxyma Pure 1M Aminokwasy 0,4M	20% roztwór piperydyny w DMF	DMF
	Warunki	150W/25sek w 70°C 30W/575sek w 90°C Przepływ gazu ON 6sek/ OFF 2sek Reszty cysteiny: 0W/120sek w 25°C 80W/900sek w 50°C	155W/25sek w 70°C 30W/245sek w 90°C	przemywanie całego kolektora i 4-krotne przemywanie nośnika stałego

1.2 Odszczepianie peptydów od nośnika

Po zakończeniu syntezy przeprowadziłam reakcję odszczepienia peptydu od nośnika, połączoną z usunięciem grup ochronnych z łańcuchów bocznych aminokwasów. Mieszanina reakcyjna składała się z kwasu trifluorooctowego (TFA), fenolu, wody, 1,2–

etanoditiolu (EDT) oraz triizopropylsilanu (TIPS) w proporcjach 91,5:5:5:2,5:1 (v:v:v:v:v). Na 1 g żywicy użyłam 10 ml tej mieszaniny. Otrzymaną zawiesinę wytrząsałam przez 3 godziny, a następnie odsączałam żywicę od roztworu przy użyciu lejka Schotta pod zmniejszonym ciśnieniem. Peptyd wytrącałam eterem dietylowym i wirowałam przez 15 minut w temperaturze 4°C przy prędkości 4000 rpm. Po tym czasie, peptyd oddzielałam od fazy eterowej poprzez dekantację. Osad peptydu ponownie zawieszałam w eterze i wirowałam, aby usunąć pozostałe zanieczyszczenia. Czynność tę powtarzałam trzykrotnie dla każdego z peptydów. Po odparowaniu resztek eteru, peptyd rozpuszczałam w wodzie i zliofilizowałam, uzyskując suchy produkt końcowy.

2. Oczyszczanie peptydów

Dla każdego z peptydów dobrałam warunki oczyszczania (warunki izokratyczne doбираłam z uwzględnieniem gradientu aż do konkretnego stężenia), wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych (RP-HPLC – ang. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) z detektorem rozproszenia światła ELSD (ang. *Evaporative Light Scattering Detector*) LTII (Shimadzu). W analizach stosowałam kolumnę analityczną Kromasil C8 (Nouryon) 5 µm, 100 Å, 4,6 mm × 250 mm (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 1).

Proces zasadniczego oczyszczania peptydów przeprowadziłam metodą RP-HPLC, wykorzystując układ półpreparatywny złożony z dwóch pomp (K1001), detektora UV (K-2001) sprzężonego z kolektorem frakcji firmy Gilson, wyposażony w kolumnę Jupiter Proteo C8 (Phenomenex), 4 µm, 90 Å, 21,2 mm × 250 mm. Rozdział chromatograficzny prowadziłam w gradiencie liniowym lub w układzie izokratycznym, przy zastosowaniu układu fazy ruchomej: A = 0,1M kwas octowy, 0,1M octan amonu w wodzie; B = 65% acetonitryl w 0,1M kwasie octowym i 0,1M octanie amonu w wodzie (v:v). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1,0 ml/min. Detekcję prowadziłam z wykorzystaniem detektora UV przy długości fali $\lambda = 223$ nm. (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 2).

Do oznaczenia czystości oczyszczonego peptydu wykorzystałam RP-HPLC (Nexera X2, Shimadzu), stosując analityczną kolumnę Kinetex C8 (Phenomenex), 2,6 µm, 100 Å, 2,1 mm × 100 mm. Objętościowe natężenie przepływu wynosiło 0,5 ml/min. Eluenty: A =

0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie (v:v); B = 80% acetonitryl w 0,1% kwasie trifluorooctowym w wodzie (v:v) (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3).

W celu potwierdzenia masy cząsteczkowej otrzymanego peptydu wykonałam analizę spektrometrii mas widma masowego MALDI–TOF (ang. *Matrix–Assisted Laser Desorption/Ionization Time–of–Flight*) przy użyciu spektrometru Bruker Briflex III MALDI–TOF (Bruker Daltonics).

3. Badanie stabilności peptydów

W celu oceny stabilności peptydów zarówno podczas badań ich właściwości biologicznych, jak i w trakcie procesów produkcyjnych docelowych kompozytów, przeprowadziłam szereg eksperymentów w różnych warunkach środowiskowych. Analiza stabilności peptydów pozwoliła na określenie ich trwałości oraz przydatności do dalszych zastosowań w badanych kompozytach.

3.1 Badanie stabilności peptydów w wodzie

Badania stabilności peptydów w wodzie polegały na inkubacji peptydu o stężeniu 100 μ M przez 24 godziny w temperaturze 37°C, przy ciągłym mieszaniu orbitalnym (300 rpm). Stabilność peptydów badałam w następujących punktach czasowych 0, 1, 2, 3, 6, 24 godziny

w trzech powtórzeniach biologicznych.

Analizę ilościową przeprowadzałam za pomocą systemu HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 1, Eluenty II). Na podstawie chromatogramów uzyskanych w poszczególnych punktach czasowych, odczytałam pole powierzchni pod odpowiednim pikiem, reprezentujące ilość peptydu w próbce w danym czasie. Wartości powierzchni zostały znormalizowane względem wartości początkowej ($t = 0$ h), którą przyjął jako 100%. Takie podejście pozwoliło na monitorowanie zmian w ilości peptydu w trakcie trwania eksperymentu. Wyniki przedstawiłam w formie wykresów słupkowych, obrazujących zależność pozostałej ilości peptydu [%] od czasu inkubacji [h].

3.2 Badanie stabilności peptydów w pożywce

W celu oceny stabilności peptydów w środowisku hodowlanym, roztwór peptydu o stężeniu 100 μ M inkubowałam w pożywce DMEM /F–12 (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F–12 Nutrient Mixture*) z dodatkiem 10% płodowej surowicy

bydłęcej FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) przez 24 godziny, w próbkach typu Eppendorf, w temperaturze 37 °C, przy ciągłym mieszaniu orbitalnym (300 rpm). Stabilność peptydów badałam w następujących punktach czasowych: 0, 1, 2, 3, 6 i 24 godziny.

Po zakończeniu inkubacji próbki przenosiłam do zamrażarki o temperaturze –90 °C. Następnie rozmrażałam je w kontrolowanych warunkach, umieszczając każdą próbkę na lodzie na 1 godzinę. Po rozmrożeniu do każdej z próbek dodałam 1 ml etanolu i dokładnie mieszałam zawartość (vortexowanie). Probki wirowałam przez 20 minut (18000 rpm) w temperaturze 4 °C. Zebrany supernatant przenosiłam do nowych probówek wirówkowych i odparowywałam w koncentratorze próżniowym SpeedVac, aż do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika.

Skoncentrowane próbki rozpuszczałam w 200 µl fazy A (0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie) oraz 50 µl fazy B (0,1% kwas trifluorooctowy w 80% acetonitrylu w wodzie; v/v). Tak przygotowane próbki przenosiłam do wialek chromatograficznych i analizowałam za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 1, Eluenty II). Dla uzyskanych wyników w poszczególnych punktach czasowych zmierzyłam powierzchnię pod pikami chromatograficznymi, odpowiadającą ilości pozostałego peptydu. Wyniki przedstawiłam w formie wykresów słupkowych, które ilustrują zależność zawartości pozostałego peptydu [%] od czasu inkubacji [h].

4. Trawienie enzymatyczne peptydów z wykorzystaniem metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej 7 (MMP-7)

Pierwszym etapem eksperymentu było wyznaczenie odpowiedniej ilości enzymu, którą należy użyć, aby peptyd ulegał skutecznemu trawieniu enzymatycznemu. Peptydy zawierały sekwencje specyficzną dla MMP-7. W tym celu przeprowadziłam szereg doświadczeń wykorzystując komercyjnie zakupiony substrat o stężeniu 0,1 mg/ml (MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂·TFA, M = 1093.15, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Substrat inkubowałam z dodatkiem enzymu w objętościach 1,0 µl; 0,5 µl; 0,25 µl oraz 0,125 µl w temperaturze 37°C przez 15, 30, 45 oraz 60 minut. Na podstawie kinetyki hydrolizy wyznaczyłam molowy stosunek enzymu do substratu (1:365,6), przy którym

zachodzi specyficzna degradacja enzymatyczna wiązania peptydowego między resztami glicyny (G) i leucyny (L) w sekwencji PLGL.

Następnie peptydy **ug4**, **ug51** i **ug52** poddałam inkubacji w obecności enzymu MMP-7. W eksperymencie wykorzystałam stosunek molowy enzym: substrat wynoszący 1:365,6. Proces inkubacji prowadziłam przez godzinę w temperaturze 37°C, przy ciągłym mieszaniu orbitalnym (300 rpm). Próbkę pobierałam w następujących punktach czasowych 0, 15, 30, 60 minut. Do każdej z pobranych próbek, w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej, dodawałam 10% roztwór kwasu trifluorooctowego (tak, aby końcowe stężenie TFA w próbce wynosiło 0,2%).

Wyniki eksperymentu analizowałam z zastosowaniem RP-HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3). Dodatkowo próbki analizowałam z użyciem spektrometru masowego MALDI-TOF Bruker Bruker Daltonics (model Bruker Briflex III).

5. Synteza estru aktywnego maleimidoglicyny (ester *N*-hydroksysukcynimidowy kwasu aminooctowego)

Syntezę estru aktywnego maleimidoglicyny (Mal-Gly-NHS) z wykorzystaniem *N*-hydroksysukcynimidu (NHS) i *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), wykonałam metodą karbodiimidową, zgodnie z procedurą zawartą w publikacji O. Nielsen i O. Buchardt [190]. Do kolby reakcyjnej (250 ml) odważyłam maleimidoglicynę (2,0 g, 12,97 mmol) oraz NHS (1,56 g, 13,55 mmol), po czym dodałam 20 ml acetonitrylu (ACN). Mieszaninę schłodziłam do temperatury 0–4°C, po czym porcjami dodawałam DCC (2,6 g, ok. 12,6 mmol) przez około 3–4 godziny. Po całkowitym dodaniu DCC, kontynuowałam reakcję w temperaturze pokojowej przez kolejne 24 godziny.

Po zakończeniu reakcji odsączałam powstały osad (dicykloheksylomocznik) na lejku Schotta i pozostawiłam go do wyschnięcia na powietrzu. Ze względu na możliwość obecności produktu w przesączu, przeprowadziłam proces zatężania przesączu i wytrącenia osadu za pomocą eteru dietylowego. Otrzymany drugi osad również odsączałam i pozostawiłam do wyschnięcia.

Identyfikację otrzymanego produktu przeprowadziłam z wykorzystaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR – ang. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) za pomocą spektrometru FTIR Jasco 4700 w zakresie 4000–500 cm⁻¹ z wykorzystaniem przystawki ATR z kryształem diamentowym oraz metodą spektroskopii

protonowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR – ang. *Proton Nuclear Magnetic Resonance*), rejestrując widmo w DMSO- d_6 (99.9% D) w temperaturze 30 °C na spektrometrze Bruker AVANCE III (500 MHz). Czystość i wydajność otrzymanego estru oceniłam za pomocą HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3).

6. Modyfikacja chitozanu przy użyciu estru *N*-hydroksysukcynimidowego maleimidoglicyny (Mal-Gly-NHS)

Celem przeprowadzonych eksperymentów było kowalencyjne przyłączenie maleimidoglicyny do chitozanu poprzez reakcję grup aminowych z aktywowanym estrem *N*-hydroksysukcynimidowym (Rysunek 31).

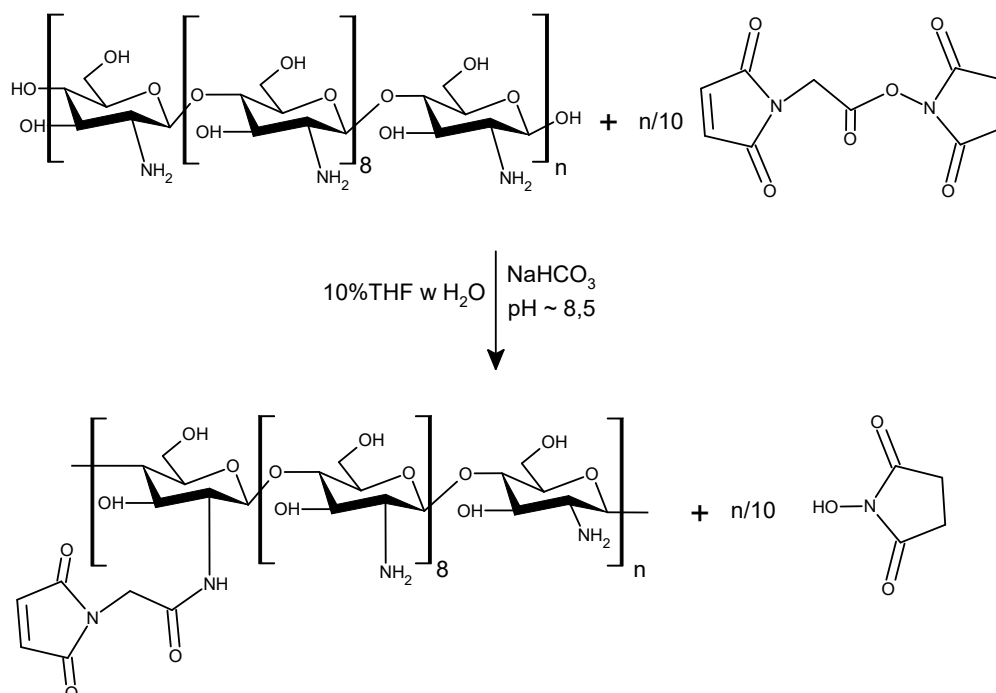
Do syntezy wybrałam chitozan 95/2000 firmy HMC+ (Heppe Medical Chitosan), charakteryzujący się stopniem deacetylacji powyżej 92,6% ($\text{DD} \geq 92,6\%$) oraz lepkością dynamiczną mieszczącą się w przedziale 2000 (1751–2250 mPas) Chitozan zawiesiłam w gorącej wodzie i mieszałam przy użyciu mieszadła magnetycznego lub sonikacji, aż mieszanina osiągnęła temperaturę pokojową i uzyskałam konsystencję jednorodnej zawiesiny.

Następnie, przygotowałam do reakcji ester aktywny maleimidoglicyny (Mal-Gly-OSu – aktywny ester *N*-hydroksysukcynimidowy). Związek ten zawiesiłam w tetrahydrofuranie (THF) poddałam 15-minutowej sonikacji, aby ułatwić jego rozpuszczenie. Po tym czasie dodałam wodę w proporcji THF:H₂O = 3:2, tak aby końcowe stężenie THF w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 10% (v:v).

Gotowy roztwór estru aktywnego dodałam do zawiesiny chitozanu. Całą mieszaninę intensywnie mieszałam przez 20 minut, stosując mieszadło magnetyczne lub sonikację. Następnie doprowadziłam pH do wartości 8,5, dodając wodorowęglan sodu (NaHCO₃). Mieszaninę pozostawiłam na 24 godziny w temperaturze pokojowej, przy ciągłym mieszaniu.

Po zakończeniu reakcji modyfikowany chitozan odsączałam na lejku Schotta lub z użyciem zestawu do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem z wymiennymi filtrami. Następnie, materiał przemyłam bardzo zimną wodą, używając około 1000 ml wody na 1 g chitozanu, w celu usunięcia nieprzereagowanych reagentów. Oczyszczony materiał poddałam liofilizacji.

Metoda ta była wielokrotnie optymalizowana – testowałam różne proporcje reagentów oraz warunki reakcji. Szczegóły procesu optymalizacji zostały opisane w części doświadczalnej, Rozdział IV.I.11 oraz w Załączniku 2. Próbkę oznaczono według schematu: CH–m X.Y, gdzie: CH – chitozan, m – symbol wskazujący na fakt, że materiał został zmodyfikowany (przez przyłączenie kwasu 2–maleimidooctowego), X – numer procedury modyfikacji (określonej zestawem warunków reakcyjnych), Y – numer kolejnej syntezy wykonanej z użyciem danej procedury. Na przykład próbka oznaczona jako CH–m 2.2 odnosi się do drugiej syntezy wykonanej zgodnie z procedurą nr 2 modyfikacji chitozanu kwasem 2–maleimidooctowym.



Rysunek 31. Reakcja chemicznej modyfikacji chitozanu z wykorzystaniem aktywowanego estru maleimidoglicyny (Mal–Gly–OSu). Grupy aminowe chitozanu reagują z estrem *N*–hydroksysukcynimidowym, prowadząc do kowalencyjnego przyłączenia reszty maleimidoglicyny do łańcucha polimerowego oraz uwolnienia *N*–hydroksysukcynamidu jako produktu ubocznego.

7. Modyfikacja chitozanu z użyciem peptydu ug4

7.1 Modyfikacja chitozanu CH–m4.1 poprzez sprzężanie z peptydem ug4

200 mg chitozanu CH–m4.1 (chitozan modyfikowany zgodnie z procedurą 4, synteza 1 – dokładne wyjaśnienie oznaczenia CH–m4.1 znajduje się w rozdziale Badania Własne IV.I.11), zmodyfikowanego w około 10% grupami pochodnej maleimidoglicyny,

umieściłam w kolbie okrągłodennej (250 ml), po czym dodałam 75 ml wody dejonizowanej.

W osobnej probówce typu Falcon odważyłam 190 mg peptydu **ug4** i rozpuściłam go w 20 ml wody dejonizowanej. Następnie roztwór peptydu dodawałam stopniowo do zawiesiny zmodyfikowanego chitozanu, kontrolując pH mieszaniny i doprowadzając je do wartości około 8,0 za pomocą roztworu wodorowęglanu sodu (NaHCO_3).

Po ustabilizowaniu pH, w celu zminimalizowania utleniania wolnej grupy tiolowej cysteiny, zabezpieczyłam kolbę balonem wypełnionym argonem. Reakcję prowadziłam przez 24 godziny w warunkach nieprzerwanego mieszania magnetycznego.

Powstały produkt – koniugat CH–m4.1–ug4 – oddzieliłam metodą filtracji próżniowej na lejku Schotta z sączkiem (ilościowy średni), dodatkowo wykorzystałam metodę wirowania. Mieszaninę reakcyjną wirowałam pięciokrotnie w probówkach Falcon (100 ml) w temperaturze 4 °C, przy prędkości 9000 rpm. Po każdym wirowaniu usuwałam supernatant i uzupełniałam wodą dejonizowaną, celem oczyszczenia produktu z pozostałości niezwiązanego peptydu i reagentów. Oczyszczony materiał poddałam procesowi liofilizacji

7.2 Modyfikacja chitozanu CH–m4.4 poprzez sprzęganie z peptydem ug4

Zważyłam 3,2g chitozanu CH–m4.4 (chitozan modyfikowany zgodnie z procedurą 4, synteza 4 – Rozdział Badania Własne IV.I.11), o stopniu modyfikacji pochodną maleimidoglicyny wynoszącym około 10% i przenieśliśmy do kolby okrągłodennej o pojemności 2 litrów, po czym dodałam 850 ml wody dejonizowanej. W osobnej kolbie przygotowałam roztwór 3,0 g peptydu **ug4** w 200 ml wody dejonizowanej. Otrzymany roztwór dodawałam powoli do zawiesiny zmodyfikowanego chitozanu, kontrolując odczyn pH i doprowadzając mieszaninę do wartości około 8,0 przy użyciu roztworu wodorowęglanu sodu (NaHCO_3). Po ustabilizowaniu pH założyłam na szyjkę kolby balon wypełniony argonem, w celu zabezpieczenia reakcji przed utlenianiem wolnych grup tiolowych cysteiny. Reakcję prowadziłam przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, pod stałym mieszaniem magnetycznym.

Po 24 godzinach odsączyłam produkt reakcji używając zestawu do filtracji próżniowej z sączkiem membranowym (Millipore, PES, porowatość 0,22 μm). Następnie, modyfikowany chitozan przemyłam zimną wodą, używając około 1000 ml wody na 1 g

modyfikowanego chitozanu – w celu usunięcia nieprzereagowanych reagentów. Oczyszczony materiał poddałam procesowi liofilizacji.

8. Analiza aminokwasów metodą chromatograficzną z derywatyzacją przedanalityczną

Aminokwasy należą do grupy związków silnie polarnych, co uniemożliwia ich skuteczną separację przy użyciu konwencjonalnych technik wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) lub chromatografii gazowej (GC), bez uprzedniej modyfikacji chemicznej.

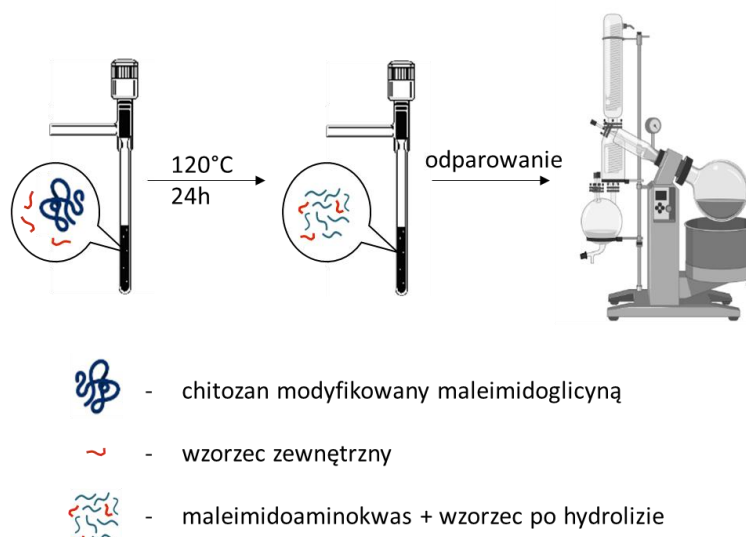
Ze względu na niską lotność oraz brak naturalnych chromoforów, ich bezpośrednia detekcja jest znacznie utrudniona. W związku z tym najczęściej stosowaną strategią analityczną jest derywatyzacja przedanalityczna, która zwiększa lotność, hydrofobowość oraz właściwości spektroskopowe analizowanych cząsteczek. W większości przypadków stosowane odczynniki derywatyzujące reagują z grupami aminowymi aminokwasów, umożliwiając ich efektywną separację i detekcję metodami chromatograficznymi.

8.1 Przygotowanie próbki do analizy aminokwasowej – hydroliza kwasowa

W celu wykonania analizy aminokwasowej przeprowadziłam hydrolizę kwasową próbki modyfikowanego chitozanu. Około 5 mg próbki umieściłam w naczyniu do hydrolizy próżniowej Schlenka (Thermo Scientific Pierce Vacuum Hydrolysis Tube, 1 ml).

W kolbie miarowej przygotowałam roztwór wzorca wewnętrznego, przygotowując 0,1 M roztwór norleucyny (Nle) w 6 M roztworze HCl. Do próbki chitozanu CH–Mal–Gly dodałam 1 ml 6 M HCl oraz odpowiednią ilość roztworu Nle, obliczoną tak, aby zawarta w niej masa norleucyny odpowiadała przewidywanej zawartości glicyny (Gly) w analizowanej próbce.

Tak przygotowaną próbkę poddałam hydrolizie w temperaturze 120 °C przez 24 godziny, prowadzonej w termobloku. Po zakończeniu hydrolizy, przy użyciu szklanej pipety Pasteura, przeniosłam próbkę do kolby sercowej o pojemności 25 ml. Następnie dodałam niewielką ilość toluenu i usunęłam nadmiar kwasu solnego poprzez odparowanie w warunkach próżniowych przy użyciu wyparki rotacyjnej (Rysunek 32).



Rysunek 32. Schematyczny przebieg hydrolizy kwasowej próbki modyfikowanego chitozanu (CH-Mal-Gly): zakwaszenie, inkubacja, usunięcie nadmiaru HCl w wyparce rotacyjnej.

8.2 Derywatyizacja

Chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją optyczną stanowi powszechnie wykorzystywaną technikę w oznaczaniu aminokwasów. W praktyce analitycznej stosuje się dwa główne podejścia: (1) chromatografię jonowymienną z pokolumnową derywatyzacją oraz (2) derywatyzację przedkolumnową, po której następuje rozdział w układzie RP-HPLC.

Jednym z najczęściej stosowanych odczynników derywatyzyjnych jest aldehyd ortoftalowy (OPA), który znajduje zastosowanie zarówno w konfiguracjach pokolumnowych (po chromatografii kationowymiennej), jak i przedkolumnowych (przed analizą RP-HPLC). OPA reaguje ze związkami zawierającymi grupy aminowe w obecności związków tiolowych, takich jak β -merkaptioetanol lub kwas 3-merkaptopropionowy (3-MPA), prowadząc do powstania fluorescencyjnych pochodnych izoindolowych. Produkty reakcji mogą być wykrywane spektrofotometrycznie ($\lambda = 340$ nm), fluorometrycznie ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm) lub za pomocą metod elektrochemicznych (np. amperometrii w przypadku słabo fluorescencyjnych pochodnych) [19, 189]. Derywatyzację przeprowadziłam na podstawie warunków opisanych w literaturze [191, 192]. Jako rozpuszczalnik aminokwasów zastosowałam roztwór 0,2 M tetraboranu sodu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) w 80% metanolu. Roztwór ten przygotowałam, rozpuszczając 378,3 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ w 50 ml wody dejonizowanej (pH 9,5), a następnie zmieszałam 40 ml

roztworu buforowego z 160 ml metanolu i mieszałam przez 10 minut w temperaturze pokojowej.

Roztwór OPA przygotowałam do stężenia 8 mM, rozpuszczając 1,07 mg OPA w 1 ml wody dejonizowanej i poddając roztwór krótkiej sonikacji. Do tej samej próbówki dodałam 2,5 mg kwasu 3–merkaptopropionowego (stężenie końcowe 24 mM). Roztwór OPA/3–MPA przygotowywałam świeżo każdego dnia, bezpośrednio przed analizą, w celu zachowania pełnej reaktywności reagentów.

Optymalizację warunków reakcji przeprowadziłam, testując różne proporcje składników derywatyzujących, jak przedstawiłam w Tabeli 6. Końcowe pH próbek po derywatyzacji wynosiło 7,0. Wyniki analizowałam za pomocą chromatografii cieczowej RP–HPLC, stosując długość fali detekcji 340 nm (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3). Stosowane układy fazy ruchomej (eluenty):

1. A = 0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie (v:v), B = 80% acetonitryl w 0,1% kwasie trifluorooctowym w wodzie (v:v);
2. A = 0,1M kwas octowy, 0,1M octan amonu w wodzie, B = 65% metanol w 0,1M kwasie octowym, 0,1M octan amonu w wodzie;
3. A = 0,1M kwas octowy, 0,1M octan amonu w wodzie, B = 45% metanol w 0,1M kwasie octowym, 0,1M octanie amonu w wodzie

Tabela 6. Zestawienie warunków derywatyzacji glicyny i standardów aminokwasowych z zastosowaniem OPA i 3–MPA.

Lp.	Stężenie derywatyzowanej próbki	Stężenie OPA	Stężenie 3–MPA
1.	20–100 μmol Gly	4 mmol	12 mmol 3–MPA
2.	200–1000 μmol Gly	4 mmol OPA	12 mmol 3–MPA
3.	200–1000 μmol Gly	40 mmol OPA	120 mmol 3–MPA
4.	0,25 μmol Gly	4 mmol OPA	12 mmol 3–MPA
5.	0,45 μmol standardu aminokwasowego	7,2 mmol OPA	14,4 mmol 3–MPA
6.	4,5 μmol standardu aminokwasowego	7,2 mmol OPA	14,4 mmol 3–MPA

Po zoptymalizowaniu proporcji reagentów w procedurze derywatyzacji przystąpiłam do oznaczenia produktów hydrolizy chitozanu zmodyfikowanego pochodną

maleimidoglicyny (CH–Mal–Gly). Jako wzorzec wewnętrzny zastosowałam norleucynę, a samą hydrolizę przeprowadziłam zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 8.1. Po zakończeniu etapu odparowania kwasu solnego, do suchej próbki dodałam około 1 ml buforu zawierającego tetraboran sodu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) w celu ustabilizowania pH na poziomie 7,0 (końcowe warunki derywatyzacji). Następnie próbkę sonikowałam przez 2 minuty, aby zapewnić jednorodność mieszaniny przed dalszą analizą.

8.3 Zastosowanie chromatografii HILIC w analizie stopnia modyfikacji chitozanu

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC – ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) opiera się na zastosowaniu polarnej fazy stacjonarnej, takiej jak krzemionka, fazy amidowe, hydroksylowe, cyjanoaminowe lub jonowymienne, w połączeniu z rozpuszczalnikami typowymi dla chromatografii w układzie faz odwróconych (RP–HPLC). Technika ta umożliwia skuteczny rozdział związków o wysokiej polarności. Elucję prowadzi się w układzie gradientowym, rozpoczynając od wysokiego udziału rozpuszczalnika organicznego (najczęściej acetonitrylu), a następnie zwiększając udział frakcji wodnej w fazie ruchomej, co prowadzi do wymywania zatrzymanych analitów.

Langrock i współautorzy opracowali metodę umożliwiającą separację 16 aminokwasów proteinogennych w czasie 25 minut, z wykorzystaniem kolumny amidowej sprzężonej z detekcją w układzie spektrometrii mas z jonizacją elektrosprejem i tandemową analizą mas (ESI–MS/MS). Detekcja opierała się na monitorowaniu neutralnej utraty cząsteczki kwasu mrówkowego [193].

Zastosowana metoda umożliwiła rozdział wszystkich izomerów hydroksyproliny obecnych w hydrolizatach kolagenu, przy granicach wykrywalności poniżej 50 pmol. Chromatografię HILIC wykorzystałam do oceny stopnia modyfikacji chitozanu pochodną maleimidoaminokwasu oraz sprzężonym peptydem.

8.3.1 Analiza stopnia podstawienia chitozanu pochodną maleimidoaminokwasu metodą chromatografii HILIC

W celu potwierdzenia stopnia podstawienia chitozanu pochodną maleimidową, przeprowadziłam reakcję hydrolizy próbki modyfikowanego chitozanu, zgodnie z procedurą w punkcie 8.1. Otrzymaną próbkę, odparowaną do sucha, rozpuściłam w 1 ml

eluentu A: 0,5 M mrówczan amonu / 0,5 M kwas mrówkowy / 90% acetonitryl w wodzie (1:1/ v:v).

Analizy próbek po hydrolizie przeprowadziłam za pomocą chromatografii cieczowej RP–HPLC (Nexera X2, Shimadzu) z użyciem kolumny bioZen Glycan (Phenomenex) 2,6 µm, 100 Å, 2,1 mm × 150 mm.

Objętościowe natężenie przepływu wynosiło 0,25 ml/min. Zastosowane eluenty: A: 0,5 M mrówczan amonu, 0,5 M kwas mrówkowy, 90% acetonitryl w wodzie (v:v); B: mrówczan amonu, 0,5M kwas mrówkowy, 75% acetonitryl w wodzie (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 4). Do analizy zastosowałam liniowy gradient 0–100% B w ciągu 45 minut. Hydrolizy wykonałam w trzech powtórzeniach technicznych (próbki po 5 mg chitozanu). Dla każdej próbki wykonałam trzy niezależne analizy chromatograficzne.

Stosunek pól powierzchni pod pikami glicyny (oznaczany aminokwas) i norleucyny (wzorzec wewnętrzny) wyznaczałam na jednym wspólnym chromatogramie i porównywałam z odpowiadającym mu stosunkiem uzyskanym z krzywej wzorcowej, sporządzonej w identycznych warunkach.

1. Obliczenie teoretycznej zawartości glicyny (Gly) w Mal–Gly–OSu:

$$\% Gly = \times 100\%$$

gdzie:

- $M_{Gly} = 75 \text{ g/mol}$
- $M_{Mal-Gly-OSu} = 261 \text{ g/mol}$

czyli: $\% Gly \approx 28,7\%$

Jeśli do syntezy użyto masy $m_{Mal-Gly-OSu}$, to masa odpowiadającej jej glicyny wynosi:

$$m_{Gly} = \%Gly \times m_{Mal-Gly-OSu}$$

2. Przygotowanie próbki do hydrolizy:

Dla każdej próbki chitozanu po syntezie oblicz:

$$m_{Gly, \text{hydroliza}} = \text{teoretyczna zawartość Gly w próbce} = \%Gly \times m_{\text{próbki}}$$

Norleucyna (Nle) – wzorzec wewnętrzny: przygotowanie 0,1M roztwór stosując 0,1312g Nle w kolbie miarowej 10 ml

Do każdej próbki należy dodać ilość Nle odpowiadającą masie Gly w tej próbce

$$m_{Nle} = m_{Gly, \text{hydroliza}}$$

3. Obliczanie stopnia modyfikacji:

$$\text{Stopień modyfikacji (\%)} = \times 100\%$$

Stosunki te wyznacza się na podstawie powierzchni pod pikami na chromatogramach HPLC.

8.3.2 Analiza stopnia podstawienia chitozanu peptydem

Dla prób chitozanu sprzężonego z peptydem zastosowałam analogiczną metodę. Po hydrolizie (zgodnie z pkt 8.1), próbkę odparowaną do sucha rozpuściłam w 1 ml eluentu A (jak wyżej). Analizy prowadzono z identycznym gradientem i parametrami HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 4).

Hydrolizę wykonałam w trzech powtórzeniach technicznych (próbki po 10 mg chitozanu). Dla każdej z próbek wykonałam trzy niezależne analizy chromatograficzne. Jako aminokwas wskaźnikowy posłużyła leucyna (obecna dwukrotnie w sekwencji peptydu ug4), natomiast wzorcem wewnętrznym była lizyna. Stosunek pola powierzchni pod pikami leucyny i lizyna wyznaczałam na jednym wspólnym chromatogramie i porównywałam z odpowiadającym mu stosunkiem uzyskanym z krzywej wzorcowej, sporządzonej w identycznych warunkach chromatograficznych.

Ilość wzorca wewnętrznego, przeliczałam tak, aby masa dodanej lizyny była równa spodziewanej masie jednego z aminokwasów zawartych w przyłączanym peptydzie (leucyna) zawartym w próbce.

Obliczenie teoretycznej zawartości leucyny (Leu) w peptydzie **ug4**:

$$\% Leu = \times 100\%$$

gdzie:

- $M_{Leu} = 131 \text{ g/mol}$
- $M_{ug4} = 982 \text{ g/mol}$

czyli: $\% Leu \approx 26,7\%$

Jeśli do syntezy użyto masy m_{ug4} , to masa odpowiadającej jej leucyny wynosi:

$$m_{Leu} = \%Leu \times m_{ug4}$$

4. Przygotowanie próbki do hydrolizy:

Dla każdej próbki chitozanu po syntezie oblicz:

$$m_{Leu, \text{hydroliza}} = \text{teoretyczna zawartość Leu w próbce} = \%Leu \times m_{próbki}$$

Lizyna (*Lys*) – wzorzec wewnętrzny: przygotowanie 0,1M roztwór stosując 0,1461 *Lys* w kolbie miarowej 10 ml

Do każdej próbki należy dodać ilość *Lys* odpowiadającą masie *Leu* w tej próbce

$$m_{Lys} = m_{Leu, \text{hydroliza}}$$

5. Obliczanie stopnia modyfikacji:

$$\text{Stopień modyfikacji (\%)} = \times 100\%$$

Stosunki te wyznacza się na podstawie powierzchni pod pikami na chromatogramach HPLC.

9. Badania agregacyjne peptydów

W celu oceny właściwości fibrylogennych peptydów **ug51**, **ug52** oraz **ug53**, przeprowadziłam ich inkubację w buforze fosforanowym (PBS) o pH 7,4, w temperaturze 37°C, z ciągłym mieszaniem w termobloku (300 rpm) przez 7 dni. Stężenie peptydu wynosiło 1 mg/ml. Próbkę były pobierane co 24 godziny (0, 1, 2, 3, 6 dni). Tak przygotowane roztwory wykorzystałam do analiz: dichroizmu kołowego, fluorescencji tioflawiny T (ThT), obrazowania TEM (tylko dla **ug52**), oraz badania uwalniania peptydu **ug52** z fibryli w obecności enzymu MMP-7.

9.1 Analiza konformacji peptydów metodą dichroizmu kołowego

Pomiary dichroizmu kołowego dla peptydów **ug51**, **ug52** i **ug53** wykonano w temperaturze pokojowej, w zakresie długości fali 190–260 nm. Od każdego widma odjęto widmo rozpuszczalnika. Wyniki przedstawiłam w formie zależności średniej eliptyczności molowej na jedną resztę aminokwasową (MRME – ang. mean residue molar ellipticity) od długości fali (nm), wyrażonej w jednostkach $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. Pomiary zostały przeprowadzone w Pracowni Dichroizmu Kołowego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, przy użyciu spektropolarymetru Jasco J-815.

9.2 Analiza agregacji fibryli peptydowych metodą fluorescencji tioflawiny T (ThT)

10 μl roztworu peptydu (1 mg/ml) po inkubacji w PBS wymieszałam z 10 μl roztworu tioflawiny T (1,5 mM w wodzie) oraz 90 μl buforu PBS (pH 7,4). Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina ThT z buforem PBS i 10 μl wody (bez peptydu).

Wzbudzenie prowadziłam przy długości fali 420 nm, a widmo emisyjne zarejestrowałam w zakresie 455–600 nm. Maksimum emisji uzyskałam przy 482 nm, co wskazuje na obecność uporządkowanych struktur fibrylowych. Uzyskane dane przedstawiłam jako zależność intensywności fluorescencji od długości fali. Formowanie się fibryli peptydowych przez peptydy ug51, ug52 i ug53 oceniałam za pomocą tzw. testu tioflawinowego (ThT) za pomocą spektrofлуorymetru Infinite 200 Pro (Tecan), używając 96–dołkowych płytek.

9.3 *Obrazowanie fibryli peptydu ug52 za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)*

W celu wizualizacji fibryli peptydu **ug52** za pomocą TEM, próbki oczyściłam przez trzykrotne wirowanie (18 000 rpm, 15 min). Po każdym etapie wirowania usuwałam supernatant i zawieszałam osad fibryli w wodzie dejonizowanej, co pozwoliło na skuteczne usunięcie pozostałości buforu. Końcowe stężenie peptydu wynosiło 0,001% (v:v). Na siateczkę miedzianą pokrytą węglem (400 mesh) nanoszono 5 μ L próbki. Po 1 minucie adsorpcji, nadmiar cieczy usuwano, a siateczki barwiono 2% roztworem octanu uranylu (v/v). Obrazowanie przeprowadzono za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Company, Hillsboro) przy napięciu przyspieszającym 120 kV, w zakresie powiększeń od 11 500 $\times$ do 39 000 $\times$. Badania wykonano w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

9.4 *Uwalnianie peptydu ug1 z fibryli ug52 w obecności metaloproteinazy MMP–7*

W celu zbadania podatności fibryli peptydowej **ug52** na hydrolizę enzymatyczną, zastosowałam metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej MMP–7 (matrylizyna–1). Enzym ten wybrałam ze względu na jego szerokie spektrum substratowe oraz udział w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej, procesach zapalnych i regeneracyjnych.

Do zawiesiny fibryli ug52 (1 mg/ml w PBS, pH 7,4) dodałam enzym MMP–7 w stosunku molowym enzym:substrat równym 1:365,6 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Inkubację prowadziłam przez 72 godziny w temperaturze 37°C, z zastosowaniem ciągłego mieszania (300 rpm). Próbki pobierałam w pięciu punktach czasowych: 0, 1, 3, 24 oraz 72 godziny. Aby zatrzymać aktywność enzymu, do każdej próbki dodawałam 10% roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA, v:v). Analizę produktów degradacji

przeprowadziłam z zastosowaniem spektrometru Bruker Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Niemcy).

10. Otrzymywanie kompozytów chitozanowo-bioszklanych zawierających peptydy

Chociaż celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie i charakterystyka koniugatu chitozanowo-peptydowego, realizowane przeze mnie badania stanowiły część szerszego projektu badawczego GlassPoPep, który od początku zakładał zastosowanie bioszklą domieszkowanego jonami cynku i strontu jako nieorganicznego komponentu kompozytów. Za syntezę i modyfikację bioszklą odpowiadał współpracujący zespół z Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, natomiast moim zadaniem było zaprojektowanie peptydów o właściwościach proregeneracyjnych, ich sprzężenie z chitozanem oraz szczegółowa analiza otrzymanych koniugatów i fibryli peptydowych.

Na końcowym etapie projektu opracowane przeze mnie komponenty organiczne zostały połączone z bioszklą, tworząc kompletne materiały kompozytowe przeznaczone do dalszych analiz i badań biologicznych. Wszystkie badania fizykochemiczne, testy uwalniania peptydów oraz analizy biologiczne prowadzone były wyłącznie dla gotowych kompozytów chitozanowo-bioszklanych zawierających zarówno chitozan (sprzężony lub zmieszany z peptydami), jak i bioszklą domieszkowaną jonami metali. Koniugaty bez dodatku bioszklą nie były poddawane tym analizom, ponieważ nie stanowiły finalnej wersji materiału projektowego.

Końcowe produkty kompozytowe otrzymano w zespole dr Moniki Biernat (Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Sieć Badawcza Łukasiewicz, Warszawa). W pierwszym etapie syntezy przygotowano bioszklą metodą zol-żel, wykorzystując tlenek krzemu (SiO_2) jako składnik strukturotwórczy oraz dodatki: CaO , P_2O_5 , a także SrO , ZnO , CuO lub MgO – w zmiennych proporcjach typowych dla szkliw bioaktywnych. Po zmieszaniu prekursorów prowadzono wygrzewanie w cieplarni (do 180°C), a następnie suszenie i wypalanie żelu w piecu ($500\text{--}750^\circ\text{C}$). Uzyskany materiał rozdrabniano do proszku o uziarnieniu $\leq 250\text{ }\mu\text{m}$ i wykorzystywano jako fazę nieorganiczną kompozytów. W przypadku kompozytu 5 zastosowano dodatkowy etap funkcjonalizacji powierzchni. Przygotowano wodny roztwór peptydu ug46 (zsyntezowanego przez dr Justynę Sawicką)

o stężeniu 0,29 mg/ml [194, 195]. Porowate rusztowanie chitozan/bioszko/peptyd ug4 zanurzono w przygotowanym roztworze peptydu, umożliwiając jego adsorpcję na powierzchnię materiału. Zestawienie nazw i składów kompozytów przedstawiłam w Tabeli 7 oraz w Załączniku 4.

Tabela 7. Skład i oznaczenia kompozytów chitozanowo-bioszklanych modyfikowanych ZnO (tlenkiem cynku)/SrO (tlenkiem strontu) i peptydami ug4/ug46/ug51/ug52 (Załącznik 4). CH-m 4.4 odnosi się do czwartej syntezy wykonanej zgodnie z procedurą nr 4 modyfikacji chitozanu kwasem 2-maleimidooctowym (Rozdział IV.I.11.2)

Numer	Nazwa kompozytu	Opis składu kompozytu
1.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_0,8%	bioszko P5 (bioszko o składzie: 70% SiO ₂ , 25% CaO, 5% P ₂ O ₅ i granulacji < 1,0mm) domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 0,8% wagowych do chitozanu
2.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_1,6%	bioszko P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu
3.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	bioszko P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu
4.	P5Sr/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	bioszko P5 domieszkowane SrO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu
5.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%_ug46	bioszko P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4 + peptyd ug46 , peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu, ug46 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 29 µg peptydu na 1 krążek
6.	P5Zn/CH-ug51	bioszko P5 domieszkowane ZnO + chitozan + peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10µg peptydu na 1 krążek
7.	P5Sr/CH-ug51	bioszko P5 domieszkowane SrO + chitozan + peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10µg peptydu na 1 krążek
8.	P5Sr/CH-ug52	bioszko P5 domieszkowane SrO + chitozan + peptyd ug52 (liofilizat) zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100µg peptydu na 1 krążek
9.	P5Zn/CH-ug52(fibr)	bioszko P5 domieszkowane ZnO + chitozan + peptyd ug52 w formie fibryli peptydowych zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100 µg na 1 krążek

11. Analiza struktury powierzchni i porowatości kompozytów metodą SEM

Badania struktury powierzchni oraz rozkładu wielkości porów kompozytów chitozanowo-bioszklanych zostały przeprowadzone przez zespół dr Moniki Biernat z

Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych Sieci Badawczej Łukasiewicz w Warszawie.

Do analizy wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) z emisją polową (Nova NanoSEM 200, FEI). Obrazowanie wykonano w niskiej próżni z użyciem detektora vCD przy napięciu przyspieszającym 15 kV, na próbkach niepokrywanych przewodzącą warstwą.

12. Ocena bioaktywności powierzchniowej kompozytów w warunkach *in vitro*

Badania bioaktywności kompozytów chitozanowo–bioszklanych przeprowadzono w zespole dr Moniki Biernat w Instytucie Materiałów Budowlanych Sieci Badawczej Łukasiewicz w Warszawie. W ramach analizy oceniono zmiany na powierzchni próbek po czterotygodniowej inkubacji w symulowanym płynie ustrojowym (SBF) w temperaturze 37°C. Charakterystykę chemiczną powierzchni wykonano w warunkach niskiej próżni, z wykorzystaniem spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDS) z detektorem SDD Apollo X (EDAX). Obrazowanie mikrostruktury przeprowadzono w warunkach wysokiej próżni z użyciem detektora Everharta–Thornleya (ETD) przy napięciu przyspieszającym 10 kV. Przed analizą próbki pokrywano warstwą przewodzącą (filmem złota o grubości 10 nm), nanoszonym przy użyciu napyłarki Leica EM SCD500.

13. Analiza kinetyki uwalniania peptydu z kompozytu

W każdej serii eksperymentalnej do badań uwalniania peptydów z kompozytów wykorzystałam dwa krążki kompozytowe o średnicy 15 mm i grubości 1 mm. Masa pojedynczego krążka wynosiła od 10 do 17 mg. Każdy eksperyment przeprowadziłam dwukrotnie, z zastosowaniem niezależnych próbek. W Tabeli 8 zestawiałam masy poszczególnych krążków użytych do analizy kinetyki uwalniania.

Tabela 8. Masy próbek kompozytów użytych w badaniach uwalniania (I i II próba).

Numer	Nazwa kompozytu	Masy kompozytów [mg]	
		I próba	II próba
1.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_0,8%	32,95	23,47
2.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_1,6%	26,39	24,11
3.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	23,23	25,98
4.	P5Sr/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	31,75	30,67
5.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%_ug46	20,33	21,56
6.	P5Zn/CH-ug51	32,01	28,76
7.	P5Sr/CH-ug51	22,29	26,30
8.	P5Sr/CH-ug52	28,15	30,15
9.	P5Zn/CH-ug52(fibr)	38,79	33,62

Badania kinetyki uwalniania peptydów z kompozytów wykonałam na płytkach 24 dołkowej w temperaturze 37°C, przy ciągłym wytrząsaniu. Krążki kompozytowe umieszczałam we wgłębieniach płytek 24-dołkowych, po czym dodawałam 1 ml buforu HEPES lub 1 ml wody dejonizowanej. Eksperymenty prowadziłam w obecności enzymu MMP-7 (1 µl), jak i w warunkach – bez enzymu. W określonych punktach czasowych pobierałam po 65 µl roztworu próbki, a następnie uzupełniałam pobraną objętość buforem lub wodą dejonizowaną (65 µl). Jako kontrolę zastosowałam krążki zawierające jedynie bioszkło i chitozan. Eksperyment wykonałam w dwóch niezależnych powtórzeniach, wykorzystując po 2 krążki kompozytowe na każde powtórzenie. Szczegółowy przebieg eksperymentów przedstawiłam w Załączniku 3.

14. Analiza termogravimetryczna

Analiza termogravimetryczna (TGA – ang. *Thermogravimetric Analysis*) to technika analityczna umożliwiająca pomiar zmiany masy próbki w funkcji temperatury lub czasu, podczas gdy próbka poddawana jest kontrolowanemu programowi grzewczemu w określonej atmosferze gazowej [196]. Przeprowadzono analizy termogravimetryczne zarówno dla niemodyfikowanego, jak i modyfikowanego chitozanu. Badania te zostały

wykonane na Politechnice Wrocławskiej przez dr Małgorzatę Gazińską. Pomiary termogravimetryczne przeprowadzono przy użyciu termowagi TGA/DSC1 Mettler Toledo (Greifensee). Próbkę ogrzewano z szybkością 10°C/min w zakresie temperatur od 25°C do 800°C, w atmosferze powietrza o przepływie 60 ml/min.

15. Badania cytotoksyczności i potencjału proliferacyjnego peptydów wobec komórek hFOB

Eksperymenty przeprowadzono w Instytucie Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku, w zespole kierowanym przez dr Beatę Gromadzką. W dniu poprzedzającym eksperyment komórki linii ludzkiej linii płodowych osteoblastów hFOB (ang. *human fetal osteoblast cell line*) wysiewano na płytki 96–dołkowe w ilości $0,02 \times 10^6$ komórek na dołek. Komórki inkubowano 24h w temperaturze 34°C. Przed rozpoczęciem eksperymentu przygotowywano rozcieńczenia peptydów w pożywce hodowlanej o stężeniach: 100, 50, 25, 12,5 i 6,25 µg/ml. Rozcieńczenia te nanoszono na hodowlę komórkową w objętości 150 µl na dołek, w dwóch niezależnych seriach, każda w czterech powtórzeniach. Po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 34°C przeprowadzono dalsze analizy biologiczne. We wszystkich eksperymentach zastosowano odpowiednie kontrole pozytywne i negatywne.

15.1 Test LDH – test do oceny uszkodzeń błony komórkowej

Test dehydrogenazy mleczanowej (LDH – ang. *lactate dehydrogenase*)) został wykonany zgodnie z normą ISO10993–5 [197]. Komórki inkubowano przez 48 godzin w obecności badanego peptydu w płytkach 96–dołkowych. Jako kontrolę pozytywną zastosowano 1% roztwór Triton X–100. Po inkubacji dodano do dołków barwnika z katalizatorem, przygotowany bezpośrednio przed użyciem. Płytki inkubowano w ciemności przez 30 min. w temperaturze pokojowej, następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 490 nm oraz 690 nm za pomocą czytnika płytek.

15.2 Test WST–1 – ocena aktywności mitochondrialnej i proliferacji komórek

Wpływ peptydów na proliferację komórek oceniono za pomocą testu (WST–1) na linii komórkowej ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Test WST–1 wykonano zgodnie z normą ISO10993–5 [197]. Roztwór WST–1 (1 ml) ogrzewano w łaźni wodnej w

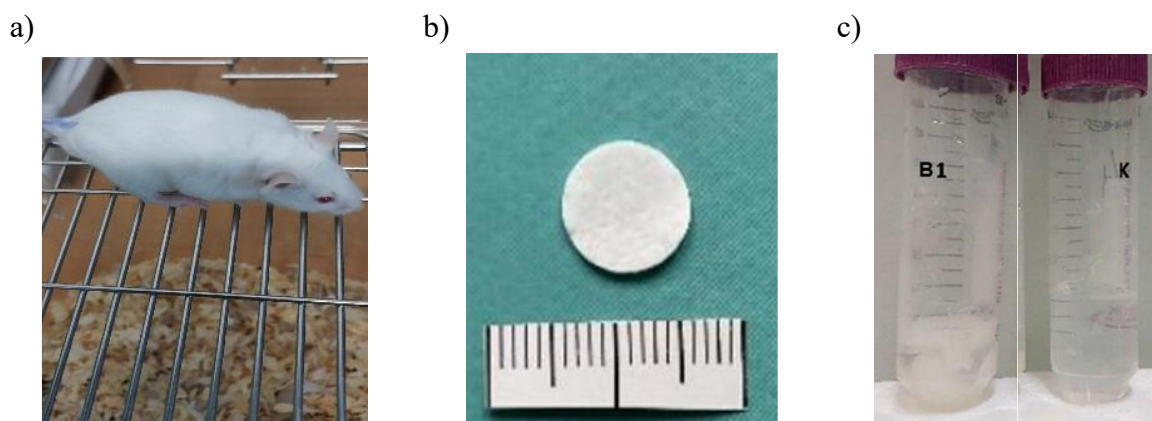
temperaturze 34°C, a następnie nanoszono do każdego dołka płytki 96–dołkowej zawierającej hodowlę komórek. Płytki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 34°C. Po zakończeniu inkubacji reakcję zatrzymywano roztworem stop, a absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm (pomiar właściwy) i 620 nm (korekta tła) za pomocą czytnika mikropłytek.

16. Badania implantacyjne kompozytu chitozanowo–bioszklanego w modelu zwierzęcym

Badania przedkliniczne przeprowadzono w Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, pod kierownictwem dr hab. Bogusławy Żywickiej. Eksperymenty zrealizowano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (uchwała nr 83/2019/P1 z dnia 15.01.2020 r.). Wszystkie próbki kompozytu nr 5 dostarczone do badań poddano sterylizacji radiacyjnej dawką ok. 30 kGy.

16.1 Badania toksyczności układowej

Badania zaplanowano i przeprowadzono zgodnie z normą PN–EN ISO 10993–11 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 11: Badania toksyczności ogólnoustrojowej” oraz Farmakopeą Polską VII (FP VII) [198, 199]. Test ostrej toksyczności wykonano na 10 dorosłych albinotycznych myszach szczepu Swiss (Rysunek 33a), pochodzących z certyfikowanej hodowli zwierząt laboratoryjnych. Zwierzęta losowo podzielono na dwie grupy po 5 osobników: badaną i kontrolną.



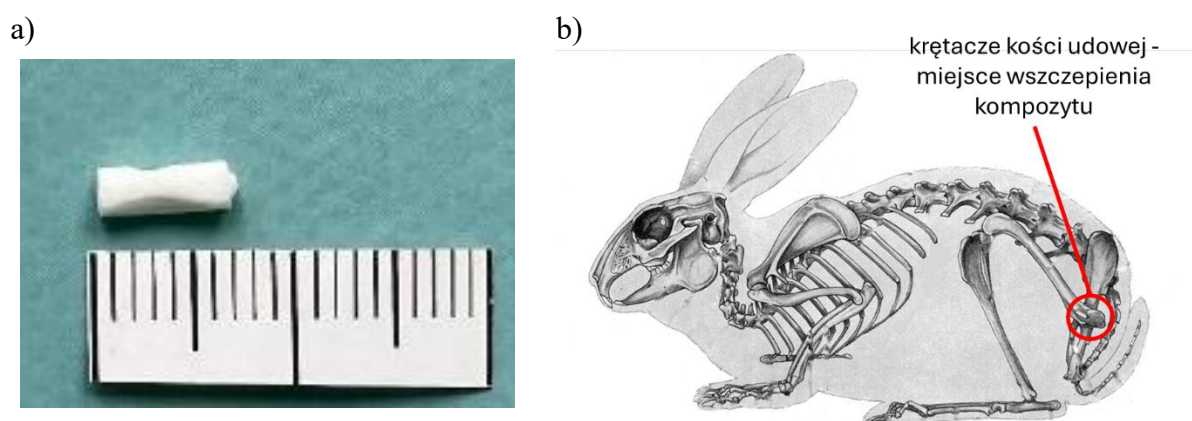
Rysunek 33. Zdjęcia przedstawiają : a) jedną z myszy szczepu Swiss biorącą udział w badaniu b) próbkę badanego biokompozytu użytą do badań toksyczności ostrej c) wyciągi wodne z badanego biokompozytu – przygotowanie roztworów do wstrzykiwań, gdzie K – kontrola – roztwór soli fizjologicznej, B1– kompozyt 5. Fotografie wykonane przez p. Krzysztofa Fabisia.

W trakcie 7–dniowego okresu przygotowawczego oraz całego eksperymentu codziennie monitorowano masę ciała, zachowanie, a także spożycie paszy i wody. Po okresie adaptacji myszom z grupy badanej podano dootrzewnowo wodny wyciąg z kompozytu 5, natomiast grupie kontrolnej – roztwór soli fizjologicznej. Rysunek 33b przedstawia próbkę badanego biokompozytu, a Rysunek 33c – przygotowany z niego wyciąg wodny.

Wyciąg sporządzono zgodnie z zaleceniami normy, stosując proporcję 3 cm² powierzchni próbki na 1 ml roztworu soli fizjologicznej (Injectio Natrii Chlorati Isotonica, Polpharma, 9 mg/ml). Inkubację prowadzono przez 72 godziny w temperaturze 37°C, równolegle przygotowując próbę kontrolną. Ekstraktów nie przesączano i wykorzystano je bezpośrednio po przygotowaniu. Iniekcje wykonano dootrzewnowo w dawce 50 ml/kg masy ciała – zgodnie z dopuszczalnym maksimum. Codziennie prowadzono obserwację kliniczną pod kątem objawów toksycznych. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i paszy. Rejestrowano także spożycie pokarmu i płynów oraz zmiany masy ciała. Po 7 dniach wykonano eutanazję poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu. Podczas sekcji oceniano skórę, naturalne otwory ciała, stan mięśni, układ kostny oraz miejsca iniekcji w jamie brzusznej.

16.2 Miejscowa reakcja po implantacji

Badania przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-6 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 6: Badania miejscowej reakcji po implantacji” [200]. Eksperymenty wykonano na królikach rasy nowozelandzkiej, obu płci, pochodzących z hodowli Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i były żywione standardową granulowaną paszą dla królików. Podzielono je na dwie grupy: badaną (z implantacją kompozytu) oraz kontrolną (z zabiegiem chirurgicznym bez wszczepienia). Na każdy zaplanowany termin sekcyjny przeznaczono co najmniej trzy króliki. Grupę kontrolną oceniano po 90 dniach od zabiegu. Wszystkie implanty kompozytu 5 miały kształt cylindryczny i wymiary 2 mm × 6 mm (Rysunek 34a). Po uzyskaniu pełnej analgezji, na wysokości stawu biodrowego odkażano skórę i wykonywano cięcie skórne długości 4–5 cm, przebiegające wzdłuż nasady bliższej kości udowej. Następnie poprzez nacięcie mięśni odsłaniano krętarze (Rysunek 34b), w których nawiercano otwór o średnicy 3mm i długości 6mm.



Rysunek 34. a) próbka badanego kompozytu 5 (kształt cylindryczny, długość ok. 6 mm, średnica 2 mm) użyta w badaniach miejscowej reakcji tkanek po implantacji u królików nowozelandzkich. Fotografia wykonana przez Krzysztofa Fabisia, b) poglądowe miejsce wszczepienia kompozytu do kości królika, na podstawie rysunku [201].

W tak wykonanych operacyjnych ubytkach kostnych umieszczano badane próbki kompozytu. W 30., 60. i 90. dniu po implantacji przeprowadzano eutanazję królików przez dożylną podanie pentobarbitalu. Przed zabiegiem oceniano ogólny stan zdrowia zwierząt. Podczas sekcji makroskopowo oceniano ranę pooperacyjną, miejsce implantacji oraz wybrane narządy wewnętrzne. Następnie pobierano kości udowe z implantami do dalszych

analiz histologicznych i radiologicznych. Tkanki utrwalano przez 72 godziny w 10% zobojętnionym formaldehydzie w buforze fosforanowym, odwapniano w mieszaninie kwasów, a następnie odwadniano i zatapiano w parafinie. Z zatopionych fragmentów kości wykonywano przekroje podłużne i poprzeczne. Skrawki (ok. 4 μm) barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą Van Gieson (VG), po czym zamykano w balsamie kanadyjskim. Preparaty oceniano pod mikroskopem świetlnym (Olympus BX43), a dokumentację obrazową wykonano za pomocą oprogramowania cellSens Standard.

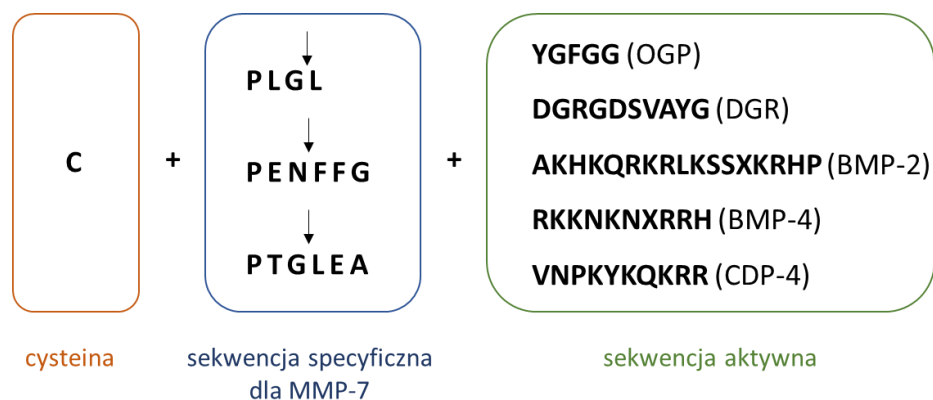
IV. BADANIA WŁASNE

CZEŚĆ I – Modyfikacja chitozanu pochodną maleimidoaminokwasu i jego kowalencyjna koniugacja z bioaktywnym peptydem

1. Projektowanie peptydów o właściwościach proregeneracyjnych

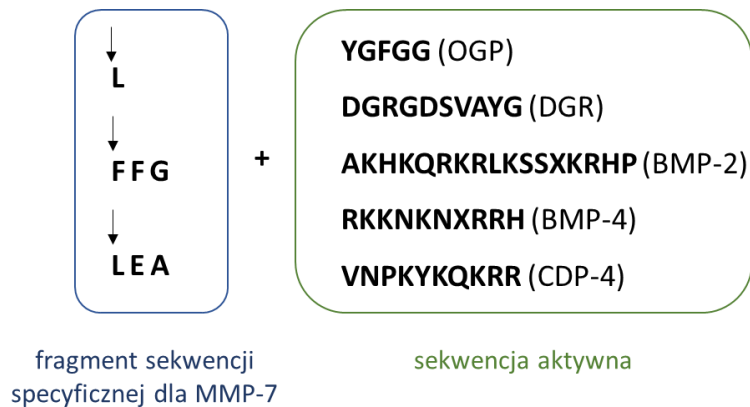
Pierwszym etapem badań było zaprojektowanie peptydów o potencjalnych właściwościach proregeneracyjnych kości. Po dokonaniu przeglądu literaturowego wybrałam pięć peptydów, które biorą udział w procesach regeneracyjnych tkanki kostnej. Są one fragmentami następujących czynników wzrostu: BMP-2, BMP-4, OGP, DGR, CDP-4. Peptydy te zostały dokładnie opisane w części teoretycznej mojej pracy w rozdziale zatytułowanym „Czynniki bioaktywne wspomagające regenerację kości – rola peptydów” (Rozdział I.5).

Każdą sekwencję aktywną wzbogaciłam o fragment rozpoznawany przez metaloproteinazę 7 (MMP-7), który ulega hydrolizie w środowisku bogatym w enzym, co umożliwia kontrolowane, miejscowe uwalnianie bioaktywnego peptydu. Na *N*-końcu każdej sekwencji umieściłam resztę cysteiny z nieosłoniętą grupą tiolową, co pozwala na kowalencyjne sprzężenie z nośnikiem polimerowym, jakim jest chitozan (Rysunek 35). Dla peptydów, które zawierały resztę cysteiny w swojej sekwencji, aby uniknąć tworzenia niepożądanych mostków disiarczkowych, zastosowałam substytucję cysteiny kwasem α -aminomasłowym (Aib), oznaczonym literą X. Jest on izosterem cysteiny, ale nie posiada reaktywnej grupy tiolowej.



Rysunek 35. Schemat projektowania sekwencji peptydów zawierających resztę cysteiny, fragment specyficzny dla MMP-7 oraz sekwencję aktywną o działaniu proregeneracyjnym – przeznaczonych do modyfikacji chitozanu.

W celu oceny proliferacyjnego potencjału zaprojektowanych sekwencji peptydów wobec osteoblastów w warunkach degradacji enzymatycznej, zaprojektowane peptydy zawierały zarówno fragment aktywny, jak i fragment substratowy dla MMP-7, umożliwiające enzymatyczne uwalnianie aktywnego peptydu w miejscu docelowym (Rysunek 36).



Rysunek 36. Zaprojektowane sekwencje peptydów zawierające fragment rozpoznawany przez MMP-7 oraz sekwencję aktywną, zastosowane w badaniach biologicznych.

2. Synteza i analiza peptydów proregeneracyjnych

Do syntezy peptydów wykorzystałam automatyczny syntezytor mikrofalowy firmy CEM Corporation. Proces przeprowadziłam stosując metodologię Fmoc na żywicy Rink

Amide ProTide Resin, zgodnie z metodologią syntezy na nośniku stałym (SPPS). W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymałam 16 peptydów, których zestawienie przedstawiłam w Tabeli 9.

Największe trudności syntetyczne wystąpiły w przypadku peptydów zawierających fragmenty czynników wzrostu BMP-2 (**ug13**, **ug14**, **ug15**) oraz BMP-4 (**ug20**, **ug21**, **ug22**). Produkty te wykazywały liczne delecje, szczególnie reszt lizyny i argininy. Aby poprawić wydajność syntez, zastosowałam podwójne sprzęganie aminokwasów oraz dodatkowy etap mycia po każdym cyklu sprzęgania i deprotekcji.

Dla peptydu **ug13** uzyskałam produkt o zadowalającej wydajności (~80%), peptydy **ug8** i **ug9** uzyskałam z wydajnością około 50%, natomiast peptyd **ug20** otrzymałam z bardzo niewielką wydajnością (~30%). Peptydy **ug14**, **ug15**, **ug21** i **ug22** uzyskałam z bardzo niską wydajnością (~5%), mimo zastosowania modyfikowanej procedury.

Czystość peptydów oceniłam metodą HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3), natomiast masę cząsteczkową potwierdziłam techniką spektrometrii mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą w czasie przelotu (MALDI-TOF).

Tabela 9. Nazwy i sekwencje syntetyzowanych peptydów, ich pochodzenie biologiczne oraz podstawowe parametry syntezy. W peptydach ug13–ug22 –X oznacza kwas 4-aminomasłowy.

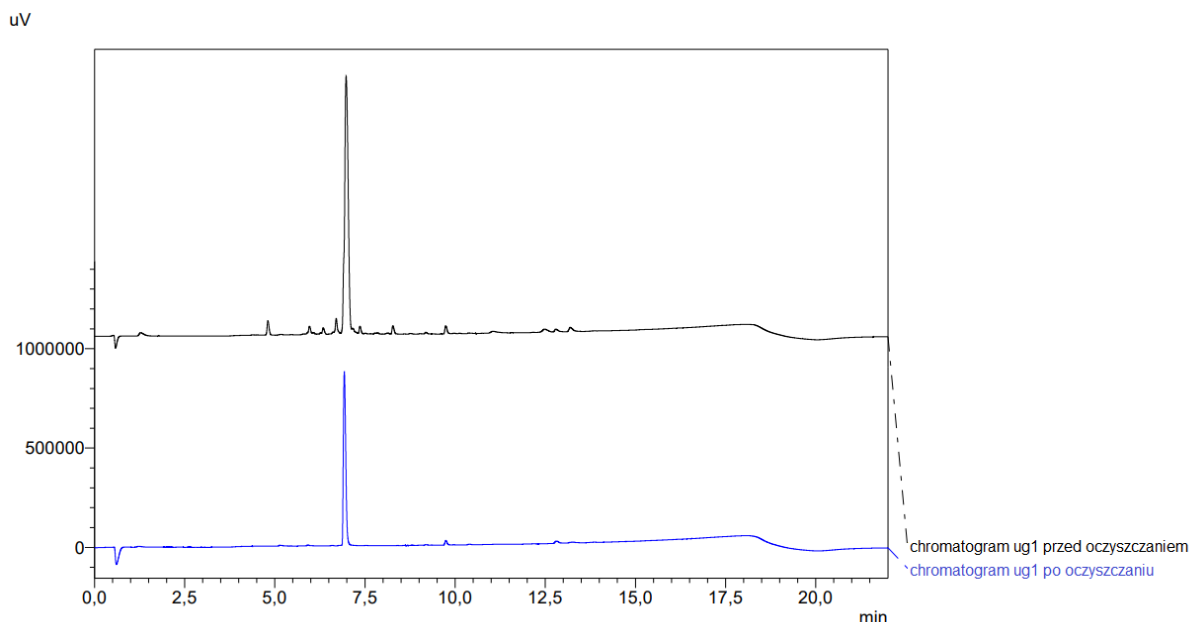
Peptyd	Sekwencja aminokwasowa	Pochodzenie peptydu	Skala syntezy [mmol]	Ilość żywicy [g]	Otrzymana ilość surowego produktu [mg]	Wydajność syntezy [%]
ug1	H-LYGFGG-NH ₂	OGP	0,1	0,476	60	98,13
			0,25	0,424	146	95,41
ug2	H-FFGYGFGG-NH ₂		0,25	0,424	202	95,00
ug3	H-LEAYGFGG-NH ₂		0,25	0,424	195	96,01
ug4	H-CPLGLYGFGG-NH ₂		0,1	0,476	80	94,73
			0,25	0,424	243	93,61
			1,0	1,69	920	97,01
ug7	H-LDGRGDSVAYG-NH ₂	DGR	0,1	0,476	101	91,18
ug8	H-FFGDGRGDSVAYG-NH ₂		0,1	0,476	67	49,78
ug9	H-LEADGRGDSVAYG-NH ₂		0,1	0,476	63	48,17
ug13	H-LAKHKQRKRLKSSXKRHP-NH ₂	BMP-2	0,1	0,476	180	81,83
			0,25	0,424	354	64,30
ug14	H-FFGAKHKQRKRLKSSXKRHP-NH ₂		0,1	0,476	12	4,92
ug15	H-LEAAKHKQRKRLKSSXKRHP-NH ₂		0,1	0,476	15	6,25
ug20	H-LRKKKNKNXRRH-NH ₂	BMP-4	0,1	0,476	51	35,14
ug21	H-FFGRKKKNKNXRRH-NH ₂		0,1	0,476	10	5,92
ug22	H-LEARKKNKNXRRH-NH ₂		0,1	0,476	14	8,48
ug26	H-LVNPKYKQKRR-NH ₂	CPD4	0,25	0,424	323	90,37
ug27*	H-FFGVNPKYKQKRR-NH ₂		0,25	0,424	278	67,12
ug28*	H-LEAVNPKYKQKRR-NH ₂		0,25	0,424	331	81,01

*syntezy wykonane przez panią Patrycję Żelechowską w ramach jej pracy licencjackiej pt. "Synteza fragmentów białka Copine-7, wydłużonych o sekwencję specyficzną dla metaloproteinaz, jako potencjalnych składników kompozytów implantów chitozanowych kości" – promotor dr Marta Orlikowska

Peptydy poddałam procesowi oczyszczania metodą odwróconej chromatografii cieczowej (RP-HPLC). Rozdział chromatograficzny przeprowadzałam zarówno w gradiencie liniowym, jak i w warunkach izokratycznych (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 2). Dla każdego z peptydów opracowałam indywidualne warunki rozdziału (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 1, Eluenty I).

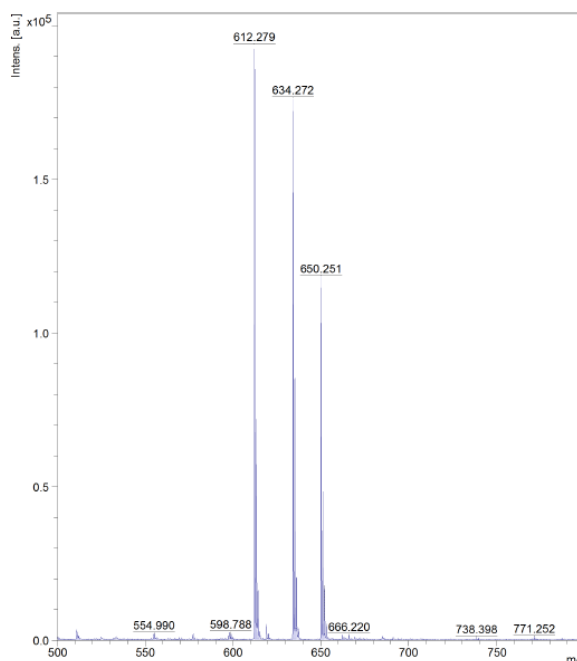
Czystość uzyskanych peptydów oceniałam także za pomocą RP-HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3). W celu potwierdzenia mas cząsteczkowych otrzymanych peptydów, wykonałam analizy spektrometrii masowej techniką MALDI-TOF.

Największe trudności w procesie oczyszczania wystąpiły w przypadku peptydów **ug2** i **ug3**, które wykazywały niższą rozpuszczalność w wodzie w porównaniu do pozostałych związków. W celu poprawy ich rozpuszczalności do wodnych roztworów peptydów dodawałam 5% roztwór kwasu octowego (v:v). Utrudniona rozpuszczalność peptydów **ug2** i **ug3** wynikała najprawdopodobniej z obecności hydrofobowych reszt fenyloalaniny i tyrozyny w ich sekwencjach aminokwasowych. Na Rysunku 37 przedstawiłam przykładowe chromatogramy peptydu **ug1** przed i po oczyszczaniu. Dobór gradientu, czas retencji oraz masy oczyszczonych peptydów zestawiałam w Tabeli 10.



Rysunek 37. Chromatogram peptydu **ug1** przed (kolor czarny) i po (kolor niebieski) oczyszczaniu metodą RP-HPLC.

Poniżej przedstawiłam przykładowe widmo MS MALDI–TOF (Rysunek 38) dla peptydu **ug1**.



Rysunek 38. Widmo masowe MALDI–TOF peptydu **ug1**. Zaobserwowane piki: $(m/z) [M+H]^+ = 612,279$, $(m/z) [M+Na]^+ = 634,272$, $(m/z) [M+K]^+ = 650,251$.

Syntezowane peptydy proregeneracyjne, stanowiące pierwszy etap opracowania kompozytów, musiały charakteryzować się odpowiednią wydajnością, warunkującą potencjalną opłacalność dalszych prac. Z tego względu peptydy **ug14**, **ug15**, **ug20**, **ug21** oraz **ug22**, których wydajność syntezy nie przekroczyła 40%, zostały wykluczone z dalszych analiz i nie zostały uwzględnione w Tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyka procesu oczyszczania peptydów proregeneracyjnych z określaniem fazy ruchomej stosowanej podczas oczyszczania, czasu retencji oraz masy cząsteczkowej peptydów.

Peptyd	Skład fazy ruchomej B	Czas retencji (min) – octany	Czas retencji (min) – 0,1% TFA	Masa obliczona (g/mol)	Masa obserwowana (m/z)
ug1	izokratycznie 24%	25,75	4,62	611,699	611,279
ug2	izokratycznie 30%	31,8	5,88	849,944	850,083
ug3	izokratycznie 20%	24,32	4,56	811,893	812,112
ug4	izokratycznie 34%	34,6	5,92	982,172	982,367
ug7	10–20%	13,518	3,75	1108,180	1107,469
ug8	15–25%	21,998	3,48	1346,420	1345,798
ug9	5–15%	14,033	4,16	1308,370	1307,596
ug13	0–5%	13,099	0,64	2182,653	2181,428
ug20	0–5%	11,025	0,61	1433,729	1433,327
ug26	0–10%	7,79	2,95	1428,750	1429,289
ug27*	10–30%	20,27	4,29	1666,991	1666,94
ug28*	0–20%	12,67	3,17	1628,949	1628,94

*oczyszczanie peptydów wykonane przez panią Patrycję Żelechowską w ramach jej pracy licencjackiej pt. "Synteza fragmentów białka Copine–7, wydłużonych o sekwencję specyficzną dla metaloproteinaz, jako potencjalnych składników kompozytów implantów chitozanowych kości" – promotor dr Marta Orlikowska

3. Stabilność peptydów proregeneracyjnych w wodzie i pożywce hodowlanej

Istotnym parametrem niezbędnym do zaprojektowania eksperymentów biologicznych dla zsyntetyzowanych peptydów jest ocena ich trwałości w warunkach prowadzenia doświadczeń. Dlatego też przeprowadziłam analizę stabilności peptydów w wodzie oraz w pożywce hodowlanej, stosowanej w testach biologicznych.

Badanie stabilności przeprowadziłam w wodzie oraz w pożywce (DMEM/F-12 z dodatkiem 10% FBS), zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale III.3. Analizy przeprowadzono techniką RP-HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 1, Eluenty II). Wyniki dotyczące procentowej zawartości peptydu po 24 godzinach przedstawiłam w Tabeli 11 oraz na wykresach na Rysunku 39.

Tabela 11. Procentowa pozostałość peptydu po 24 h inkubacji peptydów w wodzie i w pożywce.

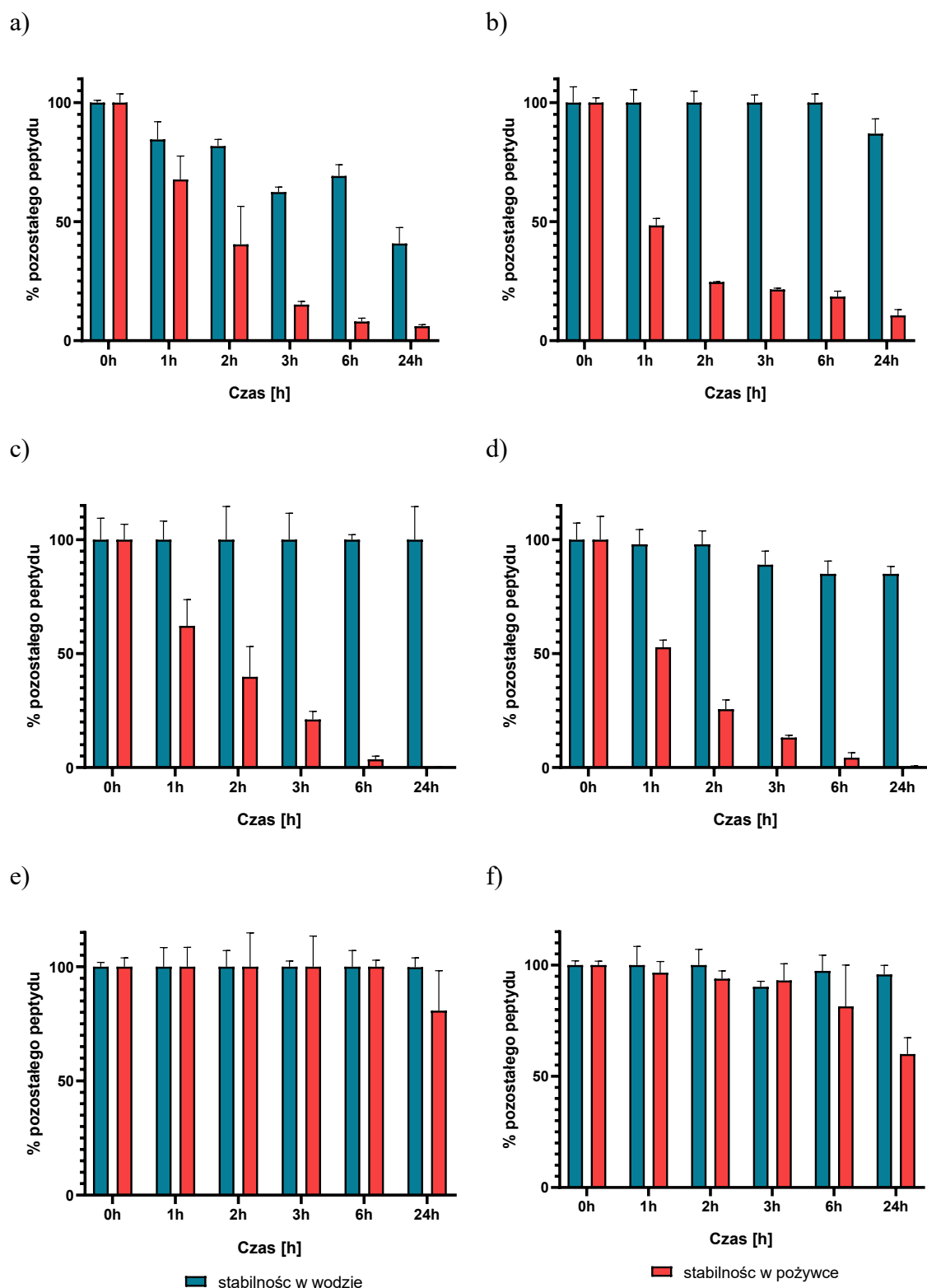
nazwa peptydu	% pozostałego peptydu w wodzie	% pozostałego peptydu w pożywce
ug1	37,22%	6,10%
ug2	86,98%	10,66%
ug3	99,21%	0,13%
ug7	85,64%	0,40%
ug13	99,77%	41,01%
ug26	95,79%	60,00%

Najwyższą stabilnością charakteryzowały się peptydy o najdłuższych sekwencjach aminokwasowych: **ug13** i **ug26**, które wykazywały ponad 95% stabilności w wodzie oraz 40–60% w pożywce. Wysoka stabilność może wynikać z ich długiej sekwencji aminokwasowej oraz obecności modyfikacji strukturalnych. Peptyd **ug13** zawiera w swojej sekwencji niestandardową resztę kwasu aminomasłowego (Aib), co czyni go nienaturalnym peptydem i potencjalnie zwiększa jego odporność na degradację enzymatyczną.

Peptydy **ug2**, **ug3** i **ug7** również wykazywały wysoką stabilność w wodzie (ponad 80%), jednak ich trwałość w pożywce była bardzo niska. Możliwą przyczyną tej szybkiej degradacji jest ich krótka sekwencja oraz brak strukturalnych modyfikacji chroniących przed działaniem enzymów proteolitycznych. Peptydy **ug2** i **ug3** posiadają ograniczoną

rozpuszczalność w wodzie, co może świadczyć o ich hydrofobowym charakterze i sugerować również możliwość adsorpcji do plastiku lub interakcji z komponentami FBS.

Szczególne miejsce zajmuje peptyd **ug1**, który charakteryzuje się najniższą stabilnością w wodzie (~37%), a także relatywnie niską stabilnością w pożywce (~6%). Mimo to, peptyd ten w dalszych badaniach wykazywał bardzo wysoką aktywność biologiczną, co sugeruje, że niski poziom detekcji może nie wynikać z degradacji, lecz np. z sorpcji do naczyń, wytrącania się z roztworu lub tworzenia niewykrywalnych agregatów.



Rysunek 39. Wykresy stabilności peptydów w wodzie i w pożywce dla peptydów: a) **ug1**, b) **ug2**, c) **ug3**, d) **ug7**, e) **ug13**, f) **ug26**. Na wykresach przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenia standardowe (SD) z trzech niezależnych pomiarów.

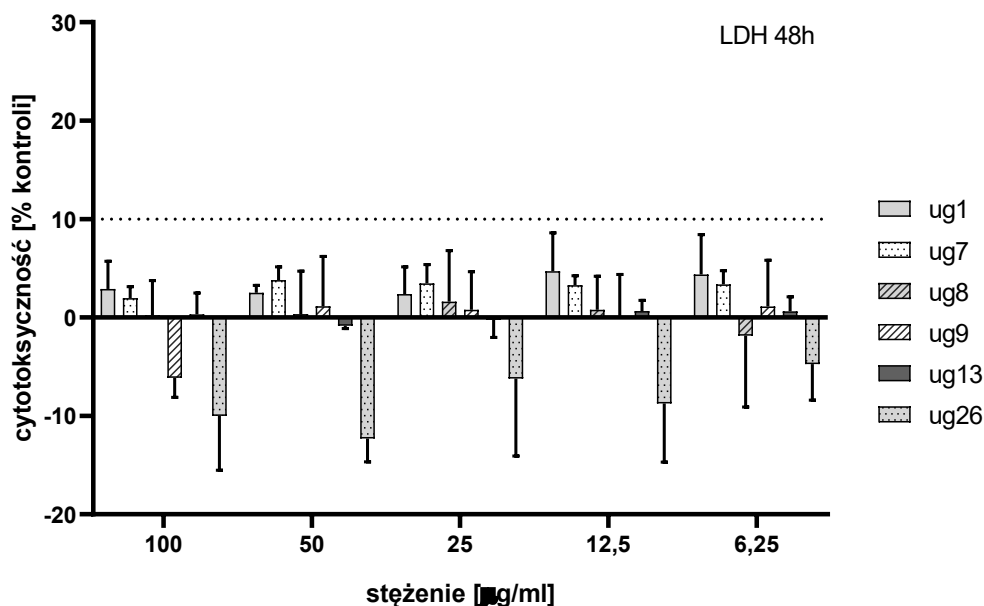
4. Badania biologiczne peptydów proregeneracyjnych

Badania biologiczne peptydów zostały wykonane przez zespół dr Beaty Gromadzkiej w Instytucie Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku, zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale III.15.

4.1 Ocena cytotoksyczności peptydów wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19

Dla zsyntezowanych i oczyszczonych peptydów przeprowadzono badania cytotoksyczności wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Peptydy **ug2** i **ug3** nie zostały włączone do testów biologicznych ze względu na ich bardzo niską rozpuszczalność w wodzie, co uniemożliwiło przygotowanie stabilnych roztworów. Test został wykonany zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale III.15.1, zgodnie z normą ISO10993–5 [197]. Zakres stężeń peptydów wynosił 6,25–100 µg/ml. Czas inkubacji peptydów z komórkami hFOB 1.19 wynosił 48 h, co miało na celu uwzględnienie pełnego cyklu podziałowego tych komórek, którego czas generacji wynosi około 36 godzin.

Potwierdzono, że badane peptydy, w testowanym zakresie stężeń, nie wykazują działania cytotoksycznego wobec komórek hFOB 1.19. Zgodnie z normą ISO10993–5 efekt cytotoksyczny definiuje się jako spadek żywotności komórek poniżej 70% wartości kontrolnej (cytotoksyczność > 30%). Wszystkie analizowane peptydy spełniły bardziej rygorystyczne kryterium braku cytotoksyczności (<10% cytotoksyczności) (Rysunek 40). Co więcej, dla części peptydów (szczególnie **ug9** i **ug26**) posiadają ujemne wartości cytotoksyczności, co sugeruje zwiększoną integralność błony komórkowej lub wpływ ochronny względem uszkodzeń.



Rysunek 40. Cytotoksyczność peptydów **ug1**, **ug7**, **ug8**, **ug9**, **ug13** oraz **ug26** oceniona testem LDH po 48 godzinach inkubacji z komórkami hFOB 1.19. Wyniki przedstawiono jako procent w stosunku do kontroli.

4.2 Ocena wpływu peptydów na proliferację komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19.

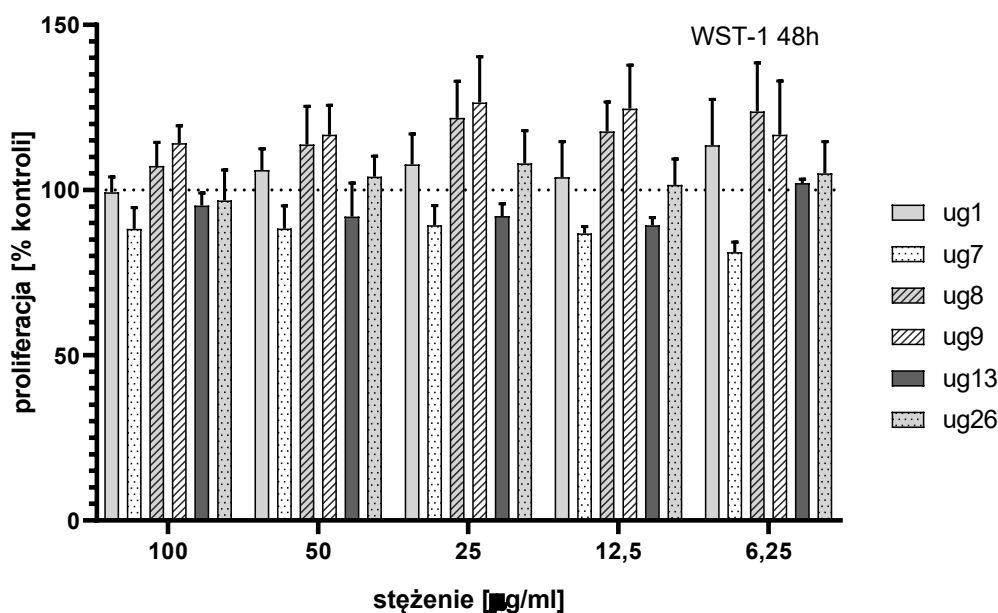
W celu określenia wpływu peptydów na proliferację komórek kości wykonano test WST–1 na linii komórkowej hFOB 1.19, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale III.15.2 i normą ISO10993–5 [197]. Zakres testowanych stężeń wynosił 6,25–100 µg/ml.

Uzyskane wyniki pokazują, że peptyd **ug1** stymulował proliferację osteoblastów w zakresie 5–15% względem kontroli w stężeniach 6,25–50 µg/ml, osiągając najwyższy efekt proliferacyjny przy najniższym stężeniu (6,25 µg/ml). Peptydy **ug8** i **ug9** wykazały najwyższy potencjał proliferacyjny, ze wzrostem liczby komórek odpowiednio do 123,5% (**ug8**) przy 6,25 µg/ml oraz 126,5% (**ug9**) przy 25 µg/ml. Peptyd **ug26** wykazał umiarkowany efekt proliferacyjny (1–8% wzrost liczby komórek), natomiast peptydy **ug7** i **ug13** nie wykazały działania stymulującego proliferację – liczba komórek była niższa niż w próbie kontrolnej (Rysunek 41).

Test WST–1 dla peptydów zawierających identyczny fragment aktywny DGRGDSVAYG (**ug7**, **ug8**, **ug9**) wskazuje, że dodatkowe reszty aminokwasowe mają wpływ na aktywność biologiczną. Peptyd **ug7** (LDGRGDSVAYG) nie powodował

wzrostu liczby komórek, natomiast **ug9** (LEADGRGDSVAYG) – wykazał najwyższy potencjał proliferacyjny spośród wszystkich badanych peptydów.

Warto podkreślić, że peptyd **ug1**, mimo najkrótszej sekwencji (5 reszt aminokwasowych), wykazywał porównywalną aktywność proliferacyjną do **ug8** i **ug9** przy najniższych testowanych stężeniach, co wskazuje na jego wysoką bioaktywność mimo niskiej stabilności chemicznej. Wynik ten może wskazywać na jego wysoką aktywność receptorową lub efektywne przenikanie do komórek.



Rysunek 41. Ocena wpływu peptydów **ug1**, **ug7**, **ug8**, **ug9**, **ug13** i **ug26** na proliferację komórek hFOB 1.19 po 48-godzinnej inkubacji, z wykorzystaniem testu WST-1. Wyniki przedstawiono jako procent w stosunku do kontroli.

5. Wybór optymalnego peptydu proregeneracyjnego do dalszych badań funkcjonalnych

W badaniach oceniających potencjał proliferacyjny wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19 najlepsze właściwości wykazały peptydy **ug1**, **ug8** oraz **ug9**. Ze względu na istotne znaczenie aspektów ekonomicznych w syntezie peptydów na skalę przemysłową, a także w kontekście potencjalnej komercjalizacji projektu GlassPoPep, przeprowadzono analizę kosztów syntezy wspomnianych peptydów (Tabela 12).

Najwyższy koszt jednostkowy syntezy oszacowałam dla peptydu **ug26**, który składa się z 11 reszt aminokwasowych. Sekwencja tego peptydu zawiera dwie reszty argininy, których pochodne Fmoc należą do jednych z najdroższych odczynników.

Peptydy **ug8** i **ug9**, mimo że wykazały wysoką aktywność biologiczną, zawierają po 13 reszt aminokwasowych, a ich synteza charakteryzowała się niską wydajnością, wynoszącą około 50%. Średni koszt pojedynczej syntezy tych peptydów wynosił około 130 zł, jednak uwzględniając niską wydajność, w celu uzyskania wymaganej ilości produktu należałoby przeprowadzić co najmniej podwójną syntezę, co znacząco zwiększa koszty.

Zdecydowanie najkorzystniejszym pod względem ekonomicznym oraz syntetycznym okazał się peptyd **ug1**. Składa się on z 6 reszt aminokwasowych, a jego synteza przebiegała z bardzo wysoką wydajnością (około 98%).

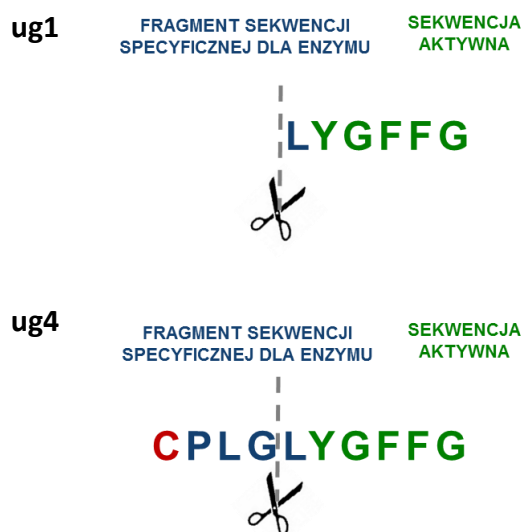
Uwzględniając wysoką aktywność biologiczną przy niskim koszcie syntezy oraz prostą, krótką sekwencję, peptyd **ug1** został wybrany jako optymalny kandydat do dalszych badań funkcjonalnych oraz modyfikacji chitozanu. Choć jego stabilność chemiczna w środowisku wodnym i pożywcze była ograniczona, nie była ona czynnikiem dyskwalifikującym. W kontekście zastosowań biomedycznych kluczowe znaczenie ma skuteczność działania biologicznego, a niekiedy już krótki impuls sygnałowy wystarcza do inicjacji procesu regeneracji. Z tego względu peptyd **ug1** został wykorzystany do dalszych eksperymentów, w których został kowalencyjnie sprzężony z chitozanem.

Tabela 12. Porównanie kosztów syntezy peptydów **ug1**, **ug8**, **ug9** i **ug26** (0,1 mmol; stan na 05.07.2024).

Odczynniki	Koszty [zł]			
	ug1	ug8	ug9	ug26
Aminokwasy (Iris Biotech)	6,94	36,31	35,74	57,35
Reagenty (Iris Biotech)	4,45	9,45	9,45	8,97
DMF (POCH)	21,61	41,02	41,02	37,45
Żywica (CEM Corporation)	47,63	47,63	47,63	47,63
Średni koszt syntezy peptydu	80,63	134,40	133,84	151,40

6. Analiza miejsca cięcia enzymatycznego peptydu **ug4** przez metaloproteinazę 7 (MMP-7)

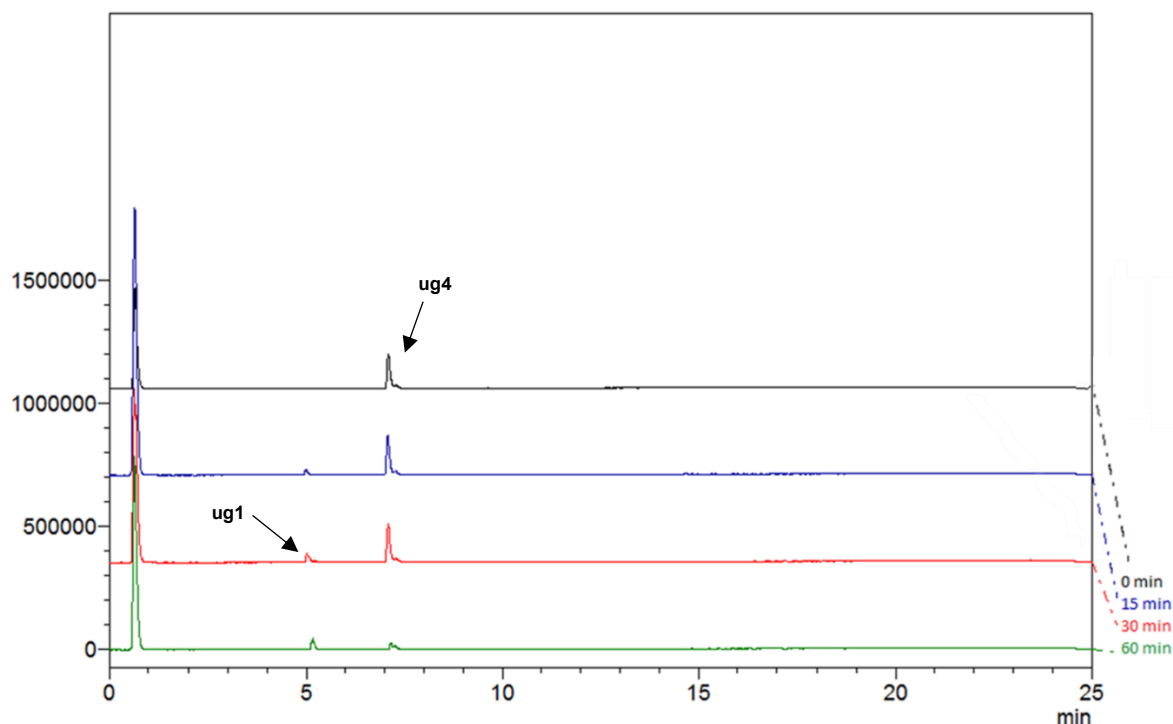
Peptyd zawierający sekwencję aktywną peptydu **ug1** (LYGFFG) oraz sekwencję specyficzną dla enzymu MMP-7 (PLGL), z dodatkową resztą cysteiny (Cys) z wolną grupą tiolową na *N*-końcu, został oznaczony jako **ug4** (CPLGLYGFFG) (Rysunek 42). Dzięki dodatkowej cysteinie możliwe było jego późniejsze kowalencyjne połączenie z łącznikiem maleimidowym.



Rysunek 42. Porównanie sekwencji peptydów **ug1** i **ug4** z zaznaczonym miejscem hydrolizy wiązania peptydowego przez enzym MMP-7.

Celem kolejnego etapu badań było określenie dokładnego miejsca rozszczepienia peptydu **ug4** i potwierdzenie, czy w wyniku działania enzymu uwalniana jest sekwencja aktywna odpowiadająca peptydowi **ug1**. W tym celu peptyd **ug4** został poddany inkubacji z enzymem MMP-7 w roztworze wodnym, zgodnie z opisem w rozdziale III.4.

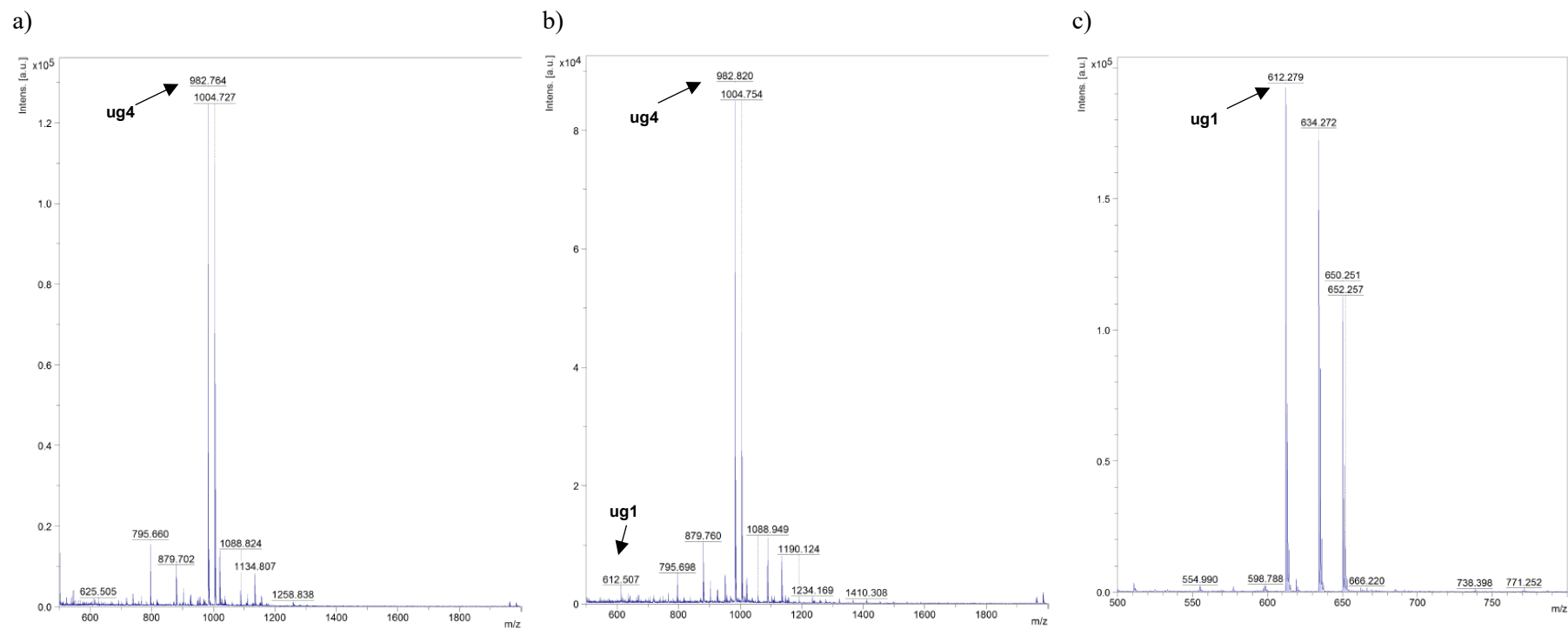
Analiza prób za pomocą techniki RP-HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3) wykazała, że po 15, 30 i 60 minutach inkubacji z enzymem pojawia się dodatkowy pik odpowiadający czasowi retencji peptydu **ug1**, przy jednoczesnym spadku intensywności piku **ug4** (Rysunek 43).



Rysunek 43. Chromatogram RP–HPLC próbek peptydu **ug4** po inkubacji z MMP–7 w czasie: 0 min (czarny), 15 min (niebieski), 30 min (czerwony), 60 min (zielony). Obserwowano stopniowy zanik sygnału peptydu **ug4** oraz pojawienie się pików odpowiadających peptydowi **ug1**, co wskazuje na postępujące trawienie enzymatyczne.

Dodatkowo, analiza spektrometrii mas (MALDI–TOF) potwierdziła obecność produktu rozszczepienia o masie odpowiadającej peptydowi **ug1**. W próbce 0–minutowej widoczne były jedynie sygnały charakterystyczne dla peptydu **ug4** ((m/z) $[M+H]^+ = 982,764$; (m/z) $[M+Na]^+ = 1004,727$) (Rysunek 44a). Po 15 minutach pojawił się dodatkowy pik odpowiadający peptydowi **ug1** ((m/z) $[M+H]^+ = 612,507$) (Rysunek 44b), a po 60 minutach zaobserwowałam jedynie sygnały odpowiadające peptydowi **ug1** ((m/z) $[M+H]^+ = 612,279$; (m/z) $[M+Na]^+ = 634,272$; (m/z) $[M+K]^+ = 650,251$) (Rysunek 44c).

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że enzymatyczna hydroliza peptydu **ug4** przez MMP–7 zachodzi w miejscu zgodnym z przewidywaną specyficznością enzymu, prowadząc do uwolnienia aktywnego peptydu **ug1**. To potwierdza prawidłowość projektu konstrukcji peptydu **ug4** jako nośnika z kontrolowanym uwalnianiem aktywnego fragmentu w odpowiedzi na działanie enzymu.

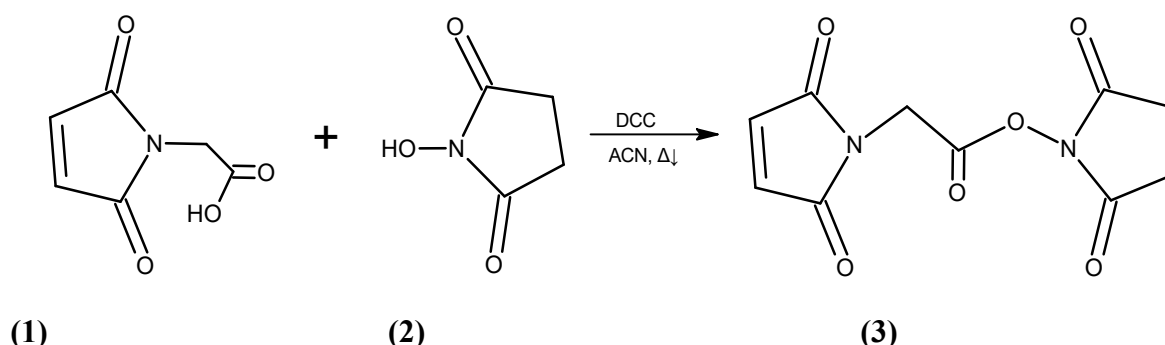


Rysunek 44. Widmo masowe MALDI-TOF peptydu **ug4** po inkubacji z enzymem MMP-7: a) 0 min b) 15 min c) 60 min.

7. Synteza estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu 2-maleimidooctowego (estru aktywnego maleimidoglicyny – Mal-Gly-OSu)

W kolejnym etapie mojej pracy doktorskiej zsyntezowałam ester aktywny kwasu 2-maleimidooctowego (Mal-Gly-OSu). Związek ten był potrzebny do koniugacji maleimidoglicyny z chitozanem.

Reakcję syntezy Mal-Gly-OSu przeprowadziłam poprzez kondensację kwasu 2-maleimidooctowego **(1)** z *N*-hydroksysukcynimidem **(2)** w obecności *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) (Rysunek 45). Naważki substratów rozpuściłam w acetonitrylu (ACN) w kolbie okrągłodennej, a następnie prowadziłam reakcję z mieszaniem magnetycznym. DCC dodawałam porcjami przez około 3–4 godziny, utrzymując kolbę w chłodzeniu ($\Delta\downarrow$), a następnie kontynuowałam reakcję przez kolejne 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji, powstały osad dicykloheksylomocznika odsączyłam na lejku Schotta. Z przesączu, zawierającego produkt reakcji, wytrąciłam osad za pomocą eteru dietylowego. Uzyskany produkt – ester *N*-hydroksysukcynimidowy kwasu 2-maleimidooctowego **(3)** (Mal-Gly-OSu) – odsączyłam i wysuszyłam na powietrzu.



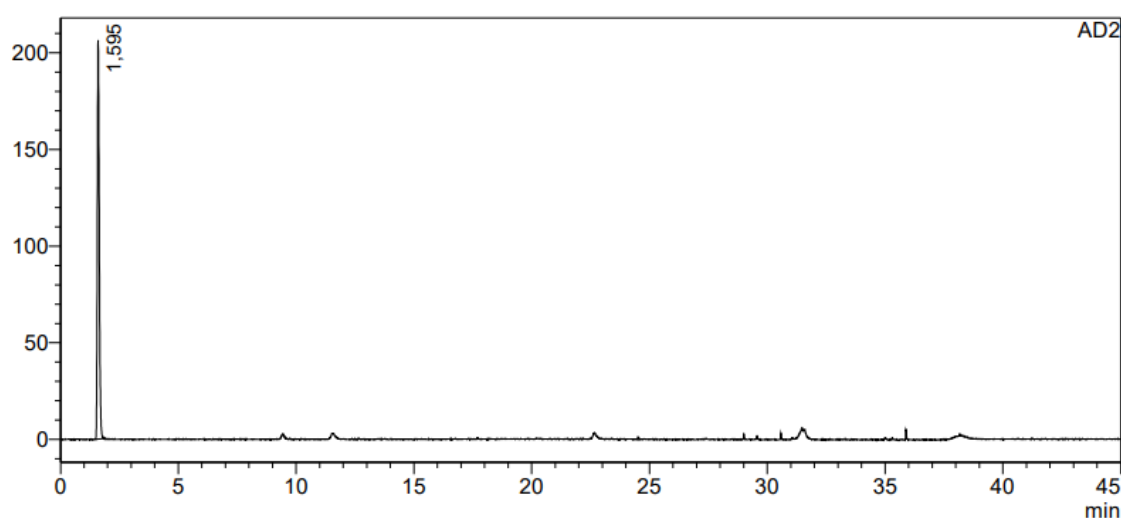
Rysunek 45. Schemat reakcji syntezy estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu 2-maleimidooctowego (Mal-Gly-OSu) z wykorzystaniem kwasu 2-maleimidooctowego, *N*-hydroksysukcynimidu i DCC jako czynnika kondensującego.

Kontrolę przebiegu reakcji i czystości produktu przeprowadziłam metodą chromatografii cieczowej (RP-HPLC) (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3) – retencja $t_r = 1,6$ min (Rysunek 46). Strukturę związku potwierdziłam za pomocą spektroskopii FTIR oraz ^1H NMR.

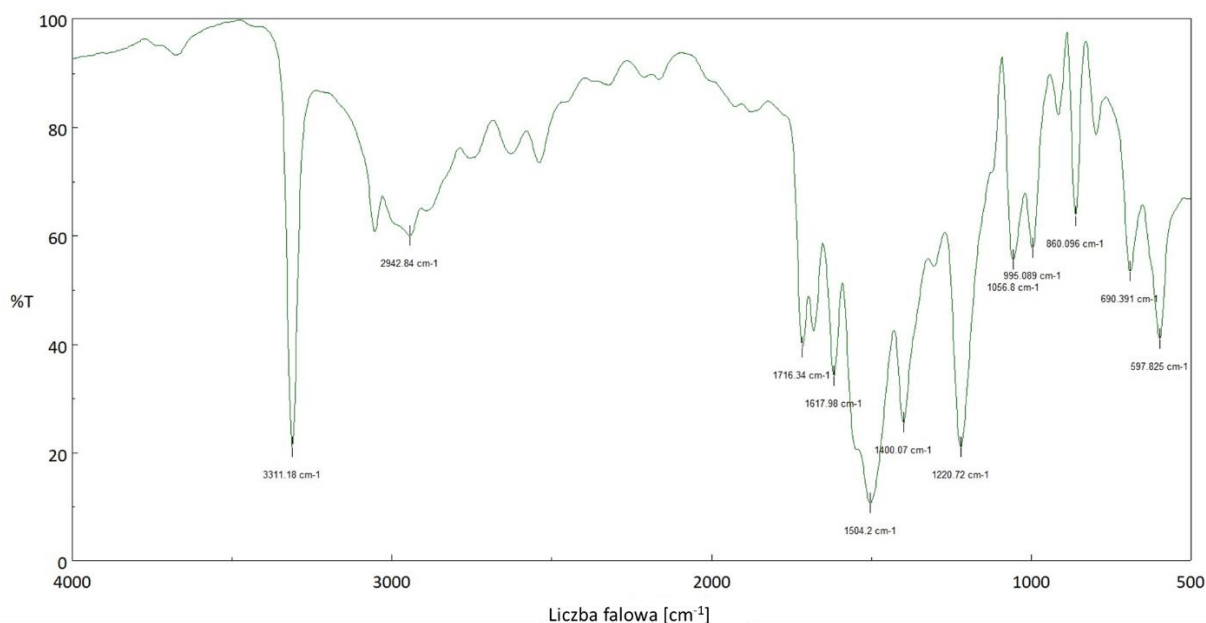
Widmo IR związku Mal-Gly-OSu potwierdza jego strukturę: obecne są charakterystyczne pasma C=O estru i pierścieni imidowych (1716 i 1691 cm^{-1}), pasmo

C=C układu maleimidowego (1584 cm^{-1}), pasma C–O–C ($1232\text{--}1222\text{ cm}^{-1}$) oraz pasma deformacyjne C–H i pierścieniowe ($989\text{--}887\text{ cm}^{-1}$). Dodatkowo zaobserwowałam szerokie, średnio intensywne pasmo przy 3311 cm^{-1} (możliwe ślady wilgoci lub grup OH/NH) oraz ostre, słabe pasmo przy 2942 cm^{-1} (rozciągające C–H grup alifatycznych) (Rysunek 47). Widmo ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) związku Mal–Gly–OSu potwierdza jego strukturę: obserwowane sygnały odpowiadają protonom układu maleimidowego (δ 7,2 ppm, s, CH=CH), grupie metylowej przy wiązaniu estrowym (δ 4,72 ppm, s, CH_2) oraz protonom pierścienia bursztynimidowego (δ 2,81 ppm, s, CH_2). Sygnał przy $\delta = 3,3$ ppm prawdopodobnie odpowiada śladowym ilościom wody pochodzącym z DMSO (Rysunek 48).

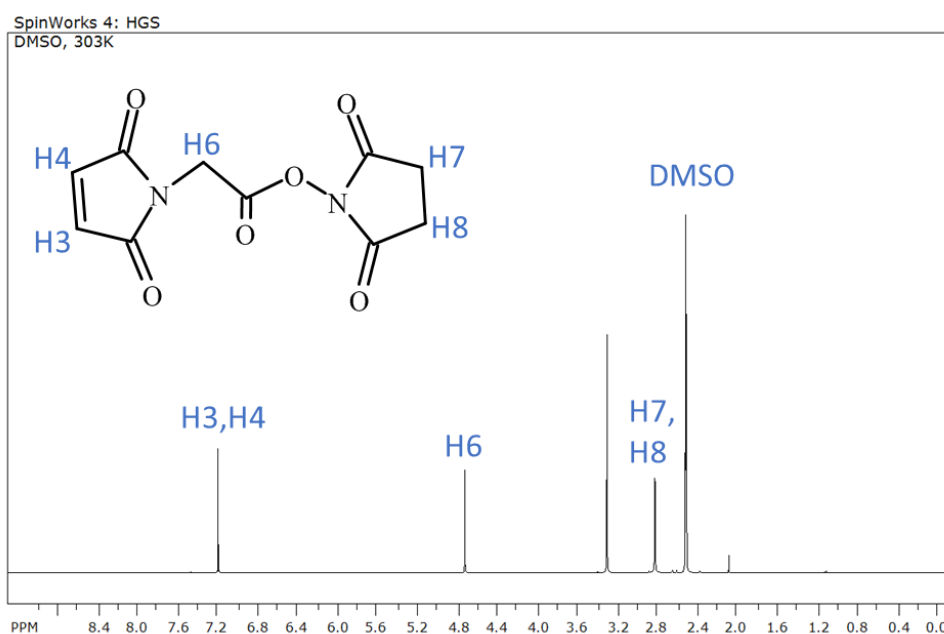
mV



Rysunek 46. Chromatogram RP–HPLC estru *N*–hydroksysukcynimidowego kwasu 2–maleimidooctowego (Mal–Gly–OSu). Czas retencji produktu głównego: $t_r = 1,6$ min.



Rysunek 47. Widmo transmisyjne w podczerwieni (FTIR) estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu 2-maleimidooctowego (Mal-Gly-OSu) z charakterystycznymi pasmami C=O (1716, 1691 cm^{-1}), C=C (1584 cm^{-1}), C-O-C (1232–1222 cm^{-1}), pasmami deformacyjnymi C-H i pierścieniowymi (989–887 cm^{-1}) oraz sygnałami przy 3311 i 2942 cm^{-1} .



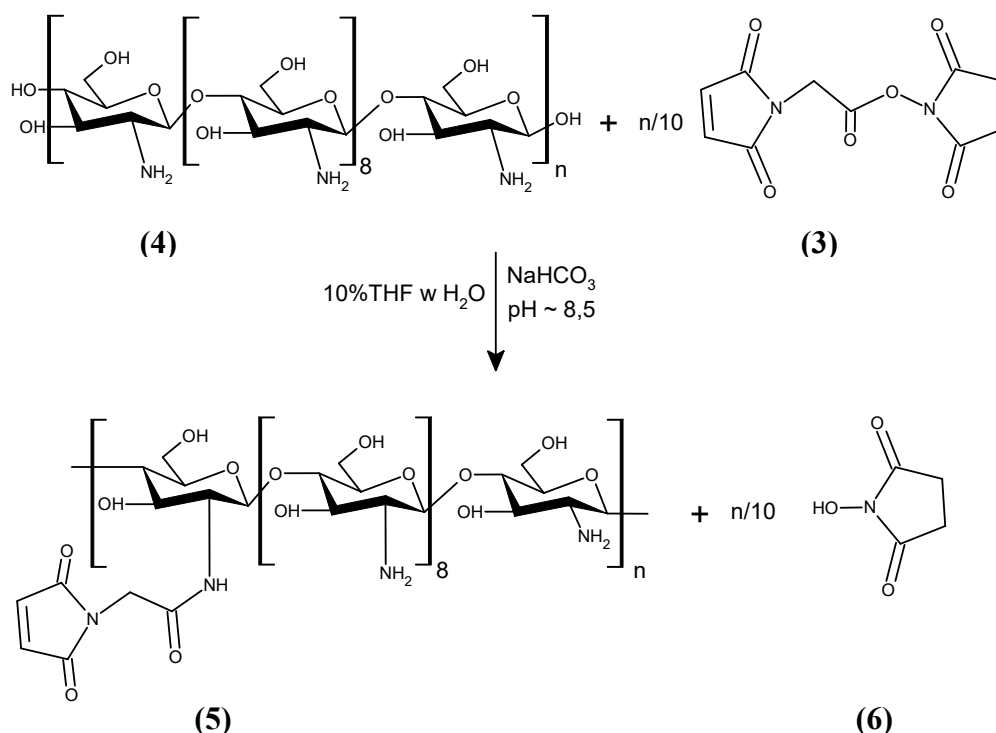
Rysunek 48. Widmo ^1H NMR estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu 2-maleimidooctowego (Mal-Gly-OSu) w DMSO- d_6 , z przypisaniem sygnałów: $\delta = 7,2$ ppm (s, CH=CH), $\delta = 4,72$ ppm, (s, CH_2), $\delta = 3,3$ ppm (sygnał od śladowej wody w DMSO), $\delta = 2,81$ ppm (s, CH_2 z pierścienia bursztynimidowego).

8. Modyfikacja chemiczna chitozanu estrem aktywnym kwasu 2-maleimidooctowego

Kolejnym etapem moich badań była kowalencyjna modyfikacja chitozanu z wykorzystaniem łącznika maleimidowego, tj. estru aktywnego kwasu 2-maleimidooctowego, w celu otrzymania maleimidochitozanu (CH-Mal-Gly) (Rysunek 49). Do syntezy wybrałam chitozan 95/2000, charakteryzujący się wysokim stopniem deacetylacji ($DD \geq 92,6\%$) oraz lepkością dynamiczną w zakresie 1751–2250 mPa·s, podawaną przez producenta dla 1% roztworu w 20°C.

Pierwotnie rozważano zastosowanie chitozanu 75/500, jednak jego niższy stopień deacetylacji ograniczał aktywność biologiczną, zwłaszcza przeciwbakteryjną. Zmiana na chitozan 95/2000 została podyktowana wynikami badań zespołu dr Moniki Biernat z Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Sieć Badawcza Łukasiewicz, który wykazał, że chitozan o wyższym DD i średniej lepkości (2000 mPa·s) cechuje się korzystniejszymi właściwościami aplikacyjnymi – szczególnie w zakresie bioaktywności i stabilności sieciowania. Wybór tej konkretnej wersji umożliwił także uzyskanie chitozanu o odpowiedniej rozpuszczalności i reologii, istotnej dla dalszej modyfikacji.

Reakcję syntezy chitozanu **(4)** z estrem aktywnym *N*-hydroksysukcynimidowym kwasu 2-maleimidooctowego **(3)** przeprowadziłam zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 49. W wyniku reakcji otrzymałam produkt modyfikowany – chitozan zmodyfikowany pochodną maleimidoglicyny **(5)**.



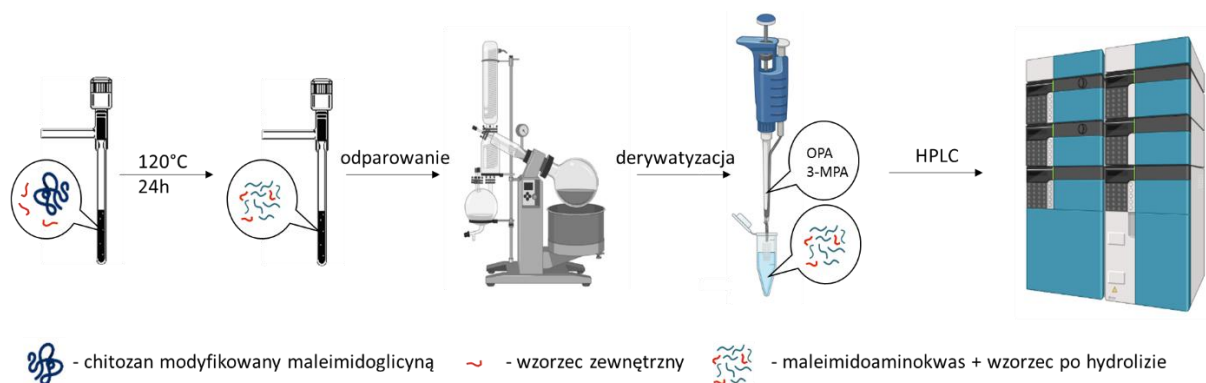
Rysunek 49. Modyfikacja chitozanu poprzez amidowanie z estrem *N*-hydroksysukcynimidowym kwasu 2-maleimidooctowego, prowadząca do otrzymania CH-Mal-Gly.

9. Analiza stopnia modyfikacji chitozanu maleimidoglicyną (Mal-Gly) metodą pośrednią

W celu określenia efektywności modyfikacji chemicznej chitozanu oraz oszacowania stopnia podstawienia, opracowałam metodę analityczną opartą na ilościowym oznaczaniu glicyny – fragmentu strukturalnego łącznika maleimidoglicynowego – po uprzedniej hydrolizie próbki. Metoda ta pozwalała na pośrednie wyznaczenie ilości przyłączonego kwasu

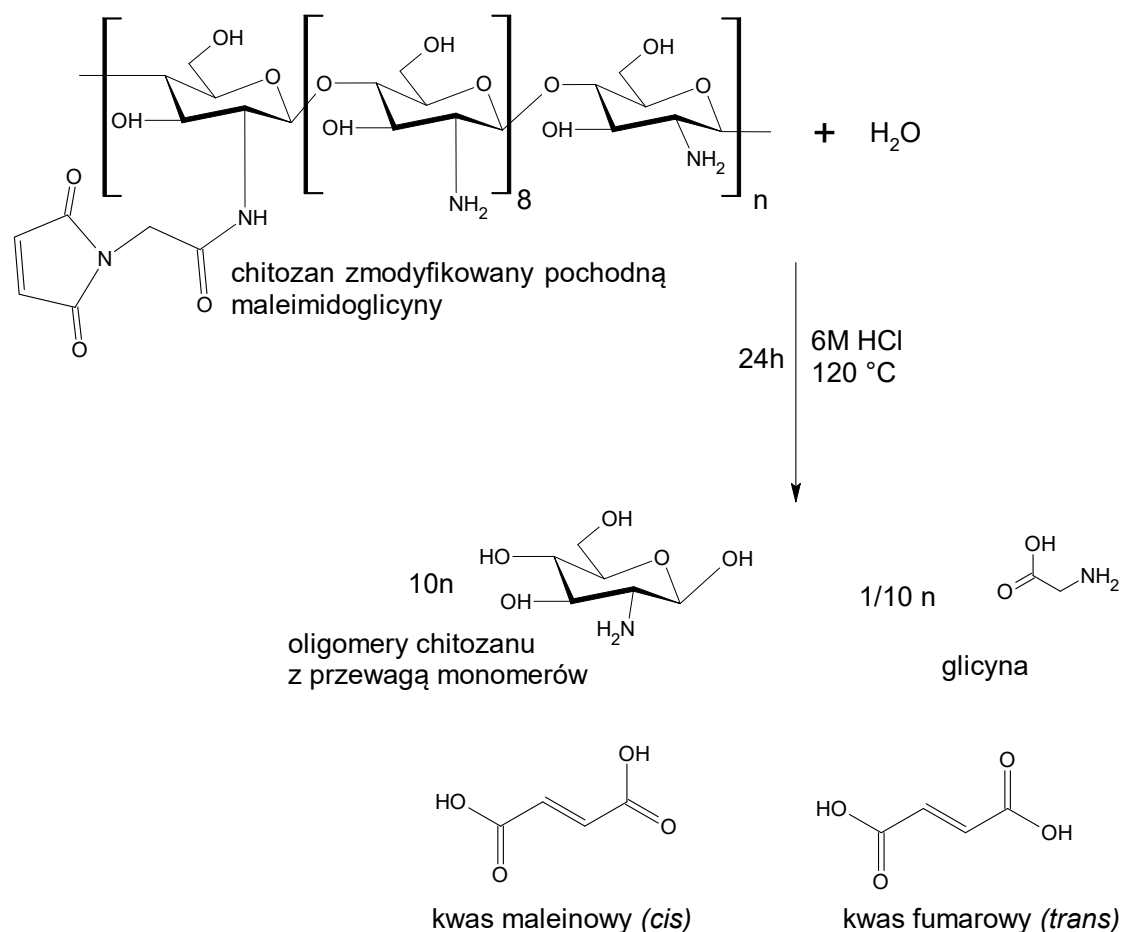
2-maleimidooctowego poprzez analizę obecności glicyny jako markera modyfikacji.

Pierwszą wykorzystaną przeze mnie metodą do oceny ilościowej glicyny w zmodyfikowanym chitozanie była hydroliza próbki, a następnie jej derywatyzacja. Na Rysunku 50 przedstawiłam kolejne etapy postępowania w oznaczaniu zawartości glicyny w CH-Mal-Gly.



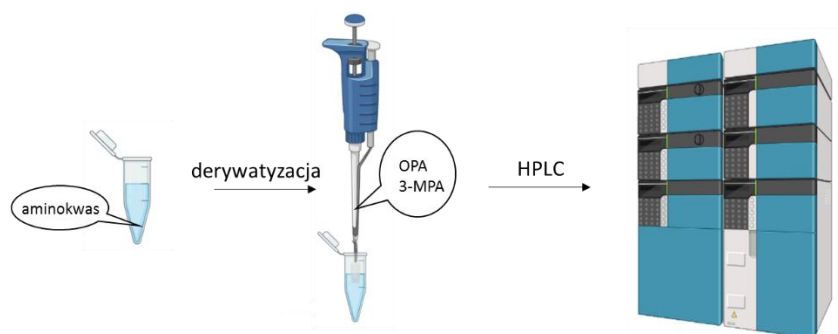
Rysunek 50. Kolejne etapy postępowania podczas ilościowego oznaczania glicyny w CH-Mal-Gly z wykorzystaniem derywatywacji.

Hydrolizę próbek przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.8.1 (Rysunek 51). Jako wzorzec wewnętrzny zastosowałam roztwór norleucyny. Po zakończonej hydrolizie próbkę rozpuściłam w buforze $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ i dodałam odczynniki derywatyzujące zgodnie z proporcjami zestawionymi w Tabeli 13. Analizę produktów derywatywacji przeprowadziłam metodą RP-HPLC (warunki chromatograficzne zawarłam w Załączniku 1 – Warunki chromatograficzne 3), rejestrując chromatogramy przy długości fali 334 nm (szczegóły w rozdziale III.8.2).



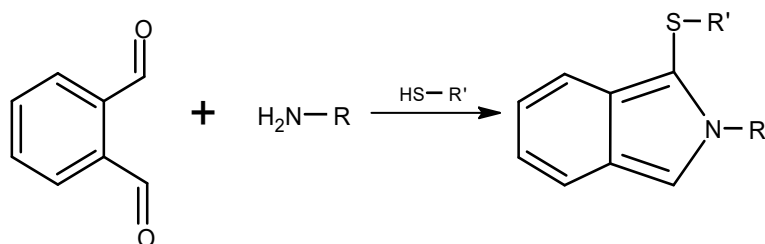
Rysunek 51. Schemat hydrolizy chitozanu zmodyfikowanego pochodną maleimidoglicyny w warunkach kwaśnych (6 M HCl, 120°C, 24 h) wraz z produktami reakcji.

W celu opracowania odpowiednich warunków derywatyзації przeprowadziłam walidację metody oznaczania glicyny, wykorzystując kwas 3–merkaptopropanowy (3–MPA) oraz aldehyd o–ftalowy (OPA). Analizę przeprowadziłam w oparciu o wyniki przedstawione przez zespół H. Cuchiario [202], co zilustrowałam na Rysunku 52.



Rysunek 52. Kolejne etapy postępowania podczas ilościowego oznaczania aminokwasów z wykorzystaniem metody derywatyżacji.

Poniżej przedstawiłam ogólną reakcję derywatyzacji aminokwasów z udziałem OPA i 3-MPA (Rysunek 53).



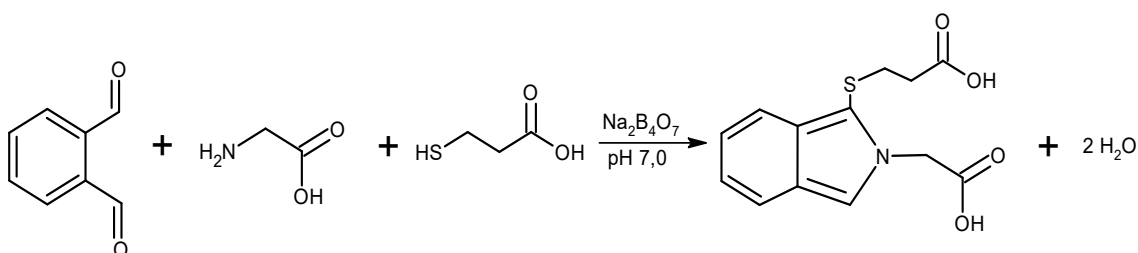
Rysunek 53. Ogólny schemat reakcji derywatyzacji związków ftalimidowych.

W ramach walidacji modyfikowałam ilości i stosunki odczynników reakcji, testując różne warianty przedstawione w Tabeli 13.

Tabela 13. Dobór ilości reagentów do walidacji metody derywatyzacji.

Nr.	Ilości reagentów				
1.	20–100 μmol Gly	:	4 mmol OPA	:	12 mmol 3–MPA
2.	200–1000 μmol Gly	:	4 mmol OPA	:	12 mmol 3–MPA
3.	200–1000 μmol Gly	:	40 mmol OPA	:	120 mmol 3–MPA
4.	0,25 μmol Gly	:	4 mmol OPA	:	12 mmol 3–MPA
5.	0,25 μmol standardu aminokwasowego	:	4 mmol OPA	:	12 mmol 3–MPA
6.	2,5 μmol standardu aminokwasowego	:	4 mmol OPA	:	12 mmol 3–MPA

Schemat reakcji derywatyzacji glicyny z wykorzystaniem MPA i OPA przedstawiłam na Rysunku 54.



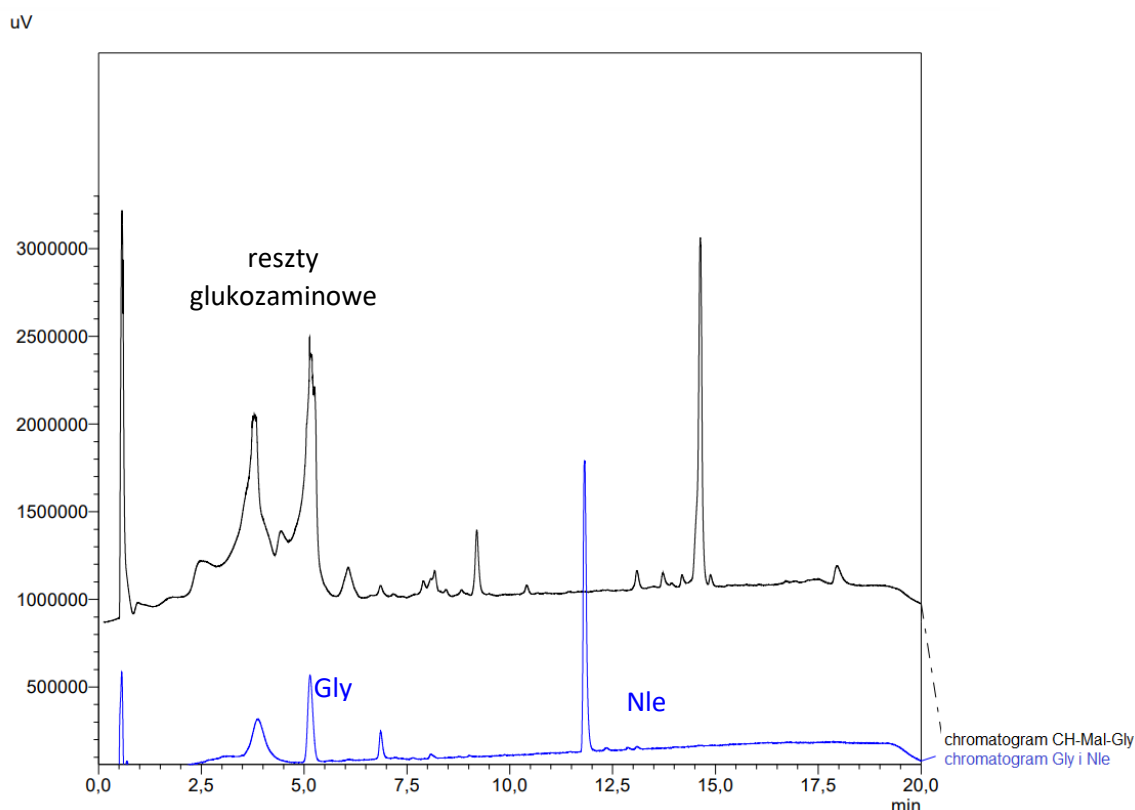
Rysunek 54. Reakcja derywatyzacji glicyny z wykorzystaniem kwasu 3-merkaptopropanowego (MPA) i aldehydu o-ftalowego (OPA).

Reakcje oznaczone jako 1–3 okazały się nieskuteczne – nie zaobserwowałam sygnału pochodzącego od zderywatyzowanej glicyny, jedynie sygnały od wolnych

reagentów (OPA i 3-MPA). Dopiero przy zastosowaniu warunków z wariantu 4 uzyskałam wyraźny sygnał od glicyny. Następnie zderywatyzowałam norleucynę jako wzorzec wewnętrzny, zachowując identyczne proporcje reagentów.

Kolejnym etapem było oznaczenie produktów hydrolizy chitozanu zmodyfikowanego maleimidoglicyną. Aby przygotować próbkę, obliczyłam ilość glicyny spodziewaną po hydrolizie na podstawie ilości przyłączonego kwasu 2-maleimidooctowego (założyłam stechiometryczny stosunek 1:1 dla chitozanu i Mal-Gly). Do każdej próbki dodałam norleucynę w tej samej ilości. Po hydrolizie przeprowadziłam derywatyzację, stosując wariant 4 z Tabeli 13.

Zaobserwowałam jednak, że fragmenty glukozaminowe pochodzące z chitozanu również ulegały derywatyzacji, generując intensywne sygnały w chromatogramie. Sygnały te częściowo nakładały się na sygnał glicyny. Na Rysunku 55 przedstawiłam porównanie chromatogramów próbki hydrolizowanego CH-Mal-Gly (czarny) oraz wzorców glicyny i norleucyny (niebieski). Czas retencji sygnałów glukozaminowych wynosił 2,5–5,5 min, natomiast glicyna pojawiała się przy 5,1 min.



Rysunek 55. Chromatogram próbek CH–Mal–Gly (czarny) i aminokwasów glicyny i norleucyny (niebieski) poddanych derywatywacji.

Rozcieńczenie próbki oraz modyfikacja warunków chromatograficznych nie pozwoliły na rozdzielenie sygnału glicyny od pozostałych. W związku z tym podjęłam decyzję o poszukiwaniu alternatywnej metody oznaczania stopnia podstawienia chitozanu.

10. Oznaczanie stopnia podstawienia chitozanu pochodną maleimidoglicyny (Mal–Gly) metodą bezpośrednią z wykorzystaniem chromatografii HILIC

Zastosowana metoda pośrednia, oparta na derywatywacji glicyny, pozwoliła na oszacowanie przybliżonego stopnia modyfikacji chitozanu. Jednak ze względu na istotne ograniczenia – przede wszystkim interferencję zderywatyzowanych fragmentów glukozaminowych – konieczne było opracowanie alternatywnego podejścia analitycznego. W kolejnym etapie badań skupiłam się na opracowaniu metody bezpośredniego oznaczania glicyny w próbkach chitozanu, z pominięciem etapu derywatywacji.

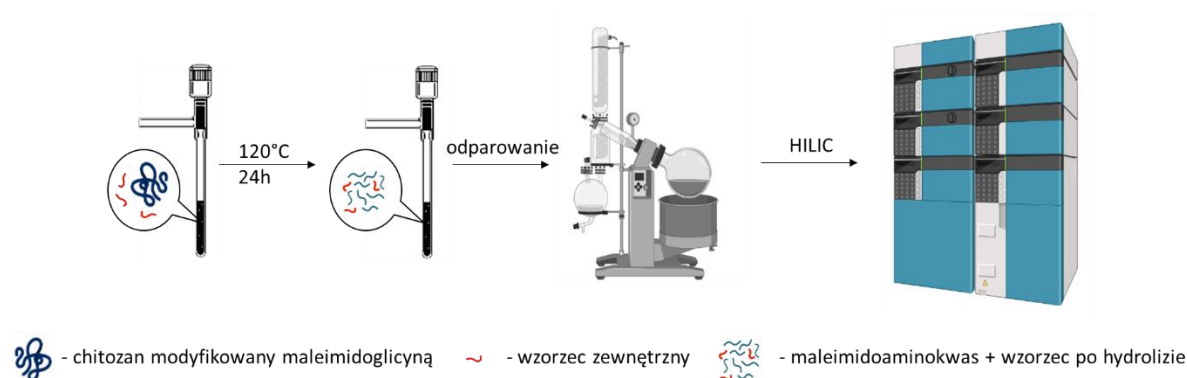
Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – HILIC) to technika umożliwiająca rozdział polarnych związków, w tym

słabych kwasów i zasad [203]. Metoda ta okazała się użyteczna w analizie aminokwasów bez potrzeby ich derywatyzacji, dlatego wykorzystałam ją do oceny stopnia modyfikacji chitozanu pochodną maleimidoglicyny.

Oparłam się na metodzie opisanej przez Socia [204], która zakładała rozdział mieszaniny aminokwasów w czasie 18 minut oraz ich ilościowe oznaczenie w hydrolizatach białkowych. Zastosowano w niej chromatografię UHPLC z detektorem wyładowań koronowych (CAD), amidową fazę stacjonarną i fazę ruchomą opartą na buforze mrówczanowym i acetonitrylu.

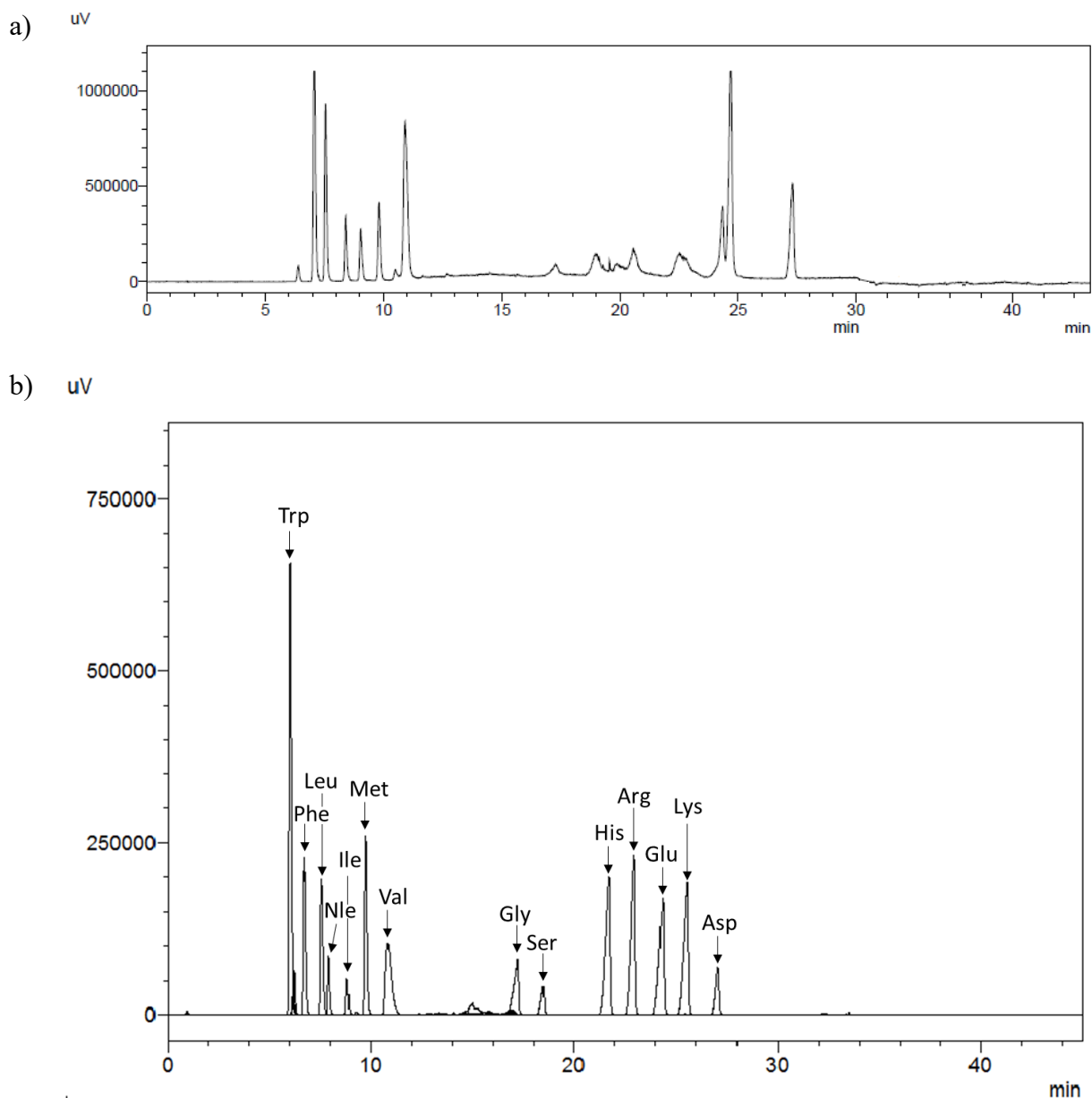
W celu odtworzenia tych warunków zastosowałam system HPLC z detektorami ELSD i PDA oraz kolumnę bioZen Glycan (Phenomenex) o parametrach 2,6 μm , 100 Å, 2,1 $\times$ 150 mm. Zmodyfikowałam jednak warunki mobilnej fazy – zamiast zmiennego gradientu stężenia buforu, użyłam stałego stężenia soli i jednakowego składu buforu w obu eluentach. Skład fazy mobilnej był następujący: A: 0,5 M mrówczan amonu, 0,5 M kwas mrówkowy, 90% ACN w wodzie; B: 0,5 M mrówczan amonu, 0,5 M kwas mrówkowy, 75% ACN w wodzie

Natężenie przepływu wynosiło 0,25 ml/min, a czas analizy – 45 minut (szczegóły: Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 4). Tak zoptymalizowane warunki pozwoliły na uzyskanie stabilnej linii podstawowej oraz dobrego rozdziału aminokwasów w szerokim zakresie. Na Rysunku 56 przedstawiłam procedurę ilościowego oznaczania glicyny w CH–Mal–Gly metodą bezpośrednią.



Rysunek 56. Schemat procedury bezpośredniego oznaczania glicyny w CH–Mal–Gly przy użyciu chromatografii HILIC, bez konieczności derywatyzacji próbki.

Na Rysunku 57a przedstawiłam chromatogram rozdzału komercyjnego standardu aminokwasowego (2,5 $\mu\text{mol/ml}$ w 0,1 N HCl, ThermoFisher), który umożliwia identyfikację i przypisanie czasów retencji poszczególnych aminokwasów. Natomiast na Rysunku 57b zaprezentowałam chromatogramy pojedynczych próbek aminokwasowych, co umożliwiło jednoznaczną identyfikację glicyny i norleucyny.



Rysunek 57. Chromatogramy uzyskane w analizie HILIC: a) rozdzał mieszaniny komercyjnego standardu aminokwasowego (2,5 $\mu\text{mol/ml}$, 0,1 N HCl), b) rozdzał pojedynczych aminokwasów umożliwiający identyfikację czasu retencji glicyny i wzorca wewnętrznego – norleucyny (Nle).

11. Optymalizacja procesu modyfikacji chitozanu pochodną maleimidoglicyny

11.1 Wprowadzenie i założenia optymalizacji

Zaimplementowana metoda oznaczania glicyny z wykorzystaniem chromatografii HILIC pozwoliła mi na wiarygodne i powtarzalne określenie stopnia modyfikacji pochodnej maleimidoglicyny na chitozanie, bez konieczności stosowania derywatywacji. Dzięki temu narzędziu analitycznemu możliwe było przystąpienie do kolejnego etapu badań, którego celem była optymalizacja warunków reakcji modyfikacji chitozanu. Szczególną uwagę poświęciłam wpływowi ilości estru Mal-Gly-OSu oraz warunków reakcji na efektywność sprzęgania i uzyskany stopień modyfikacji.

W celu opracowania powtarzalnej i wydajnej procedury modyfikacji przeprowadziłam serię reakcji, zmieniając stosunek molowy estru do chitozanu oraz objętość mieszaniny reakcyjnej. Zestawienie warunków przedstawiłam w Tabeli 14. Nazewnictwo próbek zostało opracowane w sposób systematyczny, pozwalający na jednoznaczną identyfikację zarówno zastosowanej procedury modyfikacji, jak i numeru syntezy.

Tabela 14. Warunki przeprowadzonych procedur reakcji przyłączania kwasu 2-maleimidooctowego do chitozanu.

Nr procedury	Zakładany stopień modyfikacji CH	Stosunek molowy CH : Mal-Gly-OSu	Masa chitozanu	Masa Mal-Gly-OSu	Objętość mieszaniny reakcyjnej	Nazwa próbki	Wydajność reakcji sprzęgania
1.	~50%	1 : 0,5	100 mg	75,6 mg	5 ml	CH-m1	88,27%
2.	~25%	1 : 0,25	50 mg	19,2 mg	35 ml	CH-m2.1	78,14%
						CH-m 2.2	81,05%
						CH-m2.3	72,30%
						CH-m2.4	73,80%
3.	~15	1 : 0,15	500 mg	113 mg	150 ml	CH-m3.1	22,98%
						CH-m3.2	38,51%
						CH-m3.3	24,41%
4.	~10%	1 : 0,1	200 mg	30,8 mg	65 ml	CH-m4.1	76,66%
			500 mg	77 mg	160 ml	CH-m4.2	87,52%
			1 g	154 mg	315 ml	CH-m4.3	86,66%
			3,2 g	493 mg	1000 ml	CH-m4.4	89,36%
			2,59 g	400	810 ml	CH-m4.5	83,61%
			1,2 g	185	375 ml	CH-m4.6	79,43%
			1 g	154	315 ml	CH-m4.7	84,06%
5.	~5%	1 : 0,05	200 mg	15,4 mg	60 ml,	CH-m5.1	83,57%
			1 g	77 mg	300 ml	CH-m5.2	84,96%

Szczegółowy przebieg procesu optymalizacji oraz opis reakcji prowadzonych zgodnie z procedurami 1, 2, 3 i 5 zawarto w Załączniku 2. Spośród nich, procedura nr 4 wykazała najwyższą efektywność oraz największą powtarzalność, dlatego została szczegółowo opisana w dalszej części rozdziału. Uzyskany w jej wyniku produkt CH–Mal–Gly posłużył jako substrat do kolejnej modyfikacji z użyciem peptydu **ug4**.

11.2 Procedura nr 4 – zakładana modyfikacja 10% (optymalna)

Czwarte podejście polegało na zmodyfikowaniu chitozanu zgodnie z procedurą nr 4 opisaną w Tabeli 14, zakładającą modyfikację na poziomie 10%. Do tego etapu przystąpiłam po uzyskaniu satysfakcjonujących wyników w poprzednim eksperymencie – dla próbki CH–m3.2 – gdzie stopień modyfikacji był zbliżony do założonego.

W ramach optymalizacji warunków zmieniałam stosunek reagentów, przy zachowaniu stałych parametrów reakcji, takich jak: mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego, niskie stężenie chitozanu (w celu redukcji lepkości roztworu) oraz zastosowanie dużej ilości wody do odmywania produktu reakcji. W celu ograniczenia strat produktu, wynikających z jego przenikania przez sączone lejka Schotta, zastosowałam dodatkowo sączone ilościowy.

Pierwszą reakcję w tych warunkach przeprowadziłam dla 200 mg chitozanu. Po analizie ilościowej ustaliłam, że średni stopień modyfikacji chitozanu wynosił 11,3%. Do odsączania produktu od roztworu ponownie użyłam lejka Schotta, tym razem z dodatkowym sączkiem ilościowym o średniej porowatości. Zabieg ten znacząco poprawił wydajność reakcji, która wyniosła ponad 75%, oraz zredukował ilość produktu traconego podczas filtracji. Wadą zastosowanego rozwiązania okazało się jednak szybkie zużycie sączków, zwłaszcza przy większych próbkach.

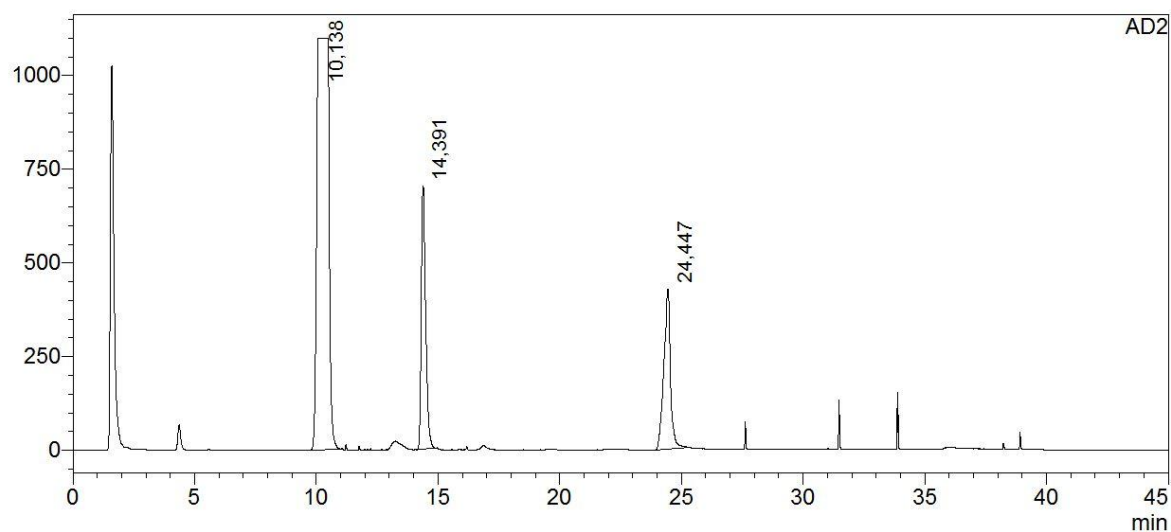
Ze względu na wysoką efektywność i powtarzalność procedury nr 4, przeprowadziłam serię powtórzeń z użyciem różnych ilości polimeru – od 500 mg do ponad 3 g (Tabela 14). W celu dalszego usprawnienia procesu, zastosowałam sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem, wykorzystując zestaw z wymiennymi filtrami o porowatości 0,45 μm . Rozwiązanie to znacząco ułatwiło proces odmywania (około 1 l wody na 0,5 g chitozanu użytego w reakcji), poprawiło całkowitą wydajność oraz zmniejszyło straty próbki.

Uzyskane wyniki wskazują, że przy zastosowanym stosunku molowym CH : Mal–Gly–OSu równym 1:0,1, modyfikacja chitozanu zachodziła w sposób zdecydowanie bardziej równomierny (Tabela 18), większość oznaczeń stopnia modyfikacji między 8–12% (CH–m4.3 został wykluczony z dalszych badań). Na Rysunku 58 przedstawiłam chromatogram jednej z próbek CH–Mal–Gly (CH–m4.4) po hydrolizie.

Tabela 18. Stopień modyfikacji dla CH–m4.1 – CH–m4.7

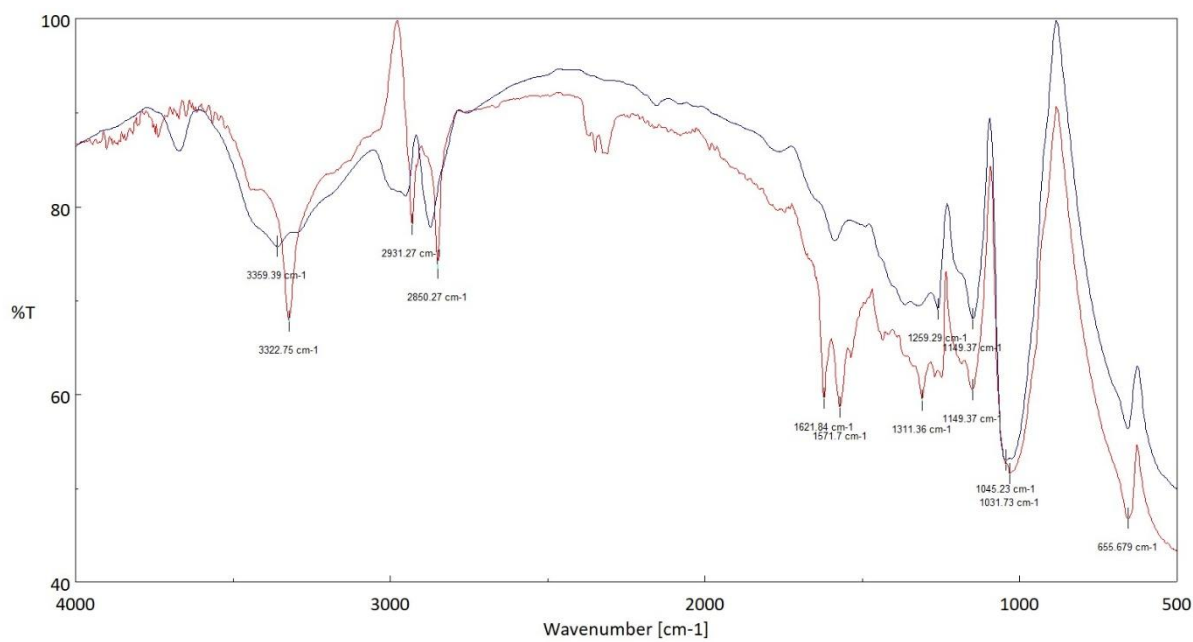
Nazwa próbki	Obliczony stopień modyfikacji [%]	Średni stopień modyfikacji [%] (średnia z trzech oznaczonych próbek)
CH–m4.1	8,47	11,30 ± 3,55
	16,30	
	9,13	
CH–m4.2	8,26	10,57 ± 1,90
	12,92	
	10,52	
CH–m4.3	20,43	15,88 ± 3,74
	11,27	
	15,95	
CH–m4.4	8,55	10,32 ± 2,47
	13,81	
	8,61	
CH–m4.5	16,98	12,21 ± 4,12
	12,70	
	6,93	
CH–m4.6	7,61	9,10 ± 2,32
	12,37	
	7,31	
CH–m4.7	8,35	8,60 ± 1,62
	6,76	
	10,70	

mV



Rysunek 58. Chromatogram próbki CH-m4.4 (Tabela 14, nr.4) po hydrolizie (CH: $t_r=10,138$ / Nle: $t_r=14,391$ / Gly: $t_r=24,447$).

Analiza FTIR potwierdziła modyfikację – w widmie zmodyfikowanego chitozanu pojawiły się pasma w zakresie $1600\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$, charakterystyczne dla grup karbonylowych maleimidu (Rysunek 59).



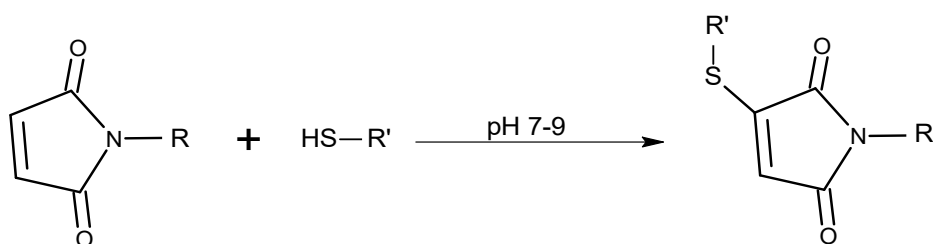
Rysunek 59. Widmo transmisyjne w podczerwieni (FTIR) chitozanu (granatowy) i chitozanu zmodyfikowanego pochodną maleimidoglicyny z charakterystycznymi pasmami C=O (1621 cm^{-1}).

Spośród wszystkich testowanych warunków, procedura nr 4 okazała się najefektywniejsza i najbardziej powtarzalna. Uzyskałam stopnie modyfikacji najbliższe założonym wartościom oraz wysoką wydajność reakcji. Zoptymalizowane parametry filtracji i odmywania odegrały kluczową rolę w sukcesie tej procedury.

Do dalszych badań – obejmujących sprzęganie chitozanu z peptydami proregeneracyjnymi – wybrałam produkty CH-m4.1 i CH-m4.4 (Tabela 18), jako reprezentatywne i najlepiej scharakteryzowane pod względem chemicznym.

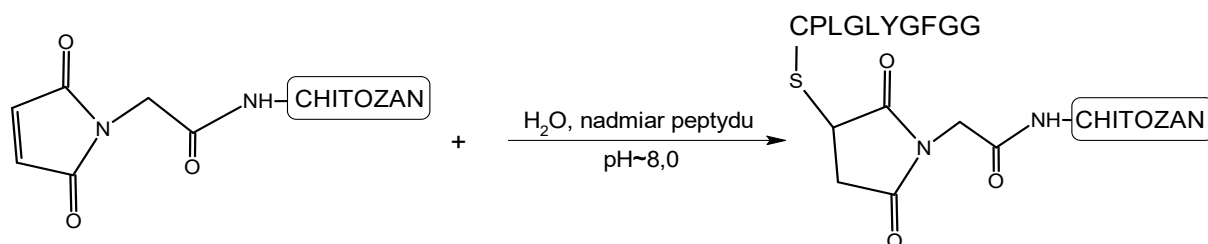
12. Modyfikacja maleimidochitozanu (CH-Mal-Gly) peptydem ug4

W celu modyfikacji CH-Mal-Gly peptydem **ug4** wykorzystałam reakcję tiolowej addycji Michaela (Rysunek 60). Wybrany peptyd **ug4** zawierał resztę Cys z nieosłoniętą grupą – SH na N-końcu. Dzięki dodatkowej cysteinie możliwe było w kolejnym etapie przyłączenie peptydu do łącznika maleimidowego.



Rysunek 60. Ogólna reakcja addycji Michaela z udziałem tiolu.

Modyfikacji peptydem poddałam chitozan CH-m4.1. Reakcję przeprowadziłam, używając 200 mg chitozanu CH-m4.1 i 190 mg peptydu ug4 (Rysunek 61).

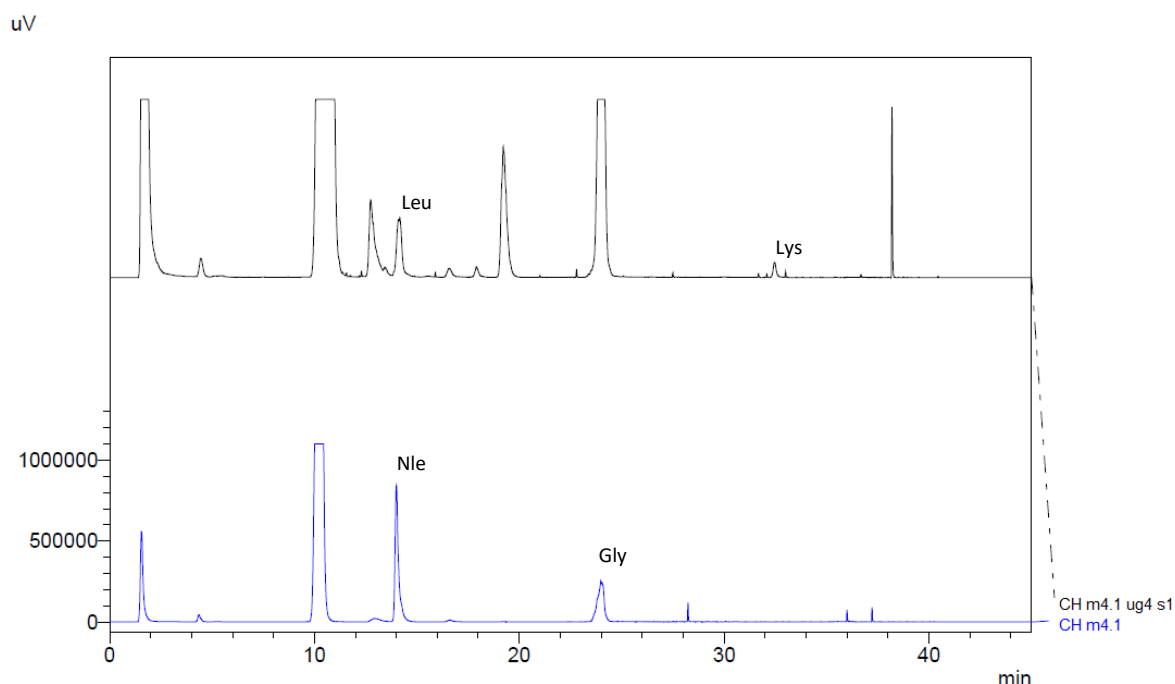


Rysunek 61. Reakcja addycji peptydu z grupą tiolową (**ug4**) do chitozanu zmodyfikowanego pochodną maleimidoglicyny (CH-m4.1).

Teoretycznie, do chitozanu powinno przyłączyć się około 115 mg peptydu. Ze względu na możliwość szybkiego utlenienia wolnej grupy tiolowej cysteiny, zastosowałam

nadmiar peptydu. Reakcję przeprowadziłam w 75 ml wodnego roztworu. Próba odsączenia produktu CH-m4.1-ug4 przy użyciu lejka Schotta z sączkiem zakończyła się niepowodzeniem – produkt przedostawał się do odbieralnika. Najprawdopodobniej modyfikacja chitozanu wpłynęła na właściwości fizykochemiczne materiału, uniemożliwiając klasyczne odsączanie. Zdecydowałam się zatem na zastosowanie wirowania jako metody oddzielenia produktu. Procedurę wirowania powtarzałam pięciokrotnie w próbkówkach typu Falcon (100 mL, 4°C, 9000 rpm), każdorazowo uzupełniając wodę dejonizowaną. Procedura ta spowodowała znaczne straty produktu, a wydajność reakcji wyniosła jedynie 37%.

W dalszym etapie przeprowadziłam analizę stopnia modyfikacji CH-Mal-Gly peptydem **ug4** zgodnie z procedurą opisaną w punkcie III.8.3. Niestety, podczas analizy napotkałam trudności: intensywność sygnałów Leu (z peptydu) oraz Lys (wzorzec wewnętrzny) była bardzo niska. Ze względu na ograniczenia aparatury, nie było możliwości wykonania większego nastrzyku. Podjęłam próbę zatężenia próbki po hydrolizie – uzyskane próbki poddałam analizie aminokwasowej. Na podstawie dwóch chromatogramów (Rysunek 622) ustaliłam, że stosunek Leu do Lys wskazuje na czterokrotnie wyższą ilość peptydu niż zakładano. Prawdopodobnie część nieprzereagowanego peptydu pozostała nieodmyta w produkcie ze względu na niedoskonałą procedurę wirowania. Ilość materiału była zbyt mała, by wykonać analizę powtórna.



Rysunek 62. Chromatogram przedstawiający chitozan zmodyfikowany pochodną maleimidoglicyny (CH–m4.1 – kolor niebieski) oraz pochodną maleimidoglicyny i peptydem **ug4** (CH–m4.1–**ug4** – kolor czarny).

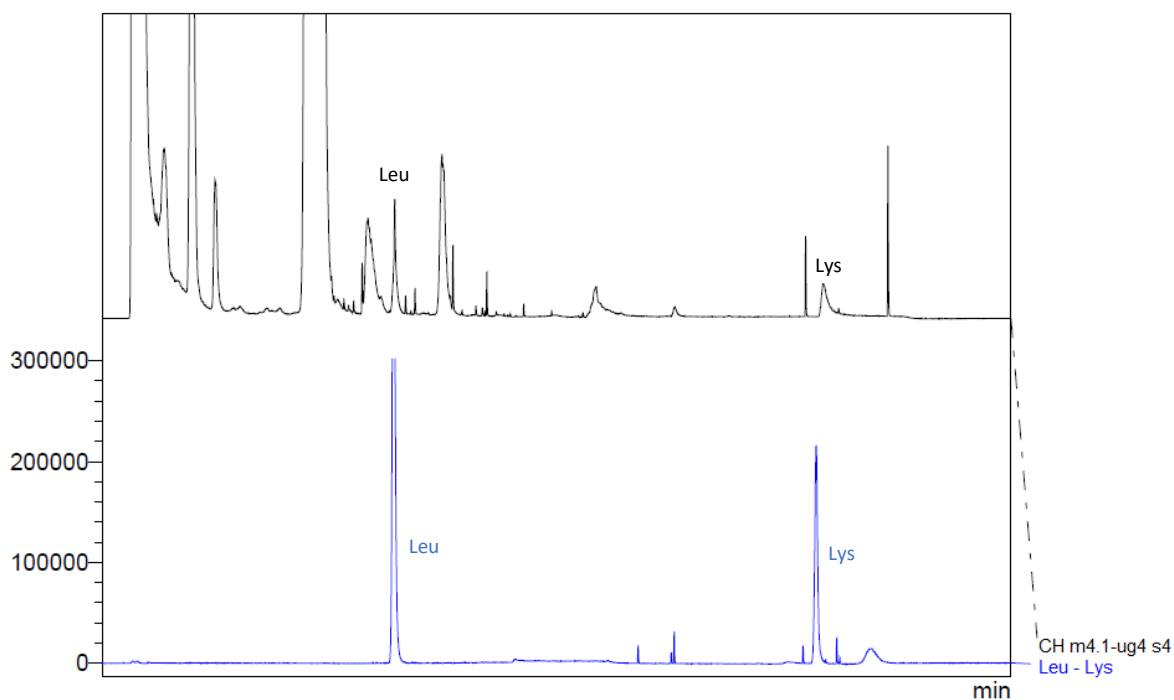
Kolejno w celu optymalizacji procedury modyfikacji maleimidochitozanu peptydem **ug4**, modyfikacji peptydem poddałam chitozan CH–m4.4. 3,2 g chitozanu zawiesiłam w 850 ml wody, natomiast 3g peptydu **ug4** rozpuściłam w 200 ml wody dejonizowanej.

W celu optymalizacji reakcji powtórzyłam procedurę z użyciem maleimidochitozanu CH–m4.4 (CH4.1 bardzo mała ilość zużyta do poprzedniego eksperymentu, wykorzystany do badań TGA i FTIR, CH4.3 wykluczony z dalszych badań). W tym celu 3,2 g chitozanu CH–m4.4 zawiesiłam w 850 ml wody, a 3 g peptydu **ug4** rozpuściłam w 200 ml wody. Rozpuszczony peptyd **ug4** dodałam do wodnego roztworu modyfikowanego chitozanu CH–m4.4 i doprowadzałam mieszaninę do pH~8,0 (NaHCO_3). Po 24 godzinach produkt odsączyłam za pomocą zestawu do filtracji próżniowej z sączkiem nylonowym o średnicy porów 0,45 μm , a następnie poddałam go liofilizacji. Wydajność reakcji wzrosła do 65%. Stopień modyfikacji (analiza wg III.8.3) był bardzo wysoki a peptyd został przyłączony niemal w 100% (Tabela 19). Przykładowy chromatogram przedstawiłam na Rysunku 63.

Tabela 19. Stopień modyfikacji modyfikowanego chitozanu peptydem **ug4** (zawiera stosunek pola powierzchni pod pikiem Leu do Lys).

Nazwa próbki	Stosunek Leu do Lys	Średni stopień modyfikacji [%] chitozanu peptydem ug4	
CH-m4.4- ug4 – I	0,818345	100,54	100,26 ± 9,44
CH-m4.4- ug4 – II	0,720802	88,55	
CH-m4.4- ug4 – III	0,909041	111,68	

uV



Rysunek 63. Chromatogram przedstawiający hydrolizat próbki chitozanu CH-m4.4-ug4 oraz wzorzec Leu/Lys w stosunku masowym 1:1, użyty do wyznaczenia stopnia modyfikacji próbki.

Podczas ilościowego oznaczania modyfikacji CH-Mal-Gly z wykorzystaniem peptydu **ug4** wystąpiły liczne trudności analityczne. Mimo wielokrotnych prób hydrolizy i analiz produktu końcowego, wyniki były w większości przypadków niejednorodne i niepowtarzalne. Głównym źródłem problemów była zbyt duża ilość chitozanu obecna w próbkach. Aby umożliwić detekcję aminokwasów, konieczne było znaczne zwiększenie jego stężenia w mieszaninie reakcyjnej. Prowadziło to do zakłóceń rozdziału, takich jak nakładanie się sygnałów chromatograficznych lub ich nieregularne przesunięcia, co uniemożliwiało jednoznaczną interpretację chromatogramów.

W celu potwierdzenia kowalencyjnego przyłączenia pochodnej Mal–Gly do chitozanu oraz peptydu do CH–Mal–Gly, zbadano mechanizm degradacji produktów reakcji metodą analizy termogravimetrycznej (TGA). Analizy zostały przeprowadzone przez dr inż. Małgorzatę Gazińską z Politechniki Wrocławskiej.

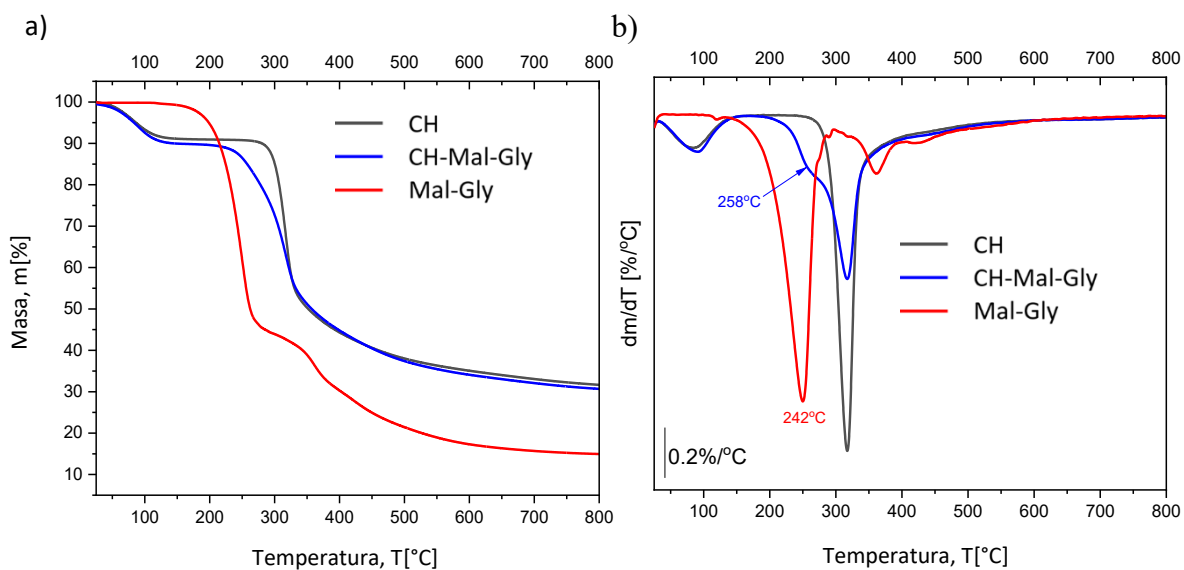
W przypadku chitozanu z przyłączonym peptydem **ug4** krzywa TGA była zbyt nieregularna i nieczytelna, prawdopodobnie z powodu niskiej zawartości przyłączonego peptydu, bo wynoszącej jedynie 1,3% masy (peptyd stanowi 35,7 % masy modyfikowanego chitozanu). Pomimo dostarczenia świeżego materiału, nie udało się uzyskać powtarzalnych wyników.

Zmierzone krzywe TGA oraz przebiegi pierwszych pochodnych masy względem temperatury ($dm/dT = f(T)$) przedstawiłam na Rysunku 64b. Degradacja CH–Mal–Gly oraz chitozanu (CH) przebiega etapowo.

Pierwszy etap ubytku masy związany jest z utratą wody i zachodzi w zakresie do 160°C, z największą szybkością, wyznaczoną z położenia pików pierwszej pochodnej ($dm/dT = f(T)$), w temperaturze 78°C dla CH i 80°C dla CH–Mal–Gly (Rysunek 64). Ubytek wody wynosi 8,67% i 9,57% odpowiednio dla chitozanu i chitozanu z pochodną maleimidoglicyny [205].

Drugi etap ubytku masy dla CH rozpoczyna się w temperaturze 293°C (T_{onset}) i zachodzi z największą szybkością w 312°C. Powyżej 340°C ubytek masy zachodzi wolniej, na co wskazuje zmiana nachylenia krzywej TGA na mniejsze. Ubytek masy w zakresie 160–600°C wynosi 55,03%. Jest to etap, który zgodnie z literaturą identyfikowany jest jako pirolityczna degradacja chitozanu [206]. Powyżej 600°C do 800°C ubytek masy wynosi dodatkowo 3,23% wag.

Mechanizm degradacji CH–Mal–Gly powyżej 160°C różni się od CH. Przed głównym etapem degradacji obserwuje się dodatkowy etap rozkładu, który rozpoczyna się w temperaturze 236,5°C (T_{onset}) i zachodzi z największą szybkością w 258°C, nakładając się częściowo na główny etap degradacji CH. Etap ten przypisywany jest degradacji fragmentów pochodzących od Mal–Gly. Dla porównania, czysta Mal–Gly degraduje z maksimum przy 242°C. Występowanie dodatkowego etapu w próbce zmodyfikowanej, z przesunięciem maksimum pików pochodnej w stronę wyższych temperatur, wskazuje na zwiększoną stabilność termiczną Mal–Gly po jej kowalencyjnym połączeniu z CH [205].



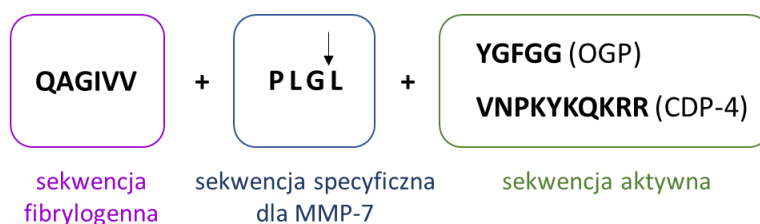
Rysunek 64. a) Krzywe termograwimetryczne (TGA) chitozanu (CH), chitozanu modyfikowanego pochodną maleimidoglicyny (CH-Mal-Gly) oraz czystej maleimidoglicyny (Mal-Gly); b) Pierwsze pochodne przebiegu degradacji termicznej ($dm/dT=f(T)$) badanych próbek.

CZĘŚĆ II – Projektowanie peptydów fibrylogennych oraz ich zastosowanie w kompozytach chitozanowo–bioszklanych

Druga część mojej pracy doktorskiej dotyczyła znalezienia peptydów, które posiadałyby właściwości proregeneracyjne i jednocześnie mogłyby tworzyć fibryle peptydowe.

1. Projektowanie peptydów o właściwościach fibrylogennych

Pierwszym etapem drugiej części badań było zaprojektowanie peptydów o potencjalnych właściwościach fibrylogennych (Rysunek 65). każdy z peptydów składał się z trzech funkcjonalnych segmentów. Pierwsza część to sekwencja aminokwasowa QAGIVV, która posiada potwierdzone właściwości fibrylogenne [207]. Druga część to sekwencja PLGL, specyficzna dla cięcia przez metaloproteinazę-7. Trzecia część zawierała sekwencje biologicznie aktywne peptydów **ug1** i **ug26**, które w badaniach biologicznych wykazywały zdolność do stymulacji proliferacji osteoblastów.



Rysunek 65. Zaprojektowane peptydy o potencjale fibrylogennym i proregeneracyjnym (strzałką oznaczono miejsce rozszczepienia sekwencji peptydowej przez enzym).

2. Synteza i oczyszczanie peptydów

Do syntezy peptydów wykorzystałam automatyczny syntezytor mikrofalowy firmy CEM Corporation. Syntezę peptydów przeprowadziłam stosując metodologię Fmoc z użyciem żywicy Rink Amide ProTide Resin (CEM Corporation). Po zakończeniu syntezy peptydy **ug52** i **ug53** poddałam acylowaniu z wykorzystaniem *N*-acetyloimidazolu, a następnie oba peptydy ściągałam z nośnika przy użyciu mieszaniny ściągającej.

Peptydy zsyntezowałam z wydajnością 70–80%. Pierwszym zsyntezowanym przeze mnie peptydem o potencjale fibrylogennym i proregeneracyjnym był peptyd **ug51** o sekwencji podanej w Tabeli 20. Okazało się jednak, że peptyd ten nie tworzył fibryli

peptydowych (szczegóły w rozdziale IV.II.5) dlatego zdecydowałam się zsyntezować peptyd **ug52** z grupą acetylową na *N*-końcu. Prawdopodobnie obecność tej grupy stabilizowała strukturę fibryli sprzyjała w jej formowaniu. W przypadku **ug51** brak acetylacji skutkowało obecnością dodatnio naładowanej grupy aminowej na *N*-końcu w pH obojętnym, co mogło prowadzić do odpychania elektrostatycznego *N*-końców i braku formowania fibryli. Dodatkowo zsyntezowałam peptyd **ug53** również z grupą acetylową na *N*-końcu, którego sekwencja aktywna pochodziła z CPD4. Peptydy **ug51** i **ug52** zawierały sekwencję aktywną będącą fragmentem OGP. Wszystkie sekwencje zostały podane w Tabeli 20.

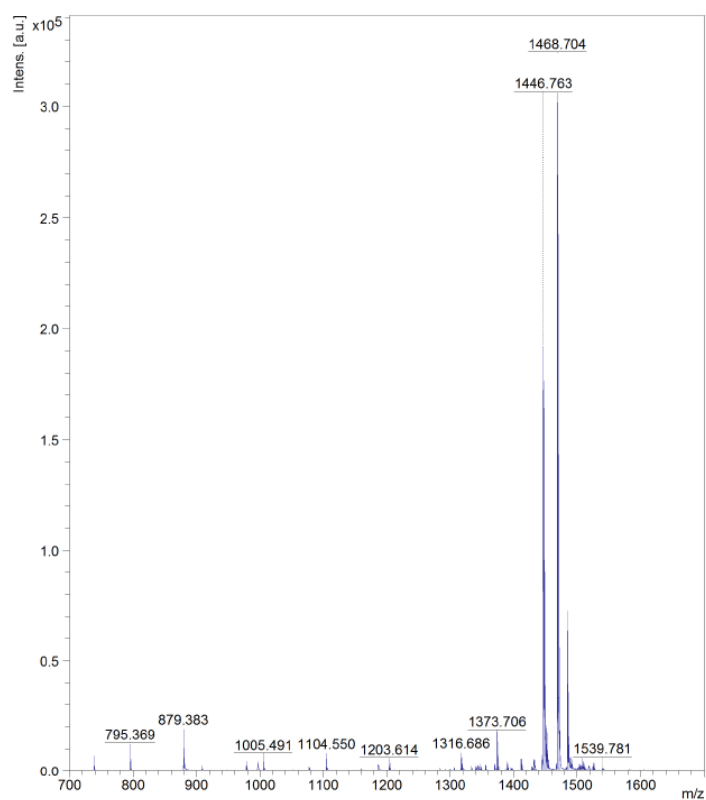
Tabela 20. Nazwy i sekwencje syntetyzowanych peptydów, ich pochodzenie biologiczne oraz podstawowe parametry syntezy.

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa	Pochodzenie peptydu	Skala syntezy [mmol]	Ilość żywicy [g]	Otrzymana ilość surowego produktu [mg]	Wydajność syntezy [%]
ug51	H-QAGIVVPLGLYGFGG-NH ₂	OGP	0,25	0,424	311	85,93
			1,0	1,690	1132	78,47
ug52	Ac-QAGIVVPLGLYGFGG-NH ₂		0,25	0,424	308	82,70
ug53	Ac-QAGIVVPLGLVNP KYKQK RR-NH ₂	CPD4	0,1	0,476	163	70,72

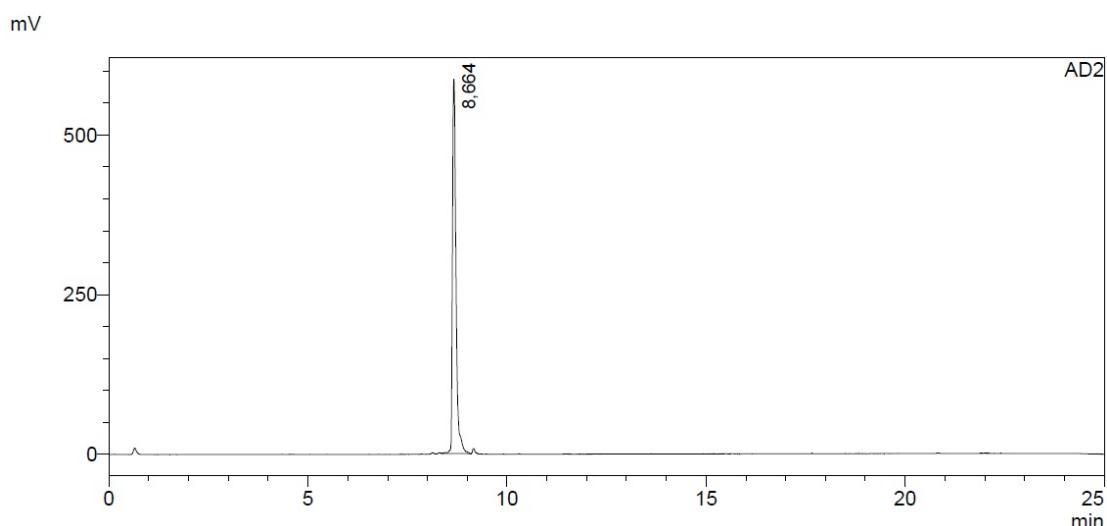
Peptydy poddałam procesowi oczyszczania przy użyciu techniki RP-HPLC. Rozdział chromatograficzny przeprowadziłam w gradiencie liniowym (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 2). Dla każdego peptydu opracowałam specyficzne warunki rozdzielania (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 1, Eluenty I). Czystość peptydów również oceniałam za pomocą RP-HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3). W celu potwierdzenia masy cząsteczkowej otrzymanego peptydu wykonano widma masowe za pomocą spektrometru MALDI-TOF firmy Bruker Daltonics (Rysunek 66). Dobór gradientu elucji do oczyszczania, czas retencji oraz masę oczyszczonych peptydów przedstawiłam w Tabeli 21. Na Rysunku 67 przedstawiłam przykładowy chromatogram oczyszczonego peptydu **ug51**.

Tabela 21. Charakterystyka procesu oczyszczania peptydów o potencjale agregacyjnym, z określaniem fazy ruchomej stosowanej podczas oczyszczania, czasu retencji oraz masy cząsteczkowej peptydów.

Peptyd	Elucja układu B	Czas retencji (min) octany	Czas retencji (min) TFA	Masa obliczona (g/mol)	Masa obserwowana (m/z)
ug51	35–42%	34,196	8,66	1446,71	1446,763
ug52	20–40%	35,69	9,52	1488,75	1487,996
ug53	25–45%	29,21	5,39	2305,77	2305,20



Rysunek 66. Widmo masowe MALDI–TOF peptydu **ug51**. Zaobserwowane piki: (m/z) $[M+H]^+ = 1446,763$, (m/z) $[M+Na]^+ = 1468,704$.



Rysunek 67. Chromatogram peptydu **ug51** ($t_r=8,66$).

3. Stabilność peptydów o potencjale fibrylogennym w wodzie i pożywce hodowlanej

W celu oceny stabilności peptydów zarówno podczas badań ich właściwości biologicznych, jak i w trakcie procesów produkcyjnych docelowych kompozytów, przeprowadziłam szereg eksperymentów inkubacji peptydów w różnych warunkach środowiskowych. Analiza stabilności peptydów pozwoliła na określenie ich trwałości oraz przydatności do dalszych zastosowań w badanych kompozytach. Badanie stabilności peptydów **ug51**, **ug52** i **ug53** przeprowadziłam w wodzie oraz w pożywce (DMEM/F-12 z 10% FBS), badania były przeprowadzone analogicznie jak w przypadku peptydów proregeneracyjnych, zgodnie z procedurą zawartą w rozdziale III.3. Wyniki procentowej zawartości peptydu po 24 godzinach przedstawiłam w Tabeli 22.

Tabela 22. Procentowa pozostałość peptydu po 24 h inkubacji peptydów w wodzie i w pożywce.

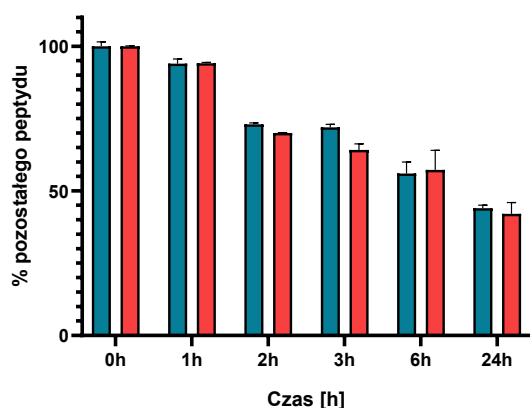
Nazwa peptydu	% pozostałego peptydu w wodzie	% pozostałego peptydu w pożywce
ug51	44,00%	42,10%
ug52	98,69%	87,15%
ug53	72,56%	59,93%

Najwyższą stabilnością spośród analizowanych peptydów charakteryzował się peptyd **ug52**, który wykazywał ponad 98% stabilności w wodzie oraz 87% stabilności w

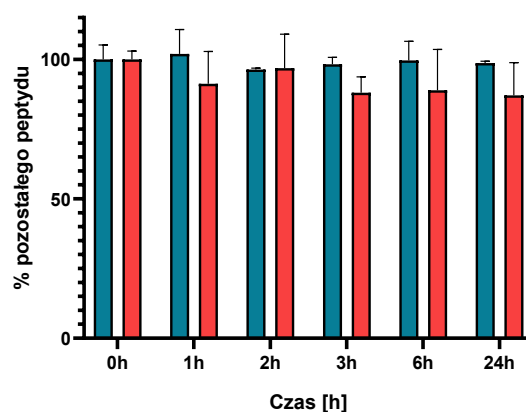
pożywce hodowlanej. Peptyd **ug53** wykazał się nieco niższą stabilnością, wynoszącą około 70% stabilności w wodzie i 60% w pożywce. Najmniej stabilny spośród badanych był peptyd **ug51**, którego stabilność wynosiła jedynie 40% zarówno w wodzie jak i w pożywce hodowlanej.

Podczas analizy HPLC zaobserwowałam również, że peptyd **ug51** rozpada się na dwa inne fragmenty, które przez dalszy czas eksperymentu były stabilne. Wykresy obrazujące spadek stabilności peptydów w czasie przedstawiałam na Rysunku 68.

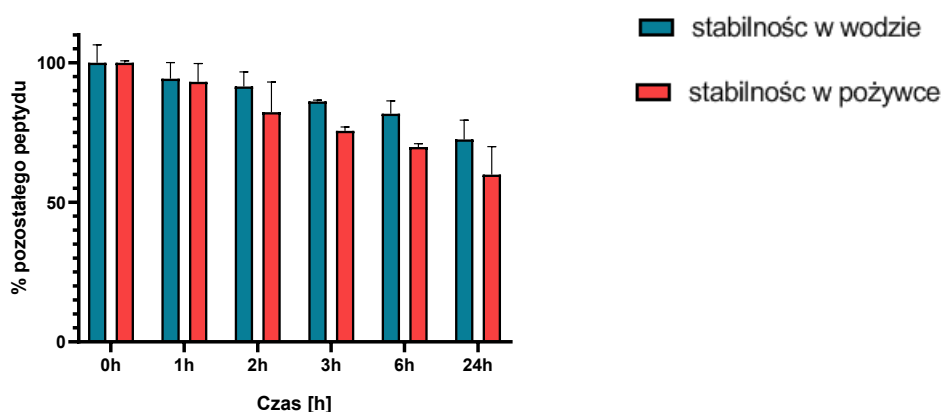
a)



b)



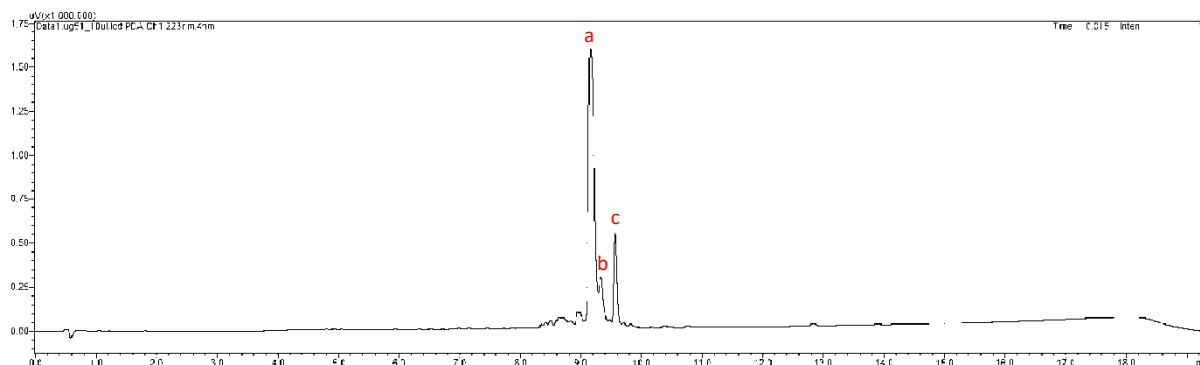
c)



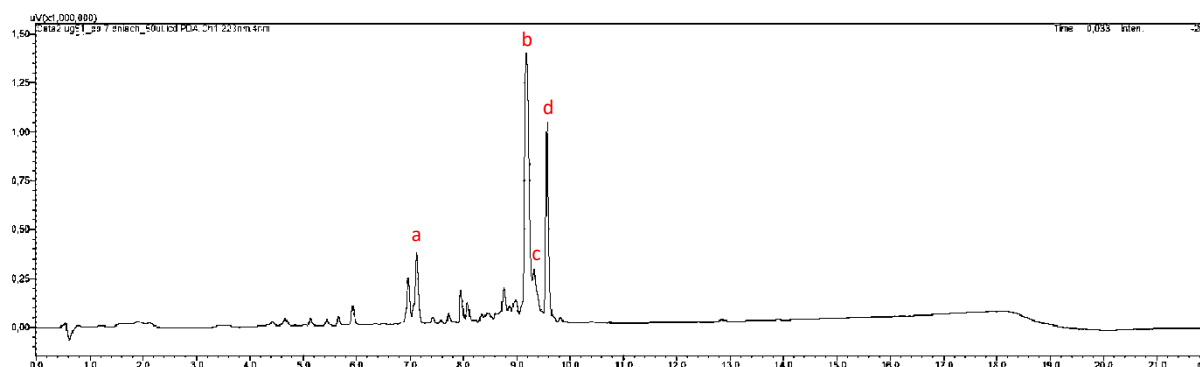
Rysunek 68. Wykresy stabilności peptydów w wodzie i w pożywce dla peptydów: a) ug51, b) ug52, c) ug53. Na wykresach przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenia standardowe (SD) z trzech niezależnych pomiarów.

4. Analiza rozpadu peptydu ug51 w wodzie

Podczas badań stabilności peptydów ustaliłam, że peptyd **ug51** wykazuje niską stabilność w wodzie. W wyniku inkubacji dochodziło do jego rozpadu na dwa główne fragmenty, które zostały zidentyfikowane na podstawie czasu retencji wynoszącego odpowiednio 9,32 min i 9,56 min (Rysunek 69). W celu ich identyfikacji wykonałam rozdział chromatograficzny próbki peptydu **ug51** inkubowanej przez 48 godzin (Rysunek 69) oraz przez 7 dni (Rysunek 70), a następnie przeprowadziłam analizę masową techniką MALDI-TOF MS.



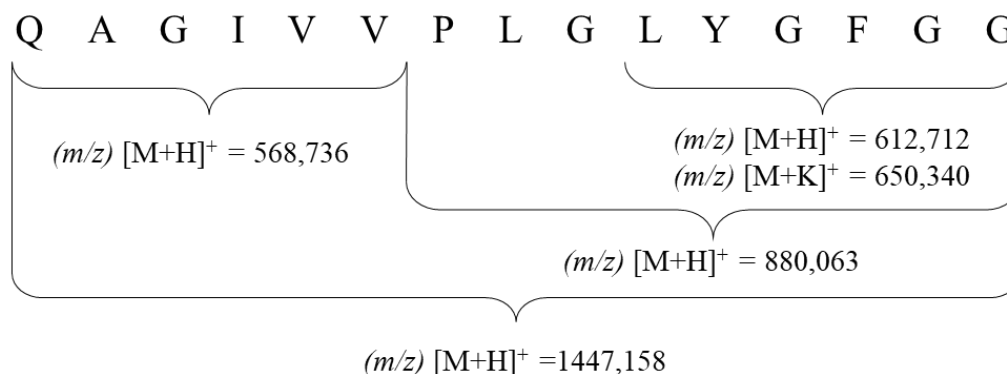
Rysunek 69. Chromatogram peptydu **ug51** w wodzie po 48 h, a: $t_r=9,17$ min, $[M]=1446,7$; b: $t_r=9,32$ min, $[M]=879$; c: $t_r=9,56$ min, $[M]=567,7$.



Rysunek 70. Chromatogram peptydu **ug51** w wodzie po 7 dniach, c: $t_r=7,12$ min, $[M]=611,9$; b: $t_r=9,15$ min, $[M]=1446,7$; c: $t_r=9,34$ min, $[M]=879$; d: $t_r=9,52$ min, $[M]=567,7$.

Peptyd **ug51** (QAGIVVPLGLYGFGG) po 48h inkubacji rozpadł się na dwa główne fragmenty: fibrylogenny (QAGIVV) oraz fragment odpowiadający sekwencji PLGL połączonej z częścią aktywną **ug1** (PLGLYGFGG). Dłuższa inkubacja peptydu **ug51** (7 dni) skutkowała pojawieniem się dodatkowego sygnału, który odpowiadał

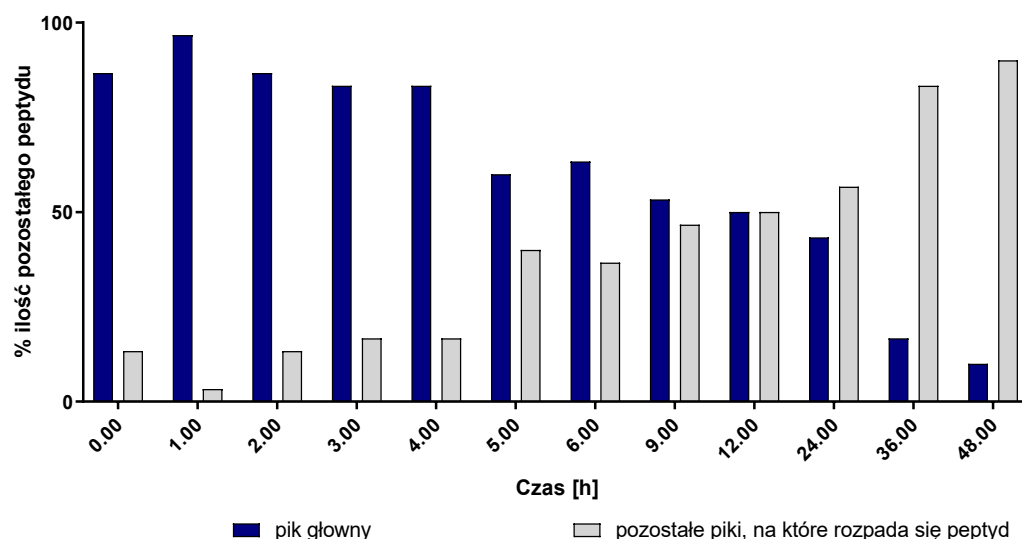
sekwencji aktywnej LYGFGG, odpowiadającej fragmentowi peptydu **ug1**. Na Rysunku 71 przedstawiłam sekwencje peptydu **ug51** z podziałem na produkty jego spontanicznego rozpadu.



Rysunek 71. Sekwencja aminokwasowa peptydu **ug51** (QAGIVVPLGLYGFGG) z zaznaczonymi fragmentami spontanicznego rozpadu wykrytymi techniką MALDI-MS. Po 48 h obserwowano powstanie fragmentów QAGIVV (m/z $[M+H]^+ = 568,736$) oraz PLGLYGFGG (m/z $[M+H]^+ = 880,063$). Po 7 dniach dodatkowo wykryto peptyd LYGFGG (m/z $[M+H]^+ = 612,712$, m/z $[M+K]^+ = 650,340$), odpowiadający aktywnej sekwencji **ug1**.

Dodatkowo zbadalam spadek stężenia peptydu **ug51** oraz przyrost jego produktów w czasie 48 godzin inkubacji w wodzie w temperaturze 37°C przy ciągłym mieszaniu orbitalnym (300 rpm). Analizę ilościową przeprowadzałam za pomocą systemu HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3). Na podstawie chromatogramów uzyskanych w poszczególnych punktach czasowych, odczytałam pole powierzchni pod odpowiednim sygnałem reprezentujące ilość peptydu **ug51** (sygnał główny) oraz produktów rozpadu (pozostałe sygnały) w próbce w danym czasie. Wartości powierzchni zostały znormalizowane względem wartości początkowej ($t = 0$ h), którą przyjął jako 100%. Wyniki przedstawiłam w formie wykresów słupkowych, obrazujących zależność pozostałej ilości peptydu [%] od czasu inkubacji [h]. Eksperyment wykonałam w jednym powtórzeniu.

Peptyd był stabilny do około 4. godziny, po czym następował jego stopniowy rozpad. Po 12 godzinach inkubacji stężenie peptydu **ug51** było porównywalne ze stężeniem powstałych produktów degradacji. Po 48 godzinach w próbce pozostało jedynie około 10% początkowego stężenia peptydu **ug51** (Rysunek 72).



Rysunek 72. Rozpad peptydu **ug51** podczas inkubacji w wodzie w czasie 48h, analiza wykonana za pomocą systemu HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3).

W kontekście potencjalnego zastosowania peptydu **ug51** w kompozytach zidentyfikowałam produkty rozpadu : peptyd o sekwencji QAGIVV (**ug54**) oraz PLGLYGFGG (**ug55**). Oba peptydy zsyntezowałam w celu oceny ich aktywności biologicznej i weryfikacji, czy właściwości proregeneracyjne są unikalne dla peptydu **ug51**, czy również obecne w jego fragmentach.

Peptydy **ug54** i **ug55** zsyntezowałam zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.1. Wydajność ich syntezy wynosiła odpowiednio 76,99% i 96,74% (Tabela 23). Oba peptydy zostały poddane oczyszczaniu zgodnie z opisem zawartym w rozdziale III.2 (Tabela 24).

Tabela 23. Nazwy i sekwencje syntetyzowanych peptydów, ich pochodzenie biologiczne oraz podstawowe parametry syntezy.

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa	Pochodzenie peptydu	Skala syntezy [mmol]	Ilość żywicy [g]	Otrzymana ilość surowego produktu [mg]	Wydajność syntezy [%]
ug54	H-QAGIVV-NH ₂	scruble peptyd fragmentu 55–60 hCC [208]	0,1 l	0,476	45	76,99
ug55	H-PLGLYGFGG-NH ₂	OGP	0,1 l	0,476	85	96,74

Tabela 24. Charakterystyka procesu oczyszczania peptydów proregeneracyjnych, z określaniem fazy ruchomej stosowanej podczas oczyszczania, czasu retencji oraz masy cząsteczkowej peptydów.

Peptyd	Elucja układu B	Czas retencji (min) octany	Czas retencji (min) TFA	Masa obliczona (g/mol)	Masa obserwowana (m/z)
ug54	10–20%	18,208	4,138	584,7168	584,562
ug55	25–35%	28,52	6,929	879,0268	878,849

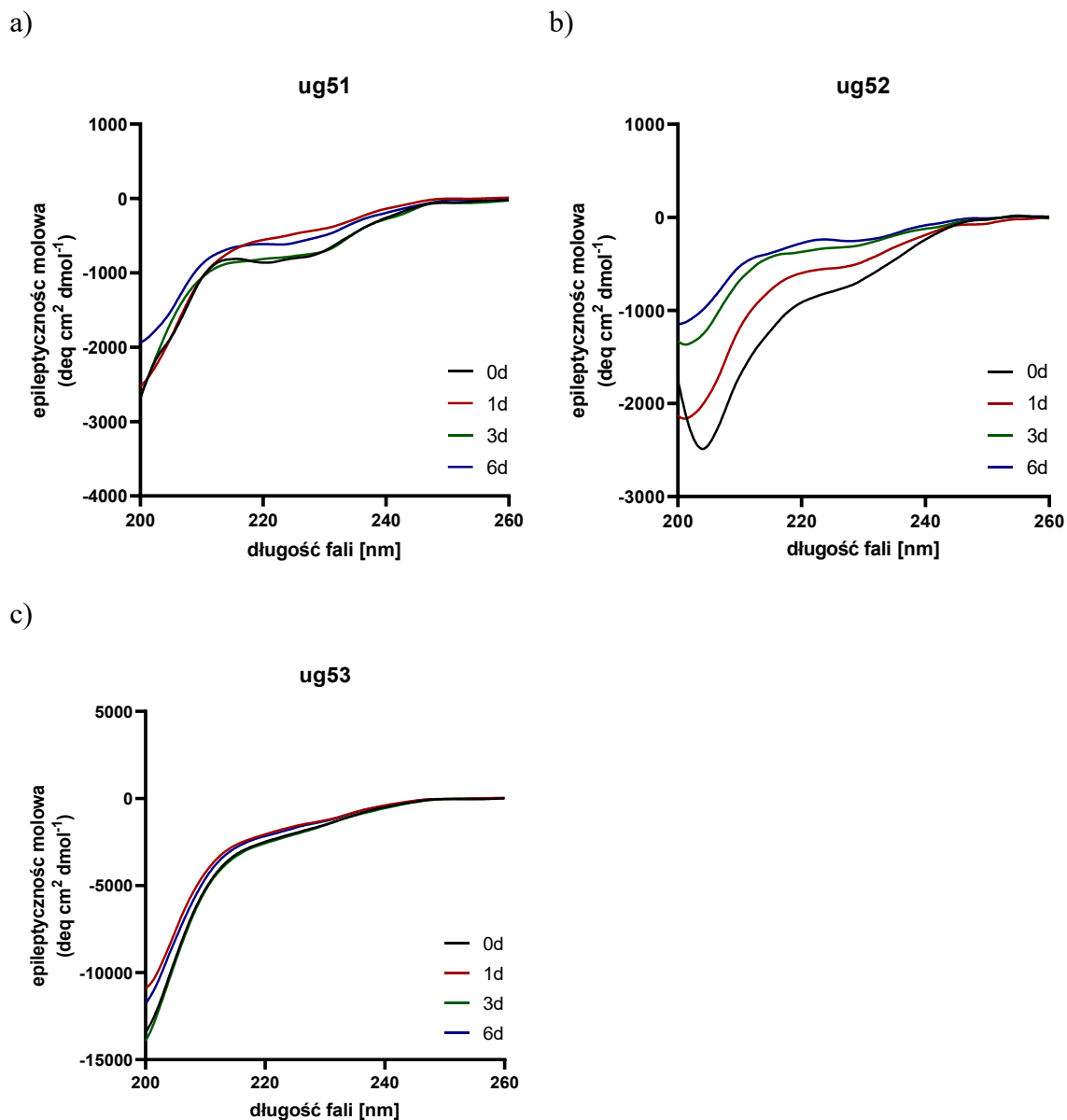
5. Charakterystyka fizykochemiczna peptydów o potencjale fibrylogennym

5.1 Analiza struktur drugorzędowych peptydów ug51, ug52, ug53 metodą dichroizmu kołowego (CD)

W celu identyfikacji struktur drugorzędowych w peptydach **ug51**, **ug52** i **ug53** przeprowadziłam analizę widm dichroizmu kołowego (CD). Peptydy **ug51**, **ug52** oraz **ug53** inkubowałam w buforze fosforanowym (pH 7,4) w temperaturze 37°C. Widma CD zostały zarejestrowane w dniach inkubacji: 0, 1, 3 i 6 – zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 2.1.

Peptydy **ug51** oraz **ug53** wykazywały widma typowe dla struktur nieuporządkowanych (~200 nm) zarówno bezpośrednio po rozpuszczeniu, jak i w kolejnych dniach inkubacji. Widma cechują się niewielkimi zmianami eliptyczności molowej w całym badanym zakresie długości fali (200–260 nm) podczas 6-dniowej inkubacji. Krzywe CD dla wszystkich punktów czasowych (0d, 1d, 3d i 6d) są niemal nałożone, z bardzo subtelnymi różnicami (Rysunek 74a i 74c). Widma CD wskazują, że peptydy nie ulegały fibrylizacji ani istotnej reorganizacji konformacyjnej.

Widma CD peptydu **ug52** pokazują, że bezpośrednio po rozpuszczeniu wykazywał podwójne minimum eliptyczności molowej w rejonie ~208 i ~222 nm, co sugeruje obecność struktury nieuporządkowanej i α -helikalnej. Po jednym dniu inkubacji minimum przy ~208 nm przesunęło się w kierunku krótszych fal (~200 nm), co wskazuje na zwiększenie udziału struktur nieuporządkowanych w konformacji peptydu **ug52**. Minimum w okolicach 200 nm utrzymywało się aż do 6. dnia inkubacji, co potwierdza utratę struktury helikalnej. Widma cechują się wyraźnymi zmianami eliptyczności molowej w całym badanym zakresie długości fali (200–260 nm) podczas inkubacji, co może wskazywać, że peptyd uległ fibrylizacji i osadzaniu się nierozpuszczalnych form, co skutkuje zmniejszeniem stężenia rozpuszczonego peptydu w roztworze (Rysunek 74b).



Rysunek 73. Widma dichroizmu kołowego dla peptydów a) **ug51**, b) **ug52**, c) **ug53** wykonane w 0, 1, 3 oraz 6 dniu inkubacji w PBS w temperaturze 37°C z zastosowaniem ciągłego wytrząsania.

5.2 Analiza fibrylizacji peptydów przy użyciu tioflawiny T

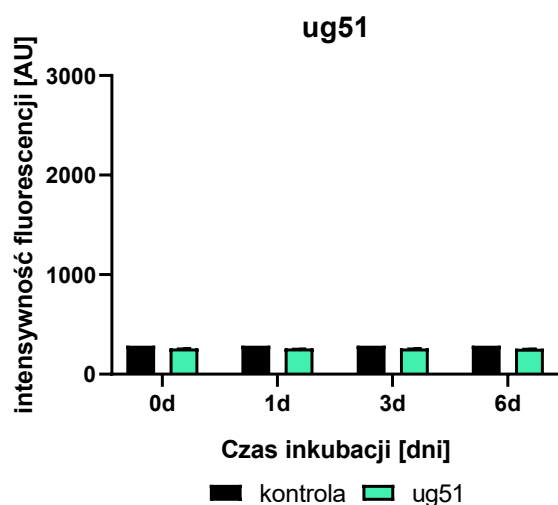
Przeprowadziłam eksperyment, podczas którego wykonałam pomiary fluorescencji próbek inkubowanych przez różny czas z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego – tioflawiny T (ThT). Celem analizy było potwierdzenie obecności struktur β tworzących kompleks z tioflawiną T w próbkach peptydów **ug51**, **ug52** i **ug53**. Tioflawina T w

obecności uporządkowanych struktur β tworzy kompleksy, których widmo emisji charakteryzuje się maksimum przy długości fali 482 nm.

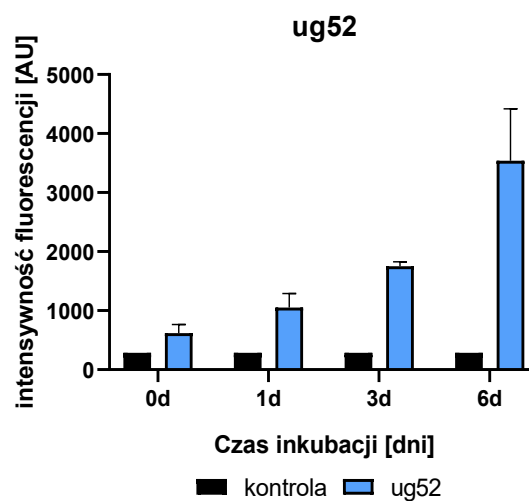
W trakcie eksperymentu analizowałam próbki pobierane w różnych punktach czasowych inkubacji. Dla peptydów **ug51** i **ug53** nie zaobserwowałam wzrostu intensywności fluorescencji ThT, co wskazuje na brak obecności struktur β oraz brak zdolności tych peptydów do tworzenia fibryli peptydowych w badanych warunkach (Rysunek 76a i 76c).

Najbardziej wyraźne zmiany zaobserwowałam dla peptydu **ug52**, który wykazał znaczny wzrost intensywności emisji ThT, sugerując inicjację procesu fibrylizacji, już po jednym dniu inkubacji. Intensywność fluorescencji rosła wraz z wydłużeniem czasu inkubacji, osiągając maksimum po 6 dniach (Rysunek 76b). Przedstawione wyniki potwierdziły, że peptyd **ug52** wykazuje zdolność do tworzenia fibryli peptydowych.

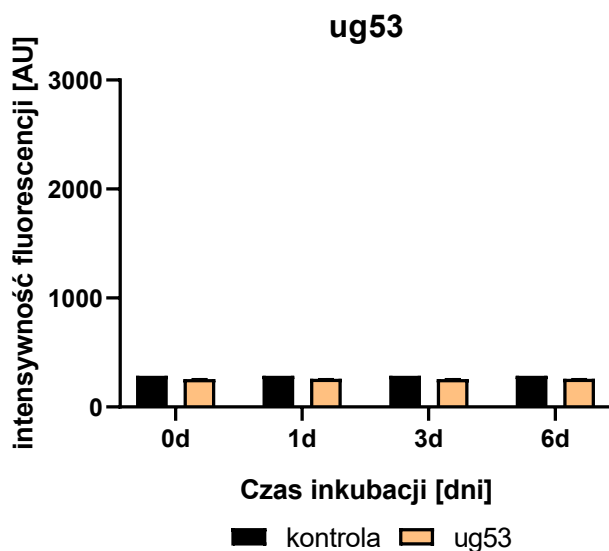
a)



b)



c)



Rysunek 74. Wykres zależności intensywności fluorescencji kompleksu peptyd–tioflawina T od czasu inkubacji względem kontroli (roztwór PBS) dla peptydów a) **ug51**, b) **ug52**, c) **ug53**. Na wykresach przedstawiono średnie wartości $\pm$ odchylenia standardowe (SD) z trzech niezależnych pomiarów.

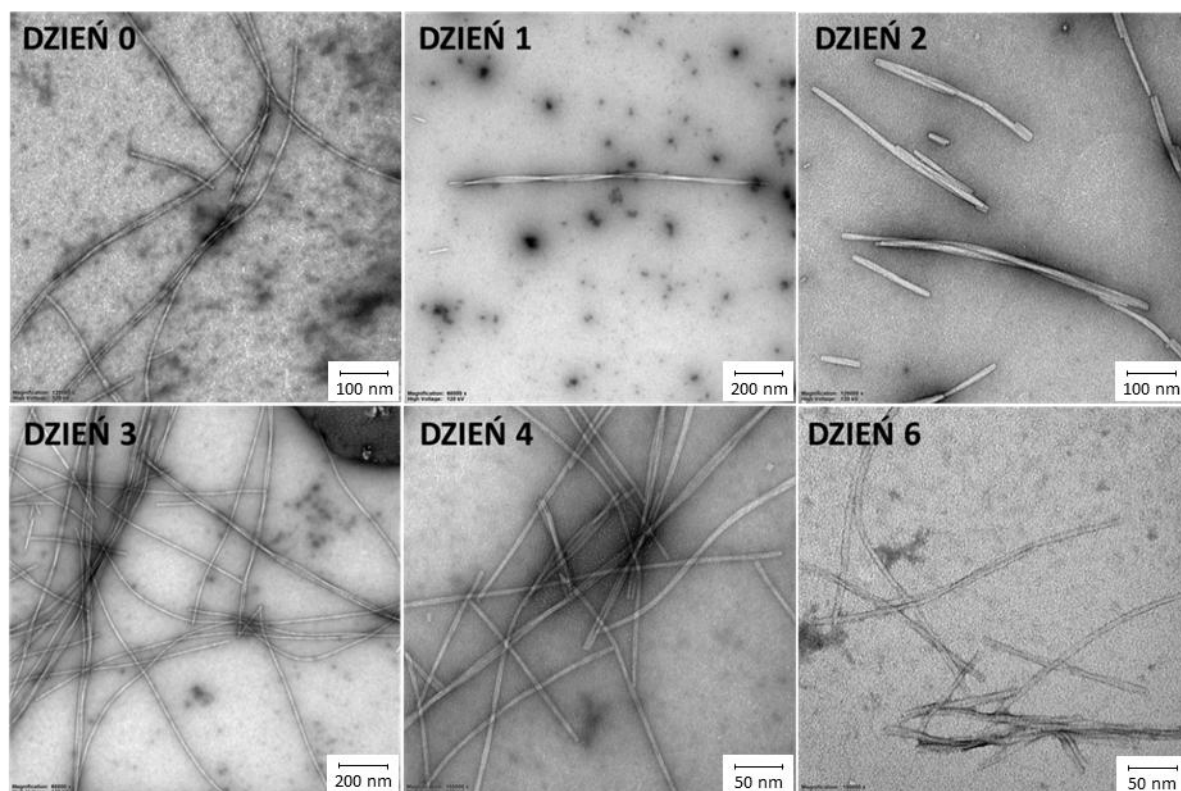
5.3 *Badanie morfologii fibryli peptydowych metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)*

Przeprowadzone analizy dichroizmu kołowego i testu z użyciem tioflawiny T (ThT) potwierdziły brak obecności β struktur w peptydach **ug51** i **ug53**. Peptydy te nie tworzyły fibryli peptydowych, dlatego wykluczyłam je z dalszej analizy morfologii fibryli z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

W celu określenia morfologii włókien peptydowych dla peptydu **ug52** przeprowadziłam 6 dniową inkubację peptydu w roztworze PBS, a następnie przekazałam próbki pobrane w punktach czasowych 0, 1, 2, 3, 4, 6 dni do wykonania zdjęć mikroskopowych, zgodnie z procedurą zawartą w rozdziale III.8.3.

Zdjęcia przedstawione na Rysunku 77, wskazują, że proces fibrylizacji peptydu **ug52** rozpoczął się bezpośrednio po rozpuszczeniu w buforze PBS. Już w dniu 0 widoczne są pierwsze struktury przypominające fibryle. W kolejnych dniach inkubacji zaobserwowałam postępujący przyrost długości i liczby włókien. Już od 2. dnia inkubacji widoczne były dobrze wykształcone fibryle, o zróżnicowanej długości – od ok. 50 nm do 1,2 μm – oraz grubości ok. 6 nm. Na obrazach z dnia 3 i 4 widoczna jest gęsta, rozgałęziona sieć fibryli, natomiast w dniu 6 zaobserwowałam bardziej rozproszony układ struktur, sugerujący możliwe przeorganizowanie sieci.

Niektóre włókna wykazują miejscowe skręcenia, jednak regularne tzw. „twisting” o skoku co 250 nm nie został jednoznacznie potwierdzony na dostępnych obrazach. Ogólnie, uzyskane wyniki wskazują na wysoką zdolność peptydu **ug52** do tworzenia stabilnych.



Rysunek 75. Obrazy transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) przedstawiające morfologię fibryli peptydu ug52 po 0, 1, 2, 3, 4 i 6 dniach inkubacji w buforze PBS.

5.4 *Badanie enzymatycznego uwalniania peptydu o sekwencji aktywnej z fibryli peptydowej ug52*

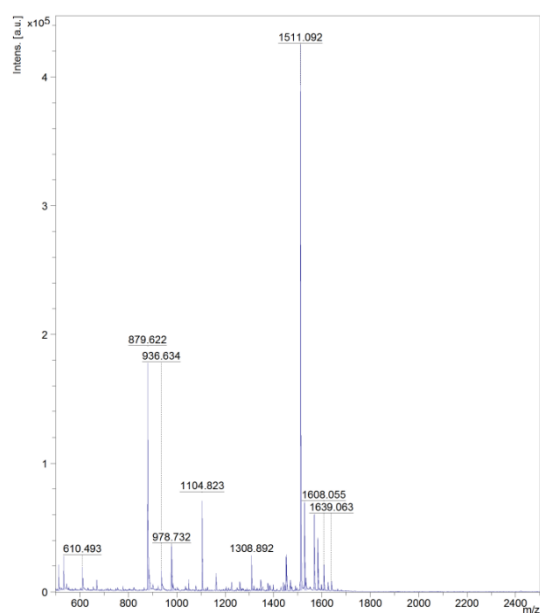
W celu oceny podatności fibryli peptydowych **ug52** na rozszczepienie w miejscu sekwencji wrażliwej na działanie metaloproteinazy 7, przeprowadziłam inkubacje fibryli w obecności enzymu MMP-7 przez 72h w temperaturze 37°C, przy ciągłym mieszaniu, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.9.4. Próbkę do analiz pobierałam w punktach czasowych 0, 1, 3, 24 oraz 72 godziny.

Analiza mas fragmentów uzyskanych po rozszczepieniu przez enzym wykazała, że po 1 godzinie inkubacji (Rysunek 78b) pod wpływem enzymu MMP-7 uwolniony został peptyd o sekwencji aktywnej **ug1** ($(m/z) [M+H]^+ = 612,526$, $(m/z) [M+Na]^+ = 634,489$).

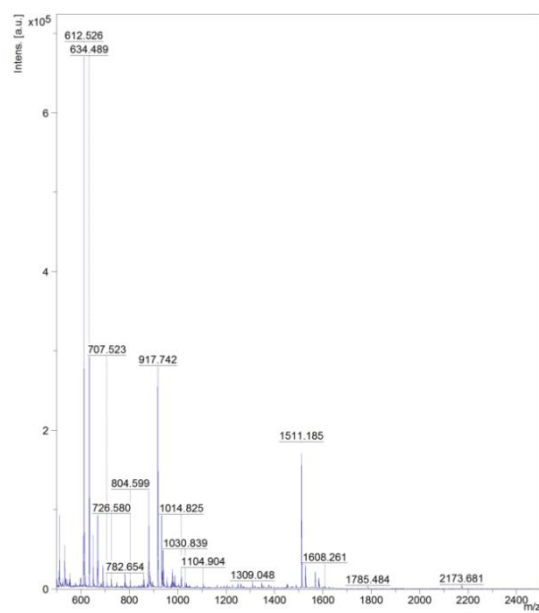
Sygnał odpowiadający substratowi – peptydu **ug52** ($(m/z) [M+Na]^+ = 1511,092$) był obecny na widmach na początku i po godzinie trwania eksperymentu, natomiast zaniknął po 24 godzinach (Rysunek 78a–78c). Rozszczepienie enzymatyczne nastąpiło w przewidywanym miejscu, tj. pomiędzy resztami glicyny i leucyny w sekwencji peptydu **ug52**.

W widmach masowych (Rysunek 77b–77d) zaobserwowałam produkty hydrolizy enzymatycznej zawierający fragment specyficzny dla enzymu (PLG) oraz fragment obejmujący sekwencję fibrylogenną (QAGIVV), tj. peptyd QAGIVVPLG – o mase (m/z) $[M+Na]^+ = 917,5$.

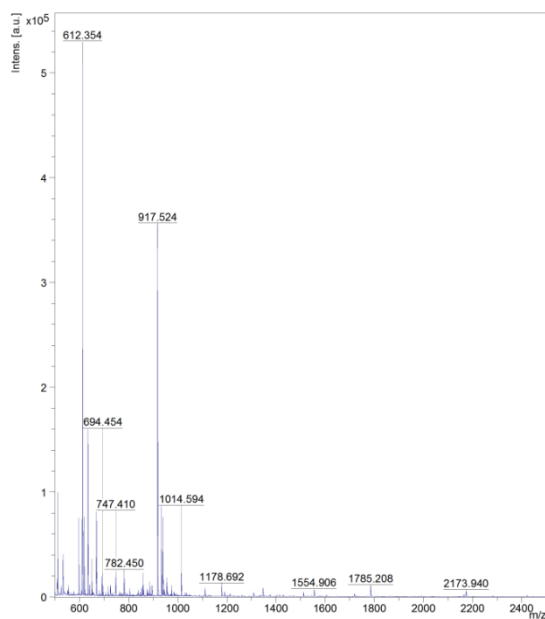
a)



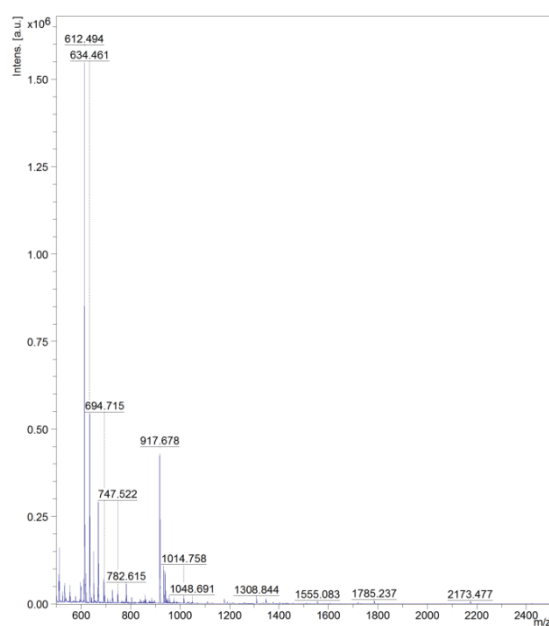
b)



c)



d)



Rysunek 76. Widma masowe MALDI-TOF próbek peptydów po inkubacji z metaloproteiną 7, zaobserwowane piki dla ug52: a) w czasie początkowym reakcji – ug52 – (m/z) $[M+Na]^+ = 1511,092$, b) po 1h – ug52 – (m/z) $[M+Na]^+ = 1511,185$, ug1 – (m/z) $[M+H]^+ = 612,526$, (m/z) $[M+Na]^+ = 634,489$, c) po 24 h – ug1 – (m/z) $[M+H]^+ = 612,526$, d) po 3 dniach – ug1 – (m/z) $[M+H]^+ = 612,526$, (m/z) $[M+Na]^+ = 634,489$.

6. Badania biologiczne peptydów o potencjale fibrylogennym

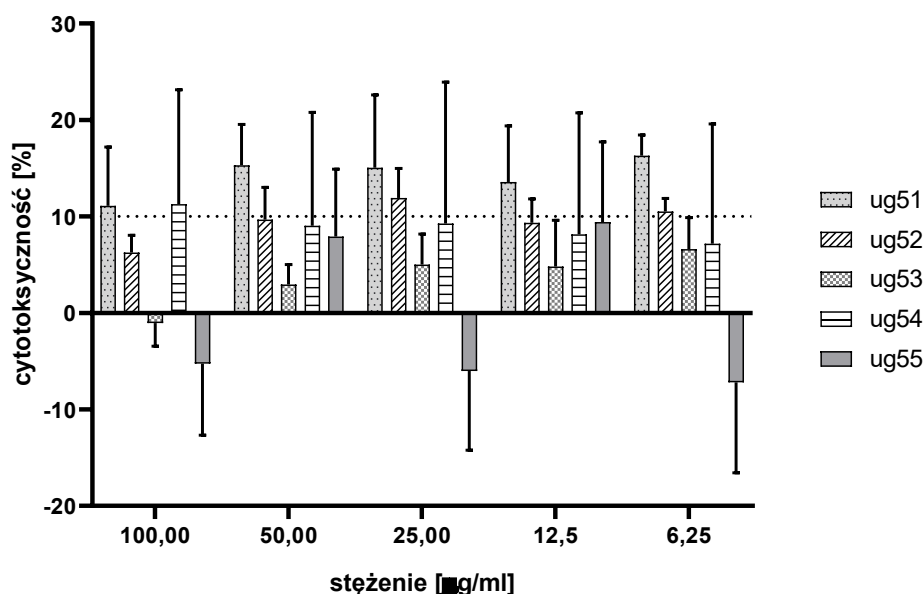
Badania biologiczne peptydów zostały wykonane przez zespół dr Beaty Gromadzkiej w Instytucie Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku, zgodnie z procedurami zawartymi w rozdziale III.15.

6.1 Ocena cytotoksyczności peptydów wobec komórek ludzkich osteoblastów płodowych hFOB 1.19

Dla zsyntezowanych i oczyszczonych peptydów **ug51** – **ug55** przeprowadzono badania cytotoksyczności wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Test LDH został wykonany zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.15.1 dla peptydów w zakresie stężeń 6,25 – 100 µg/ml, zgodnie z normą ISO10993–5.

Ze względu na fakt, że komórki hFOB 1.19 dzielą się co około 36 godzin, wybrano dłuższy czas inkubacji (48 godzin) z peptydami, aby umożliwić komórkom przejście podziału komórkowego. Potwierdzono, że badane peptydy w całym zakresie stężeń 6,25 – 100 µg/ml nie wykazują działania cytotoksycznego.

Zgodnie z normą, efekt cytotoksyczny zachodzi jeśli żywotność komórek jest zmniejszona do < 70% ślepej próby (cytotoksyczność > 30%). Żaden z badanych peptydów nie przekroczył tego progu. Co więcej, peptydy **ug53** i **ug55** osiągnęły bardziej rygorystyczny poziom bezpieczeństwa, odpowiadający ≥90% żywotności komórek (cytotoksyczność < 10%) (Rysunek 79).

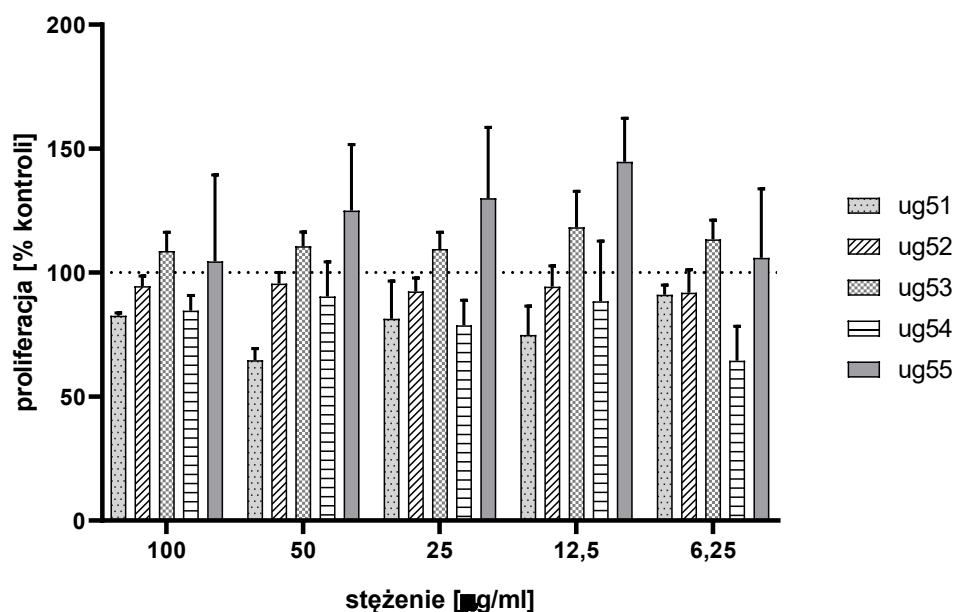


Rysunek 77. Cytotoksyczność peptydów **ug51**, **ug52**, **ug53**, **ug54**, **ug55** badana testem LDH po 48 h inkubacji wobec komórek hFOB 1.19, wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SD z trzech powtórzeń technicznych.

6.2 Ocena wpływu peptydów na proliferację komórek ludzkich osteoblastów płodowych hFOB 1.19

W celu określenia wpływu peptydów **ug51–ug55** na proliferację komórek kości, wykonano test WST–1 na linii komórkowej ludzkich osteoblastów płodowych hFOB 1.19. Test przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.15.2 dla peptydów w zakresie stężeń 6,25–100 µg/ml, zgodnie z normą ISO10993–5.

Uzyskane wyniki, przedstawiane na Rysunku 79, wskazują, że peptydy **ug51**, **ug52**, i **ug54** nie wykazują działania proliferacyjnego względem komórek hFOB 1.19 (proliferaacja < 100% w porównaniu do kontroli). Dla peptydu **ug53** można zaobserwować wzrost liczby komórek o 8–18% w stężeniach: 6,25–100 µg/ml, natomiast peptyd **ug55** wykazuje najwyższy potencjał proliferacyjny, powodując wzrost proliferacji o 20–45% w zakresie 12,5–50 µg/ml, z maksimum (ok. 45%) przy stężeniu 12,5 µg/ml. Peptyd **ug51** ulega rozpadowi na dwa główne fragmenty: **ug54** (fragment fibrylogenny) oraz **ug55** (fragment aktywny z sekwencją specyficzną dla enzymu). Można zatem uznać, że **ug51** pełni funkcję rezerwuaru peptydu **ug55**.



Rysunek 78. Wpływ peptydów **ug51**, **ug52**, **ug53**, **ug54**, **ug55** badanych testem WST–1 po 48 h inkubacji wobec komórek hFOB 1.19, wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SD z trzech powtórzeń technicznych.

Najwyższy potencjał proliferacyjny wobec komórek osteoblastów hFOB 1.19 wykazywały peptydy **ug53** i **ug55**. Jednak jak już wspomniałam, peptyd **ug51** może pełnić funkcję rezerwuaru peptydu **ug55**, co sugeruje możliwość jego powolnego uwalniania do środowiska i przedłużonego działania. Z kolei peptyd **ug52**, mimo braku aktywności proliferacyjnej, tworzy stabilne fibryle i stanowi rezerwuar peptydu **ug1**, który – jak wcześniej wykazałam – posiada wysoki potencjał proliferacyjny. Z tego powodu, do dalszych badań wybrałam peptydy **ug51** i **ug52**.

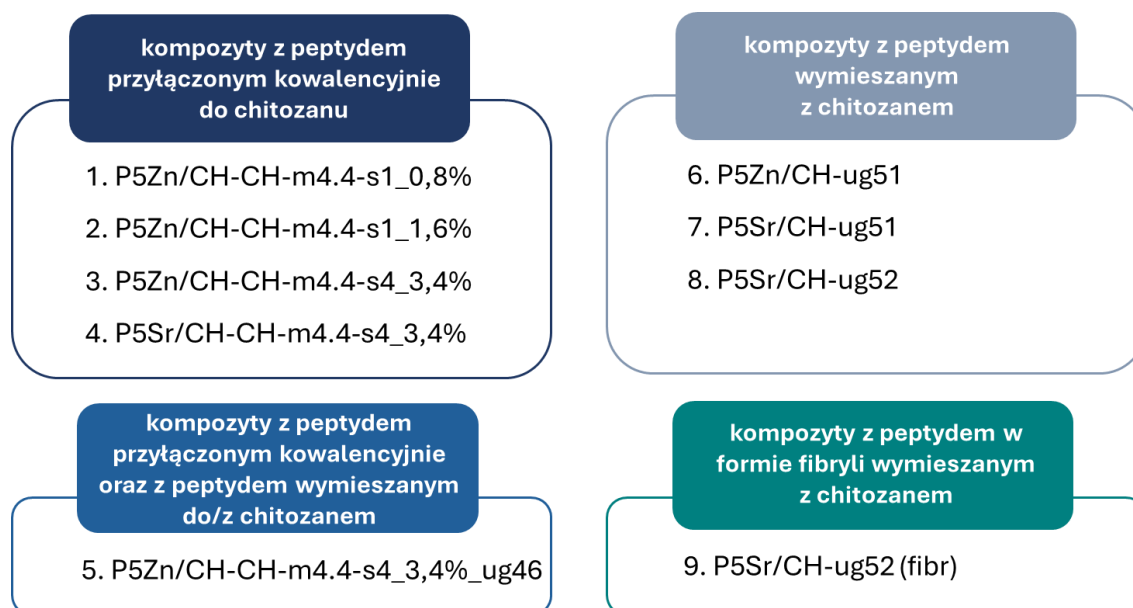
CZĘŚĆ III – Charakterystyka fizykochemiczna oraz ocena bioaktywności in vitro i in vivo kompozytów chitozanowo–bioszklanych

Trzecia część mojej pracy dotyczy analizy fizykochemicznej oraz aktywności biologicznej kompozytów składających się z wykonanych przeze mnie komponentów.

1. Analiza właściwości fizykochemicznych kompozytów chitozanowo–bioszklanych

Chitozan modyfikowany peptydem **ug4** (CH–m4.4–ug4, CH–m4.4–ug4), peptydy **ug51** i **ug52** oraz fibryle peptydowe **ug52** zostały przekazane zespołowi dr Moniki Biernat z Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Sieć Badawcza Łukasiewicz. Zespół ten przygotował kompozyty w formie krążków, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale III.10. Przygotowane zostały cztery grupy kompozytów, przedstawione na Rysunek 80, a ich dokładne składy przedstawiłam w Tabeli 25.

Zespół dr Moniki Biernat przeprowadził analizę wielkości porów, ocenę bioaktywności kompozytów oraz wykonał zdjęcia SEM kompozytów.



Rysunek 79. Podział wykonanych kompozytów chitozanowo–bioszklanych z peptydami na podstawie sposobu integracji peptydów z matrycą.

Pierwszą grupą (1–4) stanowią kompozyty z kowalencyjnie przyłączonym peptydem **ug4**, który pod wpływem enzymów zawartych w środowisku tkanki kostnej powinien ulegać hydrolizie, uwalniając peptyd **ug1**. Takie rozwiązanie umożliwia

kontrolowane, stopniowe uwalnianie peptydu o aktywności biologicznej, co może sprzyjać długofalowemu efektowi terapeutycznemu.

Kompozyt oznaczony numerem 5 zawiera zarówno kowalencyjnie przyłączony peptyd **ug4**, jak i peptyd **ug46** o działaniu antybakteryjnym. Połączenie tych dwóch składników umożliwia uzyskanie efektu synergicznego: szybkie uwolnienie peptydu **ug46** zapewnia natychmiastową ochronę przeciwdrobnoustrojową, podczas gdy stopniowa hydroliza peptydu **ug4** prowadzi do długotrwałego działania proregeneracyjnego.

Kolejna grupa (kompozyty nr 6–8) zawiera peptydy **ug51** i **ug52** wymieszane z chitozanem. W takich układach zakłada się znacznie szybsze uwalnianie peptydów z matrycy, co może być korzystne, gdy wymagany jest szybki efekt biologiczny. Warto podkreślić, że badania stabilności peptydu **ug51** wykazały, iż pełni on funkcję rezerwuaru peptydu **ug54**. Co więcej, **ug54** wykazuje silniejsze właściwości proregeneracyjne niż sam **ug51**, co może zwiększać skuteczność terapeutyczną kompozytu.

Ostatni z kompozytów (nr 9) zawiera peptyd **ug52** w formie fibryli wymieszanych z chitozanem. Zastosowanie struktury fibrylarnej umożliwia zmagazynowanie aktywnych peptydów w postaci uporządkowanej oraz ich kontrolowane, stopniowe uwalnianie pod wpływem bodźców środowiskowych lub enzymatycznych. Taki mechanizm może zapewnić długotrwałe i ukierunkowane działanie terapeutyczne.

Tabela 25. Numery, nazwy i opisy badanych kompozytów oraz wielkości porów (wyznaczona na podstawie zdjęć SEM).

Nr. kompozytu	Nazwa kompozytu	Opis składu kompozytu	Wielkość porów [μm]
1.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_0,8%	chitozan/bioszko domieszkowane ZnO/CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 0,8% wagowych do chitozanu	43,36–121,97
2.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_1,6%	chitozan/bioszko domieszkowane ZnO/CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu	70,9–130,12
3.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	chitozan/bioszko domieszkowane ZnO/CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu	73,4–161,29
4.	P5Sr/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	chitozan/bioszko domieszkowane SrO/CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu	38,96–107,24
5.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%_ug46	chitozan/bioszko domieszkowane ZnO/CH-m4.4-ug4/peptyd ug46 peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu, ug46 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 29 μg peptydu na 1 krążek	53,63–131,98
6.	P5Zn/CH-ug51	chitozan/ bioszko domieszkowane ZnO/peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10 μg peptydu na 1 krążek	109,3–334,69
7.	P5Sr/CH-ug51	chitozan/ bioszko domieszkowane SrO/peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10 μg peptydu na 1 krążek	59,83–120,49
8.	P5Sr/CH-ug52	chitozan/ bioszko domieszkowane SrO/peptyd ug52 (liofilizat) zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100 μg peptydu na 1 krążek	43,75–96,22
9.	P5Zn/CH-ug52(fibr)	chitozan/ bioszko domieszkowane ZnO, peptyd ug52 w formie fibryli peptydowych zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100 μg na 1 krążek	44,79–119,29

2. Badania struktury powierzchni oraz wielkości porów kompozytów

Po wszczepieniu biomateriału do organizmu, jego powierzchnia jako pierwsza wchodzi w kontakt z płynami ustrojowymi i komórkami, co inicjuje dalsze reakcje biologiczne, takie jak adsorpcja białek czy adhezja komórek [209]. Z tego względu analiza cech powierzchniowych biomateriału, w tym struktury i porowatości, jest kluczowa dla oceny jego biofunkcjonalności.

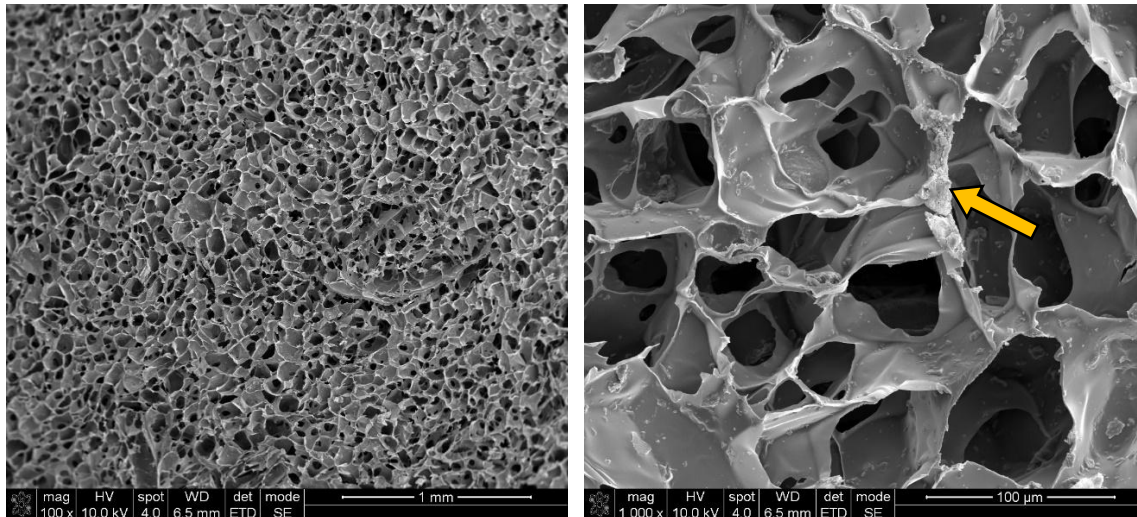
W celu oceny tych parametrów zastosowano skaningowy mikroskop elektronowy (SEM). Obrazowanie próbek nienapylonych przeprowadzono w warunkach niskiej próżni, z użyciem detektora vCD.

Jak przedstawiłam na Rysunkach 81–84, wszystkie kompozyty wykazują jednorodną, porowatą strukturę, przerywaną obecnością kryształków bioszklą. Średnice porów w analizowanych kompozytach wynoszą od 30 do 330 μm (Tabela 22), co mieści się w zakresie odpowiednim do wzrostu komórek kostnych – osteoblasty mają średnicę około 20–50 μm [210].

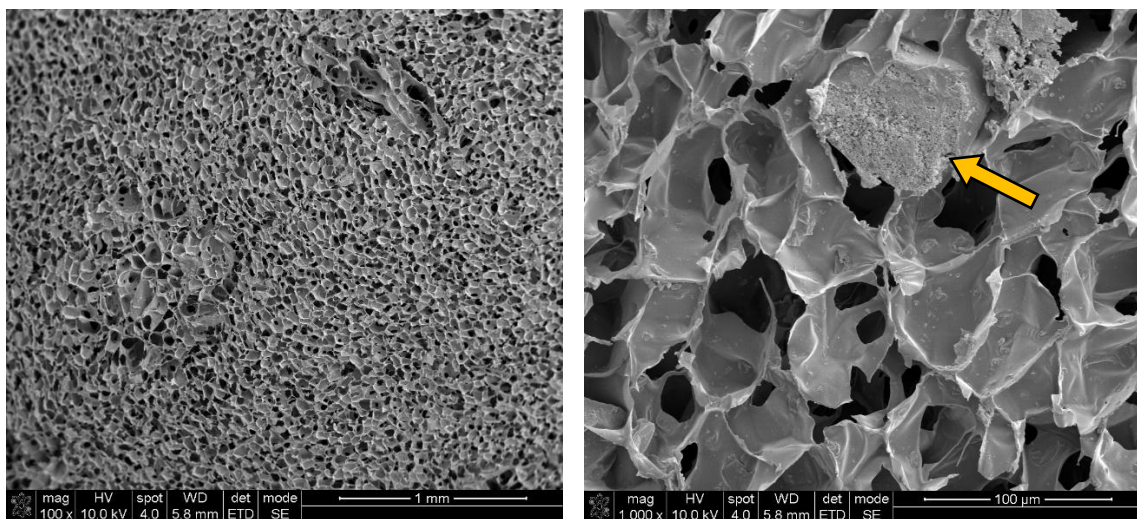
Kompozyty (Tabela 22) zawierające peptyd **ug4** przyłączony kowalencyjnie charakteryzują się średnicą porów od 38 μm (kompozyt 4) do 161 μm (kompozyt 3). Kompozyt 5, z dodatkiem peptydu **ug46** wymieszanego z chitozanem, wykazuje podobną wielkość porów. Kompozyty z peptydem **ug51/ug52** lub **ug52** w formie fibryli (kompozyty 7–9) posiadają pory o średnicy od 44 do 120 μm . Jedynie kompozyt 6 wyróżnia się porami o większej średnicy – 109–335 μm .

Kompozyty wykazują zbliżoną strukturę powierzchniową oraz porównywalny rozkład i rozmiar porów. Na Rysunkach 82 i 84 (kompozyty 3 i 5) zaobserwowano niewielkie kryształy bioszklą osadzone na ścianach porów. Z kolei na Rysunkach 83 i 85 (kompozyty 6 i 9) widoczne są większe agregaty bioszklą o średnicy około 50–70 μm . Wszystkie pory mają charakter otwarty, co sprzyja infiltracji materiału przez komórki.

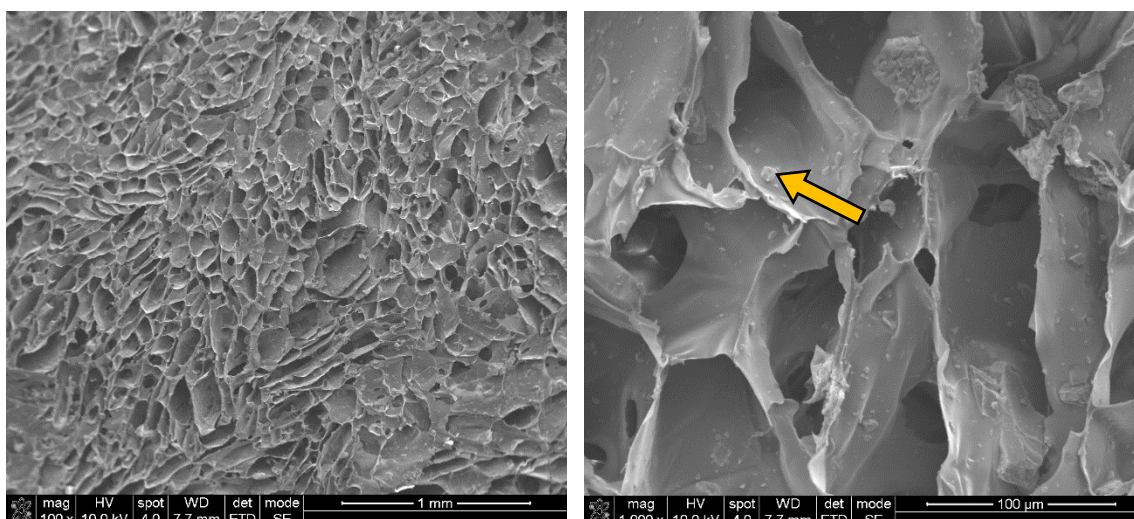
Na zdjęciach SEM kompozytu 9 nie udało się zaobserwować obecności fibryli peptydowych **ug52** w obrębie wnętrza materiału. Prawdopodobną przyczyną był bardzo mały rozmiar fibryli względem skali zastosowanej podczas obrazowania SEM (fibryle: 50–200 nm vs skala SEM: 100 μm).



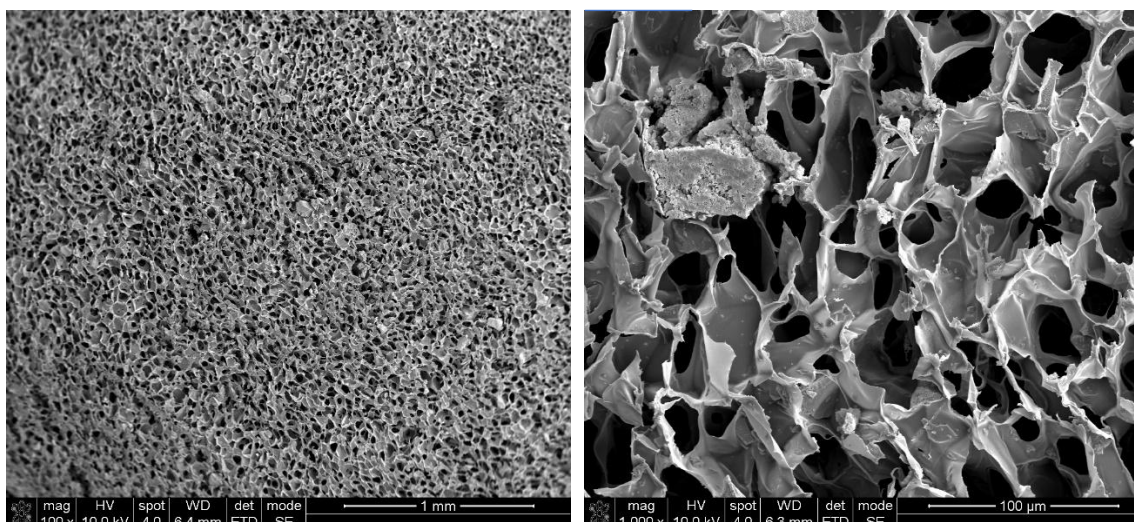
Rysunek 80. Struktura przekroju kompozytu 3 (P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%). Na zdjęciu po prawej stronie widoczne są fragmenty bioszkła osadzone w porowatej strukturze materiału, zaznaczone żółtą strzałką.



Rysunek 81. Struktura przekroju kompozytu 5 (P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%-ug46). Na zdjęciu po prawej stronie widoczne są fragmenty bioszkła osadzone w porowatej strukturze materiału, zaznaczone żółtą strzałką.



Rysunek 82. Struktura przekroju kompozytu 6 (P5Zn/CH–**ug51**). Na zdjęciu po prawej stronie widoczne są fragmenty bioszklą osadzone w porowatej strukturze materiału, zaznaczone żółtą strzałką.



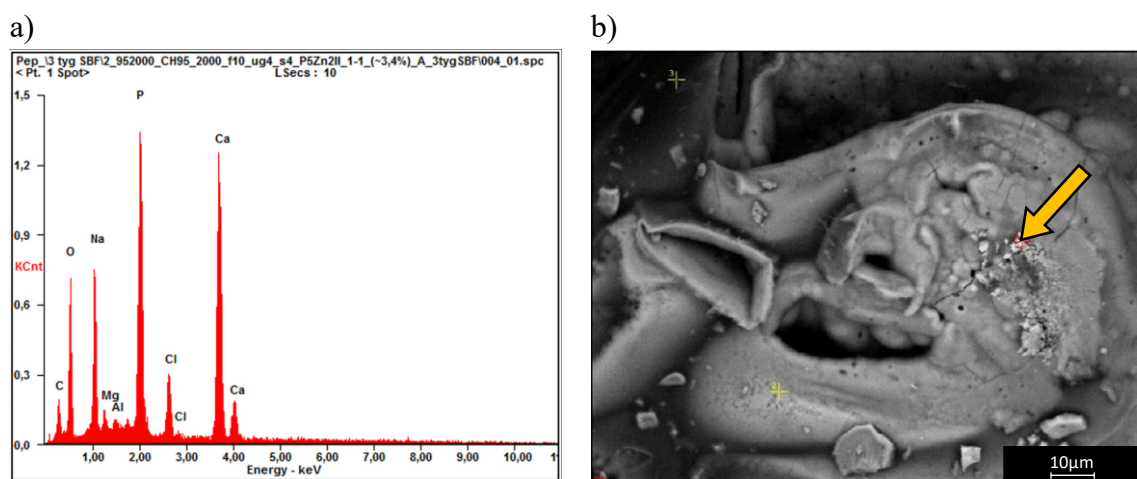
Rysunek 83. Struktura kompozytu 9 (P5Zn/CH–**ug52(fibr)**). Na zdjęciu po prawej stronie widoczne są fragmenty bioszklą osadzone w porowatej strukturze materiału, zaznaczone żółtą strzałką.

3. Badania bioaktywności kompozytów

Jedną z kluczowych cech implantu jest jego bioaktywność, rozumiana jako zdolność materiału do indukowania tworzenia warstwy kościopodobnego hydroksyapatytu (więcej informacji w części teoretycznej pracy – rozdział I.6) [128]. Parametr ten można ocenić poprzez inkubację materiału w symulowanym płynie ustrojowym (SBF), który naśladuje skład jonowy osocza krwi.

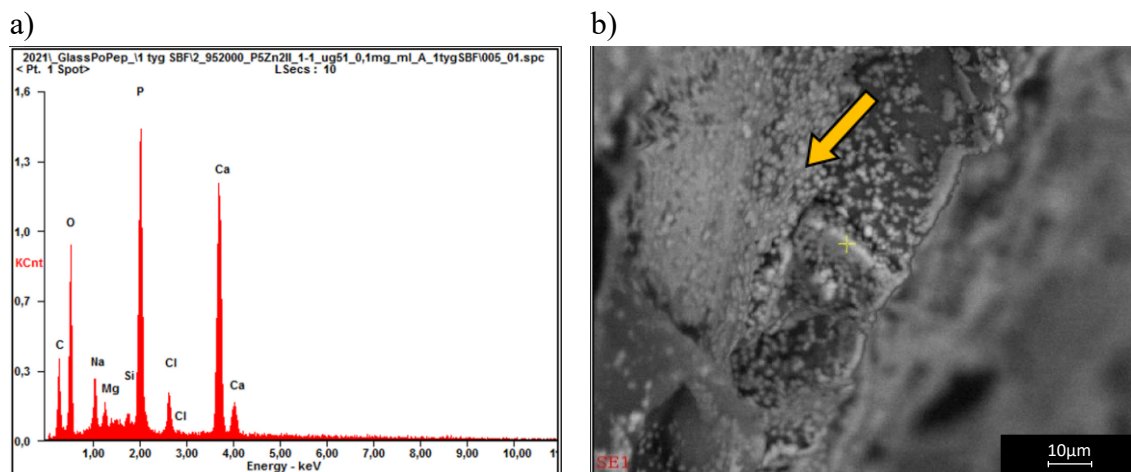
Badania bioaktywności kompozytów chitozanowo–bioszklanych zostały przeprowadzone przez zespół dr Moniki Biernat z Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie (Sieć Badawcza Łukasiewicz). Analizie poddano proces narastania warstwy apatytowej na powierzchni kompozytów po inkubacji w SBF w temperaturze 37 °C przez okres od 1 do 3 tygodni. Ocenę prowadzono przy użyciu spektroskopii EDS oraz obrazowania SEM.

Dla kompozytu 3, po 3 tygodniach inkubacji w SBF, analiza EDS (Rysunek 86a) wykazała obecność intensywnych sygnałów pochodzących od jonów Ca(II) i P(V). Oznacza to, że na powierzchni materiału powstała warstwa fosforanu wapnia, co potwierdza jego bioaktywność. Na obrazie SEM (Rysunek 86b) widoczne są charakterystyczne wysepki hydroksyapatytowe, oznaczone żółtą strzałką.



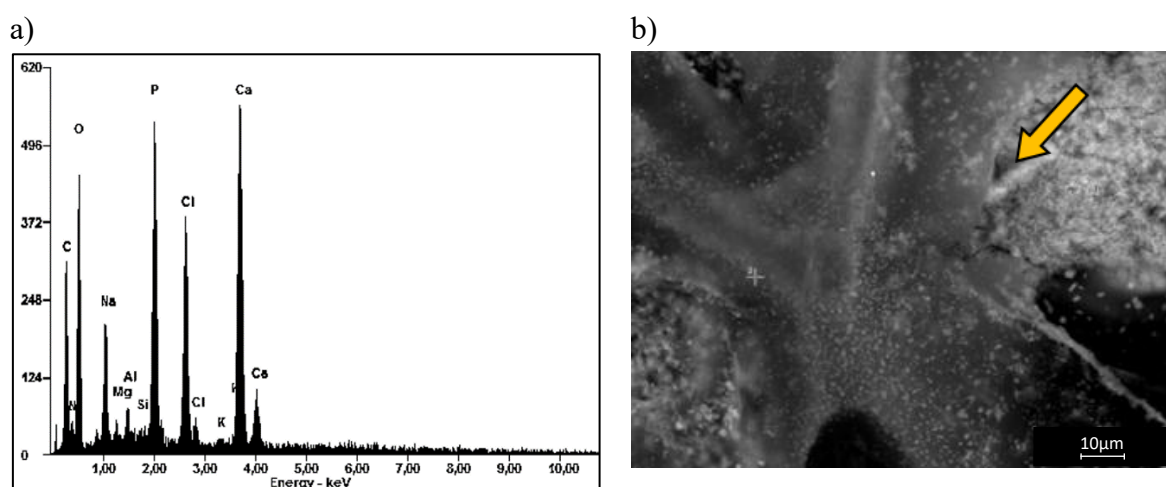
Rysunek 84. a) Widmo EDS powierzchni kompozytu 3 po 3 tygodniach inkubacji w SBF (37 °C); b) obraz SEM przedstawiający obecność wysepki hydroksyapatytowych (zaznaczonych żółtą strzałką).

W przypadku kompozytu 6, już po tygodniu inkubacji w SBF (Rysunek 87a) uzyskano silne sygnały Ca i P w analizie EDS, co również świadczy o tworzeniu się mineralnej warstwy apatytowej. Obraz SEM (Rysunek 87b) ujawnia wyraźne wysepki hydroksyapatytowe na powierzchni kompozytu.



Rysunek 85. a) Widmo EDS powierzchni kompozytu 6 po tygodniu inkubacji w SBF (37 °C); b) obraz SEM przedstawiający obecność wysepek hydroksyapatytowych, zaznaczonych żółtą strzałką.

Dla kompozytu 9, inkubowanego w SBF przez 2 tygodnie, analiza EDS (Rysunek 88a) wykazała obecność wapnia i fosforu, co – zgodnie z obserwacją SEM (Rysunek 88b) – wskazuje na tworzenie się mineralnej warstwy apatytowej. Oznacza to, że już po dwóch tygodniach kompozyt wykazuje wyraźną bioaktywność.



Rysunek 86. a) Widmo EDS powierzchni kompozytu 9 po 2 tygodniach inkubacji w SBF (37 °C); b) obraz SEM przedstawiający obecność wysepek hydroksyapatytowych, zaznaczonych żółtą strzałką.

4. Analiza profilu uwalniania peptydu z kompozytu

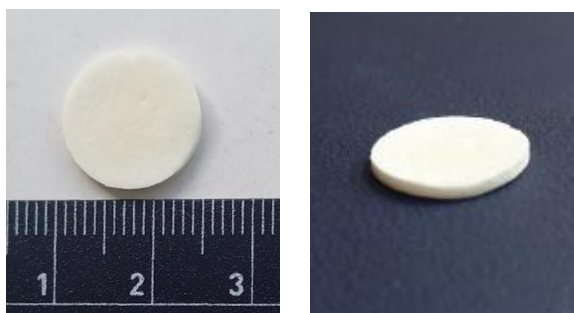
W celu oceny uwalniania peptydów z kompozytów przeprowadziłam eksperymenty, które miały wykazać, czy, w jakim zakresie i czasie dochodzi do ich uwolnienia do środowiska wodnego.

Uwalnianie z kompozytów zawierających peptydy przyłączone kowalencyjnie oraz w postaci fibryli przeprowadzałam w obecności komercyjnie dostępnego enzymu MMP-7, który hydrolizuje wiązanie peptydowe między resztami glicyny i leucyny w sekwencji PLGL. Weryfikację aktywności enzymu potwierdziłam przy użyciu substratu kontrolnego: (7-metoksykumaryna-4-ylo)acetylo-Pro-Leu-Gly-Leu-[N3-(2,4-dinitrofenylo)-L-2,3-diamino-propionylo]-Ala-Arg-NH₂ (MOCAC-PLGL(Dpa)AR) [211].

Dodatek enzymu miał na celu symulację środowiska degradacyjnego i wymuszenie uwalniania fragmentu aktywnego (np. peptydu **ug1**) ze struktury kompozytu. Z kolei w przypadku kompozytów, w których peptydy były wymieszane fizycznie z chitozanem (a nie przyłączone kowalencyjnie), badania prowadzono bez udziału enzymu, w celu oceny spontanicznego uwalniania.

Do każdego eksperymentu używałam po dwa krążki kompozytowe o średnicy 15 mm i grubości 1 mm, przy czym masa pojedynczego krążka wynosiła 10–17 mg. Każdy eksperyment przeprowadzałam w dwóch próbach, wykorzystując parę krążków, co pozwalało na uzyskanie wyższych stężeń peptydu w roztworze i zwiększenie czułości oznaczenia. Analizę uwalniania peptydów z kompozytów z wyznaczeniem stężenia uwolnionego peptydu wykonałam za pomocą systemu HPLC (Załącznik 1 – Warunki chromatograficzne 3).

Na Rysunku 88 przedstawiłam przykładowe krążki kompozytowe użyte w eksperymencie. Szczegółowe dane dotyczące ich mas oraz szacowanych ilości peptydu możliwego do uwolnienia przedstawiono w Tabeli 23.



Rysunek 87. Zdjęcia przykładowych krążków kompozytowych (na przykładzie kompozytu 6) używanych w badaniach profilu uwalniania. Zdjęcie własne.

Tabela 23. Masy kompozytów użytych w eksperymentach oraz szacowane ilości uwalnianych peptydów.

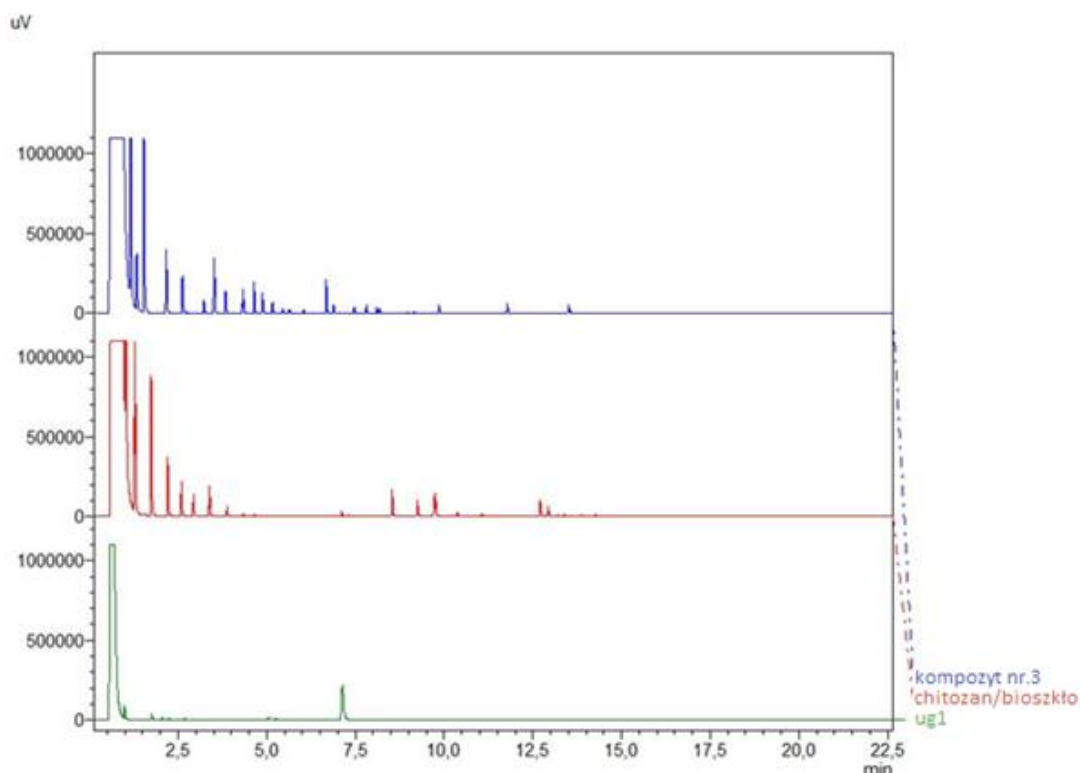
Numer	Nazwa kompozytu	Masy kompozytów [mg]		Szacowana całkowita ilość uwolnionego peptydu [μ g]	
		I próba	II próba		
1.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_0,8%	32,95	23,47	ug1	3,83
2.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_1,6%	26,39	24,11	ug1	7,65
3.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	23,23	25,98	ug1	15,3
4.	P5Sr/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	31,75	30,67	ug1	15,3
5.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%_ug46	20,33	21,56	ug1	15,3
				ug46	58
6.	P5Zn/CH-ug51	32,01	28,76	ug51	20
7.	P5Sr/CH-ug51	22,29	26,30	ug51	20
8.	P5Sr/CH-ug52	28,15	30,15	ug52	200
9.	P5Zn/CH-ug52(fibr)	38,79	33,62	ug1	82

4.1 Uwalnianie peptydu ug4 z kompozytów 1–5

Przeprowadziłam analizę uwalniania peptydu **ug4** z kompozytów 1–5 (Załącznik 3), zgodnie z procedurą opisaną w Załączniku 3. Celem badania było określenie, czy i w jakim stopniu dochodzi do uwolnienia sekwencji aktywnej – peptydu **ug1** – z **ug4** w wyniku działania enzymu MMP–7.

Na Rysunku 90 przedstawiłam przykładowe chromatogramy próbek pobranych po 24 godzinach inkubacji w buforze HEPES. Kolorem niebieskim oznaczyłam próbkę kompozytu 3, kolorem czerwonym – kontrolę (bioszko/chitozan), a kolorem zielonym – standard peptydu **ug1**. Na chromatogramie dla kompozytu 3 pojawił się słaby pik o czasie retencji ok. 7 minut, odpowiadający peptydowi **ug1**. Jednak jego intensywność była bardzo niska, a dodatkowo obecnych było wiele sygnałów tła, najprawdopodobniej pochodzących od chitozanu lub składników buforu.

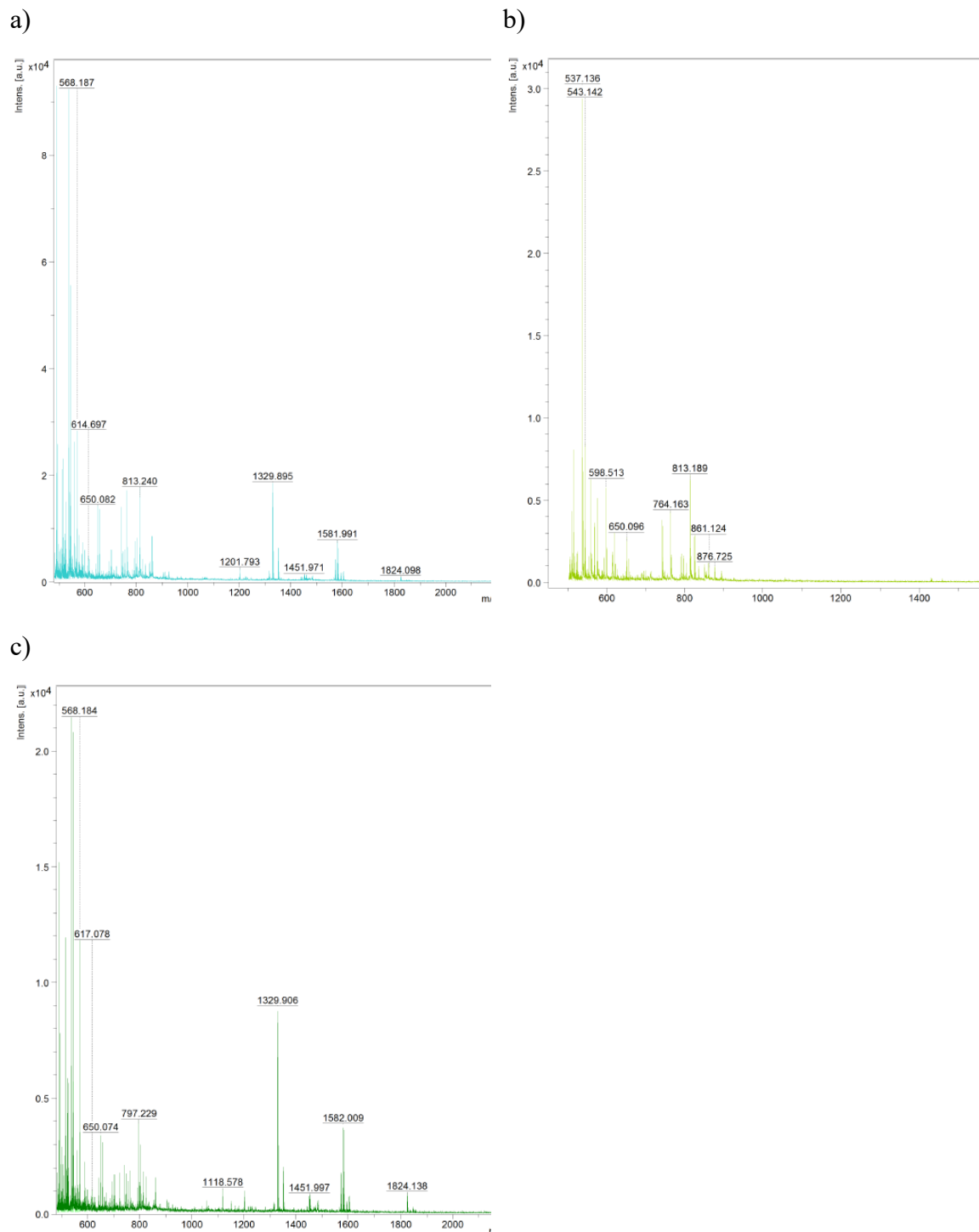
Wszystkie próbki kompozytów 1–5 wykazywały podobny przebieg chromatogramów – brakowało jednoznacznego, silnego sygnału charakterystycznego dla uwolnionego peptydu **ug1**.



Rysunek 88. Chromatogramy HPLC próbek pobranych po 24h inkubacji w buforze HEPES dla: krążków kompozytowych 3 (niebieski) i krążków kontroli chitozan/bioszko (czerwony) zestawiony z chromatogram peptydu **ug1** (zielony).

Aby zweryfikować obecność peptydu **ug1**, przeprowadziłam również analizy masowe (MS) próbek pobranych po 0, 4, 24 i 48 godzinach inkubacji. Rysunek 91 przedstawia widma MS dla próbek pobranych po 24 godzinach: a) próbka po inkubacji kompozytu 3, b) próbka kontroli (bioszko/chitozan), c) próbka kontrolna – bufor HEPES.

Na wszystkich widmach zarejestrowałam sygnał o wartości $m/z = 650,0$, odpowiadający jonowi $[M + K]^+$. Jednak ponieważ pik ten był obecny również w obu kontrolach, uznałam, że pochodzi on najprawdopodobniej z tła – zanieczyszczeń buforu lub resztek peptydów o zbliżonej masie.



Rysunek 89. Widma spektrometrii mas próbek pobranych po 24 h inkubacji w buforze HEPES: a) kompozyt 3, b) kontrola (bioszko/chitozan), c) bufor kontrolny.

Ze względu na bardzo niskie stężenia oraz brak jednoznacznych sygnałów degradacji enzymatycznej, nie byłam w stanie wiarygodnie określić profilu uwalniania

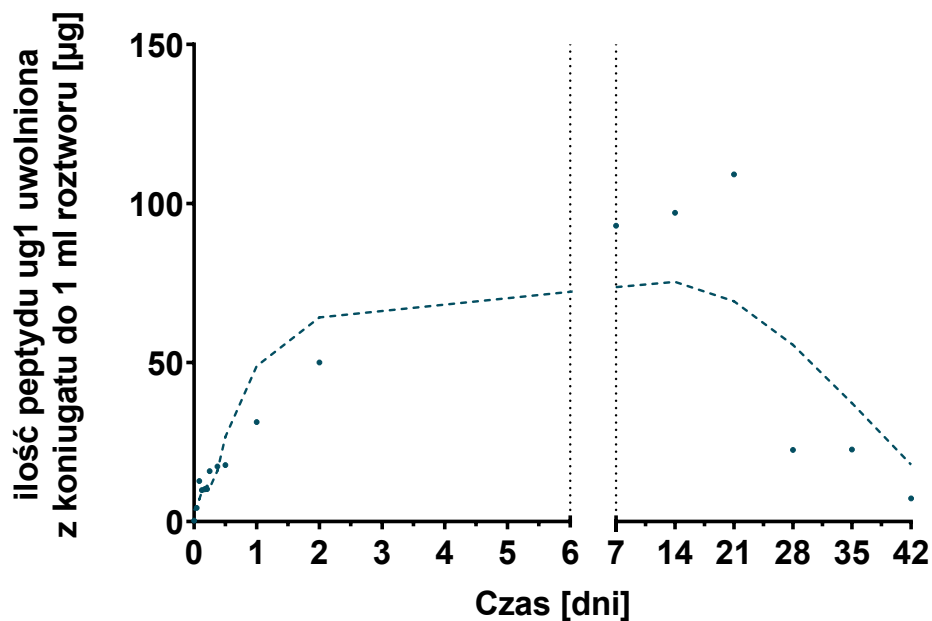
peptydu **ug1** z kompozytów 1–5. Szacunkowe ilości **ug1** możliwe do uwolnienia (Tabela 23) mieściły się w zakresie od 3,83 µg (kompozyt 1) do 15,3 µg (kompozyty 3–5) – są to wartości bardzo niskie, zbliżone do granicy wykrywalności metod HPLC i MS, co mogło również wpłynąć na trudności w jednoznacznej interpretacji wyników.

4.2 Uwalnianie peptydu *ug4* z koniugatu *CH–m4.4–ug4*

Ze względu na to, że nie udało mi się jednoznacznie potwierdzić uwalniania peptydu **ug1** z krążków kompozytowych 1–5 (Załącznik 3), przeprowadziłam osobną analizę z wykorzystaniem koniugatu CH–m4.4–ug4. Eksperyment wykonałam w wodzie, ponieważ wcześniejsze doświadczenia z wykorzystaniem buforu HEPES wskazywały na jego interferencję – generował on sygnały o czasie retencji i masie podobnej do analizowanego peptydu, co utrudniało jednoznaczną identyfikację **ug1**.

Zgodnie z założeniem, do roztworu wodnego powinno zostać uwolnione ok. 0,7 mg peptydu **ug1**. Wyniki eksperymentu, przedstawione na Rysunku 91, pokazują, że proces uwalniania przebiegał powoli i stopniowo. W ciągu pierwszych 48 godzin uwolniło się około 50 µg peptydu (ok. 7%), a po 7 dniach – ponad 90 µg (13%). Do 21. dnia ilość **ug1** w roztworze wzrosła do ok. 15,5%.

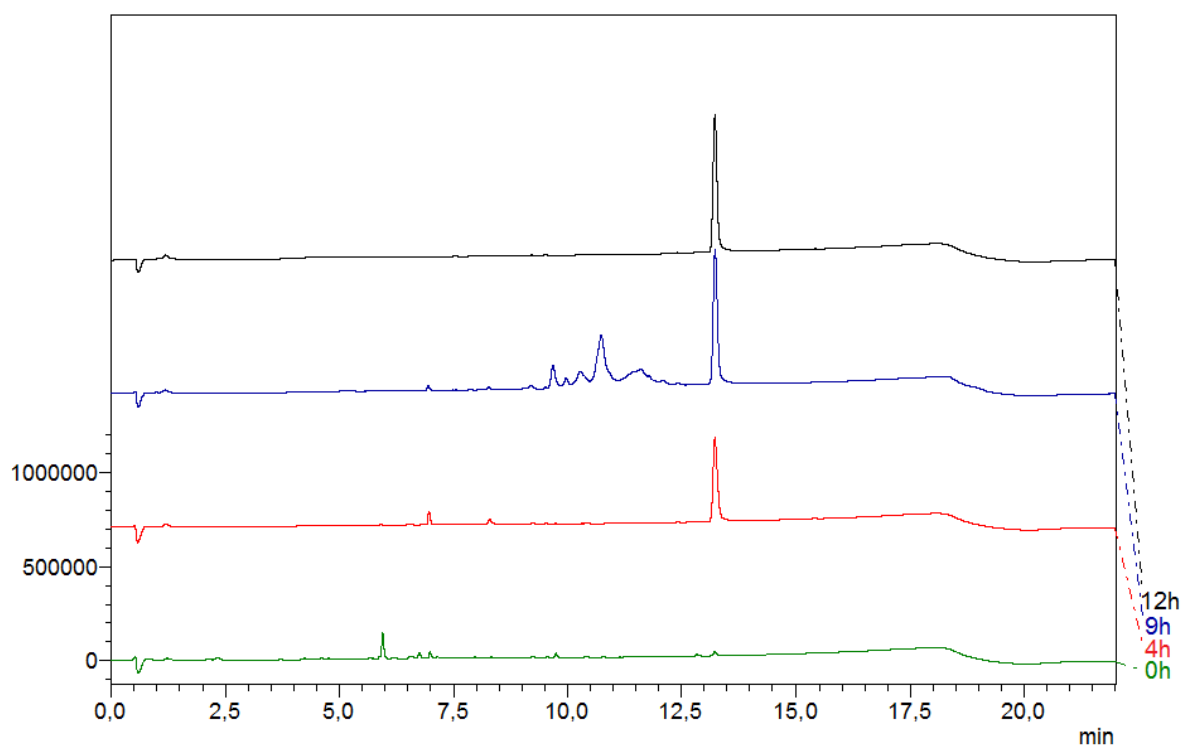
Zdecydowałam się przedłużyć inkubację do 42 dni. Po 21. dniu obserwowałam spadek stężenia uwolnionego peptydu, co mogło wynikać ze zmniejszenia tempa hydrolizy, ale także z rozpadu samego peptydu. Biorąc pod uwagę, że peptyd **ug1** charakteryzuje się ograniczoną stabilnością w środowisku wodnym (por. rozdział IV.1.3), uważam, że jego degradacja częściowo maskowała dalsze uwalnianie – mimo to, obecność **ug1** potwierdziłam nawet po 42 dniach inkubacji.



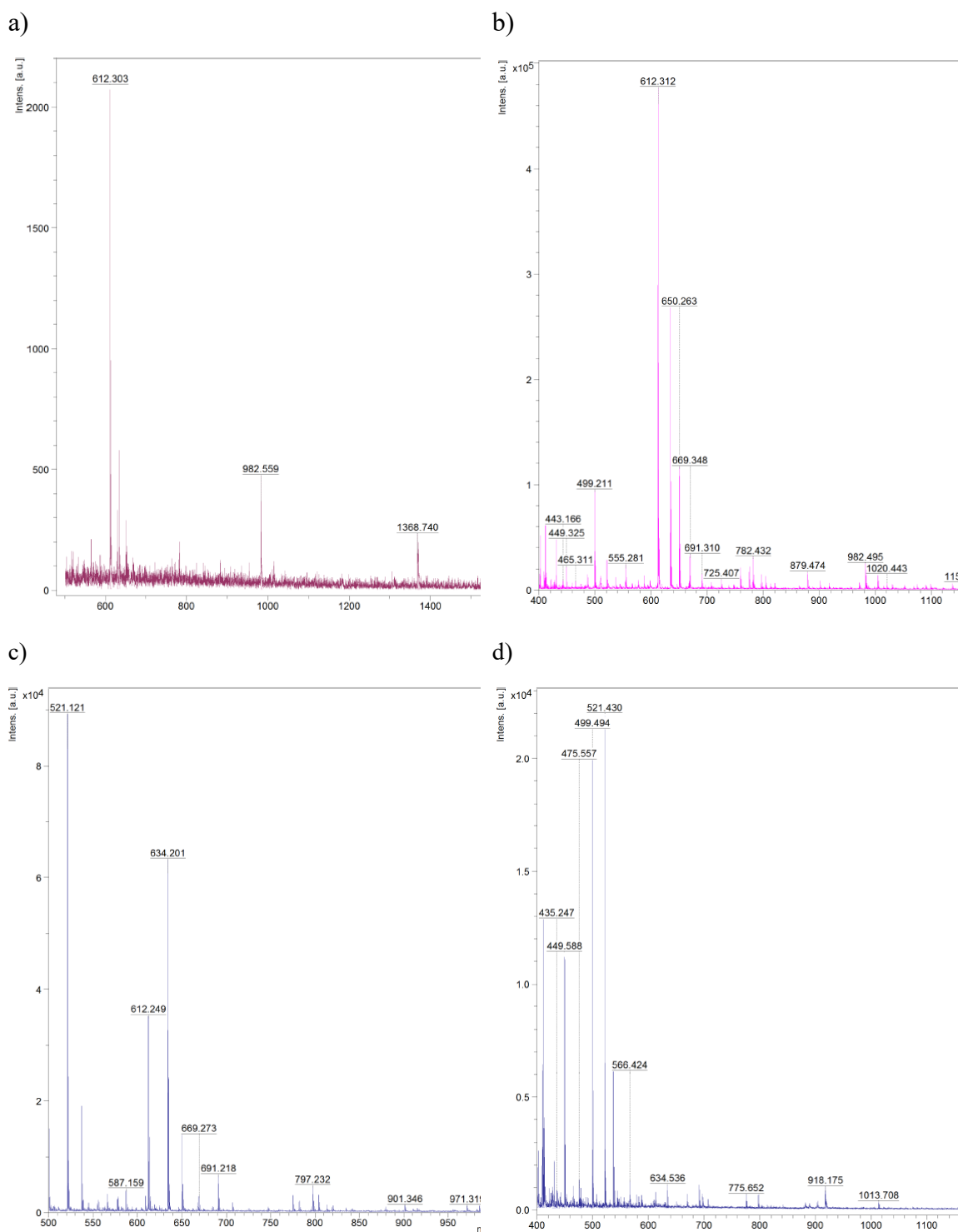
Rysunek 90. Profil uwalniania peptydu **ug1** z koniugatu CH-m4.4-ug4 w obecności enzymu MMP-7. Kropkami oznaczono punkty pomiarowe, linią przerywaną – oszacowany przebieg uwalniania (wykonany został jeden pomiar w każdym punkcie czasu).**ug1**

Przykładowe chromatogramy HPLC próbek inkubowanych z enzymem przedstawiłam na Rysunku 92, natomiast widma spektrometrii masowej (MS) próbek zebranych po 24 h, 7, 28 i 42 dniach inkubacji – na Rysunku 93. W każdej z próbek udało mi się zarejestrować sygnały odpowiadające peptydowi **ug1**. Obserwowane masy: $[M+H]^+ = 612,3$, $[M+Na]^+ = 634,2 / 634,5$, $[M+K]^+ = 650,3$, były zgodne z masą teoretyczną **ug1** (611,7 Da).

uV



Rysunek 91. Chromatogramy HPLC próbek koniugatu CH-m4.4-ug4 po inkubacji z enzymem MMP-7 w czasie: 0 h (zielony), 4 h (czerwony), 9 h (niebieski), 12 h (czarny).

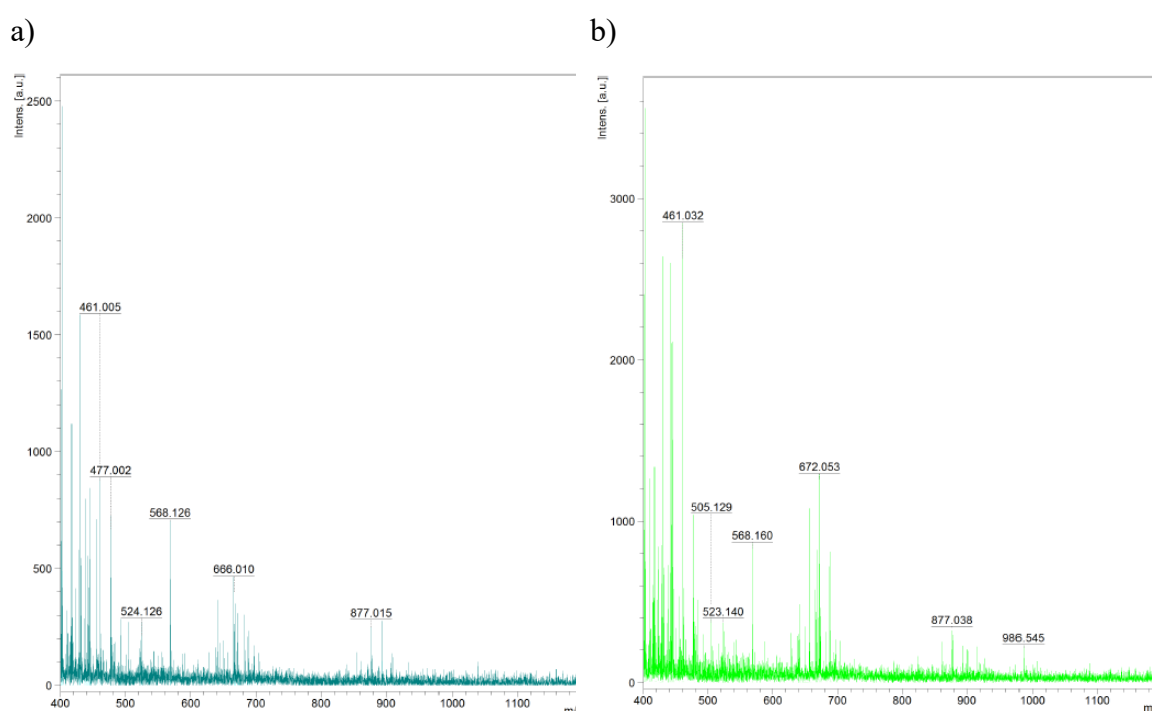


Rysunek 92. Widma spektrometrii mas próbek zawierających uwolniony peptyd **ug1** po inkubacji CH–m4.4–ug4 w wodzie z enzymem MMP–7: a) 24 h, b) 7 dni, c) 28 dni, d) 42 dni. **ug1**

Zgodnie z moimi wcześniejszymi badaniami stabilności (rozd. IV.1.3), w warunkach wodnych przy 37°C po 24 godzinach w roztworze pozostaje zaledwie ok. 37%

nienaruszonego peptydu **ug1**. Obecność jego sygnałów w próbce po 42 dniach stanowi więc mocny dowód na długotrwałe, kontrolowane uwalnianie z koniugatu.

Zarówno w analizach HPLC, jak i MS, zarejestrowałam również dodatkowe sygnały – najprawdopodobniej pochodzące od chitooligomerów uwalnianych z degradowanego chitozanu. W celu ich identyfikacji przeprowadziłam osobne doświadczenie: inkubację samego chitozanu w wodzie w temperaturze 37°C. Widma MS próbek pobranych po 4 h i 24 h, przedstawione na Rysunku 94, wykazały obecność szerokiego spektrum produktów degradacji chitozanu, co potwierdza przypuszczenie, że obserwowane wcześniej sygnały nie pochodziły od peptydu.



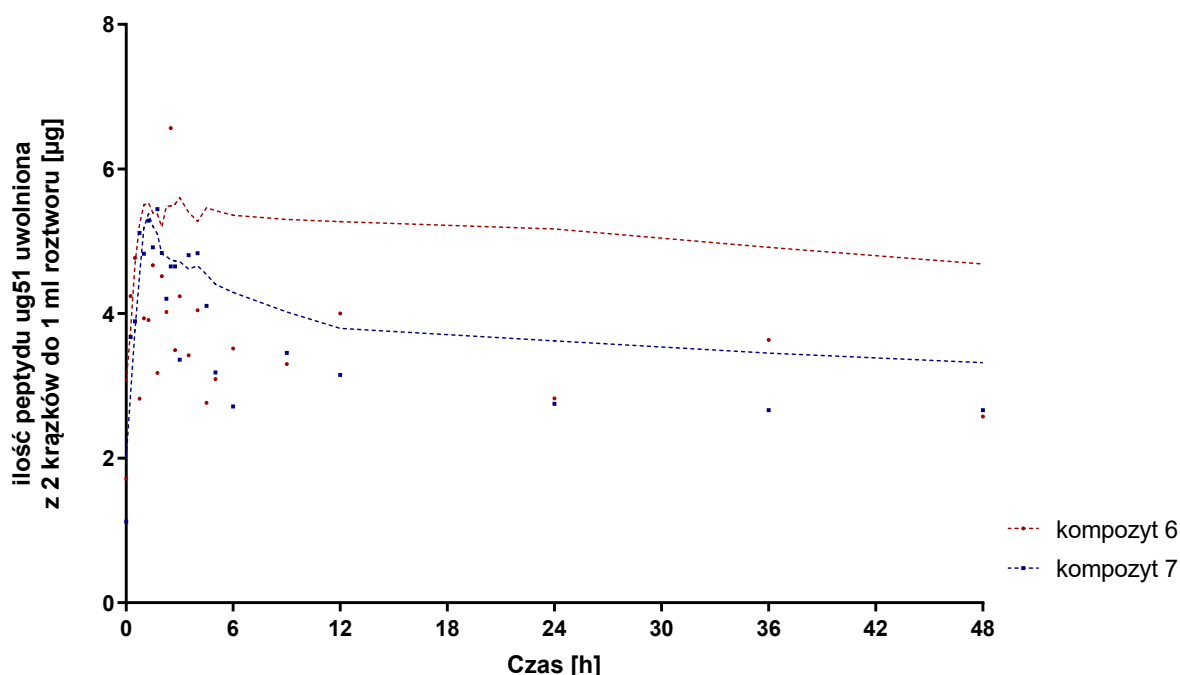
Rysunek 93. Widma spektrometrii mas chitozanu inkubowanego w wodzie w temperaturze 37 °C: a) po 4 h, b) po 24 h.

4.3 Uwalnianie peptydu **ug51** z kompozytów

W kolejnym etapie badań wyznaczyłam profil uwalniania peptydu **ug51** z kompozytów 6 i 7, w których peptyd **ug51** został zmieszany z chitozanem i bioszkiełem (Załącznik 4). Eksperyment przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w Załączniku 3. Na podstawie danych teoretycznych, z każdego krążka kompozytu do roztworu powinno się uwolnić około 20 µg peptydu (Tabela 23).

W obu przypadkach – kompozytów 6 i 7 – zaobserwowałam szybki wyrzut peptydu **ug51**, który trwał do około 3 godzin inkubacji. Po tym czasie, do roztworu uwolniło się ok. 5 μg peptydu, a następnie jego stężenie stopniowo spadało, co wskazuje na degradację, a nie dalsze uwalnianie. To zmniejszenie może być związane z hydrolizą peptydu **ug51** do fragmentów **ug54** i **ug55**, co szczegółowo opisałam w Rozdziale IV.I.14.

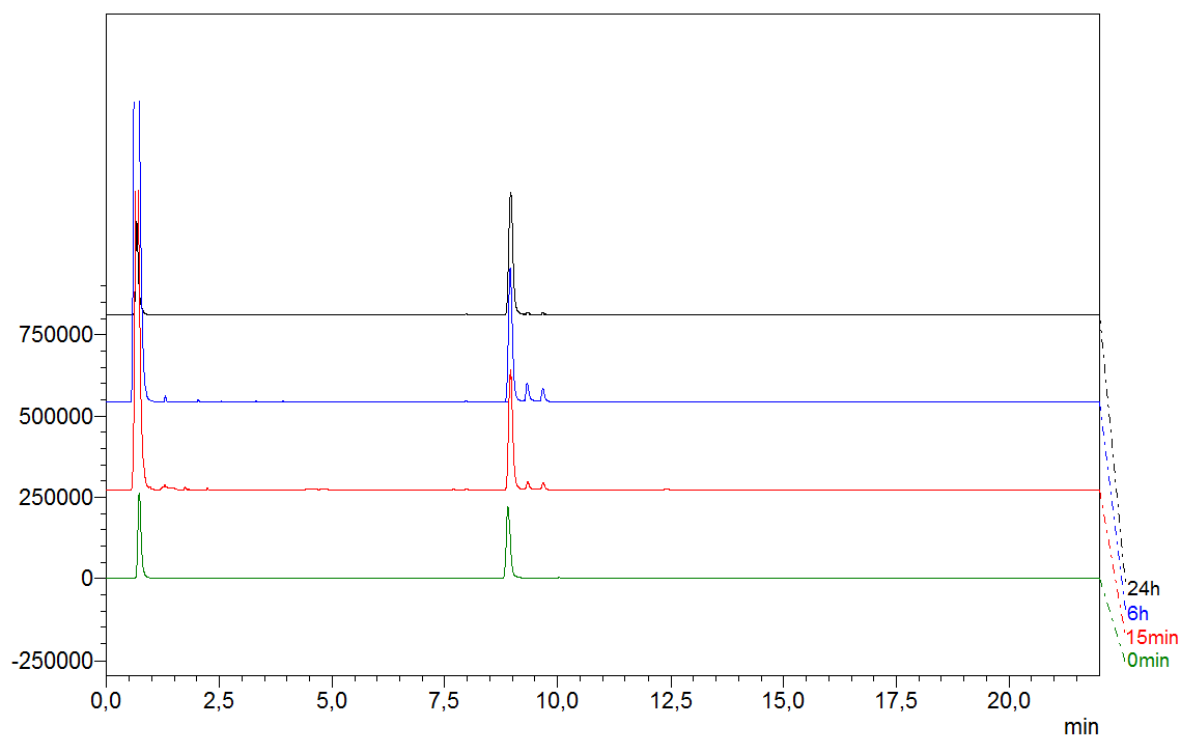
Dla kompozytu 6, maksymalną ilość uwolnionego peptydu (ponad 6 μg) odnotowałam po 2 godzinach. Po tym czasie stężenie utrzymywało się na poziomie 3–4 μg . Dla kompozytu 7, najwyższe stężenie (około 5 μg) wystąpiło po 1 godzinie, po czym – już po 3 godzinach – ilość peptydu w roztworze spadła do około 3 μg , a po 12 godzinach ustabilizowała się na poziomie około 2 μg , który utrzymał się do końca eksperymentu (48 godzin). Oba profile są zbliżone, jednak kompozyt 6 wykazywał nieco wyższe i bardziej stabilne uwalnianie.



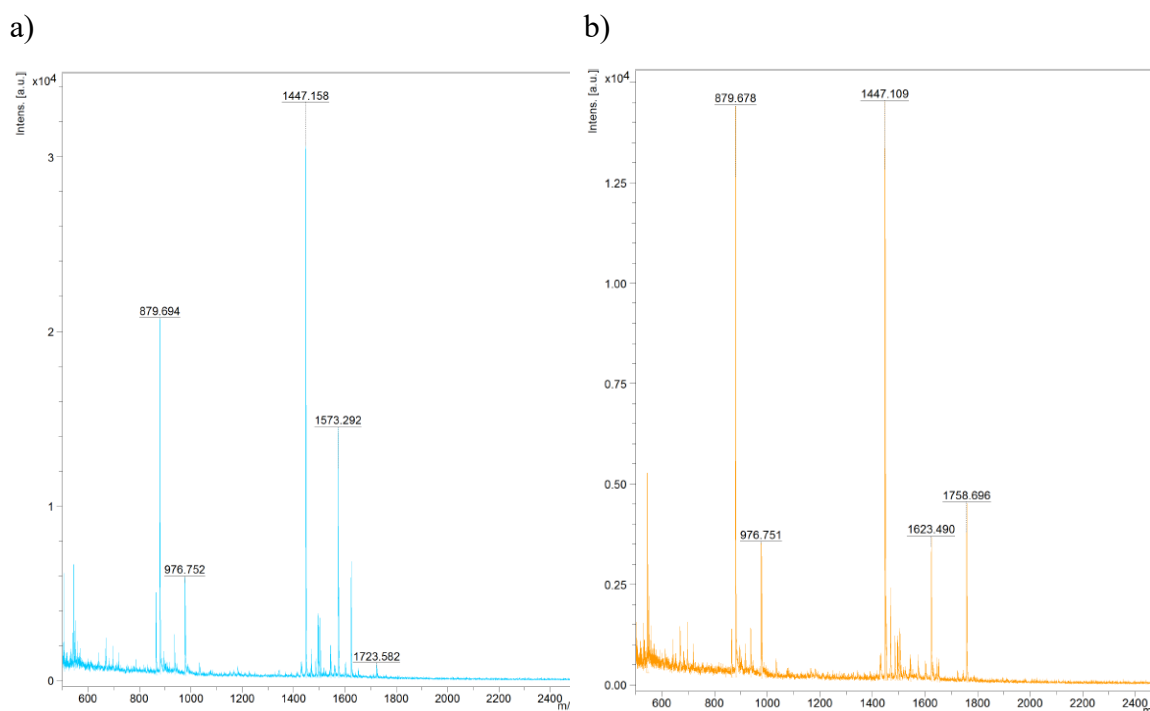
Rysunek 94. Profil uwalniania peptydu **ug51** (ilość w μg) z kompozytów 6 (kolor czerwony) i 7 (kolor niebieski) w trakcie 48-godzinnej inkubacji. Na wykresie przedstawiono średnią ilość peptydu **ug51** uwolnioną z krążków kompozytowych do 1 ml roztworu w funkcji czasu.

Aby potwierdzić obecność uwolnionego peptydu **ug51**, wykonałam analizę chromatograficzną HPLC oraz spektrometrię mas w różnych punktach czasowych (Rysunki 96 i 97). Zidentyfikowałam peptyd o masie teoretycznej $[M] = 1446,7 \text{ Da}$.

Zaobserwowane sygnały obejmowały m/z $[M+H]^+ = 1447,158$ oraz $[M+H]^+ = 1447,109$, co jednoznacznie wskazuje na obecność peptydu **ug51** w roztworze.



Rysunek 95. Chromatogramy HPLC próbek peptydu **ug51** uwolnionego z kompozytu 6 po inkubacji w wodzie przez 0min, 15min, 6h oraz 24h.



Rysunek 96. Widma spektrometrii mas dla próbek uwolnionego peptydu **ug51** pobieranych podczas 45-minutowej inkubacji w wodzie dla kompozytów a) 6 oraz b) 7.

W kolejnej analizie – przy użyciu spektrometrii mas – zidentyfikowałam także dodatkowy sygnał o masie 879 Da, odpowiadający peptydowi **ug55**. Potwierdza to częściową hydrolizę peptydu **ug51**, co szczegółowo opisałam w Rozdziale IV.II.3. Oznacza to, że zmniejszona ilość peptydu w roztworze może być bezpośrednio związana z jego rozpadem.

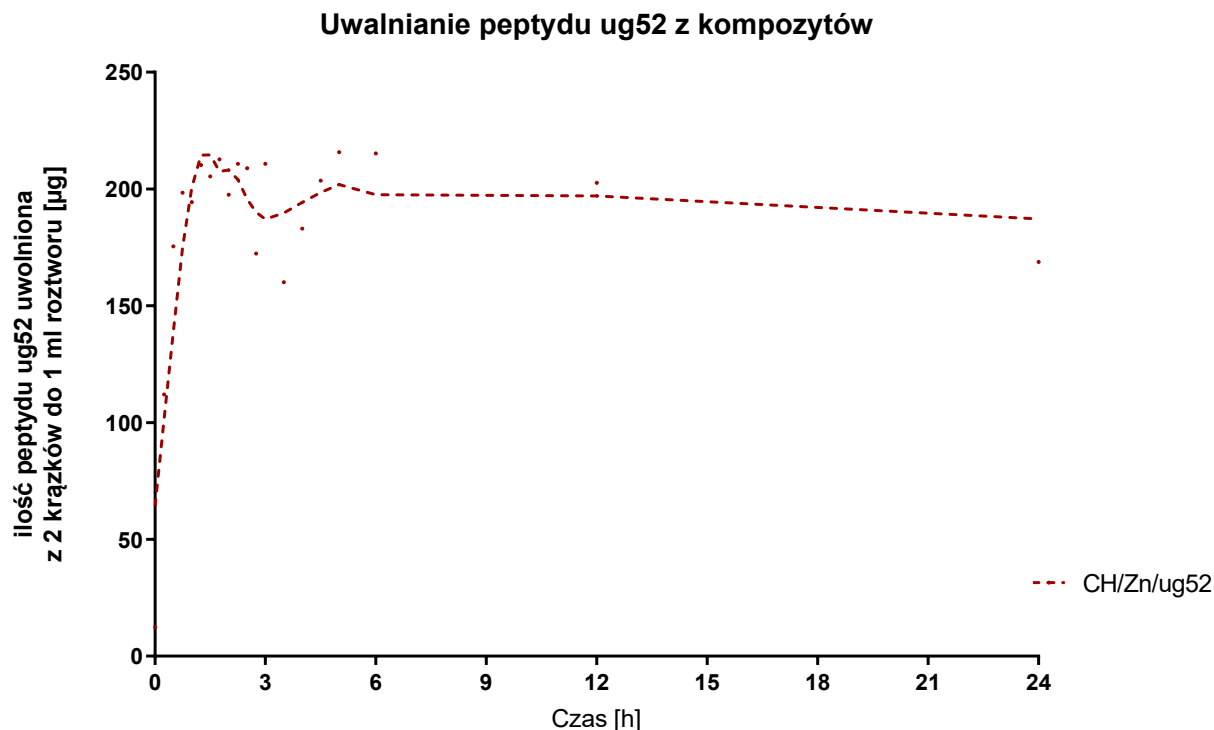
4.4 Uwalnianie peptydu **ug52** z kompozytów chitozanowo–bioszklanych

Przeprowadziłam analizę uwalniania peptydu **ug52** z kompozytu 8 i 9 zgodnie z procedurą zawartą w Załączniku 3.

4.4.1 Uwalnianie peptydu **ug52** z kompozytu 8

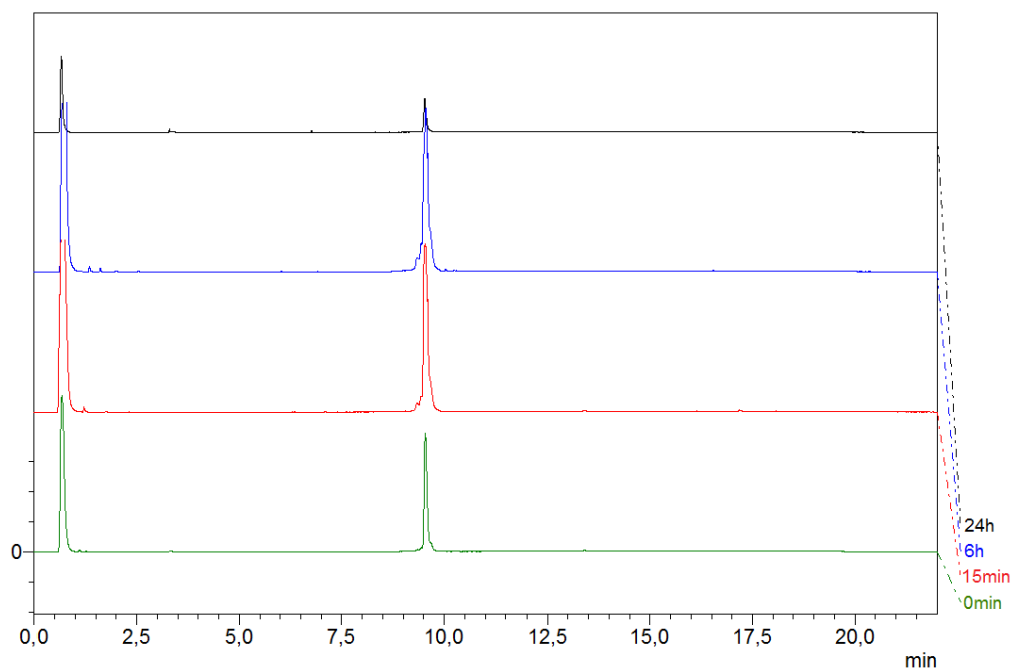
Kompozyt 8 zawierał peptyd **ug52** zmieszany z chitozanem i bioszklą (Załącznik 4). Zgodnie z obliczeniami teoretycznymi, do roztworu powinno uwolnić się około 200 μg **ug52** (Tabela 23). W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowałam bardzo szybki wyrzut peptydu, trwający do około 1 godziny i 15 minut. W tym czasie uwolniło się niemal cała przewidywana ilość peptydu (około 200 μg , co stanowi blisko 100% zakładanej ilości). Na wykresie profilu uwalniania (Rysunek 98) widoczne jest wyraźne plateau, które

potwierdza zakończenie procesu uwalniania już w tym czasie. Po 6h inkubacji odnotowałam spadek ilości peptydu w roztworze, który najprawdopodobniej był wynikiem częściowej degradacji peptydu w warunkach inkubacji.

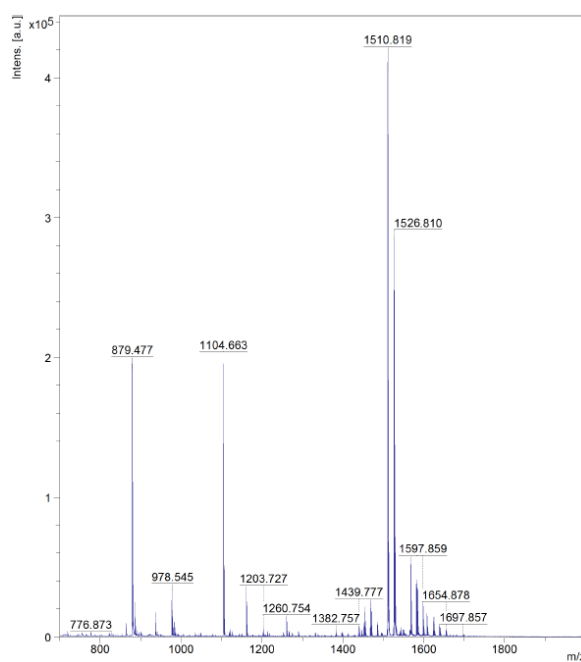


Rysunek 97. Profil uwalniania peptydu **ug52** z kompozytu 8 w ciągu 24 godzin inkubacji. Przedstawiono średnią ilość peptydu **ug52** uwolnioną z pojedynczego krążka kompozytu do 1 ml roztworu w funkcji czasu.

W celu potwierdzenia obecności peptydu **ug52** w roztworze, wykonałam analizę chromatograficzną HPLC oraz spektrometrię mas w wybranych punktach czasowych (Rysunki 99 i 100). Zidentyfikowałam sygnały odpowiadające peptydowi **ug52**, zgodne z jego teoretyczną masą molową $[M] = 1488,75$ Da. Zaobserwowane jony odpowiadają: $[M+Na]^+ = 1510,8$ oraz $[M+K]^+ = 1526,8$, co jednoznacznie potwierdza obecność peptydu **ug52** w roztworze.



Rysunek 98. Chromatogramy HPLC próbek peptydu **ug52** uwolnionego z kompozytu 8 po inkubacji w wodzie przez 0 min, 15 min, 6 h i 24 h.



Rysunek 100. Widmo spektrometrii mas dla próbki peptydu **ug52** pobranej po 30 minutach inkubacji wodnej dla kompozytu 8.

4.4.2 Uwalnianie peptydu **ug52** z kompozytu 9

Kompozyt 9 (Załącznik 4) zawierał peptyd **ug52** w formie fibryli, zmieszany z matrycą kompozytową. Zgodnie z obliczeniami teoretycznymi, z próbki powinno się uwolnić około 200 µg peptydu ug1, który był zawarty w fibrylach **ug52** (Tabela 23).

W przeprowadzonym eksperymencie nie udało mi się zarejestrować sygnałów chromatograficznych (HPLC) umożliwiających ilościowe oznaczenie peptydu **ug52**, a co za tym idzie – nie byłam w stanie wyznaczyć profilu jego uwalniania. Fibryla peptydowa **ug52** pełniła rolę rezerwuaru peptydu ug1, dlatego brak detekcji oznacza również brak uwalniania peptydu ug1 z kompozytu.

Wykonałam analizę jakościową wszystkich próbek metodą MALDI–TOF MS, która nie potwierdziła obecności peptydu ug1 w roztworze. Na tej podstawie stwierdzam, że nie nastąpiło jego uwolnienie z kompozytu. Prawdopodobną przyczyną braku uwalniania mogło być to, że fibryle zostały zmieszane z kompozytem – co skutkowało ich ograniczoną dostępnością dla enzymu.

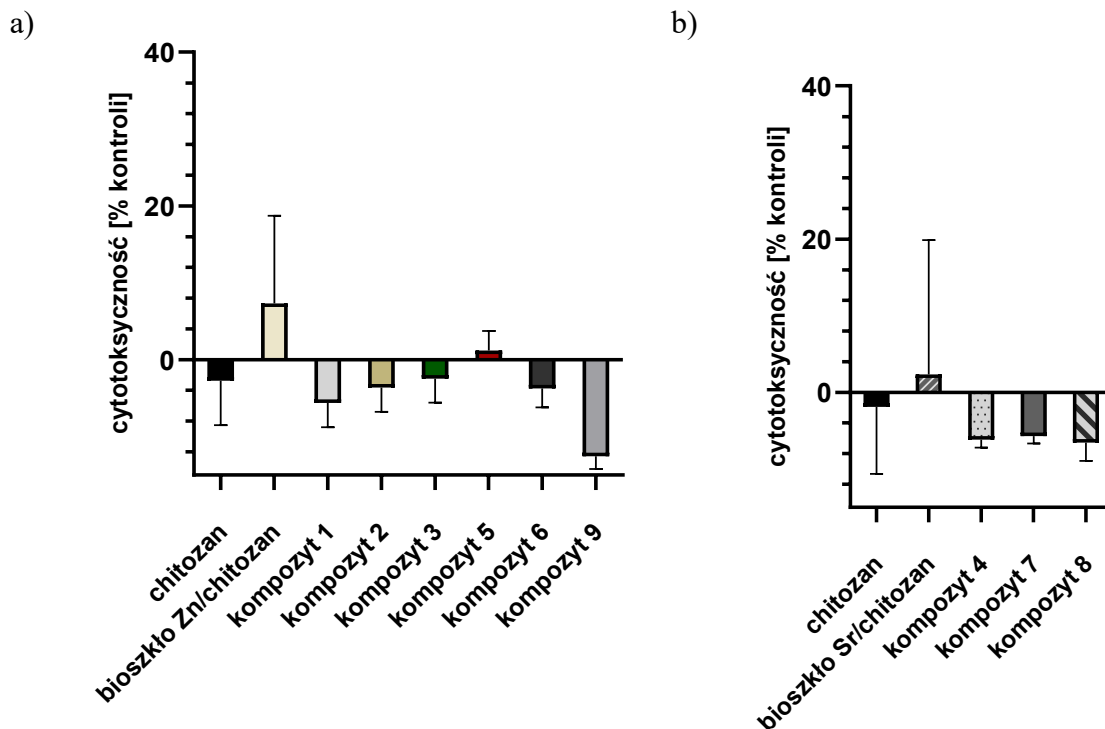
5. Badania biologiczne kompozytów

W celu wybrania kompozytu o najlepszych właściwościach proregeneracyjnych przeprowadzono badania biologiczne przygotowanych krążków kompozytowych. Eksperymenty zostały przeprowadzone w Instytucie Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w zespole dr Beaty Gromadzkiej, zgodnie z procedurą zawartą w rozdziale III.16.

Dla przygotowanych krążków kompozytowych przeprowadzono badania cytotoksyczności wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Test LDH został wykonany zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.16 zgodnie z normą ISO10993–5. Badanie zostało wykonane metodą pośrednią, w tym celu przygotowano ekstrakty z 3 krążków o średnicy 1 cm dla każdego z kompozytów poprzez zalanie ich pożywką DMEM/F–12 inkubacją przez 24h.

Z uwagi na fakt, że komórki hFOB 1.19 dzielą się co około 36 godzin, czas inkubacji z ekstraktami kompozytów został wydłużony do 48 godzin, aby umożliwić komórkom przejście pełnego cyklu podziałowego.

Potwierdzono, że badane kompozyty nie wykazują efektu cytotoksycznego. Wszystkie przebadane próbki (Rysunek 101a i 101b) osiągnęły bardziej rygorystyczny próg 90% żywotności komórek (cytotoksyczność <10%), co oznacza, że spełniają wymagania normy ISO 10993–5 dla materiałów niecytotoksycznych.



Rysunek 99. Cytotoksyczność kompozytów z bioszkieł a) wzbogaconym Zn b) wzbogaconym Sr, badana testem LDH po 48 h inkubacji z komórkami hFOB 1.19

W celu określenia wpływu krążków kompozytowych na procesy proregeneracyjne komórek kości wykonano test WST–1 na linii komórkowej ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Test przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale III.16.2.

Wyniki testu wykazały, że krążki wykonane z samego chitozanu stymulują proliferację osteoblastów hFOB 1.19 względem kontroli na poziomie 128%. Dodatek bioszkieła domieszkowanego tlenkiem cynku do kompozytu nieznacznie zwiększył proliferację do poziomu 131%.

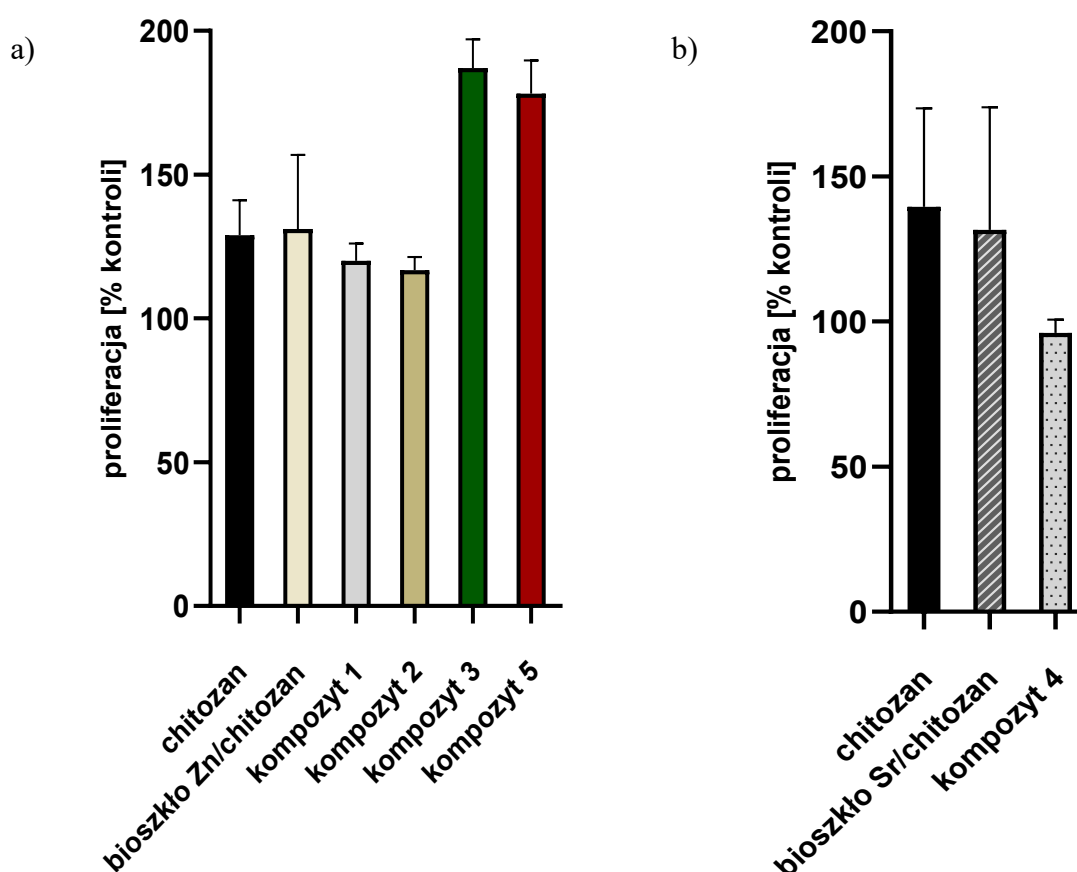
Spośród kompozytów domieszkowanych Zn z kowalencyjnie przyłączonym peptydem **ug4**, najsilniej stymulował proliferację kompozyt 3 (P5Zn/CH–CH–m4.4–

ug4_3,4%) – 187% względem kontroli. Nieco niższą, ale nadal wysoką stymulację proliferacji wykazał kompozyt 5 – 178%.

Z kolei kompozyty 1 (ug4_0,8%) i 2 (ug4_1,6%) wykazały niższy potencjał proliferacyjny, osiągając odpowiednio 120% i 116% względem kontroli (Rysunek 102a).

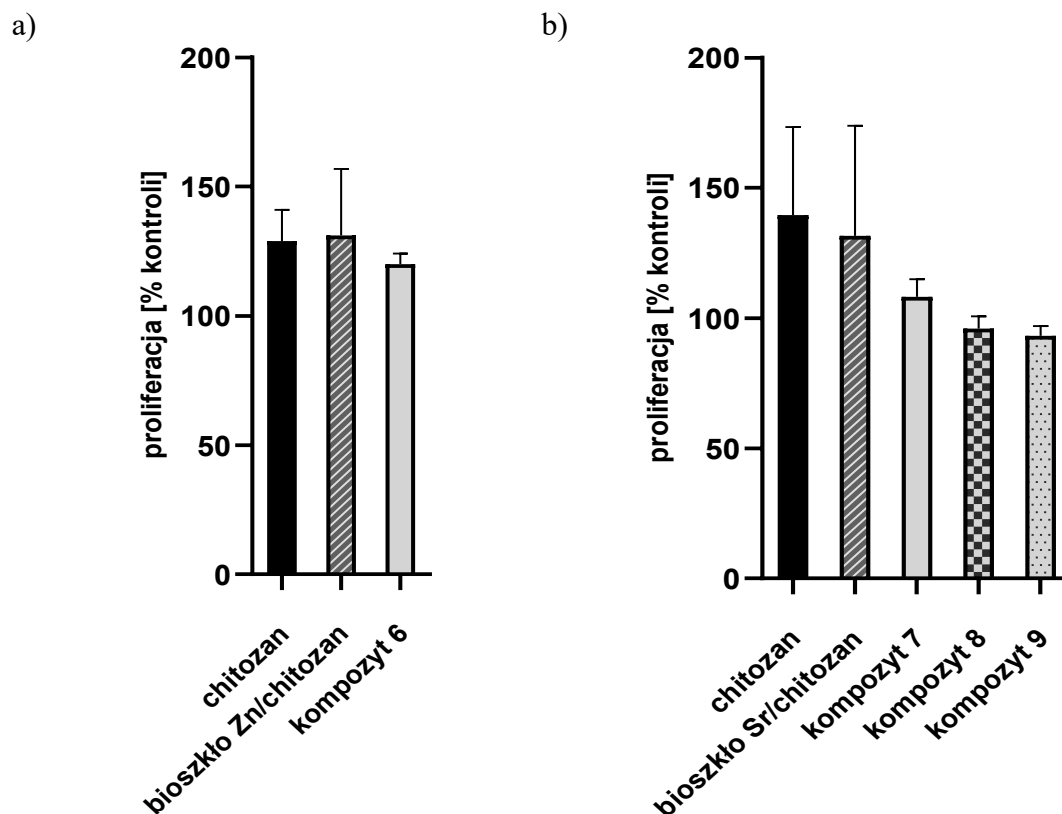
Następnie przebadano kompozyty domieszkowane tlenkiem strontu. Chitozan, jako kontrola, wykazywał stymulację proliferacji na poziomie 138%. Zastosowanie bioszklą domieszkowanego Sr w matrycy kompozytowej spowodowało nieznaczne obniżenie aktywności proliferacyjnej do 131%.

Kompozyty modyfikowane peptydem (ug4/Sr) charakteryzowały się niższą stymulacją proliferacji – w zakresie 95–105% względem kontroli (Rysunek 102b).



Rysunek 100. Wpływ kompozytów z peptydem **ug4** domieszkowanych a) tlenkiem cynku b) tlenkiem strontu adanych testem WST-1 po 48 h inkubacji na proliferację komórek hFOB 1.19.

Przebadane zostały również kompozyty 6, 7, 8 i 9. Kompozyt 9 wykazał wysoką stymulację proliferacji osteoblastów – 152% względem kontroli. Kompozyt 6 – umiarkowaną, na poziomie 120%. Kompozyty 7 i 8 – znacząco niższą proliferację (93–108%), co sugeruje ich ograniczoną skuteczność w stymulacji wzrostu komórek (Rysunek 103).



Rysunek 101. Wpływ kompozytów z peptydem **ug51/ug52** domieszkowanych: a) tlenkiem cynku b) tlenkiem strontu badanych testem WST–1 po 48 h inkubacji na proliferację komórek hFOB 1.19.

6. Badania implantacyjne

Badania przedkliniczne przeprowadzono w Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, pod kierownictwem dr hab. Bogusławy Żywickiej. Wszystkie próbki kompozytu nr 5 dostarczone do badań poddano sterylizacji radiacyjnej dawką ok. 30 kGy.

6.1 Toksyczność ostra

Celem przeprowadzonych badań była ocena ostrej toksyczności ogólnoustrojowej biokompozytu 5 (P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%) po jednorazowym, dotrzewnowym podaniu wyciągu wodnego z materiału. Test wykonano na myszach laboratoryjnych, a obserwacje prowadzono przez 7 dni.

Monitorowano stan ogólny zwierząt, zachowanie, wygląd, spożycie paszy i wody, przyrost masy ciała oraz ewentualne zmiany makroskopowe narządów wewnętrznych.

W trakcie całego eksperymentu nie zaobserwowano żadnych objawów wskazujących na toksyczność: wszystkie zwierzęta przeżyły, nie stwierdzono zmian w miejscu iniekcji, zaburzeń funkcjonowania ani istotnych różnic w przyroście masy ciała pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Spożycie paszy i wody pozostawało na porównywalnym poziomie w obu grupach.

Na podstawie wyników stwierdzono, że biokompozyt 5 nie wykazuje działania toksycznego w ostrej ekspozycji ogólnoustrojowej.

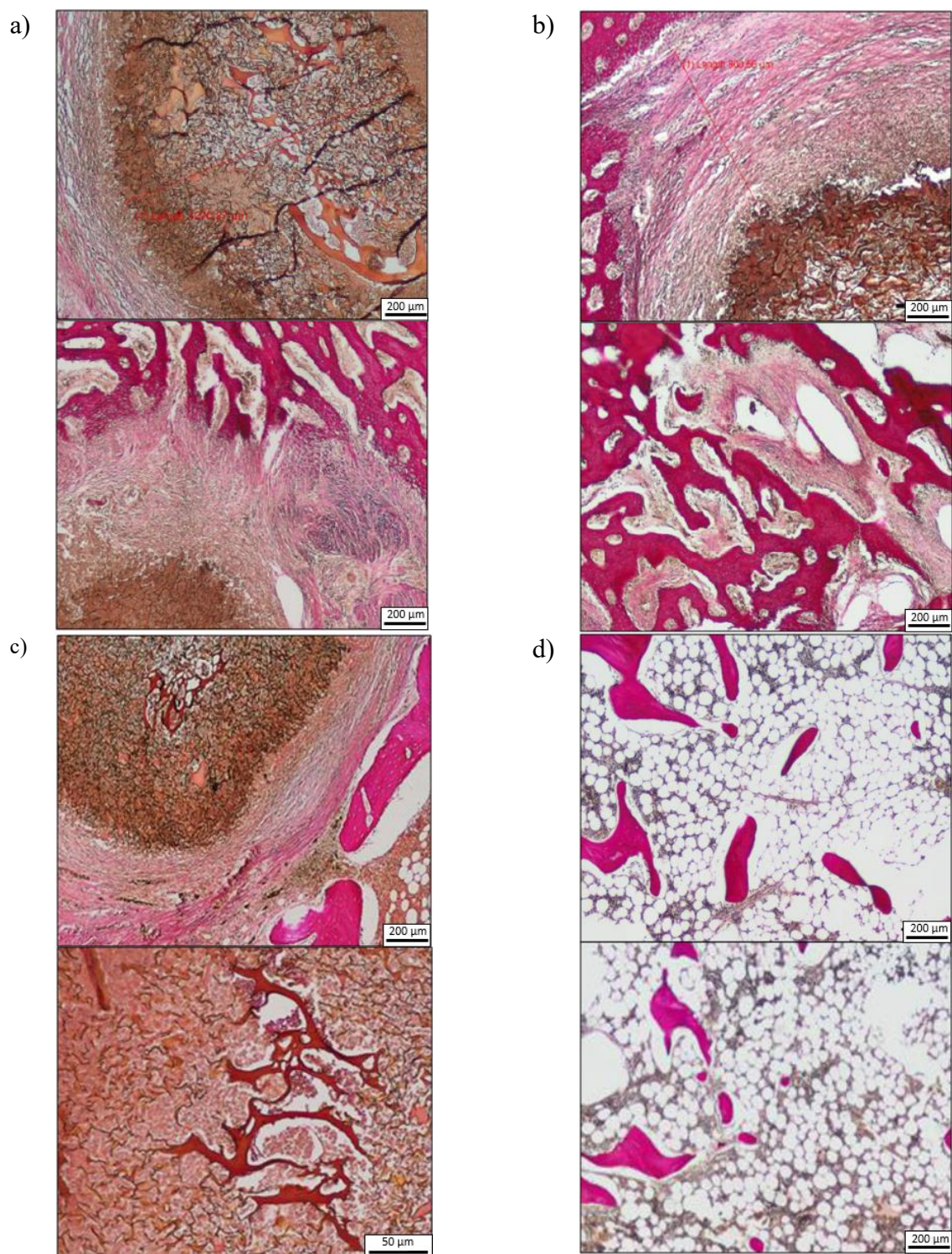
6.2 Badania miejscowej reakcji tkanki kostnej po implantacji biokompozytu

W celu oceny reakcji tkanki kostnej po implantacji, cylindryczne implanty (2×6 mm) umieszczono w krętarzach kości udowych królików. Analizę przeprowadzono po 30, 60 i 90 dniach, stosując metody makroskopowe, histologiczne i radiologiczne.

Wszystkie rany goiły się prawidłowo, a otaczające tkanki miękkie nie wykazywały zmian patologicznych. Makroskopowo stwierdzono obecność implantów otoczonych kostniną.

- Po 30 dniach implanty były otoczone pasmem tkanki łącznej, obserwowano ogniska mineralizacji oraz kolonizację przez komórki szpiku (Rysunek 104a).
- Po 60 dniach widoczna była deformacja implantu, obecna była reakcja zapalna oraz postępujące kostnienie wewnątrz implantu (Rysunek 104b).
- Po 90 dniach implanty uległy dalszej degradacji i integracji z otaczającą tkanką kostną; obserwowano także zmniejszenie szerokości pasma tkanki łącznej (Rysunek 104c).

W grupie kontrolnej (bez implantu), po 90 dniach, w miejscu ubytku obecna była gąbczasta tkanka kostna z nielicznymi beleczkami kostnymi oraz dominującym szpikiem kostnym i tkanką tłuszczową (Rysunek 104d).



Rysunek 102. Obraz histologiczny tkanki kostnej w miejscu implantacji biokompozytu 5 (P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%) w krętarzu kości udowej królika po: a) 30 dniach, b) 60 dniach, c) 90 dniach od zabiegu. d) Obraz tkanki w grupie kontrolnej (bez implantu) po 90 dniach. Barwienie: H+E, powiększenia 50× i 200×.

V. DYSKUSJA WYNIKÓW

W ostatnich latach medycyna regeneracyjna poczyniła postępy w regeneracji kości, rozwiązując część problemów związanych z utratą tkanki kostnej na skutek urazów, chorób degeneracyjnych czy starzenia się populacji. Inżynieria tkankowa, wykorzystująca naturalne zdolności regeneracyjne organizmu, stosuje zaawansowane biomateriały i bioaktywne substancje do odbudowy tkanek oraz przywracania ich funkcji. Chitozan jest jednym z powszechnie wykorzystywanych materiałów w medycynie regeneracyjnej, mogącym występować w różnych formach, takich jak folia, hydrożel, gąbka czy matryca nanowłókienna. Rusztowania kompozytowe na bazie chitozanu są szczególnie odpowiednie do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej ze względu na ich optymalną otwartą porowatość i rozmiar porów (100–400 μm), które umożliwiają migrację komórek oraz dobrą wymianę składników odżywczych [212, 213]. Skuteczną strategią w regeneracji tkanki kostnej jest integracja rusztowań z bioaktywnymi peptydami (Rozdział I.5) [214]. Peptydy te poprawiają adhezję komórek, stymulują różnicowanie osteoblastów oraz przyspieszają mineralizację. Charakteryzują się wysoką specyficznością, stabilnością i niską toksycznością, a ich synteza jest stosunkowo łatwa i ekonomiczna [215]. Szczególną uwagę zwraca się na peptydy rozpoznawane przez enzymy proteolityczne w miejscu uszkodzenia, co umożliwia ich aktywację w zależności od środowiska. Równolegle rozwijane są sekwencje peptydowe o właściwościach fibrylogennych, wspierające adhezję komórek i tworzenie struktur macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) [216]. Dodatkowo peptydy łączone z rusztowaniami i komórkami inicjują procesy adhezji, proliferacji, migracji i biomineralizacji [214]. Kowalencyjne sprzężenie peptydów z nośnikiem pozwala na precyzyjne kontrolowanie ich stężenia oraz konformacji, co wpływa na interakcje z komórkami [75]. Moje badania wpisują się w rosnące zainteresowanie nowoczesnymi strategiami terapeutycznymi w medycynie regeneracyjnej, której celem jest nie tylko leczenie, ale także przywracanie struktury i funkcji uszkodzonych tkanek, w tym kości.

Celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie i kompleksowa ocena materiałów kompozytowych o właściwościach proregeneracyjnych, dedykowanych do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. W mojej pracy opracowałam trzy różne typy koniugatów zawierających peptydy proregeneracyjne, różniące się sposobem integracji peptydu z matrycą. Takie podejście umożliwiło ocenę, jak forma związania – kowalencyjna, fizyczna

lub oparta na strukturach fibrylarnych – wpływa na bioaktywność, stabilność i profil uwalniania.

- Koniugat I zawierał chitozan kowalencyjnie zmodyfikowany biologicznie aktywnym peptydem. Peptyd został trwale przyłączony do polimeru z wykorzystaniem pochodnej maleimidoaminokwasu, która umożliwia selektywne i trwałe połączenie cząsteczki peptydu z matrycą chitozanową. Takie rozwiązanie – zgodnie z danymi literaturowymi – pozwala na precyzyjne określenie ilości unieruchomionego peptydu, a także na kontrolę jego dostępności dla komórek oraz enzymów obecnych w środowisku regenerowanej tkanki [217].
- Kompozyt II stanowił mieszaninę chitozanu z peptydem bez wiązania kowalencyjnego z peptydem. W tym przypadku nie dochodziło do trwałego wiązania z polimerem, co skutkowało szybszym i bardziej bezpośrednim uwalnianiem peptydu do środowiska. Taki mechanizm może być szczególnie korzystny w początkowych fazach regeneracji, gdy wskazane jest szybkie pobudzenie procesów naprawczych. Taki mechanizm działania, zgodnie z literaturą, może być korzystny w fazie inicjalnej regeneracji, gdzie obecność wysokiego stężenia sygnałów biologicznych pobudza migrację i proliferację komórek [218].
- Kompozyt III składał się z chitozanu oraz fibryli peptydowej, pełniącej rolę rezerwuaru bioaktywnego peptydu. Peptyd mógł być stopniowo uwalniany w wyniku działania enzymów proteolitycznych. Takie podejście umożliwia uzyskanie wydłużonego efektu terapeutycznego, istotnego w kontekście długoterminowej regeneracji [207].

Pierwszym zadaniem mojej pracy było zaprojektowanie i zsyntezowanie biologicznych aktywnych peptydów o działaniu proregeneracyjnym, wyselekcjonowanych na podstawie literatury. Zaprojektowane peptydy podzieliłam na trzy grupy:

- Grupa 1: peptydy przeznaczone do koniugacji z chitozanem zawierające sekwencję biologicznie aktywną, z sekwencją specyficzną dla MMP-7 a także końcową resztę cysteiny, która umożliwia tworzenie trwałego wiązania kowalencyjnego z grupą maleimidową zakotwiczoną na chitozanie.

- Grupa 2: peptydy zawierające sekwencję aktywną biologicznie oraz fragment sekwencji specyficznej dla MMP-7, który może być enzymatycznie uwalniany w wyniku obecności enzymu w miejscu uszkodzenia.
- Grupa 3: peptydy o potencjale fibrylogennym, zbudowane z sekwencji samoorganizującej się QAGIVV, sekwencji specyficznej rozpoznawanej przez MMP-7 oraz biologicznie aktywnego motywu.

Wszystkie peptydy szczegółowo scharakteryzowałam pod względem właściwości fizykochemicznych, takich jak masa cząsteczkowa oraz czystość, wykorzystując odpowiednie techniki analityczne, takie jak spektrometria mas czy chromatografia HPLC. Z zaprojektowanych peptydów grupy 1 zsyntezowałam peptyd **ug4**, który ulegał bardzo szybkiej dimeryzacji, co uniemożliwiło przeprowadzenie oceny stabilności oraz badań biologicznych (ponieważ trawienie enzymatyczne prowadziło do uwolnienia peptydu **ug1**).

Dla peptydów grupy 2 (**ug1**, **ug2**, **ug3**, **ug7**, **ug8**, **ug9**, **ug13**, **ug26**) oraz 3 (**ug51**, **ug52**, **ug53**) przeprowadziłam ocenę ich stabilności w wodzie oraz w pożywce hodowlanej, a także eksperymenty biologiczne *in vitro*. Wyniki tych badań pozwoliły mi ocenić potencjał proliferacyjny peptydów w warunkach zbliżonych do środowiska kostnego oraz wytypować sekwencję o najkorzystniejszych właściwościach.

Dodatkowo dla peptydów z grupy 3, sprawdziłam ich zdolność do tworzenia uporządkowanych struktur supramolekularnych, wykorzystując m.in. techniki mikroskopowe oraz spektroskopowe. Kompleksowa charakterystyka tej grupy peptydów umożliwiła ocenę ich przydatności jako składników rusztowań wspierających regenerację tkanki oraz rezerwuarów bioaktywnych sekwencji, które mogą być uwalniane w odpowiedzi na bodźce środowiskowe lub enzymatyczne.

Kolejnym zadaniem badawczym mojej pracy doktorskiej było opracowanie metody chemicznej modyfikacji chitozanu poprzez wprowadzenie grupy maleimidowej umożliwiającej kowalencyjne przyłączenie peptydu **ug4**. Proces modyfikacji chitozanu poprzedzała synteza aktywnego estru *N*-hydroksysukcynimidowego, który następnie wykorzystałam w etapie sprzęgania z chitozanem. Efektywność sprzęgania monitorowałam poprzez ocenę stopnia podstawienia grup maleimidowych na chitozanie. Następnie do tak przygotowanego polimeru przyłączyłam peptyd proregeneracyjny, a

wszystkie etapy reakcji poddałam analizie stopnia modyfikacji, co pozwoliło zweryfikować skuteczność immobilizacji peptydu na chitozanie.

Ostatnim etapem moich badań była analiza fizykochemiczna i biologiczna charakterystyka otrzymanych kompozytów, obejmująca analizę bioaktywności, analizę struktury powierzchni i wielkości porów kompozytów, a także profil uwalniania peptydów z kompozytu. Dodatkowo przeprowadzono ocenę aktywności biologicznej w tym badania cytotoksyczności i proliferacji wobec komórek ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Kompozyty złożone były z komponentów chitozan, peptydy, bioszkło, z których chitozan zmodyfikowany peptydem oraz peptydy zostały przeze mnie opracowane. Na podstawie wyników badań biologicznych oraz profili uwalniania peptydów wybrane zostały kompozyty o najlepszych właściwościach, które następnie zostały poddane ocenie *in vivo* w modelu kostnym w badaniach implantacyjnych.

Peptydy proregeneracyjne

Synteza peptydów **ug1, ug2, ug3, ug4, ug7, ug26 i ug55** przebiegała z wysoką wydajnością, na poziomie 90–98%. Z nieco słabszą wydajnością otrzymałam peptydy **ug13, ug27, ug28, ug51, ug52, ug53 i ug54** około 65–80%. Najniższa wydajność, na poziomie 5–10% uzyskałam dla peptydów **ug14, ug15, ug21 i ug22**.

Produkty syntezy o niskiej wydajności posiadały dużą ilość delecji, które najczęściej dotyczyły reszt lizyny i argininy. Choć trudno jednoznacznie wskazać przyczynę obniżonej wydajności, prawdopodobne jest, że duża liczba zasadowych reszt sprzyjała tworzeniu struktur drugorzędowych już na etapie elongacji łańcucha, co z kolei mogło utrudniać dostęp reagentów do miejsc reaktywnych [219]. Aby zminimalizować delecje, zastosowałam podwójne sprzęganie wszystkich aminokwasów, co jest rekomendowaną strategią w przypadku problematycznych sekwencji [220, 221]. Niestety, zabieg ten nie doprowadził do zauważalnej poprawy wydajności w przypadku sekwencji z grupy o najniższej efektywności.

Dodatkowo, by uniknąć negatywnego wpływu zanieczyszczeń zawierających aminy na reakcję sprzęgania, używałam oczyszczonego DMF przechowywanego nad sitami molekularnymi 4Å, co zgodnie z danymi literaturowymi zmniejsza ryzyko powstawania produktów ubocznych i ogranicza niepełne sprzęganie [222]. W moich doświadczeniach zastosowanie świeżo oczyszczonego rozpuszczalnika pozwoliło

ograniczyć ilość delecji, jednak w przypadku trudnych sekwencji nie wyeliminowało całkowicie problemów z wydajnością.

W celu uzyskania odpowiedniej ilości peptydu **ug4**, niezbędnej do dalszych etapów modyfikacji chitozanu, przeprowadziłam jego syntezę w trzech różnych skalach: 0,1 mmol, 0,25 mmol oraz 1,0 mmol. Ze względu na wysokie zapotrzebowanie ilościowe oraz wymaganą wysoką czystość peptydu konieczna była optymalizacja warunków syntezy. Najkorzystniejsze rezultaty uzyskałam przy syntezie w skali 1,0 mmol, która charakteryzowała się najwyższą wydajnością oraz pozwoliła na otrzymanie peptydu o czystości przekraczającej 95%. Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi, które wskazują, że syntezy peptydów zawierających cysteinę lub grupy reaktywne (np. tiolowe) są bardziej efektywne w większych skalach, co ogranicza wpływ niepożądanych reakcji bocznych oraz strat związanych z adsorpcją na podłożu [223]. Z uwagi na konieczność oceny nie tylko wydajności, ale również efektywności ekonomicznej poszczególnych peptydów, przeprowadziłam również analizę kosztów ich syntezy. Najbardziej korzystnym pod względem kosztów okazał się peptyd **ug1**, zawierający jedynie 6 reszt aminokwasowych i charakteryzujący się wysoką wydajnością syntezy. Z kolei peptydy **ug8** i **ug9**, mimo wykazywanej aktywności biologicznej, generowały znacznie wyższe koszty – wynikało to z długości ich sekwencji (13 reszt) oraz niskiej wydajności procesu (~50%), co wymuszało powtarzanie syntezy.

Dla zsyntezowanych peptydów z 2 i 3 grupy przeprowadziłam badania stabilności w warunkach wodnych oraz w pożywce hodowlanej (używanej przez zespół przeprowadzający badania biologiczne). Najwyższą stabilność wykazały peptydy o najdłuższych sekwencjach aminokwasowych: **ug13**, **ug26**, **ug52** i **ug53**. Charakteryzowały się one ponad 95% stabilnością w wodzie oraz 40–60% stabilnością w pożywce.

W szczególności peptyd **ug13**, który zawierał niestandardową resztę aminokwasową (kwas aminomasłowy), wyróżniał się wyjątkową odpornością na degradację enzymatyczną. Zastosowanie aminokwasów nienaturalnych w projektowaniu peptydów bioaktywnych jest dobrze udokumentowaną strategią poprawy ich stabilności i trwałości w środowisku biologicznym [224, 225]. Modyfikacje takie mogą prowadzić do ograniczenia rozpoznawania przez proteazy, co tłumaczy wyniki uzyskane dla **ug13**. Zgodnie z literaturą, jednymi z najczęściej stosowanych modyfikacji stabilizujących są podstawienia L-aminokwasów ich enancjomerami D, lub użycie aminokwasów

nienaturalnych, takich jak D–lizyna, D–arginina, kwas 2,4–diaminobutanowy (Dab) czy kwas 4–aminomasłowy (Aib) [226] Tego rodzaju podstawienia, mimo że znacząco zwiększają oporność na proteolizę, mogą wpływać na konformację peptydu, jego aktywność biologiczną, a także generować ryzyko zwiększonej cytotoksyczności lub immunogenności – co powinno być każdorazowo eksperymentalnie weryfikowane [227].

Z kolei peptydy **ug1**, **ug2**, **ug3** i **ug7** wykazywały niską stabilność w medium hodowlanym. Dodatkowo peptydy **ug2** i **ug3** wykazywały niską rozpuszczalność w wodzie, co mogło utrudniać ich dalsze zastosowania. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, obniżenie stabilności peptydu w medium może wynikać z efektu wysalania lub tworzenia kompleksów ze składnikami pożywki, co negatywnie wpływa na ich dostępność i aktywność biologiczną. [228]. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, obniżona stabilność peptydów w pożywkach hodowlanych może wynikać z efektów wysalania (salting–out), denaturacji indukowanej jonami lub interakcji ze składnikami pożywki (np. albuminą lub metalami przejściowymi), co prowadzi do agregacji i obniżenia aktywności biologicznej [229, 230].

Testy stabilności peptydów stanowią istotny etap w charakterystyce bioaktywnych sekwencji, zwłaszcza w kontekście ich dalszego zastosowania w środowisku biologicznym. W literaturze opisano wiele różnych protokołów do badania stabilności, różniących się między innymi warunkami inkubacji, typem matrycy, technikami ekstrakcji i metodami analitycznymi [231, 232]. Jednym z kluczowych problemów, z którym również zetknęłam się w trakcie badań, była utrata części peptydu podczas przygotowywania próbki – głównie na etapie oddzielania supernatantu od osadu. Peptydy mogą adsorbować się na powierzchni denaturowanych białek lub zagęszczać się w osadzie, co skutkuje zaniżonym stężeniem analizowanej próbki i ograniczoną wykrywalnością produktów degradacji. Zjawisko to zostało opisane m.in. w badaniach nad odzyskiem peptydów z osocza, gdzie wskazano, że transfer próbki z osadu może prowadzić do strat rzędu 20–40% [233].

Przykład stanowi peptyd **ug1**, który – pomimo wyraźnie niskiej stabilności chemicznej oznaczonej w wodzie (37%) i pożywce hodowlanej (6%) wykazywał bardzo dobre właściwości proregeneracyjne w badaniach *in vitro*. Dysproporcja ta sugeruje, że dane uzyskane w testach stabilności nie muszą w pełni oddawać rzeczywistej aktywności biologicznej peptydu, zwłaszcza jeśli dojdzie do częściowej utraty próbki lub błędów

kwantyfikacji. Podobne obserwacje raportowano dla innych peptydów terapeutycznych, gdzie wykrywalność produktów degradacji była silnie zależna od protokołu przygotowania próbki, a nie samego tempa rozkładu [231].

W literaturze opisano szereg metod strącania białek w ramach przygotowania próbek do oznaczania stabilności peptydów w osoczu lub innych płynach biologicznych. Wytrącanie białek jest krokiem krytycznym, ponieważ chroni próbkę przed dalszą proteolizą i umożliwia ocenę rzeczywistego stężenia analitu. Do najczęściej stosowanych metod należą: 1) wytrącanie mieszaniną acetonitryl/etanol (1:1), 2) samym acetonitrylem (ACN), 3) ACN schłodzonym do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oraz 4) 1% kwasem trichlorooctowym (TCA). W badaniach porównawczych wykazano, że dla tego samego peptydu użycie TCA skutkowało zmniejszeniem wykrywanego stężenia do około 25% wartości referencyjnej, podczas gdy mieszanina ACN/EtOH zachowała nawet 75% ilości peptydu. Różne peptydy wykazują odmienną wrażliwość na użyty odczynnik strąceniowy, jednak w każdym przypadku miał on istotny wpływ na końcowy wynik analizy [231].

Wnioski z tych obserwacji sugerują, że protokoły testów stabilności peptydów powinny być każdorazowo dostosowywane do ich właściwości fizykochemicznych, a dane ilościowe należy interpretować z uwzględnieniem możliwych strat na etapie przygotowania próbki. W przypadku peptydów terapeutycznych o krótkim czasie półtrwania lub wysokim potencjale biologicznym, nieprecyzyjny odzysk może prowadzić do zaniżenia ich rzeczywistego działania.

Peptyd **ug51** charakteryzował się niską stabilnością zarówno w wodzie, jak i w pożywce hodowlanej – poziom stabilności wynosił około 40%, co wskazuje na jego podatność na rozpad w warunkach fizjologicznych. Podczas analizy HPLC zaobserwowałam, że peptyd ten ulegał rozkładowi na dwa wyraźnie widoczne, stabilne fragmenty: sekwencję fibrylogenną QAGIVV oraz fragment PLGLYGFGG. Oznacza to, że autohydroliza zachodziła poprzez degradację wiązania peptydowego pomiędzy waliną a proliną (Val–Pro).

Hydroliza wiązania Val–Pro jest rzadziej obserwowana w warunkach nieenzymatycznych, możliwe, że specyficzne mikrośrodowisko utworzone przez sąsiednie aminokwasy – izoleucynę, walinę, leucynę oraz glicynę – zwiększało dostępność wiązania Val–Pro dla cząsteczki wody, prowadząc do jego hydrolizy. Zarówno prolina, jak i glicyna

są aminokwasami, które zaburzają strukturę α -helikalną, sprzyjając powstawaniu zagięć lub pętli w strukturze wtórnej. Takie lokalne zniekształcenia mogą wystawiać określone wiązania peptydowe na atak nukleofilowy cząsteczek wody, co mogło mieć miejsce w przypadku **ug51** [234, 235].

Dla porównania, peptyd **ug52**, który różnił się od **ug51** obecnością grupy acetylowej na *N*-końcu, wykazywał bardzo wysoką stabilność – 98% w wodzie i 87% w pożywce. Nie zaobserwowano żadnych produktów degradacji, w tym rozszczepienia wiązania Val–Pro. Wyniki te wskazują jednoznacznie na ochronną rolę acetylacji. Modyfikacje *N*- i *C*-końców peptydów są znaną strategią zwiększania ich stabilności wobec enzymów i degradacji chemicznej. Acetylacja końca aminowego może ograniczać rozpoznawanie przez aminopeptydazy oraz stabilizować konformację peptydu [236]. W badaniu D'Accolti i wsp. acetylacja *N*-końca peptydu kalcyterminy skutkowała ponad siedmiokrotnym wydłużeniem jego okresu półtrwania w osoczu. Podobny efekt można zaobserwować w przypadku **ug52**, co sugeruje, że modyfikacje końcowe mogą również zabezpieczać wewnętrzne wiązania peptydowe, prawdopodobnie poprzez stabilizację struktury przestrzennej i ograniczenie ekspozycji wrażliwych miejsc [237].

W świetle powyższych obserwacji, zastosowanie acetylacji jako prostego i niedrogiego narzędzia poprawy stabilności peptydów może mieć istotne znaczenie w projektowaniu materiałów opartych na peptydach proregeneracyjnych. Niemniej jednak, każda modyfikacja końcowa powinna być oceniana indywidualnie pod kątem wpływu na aktywność biologiczną.

Badania biologiczne peptydów proregeneracyjnych

Wyniki przeprowadzonych testów cytotoksyczności oraz analiz potencjału proliferacyjnego stanowią istotny element walidacji bezpieczeństwa i aktywności biologicznej badanych sekwencji peptydowych. Ocena wpływu związków bioaktywnych na przeżywalność i proliferację komórek docelowych jest kluczowa dla ich dalszego rozwoju jako komponentów terapii regeneracyjnych. Analizy te umożliwiają wstępną selekcję sekwencji, które nie wykazują działania toksycznego, a jednocześnie mogą aktywować komórki do podziałów i wspierać procesy naprawcze.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że zastosowane peptydy 2 i 3 grupy – a także fragmenty rozpadu peptydu **ug51** (**ug54** i **ug55**) – są dobrze tolerowane przez ludzkie

osteoblasty hFOB 1.19 w badanym zakresie stężeń (6,25–100 µg/ml). Badania umożliwiły porównanie aktywności różnych sekwencji i oceny ich wpływu na analizowane parametry biologiczne.

W pierwszym etapie eksperymentów skupiono się na analizie cytotoksyczności, której celem było zweryfikowanie bezpieczeństwa biologicznego testowanych peptydów. Zastosowany test WST–1 pozwolił ocenić żywotność komórek po ekspozycji na peptydy, a wyniki wskazały, że żadna z testowanych sekwencji nie indukowała istotnego spadku przeżywalności. Brak efektu cytotoksycznego w badanym zakresie stężeń sugeruje, że peptydy te spełniają podstawowe kryterium bezpieczeństwa wymagane dla dalszych analiz funkcjonalnych [197].

Kolejny etap obejmował ocenę wpływu wybranych peptydów na proliferację komórek osteoblastów. Najwyższy potencjał proliferacyjny wykazały peptydy **ug1**, **ug8** oraz **ug9**, dla których zaobserwowano wzrost proliferacji komórek w zakresie od 5 do 25% w zależności od zastosowanego stężenia. Dla najniższego stężenia (6,25 µg/ml) wzrost względem kontroli wynosił 13% dla **ug1**, 23% dla **ug8** i 16% dla **ug9**. Tego rodzaju umiarkowana stymulacja proliferacji może świadczyć o synergistycznym działaniu sekwencji peptydowej z czynnikami obecnymi w mikrośrodku komórkowym, np. poprzez aktywację receptorów integrynowych lub lokalne modyfikowanie sygnalizacji MAPK/ERK [238].

W przypadku peptydów **ug2** i **ug3** nie udało się przeprowadzić analizy biologicznej ze względu na ich bardzo niską rozpuszczalność w pożywce hodowlanej, co skutkowało wytrącaniem się związków i uniemożliwiało rzetelną ocenę ich wpływu na komórki. Zjawisko to może wynikać ze składu aminokwasowego peptydów, obecności sekwencji hydrofobowych oraz braku modyfikacji końców, co wpływa na rozpuszczalność i stabilność w środowisku wodnym. Podobne problemy zgłaszane są w literaturze przy pracy z krótkimi peptydami o dużej zawartości reszt hydrofobowych [239, 240]. Potencjalnym rozwiązaniem mogłoby być zastosowanie niewielkich ilości rozpuszczalników organicznych, takich jak DMSO, co pozwala na zwiększenie rozpuszczalności bez istotnego wpływu na żywotność komórek. Niestety, ze względu na ograniczenia czasowe oraz budżetowe projektu, nie było możliwe wprowadzenie takich modyfikacji w trakcie realizacji badań.

Drugą grupę doświadczalną stanowiły peptydy oznaczone jako **ug51–ug55**. W analizowanym zakresie stężeń nie stwierdzono działania cytotoksycznego wobec komórek osteoblastów linii hFOB 1.19, co potwierdza bezpieczeństwo tych związków w warunkach *in vitro*. W teście WST–1 najwyższy potencjał proliferacyjny wykazywał peptyd **ug55**, który zwiększał proliferację komórek hFOB 1.19 w sposób zależny od stężenia, osiągając wzrost o ok. 45% względem kontroli przy dawce 12,5 µg/ml.

Analiza sekwencji wykazała, że peptyd **ug55** stanowi fragment rozpadowy peptydu **ug51**. Można więc przypuszczać, że **ug51** pełni rolę „rezerwuaru” – prekursora powolnego uwalniania aktywnego fragmentu **ug55**. Takie podejście znajduje liczne analogie w literaturze, gdzie wykorzystanie większych cząsteczek jako źródeł bioaktywnych peptydów jest elementem strategii kontrolowanego uwalniania [241]. Mechanizm ten wpisuje się w aktualne trendy w medycynie regeneracyjnej, w której rosnące znaczenie mają systemy dostarczania leków o kontrolowanym profilu uwalniania.

Zastosowanie peptydu macierzystego jako nośnika aktywnego fragmentu, jak w przypadku **ug51→ug55**, może mieć kluczowe znaczenie dla zapewnienia odpowiedniego tempa uwalniania, co minimalizuje ryzyko wystąpienia efektów niepożądanych wynikających z nagłego lub nadmiernego podania substancji aktywnej. Klasycznym przykładem problemów wynikających z niekontrolowanego uwalniania substancji bioaktywnych jest rekombinowane białko morfogenetyczne kości 2 (BMP–2), szeroko stosowane klinicznie w leczeniu ubytków kostnych i w chirurgii kręgosłupa. Retrospektywne badania wykazały, że ekspozycja na wysokie dawki BMP–2 może prowadzić do poważnych powikłań, takich jak patologiczna angiogeneza, obrzęk tkanek miękkich czy resorpcja kości przez nadmierną aktywację osteoklastów. Główne przyczyny tych działań ubocznych upatruje się w braku kontroli nad uwalnianiem BMP–2 w miejscu aplikacji oraz w nieodpowiednim jego dawkowaniu [242, 243]. W tym kontekście, koncepcja „propeptydu” pełniącego funkcję źródła aktywnego fragmentu, jak **ug51** dla **ug55**, może stanowić bezpieczniejszą alternatywę dla rekombinowanych czynników wzrostu.

Peptyd **ug52** nie wykazywał istotnego efektu proliferacyjnego względem komórek osteoblastów linii hFOB 1.19, osiągając wartości na poziomie kontroli. Oznacza to, że nie stwierdzono wyraźnej stymulacji wzrostu komórek w obecności tego związku, choć nie zaobserwowano także działania cytotoksycznego. Pomimo braku efektu mitogennego,

peptyd **ug52** zasługuje na szczególną uwagę z uwagi na swoją budowę jako rezerwuuar peptydowy. Zawiera on także w swojej sekwencji fragment rozpoznawany przez metaloproteinazę macierzy pozakomórkowej 7 (MMP-7). Obecność tego motywu umożliwia potencjalne, enzymatycznie kontrolowane uwalnianie bioaktywnych sekwencji peptydowych w środowisku bogatym w metaloproteinazy, jak ma to miejsce w obrębie uszkodzonej lub przebudowywanej tkanki. Strategie wykorzystujące enzymatyczne uwalnianie leków lub cząsteczek sygnałowych są coraz częściej opisywane w literaturze jako sposób na osiągnięcie selektywnego działania terapeutycznego [244]. Metaloproteinazy, w tym MMP-7, są obecne w ogniskach zapalnych, urazach i środowiskach nowotworowych, co czyni je atrakcyjnym „wyzwalaczem” do aktywacji ukrytych funkcjonalnie peptydów.

Dodatkowo, peptydy **ug51**, **ug52** oraz **ug53** zostały zaprojektowane jako potencjalne fibryle peptydowe – zdolne do samoorganizacji i tworzenia uporządkowanych struktur włóknistych. Proces fibrylacji, choć kojarzony z patologicznymi złoгами amyloidowymi, jest także coraz częściej wykorzystywany w biomateriałach, jako sposób na tworzenie funkcjonalnych scaffoldów o właściwościach mechanicznych i bioaktywnych [245]. Fibryle peptydowe mogą pełnić rolę rusztowań sprzyjających adhezji i proliferacji komórek, wspierając procesy regeneracyjne oraz odtwarzanie trójwymiarowej architektury tkanek [246].

Wykazano, że kontrolowana fibrylacja pozwala uzyskać struktury supramolekularne o dużej przewidywalności i stabilności, które mogą być dodatkowo funkcjonalizowane biologicznie, np. poprzez wbudowanie sekwencji sygnałowych typu RGD czy enzymatycznie rozkładalnych domen [247, 248]. Z tego względu projektowanie peptydów zdolnych do tworzenia fibryli staje się ważnym kierunkiem w rozwoju nowoczesnych materiałów biomedycznych dedykowanych regeneracji tkanek.

Peptydy fibrylogenne – charakterystyka fizykochemiczna

Peptydy **ug51**, **ug52** i **ug53** poddano analizie konformacyjnej z wykorzystaniem techniki spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) w celu oceny ich zdolności do tworzenia uporządkowanych struktur drugorzędowych. Metoda CD pozwala na detekcję charakterystycznych sygnałów, takich jak minimum w zakresie 215–218 nm, które wskazują na obecność struktur β -katek – typowego motywu strukturalnego w fibrylach

amyloidowych [249, 250]. W przypadku wszystkich trzech badanych peptydów nie zaobserwowałam obecności charakterystycznego minimum w widmie CD przypisywanego strukturze β -karkki, co może wskazywać, że początkowo dominują nieuporządkowane konformacje (tzw. random coil), które mogą z czasem przekształcać się w bardziej uporządkowane struktury β w miarę postępu procesu samoorganizacji [250, 251]. Możliwe jest również, że jedynie fragment sekwencji o charakterze fibrylogennym uczestniczy w tworzeniu jąder agregacji, podczas gdy pozostała część cząsteczki pozostaje rozpuszczona i nieprzestrzennie uporządkowana. Taka dominacja sygnału od części nieuporządkowanej może maskować obecność struktur β -karktek w widmie dichroizmu kołowego [252, 253].

Aby zweryfikować obecność agregatów β -karktek, przeprowadziłam dodatkowo test z użyciem tioflawiny T – barwnika fluorescencyjnego selektywnie wiążącego się do struktur amyloidowych i umożliwiającego ich detekcję w warunkach *in vitro* [254, 255]. Wyniki testu potwierdziły brak powstawania fibryli dla peptydów **ug51** i **ug53**. Odmiennej rezultat uzyskałam natomiast dla peptydu **ug52**, w przypadku którego zaobserwowałam szybki wzrost fluorescencji tioflawiny T po rozpuszczeniu próbki w buforze fosforanowym, co jednoznacznie wskazuje na spontaniczne tworzenie struktur fibrylarnych.

Obserwacje te zostały potwierdzone za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), która dostarczyła bezpośrednich danych morfologicznych. Już bezpośrednio po rozpuszczeniu peptydu **ug52** widoczne były inicjalne formy fibryli. Dalsza inkubacja przez 6 dni w roztworze PBS pozwoliła zaobserwować dynamiczne zmiany morfologii – po pierwszym dniu pojawiły się skręcone struktury włókniste o regularnym splocie co około 250 nm. Peptyd **ug52** tworzył fibryle o długości 50 nm do 1 μ m oraz średnicy około 6 nm, co jest zgodne z morfologią fibryli peptydowych opisywanych w literaturze [256, 257].

Zauważalna regularność i wysoki stopień organizacji struktury **ug52** wskazują na jego zdolność do tworzenia stabilnych supramolekularnych układów włóknistych. Co istotne, morfologia **ug52** była zbliżona do wcześniej opisywanych fibryli zawierających motyw QAGIVV – znany ze swojej zdolności do tworzenia trwałych agregatów amyloidowych [207]. Takie właściwości czynią peptyd **ug52** potencjalnym kandydatem do zastosowania jako samoorganizujący się komponent biomateriałów – zarówno jako struktura nośnikowa, jak i scaffold wspomagający regenerację tkanek [258].

Jak wspomniałam wcześniej, peptydy **ug51** i **ug52** różnią się obecnością grupy acetylowej na końcu *N*-terminalnym – obecnej w peptydzie **ug52**, a nieobecnej w **ug51**. Analiza ich właściwości fibrylogennych, którą przeprowadziłam, wykazała, że ta z pozoru drobna modyfikacja ma istotny wpływ na zdolność cząsteczek do tworzenia uporządkowanych struktur włóknistych. Obecność grupy acetylowej może wpływać na dynamikę samoorganizacji i stabilność formowanych włókien poprzez zmianę lokalnego rozkładu ładunku, hydrofobowości oraz oddziaływań międzycząsteczkowych [236].

Na podstawie dostępnych danych literaturowych wiadomo, że wpływ acetylacji końca *N*-terminalnego jest złożony i zależy od specyficznej sekwencji peptydu oraz warunków środowiskowych, takich jak pH, temperatura czy skład buforu. Modyfikacja ta może zarówno przyspieszać, jak i opóźniać proces agregacji. Przykładem jest α -synukleina – białko związane z patogenezą choroby Parkinsona – dla którego wykazano, że acetylacja końca *N*-terminalnego (Ac- α Syn) spowalnia proces fibrylizacji w porównaniu z nieacetylowaną formą (NH₃- α Syn), a także zmniejsza zdolność wiązania tioflawiny T [259].

Sądzę, że podobne zjawisko może zachodzić w przypadku badanych przeze mnie peptydów **ug51** i **ug52**. W moich eksperymentach tylko **ug52** – zawierający grupę acetylową – wykazywał zdolność do tworzenia uporządkowanych włókien, podczas gdy **ug51**, pozbawiony tej modyfikacji, nie tworzył widocznych struktur fibrylarnych. Acetylacja może sprzyjać nukleacji i stabilizacji powstających agregatów, zmieniając właściwości powierzchniowe peptydu i torując drogę do samoorganizacji w supramolekularne włókna. Wyniki moich badań potwierdzają, że nawet drobne chemiczne modyfikacje, takie jak acetylacja końca łańcucha, mogą istotnie wpływać na morfologię oraz kinetykę tworzenia włókien peptydowych.

Wybór peptydów do opracowania kompozytów

Zgodnie z założeniami mojej pracy badawczej, moim głównym celem było zaprojektowanie i przygotowanie komponentów do trzech typów koniugatów o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkanki kostnej: (I) koniugat z peptydem przyłączonym kowalencyjnie do chitozanu, (II) koniugat z peptydem fizycznie wymieszanym z chitozanem oraz (III) koniugat zawierającego fibryłę peptydową. Założyłam, że każdy z tych systemów umożliwi kontrolowane uwalnianie peptydu do

mikrośrodowiska kości w miejscu uszkodzenia, wspierając regenerację poprzez stymulację proliferacji i różnicowania komórek, jak również przez modulację aktywności enzymów proteolitycznych – w tym metaloproteinaz macierzy (MMP), które są istotnym czynnikiem regulującym przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej [260].

W procesie wyboru peptydów kierowałam się nie tylko ich właściwościami biologicznymi, takimi jak aktywność proregeneracyjna, zdolność do tworzenia struktur fibrylarnych czy podatność na enzymatyczne uwalnianie, lecz również aspektami praktycznymi, w tym wydajnością syntezy i kosztami produkcji. Uważam, że uwzględnienie tych czynników zwiększa szansę translacji opracowanych systemów do zastosowań przedklinicznych i przemysłowych [261].

Do pierwszego typu koniugatu (I) – opartego na kowalencyjnym sprzężeniu peptydu z chitozanem – wybrałam krótki peptyd **ug1**. Aby umożliwić jego trwałe połączenie z polimerem, zaprojektowałam i zsyntezowałam peptyd **ug4**, zawierający sekwencję aktywną peptydu **ug1** (LYGFGG), fragment rozpoznawany przez enzym MMP-7 (PLGL) oraz resztę cysteiny na końcu *N*-terminalnym. Dzięki obecności wolnej grupy tiolowej, możliwe było efektywne sprzęgnięcie peptydu z chitozanem przy użyciu łącznika zawierającego ugrupowanie maleimidowe – strategii często stosowanej w systemach dostarczania leków [152, 153].

W przypadku drugiego (II) typu koniugatu, opartego na fizycznym wymieszaniu składników, zdecydowałam się na zastosowanie peptydu **ug51**, który w moich badaniach pełni funkcję rezerwuaru dla aktywnego fragmentu **ug55**. To podejście miało na celu uzyskanie kontrolowanego, długofalowego uwalniania aktywnego peptydu, co może zwiększać skuteczność działania terapeutycznego, a jednocześnie ograniczać ryzyko wystąpienia działań niepożądanych wynikających z nagłego przekroczenia stężenia progowego. Mechanizm ten, oparty na rozkładzie peptydu prekursorowego, jest zbieżny z aktualnymi trendami projektowania inteligentnych nośników peptydowych [262, 263].

Do trzeciego (III) typu koniugatu wybrałam peptyd **ug52**, który – jako jedyny spośród badanych – wykazał zdolność do samoorganizacji w stabilne fibryle. Fibryla ta pełniła podwójną funkcję: była zarówno rusztowaniem, jak i nośnikiem dla aktywnego peptydu **ug1**. Uzyskany system opierał się na koncepcji biodegradowalnej matrycy, w której degradacja chitozanu *in vivo* odsłania strukturę fibrylarną, umożliwiając stopniowe uwalnianie aktywnego komponentu. Konstrukcja ta ma za zadanie stworzyć

mikrośrodowisko wspierające adhezję i proliferację komórek, a jednocześnie oferujące precyzyjną kontrolę nad dostępnością sygnałów biologicznych.

W każdym z opracowanych kompozytów wykorzystałam chitozan jako matrycę, ze względu na jego znaną biogodność, podatność na biodegradację, zdolność do tworzenia hydrożeli oraz silne właściwości adhezyjne wobec komórek kostnych [149]. Zastosowanie chitozanu w połączeniu z peptydami – zarówno w formie sprzężonej, jak i enkapsulowanej – stanowi efektywną strategię ochrony przed ich przedwczesną degradacją enzymatyczną, a zarazem umożliwia uzyskanie systemów o regulowanym profilu działania.

Enzymatyczne uwalnianie aktywnego peptydu z prekursorów i fibryli – analiza miejsc cięcia

W ramach moich badań przeprowadziłam analizę miejsc degradacji wiązań peptydowych przez metaloproteinazę macierzy MMP-7 dla wybranych peptydów, które zaprojektowałam jako rezerwuary dla fragmentów bioaktywnych. Każdy z tych peptydów zawierał w swojej sekwencji motyw PLGL, który – zgodnie z danymi literaturowymi – jest jednym z preferowanych miejsc rozpoznawanych i ciętych przez MMP-7 [264]. Sekwencja ta została celowo umieszczona między fragmentem nośnikowym a częścią aktywną, aby umożliwić selektywne i środowiskowo kontrolowane uwalnianie.

Aby zweryfikować skuteczność tego podejścia, przeprowadziłam badania enzymatycznego rozszczepienia dla peptydów **ug4** i **ug52**. Oba zostały zaprojektowane tak, aby w wyniku działania MMP-7 dochodziło do uwolnienia aktywnej sekwencji odpowiadającej peptydowi **ug1** (LYGFGG). Analiza produktów degradacji jednoznacznie potwierdziła, że cięcie enzymatyczne zachodzi w przewidywanym miejscu – pomiędzy resztami glicyny i leucyny w obrębie sekwencji PLGL. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi specyficzności substratowej MMP-7, która preferuje hydrofobowe reszty aminokwasowe (z preferencją leucyny) w pozycji P1' [265, 266].

Wniosuję na tej podstawie, że zarówno **ug4**, jak i **ug52**, skutecznie pełnią funkcję swoistych „magazynów” peptydu **ug1**, umożliwiając jego kontrolowane i enzymatycznie indukowane uwalnianie w odpowiedzi na obecność MMP-7 w mikrośrodowisku uszkodzonej lub przebudowującej się tkanki. Mechanizm ten może być szczególnie korzystny w kontekście biomateriałów stosowanych w regeneracji kości, gdzie aktywność

enzymatyczna MMP jest istotnym markerem przebudowy macierzy pozakomórkowej [260].

W badaniach nie uwzględniłam peptydu **ug51**, ponieważ wstępne eksperymenty wykazały jego podatność na autohydrolizę, niezależnie od obecności enzymu. W związku z tym jego zachowanie nie pozwalało na jednoznaczną interpretację mechanizmu enzymatycznego rozszczepienia i został wykluczony z testów uwalniania.

Modyfikacja chitozanu metodą maleimid–tiol i ocena stopnia sprzężenia

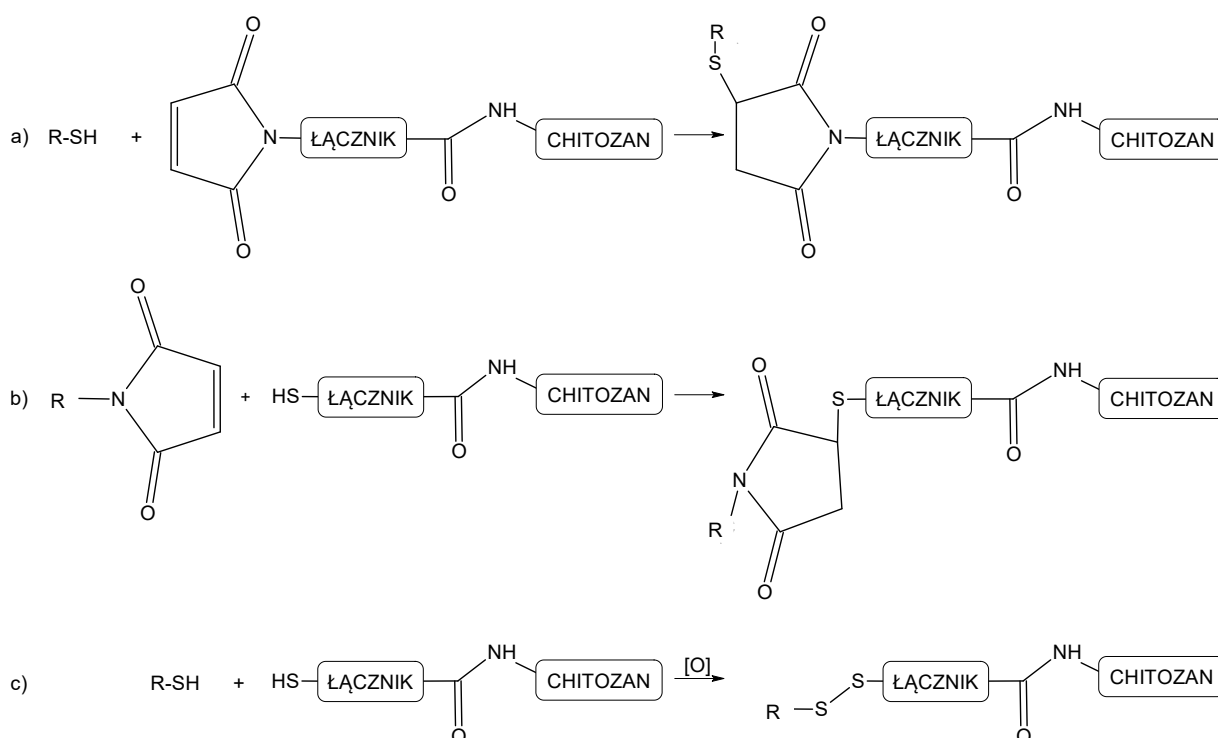
W ramach realizacji założeń mojej pracy doktorskiej przeprowadziłam modyfikację chitozanu z wykorzystaniem reakcji sprzęgania tiolu z maleimidem. W tym celu zastosowałam chemicznie aktywowaną koniugację o wysokiej selektywności, polegającą na wprowadzeniu grupy maleimidowej do chitozanu i jej dalszym sprzęgnięciu z peptydem zawierającym wolną grupę tiolową. Metody oparte na chemii maleimid–tiol, szczególnie przy użyciu odczynników N–hydroksysukcynimidowych (NHS), są szeroko opisywane w literaturze jako jedne z najbardziej selektywnych i efektywnych metod sprzęgania biomolekuł z polimerami naturalnymi [152, 153].

Pierwszym etapem mojej procedury było podstawienie grup maleimidowych do łańcucha chitozanu za pomocą estru NHS kwasu aminooctowego (Rysunek 105a). Dzięki tej modyfikacji chitozan uzyskał zdolność selektywnego reagowania z grupami tiolowymi obecnymi w peptydach. W kolejnym kroku przeprowadziłam sprzęganie chitozanu z tiolowanym peptydem – w moim przypadku zawierającym cysteinę na końcu *N*–terminalnym. Reakcja ta przebiegała zgodnie z mechanizmem klasycznej addycji Michaela – wolna grupa tiolowa peptydu atakowała wiązanie podwójne w pierścieniu maleimidowym, co prowadziło do utworzenia trwałego wiązania tioeterowego (–S–C–).

Rozwahałam również alternatywne strategie modyfikacji, takie jak odwrócone sprzężenie – polegające na modyfikacji chitozanu grupą tiolową i sprzęganiu go z peptydem zawierającym maleimid (Rysunek 105b). Tego typu podejście można zrealizować m.in. z wykorzystaniem reagenta Traut’a (2–iminotiolan) [267]. Ostatecznie jednak zdecydowałam się na klasyczne rozwiązanie z maleimidem w polimerze, ponieważ umożliwia ono uproszczenie syntezy i wysoką wydajność przy minimalnej liczbie etapów. Dodatkowo, przeanalizowałam możliwość zastosowania mostków disiarczkowych (–S–S–) jako alternatywnej formy sprzęgania (Rysunek 105c), jednak potencjalna niestabilność

takich wiązań w środowisku redukującym mogłaby prowadzić do przedwczesnego uwolnienia peptydu z matrycy [268]. W związku z tym uznałam wiązanie tioeterowe za stabilniejsze i bardziej odpowiednie dla zamierzonego zastosowania implantologicznego.

Spośród dostępnych metod koniugacji [150–156] (m.in. SPDP, Sulfo–SANPAH, karboimidy) wybrałam maleimid–tiol ze względu na jej uniwersalność, kompatybilność z peptydami wrażliwymi na pH, dostępność odczynników oraz możliwość prowadzenia reakcji w wodzie w łagodnych warunkach (pH 6,5–7,5), co minimalizuje ryzyko denaturacji struktury peptydowej [269, 270].



Rysunek 103. Warianty wykorzystania metody połączenia peptydu z chitozanem za pomocą maleimidu i tiolu/wiązania disiarczowego.

Jednym z istotnych wyzwań w realizacji mojej pracy doktorskiej była ocena stopnia modyfikacji chitozanu na kolejnych etapach procesu: początkowo przyłączenia maleimidoglicyny, a następnie sprzężenia peptydu. W literaturze najczęściej stosowaną metodą do oceny stopnia modyfikacji chitozanu jest spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego protonów (1H NMR), która umożliwia identyfikację oraz ilościową analizę sygnałów protonowych charakterystycznych dla grup funkcyjnych obecnych w zmodyfikowanym polimerze [271]. W przypadku chitozanu modyfikowanego

maleimidoglicyną spodziewanymi sygnałami są protony pierścienia maleimidowego (2H) oraz sygnały pochodzące od glukozy – powtarzalnej jednostki chitozanu (ok. 7H). [272]. W ramach mojej pracy podjęłam próbę zastosowania tej techniki, jednak nie udało mi się uzyskać widm NMR, które pozwalałyby na jednoznaczną analizę ilościową. Uważam, że trudności te mogły wynikać z ograniczonej rozpuszczalności chitozanu w typowych rozpuszczalnikach NMR, nakładania się sygnałów oraz niskiej czułości techniki względem niektórych fragmentów polimeru, co jest zresztą zjawiskiem często raportowanym w badaniach nad chitozaniem i jego pochodnymi [273, 274].

Do oceny stopnia modyfikacji zastosowałam więc alternatywne podejście: wykorzystałam maleimidoglicynę jako łącznik, umożliwiający pośrednią analizę modyfikacji poprzez oznaczenie ilości przyłączonej glicyny. Początkowo próbowałam zastosować klasyczną metodę derywatyzacji z użyciem aldehydu o-ftalowego (OPA), jednak analiza próbki okazała się problematyczna – czas retencji derywatyzowanych reszt glukozaminowych pokrywał się z czasem retencji glicyny, co uniemożliwiało jednoznaczną identyfikację sygnałów i wiarygodne oznaczenie ilościowe.

W związku z tym zdecydowałam się na analizę aminokwasową z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej w fazie hydrofilowej (HILIC), zgodnie z procedurą opisaną przez Socia et al. [204]. Zastosowanie tej metody pozwoliło mi skutecznie rozdzielić glicynę od reszty składników próbki oraz dokładnie określić jej ilość. Uzyskane wyniki były powtarzalne i wiarygodne, co pozwoliło mi na ocenę efektywności podstawienia grup maleimidowych w strukturze chitozanu.

W dalszym etapie, podczas analizy stopnia sprzężenia zmodyfikowanego chitozanu (CH–Mal–Gly) z peptydem **ug4**, napotkałam kolejne trudności analityczne. Wysoka zawartość chitozanu w próbkach, konieczna do detekcji aminokwasów, zakłócała rozdział chromatograficzny, co utrudniało zarówno interpretację wyników, jak i oznaczenie ilości przyłączonego peptydu.

Przy ponownej próbie oznaczenia planowałam zmniejszyć ilość chitozanu w próbce po hydrolizie, co mogłoby poprawić jakość rozdziału. Potencjalnym rozwiązaniem mogłaby być ultrafiltracja – z wykorzystaniem filtrów o granicy odcięcia 3 kDa (lub, jeśli dostępne, 500 Da) [275]. Warto jednak pamiętać, że podczas silnej hydrolizy kwaśnej chitozan może degradować nawet do pojedynczych reszt glukozy (fragmenty o masie cząsteczkowej ok. 170 Da) [276], co może utrudniać ich efektywne oddzielenie.

W przyszłych badaniach rozważyłabym również wykorzystanie elementarnej analizy CHNS jako metody komplementarnej – oznaczanie zawartości siarki mogłoby pozwolić na określenie stopnia podstawienia peptydu zawierającego cysteinę, stanowiącego źródło tego pierwiastka. Metoda ta znajduje zastosowanie w analizie tiolowanych polisacharydów i może być potencjalnie użyteczna do badania koniugatów zawierających wiązania tioeterowe, szczególnie w przypadkach, gdy standardowe metody chromatograficzne okazują się niewystarczające [277].

Analiza właściwości kompozytów do zastosowania w regeneracji tkanki kostnej

Kość zbita charakteryzuje się gęsto upakowaną strukturą z systemem Haversa, którego kanały o średnicy 20–100 μm umożliwiają transport składników odżywczych i gazów. Z kolei kość gąbczasta posiada beleczki kostne oddzielone porami o wielkości 300–600 μm , które zapewniają wymianę metaboliczną i sprzyjają regeneracji [212, 278]. Zgodnie z aktualnymi doniesieniami, optymalne rusztowania (scaffoldy) dla inżynierii tkanki kostnej powinny zawierać pory o zróżnicowanej wielkości – mniejsze (50–100 μm), które sprzyjają adhezji i proliferacji komórek, oraz większe (200–400 μm), umożliwiające angiogenezę i transport substancji odżywczych [212]. Stosowanie porów przekraczających 400 μm nie wykazuje istotnych, udokumentowanych korzyści biologicznych, a nadmierna porowatość może prowadzić do pogorszenia właściwości mechanicznych materiału [279, 280].

W przeprowadzonych analizach mikroskopowych, badane kompozyty wykazywały porowatość w zakresie 30–330 μm (Tabela 22). W ich strukturze obecne były zarówno mniejsze pory (50–100 μm), wspierające zasiedlanie przez komórki osteoblastów i ich proliferację, jak i większe (200–400 μm), sprzyjające tworzeniu naczyń krwionośnych. Taka organizacja przestrzenna porów stanowi korzystny kompromis między właściwościami biologicznymi a mechanicznymi i może wspierać długoterminowe przeżycie oraz funkcjonalność odtwarzanej tkanki kostnej.

Istotną cechą projektowanych kompozytów była ich bioaktywność, rozumiana jako zdolność do indukowania tworzenia apatytu o składzie zbliżonym do hydroksyapatytu kostnego po inkubacji w symulowanym płynie ustrojowym (SBF). Przeprowadzone zostały eksperymenty, w których kompozyty były inkubowane w SBF przez okres 2–3 tygodni. Na ich powierzchni pojawiły się wyraźne wysepki apatytowe, co świadczy o

zdolności materiałów do inicjowania mineralizacji w warunkach fizjologicznych. Jak podaje literatura, tempo formowania apatytu jest ściśle powiązane z obecnością funkcjonalnych grup chemicznych (np. $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) oraz mikrostrukturą powierzchni, które wspierają adsorpcję jonów wapniowych i fosforanowych [281].

W kolejnym etapie pracy przeprowadziłam badania uwalniania peptydów z przygotowanych kompozytów. W przypadku próbek oznaczonych numerami 1–5 nie udało mi się uzyskać wiarygodnych profili uwalniania, co wynikało z bardzo niskiej zawartości peptydu – stężenia były poniżej granicy detekcji zastosowanych metod analitycznych, uniemożliwiając ilościową analizę.

Aby lepiej zrozumieć przebieg procesu uwalniania, przeprowadziłam eksperyment dla koniugatu CH–m4.4–ug4 zawierającego peptyd **ug1** sprzężony za pośrednictwem połączenia maleimid–tiol. Eksperyment trwał 42 dni. W ciągu pierwszych 21 dni obserwowałam sukcesywny wzrost ilości uwalnianego peptydu, który po tym czasie zaczął się stabilizować i wykazywał tendencję spadkową, choć peptyd nadal był wykrywalny w roztworze. Całkowity poziom uwolnienia peptydu **ug1** wyniósł około 15,5%. Uważam jednak, że rzeczywista ilość mogła być wyższa, ponieważ **ug1** – jako krótki peptyd – wykazuje ograniczoną stabilność w środowisku wodnym, co mogło prowadzić do jego degradacji w trakcie inkubacji.

Mimo tych ograniczeń, uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają pożądany efekt stopniowego, wydłużonego w czasie uwalniania bioaktywnego peptydu, co jest kluczowe dla zapewnienia jego działania w dłuższej perspektywie terapeutycznej.

Kompozyty oznaczone numerami 6–8, w których peptydy zostały fizycznie wymieszane z bioszkiełem i chitozanem, wykazywały charakterystyczny profil uwalniania, z bardzo szybkim wyrzutem już w pierwszej godzinie eksperymentu. Dla peptydu **ug51** obecnego w kompozytach 6 i 7 zaobserwowałam uwolnienie około 30% peptydu w tym czasie. Warto zaznaczyć, że wyjściowe stężenie peptydu w tych kompozytach było stosunkowo niskie, co mogło mieć wpływ na wiarygodność oznaczeń ilościowych, szczególnie przy zastosowaniu metody HPLC. Dodatkowo, peptyd **ug51** wykazuje ograniczoną stabilność w warunkach wodnych, co mogło prowadzić do jego częściowej degradacji w trakcie trwania eksperymentu. W efekcie uzyskana wartość 30% może być zaniżona względem faktycznej ilości uwolnionego peptydu.

Dla peptydu **ug52**, zawartego w kompozycie nr 8, zarejestrowałam całkowite (100%) uwolnienie się związku już w ciągu pierwszej godziny eksperymentu. Wynik ten jednoznacznie wskazuje, że w przypadku braku zastosowania metod unieruchamiania (np. wiązania kowalencyjnego lub enkapsulacji), peptydy mogą być bardzo szybko uwalniane z matrycy. Tak gwałtowny wyrzut substancji czynnej może prowadzić do przekroczenia lokalnego stężenia progowego, a następnie do jego szybkiego spadku poniżej poziomu terapeutycznego, co może istotnie ograniczać skuteczność działania kompozytu w dłuższym okresie [262, 263].

Dla kompozytu 9 nie udało mi się zarejestrować uwolnionego peptydu. Możliwą przyczyną mogło być takie połączenie fibryli z kompozytem, które uniemożliwiło dostęp enzymu do fibryli. Należy jednak uwzględnić, że w tym kompozycie fibryla peptydowa została zmieszana z chitozanem, który w środowisku implantacyjnym ulega stopniowej biodegradacji enzymatycznej i hydrolitycznej. Proces ten prowadzi do sukcesywnego odsłaniania uwieczonych wewnątrz kompozytu fibryli peptydowych, które początkowo mogą być fizycznie niedostępne dla enzymu. Dopiero po częściowej degradacji chitozanu enzymy, jak takie MMP-7, mogą dotrzeć do ukrytych w rdzeniu kompozytu struktur fibrylarnych i przeprowadzić selektywne cięcie, prowadząc do uwolnienia bioaktywnego fragmentu peptydu **ug1**. Taki mechanizm kontrolowanego odsłaniania i późniejszego enzymatycznego uwalniania jest zgodny z koncepcją inteligentnych biomateriałów, które reagują na zmieniające się mikrośrodowisko tkankowe i pozwalają na przestrzennie i czasowo zróżnicowane uwalnianie substancji czynnych [233].

Dostępne dane literaturowe wyraźnie wskazują, iż systemy o przedłużonym, kontrolowanym profilu uwalniania wykazują większą skuteczność w regeneracji kości w porównaniu do układów z szybkim uwalnianiem – głównie dzięki utrzymywaniu stabilnego stężenia terapeutycznego i lepszemu dopasowaniu do dynamicznego procesu przebudowy tkanki [262, 263].

Badania biologiczne i implantacyjne

Dla przygotowanych krążków kompozytowych przeprowadzono badania cytotoksyczności wobec ludzkich płodowych osteoblastów linii hFOB 1.19. Wszystkie testowane kompozyty, oznaczone numerami od 1 do 9, charakteryzowały się niską

cytotoksycznością – poniżej 10%, co pozwala uznać je za materiały biozgodne, zgodnie z normami ISO 10993–5.

Dodatkowo oceniono ich wpływ na zdolność stymulacji proliferacji komórek kostnych. Kompozytem, który wykazał najsilniejsze właściwości proregeneracyjne, był kompozyt nr 3 (P5Zn/CH–CH–m4.4–ug4_3,4%), który powodował 187% wzrost liczby komórek w stosunku do kontroli. Wysoką aktywność proliferacyjną wykazał również kompozyt nr 5 (P5Zn/CH–CH–m4.4–ug4_3,4%) – na poziomie 178%. Różnica pomiędzy nimi polegała na tym, że kompozyt 5 zawierał dodatkowo peptyd **ug46** o udokumentowanych właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych [194]. Ze względu na jego dodatkowe właściwości biologiczne, to kompozyt 5 został wybrany do dalszych badań implantacyjnych *in vivo*.

Kompozyty 6–8, zawierające fizycznie wymieszany peptyd **ug51**, wykazywały poziom proliferacji komórek zbliżony do kontroli. Należy jednak zaznaczyć, że peptyd **ug51** został wykorzystany przez dr inż. Małgorzatę Gazińską w niezależnej serii badań syntezy kompozytu na bazie poliadypinianu glicerolu [282, 283]. Materiał ten wykazywał bardzo dobre właściwości proregeneracyjne wobec komórek kostnych w badaniach *in vivo*, jednak dane te nie zostały ujęte w niniejszej dysertacji.

Dla kompozytu nr 5 przeprowadzone zostały badania *in vivo* w modelu uszkodzenia krętarza kości udowej królika. Wyniki eksperymentu wykazały, że po implantacji tego kompozytu następuje szybsze zasiedlenie miejsca ubytku przez osteocyty w porównaniu do kontroli (grupę kontrolną stanowiły zwierzęta z wykonaną operacją bez wszczepienia po 90 dniach). Kompozyt pełnił funkcję skutecznego rusztowania dla komórek szpiku kostnego. W jego obrębie zaobserwowałam pojedyncze ogniska mineralizacji oraz tworzenia się nowej tkanki kostnej. Wokół implantu zgodnie z fizjologicznym procesem regeneracyjnym uformowała się tkanka łączna, jednak jej resorpcja przebiegała wolniej, niż pierwotnie zakładano.

W trakcie trwania eksperymentu kompozyt zachował trójwymiarową strukturę przestrzenną, zapobiegając zapadaniu się ubytku, a jednocześnie ulegał powolnej biodegradacji. Jednocześnie nie zaobserwowano oznak przewlekłego stanu zapalnego ani ogólnoustrojowych działań niepożądanych, co wskazuje na dobrą biokompatybilność materiału. W porach kompozytu zaobserwowano zasiedlanie przez komórki i inicjację

procesu osteogenezy, co potwierdza funkcjonalność struktury porowatej jako mikrośrodowiska sprzyjającego regeneracji [212, 284].

Kompozyt 5 spełnia podstawowe kryteria skutecznego implantu do regeneracji tkanki kostnej: jest biozgodny, strukturalnie stabilny, biodegradowalny i wykazuje aktywność biologiczną. W dalszych etapach badań należałoby skupić się na poprawie stopnia osteointegracji oraz przeprowadzeniu długoterminowych badań *in vivo* obrazujących pełen przebieg degradacji kompozytu oraz remodeling tkanki kostnej.

Uzyskane wyniki dotyczące działania peptydu **ug4** oraz kompozytu 5 zostały objęte zgłoszeniem patentowym UPRP (P.442881, data zgłoszenia: 18.11.2022) pt. „Wielofunkcyjne kompozyty o działaniu proregeneracyjnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów o działaniu proregeneracyjnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej” oraz odpowiednikiem europejskim EP23174685.0 (data zgłoszenia: 22.05.2023), których jestem współautorką.

Zaprojektowane kompozyty, dzięki zdolności do stopniowego uwalniania peptydów bioaktywnych oraz możliwości dostosowywania ich właściwości fizykochemicznych, mogą stanowić nowoczesną alternatywę dla obecnie stosowanych implantów na bazie hydroksyapatytu. Elastyczność w konstrukcji rusztowań oraz potencjał do precyzyjnego sterowania odpowiedzią biologiczną czyni je szczególnie interesującymi dla zastosowań w inżynierii tkanki kostnej.

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO AUTORKI

Stan na dzień 02.07.2025 r.

PUBLIKACJE:

1. Sławomir Lach, Przemysław Jurczak, Natalia Karska, **Agnieszka Kubiś**, Aneta Szymańska, Sylwia Rodziewicz–Motowidło: “Spectroscopic Methods Used in Implant Material Studies”, *Molecules*, 25(3), 579 (2020), IF(3.060)
2. Natalia Karska, Małgorzata Graul, Emilia Sikorska, Magdalena Ślusarz, Igor Zhukov, Franciszek Kasprzykowski, **Agnieszka Kubiś**, Andrea Lipińska, Sylwia Rodziewicz–Motowidło: “Investigation of the Effects of Primary Structure Modifications within the RRE Motif on the Conformation of Synthetic Bovine Herpesvirus 1-Encoded UL49.5 Protein Fragments”, *Chemistry & Biodiversity* 18, 2, 2021.
3. Milena Chraniuk, Mirosława Panasiuk, Lilit Hovhannisyan, Sabina Żołędowska, Dawid Nidzworski, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Zbigniew Jaegermann, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Monika Biernat, Beata Gromadzka: “Assessment of the toxicity of biocompatible materials supporting bone regeneration; Impact of the type of assay and used controls”, *Toxics*. 2021,10, 20. IF(3.79)

W przygotowaniu znajdują się publikacje dotyczące modyfikacji chitozanu peptydem **ug4** oraz syntezy i charakterystyki fizykochemicznej i biologicznej kompozytów PGA zawierających peptyd **ug51**.

KONFERENCJE:

1. Biernat Monika, **Kubiś Agnieszka**, Sylla Anna, Karska Natalia, Panasiuk Mirosława, Ciołek Lidia, Gazińska Małgorzata, Bollin Piotr, Sawicka Justyna, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Porowate kompozyty chitozan–bioszkło, przeznaczone do wypełniania ubytków kości, wzbogacone o biologicznie aktywne peptydy, 2024, VI Interdyscyplinarna Konferencja Nano(&)BioMateriały – od teorii do aplikacji 2024, poster
2. Karska Natalia, **Kubiś Agnieszka**, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, Kasprzykowski Franciszek, Chraniuk Milena, Panasiuk Mirosława, Gromadzka Beata, Jaegermann Zbigniew, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Projektowanie, synteza oraz sprzęganie biologicznie aktywnych peptydów z chitozanem – uzyskiwanie biomateriału do odbudowy kości, 2024, VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Interdyscyplinarność w tworzeniu biomateriałów" 2024, poster
3. Biernat Monika, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Sawicka Justyna, Rodziewicz–Motowidło Sylwia, Bolin Piotr, Hovhannisyan Lilit, Chraniuk Milena: Wielofunkcyjność materiału podstawą do otrzymania implantu

doskonałego, 2023, V Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Technologie, chemia i medycyna" 2023, referat wygłoszony

4. Woźniak Anna, Biernat Monika, Ciołek Lidia, **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Sawicka Justyna, Hovhannisyan Lilit, Chraniuk Milena, Panasiuk Mirosława, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Metody formowania wielofunkcyjnych materiałów kompozytowych z udziałem aktywnych biologicznie peptydów, 2023, V Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Technologie, chemia i medycyna" 2023, referat wygłoszony
5. Woźniak Anna, Biernat Monika, Ciołek Lidia, **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Sawicka Justyna, Rodziewicz–Motowidło Sylwia, Tymowicz–Grzyb Paulina, Hovhannisyan Lilit, Chraniuk Milena: Preparation of multifunctional porous biocomposites made of chitosan, bioglass and peptides, 2023, TERMIS European Chapter Meeting 2023, poster
6. Sawicka Justyna, Deptuła Milena, **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Sosnowski Paweł, Sass Piotr, Iłowska Emilia, Czerwiec Katarzyna, Szymańska Aneta, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Functionalized peptide fibrils as a scaffold for active substances, 2022, International Meeting CYSTATINS 2022 2022, referat wygłoszony
7. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, Kasprzykowski Franciszek, Chraniuk Milena, Panasiuk Mirosława, Gromadzka Beata, Jaegermann Zbigniew, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Projektowanie, synteza oraz sprzęganie biologicznie aktywnych peptydów z chitozanem – uzyskiwania biomateriału do odbudowy kości, 2022, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Inżynieria, medycyna, i nauka – w pogoni za implantem doskonałym" 2022, poster
8. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, Biernat Monika, Kasprzykowski Franciszek, Chraniuk Milena, Panasiuk Mirosława, Gromadzka Beata, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Proregenerative peptides as part of a composites for bone reconstruction, 2022, 17th Naples Workshop on Bioactive Peptides "Emerging peptide science in 2022" 2022, poster
9. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, Kasprzykowski Franciszek, Chraniuk Milena, Panasiuk Mirosława, Gromadzka Beata, Jaegermann Zbigniew, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Synthesis and analysis of chitosan composites with proregenerative properties, 2022, NanoTech Poland 2022, poster
10. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, Biernat Monika, Kasprzykowski Franciszek, Chraniuk Milena, Panasiuk Mirosława, Gromadzka Beata, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Synteza i analiza kompozytów chitozanowych o właściwościach proregeneracyjnych, 2021, XXV Konferencja Naukowa "Modyfikacja Polimerów" 2021, referat wygłoszony

11. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Woźniak Anna, Ciołek Lidia, Biernat Monika, Kasprzykowski Franciszek, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Synteza i analiza kompozytów chitozanowych o właściwościach proregeneracyjnych, 2021, III Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Koncepcja a realia we współczesnych rozwiązaniach" 2021, referat wygłoszony
12. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Kasprzykowski Franciszek, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i pro–regeneracyjnych do odbudowy tkanki kostnej, 2019, XVII Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów "Na Pograniczu Chemii i Biologii" 2019, referat wygłoszony
13. Karska Natalia, **Kubiś Agnieszka**, Kasprzykowski Franciszek, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Multifunctional composite material with proregenerative properties for the reconstruction of bone tissue, 2019, 25th Polish Peptide Symposium 2019, poster
14. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Kasprzykowski Franciszek, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach proregeneracyjnych do odbudowy kości, 2019, XXII Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2019, poster
15. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach proregeneracyjnych do odbudowy kości, 2019, VI Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP 2019, poster
16. **Kubiś Agnieszka**, Karska Natalia, Lach Sławomir, Kasprzykowski Franciszek, Rodziewicz–Motowidło Sylwia: Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i proregeneracyjnych do odbudowy tkanki kostnej, 2019, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Nowoczesna implantologia – dylematy i nadzieje" 2019, poster

TARGI:

1. XVI Międzynarodowe Targi Wynalazków i Innowacji INTARG–2023 w Katowicach (24–25.05.2023), Zdobyte nagrody: Platinum Medal INTARG (Nagroda Platynowa) za wynalazek „Wielofunkcyjny kompozytowy materiał implantacyjny do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Gold Medal INTARG (Złoty Medal) za wynalazek „Bioszkła antybakteryjne do zastosowań medycznych”, Gold Medal INTARG (Złoty Medal) za „Wielofunkcyjny elastomerowy biokompozyt do regeneracji tkanki kostnej”, Nagroda Polskiej Izby Rzeczników Patentowych za wynalazek „Wielofunkcyjny kompozytowy materiał implantacyjny do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”

2. Targi GLOBAL INDUSTRIE w Paryżu (25–28.03.2024), prezentacja wyników w formie plakatów „Multifunctional elastomeric biocomposite implant material for bone tissue regeneration” i „Multifunctional composite implant material for bone defects filling and for bone tissue regeneration”
3. Targi ceramitec w Monachium (9–12.04.2024), prezentacja w formie plakatów „Multifunctional elastomeric biocomposite implant material for bone tissue regeneration” i „Multifunctional composite implant material for bone defects filling and for bone tissue regeneration”

ZGŁOSZENIA PATENTOWE:

1. Zgłoszenie patentowe UPRP „Biokompozyty polimerowo–ceramiczne o właściwościach przeciwbakteryjnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich otrzymywania”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed–Georgiou, Marcin Włodarczyk, numer zgłoszenia: P.442875, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
2. Zgłoszenie patentowe UPRP „Biokompozyty polimerowo–ceramiczne zawierające peptyd o właściwościach przeciwzapalnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób otrzymywania biokompozytów”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442876, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
3. Zgłoszenie patentowe UPRP „Biokompozyty polimerowo–ceramiczne o właściwościach proregeneracyjnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich otrzymywania”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed–Georgiou, Marcin Włodarczyk, numer zgłoszenia: P.442877, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
4. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjny kompozyt chitozanowy do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnego kompozytu chitozanowego do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew

- Jaegermann, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442878, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
5. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjne kompozyty chitozanowe o działaniu przeciwdrobnoustrojowym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów chitozanowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442879, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
 6. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjne kompozyty o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwzapalnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwzapalnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442880, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
 7. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjne kompozyty o działaniu pro–regeneracyjnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów o działaniu pro–regeneracyjnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442881, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
 8. Zgłoszenie patentowe UPRP „Sposób otrzymywania *N*–maleimidoglicyny, sposób otrzymywania zmodyfikowanego *N*–maleimidoglicyną chitozanu oraz sposób analizy ilościowej przyłączonej *N*–maleimidoglicyny do chitozanu, Natalia Karska, **Agnieszka Kubiś**, Małgorzata Gazińska, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, numer zgłoszenia P.443979, data zgłoszenia: 4.03.2023 r.
 9. Zgłoszenie patentowe EPO “Multifunctional chitosan composite for bone defect filling and bone tissue regeneration and how to obtain multifunctional chitosan composite for bone defect filling and bone tissue regeneration”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: EP23174685.0, data zgłoszenia 22.05.2023
 10. Zgłoszenie patentowe EPO “Polymer–ceramic biocomposites with pro–regenerative properties for filling bone defects and regenerating bone tissue and how to produce them”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad

Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, **Agnieszka Kubiś**, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz–Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed–Georgiou, Marcin Włodarczyk, numer zgłoszenia: EP23174684.3, data zgłoszenia 22.05.2023

BIBLIOGRAFIA

- [1] Meng X., Wang W.D., Li S.R., Sun Z.J., Zhang L. "Harnessing Cerium-Based Biomaterials for the Treatment of Bone Diseases." *Acta Biomater.* **2024**, *183*, 30–49, doi:10.1016/j.actbio.2024.05.046.
- [2] Xu Z., Zhang R., Chen H., Zhang L., Yan X., Qin Z., Cong S., Tan Z., Li T., Du M. "Characterization and Preparation of Food-Derived Peptides on Improving Osteoporosis: A Review." *Food Chem. X* **2024**, *23*, 101530, doi:10.1016/j.fochx.2024.101530.
- [3] Rachner T.D., Khosla S., Hofbauer L.C. "Osteoporosis: Now and the Future." *Lancet* **2011**, *377*, 1276–1287, doi:10.1016/S0140-6736(10)62349-5.
- [4] Zoulakis M., Axelsson K.F., Litsne H., Johansson L., Lorentzon M. "Real-World Effectiveness of Osteoporosis Screening in Older Swedish Women (SUPERB)." *Bone* **2024**, *187*, 117204, doi:10.1016/j.bone.2024.117204.
- [5] de Villiers T.J., Goldstein S.R. "Bone Health 2022: An Update." *Climacteric* **2022**, *25*, 1–3, doi:10.1080/13697137.2021.1965408.
- [6] Kanis J.A., Norton N., Harvey N.C., Jacobson T., Johansson H., Lorentzon M., McCloskey E. V., Willers C., Borgström F. "SCOPE 2021: A New Scorecard for Osteoporosis in Europe." *Arch. Osteoporos.* **2021**, *16*, 82, doi:10.1007/s11657-020-00871-9.
- [7] Liu P., Lv H., Li Y., Liu Z., Yang X., Hu H. "Global Bone Cancer Incidence and Death Rate Analysis at 40 Years." *Discov. Oncol.* **2025**, *16*, 1–24, doi:10.1007/s12672-025-02917-1.
- [8] Wang Y., Wang C., Xia M., Tian Z., Zhou J., Berger J.M., Zhang X.H.F., Xiao H. "Engineering Small-Molecule and Protein Drugs for Targeting Bone Tumors." *Mol. Ther.* **2024**, *32*, 1219–1237, doi:10.1016/j.ymthe.2024.03.001.
- [9] Henkel J., Woodruff M.A., Epari D.R., Steck R., Glatt V., Dickinson I.C., Choong P.F.M., Schuetz M.A., Hutmacher D.W. "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective." *Bone Res.* **2013**, *1*, 216–248, doi:10.4248/BR201303002.
- [10] Matsushita T., Watanabe Y., Takenaka N., Miyamoto W., Kawano H. "Correction of Equinus Deformity by Means of a New Unconstrained Ilizarov Frame System." *Injury* **2021**, *52*, 2006–2009, doi:10.1016/j.injury.2021.02.002.
- [11] Giannoudis P. V., Faour O., Goff T., Kanakaris N., Dimitriou R. "Masquelet Technique for the Treatment of Bone Defects: Tips-Tricks and Future Directions." *Injury* **2011**, *42*, 591–598, doi:10.1016/j.injury.2011.03.036.
- [12] Keating J.F., Simpson A.H.R.W., Robinson C.M. "The Management of Fractures with Bone Loss." *J. Bone Jt. Surg.* **2005**, *87*, 142–150, doi:10.1302/0301-620X.87B2.15874.
- [13] Qu H., Fu H., Han Z., Sun Y. "Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review." *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26252–26262, doi:10.1039/c9ra05214c.
- [14] Annamalai R.T., Hong X., Schott N.G., Tiruchinapally G., Levi B., Stegemann J.P. "Injectable Osteogenic Microtissues Containing Mesenchymal Stromal Cells Conformally Fill and Repair Critical-Size Defects." *Biomaterials* **2019**, *208*, 32–44, doi:10.1016/j.biomaterials.2019.04.001.
- [15] Ren C., Li M., Ma T., Li Z., Xu Y., Sun L., Lu Y., Wang Q., Xue H., Zhang K. "A Meta-Analysis of the Masquelet Technique and the Ilizarov Bone Transport Method for the Treatment of Infected Bone Defects in the Lower Extremities." *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)* **2022**, *30*, 10225536221102684, doi:10.1177/10225536221102685.
- [16] Borzunov D.Y., Kolchin S.N., Mokhovikov D.S., Malkova T.A. "Ilizarov Bone Transport Combined with the Masquelet Technique for Bone Defects of Various Etiologies (Preliminary Results)." *World J. Orthop.* **2022**, *13*, 278–288, doi:10.5312/wjo.v13.i3.278.
- [17] Fernandez de Grado G., Keller L., Idoux-Gillet Y., Wagner Q., Musset A.M., Benkirane-Jessel N.,

- Bornert F., Offner D. "Bone Substitutes: A Review of Their Characteristics, Clinical Use, and Perspectives for Large Bone Defects Management." *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*, doi:10.1177/2041731418776819.
- [18] Ansari M. "Bone Tissue Regeneration: Biology, Strategies and Interface Studies." *Prog. Biomater.* **2019**, *8*, 223–237, doi:10.1007/s40204-019-00125-z.
- [19] Pearlin, Nayak S., Manivasagam G., Sen D. "Progress of Regenerative Therapy in Orthopedics." *Curr. Osteoporos. Rep.* **2018**, *16*, 169–181, doi:10.1007/s11914-018-0428-x.
- [20] Barth H.D., Zimmermann E.A., Schaible E., Tang S.Y., Alliston T., Ritchie R.O. "Characterization of the Effects of X-Ray Irradiation on the Hierarchical Structure and Mechanical Properties of Human Cortical Bone." *Biomaterials* **2011**, *32*, 8892–8904, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.013.
- [21] Oftadeh R., Perez-Viloria M., Villa-Camacho J.C., Vaziri A., Nazarian A. "Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review." *J. Biomech. Eng.* **2015**, *137*, 108021–1080215, doi:10.1115/1.4029176.
- [22] Callens S.J.P., Tourolle né Betts D.C., Müller R., Zadpoor A.A. "The Local and Global Geometry of Trabecular Bone." *Acta Biomater.* **2021**, *130*, 343–361, doi:10.1016/j.actbio.2021.06.013.
- [23] Burr D.B., Akkus O. "Bone Morphology and Organization." In *Basic and Applied Bone Biology*; Elsevier, **2013**; pp. 3–25 ISBN 9780124160156.
- [24] CURREY J. "The Structure and Mechanical Properties of Bone." In *Bioceramics and their Clinical Applications*; Kokubo, T.B.T.-B. and their C.A., Ed.; Elsevier, **2008**; pp. 3–27 ISBN 978-1-84569-204-9.
- [25] Dzygóra W. *Podstawy Histologii. Cz. 1, Tkanki i Ich Charakterystyka*; Karkonoska Państwowa Szkoła Wyższa, **2015**; ISBN 9788361955399.
- [26] Lekszycki T. *Wybrane Zagadnienia Modelowania w Biomechanice Kości*; Warszawa, **2007**; ISBN 978-83-89687-24-1.
- [27] Safadi F.F., Barbe M.F., Abdelmagid S.M., Rico M.C., Aswad R.A., Litvin J., Popoff S.N. "Bone Structure, Development and Bone Biology." In *Bone Pathology*; Khurana, J.S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2009**; pp. 1–50 ISBN 9781588297662.
- [28] Matos M.A., Araújo F.P., Paixão F.B. "Histomorphometric Evaluation of Bone Healing in Rabbit Fibular Osteotomy Model without Fixation." *J. Orthop. Surg. Res.* **2008**, *3*, 1–6, doi:10.1186/1749-799X-3-4.
- [29] Xue B., Li Y., Fu Z., Ping H., Wang K. "Intrafibrillar Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals in Multiscale Collagen." *Crystals* **2023**, *13*, 692, doi:10.3390/cryst13040692.
- [30] Von Euw S., Wang Y., Laurent G., Drouet C., Babonneau F., Nassif N., Azaïs T. "Bone Mineral: New Insights into Its Chemical Composition." *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8456, doi:10.1038/s41598-019-44620-6.
- [31] Murshed M. "Mechanism of Bone Mineralization." *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a031229.
- [32] Lin X., Patil S., Gao Y.-G., Qian A. "The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration." *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 757, doi:10.3389/fphar.2020.00757.
- [33] Behzadi S., Luther G.A., Harris M.B., Farokhzad O.C., Mahmoudi M. "Nanomedicine for Safe Healing of Bone Trauma: Opportunities and Challenges." *Biomaterials* **2017**, *146*, 168–182, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.09.005.
- [34] Donsante S., Palmisano B., Serafini M., Robey P.G., Corsi A., Riminucci M. "From Stem Cells to Bone-Forming Cells." *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3989, doi:10.3390/ijms22083989.

- [35] Agemura T., Hasegawa T., Yari S., Kikuta J., Ishii M. "Arthritis-Associated Osteoclastogenic Macrophages (AtoMs) Participate in Pathological Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis." *Immunol. Med.* **2022**, *45*, 22–26, doi:10.1080/25785826.2021.1944547.
- [36] Shrivats A.R., Alvarez P., Schutte L., Hollinger J.O. "Bone Regeneration." In *Principles of Tissue Engineering*; Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.B.T.-P. of T.E. (Fourth E., Eds.; Elsevier: Boston, **2014**; pp. 1201–1221 ISBN 978-0-12-398358-9.
- [37] Ai-Aql Z.S., Alagl A.S., Graves D.T., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. "Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis." *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 107–118, doi:10.1177/154405910808700215.
- [38] Zhu G., Zhang T., Chen M., Yao K., Huang X., Zhang B., Li Y., Liu J., Wang Y., Zhao Z. "Bone Physiological Microenvironment and Healing Mechanism: Basis for Future Bone-Tissue Engineering Scaffolds." *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 4110–4140, doi:10.1016/j.bioactmat.2021.03.043.
- [39] Chaparro O., Linero I. "Regenerative Medicine: A New Paradigm in Bone Regeneration." In *Advanced Techniques in Bone Regeneration*; Zorzi, A.R., Miranda, J.B. de, Eds.; InTech: Rijeka, **2016**; p. Ch. 12 ISBN 978-953-51-2539-6.
- [40] McNamara L.M. "Bone as a Material." In *Comprehensive Biomaterials II*; Elsevier, **2017**; Vol. 2, pp. 202–227 ISBN 9780081006924.
- [41] Siddiqui J.A., Partridge N.C. "Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement." *Physiology (Bethesda)*. **2016**, *31*, 233–245, doi:10.1152/physiol.00061.2014.
- [42] Javed F., Akram Z., Khan J., Zafar M.S. "Growth Factors and Guided Bone Regeneration." In *Dental Implants*; Zafar, M.S., Khurshid, Z., Khan, A.S., Najeeb, S., Sefat, F.B.T.-D.I., Eds.; Elsevier, **2020**; pp. 133–143 ISBN 978-0-12-819586-4.
- [43] Devescovi V., Leonardi E., Ciapetti G., Cenni E. "Growth Factors in Bone Repair." *Chir. Organi Mov.* **2008**, *92*, 161–168, doi:10.1007/s12306-008-0064-1.
- [44] Papachroni K.K., Karatzas D.N., Papavassiliou K.A., Basdra E.K., Papavassiliou A.G. "Mechanotransduction in Osteoblast Regulation and Bone Disease." *Trends Mol. Med.* **2009**, *15*, 208–216, doi:https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.03.001.
- [45] Toosi S., Behravan J. "Osteogenesis and Bone Remodeling: A Focus on Growth Factors and Bioactive Peptides." *Biofactors* **2020**, *46*, 326–340, doi:10.1002/biof.1598.
- [46] Bai Y., Yin G., Huang Z., Liao X., Chen X., Yao Y., Pu X. "Localized Delivery of Growth Factors for Angiogenesis and Bone Formation in Tissue Engineering." *Int. Immunopharmacol.* **2013**, *16*, 214–223, doi:https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.001.
- [47] Zhu S., Chen W., Masson A., Li Y.-P. "Cell Signaling and Transcriptional Regulation of Osteoblast Lineage Commitment, Differentiation, Bone Formation, and Homeostasis." *Cell Discov.* **2024**, *10*, 71, doi:10.1038/s41421-024-00689-6.
- [48] Wang L., Ruan M., Bu Q., Zhao C. "Signaling Pathways Driving MSC Osteogenesis: Mechanisms, Regulation, and Translational Applications." *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, doi:10.3390/ijms26031311.
- [49] Franceschi R.T., Ge C. "Control of the Osteoblast Lineage by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling." *Curr. Mol. Biol. reports* **2017**, *3*, 122–132, doi:10.1007/s40610-017-0059-5.
- [50] Senta H., Park H., Bergeron E., Drevelle O., Fong D., Leblanc E., Cabana F., Roux S., Grenier G., Fauchoux N. "Cell Responses to Bone Morphogenetic Proteins and Peptides Derived from Them: Biomedical Applications and Limitations." *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**, *20*, 213–222, doi:10.1016/j.cytogfr.2009.05.006.
- [51] Gillman C.E., Jayasuriya A.C. "FDA-Approved Bone Grafts and Bone Graft Substitute Devices in Bone Regeneration." *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **2021**, *130*, 112466, doi:10.1016/j.msec.2021.112466.

- [52] Skovrlj B., Koehler S.M., Anderson P.A., Qureshi S.A., Hecht A.C., Iatridis J.C., Cho S.K. "Association Between BMP-2 and Carcinogenicity." *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2015**, *40*, 1862–1871, doi:10.1097/BRS.0000000000001126.
- [53] Zhang J., Li L. "BMP Signaling and Stem Cell Regulation." *Dev. Biol.* **2005**, *284*, 1–11, doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.009.
- [54] Visser R., Rico-Llanos G.A., Pulkkinen H., Becerra J. "Peptides for Bone Tissue Engineering." *J. Control. Release* **2016**, *244*, 122–135, doi:10.1016/j.jconrel.2016.10.024.
- [55] Pountos I., Panteli M., Lampropoulos A., Jones E., Calori G.M., Giannoudis P. V "The Role of Peptides in Bone Healing and Regeneration: A Systematic Review." *BMC Med.* **2016**, *14*, 103, doi:10.1186/s12916-016-0646-y.
- [56] Kanie K., Kurimoto R., Tian J., Ebisawa K., Narita Y., Honda H., Kato R. "Screening of Osteogenic-Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications." *Materials (Basel)*. **2016**, *9*, doi:10.3390/ma9090730.
- [57] Safari B., Davaran S., Aghanejad A. "Osteogenic Potential of the Growth Factors and Bioactive Molecules in Bone Regeneration." *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *175*, 544–557, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.052.
- [58] Chen Q., Zhang D., Zhang W., Zhang H., Zou J., Chen M., Li J., Yuan Y., Liu R. "Dual Mechanism β -Amino Acid Polymers Promoting Cell Adhesion." *Nat. Commun.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-020-20858-x.
- [59] Shekaran A., García A.J. "Extracellular Matrix-Mimetic Adhesive Biomaterials for Bone Repair." *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *96*, 261–272, doi:10.1002/jbm.a.32979.
- [60] García A.J., Reyes C.D. "Bio-Adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation." *J. Dent. Res.* **2005**, *84*, 407–413, doi:10.1177/154405910508400502.
- [61] Kumar V.B., Tiwari O.S., Finkelstein-Zuta G., Rencus-Lazar S., Gazit E. "Design of Functional RGD Peptide-Based Biomaterials for Tissue Engineering." *Pharmaceutics* **2023**, *15*, doi:10.3390/pharmaceutics15020345.
- [62] Bellis S.L. "Advantages of RGD Peptides for Directing Cell Association with Biomaterials." *Biomaterials* **2011**, *32*, 4205–4210, doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.029.
- [63] Gutiérrez-Sánchez M., Escobar-Barrios V.A., Pozos-Guillén A., Escobar-García D.M. "RGD-Functionalization of PLA/Starch Scaffolds Obtained by Electrospinning and Evaluated in Vitro for Potential Bone Regeneration." *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 798–806, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.003.
- [64] Bilem I., Chevallier P., Plawinski L., Sone E.D., Durrieu M.C., Laroche G. "RGD and BMP-2 Mimetic Peptide Crosstalk Enhances Osteogenic Commitment of Human Bone Marrow Stem Cells." *Acta Biomater.* **2016**, *36*, 132–142, doi:10.1016/j.actbio.2016.03.032.
- [65] Si J., Wang C., Zhang D., Wang B., Hou W., Zhou Y. "Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases." *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e919159, doi:10.12659/MSM.919159.
- [66] Tan Y., Zhao L., Yang Y.-G., Liu W. "The Role of Osteopontin in Tumor Progression Through Tumor-Associated Macrophages." *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 953283, doi:10.3389/fonc.2022.953283.
- [67] Horii A., Wang X., Gelain F., Zhang S. "Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration." *PLoS One* **2007**, *2*, e190, doi:10.1371/journal.pone.0000190.
- [68] Lu T., Chen T., Zhai Y.-K., Ma Y., Xiao Y. "Designer Functionalized Self-Assembling Peptide Scaffolds for Adhesion, Proliferation, and Differentiation of MC3T3-E1." *Soft Mater.* **2014**, *12*, doi:10.1080/1539445X.2012.756018.

- [69] Nguyen H., Qian J.J., Bhatnagar R.S., Li S. "Enhanced Cell Attachment and Osteoblastic Activity by P-15 Peptide-Coated Matrix in Hydrogels." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 179–186, doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.192.
- [70] Fu L., Omi M., Sun M., Cheng B., Mao G., Liu T., Mendonça G., Averick S.E., Mishina Y., Matyjaszewski K. "Covalent Attachment of P15 Peptide to Ti Alloy Surface Modified with Polymer to Enhance Osseointegration of Implants." *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 38531–38536, doi:10.1021/acsami.9b14651.
- [71] Lutz R., Srouf S., Nonhoff J., Weisel T., Damien C.J., Schlegel K.A. "Biofunctionalization of Titanium Implants with a Biomimetic Active Peptide (P-15) Promotes Early Osseointegration." *Clin. Oral Implants Res.* **2010**, *21*, 726–734, doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01904.x.
- [72] Arnold P.M., Sasso R.C., Janssen M.E., Fehlings M.G., Heary R.F., Vaccaro A.R., Kopjar B. "I-Factor™ Bone Graft vs Autograft in Anterior Cervical Discectomy and Fusion: 2-Year Follow-up of the Randomized Single-Blinded Food and Drug Administration Investigational Device Exemption Study." *Neurosurgery* **2018**, *83*, 377–384, doi:10.1093/neuros/nyx432.
- [73] Arnold P.M., Sasso R.C., Janssen M.E., Fehlings M.G., Smucker J.D., Vaccaro A.R., Heary R.F., Patel A.I., Goulet B., Kalfas I.H., et al. "Efficacy of I-Factor Bone Graft versus Autograft in Anterior Cervical Discectomy and Fusion." *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2016**, *41*, 1075–1083, doi:10.1097/BRS.0000000000001466.
- [74] Cerapedics I-FACTOR and P-15 Available online: <https://cerapedics.com/i-factor-and-p-15> (accessed on 18 March 2025).
- [75] Bullock G., Atkinson J., Gentile P., Hatton P., Miller C. "Osteogenic Peptides and Attachment Methods Determine Tissue Regeneration in Modified Bone Graft Substitutes." *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12*, doi:10.3390/jfb12020022.
- [76] Madl C.M., Mehta M., Duda G.N., Heilshorn S.C., Mooney D.J. "Presentation of BMP-2 Mimicking Peptides in 3D Hydrogels Directs Cell Fate Commitment in Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells." *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 445–455, doi:10.1021/bm401726u.
- [77] Chao Y.-L., Lin L.-D., Chang H.-H., Wang T.-M. "Preliminary Evaluation of BMP-2-Derived Peptide in Repairing a Peri-Implant Critical Size Defect: A Canine Model." *J. Formos. Med. Assoc.* **2021**, *120*, 1212–1220, doi:https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.07.023.
- [78] Chen Y., Liu X., Liu R., Gong Y., Wang M., Huang Q., Feng Q., Yu B. "Zero-Order Controlled Release of BMP2-Derived Peptide P24 from the Chitosan Scaffold by Chemical Grafting Modification Technique for Promotion of Osteogenesis in Vitro and Enhancement of Bone Repair in Vivo." *Theranostics* **2017**, *7*, 1072–1087, doi:10.7150/thno.18193.
- [79] Suzuki Y., Tanihara M., Suzuki K., Saitou A., Sufan W., Nishimura Y. "Alginate Hydrogel Linked with Synthetic Oligopeptide Derived from BMP-2 Allows Ectopic Osteoinduction in Vivo." *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 405–409, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(20000605)50:3<405::AID-JBM15>3.0.CO;2-Z.
- [80] Sun T., Zhou K., Liu M., Guo X., Qu Y., Cui W., Shao Z., Zhang X., Xu S. "Loading of BMP-2-related Peptide onto Three-dimensional Nano-hydroxyapatite Scaffolds Accelerates Mineralization in Critical-sized Cranial Bone Defects." *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, 864–877, doi:10.1002/term.2371.
- [81] Bab I., Gazit D., Chorev M., Muhlrad A., Shteyer A., Greenberg Z., Namdar M., Kahn A. "Histone H4-Related Osteogenic Growth Peptide (OGP): A Novel Circulating Stimulator of Osteoblastic Activity." *EMBO J.* **1992**, *11*, 1867–1873, doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05238.x.
- [82] Gabet Y., Müller R., Regev E., Sela J., Shteyer A., Salisbury K., Chorev M., Bab I. "Osteogenic Growth Peptide Modulates Fracture Callus Structural and Mechanical Properties." *Bone* **2004**, *35*, 65–73, doi:10.1016/j.bone.2004.03.025.

- [83] Pigossi S.C., Medeiros M.C., Saska S., Cirelli J.A., Scarel-Caminaga R.M. "Role of Osteogenic Growth Peptide (OGP) and OGP(10-14) in Bone Regeneration: A Review." *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17111885.
- [84] Zuo Y., Xiong Q., Li Q., Zhao B., Xue F., Shen L., Li H., Yuan Q., Cao S. "Osteogenic Growth Peptide (OGP)-Loaded Amphiphilic Peptide (NapFFY) Supramolecular Hydrogel Promotes Osteogenesis and Bone Tissue Reconstruction." *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *195*, 558–564, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.028.
- [85] Seo Y.M., Park S.J., Lee H.K., Park J.C. "Copine-7 Binds to the Cell Surface Receptor, Nucleolin, and Regulates Ciliogenesis and Dspp Expression during Odontoblast Differentiation." *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13, doi:10.1038/s41598-017-11641-y.
- [86] Lee D., Park K., Yoon G.J., Lee H.J., Lee J., Park Y.S., Park J., Lee G., Chung C.P., Park Y.J. "Identification of Cell-penetrating Osteogenic Peptide from Copine-7 Protein and Its Delivery System for Enhanced Bone Formation." *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2019**, *107*, 2392–2402, doi:10.1002/jbm.a.36746.
- [87] Schnoke M., Midura S.B., Midura R.J. "Parathyroid Hormone Suppresses Osteoblast Apoptosis by Augmenting DNA Repair." *Bone* **2009**, *45*, 590–602, doi:10.1016/j.bone.2009.05.006.
- [88] Agrawal S., Srivastava R. "Osteoinductive and Osteoconductive Biomaterials." In *Racing for the Surface*; Springer International Publishing: Cham, **2020**; pp. 355–395 ISBN 9783030344719.
- [89] Diana D., Ziacco B., Colombo G., Scarabelli G., Romanelli A., Pedone C., Fattorusso R., D'Andrea L.D. "Structural Determinants of the Unusual Helix Stability of a De Novo Engineered Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Mimicking Peptide." *Chem. – A Eur. J.* **2008**, *14*, 4164–4166, doi:10.1002/chem.200800180.
- [90] Santulli G., Ciccarelli M., Palumbo G., Campanile A., Galasso G., Ziacco B., Altobelli G.G., Cimini V., Piscione F., D'Andrea L.D., et al. "In Vivo Properties of the Proangiogenic Peptide QK." *J. Transl. Med.* **2009**, *7*, 41, doi:10.1186/1479-5876-7-41.
- [91] Naldini A., Carraro F., Baldari C.T., Paccani S.R., Bernini C., Keherly M.J., Carney D.H. "The Thrombin Peptide, TP508, Enhances Cytokine Release and Activates Signaling Events." *Peptides* **2004**, *25*, 1917–1926, doi:10.1016/j.peptides.2004.05.017.
- [92] Fife C., Mader J.T., Stone J., Brill L., Satterfield K., Norfleet A., Zwernemann A., Ryaby J.T., Carney D.H. "Thrombin Peptide Chrysalin® Stimulates Healing of Diabetic Foot Ulcers in a Placebo-controlled Phase I/II Study." *Wound Repair Regen.* **2007**, *15*, 23–34, doi:10.1111/j.1524-475X.2006.00181.x.
- [93] Olszewska-Pazdrak B., Carney D.H. "Systemic Administration of Thrombin Peptide TP508 Enhances VEGF-Stimulated Angiogenesis and Attenuates Effects of Chronic Hypoxia." *J. Vasc. Res.* **2013**, *50*, 186–196, doi:10.1159/000348250.
- [94] Iruela-Arispe M.L., Lane T.F., Redmond D., Reilly M., Bolender R.P., Kavanagh T.J., Sage E.H. "Expression of SPARC during Development of the Chicken Chorioallantoic Membrane: Evidence for Regulated Proteolysis in Vivo." *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 327–343, doi:10.1091/mbc.6.3.327.
- [95] Dzierżyńska M., Sawicka J., Deptuła M., Sosnowski P., Sass P., Peplińska B., Pietralik-Molińska Z., Fularczyk M., Kasprzykowski F., Zieliński J., et al. "Release Systems Based on Self-Assembling RADA16-I Hydrogels with a Signal Sequence Which Improves Wound Healing Processes." *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 6273, doi:10.1038/s41598-023-33464-w.
- [96] Shrivats A.R., McDermott M.C., Hollinger J.O. "Bone Tissue Engineering: State of the Union." *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 781–786, doi:10.1016/j.drudis.2014.04.010.
- [97] Yessuf A.M., Bahri M., Kassa T.S., Sharma B.P., Salama A.M., Xing C., Zhang Q., Liu Y. "Electrospun Polymeric Nanofibers: Current Trends in Synthesis, Surface Modification, and Biomedical Applications." *ACS Appl. Bio Mater.* **2024**, *7*, 4231–4253,

doi:10.1021/acsabm.4c00307.

- [98] Abdelaziz A.G., Nageh H., Abdo S.M., Abdalla M.S., Amer A.A., Abdal-Hay A., Barhoum A. "A Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges." *Bioeng. (Basel, Switzerland)* **2023**, *10*, doi:10.3390/bioengineering10020204.
- [99] Morhardt D.R., Mauney J.R., Estrada C.R. "Role of Biomaterials in Surgery." In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Reis, R.L.B.T.-E. of T.E. and R.M., Ed.; Elsevier: Oxford, **2019**; pp. 315–330 ISBN 978-0-12-813700-0.
- [100] Koons G.L., Diba M., Mikos A.G. "Materials Design for Bone-Tissue Engineering." *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 584–603, doi:10.1038/s41578-020-0204-2.
- [101] Zuo W., Yu L., Lin J., Yang Y., Fei Q. "Properties Improvement of Titanium Alloys Scaffolds in Bone Tissue Engineering: A Literature Review." *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 1259, doi:10.21037/atm-20-8175.
- [102] Takizawa T., Nakayama N., Haniu H., Aoki K., Okamoto M., Nomura H., Tanaka M., Sobajima A., Yoshida K., Kamanaka T., et al. "Titanium Fiber Plates for Bone Tissue Repair." *Adv. Mater.* **2018**, *30*, doi:10.1002/adma.201703608.
- [103] Liu J., Ruan J., Chang L., Yang H., Ruan W. "Porous Nb-Ti-Ta Alloy Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Fabrication, Mechanical Properties and in Vitro/Vivo Biocompatibility." *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 503–512, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.088.
- [104] Nabiyouni M., Brückner T., Zhou H., Gbureck U., Bhaduri S.B. "Magnesium-Based Bioceramics in Orthopedic Applications." *Acta Biomater.* **2018**, *66*, 23–43, doi:10.1016/j.actbio.2017.11.033.
- [105] Dutta S., Roy M. "Recent Developments in Engineered Magnesium Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2023**, *9*, 3010–3031, doi:10.1021/acsbiomaterials.2c01510.
- [106] Li Z., Du T., Ruan C., Niu X. "Bioinspired Mineralized Collagen Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 1491–1511, doi:10.1016/j.bioactmat.2020.11.004.
- [107] Lee J., Kim G. "Three-Dimensional Hierarchical Nanofibrous Collagen Scaffold Fabricated Using Fibrillated Collagen and Pluronic F-127 for Regenerating Bone Tissue." *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 35801–35811, doi:10.1021/acsami.8b14088.
- [108] Yadav L.R., Chandran S.V., Lavanya K., Selvamurugan N. "Chitosan-Based 3D-Printed Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *183*, 1925–1938, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.215.
- [109] Kara A., Distler T., Polley C., Schneidereit D., Seitz H., Friedrich O., Tihminlioglu F., Boccaccini A.R. "3D Printed Gelatin/Decellularized Bone Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Fabrication, Characterization and Cytocompatibility Study." *Mater. Today Bio* **2022**, *15*, 100309, doi:10.1016/j.mtbio.2022.100309.
- [110] Ding Z., Cheng W., Mia M.S., Lu Q. "Silk Biomaterials for Bone Tissue Engineering." *Macromol. Biosci.* **2021**, *21*, e2100153, doi:10.1002/mabi.202100153.
- [111] Iglesias-Mejuto A., García-González C.A. "3D-Printed Alginate-Hydroxyapatite Aerogel Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *131*, 112525, doi:10.1016/j.msec.2021.112525.
- [112] Zhai P., Peng X., Li B., Liu Y., Sun H., Li X. "The Application of Hyaluronic Acid in Bone Regeneration." *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 1224–1239, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169.
- [113] Jin S., Xia X., Huang J., Yuan C., Zuo Y., Li Y., Li J. "Recent Advances in PLGA-Based Biomaterials for Bone Tissue Regeneration." *Acta Biomater.* **2021**, *127*, 56–79, doi:10.1016/j.actbio.2021.03.067.

- [114] Li Y., Liu X., Gaihre B., Li L., Rezaei A., Miller A.L., Waletzki B., Park S., Terzic A., Lu L. "Zinc-Doped Hydroxyapatite and Poly(Propylene Fumarate) Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering." *J. Mater. Sci.* **2022**, *57*, 5998–6012, doi:10.1007/s10853-022-06966-7.
- [115] Petretta M., Gambardella A., Boi M., Berni M., Cavallo C., Marchiori G., Maltarello M.C., Bellucci D., Fini M., Baldini N., et al. "Composite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration Based on PCL and Mg-Containing Bioactive Glasses." *Biology (Basel)*. **2021**, *10*, doi:10.3390/biology10050398.
- [116] Szczepańczyk P., Szlachta M., Złocista-Szewczyk N., Chłopek J., Pielichowska K. "Recent Developments in Polyurethane-Based Materials for Bone Tissue Engineering." *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:10.3390/polym13060946.
- [117] Petretta M., Gambardella A., Desando G., Cavallo C., Bartolotti I., Shelyakova T., Goranov V., Brucalè M., Dediu V.A., Fini M., et al. "Multifunctional 3D-Printed Magnetic Polycaprolactone/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:10.3390/polym13213825.
- [118] Liu S., Chen J., Chen T., Zeng Y. "Fabrication of Trabecular-like Beta-Tricalcium Phosphate Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 13187–13198, doi:10.1016/j.ceramint.2021.01.184.
- [119] Polley C., Distler T., Scheufler C., Detsch R., Lund H., Springer A., Schneidereit D., Friedrich O., Boccaccini A.R., Seitz H. "3D Printing of Piezoelectric and Bioactive Barium Titanate-Bioactive Glass Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Mater. Today Bio* **2023**, *21*, 100719, doi:10.1016/j.mtbio.2023.100719.
- [120] Liu X., George M.N., Park S., Miller II A.L., Gaihre B., Li L., Waletzki B.E., Terzic A., Yaszemski M.J., Lu L. "3D-Printed Scaffolds with Carbon Nanotubes for Bone Tissue Engineering: Fast and Homogeneous One-Step Functionalization." *Acta Biomater.* **2020**, *111*, 129–140, doi:10.1016/j.actbio.2020.04.047.
- [121] Huang H.-Y., Fan F.-Y., Shen Y.-K., Wang C.-H., Huang Y.-T., Chern M.-J., Wang Y.-H., Wang L. "3D Poly-ε-Caprolactone/Graphene Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2020**, *606*, 125393, doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125393.
- [122] Raut H.K., Das R., Liu Z., Liu X., Ramakrishna S. "Biocompatibility of Biomaterials for Tissue Regeneration or Replacement." *Biotechnol. J.* **2020**, *15*, doi:10.1002/biot.202000160.
- [123] Xie C., Ye J., Liang R., Yao X., Wu X., Koh Y., Wei W., Zhang X., Ouyang H. "Advanced Strategies of Biomimetic Tissue-Engineered Grafts for Bone Regeneration." *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, doi:10.1002/adhm.202100408.
- [124] Davoodi E., Montazerian H., Mirhakimi A.S., Zhianmanesh M., Ibhádode O., Shahabadi S.I., Esmaeilizadeh R., Sarikhani E., Toorandaz S., Sarabi S.A., et al. "Additively Manufactured Metallic Biomaterials." *Bioact. Mater.* **2022**, *15*, 214–249, doi:10.1016/j.bioactmat.2021.12.027.
- [125] Golafshan N., Vorndran E., Zaharievski S., Brommer H., Kadumudi F.B., Dolatshahi-Pirouz A., Gbureck U., van Weeren R., Castilho M., Malda J. "Tough Magnesium Phosphate-Based 3D-Printed Implants Induce Bone Regeneration in an Equine Defect Model." *Biomaterials* **2020**, *261*, 120302, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120302.
- [126] Chandra G., Pandey A. "Biodegradable Bone Implants in Orthopedic Applications: A Review." *Biocybern. Biomed. Eng.* **2020**, *40*, 596–610, doi:10.1016/j.bbe.2020.02.003.
- [127] Hadjidakis D.J., Androulakis I.I. "Bone Remodeling." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1092*, 385–396, doi:10.1196/annals.1365.035.
- [128] Kokubo T., Matsushita T., Takadama H., Kizuki T. "Development of Bioactive Materials Based on Surface Chemistry." *J. Eur. Ceram. Soc.* **2009**, *29*, 1267–1274, doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.004.
- [129] Blokhuis T.J., Arts J.J.C. "Bioactive and Osteoinductive Bone Graft Substitutes: Definitions, Facts

- and Myths." *Injury* **2011**, 42, S26–S29, doi:10.1016/j.injury.2011.06.010.
- [130] García-Gareta E., Coathup M.J., Blunn G.W. "Osteoinduction of Bone Grafting Materials for Bone Repair and Regeneration." *Bone* **2015**, 81, 112–121, doi:10.1016/j.bone.2015.07.007.
- [131] International Organization for Standardization *ISO 23317 Implants for Surgery — In Vitro Evaluation for Apatite-Forming Ability of Implant Materials*; **2009**;
- [132] Lu Y., Cai W.-J., Ren Z., Han P. "The Role of Staphylococcal Biofilm on the Surface of Implants in Orthopedic Infection." *Microorganisms* **2022**, 10, doi:10.3390/microorganisms10101909.
- [133] Josse J., Velard F., Gangloff S.C. "Staphylococcus Aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis." *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, 5, 85, doi:10.3389/fcimb.2015.00085.
- [134] Meier E.L., Jang Y. "Surface Design Strategies of Polymeric Biomedical Implants for Antibacterial Properties." *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2023**, 26, doi:10.1016/j.cobme.2023.100448.
- [135] Ahmadabadi H.Y., Yu K., Kizhakkedathu J.N. "Surface Modification Approaches for Prevention of Implant Associated Infections." *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2020**, 193, 111116, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111116.
- [136] Jin X., Xiong Y.-H., Zhang X.-Y., Wang R., Xing Y., Duan S., Chen D., Tian W., Xu F.-J. "Self-Adaptive Antibacterial Porous Implants with Sustainable Responses for Infected Bone Defect Therapy." *Adv. Funct. Mater.* **2019**, 29, 1807915, doi:10.1002/adfm.201807915.
- [137] Ishihama H., Ishii K., Nagai S., Kakinuma H., Sasaki A., Yoshioka K., Kuramoto T., Shiono Y., Funao H., Isogai N., et al. "An Antibacterial Coated Polymer Prevents Biofilm Formation and Implant-Associated Infection." *Sci. Rep.* **2021**, 11, 3602, doi:10.1038/s41598-021-82992-w.
- [138] Tan R., Marzolini N., Jiang P., Jang Y. "Bio-Inspired Polymer Thin Films with Non-Close-Packed Nanopillars for Enhanced Bactericidal and Antireflective Properties." *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, 2, 5808–5816, doi:10.1021/acsapm.0c01054.
- [139] Costa F.M.T.A., Maia S.R., Gomes P.A.C., Martins M.C.L. "Dhvar5 Antimicrobial Peptide (AMP) Chemoselective Covalent Immobilization Results on Higher Antiadherence Effect than Simple Physical Adsorption." *Biomaterials* **2015**, 52, 531–538, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.049.
- [140] Kalirajan C., Dukle A., Nathanael A.J., Oh T.-H., Manivasagam G. "A Critical Review on Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications." *Polymers (Basel)*. **2021**, 13, doi:10.3390/polym13173015.
- [141] Terzopoulou Z., Zamboulis A., Koumentakou I., Michailidou G., Noordam M.J., Bikiaris D.N. "Biocompatible Synthetic Polymers for Tissue Engineering Purposes." *Biomacromolecules* **2022**, 23, 1841–1863, doi:10.1021/acs.biomac.2c00047.
- [142] Guo L., Liang Z., Yang L., Du W., Yu T., Tang H., Li C., Qiu H. "The Role of Natural Polymers in Bone Tissue Engineering." *J. Control. Release* **2021**, 338, 571–582, doi:10.1016/j.jconrel.2021.08.055.
- [143] Madni A., Kousar R., Naeem N., Wahid F. "Recent Advancements in Applications of Chitosan-Based Biomaterials for Skin Tissue Engineering." *J. Bioresour. Bioprod.* **2021**, 6, 11–25, doi:10.1016/j.jobab.2021.01.002.
- [144] Rahimi M., Mir S.M., Baghban R., Charmi G., Plummer C.M., Shafiei-Irannejad V., Soleymani J., Pietrasik J. "Chitosan-Based Biomaterials for the Treatment of Bone Disorders." *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, 215, 346–367, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.06.079.
- [145] Potivas T., Laokuldilok T. "Deacetylation of Chitin and the Properties of Chitosan Films with Various Deacetylation Degrees." *Chiang Mai Univ. J. Nat. Sci.* **2014**, 13, 559–567, doi:10.12982/cmujns.2014.0058.

- [146] Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. "Chitin Deacetylases: New, Versatile Tools in Biotechnology." *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 305–312, doi:10.1016/s0167-7799(00)01462-1.
- [147] Tan T.S., Chin H.Y., Tsai M.-L., Liu C.-L. "Structural Alterations, Pore Generation, and Deacetylation of α - and β -Chitin Submitted to Steam Explosion." *Carbohydr. Polym.* **2015**, 122, 321–328, doi:10.1016/j.carbpol.2015.01.016.
- [148] Sivashankari P.R., Prabakaran M. "Deacetylation Modification Techniques of Chitin and Chitosan." In *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*; Elsevier, **2017**; Vol. 1, pp. 117–133 ISBN 9780081002308.
- [149] Bharathi R., Ganesh S.S., Harini G., Vatsala K., Anushikaa R., Aravind S., Abinaya S., Selvamurugan N. "Chitosan-Based Scaffolds as Drug Delivery Systems in Bone Tissue Engineering." *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, 222, 132–153, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.058.
- [150] Stillger L., Müller D. "Peptide-Coating Combating Antimicrobial Contaminations: A Review of Covalent Immobilization Strategies for Industrial Applications." *J. Mater. Sci.* **2022**, 57, 10863–10885, doi:10.1007/s10853-022-07266-w.
- [151] Zhao X., Li Z., Liu W., Lam W., Sun P., Kao R.Y.T., Luk K.D.K., Lu W.W. "Octaarginine-Modified Chitosan as a Nonviral Gene Delivery Vector: Properties and in Vitro Transfection Efficiency." *J. Nanoparticle Res.* **2011**, 13, 693–702, doi:10.1007/s11051-010-0067-3.
- [152] Hansson A., Hashom N., Falson F., Rousselle P., Jordan O., Borchard G. "In Vitro Evaluation of an RGD-Functionalized Chitosan Derivative for Enhanced Cell Adhesion." *Carbohydr. Polym.* **2012**, 90, 1494–1500, doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.020.
- [153] Babu A., Amreddy N., Muralidharan R., Pathuri G., Gali H., Chen A., Zhao Y.D., Munshi A., Ramesh R. "Chemodrug Delivery Using Integrin-Targeted PLGA-Chitosan Nanoparticle for Lung Cancer Therapy." *Sci. Rep.* **2017**, 7, 14674, doi:10.1038/s41598-017-15012-5.
- [154] Malhotra M., Tomaro-Duchesneau C., Saha S., Kahouli I., Prakash S. "Development and Characterization of Chitosan-PEG-TAT Nanoparticles for the Intracellular Delivery of siRNA." *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 8, 2041–2052, doi:10.2147/IJN.S43683.
- [155] Wang C., Chen B., Zou M., Cheng G. "Cyclic RGD-Modified Chitosan/Graphene Oxide Polymers for Drug Delivery and Cellular Imaging." *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 122, 332–340, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.07.018.
- [156] Karakeçili A.G., Gümüşderelioglu M. "Physico-Chemical and Thermodynamic Aspects of Fibroblastic Attachment on RGDS-Modified Chitosan Membranes." *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, 61, 216–223, doi:10.1016/j.colsurfb.2007.08.009.
- [157] Yang Y., Liu X., Yu W., Zhou H., Li X., Ma X. "Homogeneous Synthesis of GRGDY Grafted Chitosan on Hydroxyl Groups by Photochemical Reaction for Improved Cell Adhesion." *Carbohydr. Polym.* **2010**, 80, 733–739, doi:10.1016/j.carbpol.2009.12.019.
- [158] Borah H.N., Boruah R.C., Sandhu J.S. "Microwave-Induced One-Pot Synthesis of N-Carboxyalkyl Maleimides and Phthalimides†." *J. Chem. Res.* **1998**, 272–273, doi:10.1039/a707961c.
- [159] Poad S.N.M., Hassan N.I., Hassan N.H. "Synthesis and Characterization of Acetic Acid and Ethanoic Acid (Based)-Maleimide." *AIP Conf. Proc.* **2016**, 1784, 30016, doi:10.1063/1.4966754.
- [160] Walker M.A. "A High Yielding Synthesis of N-Alkyl Maleimides Using a Novel Modification of the Mitsunobu Reaction." *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5352–5355, doi:10.1021/jo00121a070.
- [161] Pizarro G.D.C., Marambio O.G., Jeria-Orell M., Huerta M.R., Rivas B.L. "Poly(N-Phenylmaleimide-Co- β -Methyl Hydrogen Itaconate): Synthesis, Characterization, and Copper(II)-Ion-Binding Properties." *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, 95, 1361–1367, doi:10.1002/app.21359.
- [162] Xiao S.-J., Wieland M., Brunner S. "Surface Reactions of 4-Aminothiophenol with Heterobifunctional Crosslinkers Bearing Both Succinimidyl Ester and Maleimide for Biomolecular

- Immobilization." *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *290*, 172–183, doi:10.1016/j.jcis.2005.04.014.
- [163] Lavis L.D., Chao T.Y., Raines R.T. "Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging." *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 252–260, doi:10.1021/cb600132m.
- [164] Ravasco J.M.J.M., Faustino H., Trindade A., Gois P.M.P. "Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology." *Chem. – A Eur. J.* **2019**, *25*, 43–59, doi:10.1002/chem.201803174.
- [165] Richardson N.C., Kasamon Y.L., Chen H., de Claro R.A., Ye J., Blumenthal G.M., Farrell A.T., Pazdur R. "FDA Approval Summary: Brentuximab Vedotin in First-Line Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma." *Oncologist* **2019**, *24*, e180–e187, doi:10.1634/theoncologist.2019-0098.
- [166] Wedam S., Fashoyin-Aje L., Gao X., Bloomquist E., Tang S., Sridhara R., Goldberg K.B., King-Kallimanis B.L., Theoret M.R., Ibrahim A., et al. "FDA Approval Summary: Ado-Trastuzumab Emtansine for the Adjuvant Treatment of HER2-Positive Early Breast Cancer." *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 4180–4185, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3980.
- [167] Reddy P.Y., Kondo S., Toru T., Ueno Y. "Lewis Acid and Hexamethyldisilazane-Promoted Efficient Synthesis of N-Alkyl- and N-Arylimide Derivatives." *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2652–2654, doi:10.1021/jo962202c.
- [168] Song H.Y., Ngai M.H., Song Z.Y., MacAry P.A., Hobley J., Lear M.J. "Practical Synthesis of Maleimides and Coumarin-Linked Probes for Protein and Antibody Labelling via Reduction of Native Disulfides." *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400–3406, doi:10.1039/b904060a.
- [169] Rajinikanth B S., Rajkumar D.S.R., K K., Vijayaragavan V. "Chitosan-Based Biomaterial in Wound Healing: A Review." *Cureus* **2024**, *16*, e55193, doi:10.7759/cureus.55193.
- [170] Hamed H., Moradi S., Hudson S.M., Tonelli A.E. "Chitosan Based Hydrogels and Their Applications for Drug Delivery in Wound Dressings: A Review." *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 445–460, doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.114.
- [171] Neubrech F., Sauerbier M., Moll W., Seegmüller J., Heider S., Harhaus L., Bickert B., Kneser U., Kremer T. "Enhancing the Outcome of Traumatic Sensory Nerve Lesions of the Hand by Additional Use of a Chitosan Nerve Tube in Primary Nerve Repair: A Randomized Controlled Bicentric Trial." *Plast. Reconstr. Surg.* **2018**, *142*, 415–424, doi:10.1097/PRS.0000000000004574.
- [172] Zhao C., Qazvini N.T., Sadati M., Zeng Z., Huang S., De La Lastra A.L., Zhang L., Feng Y., Liu W., Huang B., et al. "A PH-Triggered, Self-Assembled, and Bioprintable Hybrid Hydrogel Scaffold for Mesenchymal Stem Cell Based Bone Tissue Engineering." *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 8749–8762, doi:10.1021/acsami.8b19094.
- [173] Abueva C.D.G., Padalhin A.R., Min Y.-K., Lee B.-T. "Preformed Chitosan Cryogel-Biphasic Calcium Phosphate: A Potential Injectable Biocomposite for Pathologic Fracture." *J. Biomater. Appl.* **2015**, *30*, 182–192, doi:10.1177/0885328215577892.
- [174] Eggermont L.J., Rogers Z.J., Colombani T., Memic A., Bencherif S.A. "Injectable Cryogels for Biomedical Applications." *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 418–431, doi:10.1016/j.tibtech.2019.09.008.
- [175] Lavanya K., Chandran S.V., Balagangadharan K., Selvamurugan N. "Temperature- and PH-Responsive Chitosan-Based Injectable Hydrogels for Bone Tissue Engineering." *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *111*, 110862, doi:10.1016/j.msec.2020.110862.
- [176] Li H., Ji Q., Chen X., Sun Y., Xu Q., Deng P., Hu F., Yang J. "Accelerated Bony Defect Healing Based on Chitosan Thermosensitive Hydrogel Scaffolds Embedded with Chitosan Nanoparticles for the Delivery of BMP2 Plasmid DNA." *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105*, 265–273, doi:10.1002/jbm.a.35900.
- [177] Lee S.S., Du X., Kim I., Ferguson S.J. "Scaffolds for Bone-Tissue Engineering." *Matter* **2022**, *5*, 2722–2759, doi:https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.003.

- [178] Amiryaghoubi N., Fathi M., Pesyan N.N., Samiei M., Barar J., Omidi Y. "Bioactive Polymeric Scaffolds for Osteogenic Repair and Bone Regenerative Medicine." *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 1833–1870, doi:10.1002/med.21672.
- [179] Martins T., Oliveira A.A.R., Oliveira A.C., Boaventura T.P., Barrioni B.R., Costa-Júnior E.S., Pereira M.M. "Novel 3D Composites with Highly Flexible Behavior Based on Chitosan and Bioactive Glass for Biomedical Applications." *Mater. Chem. Phys.* **2017**, *189*, 1–11, doi:10.1016/j.matchemphys.2016.12.012.
- [180] Jindal A., Mondal T., Bhattacharya J. "An in Vitro Evaluation of Zinc Silicate Fortified Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 4252–4262, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.018.
- [181] Tsai C.-H., Hung C.-H., Kuo C.-N., Chen C.-Y., Peng Y.-N., Shie M.-Y. "Improved Bioactivity of 3D Printed Porous Titanium Alloy Scaffold with Chitosan/Magnesium-Calcium Silicate Composite for Orthopaedic Applications." *Mater. (Basel, Switzerland)* **2019**, *12*, doi:10.3390/ma12020203.
- [182] Frohbergh M.E., Katsman A., Botta G.P., Lazarovici P., Schauer C.L., Wegst U.G.K., Lelkes P.I. "Electrospun Hydroxyapatite-Containing Chitosan Nanofibers Crosslinked with Genipin for Bone Tissue Engineering." *Biomaterials* **2012**, *33*, 9167–9178, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.009.
- [183] Bi Y., Lin Z., Deng S. "Fabrication and Characterization of Hydroxyapatite/Sodium Alginate/Chitosan Composite Microspheres for Drug Delivery and Bone Tissue Engineering." *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *100*, 576–583, doi:10.1016/j.msec.2019.03.040.
- [184] Paik B.A., Mane S.R., Jia X., Kiick K.L. "Responsive Hybrid (Poly)Peptide-Polymer Conjugates." *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 8274–8288, doi:10.1039/C7TB02199B.
- [185] Kulkarni N., Shinde S.D., Jadhav G.S., Adsare D.R., Rao K., Kachhia M., Maingle M., Patil S.P., Arya N., Sahu B. "Peptide-Chitosan Engineered Scaffolds for Biomedical Applications." *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 448–465, doi:10.1021/acs.bioconjchem.1c00014.
- [186] Nie X., Zhang J., Xu Q., Liu X., Li Y., Wu Y., Chen C. "Targeting Peptide IRGD-Conjugated Amphiphilic Chitosan-Co-PLA/DPPE Drug Delivery System for Enhanced Tumor Therapy." *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3232–3242, doi:10.1039/C3TB21744B.
- [187] Narayanan D., Anitha A., Jayakumar R., Chennazhi K.P. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Osteoporosis Therapeutic Peptide PTH 1–34 Loaded PEGylated Chitosan Nanoparticles." *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 4159–4167, doi:10.1021/mp400184v.
- [188] Lee C.-M., Jeong H.-J., Cheong S.-J., Kim E.-M., Kim D.W., Lim S.T., Sohn M.-H. "Prostate Cancer-Targeted Imaging Using Magnetofluorescent Polymeric Nanoparticles Functionalized with Bombesin." *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 712–721, doi:10.1007/s11095-010-0072-3.
- [189] Mohan T., Kleinschek K.S., Kargl R. "Polysaccharide Peptide Conjugates: Chemistry, Properties and Applications." *Carbohydr. Polym.* **2022**, *280*, 118875, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118875.
- [190] Nielsen O., Buchardt O. "Facile Synthesis of Reagents Containing a Terminal Maleimido Ligand Linked to an Active Ester." *Synthesis (Stuttg.)* **1991**, *1991*, 819–821, doi:10.1055/s-1991-26579.
- [191] Joseph M.H., Davies P. "Electrochemical Activity of O-Phthalaldehyde—Mercaptoethanol Derivatives of Amino Acids." *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1983**, *277*, 125–136, doi:10.1016/S0378-4347(00)84829-X.
- [192] Kaspar H., Dettmer K., Gronwald W., Oefner P.J. "Advances in Amino Acid Analysis." *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 445–452, doi:10.1007/s00216-008-2421-1.
- [193] Langrock T., Hoffmann R. "Analysis of Hydroxyproline in Collagen Hydrolysates." In *Methods in Molecular Biology*; Alterman, M.A., Hunziker, P., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, **2012**; Vol. 828, pp. 271–280 ISBN 9781617794445.
- [194] Panasiuk M., Chraniuk M., Bollin P., Sawicka J., Sylla A., Hovhannisyan L., Biernat M.,

- Rodziewicz-Motowidło S., Gromadzka B. "Versatile Biomaterial Additive: A Game-Changing Multifunctional Synthetic Peptide With Pro-Regenerative, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Properties." *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2025**, *113*, e35591, doi:10.1002/jbm.b.35591.
- [195] Sawicka J., Bollin P., Sylla A., Panasiuk M., Wilkowska M., Ciołek L., Leśniewski M., Konopka A., Struniawski K., Całka-Kuc G., et al. "Design and Characterization of Antibacterial Peptide Nanofibrils as Components of Composites for Biomaterial Applications." *Curr. Protein Pept. Sci.* **2025**, *26*, doi:10.2174/0113892037353453241219185311.
- [196] Prime R.B., Bair H.E., Vyazovkin S., Gallagher P.K., Riga A. "Thermogravimetric Analysis (TGA)." In *Thermal Analysis of Polymers*; Wiley, **2009**; pp. 241–317 ISBN 9780471769170.
- [197] International Organization for Standardization ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices —Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity **2009**.
- [198] Polski Komitet Normalizacyjny PN-EN ISO 10993-11 Biologiczna Ocena Wyrobów Medycznych – Część 11: Badania Toksyczności Ogólnoustrojowej **2018**.
- [199] Lecznicych U.R.P. *Farmakopea Polska VII*; **2006**; ISBN 9788388157462.
- [200] Polski Komitet Normalizacyjny PN-EN ISO 10993-6 Biologiczna Ocena Wyrobów Medycznych – Część 6: Badania Miejscowej Reakcji Po Implantacji **2015**.
- [201] Barone R., Pavaux C., Blin P., Cuq P. *Atlas d'anatomie Du Lapin: Atlas of Rabbit Anatomy*; Sandoz: Paris, **1973**;
- [202] Cuchiaro H., Laurens L.M.L. "Total Protein Analysis in Algae via Bulk Amino Acid Detection: Optimization of Amino Acid Derivatization after Hydrolysis with O-Phthalaldehyde 3-Mercaptopropionic Acid (OPA-3MPA)." *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5672–5679, doi:10.1021/acs.jafc.9b00884.
- [203] Jandera P. "Stationary and Mobile Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography: A Review." *Anal. Chim. Acta* **2011**, *692*, 1–25, doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047.
- [204] Socia A., Foley J.P. "Direct Determination of Amino Acids by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detection." *J. Chromatogr. A* **2016**, *1446*, 41–49, doi:10.1016/j.chroma.2016.03.042.
- [205] Chu P.M., Guenther F.R., Rhoderick G.C., Lafferty W.J. "The NIST Quantitative Infrared Database." *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **1999**, *104*, 59, doi:10.6028/jres.104.004.
- [206] Corazzari I., Nisticò R., Turci F., Faga M.G., Franzoso F., Tabasso S., Magnacca G. "Advanced Physico-Chemical Characterization of Chitosan by Means of TGA Coupled on-Line with FTIR and GCMS: Thermal Degradation and Water Adsorption Capacity." *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *112*, 1–9, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006.
- [207] Sawicka J., Iłowska E., Deptuła M., Sosnowski P., Sass P., Czerwec K., Chmielewska K., Szymańska A., Pietralik-Molińska Z., Kozak M., et al. "Functionalized Peptide Fibrils as a Scaffold for Active Substances in Wound Healing." *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22083818.
- [208] Iłowska E., Barciszewski J., Jaskólski M., Moliński A., Kozak M., Szymańska A. Identification of a Steric Zipper Motif in the Amyloidogenic Core of Human Cystatin C and Its Use for the Design of Self-Assembling Peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*.
- [209] Sionkowska A., Płancka A. "Preparation and Characterization of Silk Fibroin/Chitosan Composite Sponges for Tissue Engineering." *J. Mol. Liq.* **2013**, *178*, 5–14, doi:https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.10.042.
- [210] Qiu Z.-Y., Cui Y., Wang X.-M. "Natural Bone Tissue and Its Biomimetic." In *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes*; Wang, X.-M., Qiu, Z.-Y., Cui, H.B.T.-M.C.B.G.S., Eds.; Elsevier, **2019**; pp. 1–22 ISBN 9780081027172.

- [211] Oneda H., Shiihara M., Inouye K. "Inhibitory Effects of Green Tea Catechins on the Activity of Human Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin)." *J. Biochem.* **2003**, *133*, 571–576, doi:10.1093/jb/mvg073.
- [212] Mukasheva F., Adilova L., Dyussenbinov A., Yernaimanova B., Abilev M., Akilbekova D. "Optimizing Scaffold Pore Size for Tissue Engineering: Insights across Various Tissue Types." *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2024**, *12*, 1444986, doi:10.3389/fbioe.2024.1444986.
- [213] Brun P., Zamuner A., Cassari L., D'Auria G., Falcigno L., Franchi S., Contini G., Marsotto M., Battocchio C., Iucci G., et al. Chitosan Covalently Functionalized with Peptides Mapped on Vitronectin and BMP-2 for Bone Tissue Engineering. *Nanomaterials* **2021**, *11*.
- [214] Azadi S., Yazdanpanah M.A., Afshari A., Alahdad N., Chegeni S., Angaji A., Rezayat S.M., Tavakol S. "Bioinspired Synthetic Peptide-Based Biomaterials Regenerate Bone through Biomimicking of Extracellular Matrix." *J. Tissue Eng.* **2024**, *15*, 20417314241303816, doi:10.1177/20417314241303818.
- [215] Li R., Zhou C., Chen J., Luo H., Li R., Chen D., Zou X., Wang W. "Synergistic Osteogenic and Angiogenic Effects of KP and QK Peptides Incorporated with an Injectable and Self-Healing Hydrogel for Efficient Bone Regeneration." *Bioact. Mater.* **2022**, *18*, 267–283, doi:https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.011.
- [216] Sirma Tarım B., Tamburacı S., Uysal B., Top A. "Integration of Leu-Asp-Val Cell Attachment Motif into Self-Assembling Peptide Sequences for Nanofibrillar Hydrogel Formation in Wound Healing." *ACS Appl. Nano Mater.* **2025**, *8*, 5302–5314, doi:10.1021/acsnm.4c06408.
- [217] Reis L.A., Chiu L.L.Y., Liang Y., Hyunh K., Momen A., Radisic M. "A Peptide-Modified Chitosan–Collagen Hydrogel for Cardiac Cell Culture and Delivery." *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1022–1036, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.030.
- [218] Hao Z.-W., Zhang Z.-Y., Wang Z.-P., Wang Y., Chen J.-Y., Chen T.-H., Shi G., Li H.-K., Wang J.-W., Dong M.-C., et al. "Bioactive Peptides and Proteins for Tissue Repair: Microenvironment Modulation, Rational Delivery, and Clinical Potential." *Mil. Med. Res.* **2024**, *11*, 75, doi:10.1186/s40779-024-00576-x.
- [219] Bedford J., Hyde C., Johnson T., Jun W., Owen D., Quibell M., Sheppard R.C. "Amino Acid Structure and “Difficult Sequences” in Solid Phase Peptide Synthesis." *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 300–307, doi:10.1111/j.1399-3011.1992.tb00305.x.
- [220] Paradis-Bas M., Tulla-Puche J., Albericio F. "The Road to the Synthesis of “Difficult Peptides.”" *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 631–654, doi:10.1039/C5CS00680E.
- [221] Bacsa B., Horváti K., Bösze S., Andreae F., Kappe C.O. "Solid-Phase Synthesis of Difficult Peptide Sequences at Elevated Temperatures: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Technologies." *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7532–7542, doi:10.1021/JO8013897/SUPPL_FILE/JO8013897_SI_001.PDF.
- [222] Magtaan J.K., Devocelle M., Kelleher F. "Regeneration of Aged DMF for Use in Solid-Phase Peptide Synthesis." *J. Pept. Sci.* **2019**, *25*, e3139, doi:10.1002/PSC.3139;CTYPE:STRING:JOURNAL.
- [223] Stathopoulos P., Papas S., Pappas C., Mousis V., Sayyad N., Theodorou V., Tzakos A.G., Tsikaris V. "Side Reactions in the SPPS of Cys-Containing Peptides." *Amino Acids* **2013**, *44*, 1357–1363, doi:10.1007/S00726-013-1471-7/METRICS.
- [224] Oliva R., Chino M., Pane K., Pistorio V., De Santis A., Pizzo E., D'Errico G., Pavone V., Lombardi A., Del Vecchio P., et al. "Exploring the Role of Unnatural Amino Acids in Antimicrobial Peptides." *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8888, doi:10.1038/S41598-018-27231-5.
- [225] Pei J., Gao X., Pan D., Hua Y., He J., Liu Z., Dang Y. "Advances in the Stability Challenges of Bioactive Peptides and Improvement Strategies." *Curr. Res. Food Sci.* **2022**, *5*, 2162,

- doi:10.1016/J.CRFS.2022.10.031.
- [226] Lu J., Xu H., Xia J., Ma J., Xu J., Li Y., Feng J. "D- and Unnatural Amino Acid Substituted Antimicrobial Peptides With Improved Proteolytic Resistance and Their Proteolytic Degradation Characteristics." *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 563030, doi:10.3389/fmicb.2020.563030.
 - [227] Ding Y., Ting J.P., Liu J., Al-Azzam S., Pandya P., Afshar S. "Impact of Non-Proteinogenic Amino Acids in the Discovery and Development of Peptide Therapeutics." *Amino Acids* **2020**, *52*, 1207, doi:10.1007/S00726-020-02890-9.
 - [228] Sikora K., Jaśkiewicz M., Neubauer D., Migoń D., Kamysz W. "The Role of Counter-Ions in Peptides-An Overview." *Pharmaceuticals (Basel)*. **2020**, *13*, doi:10.3390/ph13120442.
 - [229] Zapadka K.L., Becher F.J., Gomes dos Santos A.L., Jackson S.E. "Factors Affecting the Physical Stability (Aggregation) of Peptide Therapeutics." *Interface Focus* **2017**, *7*, 20170030, doi:10.1098/RSFS.2017.0030.
 - [230] Haney E.F., Wu B. (Catherine), Lee K., Hilchie A.L., Hancock R.E.W. "Aggregation and Its Influence on the Immunomodulatory Activity of Synthetic Innate Defense Regulator Peptides." *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 969-980.e4, doi:10.1016/j.chembiol.2017.07.010.
 - [231] Kohler A., Jülke E.-M., Stichel J., Beck-Sickinger A.G. "Comparison of Protocols to Test Peptide Stability in Blood Plasma and Cell Culture Supernatants." *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2024**, *7*, 3618–3625, doi:10.1021/acsptsci.4c00503.
 - [232] Cavaco M., Andreu D., Castanho M.A.R.B. "The Challenge of Peptide Proteolytic Stability Studies: Scarce Data, Difficult Readability, and the Need for Harmonization." *Angew. Chemie Int. Ed.* **2021**, *60*, 1686–1688, doi:10.1002/anie.202006372.
 - [233] Teuffel P., Goebel-Stengel M., Hofmann T., Prinz P., Scharner S., Körner J.L., Grötzing C., Rose M., Klapp B.F., Stengel A. "A RAPID Method for Blood Processing to Increase the Yield of Plasma Peptide Levels in Human Blood." *J. Vis. Exp.* **2016**, *2016*, e53959, doi:10.3791/53959.
 - [234] Nick Pace C., Martin Scholtz J. "A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins." *Biophys. J.* **1998**, *75*, 422–427, doi:10.1016/S0006-3495(98)77529-0.
 - [235] Blaber M., Zhang X.J., Matthews B.W. "Structural Basis of Amino Acid Alpha Helix Propensity." *Science* **1993**, *260*, 1637–1640, doi:10.1126/science.8503008.
 - [236] Shi S.M., Di L. "Strategies to Optimize Peptide Stability and Prolong Half-Life." In *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*; Springer, Cham, **2022**; Vol. 47, pp. 163–182 ISBN 978-3-031-04544-8.
 - [237] D'Accolti M., Bellotti D., Dzień E., Leonetti C., Leveraro S., Albanese V., Marzola E., Guerrini R., Caselli E., Rowińska-Żyrek M., et al. "Impact of C- and N-Terminal Protection on the Stability, Metal Chelation and Antimicrobial Properties of Calcitermin." *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 18228, doi:10.1038/s41598-023-45437-0.
 - [238] Zhu W.-Q., Li K., Su S., Chen W., Liu Y., Qiu J. "Effects of Zinc Ions Released From Ti-NW-Zn Surface on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro and in an In Vivo Zebrafish Model." *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 848769, doi:10.3389/fbioe.2022.848769.
 - [239] He M., Liu C., Zhang X., Chen X., Olatunji O.J., Suttikhana I., Le T. Do, Ashaolu T.J. "Insights into the Physicochemical and Functional Characteristics of Biologically Active Food-Derived Peptides." *J. Funct. Foods* **2025**, *131*, 106964, doi:10.1016/J.JFF.2025.106964.
 - [240] Yang S., Wang M., Wang T., Sun M., Huang H., Shi X., Duan S., Wu Y., Zhu J., Liu F. "Self-Assembled Short Peptides: Recent Advances and Strategies for Potential Pharmaceutical Applications." *Mater. Today Bio* **2023**, *20*, 100644, doi:10.1016/J.MTBIO.2023.100644.
 - [241] Wolfram M., Tiwari M.K., Hassenkam T., Li M., Bjerrum M.J., Meldal M. "Cascade Autohydrolysis of Alzheimer's A β Peptides." *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 4986–4996,

doi:10.1039/D2SC06668H.

- [242] Cahill K.S., Chi J.H., Day A., Claus E.B. "Prevalence, Complications, and Hospital Charges Associated with Use of Bone-Morphogenetic Proteins in Spinal Fusion Procedures." *JAMA* **2009**, 302, 58–66, doi:10.1001/jama.2009.956.
- [243] Zhu F., Nie G., Liu C. "Engineered Biomaterials in Stem Cell-Based Regenerative Medicine." *Life Med.* **2023**, 2, lnad027, doi:10.1093/lifemedi/lnad027.
- [244] Furlan A.G., Spanou C.E.S., Godwin A.R.F., Wohl A.P., Zimmermann L.M.A., Imhof T., Koch M., Baldock C., Sengle G. "A New MMP-mediated Prodomain Cleavage Mechanism to Activate Bone Morphogenetic Proteins from the Extracellular Matrix." *FASEB J.* **2021**, 35, e21353, doi:10.1096/FJ.202001264R.
- [245] Knowles T.P.J., Mezzenga R. "Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials." *Adv. Mater.* **2016**, 28, 6546–6561, doi:10.1002/adma.201505961.
- [246] Reynolds N.P. "Amyloid-like Peptide Nanofibrils as Scaffolds for Tissue Engineering: Progress and Challenges (Review)." *Biointerphases* **2019**, 14, doi:10.1116/1.5098332/997528.
- [247] Sedighi M., Shrestha N., Mahmoudi Z., Khademi Z., Ghasempour A., Dehghan H., Talebi S.F., Toolabi M., Pr  at V., Chen B., et al. "Multifunctional Self-Assembled Peptide Hydrogels for Biomedical Applications." *Polym. 2023, Vol. 15, Page 1160* **2023**, 15, 1160, doi:10.3390/POLYM15051160.
- [248] Ishida A., Oshikawa M., Ajioka I., Muraoka T. "Sequence-Dependent Bioactivity and Self-Assembling Properties of RGD-Containing Amphiphilic Peptides as Extracellular Scaffolds." *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, 3, 3605–3611, doi:10.1021/acsabm.0c00240.
- [249] Aguilar M.I., Purcell A.W. "Peptides." In *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*; Elsevier, **2004**; pp. 29–36 ISBN 9780123693976.
- [250] Ji W., Yuan C., Chakraborty P., Gilead S., Yan X., Gazit E. "Stoichiometry-Controlled Secondary Structure Transition of Amyloid-Derived Supramolecular Dipeptide Co-Assemblies." *Commun. Chem.* **2019**, 2, 65, doi:10.1038/s42004-019-0170-z.
- [251] Mizuguchi C., Nakagawa M., Namba N., Sakai M., Kurimitsu N., Suzuki A., Fujita K., Horiuchi S., Baba T., Ohgita T., et al. "Mechanisms of Aggregation and Fibril Formation of the Amyloidogenic N-Terminal Fragment of Apolipoprotein A-I." *J. Biol. Chem.* **2019**, 294, 13515–13524, doi:10.1074/jbc.RA119.008000.
- [252] Honisch C., Torn   F., Hussain R., Ruzza P., Siligardi G. "Effect of Trehalose and Ceftriaxone on the Stability of Aggregating-Prone Tau Peptide Containing PHF6* Sequence: An SRCD Study." *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 2932, doi:10.3390/IJMS23062932/S1.
- [253] Ulamec S.M., Brockwell D.J., Radford S.E. "Looking Beyond the Core: The Role of Flanking Regions in the Aggregation of Amyloidogenic Peptides and Proteins." *Front. Neurosci.* **2020**, 14, 611285, doi:10.3389/FNINS.2020.611285/XML.
- [254] Hudson S.A., Ecroyd H., Kee T.W., Carver J.A. "The Thioflavin T Fluorescence Assay for Amyloid Fibril Detection Can Be Biased by the Presence of Exogenous Compounds." *FEBS J.* **2009**, 276, 5960–5972, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x.
- [255] Biancalana M., Koide S. "Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils." *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, 1804, 1405–1412, doi:10.1016/J.BBAPAP.2010.04.001.
- [256] John T., Martin L.L., Abel B., John [+] T., Abel B., Martin L.L. "Peptide Self-Assembly into Amyloid Fibrils at Hard and Soft Interfaces—From Corona Formation to Membrane Activity." *Macromol. Biosci.* **2023**, 23, 2200576, doi:10.1002/MABI.202200576.
- [257] Hoppenreijds L.J.G., Fitzner L., Ruhmlieb T., Heyn T.R., Schild K., van der Goot A.J., Boom R.M.,

- Steffen-Heins A., Schwarz K., Keppler J.K. "Engineering Amyloid and Amyloid-like Morphologies of β -Lactoglobulin." *Food Hydrocoll.* **2022**, 124, 107301, doi:10.1016/J.FOODHYD.2021.107301.
- [258] Gelain F., Luo Z., Rioult M., Zhang S. "Self-Assembling Peptide Scaffolds in the Clinic." *npj Regen. Med.* **2021**, 6, 9, doi:10.1038/s41536-020-00116-w.
- [259] Watson M.D., Lee J.C. "N-Terminal Acetylation Affects α -Synuclein Fibril Polymorphism." *Biochemistry* **2019**, 58, 3630–3633, doi:10.1021/acs.biochem.9b00629.
- [260] Tokuhara C.K., Santesso M.R., De Oliveira G.S.N., Ventura T.M.D.S., Doyama J.T., Zambuzzi W.F., Oliveira R.C. De "Updating the Role of Matrix Metalloproteinases in Mineralized Tissue and Related Diseases." *J. Appl. Oral Sci.* **2019**, 27, e20180596, doi:10.1590/1678-7757-2018-0596.
- [261] Han X., Alu A., Liu H., Shi Y., Wei X., Cai L., Wei Y. "Biomaterial-Assisted Biotherapy: A Brief Review of Biomaterials Used in Drug Delivery, Vaccine Development, Gene Therapy, and Stem Cell Therapy." *Bioact. Mater.* **2022**, 17, 29–48, doi:10.1016/J.BIOACTMAT.2022.01.011.
- [262] Sahandi Zangabad P., Abousalman Rezvani Z., Tong Z., Esser L., Vasani R.B., Voelcker N.H. "Recent Advances in Formulations for Long-Acting Delivery of Therapeutic Peptides." *ACS Appl. Bio Mater.* **2023**, 6, 3532–3554, doi:10.1021/ACSABM.3C00193,.
- [263] Xiao W., Jiang W., Chen Z., Huang Y., Mao J., Zheng W., Hu Y., Shi J. "Advance in Peptide-Based Drug Development: Delivery Platforms, Therapeutics and Vaccines." *Signal Transduct. Target. Ther.* **2025**, 10, 1–56, doi:10.1038/s41392-024-02107-5.
- [264] Li Y., Yang G., Gerstweiler L., Thang S.H., Zhao C. "Design of Stimuli-Responsive Peptides and Proteins." *Adv. Funct. Mater.* **2023**, 33, 2210387, doi:10.1002/adfm.202210387.
- [265] Park H.I., Turk B.E., Gerkema F.E., Cantley L.C., Sang Q.X.A. "Peptide Substrate Specificities and Protein Cleavage Sites of Human Endometase/Matrilysin-2/Matrix Metalloproteinase-26." *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35168–35175, doi:10.1074/JBC.M205071200.
- [266] Eckhard U., Huesgen P.F., Schilling O., Bellac C.L., Butler G.S., Cox J.H., Dufour A., Goebeler V., Kappelhoff R., auf dem Keller U., et al. "Active Site Specificity Profiling of the Matrix Metalloproteinase Family: Proteomic Identification of 4300 Cleavage Sites by Nine MMPs Explored with Structural and Synthetic Peptide Cleavage Analyses." *Matrix Biol.* **2016**, 49, 37–60, doi:10.1016/J.MATBIO.2015.09.003.
- [267] Bernkop-Schnürch A., Gugli D., Pinter Y. "Thiolated Chitosans: Development and in Vitro Evaluation of a Mucoadhesive, Permeation Enhancing Oral Drug Delivery System." *J. Control. Release* **2004**, 94, 177–186, doi:10.1016/J.JCONREL.2003.10.005.
- [268] Wang K., Liu N., Zhang P., Guo Y., Zhang Y., Zhao Z., Luan Y., Li S., Cai J., Cao J. "Synthetic Methods of Disulfide Bonds Applied in Drug Delivery Systems." *Curr. Org. Chem.* **2015**, 20, 1477–1489, doi:10.2174/1385272820666151207194002.
- [269] Sun Y., Liu H., Cheng L., Zhu S., Cai C., Yang T., Yang L., Ding P. "Thiol Michael Addition Reaction: A Facile Tool for Introducing Peptides into Polymer-based Gene Delivery Systems." *Polym. Int.* **2018**, 67, 25–31, doi:10.1002/pi.5490.
- [270] Leiro V., Parreira P., Freitas S.C., Martins M.C.L., Pêgo A.P. "Conjugation Chemistry Principles and Surface Functionalization of Nanomaterials." In *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*; Sarmiento, B., das Neves, J.B.T.-B.A. of F.N., Eds.; Elsevier, **2018**; pp. 35–66 ISBN 9780323508797.
- [271] Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., Gupta A. "A Validated ¹H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan." *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32, 1149–1158, doi:10.1016/S0731-7085(03)00155-9.
- [272] Guaresti O., García-Astrain C., Palomares T., Alonso-Varona A., Eceiza A., Gabilondo N. "Synthesis and Characterization of a Biocompatible Chitosan-Based Hydrogel Cross-Linked via 'Click' Chemistry for Controlled Drug Release." *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 102, 1–9,

doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.003.

- [273] Kasaai M.R. "Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review." *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1667–1676, doi:10.1021/jf803001m.
- [274] Bellich B., D'Agostino I., Semeraro S., Gamini A., Cesàro A. "'The Good, the Bad and the Ugly' of Chitosans." *Mar. Drugs* **2016**, *Vol. 14*, Page 99 **2016**, *14*, 99, doi:10.3390/MD14050099.
- [275] Rokhati N., Istirokhatun T., Hamada N., Aini, Apriyanti D.T. "Membrane Technology Application for Fractionation Process to Obtain High Quality Glucosamine." *Reaktor* **2020**, *20*, 103–108, doi:10.14710/REAKTOR.20.2.103-108.
- [276] Yan X., Evenocheck H.M. "Chitosan Analysis Using Acid Hydrolysis and HPLC/UV." *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 1774–1778, doi:10.1016/J.CARBPOL.2011.09.091.
- [277] Kemmer A., Heinze T. "Efficient Synthesis of S-Protected Thiolated Polysaccharide Xylan." *React. Funct. Polym.* **2022**, *181*, 105418, doi:10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2022.105418.
- [278] Jiao J., Hong Q., Zhang D., Wang M., Tang H., Yang J., Qu X., Yue B. "Influence of Porosity on Osteogenesis, Bone Growth and Osteointegration in Trabecular Tantalum Scaffolds Fabricated by Additive Manufacturing." *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1117954, doi:10.3389/FBIOE.2023.1117954/BIBTEX.
- [279] Zhou J., Xiong S., Liu M., Yang H., Wei P., Yi F., Ouyang M., Xi H., Long Z., Liu Y., et al. "Study on the Influence of Scaffold Morphology and Structure on Osteogenic Performance." *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1127162, doi:10.3389/FBIOE.2023.1127162/XML.
- [280] Guo Y., Xie K., Jiang W., Wang L., Li G., Zhao S., Wu W., Hao Y. "In Vitro and in Vivo Study of 3D-Printed Porous Tantalum Scaffolds for Repairing Bone Defects." *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 1123–1133, doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01094.
- [281] Drobota M., Ursache S., Aflori M. "Surface Functionalities of Polymers for Biomaterial Applications." *Polymers (Basel)*. **2022**, *14*, 2307, doi:10.3390/POLYM14122307.
- [282] Gazinska M., Krokos A., Otryl E., Grzymajlo M., Szustakiewicz K., Kobielarz M., Chyzy K., Kubis A., Karska N., Sawicka J., et al. *Biokompozyty Polimerowo-Ceramiczne o Właściwościach Przeciwbakteryjnych Do Wypełniania Ubytków Kostnych i Regeneracji Tkanki Kostnej Oraz Sposób Ich Otrzymywania*; (data zgłoszenia patentowego 18.11.2022), P.442877;
- [283] Gazinska M., Krokos A., Otryl E., Grzymajlo M., Szustakiewicz K., Kobielarz M., Chyzy K., Kubis A., Karska N., Sawicka J., et al. *Polymer-Ceramic Biocomposites with pro-Regenerative Properties for Filling Bone Defects and Regenerating Bone Tissue and Method of Obtaining Them*; (data zgłoszenia patentowego 18.11.2022): EP004454670A1;
- [284] Abbasi N., Hamlet S., Love R.M., Nguyen N.T. "Porous Scaffolds for Bone Regeneration." *J. Sci. Adv. Mater. Devices* **2020**, *5*, 1–9, doi:10.1016/J.JSAMD.2020.01.007.

SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

Załącznik 1 Warunki chromatograficzne	229
Załącznik 2 Procedury przeprowadzonych reakcji przyłączania kwasu 2–maleimidooctowego do chitozanu.....	230
Załącznik 3 Uwalnianie peptydów z kompozytów.....	236
Załącznik 4 Skład i oznaczenia kompozytów chitozanowo–bioszklanych modyfikowanych ZnO/SrO i peptydami ug4/ug46/ug51/ug52.....	240

Załącznik 1

Tabela 1z. Warunki chromatograficzne.

	Warunki chromatograficzne 1	Warunki chromatograficzne 2	Warunki chromatograficzne 3	Warunki chromatograficzne 4
Aparatura	RP–HPLC na systemie LC–20A (Shimadzu) z detektorem rozproszenia światła ELSD (ang. <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>) LTII (Shimadzu).	RP–HPLC – układ półpreparatywny złożony z dwóch pomp (K1001), detektora UV (K–2001) sprzężonego z kolektorem frakcji firmy Gilson,	RP–HPLC (Nexera X2, Shimadzu) złożony z: dwóch pomp (LC 30AD), detektora ELSD LTII oraz detektora SPD–M20A,	RP–HPLC (Nexera X2, Shimadzu) złożony z: dwóch pomp (LC 30AD), detektora ELSD LTII oraz detektora SPD–M20A,
Kolumna	Kromasil C8 (Nouryon) 5 μm , 100 Å, 4,6 mm $\times$ 250 mm. Przepływ fazy ruchomej wynosił 1,0 ml/min	Jupiter Proteo C8 (Phenomenex), 4 μm , 90 Å, 21,2 mm $\times$ 250 mm. Przepływ fazy ruchomej wynosił 5,0 ml/min.	Kinetex C8 (Phenomenex), 2,6 μm , 100 Å, 2,1 mm $\times$ 100 mm. Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,5 ml/min.	bioZen Glycan (Phenomenex) 2,6 μm , 100 Å, 2,1 mm $\times$ 150 mm. Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,25 ml/min.
Eluenty	Eluenty I: A = 0,1M kwas octowy, 0,1M octan amonu w wodzie; B = 65% acetonitryl w 0,1M kwasie octowym i 0,1M octanie amonu w wodzie (v:v). Eluenty II: A = 0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie, B = 0,1% kwas trifluorooctowy w 80% acetonitrylu w wodzie (v:v).	A = 0,1M kwas octowy, 0,1M octan amonu w wodzie; B = 65% acetonitryl w 0,1M kwasie octowym i 0,1M octanie amonu w wodzie (v:v).	A = 0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie (v:v); B = 80% acetonitryl w 0,1% kwasie trifluorooctowym w wodzie (v:v).	A = 0,5M mrówczan amonu, 0,5M kwas mrówkowy, 90% acetonitryl w wodzie (v:v); B: 0,5M mrówczan amonu, 0,5M kwas mrówkowy, 75% acetonitryl w wodzie.

Załącznik 2

Tabela 2z. Warunki przeprowadzonych procedur reakcji przyłączania kwasu 2-maleimidooctowego do chitozanu. Próbkę oznaczono według schematu: CH-m X.Y, gdzie: CH – chitozan, m – symbol wskazujący na fakt, że materiał został zmodyfikowany (przez przyłączenie kwasu 2-maleimidooctowego), X – numer procedury modyfikacji (określonej zestawem warunków reakcyjnych), Y – numer kolejnej syntezy wykonanej z użyciem danej procedury. Na przykład próbka oznaczona jako CH-m 2.2 odnosi się do drugiej syntezy wykonanej zgodnie z procedurą nr 2 modyfikacji chitozanu kwasem 2-maleimidooctowym.

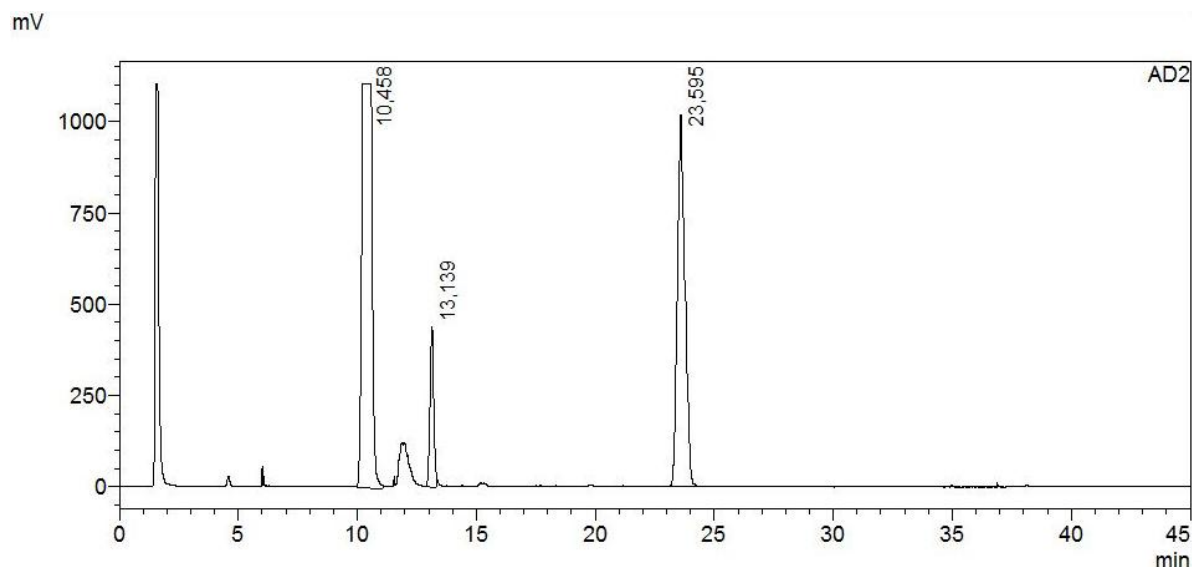
Nr procedury	Zakładany stopień modyfikacji CH	Stosunek molowy CH : Mal-Gly-OSu	Masa chitozanu	Masa Mal-Gly-OSu	Objętość mieszaniny reakcyjnej	Nazwa próbki	Wydajność reakcji sprzęgania
1.	~50%	1 : 0,5	100 mg	75,6 mg	5 ml	CH-m1	88,27%
2.	~25%	1 : 0,25	50 mg	19,2 mg	35 ml	CH-m2.1	78,14%
						CH-m 2.2	81,05%
						CH-m2.3	72,30%
						CH-m2.4	73,80%
3.	~15	1 : 0,15	500 mg	113 mg	150 ml	CH-m3.1	22,98%
						CH-m3.2	38,51%
						CH-m3.3	24,41%
4.	~10%	1 : 0,1	200 mg	30,8 mg	65 ml	CH-m4.1	76,66%
			500 mg	77 mg	160 ml	CH-m4.2	87,52%
			1 g	154 mg	315 ml	CH-m4.3	86,66%
			3,2 g	493 mg	1000 ml	CH-m4.4	89,36%
			2,59 g	400	810 ml	CH-m4.5	83,61%
			1,2 g	185	375 ml	CH-m4.6	79,43%
			1 g	154	315 ml	CH-m4.7	84,06%
5.	~5%	1 : 0,05	200 mg	15,4 mg	60 ml,	CH-m5.1	83,57%
			1 g	77 mg	300 ml	CH-m5.2	84,96%

Procedura nr 1 – zakładana modyfikacja 50%

W pierwszym eksperymencie zastosowałam stosunek molowy chitozan : Mal-Gly-OSu równy 1:0,5. Reakcję przeprowadziłam w niewielkiej ilości wody, co spowodowało żelowanie roztworu chitozanu. Po zakończeniu reakcji produkt odsączyłam, przemyłam wodą i poddałam liofilizacji.

Próbkę poddałam hydrolizie, a następnie przeprowadziłam ilościową analizę glicyny za pomocą kolumny HILIC (Rysunek 1z) (procedura opisana w Rozdziale 8.2). Zmodyfikowałam niewielką ilość chitozan pierwszą procedurą w jednej syntezie, otrzymując maleimidoaminokwas CH-m1 (Tabela 3z). Otrzymany wynik wskazał na ponad 100% stopień modyfikacji, co sugerowało nierównomierne przyłączenie kwasu 2-maleimidooctowego do chitozanu. Najprawdopodobniej było to wynikiem zbyt małej

ilości rozpuszczalnika i silnie lepkiego, żelowego układu reakcyjnego (Tabela 2z Warunki przeprowadzonych procedur reakcji przyłączania kwasu 2-maleimidooctowego do chitozanu).



Rysunek 1z. Chromatogram CH-m1 (Tabela 14, nr.1) po hydrolizie (CH: $t_r=10,458$ / Nle: $t_r=13,139$ / Gly: $t_r=23,595$).

Tabela 3z. Stopień modyfikacji dla CH-m1.

Nazwa próbki	Obliczony stopień modyfikacji (procedura rozdział 8.2)
CH-m1	126,7%

Procedura nr 2 – zakładana modyfikacja 25%

W kolejnym eksperymencie, zgodnie z procedurą nr 2 przedstawioną w Tabeli 2z, przeprowadziłam modyfikację chitozanu, wykorzystując stosunek molowy chitozan : ester kwasu 2-maleimidooctowego wynoszący 1:0,25, co odpowiadało zakładanemu stopniowi modyfikacji polimeru na poziomie 25% Mal-Gly. W celu poprawy jednorodności reakcji zwiększyłam siedmiokrotnie objętość rozpuszczalnika przypadającą na 1 gram chitozanu w porównaniu z procedurą nr 1, aby zapewnić bardziej równomierne warunki sprzęgania. Dodatkowo, w celu zbadania wpływu techniki mieszania na efektywność reakcji, zastosowałam dwa podejścia: pierwsze – z użyciem mieszadła magnetycznego (CH-m2.1

i CH–m2.2) oraz drugie – z wykorzystaniem sonikacji (CH–m2.3 i CH–m2.4). Po zakończeniu reakcji produkty odsączyłam, przemyłam wodą i poddałam liofilizacji.

Próbki CH–m2.1–CH–m2.4 poddałam analizie ilościowej zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.8.3.1. Niestety, uzyskane wyniki wykazywały istotną zmienność pomiędzy próbkami. Nie stwierdziłam znaczących różnic w stopniu modyfikacji w zależności od zastosowanej techniki mieszania, dlatego w kolejnych procedurach zdecydowałam się na wykorzystanie wyłącznie mieszadeł magnetycznych.

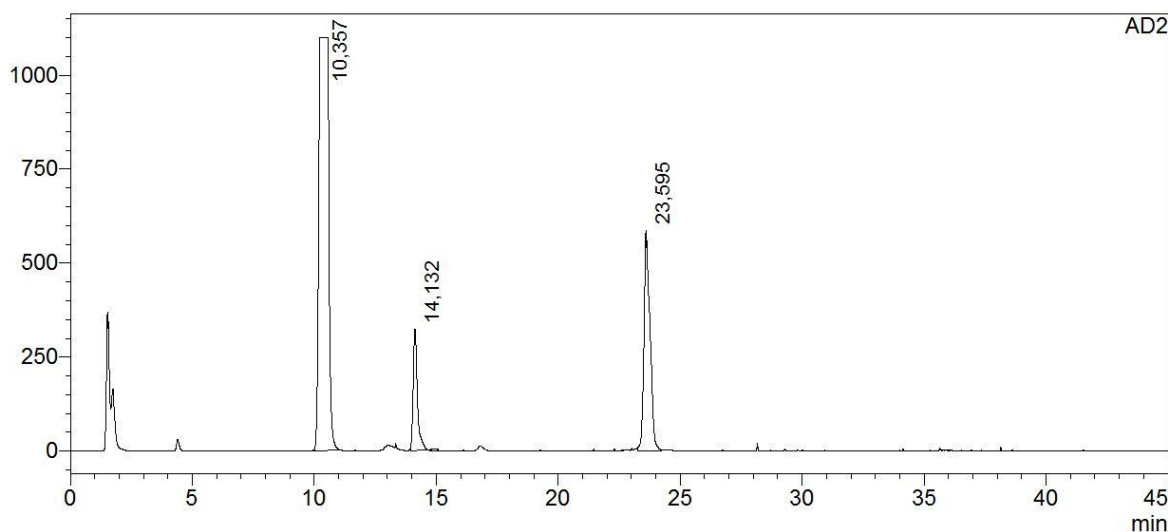
Uzyskane wartości stopnia modyfikacji chitozanu (48–62%) były znacznie wyższe niż zakładane 25% (Tabela 4z). Prawdopodobnym powodem zawyżonych wyników było niedostateczne odmywanie produktu wodą – użyto jedynie 200 ml, co mogło być niewystarczające do usunięcia wolnego, nieprzereagowanego estru z próbki. Możliwa jest również fizyczna adsorpcja cząsteczek Mal–Gly na powierzchni chitozanu, a nie ich kowalencyjne przyłączenie, szczególnie w warunkach żelowych.

Dodatkowo, niedostateczne wymieszanie w trakcie reakcji oraz ograniczona skuteczność mieszania, szczególnie w przypadku lepkich, gęstych roztworów, mogły skutkować niejednorodnym dostępem reagentów do grup aminowych chitozanu, prowadząc do lokalnie nadmiernej modyfikacji. Na Rysunku 2z przedstawiłam chromatogram jednej z próbek CH–Mal–Gly (CH–m2.2) po hydrolizie.

Tabela 4z. Średni stopień modyfikacji dla CH–m2.1 – CH–m2.4.

Nazwa próbki	Obliczony stopień modyfikacji [%]	Średni stopień modyfikacji [%] (średnia z czterech oznaczonych próbek)
CH–m2.1	52,80	54,11 ± 5,05
CH–m2.2	62,09	
CH–m2.3	48,11	
CH–m2.4	53,44	

mV



Rysunek 2z. Chromatogram próbki CH–m2.2 (Tabela 2z, nr.2) po hydrolizie (CH: t_r =10,357 min/ Nle: t_r =14,132 min/ Gly: t_r =23,595 min).

Procedura nr 3 – zakładana modyfikacja 15%

Podjęłam kolejną próbę modyfikacji chitozanu, zgodnie z procedurą nr 3 przedstawioną w Tabeli 2z, zakładając modyfikację polimeru na poziomie 15%. W tym celu przeprowadziłam trzy równoległe eksperymenty (CH–m3.1, CH–m3.2, CH–m3.3). Po zakończeniu reakcji każdy z produktów (CH–Mal–Gly) odmyłam dużą ilością bardzo zimnej wody dejonizowanej (około 1 l na 0,5 g chitozanu użytego do reakcji).

W dotychczasowych doświadczeniach do odsączania produktów stosowałam lejki Schotta. Zaobserwowałam, że podczas długiego przemywania część produktu przedostaje się przez sącdek, co znacząco wpłynęło na końcową wydajność reakcji, wynoszącą w tym przypadku jedynie 20–40%.

Wyniki przedstawione w Tabeli 5z pokazały, że stopień modyfikacji polimeru mieścił się w szerokim przedziale – od około 6% do 25%, w zależności od próby. Zakładany poziom modyfikacji (ok. 15%) udało mi się osiągnąć jedynie w przypadku próbki CH–m3.2 (14,56%). Niestety, próbki CH–m3.1 i CH–m3.3 charakteryzowały się odpowiednio niższym i wyższym stopniem modyfikacji w stosunku do założeń.

Dodatkowo zauważyłam, że próbki pobrane do analizy z jednej reakcji (np. CH–m3.3) wykazywały znaczną rozbieżność w wynikach – od 19% do 36%. Tego rodzaju zmienność mogła być spowodowana stratą produktu podczas intensywnego płukania – przenikanie materiału przez sącdek lejka Schotta prowadziło do częściowej utraty próbki,

co mogło skutkować jej niejednorodnością i w efekcie wpływać na wynik oznaczenia stopnia modyfikacji.

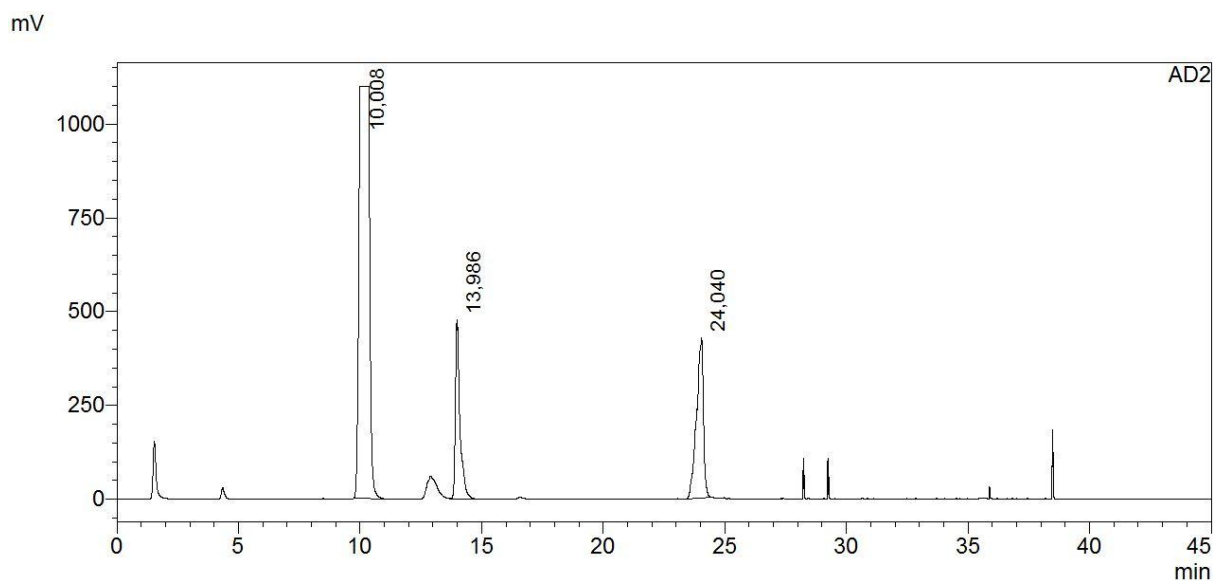
Ponadto, nieregularności w strukturze samego chitozanu, takie jak zmienny stopień deacetylacji lub zróżnicowana długość łańcuchów polimerowych, mogły prowadzić do różnej dostępności grup aminowych, a tym samym wpływać na efektywność reakcji sprzęgania.

Uzyskane wyniki wskazują, że przy zastosowanym stosunku molowym CH : Mal–Gly–OSu równym 1:0,15, modyfikacja chitozanu nadal zachodziła w sposób nierównomierny (Tabela 5z).

Na Rysunku 3z przedstawiłam chromatogram jednej z próbek CH–Mal–Gly (CH–m3.2) po hydrolizie.

Tabela 5z. Średni stopień modyfikacji CH–m3.1 – CH–m3.3

Nazwa próbki	Obliczony stopień modyfikacji [%]	Średni stopień modyfikacji [%] (średnia z trzech oznaczonych próbek)
CH–m3.1	7,22	6,17 ± 0,77
	5,86	
	5,42	
CH–m3.2	20,38	14,56 ± 4,13
	12,08	
	11,21	
CH–m3.3	36,61	25,53 ± 7,85
	20,60	
	19,40	



Rysunek 3z. Chromatogram próbki CH-m3.2 (Tabela 2z, nr.3) po hydrolizie (CH: t_r =10,008 / Nle: t_r =13,986 / Gly: t_r =24,040).

Procedura nr 5 – zakładana modyfikacja 5%

Podjęłam kolejną próbę modyfikacji chitozanu, tym razem zgodnie z procedurą nr 5 przedstawioną w Tabeli 2z, zakładającą modyfikację na poziomie 5%. Do reakcji zastosowałam mieszadła magnetyczne, odpowiednią ilość roztworu oraz dużą objętość wody do odmywania produktu – analogicznie jak w procedurze 4.

Pomimo zachowania zoptymalizowanych warunków, uzyskane wyniki dotyczące stopnia modyfikacji były niewiarygodne i obarczone dużą niepewnością. Głównym problemem okazała się zbyt niska czułość aparatury HPLC, która uniemożliwiała jednoznaczne wykrycie niewielkiej ilości glicyny obecnej w próbkach. W większości analiz sygnał glicyny znajdował się na granicy szumu tła, co uniemożliwiło dokładne oszacowanie stopnia modyfikacji.

Na podstawie tych obserwacji uznałam, że przy tak niskim założonym poziomie modyfikacji (5%) metoda analizy ilościowej glicyny z zastosowaniem HILIC nie jest wystarczająco czuła i nie pozwala na wiarygodną ocenę efektywności reakcji.

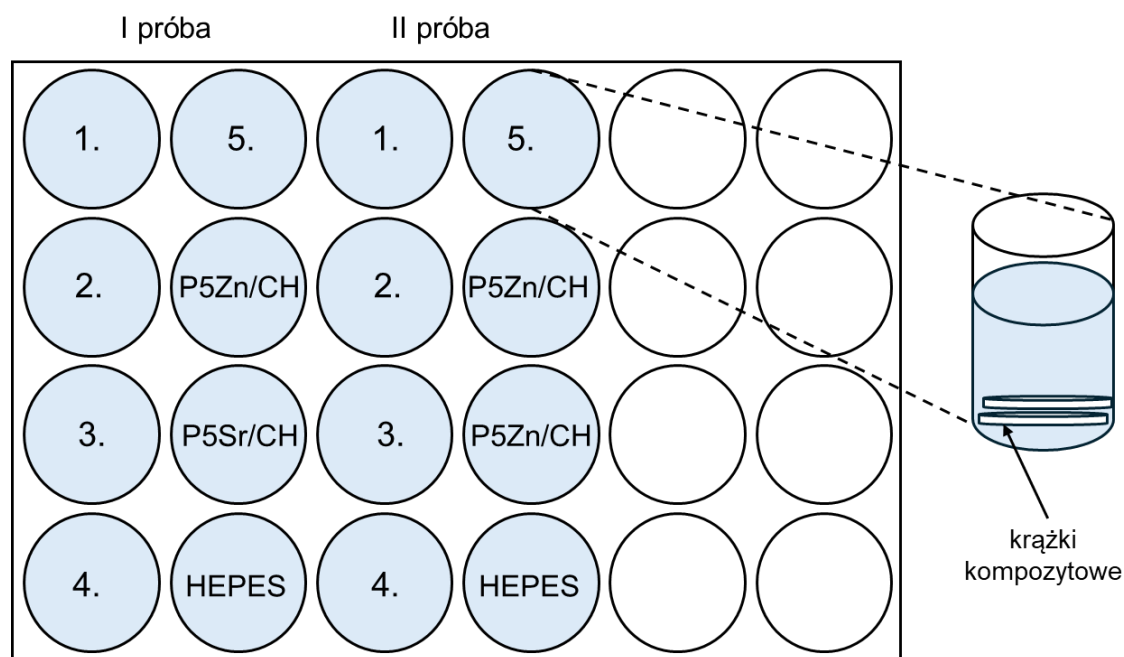
Załącznik 3

Uwalnianie peptydu ug4 z kompozytów

Uwalnianie peptydu ug4 z kompozytu 1–5

Badania kinetyki uwalniania peptydu **ug4** z kompozytów 1–5, w których peptyd był kowalencyjnie przyłączony do chitozanu, przeprowadziłam, umieszczając krążki kompozytowe w płytce 24–dołkowej (zgodnie z układem przedstawionym na Rysunku 4z). Płytkę inkubowałam w termobloku w temperaturze 37°C z zastosowaniem ciągłego mieszania (300 rpm), w obecności 1 ml buforu HEPES oraz 1 µl enzymu MMP–7. Inkubację prowadziłam przy ciągłym wytrząsaniu.

Jako kontrolę zastosowałam krążki kompozytowe zawierające wyłącznie chitozan i bioszkło, a także sam bufor HEPES bez kompozytu. Próbki do analizy HPLC pobierałam w kolejnych punktach czasowych: 0 min, 30 min, 1h, 1h 30 min, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h, 24h, 48h.



Rysunek 4z. Schemat rozmieszczenia krążków kompozytowych w płytce 24–dołkowej użytej w eksperymencie uwalniania peptydu. Numery w dołkach oznaczają identyfikatory kompozytów.

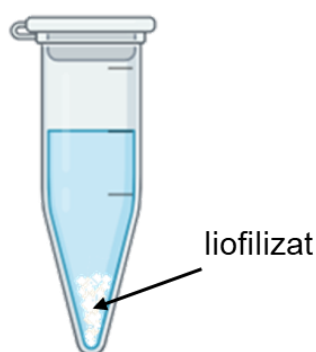
W każdym punkcie czasowym pobierałam po 65 µl roztworu próbki, a następnie uzupełniałam ubytek, dodając równoważną objętość (65 µl) wody dejonizowanej.

Eksperyment przeprowadziłam w dwóch powtórzeniach obejmujących przedział czasowy 0–48 h.

Uwalnianie peptydu ug4 z koniugatu chitozanowego CH–CH–m4.4–s4

Eksperymenty dotyczące uwalniania peptydu **ug4** z liofilizatu, w którym peptyd był kowalencyjnie sprzężony z chitozanem, przeprowadziłam w wodzie dejonizowanej, w obecności 4 µl enzymu MMP–7. Eksperyment prowadziłam w probówkach typu Eppendorf (zgodnie z układem przedstawionym na Rysunku 5z), w termobloku utrzymującym temperaturę 37°C, przy ciągłym wytrząsaniu (300 rpm).

W określonych punktach czasowych pobierałam po 65 µl roztworu, a następnie uzupełniałam ubytek, dodając taką samą objętość wody dejonizowanej. Eksperyment przeprowadziłam w jednym powtórzeniu obejmującym okres do 2 miesięcy. Próbki analizowałam za pomocą HPLC. Masa zastosowanego liofilizatu wynosiła 31,63 mg.



Rysunek 5z. Schemat eksperymentu uwalniania peptydu z koniugatu chitozanowego CH–CH–m4.4–s4.

Uwalnianie peptydu ug51 z kompozytów 6 i 7

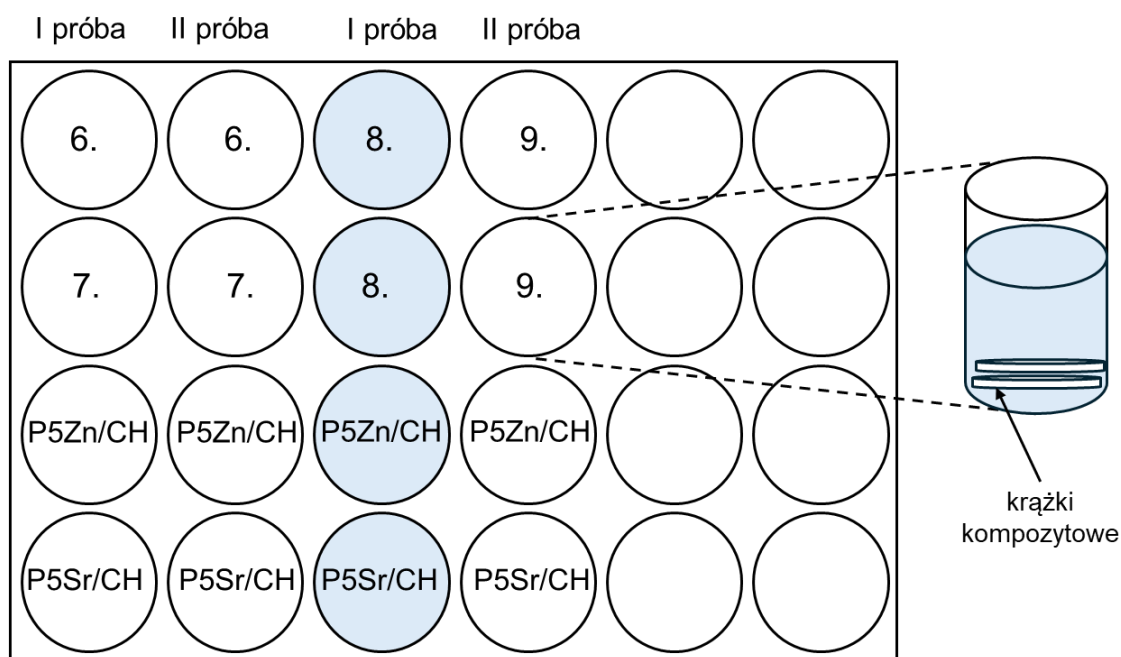
Badania kinetyki uwalniania peptydu **ug51** z kompozytów 6 i 7 wykonałam na płytce 24 dołkowej w temperaturze 37°C, przy ciągłym wytrząsaniu (300 rpm), zgodnie z Rysunkiem 6z. Krążki umieściłam w dołkach 24–dołkowej płytki, a następnie dodałam 1 ml wody dejonizowanej.

W każdym punkcie czasowym pobierałam po 65 µl roztworu próbki, a następnie uzupełniałam pobraną objętość 65 µl wody dejonizowanej. W eksperymencie użyłam jako kontroli krążków bioszkló/chitozan. Eksperyment przeprowadziłam w dwóch niezależnych powtórzeniach, w przedziale czasowym 0–48h. Próbki do analizy HPLC pobierałam w



THE UNIVERSITY OF CHICAGO

[illegible]

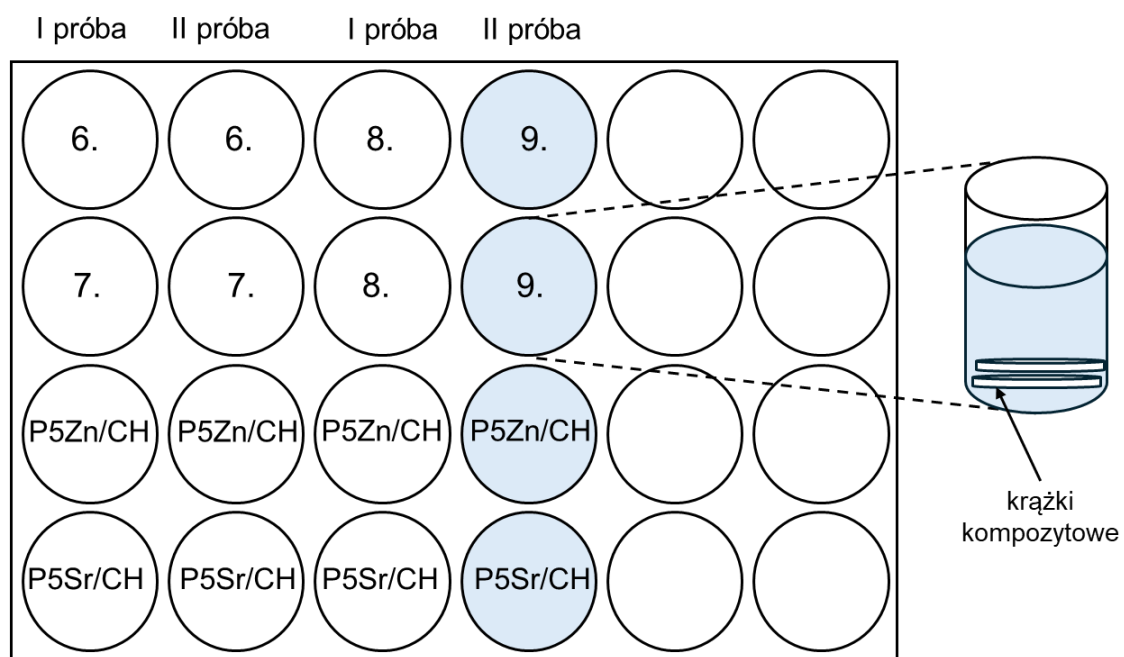


Rysunek 7z.. Schemat eksperymentu uwalniania peptydu z krążków kompozytowych 8.

Uwalnianie peptydu ug52 kompozytów 9

Badania kinetyki uwalniania peptydu **ug52** z kompozytu 9 wykonałam na płytce 24 dołkowej w temperaturze 37°C przy ciągłym wytrząsaniu (300 rpm), zgodnie z Rysunkiem 8z. Krążki umieściłam we wialach 24–dołkowej płytki do hodowli komórkowej, a następnie dodałam 1ml wody dejonizowanej i 2 µl enzymu MMP–7.

W każdym punkcie czasowym pobierałam po 65 ul roztworu próbki, a następnie uzupełniałam pobraną objętość 65 µl wody dejonizowanej. Eksperyment przeprowadziłam w dwóch niezależnych powtórzeniach, w przedziale czasowym 0–24h. Próbki do analizy HPLC pobierałam w kolejnych punktach czasowych : 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 1h 15 min 1h 30 min, 1h 45 min, 2h, 2h 15 min, 2h 30 min, 2h 45 min, 3h, 3h 30 min, 4h, 4h 30 min, 5h, 6h, 12h, 24h. Do jednego powtórzenia eksperymentu używałam 2 krążków. Do jednego powtórzenia eksperymentu używałam 2 krążków.



Rysunek 8z. Schemat eksperymentu uwalniania peptydu z krążków kompozytowych 9.

Załącznik 4

Tabela 6z. Skład i oznaczenia kompozytów chitozanowo-bioszklanych modyfikowanych ZnO/SrO i peptydami ug4/ug46/ug51/ug52.

Numer	Nazwa kompozytu	Opis składu kompozytu
1.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_0,8%	bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 0,8% wagowych do chitozanu
2.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_1,6%	bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu
3.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu
4.	P5Sr/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%	bioszkło P5 domieszkowane SrO + chitozan + CH-m4.4-ug4, peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 1,6% wagowych do chitozanu
5.	P5Zn/CH-CH-m4.4-ug4_3,4%_ug46	bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + CH-m4.4-ug4 + peptyd ug46 , peptyd ug4 przyłączony kowalencyjnie w ilości 3,4% wagowych do chitozanu, ug46 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 29 µg peptydu na 1 krążek
6.	P5Zn/CH-ug51	bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10µg peptydu na 1 krążek
7.	P5Sr/CH-ug51	bioszkło P5 domieszkowane SrO + chitozan + peptyd ug51 zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 10µg peptydu na 1 krążek
8.	P5Sr/CH-ug52	bioszkło P5 domieszkowane SrO + chitozan + peptyd ug52 (лиофилизат) zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100µg peptydu na 1 krążek
9.	P5Zn/CH-ug52(fibr)	bioszkło P5 domieszkowane ZnO + chitozan + peptyd ug52 w formie fibryli peptydowych zaadsorbowany na kompozycie w stężeniu 100 µg na 1 krążek