POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA – INŻYNIERIA CHEMICZNA/ DZIEDZINA NAUK – NAUKI INŻYNIERYJNO-TECHNICZNE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Iwona Łopianiak

Otrzymywanie i ocena właściwości warstwowych, włóknistych protez naczyń krwionośnych wytwarzanych w procesie rozdmuchu roztworu polimeru

Promotorzy

prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach dr hab. inż. Beata Butruk-Raszeja

WARSZAWA 2025

Składam serdeczne podziękowania

Promotorom

za zapewnienie warunków do rozwoju naukowego, życzliwość oraz nieocenione wsparcie i zaangażowanie, które towarzyszyły mi na każdym etapie pracy badawczej i przygotowywania rozprawy.

Współpracownikom z Zakładu Biotechnologii i Inżynierii Bioprocesowej za przyjazną atmosferę pracy oraz gotowość do dzielenia się wiedzą i doświadczeniem.

Streszczenie

Otrzymywanie i ocena właściwości warstwowych, włóknistych protez naczyń krwionośnych wytwarzanych w procesie rozdmuchu roztworu polimeru

Chirurgiczne leczenie niedrożności naczyń krwionośnych małej średnicy (<6 mm) z wykorzystaniem protez naczyniowych stanowi istotne wyzwanie w praktyce klinicznej. Dostępne rozwiązania rzadko zapewniają długotrwałą drożność w naczyniach o małym przekroju. Nowoczesne podejście łączące narzędzia inżynierii chemicznej, inżynierii produktu i inżynierii tkankowej oferuje alternatywę dla klasycznych syntetycznych protez, umożliwiając tworzenie biofunkcjonalnych implantów wspierających odbudowę naczyń krwionośnych.

Celem opisanych prac badawczych było **opracowanie protezy naczyniowej o strukturze warstwowej, włóknistej i właściwościach mechanicznych zbliżonych do właściwości naczyń krwionośnych**. W założeniu, struktura protezy miała sprzyjać adhezji i proliferacji komórek zasiedlających naczynia krwionośne oraz minimalizować proces adhezji płytek krwi. Materiały wytwarzano z poliuretanów klasy medycznej w procesie rozdmuchu roztworu polimeru. Przeprowadzono szczegółową analizę wpływu parametrów procesu rozdmuchu roztworu polimeru, właściwości polimerów oraz roztworów polimerów na morfologię i właściwości mechaniczne włóknin, co umożliwiło kontrolowane wytwarzanie materiałów o pożądanych właściwościach. Oceniono również wpływ struktury materiałów na zachowanie wybranych komórek budujących ściany naczyń krwionośnych. Przeprowadzone badania z krwią pozwoliły oszacować poziom adhezji płytek krwi oraz potencjał hemolityczny powierzchni.

Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano i wytworzono wielowarstwową protezę naczyniową o właściwościach sprzyjających odbudowie struktury i funkcji naczynia krwionośnego. Wykazano, że opracowane warstwowe protezy naczyniowe spełniają podstawowe kryteria strukturalne i mechaniczne stawiane rusztowaniom wykorzystywanym do regeneracji naczyń krwionośnych. Ponadto, stanowią odpowiednie rusztowanie do rozwoju wybranych typów komórek budujących naczynie krwionośne, a w kontakcie z krwią wykazują akceptowalny poziom adhezji płytek krwi Otrzymane wyniki wskazują na wysoki potencjał aplikacyjny opracowanych implantów.

Słowa kluczowe: rozdmuch roztworu polimeru, rusztowania komórkowe, poliuretany, protezy naczyń krwionośnych małych średnic, inżynieria tkankowa

Abstract

Fabrication and characterization of multilayered fibrous vascular grafts produced using solution blow spinning process

Surgical treatment of small-diameter blood vessel (<6 mm) occlusions using vascular prostheses remains a significant challenge in clinical practice. Existing solutions rarely ensure long-term patency in vessels with small lumen diameters. A modern approach combining tools from chemical engineering, product engineering, and tissue engineering offers an alternative to conventional synthetic grafts by enabling the development of biofunctional implants that support vascular regeneration.

The aim of the present research was to **develop a layered**, **fibrous vascular graft with mechanical properties similar to those of native blood vessels**. The structure of the graft was designed to promote the adhesion and proliferation of vascular wall cells while minimizing platelet adhesion. The materials were fabricated from medical-grade polyurethanes using the solution blow spinning (SBS) technique. A detailed analysis of the influence of SBS process parameters, polymer properties, and solution characteristics on the morphology and mechanical properties of the fibrous materials was conducted, allowing for the controlled production of scaffolds with targeted properties. The effect of scaffold structure on the behavior of selected vascular cell types was also assessed. Blood-contact studies were carried out to evaluate platelet adhesion and the hemolytic potential of the surfaces.

Based on the obtained results, a multilayered vascular graft was designed and fabricated, exhibiting structural and functional properties favorable for the restoration of vascular tissue. The layered grafts developed in this study meet key structural and mechanical criteria required for scaffolds used in vascular tissue engineering. Furthermore, they provide a suitable environment for the growth of specific vascular cell types and demonstrate an acceptable level of platelet adhesion upon blood contact. The results indicate high application potential of the proposed implants.

Key words: solution blow spinning, scaffolds, polyurethanes, small-diameter vascular grafts, tissue engineering

Praca powstała w wyniku realizacji projektów:



BioGraft – Biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, LIDER VIII, nr projektu: LIDER/18/0104/L-8/16/NCBR/2017 Wykonawca: Politechnika Warszawka

Kierownik projektu: dr hab. inż. Beata Butruk-Raszeja



Rusztowania do kierowanej regeneracji tkanki nerwowej i mięśniowej (GuideTiReg)

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, VI polsko-tajwański konkurs na wspólne projekty bilateralne, nr projektu: PL-TW/VI/4/2019

Partnerzy projektu: Politechnika Warszawska, National Taiwan University of Science and Technology

Kierownik projektu: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach



Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechnika Warszawska

Hemozgodność struktur nano/mikrowłóknistych

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej, Grant Dziekański 2021

Kierownik projektu: mgr inż. Iwona Łopianiak



Materiały rusztowań dla komórek śródbłonka naczyniowego: badania wpływu struktury i właściwości fizykochemicznych powierzchni (Restore)

Narodowe Centrum Nauki, OPUS-LAP 20, nr projektu: 2020/39/I/ST5/01131

Partnerzy projektu: Politechnika Warszawska, University Hospital Erlangen

Kierownik projektu: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach

Spis treści

S	tre	szczenie	;
A	bst	ract	1
1.		Wprowadzenie 19)
2.		Wstęp teoretyczny)
	2.	1 Zarys problemu)
	2.2	2 Budowa naczyń krwionośnych i wymagania stawiane protezom naczyniowym 22)
	2.	3 Poliuretany	;
	2.4	4 Procesy wytwarzania włóknistych protez naczyń krwionośnych	,
	2.:	5 Podsumowanie części teoretycznej	;
3.		Cel i zakres badań	ł
4.		Część doświadczalna	1
	4.	1 Dobór parametrów procesu wytwarzania włóknin o zadanych właściwościach	1
	m	etodą rozdmuchu roztworu polimeru)
	4.2	2 Ocena wpływu morfologii powierzchni na wzrost wybranych typów komórek	ζ
	za	siedlających naczynia krwionośne	;
	4.	3 Otrzymanie protez naczyń krwionośnych o strukturze dobranej w toku	1
	do	tychczasowych badań i ocena ich właściwości61	L
5.		Dyskusja wyników	5
6.		Dalsze badania)
7.		Podsumowanie	3
S	kró	oty i symbole)
S	pis	rysunków)
B	ibli	iografia82	2
P	ełn	e teksty publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej)
	Ρu	ıblikacja P1 99)
	Ρı	ıblikacja P2 113	;
	Ρu	ıblikacja P3 125	;
	Ρı	ıblikacja P4 147	1
	Pu	ıblikacja P5	7

Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

- [P1] Łopianiak I., Butruk-Raszeja B.A. Wojasiński M.*, (2025). Shore hardness of bulk polyurethane affects the properties of nanofibrous materials differently. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 161, 1-10, DOI: <u>10.1016/j.jmbbm.2024.106793</u>. IF (2025) = 3,3, punktacja MNiSW (2025) = 100, CiteScore = 6,800, liczba cytowań (bez autocytowań) = 0
- [P2] <u>Łopianiak I.</u>*, Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A. (2020). Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning. Chemical and Process Engineering, 41(4), 267-276. DOI: <u>10.24425/cpe.2020.136012</u>. IF (2020) = 0,485, punktacja MNiSW (2025) = 100, CiteScore = 1,400, liczba cytowań (bez autocytowań) = 1
- [P3] <u>Łopianiak I.</u>*, Kawecka A., Civelek M., Wojasiński M., Cicha I., Ciach T., Butruk-Raszeja B.A. (2024). *Characterization of blow-spun polyurethane scaffolds-influence* of fiber alignment and fiber diameter on pericyte growth. ACS Biomaterials Science&Engineering, 10(7), 4388–4399, DOI: <u>10.1021/acsbiomaterials.4c00051</u>. IF(2024) = 5,5, punktacja MNiSW (2025) = 140, CiteScore = 10,300, liczba cytowań (bez autocytowań) = 3
- [P4] Łopianiak I., Wojasiński M., Kuźmińska A., Trzaskowska P.A., Butruk-Raszeja B.A.* (2021). The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds. Journal of Biological Engineering, 15(27). DOI: <u>10.1186/s13036-021-00278-1</u>. IF (2021) =6,248, punktacja MNiSW (2025) = 140, CiteScore = 9,000, liczba cytowań (bez autocytowań) = 4
- [P5] Lopianiak I., Rzempołuch W., Civelek M., Cicha I., Ciach T., Butruk-Raszeja B.A.* (2023). Multilayered blow-spun vascular prostheses with luminal surfaces in Nano/Micro range: the influence on endothelial cell and platelet adhesion. Journal of Biological Engineering, 17(20), 1-17, DOI: <u>10.1186/s13036-023-00337-9</u>. IF (2023) = 5,7, punktacja MNiSW (2025) = 140, CiteScore = 11,500, liczba cytowań (bez autocytowań) = 7

*autor korespondencyjny

Wykaz pozostałych publikacji:

- [P6] Iwoń Z., Krogulec E., Kierlańczyk A., Baranowska P., Łopianiak I., Wojasiński M., Jastrzębska E.* (2024). *Improving rodents and humans cardiac cell maturity in vitro through polycaprolactone and polyurethane nanofibers*, Biomedical Materials, 19, 1-20, DOI: <u>10.1088/1748-605X/ad240a</u>. MNiSW (2025) = 70, CiteScore = 6,700
- [P7] Iwoń Z., Krogulec E., Tarnowska I., <u>Łopianiak I.</u>, Wojasiński M., Dobrzyń A., Jastrzębska E.* (2024). *Maturation of human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) on polycaprolactone and polyurethane nanofibrous mats*, Scientific Reports, 14, 1-13, DOI: <u>10.1038/s41598-024-63905-z</u>. IF (2024) = 3,8, punktacja MNiSW (2025) = 140, CiteScore = 7,500
- [P8] Kołodziejek D., Sierańska U., Iwoń Z., Łopianiak I., Krogulec E., Wojasiński M., Jastrzębska E.* (2024). Cardiac tissue modeling using flow microsystems and nanofiber mats: Evaluating hypoxia-induced cellular and molecular changes, Sensors and Actuators B Chemical, 403, 2024, 135169_1-135169_11, DOI: 10.1016/j.snb.2023.135169. IF (2024) = 8, punktacja MNiSW (2025) = 200, CiteScore = 14,600
- [P9] Kołodziejek D., Łopianiak I., Tadko O., Drozd M., Wojasiński M., Jastrzębska E.* (2023). Magnetic polyurethane nanomaterials: A novel approach for in vitro cardiac cell maturation and culture, Polymer Testing, 127, 1-9, DOI: 10.1016/j.polymertesting.2023.108190. IF (2023) = 5,0, punktacja MNiSW (2025) = 100, CiteScore = 9,200
- [P10] Szymańska E.*, Wojasiński M., Czarnomysy R., Dębowska R., Łopianiak I., Adasiewicz K., Ciach T., Winnicka K. (2022) *Chitosan-enriched solution blow spun poly(ethylene oxide) nanofibers with poly(dimethylsiloxane) hydrophobic outer layer for Skin healing and regeneration*, International Journal of Molecular Sciences, 23(9), 1-22, DOI: <u>10.3390/ijms23095135</u>. IF (2022) = 5,6, punktacja MNiSW (2025) = 140, CiteScore = 7,800
- [P11] Lopianiak I.*, Butruk-Raszeja B. (2020). Evaluation of sterilization/disinfection methods of fibrous polyurethane scaffolds designed for tissue engineering applications, International Journal of Molecular Sciences, 21(21), 1-18, DOI: <u>10.3390/ijms21218092</u>. IF (2020) = 5,924, punktacja MNiSW (2025) = 140, CiteScore = 6,000

Wystąpienia konferencyjne w roli prezentującego

- [K1] <u>Łopianiak I.</u>, Civelek M., Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A., Cicha I., Ciach T., Warstwowe protezy naczyń krwionośnych – wpływ morfologii powierzchni na wzrost komórek, VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa Implanty 2024, 22-24.05.2024, Sopot, prezentacja ustna
- [K2] <u>Łopianiak I.</u>, Civelek M., Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A., Cicha I., Ciach T., Influence of fiber diameter and arrangement of polyurethane scaffolds on cells growth, Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering (PCBBE), 27-29.09.2023, Łódź, prezentacja plakatowa
- [K3] <u>Łopianiak I.</u>, Civelek M., Butruk-Raszeja B.A., Cicha I., Ciach T., *Dual magnetic seeding approach to co-culture tubular vascular scaffolds with cells*, I Ogólnopolska Konferencja NanoBioTechMedyczna, 21-22.09.2023, Warszawa, prezentacja ustna
- [K4] <u>Łopianiak I.</u>, Butruk-Raszeja B.A, Ciach T., Layered vascular grafts mechanical properties and hemocompatibility, TERMIS EU 2022, 28.06-1.07.2022, Kraków, prezentacja ustna
- [K5] <u>Łopianiak I.</u>, Butruk-Raszeja B.A, Wojasiński M., Ciach T., Properties and hemocompatibility of layered vascular scaffolds" Global Conference on Biomaterials, online, 08-09.11.2021, prezentacja ustna
- [K6] <u>Łopianiak I.</u>, Butruk-Raszeja B.A, Wojasiński M., Ciach T., Fibrous scaffolds from biodegradable polymers for nerve and muscle tissue regeneration, European Young Engineers Conference, 19-21.04.2021, online, prezentacja plakatowa
- [K7] <u>Łopianiak I.</u>, Kulesz I., Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A, Polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning for biomedical application, UK-Poland Bioinspired Materials Conference, 23-24.11.2020, online, prezentacja plakatowa
- [K8] <u>Łopianiak I.</u>, Banasiak A., Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A., Materiały włókniste wytwarzane z polimerów biodegradowalnych do trójwymiarowych hodowli komórkowych, III Ogólnopolska Konferencja Naukowa Polimery w Medycynie, 3.11.2020, online, prezentacja plakatowa
- [K9] <u>Łopianiak I.</u>, Kulesz I., Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A., Właściwości poliuretanowych materiałów włóknistych wytwarzanych metodą rozdmuchu roztworu polimeru, III Ogólnopolska Konferencja Naukowa Polimery w Medycynie, 3.11.2020, online, prezentacja plakatowa

- [K10] <u>Łopianiak I.</u>, Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A, Influence of solution blow spinning process parameters on properties of fibrous materials for biomedical applications, Webinar on Materials Science and Nanotechnology, iMAT 2020, 19-20.10.2020, online, prezenracja plakatowa
- [K11] <u>Łopianiak I.</u>, Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A., Nano- and microfibrous structures for three-dimensional cell culture, 1st InterBioMed Young Scientists Forum, 14-15.09.2019, Warszawa, prezentacja plakatowa

Przyznane patenty

[Pat1] B. Butruk–Raszeja, <u>I. Łopianiak</u>, "Implant cylindryczny modyfikowany poli(katecholaminą)", data udzielenia patentu: 17.04.2024, numer patentu: P.448321

Zgłoszenia patentowe

- [ZP1] <u>I. Łopianiak</u>, B. Butruk–Raszeja, W. Rzempołuch, "Sposób wytwarzania włókna o strukturze typu rdzeń-otoczka przy zastosowaniu metody rozdmuchu roztworu polimeru", data zgłoszenia: 11.04.2024, numer zgłoszenia: P.451325
- [ZP2] <u>I. Łopianiak</u>, B. Butruk–Raszeja, W. Rzempołuch, "Dwuwarstwowe włókno o strukturze typu rdzeń-otoczka", data zgłoszenia: 11.04.2024, numer zgłoszenia: P.448273
- [ZP4] D. Kołodziejek, E. Jastrzębska, M. Drozd, M. Wojasiński, <u>I. Łopianiak</u>, "Materiały nanowłókniste magnetyczne, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie", data zgłoszenia: 22.12.2022, numer zgłoszenia: P.443235

Szkoła letnia

[SzL1] International Summer School for Doctoral Students, CEZAMAT, 12-16.09.2022, Warszawa - program szkoły obejmował wykłady i warsztaty z zakresu fotoniki, bioinżynierii, biomechaniki oraz szkolenia z kompetencji miękkich.

Staże badawczo-naukowe

- [S1] 26.04.2023 28.05.2023 University Hospital Erlangen, Section of Experimental Medicine and Nanotechnology
 Finansowany w ramach programu Mobility V PW ze środków Inicjatywa doskonałości Uczelnia Badawcza (IDUB PW)
- [S2] 27.07.2024 31.08.2024 University Hospital Erlangen, Section of Experimental Medicine and Nanotechnology
 Finansowany w ramach programu Mobility XIII PW ze środków Inicjatywa doskonałości Uczelnia Badawcza (IDUB PW)

Projekty niezwiązane z tematyką rozprawy doktorskiej



Nowa metoda regeneracji krążka międzykręgowego (DYSKOBOL)

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Program Operacyjny Inteligentny Rozwój 2014-2020, nr projektu: POIR.04.01.04-00-0007/17

Funkcja i zadania: badacz, otrzymywanie (w procesie rozdmuch roztworu polimeru) i badanie właściwości materiałów włóknistych do zastosowań w regeneracji krążka międzykręgowego.



Badania nad zastosowaniem systemów Lab-on-a-chip do analizy regeneracji komórek serca

Narodowe Centrum Nauki, SONATA BIS, nr projektu: 2019/34/E/ST5/00381

Funkcja i zadania: badacz, otrzymywanie (w procesie rozdmuch roztworu polimeru) i badanie właściwości materiałów włóknistych do zastosowań w regeneracji komórek serca.

Nagrody

- [N1] Nagroda Dziekana za osiągniecia naukowe w semestrze zimowym r.a. 2023/2024
- [N2] Nagroda zespołowa I stopnia JM Rektora PW za osiągnięcia naukowe w latach 2022/2023
- [N3] Nagroda Dziekana za osiągniecia naukowe w roku akademickim 2020/2021
- [N4] Nagroda za najlepszą ustną prezentację II miejsce
 VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa Implanty 2024, 05.2024
- [N5] Nagroda za najlepszą ustną prezentację I miejsce
 I Ogólnopolska Konferencja NanoBioTechMedyczna "Nanobiomedica" 09.2023

Wskaźniki bibliometryczne (stan na: 11.06.2025)

Sumaryczna punktacja MNiSW (wg. Bazy Wiedzy PW): 1420 Sumaryczny Impact Factor (wg. Bazy Wiedzy PW): 53,457 Sumaryczna liczba cytowań (wg Scopus): 82 (65 bez autocytowań) h-index (wg Scopus): 6 (4 bez autocytowań) Nr ORCID: 0000-0002-3411-9793

1. Wprowadzenie

Współczesna inżyniera chemiczna i procesowa odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowoczesnych biomateriałów, dostarczając zaawansowanych narzędzi do kontroli procesów syntezy, przetwarzania i formowania produktów o ściśle określonych właściwościach fizykochemicznych i mechanicznych. Dzięki rozwojowi tej dziedziny możliwe stało się projektowanie procesów, w których parametry mają bezpośredni wpływ na mikroi makrostrukturę otrzymywanych struktur. To podejście umożliwia kontrolowaną produkcję materiałów o wysokiej powtarzalności, dostosowanych do konkretnych wymagań aplikacyjnych, co stanowi istotny krok w kierunku translacji technologii laboratoryjnych do praktyki klinicznej.

Z kolei inżynieria tkankowa, opierająca się na koncepcji złotej triady obejmującej trzy podstawowe elementy funkcjonalnego biomateriału: rusztowanie, komórki i czynniki biologiczne, koncentruje się na projektowaniu materiałów zdolnych do wspierania procesów regeneracyjnych poprzez interakcje z żywymi komórkami i tkankami. Każdy z elementów złotej triady inżynierii tkankowej odgrywa niezwykle istotną rolę, jednak dopiero ich odpowiedni dobór i synergistyczne działanie stwarzają warunki do efektywnej regeneracji tkanek i narządów. Ostateczny sukces implantu zależy zatem nie tylko od jego biozgodności, ale również od precyzyjnego dostosowania jego właściwości mechanicznych, strukturalnych i powierzchniowych do specyficznych wymagań biologicznych danego zastosowania.

Na niniejszą rozprawę doktorską składa się cykl pięciu spójnych tematycznie, recenzowanych publikacji naukowych. Przedstawiają one wyniki badań prowadzących do opracowania wielowarstwowego, włóknistego implantu przeznaczonego do regeneracji naczyń krwionośnych małych średnic.

Praca obejmuje: (1) dobór najkorzystniejszych parametrów wytwarzania materiałów włóknistych o kontrolowanych właściwościach w procesie rozdmuchu roztworu polimeru, (2) ocenę wpływu struktury materiału na wzrost wybranych typów komórek zasiedlających naczynia krwionośne oraz (3) wytworzenie implantów i ocenę ich funkcjonalności jako rusztowań wspierających regenerację naczyń krwionośnych, z uwzględnieniem wymagań biologicznych i inżynierskich.

2. Wstęp teoretyczny

2.1 Zarys problemu

Choroby sercowo-naczyniowe (ang. *cardiovascular diseases*, CVDs), zaliczane do chorób cywilizacyjnych, są dominującą przyczyną zgonów na całym świecie. W 2022 r. światowa, roczna liczba zgonów spowodowanych CVDs wynosiła 19,8 mln, co stanowiło ponad 30% wszystkich zgonów [1]. Największą całkowitą umieralność z powodu tych chorób odnotowuje się w Europie Wschodniej (553 zgony na 100 000) [1], [2]. Według Głównego Urzędu Statystycznego, w Polsce w 2022 r., około 35% zgonów było spowodowanych CVDs (Rysunek 1) [3]. Mimo iż z roku na rok, dzięki odpowiednio wdrażanej profilaktyce, postępach w terapii oraz redukcji czynników ryzyka, ich udział w ogólnej liczbie zgonów w Polsce maleje (dla porównania, na początku lat 90 XX w. CVDs były przyczyną ok. 50% zgonów w Polsce i ok. 45% na świecie [4]), odsetek ten jest nadal bardzo wysoki i należy poszukiwać rozwiązań pozwalających na ratowanie zdrowia i życia pacjentów.

Do CVDs zaliczane są: choroba niedokrwienna serca (wieńcowa), choroba naczyń mózgowych, choroba tętnic obwodowych, reumatyczna choroba serca, wrodzona wada serca oraz zakrzepica żył głębokich i zatorowość płucna [1], [5]. Wśród nich, choroba niedokrwienna serca i choroba tętnic obwodowych są przyczyną około 40% zgonów spowodowanych chorobami CVDs, przy czym 1 na 5 śmierci dotyka osób poniżej 65. roku życia. Szacuje się, że 1 na 20 osób powyżej 20. roku życia cierpi na chorobę niedokrwienną serca [2], [6]. Jej przyczyną jest odkładanie się blaski miażdżycowej w tętnicach wieńcowych, co w konsekwencji skutkuje niedokrwieniem mięśnia sercowego, a w zaawansowanych stadiach zawałem serca spowodowanym całkowitym zasklepieniem światła naczynia krwionośnego [7], [8].

Leczenie zaawansowanych stadiów choroby niedokrwiennej serca obejmuje przezskórną interwencję wieńcową polegającą na wprowadzeniu stentu do naczynia krwionośnego w miejscu zmienionym chorobowo, w celu poszerzenia jego światła i przywrócenia prawidłowego krążenia krwi oraz pomostowanie aortalno-wieńcowe polegające na zbudowaniu pomostu omijającego zmieniony chorobowo odcinek tętnicy. Wprowadzenie stentu stosowane jest u pacjentów z wczesnym nagromadzeniem blaszki miażdżycowej, jednak charakteryzuje się dużym ryzykiem powtórnego zwężenia naczynia [9]. Do pomostowania aortalno-wieńcowego kwalifikowani są pacjenci w zaawansowanym stadium choroby wieńcowej [10], [11], [12].



Rysunek 1. Główne przyczyny zgonów w Polsce w latach 2015 i 2022 [3]

Zabieg pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. coronary artery bypass grafting, CABG) należy do najczęściej wykonywanych zabiegów kardiochirurgicznych [13]. Szacuje się, że rocznie na świecie przeprowadzanych jest około 400 000 zabiegów CABG [14], z czego około 13 000 wykonywanych jest w Polsce [15], [16]. Pomimo postępów w leczeniu zachowawczym i interwencyjnym CABG pozostaje najskuteczniejszą metodą leczenia zaawansowanej choroby wieńcowej, szczególnie w przypadkach obejmujących zmiany wielonaczyniowe [17]. Obecnie złotym standardem przy operacji CABG jest wykorzystanie naczyń pacjenta: tętnicy piersiowej wewnętrznej, tętnicy promieniowej lub żyły odpiszczelowej [18], [19], [20]. Jednakże, w wielu przypadkach, zły stan naczyń autologicznych uniemożliwia ich wykorzystanie do przeszczepu. Dodatkowym wyzwaniem jest niedostateczna długoterminowa drożność przeszczepionych naczyń, co często prowadzi do konieczności ponownych zabiegów [21], [22]. Badania przeprowadzone w 2004 r. wykazały, że w zależności od rodzaju autologicznego naczynia wykorzystanego podczas pomostowania aortalno-wieńcowego, drożność po 10 latach od zabiegu wynosi od 61 do 85%. (odpowiednio dla żyły odpiszczelowej i tętnicy piersiowej wewnętrznej) [23]. Wykazano także, że prawdopodobieństwo wystąpienia całkowitej niedrożności przeszczepionej żyły odpiszczelowej po 1, 5, 10 i 15 latach od przeszczepu wynosi odpowiednio 15-20%, 25%, 40% i 50% [24].

Ograniczona dostępność autologicznych naczyń krwionośnych oraz problemy po ich implantacji generują potrzebę poszukiwania alternatywnych rozwiązań pozwalających ratować zdrowie i życie pacjentów. Jedną z najbardziej obiecujących dróg są syntetyczne, polimerowe protezy naczyń krwionośnych oraz biozgodne rusztowania tkankowe naśladujące strukturę, funkcje i właściwości mechaniczne naczyń natywnych [25], [26]. Rozwiązania te oferują

wysoki potencjał aplikacyjny w chirurgii naczyniowej i stanowią kierunek intensywnych badań nad nowoczesnymi materiałami medycznymi.

2.2 Budowa naczyń krwionośnych i wymagania stawiane protezom naczyniowym

Ściana naczynia krwionośnego zbudowana jest z trzech głównych warstw:

- wewnętrznej wyściełanej jednowarstwowym śródbłonkiem (ang. *endothelial cells*, ECs), który stanowi szczelną barierę pomiędzy światłem naczynia a jego ścianą. Komórki ECs odgrywają kluczową rolę w regulacji przepływu krwi, procesach hemostazy, interakcjach komórkowych oraz syntezie i degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej;
- środkowej składającej się głównie z komórek mięśni gładkich i włókien kolagenowych, odpowiadającej za elastyczność i zdolność do kurczenia się naczyń, co umożliwia regulację średnicy naczynia oraz ciśnienia krwi;
- zewnętrznej zbudowanej z fibroblastów i tkanki łącznej kolagenowej. Warstwa zewnętrzna pełni funkcję stabilizującą, łącząc naczynie z otaczającymi tkankami oraz zabezpieczającą przed jego uszkodzeniem i zapadaniem. Jednocześnie zapobiega nadmiernemu rozciąganiu lub kurczeniu się naczynia [12], [27], [28].

Mimo pozornie prostej budowy cylindrycznej naczynia krwionośne wykazują dużą złożoność strukturalną i funkcjonalną. Poszczególne warstwy pozostają w ścisłej interakcji, zapewniając prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego [29]. Zarówno grubość ściany, złożoność poszczególnych warstw, jak i średnica naczynia są zróżnicowane i zależą od jego rodzaju (tętnica, żyła, naczynie włosowate) oraz funkcji. W związku z tym projektowanie protez dużych i małych naczyń krwionośnych wymaga odrębnych podejść konstrukcyjnych i materiałowych [30], [31], [32].

Choć warstwa środkowa naczyń krwionośnych zbudowana jest głównie z komórek mięśni gładkich, coraz częściej zwraca się uwagę na rolę perycytów, szczególnie w mniejszych naczyniach i w kontekście regeneracji ściany naczyniowej. Perycyty, pełniące funkcje stabilizujące naczynia i regulujące przepuszczalność komórek ECs, wykazują zdolność do różnicowania w kierunku komórek mięśniowych, a ich fenotyp i wymagania środowiskowe są zbliżone do vSMCs [33], [34].

Dostępne na rynku syntetyczne protezy naczyniowe produkowane są głównie z polimerów niebiodegradowalnych: ekspandowanego politetrafluoroetylenu (ePTFE) lub politereftalanu etylenu (PET) [35], [36], [37], [38]. Pierwsze udane wszczepy z wykorzystaniem tych

materiałów przeprowadzono już w latach 50 XX w. [39]. Choć syntetyczne protezy są skuteczne w przypadku naczyń o dużych średnicach (>6 mm), np. przy pomostowaniu tętnicy udowej [40], nie sprawdzają się w przypadku naczyń małej średnicy (<6 mm), takich jak tętnice wieńcowe czy małe naczynia obwodowe [31], [41].

Wśród przyczyn niepowodzeń przeszczepów syntetycznych wyróżnia się: zakrzepicę, przerost błony wewnętrznej (hiperplazję) oraz infekcje utrudniające gojenie, spowodowane kolonizacją bakterii wewnątrz syntetycznej protezy [42], [43], [44]. Głównym problemem w przypadku protez małej średnicy jest brak odpowiedniej endotelializacji, czyli zasiedlenia wewnętrznej powierzchni protezy przez komórki ECs. Jest to proces kluczowy dla długoterminowego sukcesu implantacji, ponieważ warstwa komórek ECs pełni fundamentalne funkcje w utrzymaniu homeostazy naczyniowej regulując przepływ krwi, zapobiegając aktywacji układu krzepnięcia i ograniczając adhezję komórek zapalnych oraz płytek krwi, które prowadzą do wystąpienia zakrzepicy [45], [46], [47], [48].

Wszczepienie protezy stymuluje także odpowiedź układu immunologicznego, co sprzyja powstawaniu skrzepów. W przypadku protez o małych średnicach, które są stosowane podczas procedury CABG, prowadzi to do znacznego ograniczenia drożności implantu, a w konsekwencji udarów niedokrwiennych narządów obwodowych i ośrodkowego układu nerwowego [47], [49], [50]. Zatem głównym wyzwaniem związanym z zastosowaniem protez naczyniowych przy pomostowaniu małych naczyń krwionośnych (<6mm) jest zachowanie ich długoterminowej drożności [43], [51].

Wymagania stawiane protezom naczyń krwionośnych

Jak każdy biomateriał mający kontakt z tkankami pacjenta, protezy naczyń krwionośnych powinny charakteryzować się wysoką biozgodnością. Termin ten odnosi się do zdolności materiału do prawidłowego funkcjonowania w organizmie żywym bez wywoływania niepożądanych reakcji toksycznych, zapalnych czy immunologicznych [52], [53]. Szczególnie istotną cechą materiałów przeznaczonych do kontaktu z krwią jest ich hemozgodność, czyli zdolność do interakcji z jej składnikami w sposób niewywołujący niepożądanych reakcji, takich jak nadmierna aktywacja płytek krwi, tworzenie zakrzepów czy hemoliza [54], [55], [56], [57]. Aby uniknąć problemów związanych z niewłaściwą integracją z otaczającymi tkankami, warstwa wewnętrzna powinna charakteryzować się wysoką hemozgodnością i wspomagać możliwie szybkie utworzenie monowarstwy komórek ECs [55], [58], [59].

Geometria protezy naczyniowej również odgrywa znaczącą rolę w zapewnieniu jej funkcjonalności [60]. Nawet niewielkie odchylenia od fizjologicznej geometrii mogą prowadzić do poważnych powikłań klinicznych [61], [62]. Niezgodność średnicy światła protezy ze średnicą wewnętrzną naczynia może prowadzić do zaburzeń przepływu krwi, co sprzyja formowaniu skrzepów w miejscach zespolenia [47], [63].

Grubość ściany wpływa bezpośrednio na szczelność oraz właściwości mechaniczne protezy. Optymalna grubość powinna umożliwiać zachowanie równowagi między elastycznością a stabilnością strukturalną [32], [64]. Nadmierna sztywność implantu wynikająca ze zbyt dużej grubości ściany lub niewłaściwego doboru materiału może zaburzać przepływ krwi, powodując wzrost lokalnych naprężeń, co z kolei skutkuje uszkodzeniem komórek ECs w miejscu zespolenia. Tego typu uszkodzenia sprzyjają aktywacji płytek krwi, zakrzepicy, hiperplazji błony wewnetrznej oraz w konsekwencji utracie drożności naczynia [63], [65]. Z kolei wszczepienie cienkościennej, wysokoelastycznej protezy może skutkować zapadaniem się ściany naczynia lub jego deformacją pod wpływem ciśnienia krwi [64], [66]. Brak zgodności mechanicznej pomiędzy protezą a natywnym naczyniem pacjenta może prowadzić do licznych powikłań i utrudniać prawidłową integrację z tkanką gospodarza. Nieodpowiednie właściwości mechaniczne protez mogą też skutkować ich zapadaniem podczas zginania wzdłuż głównej osi, spowodowanym ruchem całego ciała. Właściwości mechaniczne wszczepianych protez powinny zatem jak najwierniej odwzorowywać biomechanikę naczyń fizjologicznych, które w warunkach in vivo podlegają ciągłym, cyklicznym obciążeniom [30], [32], [64], [65].

Równie istotną rolę w odwzorowywaniu właściwości naczynia krwionośnego odgrywają właściwości strukturalne implantów, takie jak wielkość i rozmieszczenie porów oraz porowatość, które determinują zarówno przepuszczalność dla gazów i substancji odżywczych, jak i możliwość zasiedlania rusztowania przez komórki [67], [68]. Wielkość i rozmieszczenie porów mają bezpośredni wpływ na interakcję rusztowania z komórkami ECs, komórkami mięśni gładkich oraz elementami morfotycznymi krwi [69], [70]. W przypadku warstwy wewnętrznej, kontaktującej się bezpośrednio z krwią, pożądana jest obecność porów o rozmiarach ograniczających migrację komórek ECs w głąb protezy oraz wspomagających szybkie odtworzenie ich monowarstwy, co zwiększa hemozgodność i ogranicza ryzyko zakrzepicy [71], [72]. Z kolei warstwa zewnętrzna, pełniąca funkcję integrującą implant z otaczającą tkanką, powinna charakteryzować się porami o rozmiarach umożliwiających

migrację komórek mięśniowych i fibroblastów w głąb struktury, wspierając regenerację ściany naczynia oraz stabilną integrację z organizmem biorcy [68], [69], [73].

Obecność odpowiednio ukształtowanych i rozmieszczonych porów umożliwia komunikację różnych typów komórek zasiedlających rusztowanie, zarówno poprzez kontakt bezpośredni, jak i wymianę cząsteczek sygnałowych [74]. Taka interakcja jest kluczowa dla zachowania równowagi funkcjonalnej i odtworzenia prawidłowej architektury ściany naczyniowej. Dzięki kontrolowanej porowatości możliwe jest stworzenie mikrośrodowiska, które wspiera naturalne procesy naprawcze, sprzyja prawidłowej organizacji komórek i tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej oraz odzwierciedla złożoną strukturę fizjologiczną naczynia [67], [71], [73].

Projektowanie i wytwarzanie protez naczyń krwionośnych małych średnic powinno przebiegać zgodnie z koncepcją złotej triady inżynierii tkankowej, w której rusztowanie, komórki oraz czynniki biologiczne umożliwiają odtworzenie możliwe zbliżonego mikrośrodowiska oraz ułatwiają integrację implantu z organizmem [22], [75].

Mimo wieloletnich badań klinicznych i laboratoryjnych w dalszym ciągu protezy syntetyczne nie stanowią rutynowego rozwiązania przy zabiegach CABG i zwykle stosowane są jedynie w razie braku naczyń autologicznych [21], [22], [76]. Obserwowane powikłania, takie jak wykrzepianie krwi, przerost błony wewnętrznej czy odpowiedź zapalna, wskazują na potrzebę sięgania po nowe materiały, które zapewnią lepszą hemozgodność, sprzyjają regeneracji warstw ściany naczynia, a zarazem będą charakteryzowały się odpowiednią wytrzymałością mechaniczną [58].

2.3 Poliuretany

Poliuretany (PU) to kopolimery zbudowane z naprzemiennie ułożonych segmentów połączonych wiązaniami uretanowymi. Ich segmentowa budowa umożliwia otrzymywanie materiałów o szerokim zakresie właściwości użytkowych. Segmenty twarde (ang. *hard segments*) odpowiadają za wytrzymałość mechaniczną i sztywność, natomiast segmenty miękkie (ang. *soft segments*), nadają poliuretanowemu tworzywu elastyczność i sprężystość [77], [78], [79].

Modyfikując proporcje obu typów segmentów, można uzyskać poliuretany o bardzo zróżnicowanych właściwościach — od materiałów miękkich i elastycznych po twarde i sztywne [80], [81], [82]. Poliuretany węglanowe, wyróżniające się wysoką wytrzymałością mechaniczną, odpornością chemiczną i temperaturową, wykazują wysoką bio- i hemozgodność oraz stabilność *in vivo*, a w dłuższej perspektywie cechują się podatnością na hydrolizę enzymatyczną i degradację oksydacyjną przez komórki [80]. Znajdują szerokie zastosowanie w medycynie, szczególnie w produkcji wyrobów medycznych, takich jak stenty, protezy naczyń krwionośnych, sztuczne zastawki i komory serca [83], [84]. Ich wysoka odporność na odkształcenia plastyczne oraz zdolność do przenoszenia sił skurczowych bez uszkodzenia materiału, czynią je idealnymi do zastosowań w produkcji implantów układu sercowonaczyniowego [77], [85].

Dotychczas liczne badania *in vivo* prowadzone na modelach zwierzęcych potwierdziły możliwość wykorzystania poliuretanowych protez naczyń krwionośnych jako substytutów dla naczyń natywnych. Szczególną uwagę zwrócono na poliuretany węglanowe, które wykazały wyższą biozgodność i biostabilność po implantacji w organizmach żywych w porównaniu z innymi typami poliuretanów. Wynika to z wysokiej stabilności segmentów giętkich, co sprawia, że PU węglanowe są materiałami o szczególnie wysokim potencjale do zastosowań biomedycznych [86], [87].

Należy podkreślić, że dobór odpowiedniego polimeru jest kluczowym, lecz nie jedynym elementem, który należy wziąć pod uwagę przy projektowaniu skutecznych rusztowań tkankowych. Jak opisano w podrozdziale 2.2, równie istotna jest struktura przestrzenna biomateriału, obejmująca takie cechy jak porowatość czy rozmiar porów, które warunkują efektywne zasiedlanie rusztowania przez komórki, prawidłową dyfuzję składników odżywczych i gazów oraz stabilną integrację z otaczającymi tkankami. W związku z tym oprócz właściwości materiałowych, kluczowe znaczenie ma również odpowiedni dobór technologii wytwarzania biomateriału.

2.4 Procesy wytwarzania włóknistych protez naczyń krwionośnych

Elektroprzędzenie

Wśród dostępnych procesów wytwarzania elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*, ES) jest obecnie najczęściej stosowanym procesem produkcji protez naczyniowych [69], [88]. Technika ta pozwala na uzyskanie materiałów o strukturze zbliżonej do macierzy zewnątrzkomórkowej, co sprzyja zasiedlaniu ich przez komórki oraz wspomaga integrację implantu z otaczającymi tkankami [89], [90].

W procesie ES cienka strużka roztworu polimeru zostaje wyciągnięta z dyszy pod wpływem wysokiego napięcia elektrycznego i zdeponowana na kolektorze w postaci mikrowłókien lub nanowłókien [91], [92]. Proces ten, przy zastosowaniu kolektora o odpowiednim kształcie, umożliwia formowanie cylindrycznych rusztowań o kontrolowanej porowatości, ukierunkowaniu włókien oraz grubości ściany, które mogą odwzorowywać strukturę fizjologicznego naczynia krwionośnego [69]. Znane są protezy jedno- [93], [94], jak również dwu- [95], [96] i trzywarstwowe [97], [98], [99], odwzorowujące warstwową strukturę rusztowania, produkowane z polimerów syntetycznych [95], [97], [99] oraz mieszaniny naturalnych i syntetycznych [93], [94], [96], [98] za pomocą techniki ES.

Kluczowym wyzwaniem przy produkcji włókien w procesie ES jest konieczność stosowania wysokiego napięcia, co wiąże się z potencjalnym ryzykiem operacyjnym oraz wymaga wykorzystania specjalistycznej aparatury. Dodatkowo, technika ta cechuje się ograniczoną skalowalnością, co znacząco utrudnia jej zastosowanie w produkcji przemysłowej. Co istotne, ES nie jest metodą wydajną w kontekście wytwarzania struktur o znacznych wymiarach. Proces produkcji włóknin o grubości rzędu kilkuset mikrometrów jest bardzo czasochłonny. Z tego względu technika ES znajduje głównie zastosowanie w otrzymywaniu cienkich warstw lub membran [100], [101], [102], [103].

Alternatywną techniką wytwarzania materiałów włóknistych do zastosowań biomedycznych jest rozdmuch roztworu polimeru.

Rozdmuch roztworu polimeru

Rozdmuch roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*, SBS) jest jedną z technik wytwarzania funkcjonalnych materiałów nano- i mikrowłóknistych [104], [105], [106], która po raz pierwszy została opisana w 2009 roku jako metoda łącząca cechy elektroprzędzenia i przędzenia ze stopionego polimeru [107]. W porównaniu do alternatywnych procesów SBS charakteryzuje się wysokim bezpieczeństwem, niskimi kosztami i dużą wydajnością, a także prostotą prowadzenia i możliwością skalowania procesu. Proces ten wykorzystuje sprężony gaz (najczęściej powietrze), który podczas rozprężania staje się nośnikiem siły napędowej do formowania włókien z roztworu polimeru. Włókna mogą być deponowane na podłożach o zróżnicowanej geometrii, co umożliwia otrzymywanie struktur włóknistych o różnorodnych kształtach i formach przestrzennych [108], [109].

Dysza stosowana w procesie SBS zbudowana jest z dwóch koncentrycznych kanałów, umożliwiających jednoczesny przepływ roztworu polimeru (kanał wewnętrzny) i sprężonego

powietrza (kanał zewnętrzny). W celu zapewnienia stabilnego formowania włókien kanał wewnętrzy dyszy jest zazwyczaj wysunięty przed kanał zewnętrzny o około 0,5–3 mm [107].

Sprężone powietrze przepływające kanałem zewnętrznym ulega gwałtownemu rozprężeniu w momencie opuszczenia dysz, w wyniku czego generowana jest energia przyspieszająca strumień gazu zgodnie z prawem Bernoulliego. Gwałtowne przyspieszenie gazu w rejonie wylotu kanału wewnętrznego powoduje wyciągnięcie roztworu polimeru z dyszy i jednocześnie generuje siły ścinające na granicy faz gaz/roztwór polimeru, w wyniku których kropla roztworu polimeru formowana jest w stożek na końcu dyszy (Rysunek 2). W momencie, gdy siły ścinające pokonują siły napięcia powierzchniowego roztworu polimeru, z uformowanego stożka wyciągany jest cienki strumień roztworu polimeru (ang. *jet*), który następnie przenoszony jest w strumieniu gazu w kierunku kolektora. W trakcie lotu następuje odparowanie lotnego rozpuszczalnika oraz rozciąganie włókien w burzliwym strumieniu, a na kolektorze deponowane są włókna polimerowe [104], [107], [110], [111].



Rysunek 2. Budowa dyszy wykorzystywanej do wytwarzania włókien metodą rozdmuchu roztworu polimeru. Roztwór polimeru podawany jest kanałem wewnętrzym, podczas gdy kanałem zewnętrznym przepływa strumień gazu o wysokim ciśnieniu (P1). Geometria dyszy umożliwia powstanie obszaru niskiego ciśnienia (P2) wokół kanału wewnętrznego, w wyniku czego kropla polimeru formowana jest w stożek na wylocie z dyszy [107]. Reprodukcja i tłumaczenie za zgodą wydawnictwa John Wiley and Sons.

Parametry umożliwiające kontrolę procesu SBS można podzielić na cztery kategorie:

- parametry roztworu polimeru (tj.: rodzaj i masa cząsteczkowa polimeru, lotność rozpuszczalnika, lepkość i stężenie polimeru w roztworze, napięcie powierzchniowe);
- parametry procesu (tj.: ciśnienie gazu, natężenie przepływu roztworu polimeru, odległość dysza-kolektor);
- parametry układu (tj.: geometria dyszy, geometria kolektora, prędkość obrotowa kolektora);
- parametry otoczenia (tj.: ciśnienie atmosferyczne, temperatura, wilgotność) [104].

Parametry roztworu polimeru

Aby możliwe było wytworzenie włókien z roztworu polimeru, polimer musi być w pełni rozpuszczalny w wybranym rozpuszczalniku, w zakresie stężeń umożliwiającym wytworzenie włókien o pożądanych średnicach [110]. Lotność rozpuszczalnika determinuje jego szybkość parowania w trakcie transportu strumienia roztworu polimeru w kierunku kolektora. Powinna ona być na tyle wysoka, aby zapewnić całkowite odparowanie rozpuszczalnika ze strumienia roztworu polimeru przed osadzeniem się włókien na kolektorze. Zastosowanie rozpuszczalników o wysokiej temperaturze wrzenia, a tym samym niskiej lotności może przyczynić się do otrzymania materiałów włóknistych z licznymi defektami, wynikającymi z niepełnego odparowania rozpuszczalnika. Stopień odparowania rozpuszczalnika może także wpływać na średnice otrzymywanych włókien [105], [112].

Kluczowe znaczenie dla możliwości przędzenia włókien ma również masa cząsteczkowa polimeru oraz jego zachowanie w rozpuszczalniku. Łańcuchy polimeru muszą rozprostowywać się w roztworze i tworzyć odpowiednią liczbę splątań, umożliwiających stabilne formowanie włókien [113]. Wzajemne interakcje łańcuchów polimerowych (splątania oraz oddziaływania typu "głowa-ogon") prowadzą bezpośrednio do możliwości przędzenia włókien w procesie SBS i są kluczowe dla powstania ciągłych, jednorodnych włókien. Dla każdego układu polimer–rozpuszczalnik istnieje charakterystyczne okno przędzalności, czyli zakres parametrów roztworu (oddziaływań międzyłańcuchowych polimeru), w którym możliwe jest stabilne formowanie jednorodnych włókien [113].

Stężenie polimeru w roztworze jest kluczowym parametrem wpływającym na średnice włókien otrzymywanych metodą SBS i jest bezpośrednio związane lepkością roztworu polimeru [110]. Wzrost liczby łańcuchów polimerowych w roztworze, a tym samym wzrost

interakcji łańcuchów polimeru, lepkości oraz napięcia powierzchniowego roztworu, skutkuje zwiększeniem średnicy formowanych włókien [107], [114], [115].

Parametry procesu

Ciśnienie gazu podawanego dyszą zewnętrzną oraz natężenie przepływu roztworu polimeru przez dyszę wewnętrzną wpływają na efektywność formowania włókien, morfologię wytwarzanych materiałów (w tym liczbę defektów), jak również w niewielkim stopniu na średnicę otrzymywanych włókien [107], [116]. Zwiększenie ciśnienia gazu może prowadzić do zmniejszenia średnic włókien poprzez zwiększenie sił rozciągających działających na kroplę roztworu polimeru. Jednak zarówno zbyt wysokie, jak i zbyt niskie ciśnienie gazu może destabilizować proces, co prowadzi do zwiększenia liczby defektów w strukturze materiałów lub nawet do zatrzymania procesu w wyniku zatkania kanału wewnętrznego dyszy roztworem polimeru [114].

Podobne znaczenie ma odpowiednie dobranie natężenia przepływu roztworu polimeru. Zbyt niskie natężenie może utrudniać formowanie stabilnej kropli roztworu na wylocie dyszy, natomiast zbyt wysokie sprzyja gwałtownemu wyrzucaniu dużych ilości roztworu ("plucie"), co prowadzi do powstawania defektów w postaci plam lub posklejanych włókien wynikających z niedostatecznego odparowania rozpuszczalnika [105], [109].

Dodatkowo, odpowiednio dobrana odległość między dyszą a kolektorem umożliwia pełne odparowanie rozpuszczalnika i uzyskanie jednorodnych włókien o minimalnej liczbie defektów. Skrócenie tej odległości powoduje zmniejszenie porowatości wytwarzanego materiału i jednocześnie zwiększenie rozmiarów defektów struktury pojawiających się na skutek niecałkowitego odparowania rozpuszczalnika [114], [117], [118]. Ponadto zwiększenie odległości między dyszą a kolektorem może przyczynić się do zmniejszenia średnicy włókien w wyniku lepszego odparowania rozpuszczalnika [105]. Ustawienie dyszy bezpośrednio przed kolektorem prowadzi do zatracenia włóknistej, porowatej struktury materiału i powstania folii polimerowej [114].

Parametry układu

Średnice koncentrycznych kanałów tworzących dyszę mają istotny wpływ na efektywność procesu SBS oraz średnice formowanych włókien [108], [118]. Kanał wewnętrzny powinien mieć średnicę wystarczająco małą, aby umożliwić formowanie włókien, natomiast odpowiedni dobór średnic obu kanałów (wewnętrznego i zewnętrznego) zapewnia stabilność procesu

w początkowej fazie tworzenia kropli roztworu polimeru. Zbyt duża średnica kanału wewnętrznego może utrudniać efektywne odparowywanie rozpuszczalnika prowadząc do deponowania na kolektorze strużek roztworu polimeru lub tworzenia posklejanych włókien – defektów [114]. Ponadto, długość dyszy odgrywa istotną rolę w stabilizacji przepływu gazu. Dysza powinna być na tyle długa, aby umożliwić ustabilizowanie ciśnienia i prędkości gazu przepływającego wewnątrz kanału [118], [119]. Jednakże zbyt duża długość dyszy może prowadzić do powstawania turbulencji przy wylocie, czego skutkiem jest szerszy rozkład średnic otrzymywanych włókien w porównaniu do dysz krótszych. Zazwyczaj zastosowanie dysz o mniejszych średnicach sprzyja formowaniu włókien o mniejszych rozmiarach, choć ostateczna średnica włókien zależy głównie od rodzaju polimeru oraz jego stężenia w roztworze [108]. Średnice kanałów oraz długość dyszy powinny być także odpowiednio skorelowane z ciśnieniem powietrza podawanego do dyszy wewnętrznej [118].

Istotnym parametrem jest także wysunięcie kanału wewnętrznego dyszy przed kanał zewnętrzny. Aby możliwe było stabilne formowanie kropli roztworu polimeru na końcu dyszy, a następnie generowanie włókien, kanał wewnętrzny powinien być wysunięty przed kanał zewnętrzny o 0,5–3 mm [107], [118].

Geometria i wymiary kolektora determinują formę i organizację wytwarzanych materiałów włóknistych. Stosowanie kolektorów płaskich skutkuje otrzymaniem materiałów o losowym, nieukierunkowanym ułożeniu włókien [109]. Natomiast w przypadku kolektorów cylindrycznych, średnica oraz prędkość obrotowa kolektora wpływają na średnicę włókien, ich splątanie i orientację. Wzrost prędkości obrotowej kolektora prowadzi do zwiększenia jednorodności włókien, uzyskania wyraźnego ukierunkowania włókien w strukturze wytworzonego materiału, a także zmniejszenia ich średnicy [120], [121], [122].

Parametry otoczenia

Proces SBS najczęściej jest prowadzony w warunkach normalnych, jednakże warunki otoczenia mogą wpływać zarówno na przebieg procesu, jak i na jakość otrzymywanych włókien [108]. Wpływ parametrów otoczenia, takich jak: temperatura, ciśnienie atmosferyczne oraz wilgotność powietrza na proces SBS nie został jeszcze dokładnie zbadany. Wiadomo jednak, że wyższa temperatura otoczenia przyspiesza odparowanie lotnego rozpuszczalnika podczas transportu strużki roztworu polimeru w kierunku kolektora [112], zmniejsza lepkość roztworu oraz zwiększa rozpuszczalność polimeru w rozpuszczalniku [123]. Z kolei niższa temperatura może prowadzić do niepełnego odparowania rozpuszczalnika, zbierania się

roztworu na kolektorze w postaci defektów oraz do powstawania włókien o większych średnicach [109], [114]. Wpływ wilgotności powietrza na jakość włókien jest szczególnie istotny przy przędzeniu z roztworów wodnych, kiedy to wydłużony czas parowania rozpuszczalnika znacząco wpływa na strukturę włókien [114].

Nie istnieje uniwersalny zestaw parametrów umożliwiający kontrolę procesu SBS i wytwarzanie włókien o ściśle określonej morfologii. Opisane powyżej zależności mają charakter ogólny i są wspólne dla większości układów polimer-rozpuszczalnik. Znajomość wzajemnych relacji pomiędzy parametrami procesu a właściwościami uzyskiwanych włóknistych materiałów pozwala jednak na świadome i celowe dostosowywanie warunków wytwarzania do specyficznych wymagań stawianych produktowi.

Proces SBS eliminuje konieczność stosowania wysokiego napięcia, oferując jednocześnie większą wydajność, niższe koszty aparatury i produkcji oraz umożliwiając stosowanie szerszej gamy polimerów i rozpuszczalników. Jest też bardziej przewidywalny i powtarzalny w porównaniu do procesu ES [105], [108]. Według mojej najlepszej wiedzy, w dostępnej literaturze brak jest doniesień dotyczących wytwarzania poliuretanowych protez naczyniowych w procesie SBS. Co więcej, w nielicznych pracach, które ogólnie odnoszą się do zastosowania SBS w inżynierii tkankowej, koncentrowano się głównie na rusztowaniach o ogólnym przeznaczeniu, często z wykorzystaniem innych materiałów niż PU, takich jak kwas polimlekowy (PLA) i polikaprolakton (PCL) [104], [105]. Nie opisano kompleksowego podejścia obejmującego projektowanie wielowarstwowej struktury odwzorowującej budowę naczynia krwionośnego, analizę parametrów procesu, ocenę właściwości mechanicznych oraz ocenę biologiczną materiału.

2.5 Podsumowanie części teoretycznej

W części teoretycznej pracy dokonano kompleksowej analizy problematyki chorób sercowo-naczyniowych, ze szczególnym uwzględnieniem przypadków, w których zachodzi konieczność wykonania zabiegu CABG. Przedstawiono ograniczenia stosowanych obecnie rozwiązań, takich jak stenty czy przeszczepy autologiczne oraz wskazano na potrzebę opracowania alternatywy w postaci syntetycznych protez naczyniowych. Opisano budowę anatomiczną naczyń krwionośnych, a także złożoność ich funkcji i interakcji międzywarstwowych, co stanowiło punkt wyjścia do określenia wymagań stawianych nowoczesnym protezom naczyniowym. Szczególną uwagę poświęcono właściwościom mechanicznym i strukturalnym (takim jak porowatość, struktura czy grubość ściany), które decydują o efektywności zasiedlania rusztowania przez komórki oraz integracji z otaczającymi tkankami. Podkreślono również znaczenie hemozgodności i biozgodności materiałów stosowanych do kontaktu z krwią i ich wpływu na ograniczenie ryzyka zakrzepicy i hiperplazji.

Następnie przedstawiono potencjał poliuretanów węglanowych jako polimerów do wytwarzania biomateriałów o wysokiej stabilności mechanicznej, elastyczności i biozgodności, które znajdują szerokie zastosowanie w konstrukcji protez sercowo-naczyniowych. Szczegółowo omówiono również techniki wytwarzania włóknistych rusztowań, wskazując elektroprzędzenie jako dotychczas najczęściej stosowany proces, ale obarczony ograniczeniami związanymi z wydajnością, zgodnością materiałową oraz trudnością w skalowaniu. Alternatywę stanowi rozdmuch roztworu polimeru, który oferuje większą swobodę projektowania, większą wydajność oraz możliwość stosowania szerszej gamy materiałów.

Opisane zagadnienia stanowią podstawę merytoryczną dla dalszych badań nad projektowaniem i wytwarzaniem funkcjonalnych rusztowań naczyniowych w procesie rozdmuchu roztworu polimeru. Przegląd literatury pozwolił na zidentyfikowanie kluczowych parametrów materiałowych i procesowych wpływających na morfologię, strukturę i właściwości mechaniczne materiałów włóknistych, co stanowi fundament pod badania eksperymentalne, których celem było opracowanie warstwowego, funkcjonalnego rusztowania naczyniowego o kontrolowanej strukturze, dostosowanego do wymagań stawianych protezom naczyń krwionośnych małych średnic.

33

3. Cel i zakres badań

Celem pracy jest opracowanie **protezy naczyniowej o strukturze warstwowej, włóknistej i właściwościach mechanicznych zbliżonych do właściwości naczyń krwionośnych** Struktura protezy ma sprzyjać adhezji i proliferacji komórek zasiedlających naczynia krwionośne oraz minimalizować proces adhezji płytek krwi.

W ramach głównego celu pracy wyróżniono trzy szczegółowe cele badawcze:

1. Dobór parametrów procesu wytwarzania włóknin o zadanych właściwościach metodą rozdmuchu roztworu polimeru

Zastosowane parametry procesu rozdmuchu roztworu polimeru, jak również właściwości polimerów oraz roztworów polimerów, z których wytwarzane są włókna, wpływają znacząco na morfologię i właściwości otrzymywanych materiałów włóknistych.

W ramach pierwszego szczegółowego celu badawczego określono wpływ kluczowych zmiennych: twardości poliuretanu, stężenia polimeru w roztworze, natężenia przepływu roztworu polimeru, ciśnienia gazu oraz prędkości obrotowej kolektora na: przędzalność roztworów, średnicę włókien, porowatość, rozmiar porów oraz właściwości mechaniczne wytwarzanych materiałów.

Przeprowadzone analizy umożliwiły określenie zależności pomiędzy kluczowymi parametrami procesu rozdmuchu roztworu polimeru oraz parametrami roztworów polimerów a morfologią, strukturą i właściwościami mechanicznymi otrzymywanych materiałów włóknistych. Na tej podstawie wyselekcjonowano warunki procesowe pozwalające na formowanie struktur o kontrolowanej morfologii, co stanowiło punkt wyjścia do dalszych analiz.

2. Ocena wpływu morfologii powierzchni na wzrost wybranych typów komórek zasiedlających naczynia krwionośne

Efektywność rusztowań komórkowych zależy w dużej mierze od ich zdolności do wspierania aktywności biologicznej zasiedlających je komórek, a w przypadku materiałów mających kontakt z krwią, także od ich hemozgodności. Morfologia powierzchni i struktura włóknistych biomateriałów w tym: średnica i orientacja włókien, porowatość oraz rozmiar porów mogą istotnie modulować adhezję, proliferację i migrację komórek budujących naczynia krwionośne.

W ramach drugiego celu szczegółowego oceniono odpowiedź biologiczną komórek pokrywających wnętrze oraz budujących ścianę naczynia krwionośnego na kontakt z materiałami włóknistymi o różnej morfologii i strukturze. Ponadto zbadano zachowanie płytek krwi w kontakcie z powierzchnią biomateriałów.

Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką zgodność opracowanych materiałów z płytkami krwi, wskazując na ich niski potencjał trombogenny. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wyodrębnienie powierzchni najbardziej sprzyjających zasiedlaniu przez poszczególne typy komórek budujących naczynia krwionośne, co miało kluczowe znaczenie w dalszym etapie projektowania funkcjonalnych protez.

3. Otrzymanie protez naczyń krwionośnych o strukturze dobranej w toku dotychczasowych badań i ocena ich właściwości

Struktura rusztowania komórkowego oraz jego właściwości mechaniczne powinny być ściśle dostosowane do specyfiki tkanki, którą ma zastępować lub wspierać w procesie regeneracji. W przypadku naczyń krwionośnych istotne jest odwzorowanie układu przestrzennego i organizacji ściany naczynia, które umożliwią zasiedlenie rusztowania komórkami, a także zapewnią jego elastyczność i szczelność.

Bazując na wynikach uzyskanych w ramach realizacji celów 1 i 2, w ostatniej części pracy opracowano cylindryczne, warstwowe włókniste rusztowania, których poszczególne warstwy zostały zaprojektowane tak, aby odzwierciedlać funkcjonalną strukturę fizjologicznego naczynia krwionośnego. Zaprojektowano i wytworzono protezy naczyniowe o różnych morfologiach powierzchni zewnętrznej i wewnętrznej, które dają wysoki potencjał do zasiedlania przez określone typy komórek budujących naczynie krwionośne.

W ramach tego etapu dokonano oceny właściwości mechanicznych, morfologii warstw oraz zgodności biologicznej wytworzonych protez naczyń krwionośnych.

W oparciu o opisane powyżej cele oraz w odpowiedzi na zidentyfikowaną lukę badawczą związaną z brakiem doniesień literaturowych dotyczących wykorzystania procesu rozdmuchu roztworu polimeru do wytwarzania poliuretanowych protez naczyniowych, a także mając na uwadze potencjał tej technologii do efektywnego projektowania biomateriałów, sformułowano następujące tezy badawcze:

Teza 1: W procesie rozdmuchu roztworu polimeru możliwe jest wytworzenie materiałów włóknistych o kontrolowanej morfologii z wybranych poliuretanów

Teza 2: Technologia rozdmuchu roztworu polimeru umożliwia otrzymywanie protez naczyniowych spełniających założone kryteria strukturalne i mechaniczne
4. Część doświadczalna

W części doświadczalnej przedstawiono podsumowanie wyników badań opisanych w cyklu publikacji będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej koncentrujących się na: (1) doborze parametrów procesu rozdmuchu roztworu polimeru prowadzących do wytworzenia poliuretanowych materiałów włóknistych o pożądanych właściwościach mechanicznych oraz morfologii (średnice włókien, rozmiar porów, porowatość, ukierunkowanie włókien) (Publikacje P1 – P3); (2) ocenie wpływu morfologii powierzchni na wzrost wybranych typów komórek zasiedlających naczynia krwionośne (Publikacje P3 i P4); (3) otrzymaniu protez naczyń krwionośnych o strukturze dobranej w toku dotychczasowych badań i ocenie ich właściwości (Publikacja P5).

Jak opisano w podrozdziale 2.3, poliuretany, a w szczególności poliuretany węglanowe, są obiecującym materiałem do wytwarzania wyrobów medycznych do leczenia chorób sercowo-naczyniowych. W niniejszej pracy do badań wykorzystano komercyjnie dostępne poliuretany (PU) klasy medycznej Chronoflex[®]C będące grupą aromatycznych elastomerów na bazie poliwęglanu, charakteryzujące się niskim modułem sprężystości (modułem Younga (MY)) oraz wysoką odpornością na pękanie naprężeniowe. PU Chronoflex[®]C są nieinwazyjnymi polimerami zalecanymi do stosowania jako krótko- i długoterminowe materiały implantowane w leczeniu schorzeń onkologicznych, ortopedycznych oraz sercowo-naczyniowych [124].

Poliuretanowe protezy wytwarzano metodą rozdmuchu roztworu polimeru (ang. *solution blow spinning*, SBS), wykorzystując aparaturę dostępną na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Bioprocesowej Politechniki Warszawskiej. Stanowisko do wytwarzania materiałów w procesie SBS, przedstawione schematycznie na Rysunku 3, składało się z:

- układu koncentrycznych dysz, zapewniającego odpowiedni przepływ roztworu polimeru (dysza wewnętrzna) i powietrza (dysza zewnętrzna);
- kolektora, na którym zbierano włókna;
- infuzyjnej pompy strzykawkowej umożliwiającej podawanie roztworu polimeru z zadanym natężeniem przepływu;
- źródła sprężonego powietrza.

Zastosowana aparatura umożliwiała zmianę parametrów procesu wytwarzania włókien (szybkości podawania roztworu polimeru, ciśnienia sprężonego powietrza, odległości między

dyszą a kolektorem, prędkości obrotowej kolektora) oraz parametrów roztworu polimeru (stężenia polimeru w roztworze, twardości polimeru).



Rysunek 3. Schemat stanowiska do wytwarzania materiałów włóknistych metodą rozdmuchu roztworu polimeru. Utworzono w BioRender.com.

Biomateriały mające potencjalne zastosowanie jako rusztowania komórkowe powinny swoją strukturą naśladować strukturę tkanki, którą mają zastępować. Celem prac było opracowanie implantów, które będą spełniały założone **podstawowe wymagania stawiane protezom naczyń krwionośnych**:

1. Struktura naśladująca warstwową budowę naczynia krwionośnego: poszczególne warstwy charakteryzują się odmienną morfologią, aby wspierać zasiedlanie protezy różnymi typami komórek budujących naczynia krwionośne i zapewniać odpowiednią szczelność protezy;

2. Właściwości mechaniczne zbliżone do właściwości naczyń ludzkich (MY < 10 MPa);

3. Kontakt wewnętrznej powierzchni protezy z krwią skutkujący niską adhezją płytek krwi, zbliżoną do wartości uzyskanych dla protez referencyjnych wytworzonych z ePTFE;

4. Powierzchnia protezy wykazująca właściwości niehemolityczne.

4.1 Dobór parametrów procesu wytwarzania włóknin o zadanych właściwościach metodą rozdmuchu roztworu polimeru

W pierwszej części przeprowadzonych badań oceniano przędzalność wybranych roztworów poliuretanów oraz wpływ zmiany wybranych parametrów procesu SBS (ciśnienia powietrza, natężenia przepływu roztworu polimeru oraz prędkości obrotowej kolektora) na morfologię wytwarzanych włókien i materiałów włóknistych (Publikacje P1 - P3). Ponadto określono wpływ stężenia polimeru w roztworze na średnice włókien, rozmiar porów i porowatość materiałów, a także wpływ twardości PU na właściwości mechaniczne otrzymywanych włóknin.

Ocena przędzalności roztworów poliuretanów oraz wpływu stężenia polimeru w roztworze i twardości polimeru na właściwości materiałów

Do badań wybrano poliuretany (PU) Chronoflex[®]C o twardościach 75A, 80A, 93A, 45D oraz 75D w skali Shore'a. PU Chronoflex[®]C są polimerami o ograniczonej rozpuszczalności w większości popularnych rozpuszczalników organicznych. 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2propanol został wybrany jako najkorzystniejszy rozpuszczalnik (wysoka lotność, dobra rozpuszczalność poliuretanów w szerokim zakresie stężeń) dla PU Chronoflex[®]C na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych przez innych członków Zespołu. Dla uproszczenia PU Chronoflex[®]C w dalszej części pracy będą określane jako PU.

W pierwszej kolejności badano przędzalność roztworów polimerów dla wszystkich badanych PU w zakresie stężeń 2-10% (w/w). Roztwory polimerów były podawane do układu koncentrycznych dysz ze stałym natężeniem przepływu (30 ml/h), a następnie włókna polimerowe były rozciągane i przenoszone w strumieniu powietrza (o ciśnieniu wlotowym 0,1 MPa) w kierunku cylindrycznego kolektora, obracającego się ze stałą prędkością (3 000 obrotów/min) (Rysunek 3). Jeśli nie zaznaczono inaczej, podane parametry procesu SBS były stałe podczas wytwarzania materiałów, których właściwości opisano w niniejszej pracy.

Wyniki opisane w Publikacji P1 wykazały, że ze wszystkie badane PU są przędzalne, jednak dla każdego z nich istnieje inny zakres stężeń (okno przędzalności), dla którego możliwe jest wytworzenie włókien metodą SBS. W przypadku PU o twardości 75A, włókna uzyskano ze stężeń roztworów w zakresie 2,0-7,0%, dla PU o twardości 80A w zakresie 3,0-10,0%, dla PU o twardości 93A w zakresie 3,0-8,0%, dla PU o twardości 45D w zakresie 4,0-7,5%, a dla PU o twardości 75D w zakresie 3,0-7,0%. Nie zaobserwowano korelacji między twardością PU a zakresem stężeń, z którego możliwe było wytworzenie włókien. Wyniki

pomiarów średnic włókien wykazały, że stężenie polimeru w roztworze, z którego wytwarzane są materiały włókniste, wpływa na rozmiar otrzymywanych włókien, niezależnie od twardości PU, z którego są wytwarzane. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano wzrost średniej średnicy włókien wraz ze wzrostem stężenia polimeru w roztworze dla wszystkich badanych PU. Najmniejsze średnie średnice włókien uzyskane dla wszystkich PU wynosiły około 200 nm, podczas gdy największe uzyskane średnie średnice włókien wynosiły od ok. 1000 nm (PU 93A) do ok. 2500 nm (PU 45D) (Rysunek 4).



Rysunek 4. Średnica włókien w zależności od **stężenia polimeru w roztworze** dla poliuretanów **o różnych twardościach w skali Shore'a**. Przerywanymi liniami oznaczono średnice włókien wynoszące 200 nm i 1 000 nm. Każdy z badanych polimerów charakteryzuje się innym oknem przędzalności. Średnia średnica włókien wzrasta wraz ze wzrostem stężenia polimeru niezależnie od twardości PU. Najmniejsze średnie średnice włókien uzyskane dla wszystkich PU wynosiły ok. 200 nm, podczas gdy największe średnie średnice wynosiły od ok. 1 000 nm (PU 93A) do ok. 2500 nm (PU 45D). Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji P1 [126] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Następnie z każdego z badanych PU wytworzono materiały o zadanych średnich średnicach włókien wynoszących ok. 200, 500 i 1 000 nm. Analiza obrazów otrzymanych przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) wykazała, że włókna w wytworzonych materiałach były ułożone w sposób losowy (Rysunek 5). Na powierzchni oraz w strukturze materiałów obserowowano defekty w postaci plam i zgrubień, typowe dla materiałów wytwarzanych metodą rozdmuchu roztworu polimeru. Najwyższe porowatości (0,8-0,9) otrzymano dla materiałów wytworzonych z PU o twardości 75D. Porowatości materiałów wytworzonych z pozostałych badanych PU (75A, 80A, 93A i 45D) były zbliżone i mieściły się w zakresie 0,6-0,7 niezależnie od średnicy włókien (Fig. 2(C) w Publikacji **P1**).

Właściwości mechaniczne materiałów włóknistych badanych w niniejszej pracy mierzono metodą statycznej próby rozciągania zgodnie z normą ASTM D 638-02a - Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics [125]. Zgodnie z oczekiwaniami, wyniki badań opisane w Publikacji P1 wykazały, że właściwości mechaniczne materiałów włóknistych zależą od twardości poliuretanu, z którego wytworzone są włókna oraz od średnicy włókien (Rysunek 6). Najmniej elastyczne materiały (o najwyższych wartościach MY wynoszących 6,7–22,6 MPa) zostały wytworzone z najbardziej twardego PU o twardości 75D. Materiały włókniste wytworzone z PU o twardościach 75A, 80A, 93A i 45D wykazały zbliżoną wysoką elastyczność i charakteryzowały się wartościami MY nieprzekraczającymi 3MPa. Jednocześnie dla materiałów wytworzonych z PU o twardościach 75A, 80A i 93A zaobserwowano wzrost elastyczności materiałów (zmniejszenie wartości MY) wraz ze wzrostem średnicy włókien, natomiast dla materiałów wytworzonych z PU o twardości 45D wzrost elastyczności zaobserwowano tylko dla materiałów o średnicach włókien 1 000 nm (największych badanych). W przypadku materiałów wytworzonych z PU o twardości 75D elastyczność malała wraz ze wzrostem średniej średnicy włókien (Rysunek 6(A)). Spośród badanych materiałów największą odporność na odkształcenia wykazywały materiały wytworzone z PU o twardości 75A, a najmniejszą z PU o twardości 75D. Odporność na odkształcenia (maksymalne naprężenia) wytworzonych materiałów rosła wraz ze wzrostem średnicy włókien dla materiałów wytworzonych z PU o twardości 75D oraz malała w przypadku materiałów wytworzonych z PU o twardościach 75A i 80A. Nie zaobserwowano jednoznacznej zależności między średnicą włókien, a odpornością na odkształcenia dla materiałów wytworzonych z PU o twardościach 93A oraz 45D (Rysunek 6(B)). Największe wydłużenia próbek w momencie zerwania zaobserwowano dla materiałów najbardziej elastycznych wytworzonych z PU o twardości 75A (ok. 2 mm/mm), a najmniejsze z materiałów

najbardziej sztywnych PU o twardości 75D (0,3-0,6 mm/mm), co odzwierciedla właściwości elastyczne materiałów wytworzonych z tych PU (Rysunek 6 (A) i (C)).



Rysunek 5. Obrazy SEM powierzchni materiałów o średnich **średnicach włókien 200, 500 i 1 000 nm** wytworzonych z **PU o różnych twardościach w skali Shore'a.** Skala: 20 µm. Niezależnie od średnicy włókien i twardości PU włókna były ułożone w sposób losowy, a na powierzchni oraz w strukturze materiałów widoczne są defekty w postaci plam i zgrubień. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P1** [126] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).



Rysunek 6. Właściwości mechaniczne materiałów włóknistych o różnych średnicach włókien wytworzonych z PU o różnych twardościach w skali Shore'a: moduł Younga (A), maksymalne naprężenia (B), wydłużenie przy zerwaniu (C). Twardość PU, z którego wytwarzano włókna, miała znaczący wpływ na właściwości mechaniczne wytworzonych materiałów. Najbardziej sztywne materiały wytworzono z PU o największej twardości (75D), podczas gdy materiały wytworzone z pozostałych PU (75A, 80A, 93A, 45D) wykazywały zbliżoną, wysoką elastyczność. Dla materiałów elastycznych (75A, 80A, 93A, 45D) zaobserwowano wzrost elastyczności wraz ze wzrostem średnicy włókien, natomiast dla materiałów sztywnych (75D) zależność ta była odwrotna. Spośród badanych materiałów największą odporność na odkształcenia wytworzonych materiały wytworzone z PU 75A, a najmniejszą z PU 75D. Odporność na odkształcenia wytworzonych materiałów rosła wraz ze wzrostem średnicy włókien materiałów wytworzonych z PU 75D oraz malała w przypadku materiałów wytworzonych z PU 75A i PU 80A. Obserwowane stopnie wydłużenia próbek w momencie zerwania odzwierciedlają właściwości elastyczne materiałów. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P1** [126] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Opisane w niniejszym podrozdziale badania, stanowiące treść Publikacji P1, stanowią punkt wyjścia oraz merytoryczny trzon niniejszej rozprawy doktorskiej. Przeprowadzona analiza przędzalności pięciu PU medycznych o zróżnicowanej twardości wykazała, że wszystkie zbadane polimery są przędzalne w procesie SBS, jednak wykazują indywidualne okna przędzalności. Ponadto dla każdej badanej twardości PU istniało indywidualne stężenie polimeru w roztworze pozwalające na otrzymanie włókien o zadanej średniej średnicy. Kluczowe zależności wykazane w tej części pracy dotyczyły wpływu twardości PU i średnicy włókien na porowatość i właściwości mechaniczne otrzymywanych materiałów. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych etapów badań wyselekcjonowano materiały wytworzone z PU o twardościach 75A oraz 75D, charakteryzujące się odmiennymi właściwościami mechanicznymi i porowatością. Materiałów wytworzonych z PU o twardościach 80A, 93A i 45D nie uwzględniono w dalszych z PU 75A.

Ocena wpływu ciśnienia powietrza oraz natężenia przepływu roztworu polimeru na właściwości materiałów

W Publikacji **P2** zbadano wpływ wybranych parametrów procesu SBS (natężenia przepływu roztworu polimeru w zakresie 10-50 ml/h oraz ciśnienia powietrza w zakresie 0,05-0,2 MPa) na morfologię otrzymywanych włóknin (w szczególności liczbę i rodzaj defektów). Badania przeprowadzono na materiałach wytworzonych z PU o twardościach 75A oraz 75D o średnicach 250 i 1 000 nm wybranych na podstawie istotnych różnic we właściwościach tychże materiałów, które wykazano w Publikacji **P1**. Podczas analizy wpływu zmiany ciśnienia powietrza na morfologię włókien, w trakcie wytwarzania włókien, stosowano stałe natężenie przepływu roztworu polimeru wynoszące 30 ml/h. Natomiast podczas analizy wpływu zmiany natężenia przepływu roztworu polimeru na morfologię włókien stosowano stałą wartość ciśnienia powietrza wynoszącą 0,1 MPa.

Do oceny wpływu zmiany analizowanych parametrów procesu SBS na morfologię materiałów wykorzystano obrazy SEM powierzchni wytworzonych próbek, na podstawie których policzono defekty (w postaci plam roztworu polimeru oraz zgrubień i skręceń włókien) obecne na powierzchni materiałów. Uzyskane wyniki, przedstawione w Table 1 w Publikacji **P2**, wykazały, że oba analizowane parametry procesu SBS wpływają na morfologię wytwarzanych włókien oraz przędzalność roztworów polimerów. Analiza obrazów SEM

morfologii powierzchni wytworzonych materiałów udowodniła, że na jakość (liczba i rozmiar defektów) materiałów włóknistych silny wpływ ma ciśnienie powietrza oraz, w nieco mniejszym stopniu, natężenie przepływu roztworu polimeru. Ponadto wykazano, że roztwory polimerów o wysokich stężeniach wymagają zapewnienia wyższej siły napędowej do prowadzenia procesu SBS (wyższego ciśnienia powietrza) niż roztwory o niskich stężeniach, przy takich samych pozostałych parametrach procesu. W przypadku wysokich stężeń roztworów polimerów niemożliwe było wytworzenie włókien przy niskich ciśnieniach powietrza. Reprezentacyjne zestawienie obrazów SEM, przedstawiających morfologie powierzchni materiałów wytwarzanych z roztworu PU o twardości 75A przy różnych ciśnieniach powietrza przedstawiono na Rysunku 7. Szczegółowa analiza liczby defektów w strukturze materiałów pozwoliła na wyodrębnienie najkorzystniejszych wartości ciśnienia powietrza oraz natężenia przepływu roztworu polimeru umożliwiających wytwarzanie materiałów o minimalnej liczbie defektów z PU badanych w ramach niniejszej rozprawy. Dla obu analizowanych PU, niezależnie od średnicy wytwarzanych włókien, wybrane wartości ciśnienia powietrza oraz natężenia przepływu roztworu polimeru wynosiły odpowiednio: 0,1 MPa oraz 30 ml/h.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały także, że rozmiar porów w materiałach włóknistych zależy od średnicy włókien, a więc od stężenia polimeru w roztworze, z którego produkowane są materiały. Zaobserwowano wzrost rozmiaru porów wraz ze wzrostem średnicy włókien (ok. 3µm oraz ok. 35-40 µm dla materiałów o średnich średnicach włókien odpowiednio 250 i 1 000 nm (Fig. 5 w Publikacji **P2**). Otrzymane wyniki pomiarów właściwości mechanicznych materiałów potwierdziły znaczące różnice w elastyczności włóknin wytworzonych z PU o twardościach 75A i 75D wykazane w Publikacji **P1**. Materiały wytworzone z twardego PU 75D wykazywały znacznie niższą elastyczność niż materiały wytworzone z miękkiego PU o twardości 75A (Table 3 w Publikacji **P2**). Otrzymane w Publikacji **P2** wyniki pomiarów MY, odporności na odkształcenia i wydłużenia w zależności od średnicy włókien korelowały w zależnościami opisanymi w Publikacji **P1**.



Rysunek 7. Obrazy SEM materiałów o średniej **średnicy włókien 1 000 nm** wytworzonych z **PU o twardości 75A pod ciśnieniem** (A) 0,1 MPa, (B) 0,125 MPa, (C) 0,15 MPa, (D) 0,175 MPa, (E) 0,2 MPa. Skala: 200 µm. Dla ciśnienia powietrza <0,1 MPa niemożliwe było wytworzenie włókien.

W badaniach przedstawionych w Publikacji P2 skupiono się na analizie wpływu ciśnienia gazu oraz natężenia przepływu roztworu polimeru na właściwości materiałów włóknistych wytworzonych z dwóch wcześniej wyselekcjonowanych poliuretanów o odmiennych twardościach w skali Shore'a (75A i 75D). PU te zostały wybrane na podstawie ich skrajnie różnych właściwości mechanicznych i strukturalnych, wykazanych w Publikacji P1. Badania przeprowadzone w Publikacji P2 pozwoliły na identyfikację najkorzystniejszych parametrów procesu SBS (ciśnienia powietrza: 0,1 MPa i natężenia przepływu roztworu polimeru: 30 ml/h), przy których uzyskiwano poliuretanowe materiały o minimalnej liczbie defektów, niezależnie od rodzaju PU i średnicy włókien. Dodatkowo, analiza właściwości mechanicznych potwierdziła wcześniejsze obserwacje dotyczące elastyczności badanych materiałów. Materiały wytworzone z PU o twardości 75A charakteryzowały się wysoką elastycznością i odpornością na deformację, a także wykazywały cechy pamięci kształtu, pożądane w kontekście konstrukcji funkcjonalnych rusztowań naczyniowych. Natomiast materiały wytworzone z PU o twardości 75D cechowały się znaczącą sztywnością, co w dalszej perspektywie może ograniczać ich integrację z naczyniami krwionośnymi poddawanymi ciągłym odkształceniom.

W efekcie, biorąc pod uwagę zarówno morfologię włóknin, jak i ich właściwości mechaniczne, PU o twardości 75D został wykluczony z dalszych etapów badań. Do kolejnych etapów badań wyselekcjonowano włókniny wytworzone z PU o twardości 75A, które dzięki stabilnemu procesowi przędzenia, niskiej liczbie defektów oraz wysokiej elastyczności wykazują największy potencjał do wykorzystania w konstrukcji funkcjonalnych, warstwowych protez naczyń krwionośnych małych średnic.

Ocena wpływu prędkości obrotowej kolektora na właściwości materiałów

Jak opisano w podrozdziale 2.4, zwiększanie prędkości obrotowej kolektora prowadzi do ukierunkowania włókien w materiale wytwarzanym w procesie SBS. W Publikacji P3 zbadano wpływ prędkości obrotowej kolektora w zakresie 200-25 000 rpm na ułożenie włókien w poliuretanowych materiałach włóknistych o średnich średnicach włókien 200, 500 i 1 000 nm. Uzyskane wyniki wykazały, że średnica włókien ma znaczący wpływ na możliwość zmiany ułożenia włókien w materiale (ukierunkowanie). Na podstawie obrazów SEM wytworzonych materiałów włóknistych zmierzono kąty odchylenia włókien od prostej prostopadłej do dolnej krawędzi obrazu. Przyjęto, że włókna są ukierunkowane, jeżeli kąt ten jest mniejszy niż 30°. Zmianę kierunku ułożenia włókien uzyskano dla materiałów o średnich średnicach włókien ≥500 nm (Figure 3-4 w Publikacji P3). Materiały o włóknach ukierunkowanych (gdzie średni kąt odchylenia włókna od kierunku uporządkowania wynosił <30°) uzyskano dla prędkości obrotowych kolektora >10 000 rpm dla materiałów o średnich średnicach włókien 500 nm oraz ≥10 000 rpm dla materiałów o średnich średnicach włókien 1 000 nm (Rysunek 8). Przy czym niższe kąty odchylenia włókien od kierunku uporządkowania uzyskiwano dla materiałów o wiekszych średnicach przy zastosowania tych samych predkości obrotowych kolektora (Rysunek 9 (A)). W przypadku materiałów o najmniejszych badanych średnicach włókien (200 nm), dla badanego zakresu prędkości obrotowej kolektora nie zaobserwowano wpływu zmiany prędkości obrotowej kolektora na ułożenie włókien w materiale (Figure 2 w Publikacji P3). Niezależnie od prędkości obrotowej kolektora kąty odchylenia włókien od kierunku uporządkowania dla tych materiałów wynosiły 40-50° (Rysunek 9 (A)).

Następnie w Publikacji **P3** opisano wyniki badań wpływu zmiany prędkości obrotowej kolektora na średnice otrzymywanych włókien. **Wyniki pomiarów wykazały, że zwiększenie**

prędkości obrotowej kolektora wpływa na zmniejszenie średnicy włókien w przypadku materiałów o średnich średnicach włókien ≥500 nm (Rysunek 9 (B)). Ponadto, podczas analizy rozkładów średnic włókien dla materiałów o średnich średnicach włókien ≥500 nm zaobserwowano zwężanie się rozkładów średnic wraz ze zwiększaniem prędkości obrotowej kolektora oraz przesunięcie rozkładów w stronę wartości mniejszych (Figure S4 w Publikacji P3). W przypadku materiałów o średnich średnicach włókien wynoszących 200 nm nie zaobserwowano znaczącego wpływu zmiany prędkości obrotowej kolektora na średnice włókien dla badanego zakresu prędkości obrotowych kolektor (Rysunek 9 (B)). W wyniku przeprowadzonych badań wyznaczono prędkości obrotowe kolektora umożliwiające otrzymanie materiałów o włóknach nieukierunkowanych i ukierunkowanych wynoszące odpowiednio 5 000 rpm i 25 000 rpm.



Rysunek 8. Obrazy SEM materiałów włóknistych o średniej średnicy włókien 1 000 nm wytworzonych z PU 75A przy prędkości obrotowej kolektora: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm, (C) 1 000 rpm, (D) 5 000 rpm, (E) 10 000 rpm, (F) 15 000 rpm, (G) 20 000 rpm, (H). Skale: 100 μ m i 10 μ m. Materiały o włóknach ukierunkowanych uzyskano dla prędkości obrotowych kolektora \geq 10 000 rpm. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji P3 [127] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).



Rysunek 9. Zmiana ukierunkowania włókien (A) oraz zmiana średnicy włókien (B) w materiałach włóknistych w zależności od prędkości obrotowej kolektora. Zmianę kierunku ułożenia włókien uzyskano dla materiałów o średnicach włókien \geq 500 nm. Zwiększenie prędkości obrotowej kolektora wpływa na zmniejszenie średniej średnicy włókien w przypadku materiałów o średnich średnicach włókien \geq 500 nm. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji P3 [127] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

W drugiej części badań opisanych w Publikacji **P3** wytworzono materiały o włóknach nieukierunkowanych i ukierunkowanych o średnich średnicach włókien wynoszących 500 i 1 000 nm i opisano wpływ kierunku ułożenia i średnicy włókien na porowatość, rozmiar porów oraz właściwości mechaniczne wytworzonych materiałów. Nie zaobserwowano znaczącego wpływu średnicy włókien oraz ich ukierunkowania na porowatość materiału (Figure 6(B) w Publikacji **P3**). Natomiast w wyniku **ukierunkowania włókien w materiale zaobserwowano zmniejszenie średniego rozmiaru porów** (Figure 6(A) w Publikacji **P3**).



Rysunek 10. Schemat przedstawiający sposób nakładania włókien nieukierunkowanych i ukierunkowanych na kolektor wraz zaznaczonymi kierunkami wykonywania pomiarów właściwości mechanicznych. Utworzono w BioRender.com. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P3** [127] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Ponadto wykazano, że właściwości mechaniczne materiałów włóknistych zależą od sposobu ułożenia włókien w rozciąganej próbce. Zdefiniowano dwa kierunki rozciągania próbek: wzdłużny i osiowy (Rysunek 10). Wykazano, że próbki rozciągane w kierunku wzdłużnym charakteryzują się wyższą elastycznością (wartości MY wynoszące 0,8-1,7 MPa) niż próbki rozciągane kierunku osiowym (wartości MY wynoszące 4,3-7,5 MPa) (Rysunek 11 (A)). Materiały rozciągane w kierunku osiowym charakteryzowały się mniejszym stopniem wydłużenia (80-140%) niż materiały rozciągane w przeciwnym kierunku (220-250%) (Rysunek 11 (B)). Jednocześnie wytrzymałość na odkształcenia materiałów rozciąganych w kierunku osiowym była wyższa (maksymalne naprężenia wynoszące: 12-20 MPa) niż materiałów, które rozciągano kierunku wzdłużnym (5-8 MPa). Ponadto zaobserwowano, że w przypadku materiałów o średnicach włókien wynoszących ok. 1 000 nm (największych badanych) zmiana kierunku ułożenia włókien w materiale wpływa na jego właściwości mechaniczne (Rysunek 11 (C)). Materiały o włóknach ukierunkowanych wykazywały mniejszą

elastyczność i jednocześnie większą odporność na odkształcenia niż materiały o włókach nieukierunkowanych. Przy czym różnice te zaobserwowano tylko w przypadku, gdy próbki były poddawane rozciąganiu w kierunku osiowym (Rysunek 11 (A) i (C)).



Rysunek 11. Właściwości mechaniczne materiałów włóknistych o włóknach nieukierunkowanych (NK) i ukierunkowanych (UK) i średnich średnicach włókien 500 i 1 000 nm w zależności od kierunku rozciągania: moduł Younga (A), wydłużenie przy zerwaniu (B), maksymalne naprężenia (C). Kierunek rozciągania miał znaczący wpływ na właściwości mechaniczne włóknin. Materiały rozciągane w kierunku wzdłużnym charakteryzują się wyższą elastycznością i mniejszą odpornością na odkształcenia w porównaniu do materiałów rozciągane w kierunku osiowym. Materiały o średnicach 1 000 nm i włóknach ukierunkowanych rozciągane w kierunku osiowym wykazywały mniejszą elastyczność i jednocześnie większą odporność na odkształcenia niż materiały o włókach nieukierunkowanych i tych samych średnicach. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P3** [127] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Podsumowując, w Publikacji **P3** skoncentrowano się na analizie wpływu prędkości obrotowej kolektora na sposób ułożenia włókien w próbce i ich średnicę, a także właściwości mechaniczne włóknin. Wykazano, że włókna o średnicach ≥500 nm można skutecznie ukierunkować zwiększając prędkość obrotową kolektora. Dodatkowo wykazano, że ukierunkowanie włókien wpływa na właściwości mechaniczne materiału.

Ocena wpływu odległości dysza-kolektor na właściwości materiałów

Zbadano wpływ odległości między dyszą a kolektorem w zakresie 10–50 cm na morfologię oraz porowatość materiałów. Badania przeprowadzono na PU o twardości 75A i średnich średnicach włókien wynoszących ok. 200 nm i 1 000 nm. Na podstawie analizy obrazów SEM powierzchni otrzymanych materiałów wykazano, że w wyniku zwiększania odległości między dyszą a kolektorem zmniejsza się liczba defektów w strukturze materiałów. Natomiast zmniejszenie odległości do 10 cm prowadzi do zatracenia włóknistej struktury materiałów. Materiały wytworzone przy zastosowaniu odległości dysza-kolektor wynoszącej 10 cm charakteryzują się litą strukturą, na której występują nieliczne i niewielkie obszary włókniste (Rysunek 12).

Odległość między dyszą a kolektorem wynoszącą 30 cm uznano za wystarczającą do otrzymania struktur włóknistych dla obu badanych średnic włókien. Jednakże w przypadku materiałów o średnich średnicach włókien wynoszących 200 nm, zwiększenie odległości do 50 cm wpłynęło korzystnie na zredukowanie liczby defektów w strukturze materiałów. Ponadto wykazano, że porowatość materiałów rośnie wraz ze wzrostem odległości między dyszą a kolektorem, niezależnie od średnicy włókien (Rysunek 13).

Wyniki te nie zostały opisane w żadnej z publikacji wchodzących w skład cyklu, jednak stanowią istotny element badań nad wpływem parametrów procesu SBS na właściwości wytwarzanych materiałów włóknistych i zostały wykorzystane podczas projektowania warstwowej protezy opisanej w Publikacji **P5**.



Rysunek 12. Obrazy SEM materiałów wytworzonych z PU o twardości 75A i średnich średnicach włókien 200 i 1 000 nm przy **odległościach dysza-kolektor** wynoszących **10, 30 i 50 cm**. Skala: 50 µm. Zwiększanie odległości między dyszą, a kolektorem wpływa na zmniejszenie liczby defektów w strukturze materiałów. Natomiast zmniejszanie odległości prowadzi do zatracenia włóknistej struktury materiałów.



Rysunek 13. Wpływ odległości dysza-kolektor w zakresie 10–50 cm na porowatość materiałów włóknistych o średnicach włókien 200 nm i 1 000 nm (* $p \le 0.05$, ** $p \le 0.001$). Porowatość materiałów włóknistych wzrasta wraz ze wzrostem odległości dysza-kolektor niezależnie od średnicy włókien.

Wyniki badań opisanych w podrozdziale 4.1 oraz w Publikacjach P1, P2 oraz P3 umożliwiły określenie zależności między kluczowymi parametrami procesu rozdmuchu roztworu polimeru oraz parametrami roztworów polimerów a właściwościami otrzymywanych materiałów włóknistych. Wyselekcjonowano warunki procesowe pozwalające na formowanie struktur o kontrolowanej morfologii, co stanowiło punkt wyjścia do dalszych analiz. Wykazano, że materiały poliuretanowe wytworzone z PU o twardości 75A charakteryzują się najkorzystniejszymi właściwościami z punktu widzenia zastosowania w inżynierii naczyń krwionośnych, dlatego też zostały wybrane do dalszych badań.

Rusztowania komórkowe powinny charakteryzować się nie tylko odpowiednią architekturą przestrzenną i parametrami mechanicznymi, ale przede wszystkim zdolnością do skutecznego wspierania procesów biologicznych. Idealne rusztowanie powinna cechować morfologia wspierająca adhezję, proliferację i migrację komórek, które je zasiedlają. Dostępne dane literaturowe wykazują, że morfologia biomateriału (średnice włókien, orientacja włókien, rozmiar, ilość i ułożenie porów) modulują zachowanie komórek rosnących na jego powierzchni [128], [129], [130].

W kontekście powyższych założeń, w dalszej części pracy (Publikacje **P3** i **P4**), dokonano oceny wpływu morfologii materiałów włóknistych na wzrost komórek zasiedlających naczynia krwionośne.

4.2 Ocena wpływu morfologii powierzchni na wzrost wybranych typów komórek zasiedlających naczynia krwionośne

Analiza wpływu morfologii powierzchni materiałów na wzrost komórek zasiedlających ścianę naczynia krwionośnego

W Publikacji **P3** zbadano wpływ orientacji oraz średnicy włókien na wzrost perycytów. Badania te przeprowadzono podczas stażu badawczego (Staż **S1**) w University Hospital Erlangen, Section of Experimental Medicine and Nanotechnology w grupie badawczej mającej wieloletnie doświadczenie w medycynie regeneracyjnej w tym medycynie sercowonaczyniowej. Na podstawie badań prowadzonych przez grupę badawczą z Erlangen perycyty zostały wybrane jako modelowe komórki do oceny właściwości materiałów włóknistych mających budować ścianę naczynia krwionośnego.

Badania przeprowadzono na materiałach włóknistych o włóknach nieukierunkowanych i ukierunkowanych oraz o średnich średnicach włókien wynoszących 500 i 1 000 nm. Zbadano wpływ średnicy oraz kierunku ułożenia włókien na wzrost perycytów.

W ciągu pierwszych 3 dni prowadzenia hodowli nie zaobserwowano istotnych zmian w stopniu pokrycia powierzchni materiałów przez komórki. Jednocześnie wykazano istotne różnice w morfologii komórek rosnących na włóknach ukierunkowanych i nieukierunkowanych (Rysunek 14 (A)). Po 3 dniach prowadzenia eksperymentu komórki hodowane na włóknach ukierunkowanych wykazywały wyraźnie wydłużony, wrzecionowaty kształt, a ich ułożenie było jednorodnie zorientowane wzdłuż kierunku ułożenia włókien. Z kolei na włóknach nieukierunkowanych obserwowano perycyty przypadkowo zorientowane, a także niecałkowicie wydłużone.

Po 7 dniach prowadzenia hodowli komórki rosnące na włóknach ukierunkowanych tworzyły wyraźne jednorodnie zorientowane warstwy. Natomiast perycyty rosnące na materiałach o włóknach nieukierunkowanych charakteryzowały się bardziej zróżnicowaną morfologią i niejednorodnym kierunkiem wzrostu. Zaobserwowano również różnice w stopniu pokrycia powierzchni materiałów przez komórki. Wyniki wykazały znacząco niższy stopień pokrycia powierzchni materiałów o włóknach nieukierunkowanych i średnich średnicach 500 nm (68%), w porównaniu dla włókien ukierunkowanych o tych samych średnicach (89%). W przypadku materiałów o średnich średnicach włókien wynoszących ok. 1 000nm, stopień pokrycia powierzchni wynosił 95-100% niezależnie od sposobu ułożenia włókien w materiale (Rysunek 14 (B)). Różnice w morfologii komórek i jednocześnie brak znaczących różnic w stopniu pokrycia powierzchni przez komórki materiałów o włóknach ukierunkowanych



Rysunek 14. Perycyty rosnące na powierzchni materiałów o włóknach nieukierunkowanych i ukierunkowanych, o średnich średnicach włókien wynoszących ok. 500 i 1 000 nm. Na kolor zielony wybarwiono filamenty aktynowe. Obrazy wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego (CLSM). Skala: 200 µm (obrazy SEM) i 100 µm (obrazy CLSM) (A); Stopień pokrycia powierzchni przez perycyty w zależności od ukierunkowania i średnicy włókien w materiale (B). Perycyty rosnące na materiałach o włóknach ukierunkowanych charakteryzowały się wyraźnie wydłużonym kształtem oraz tworzyły wyraźnie zorientowane warstwy w przeciwieństwie do komórek rosnących na materiałach o włóknach nieukierunkowanych. Wzrost komórek jest zależny od ukierunkowania i średnicy włókien. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P3** [127] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

i nieukierunkowanych i średnicach 1 000 nm wskazują, że większa średnica włókien zapewnia korzystniejsze warunki proliferacyjne dla perycytów, co skutkowało całkowitym pokryciem powierzchni niezależnie od kierunku ułożenia włókien.

Przeprowadzone badania wykazały, że poliuretanowe materiały włókniste wspierają wzrost perycytów na swojej powierzchni, przy czym jest on zależny zarówno od ukierunkowania, jak i średnicy włókien.

Dodatkowo, wyniki badań opisanych w Publikacji **P4** przeprowadzonych przez innych członków Zespołu wykazały, że średnica porów w materiale włóknistym ma znaczący wpływ na wnikanie komórek budujących ścianę naczynia w głąb struktury materiału. Efekt wnikania zaobserwowano, jedynie w przypadku materiałów o największych analizowanych średnicach włókien wynoszących 1 000 nm. Zaobserwowany efekt sugeruje zdolność tych materiałów do wspierania zasiedlania ściany protezy naczynia krwionośnego komórkami (Fig. 5(E) i Fig. 8 w Publikacji **P4**).

Analiza wpływu morfologii powierzchni materiałów na wzrost komórek zasiedlających powierzchnię wewnętrzną naczynia krwionośnego

Na potrzeby prowadzonych badań wytypowano sześć poliuretanowych materiałów wytwarzanych w procesie rozdmuchu roztworu polimeru różniących się morfologią powierzchni, a następnie zbadano szybkość wzrostu komórek śródbłonka (ang. *endothelial cells*, ECs) oraz ich zdolność do tworzenia monowarstwy na powierzchniach biomateriałów (Publikacja **P4**). Ludzkie komórki ECs hodowano na powierzchni materiałów włóknistych o średnicach włókien ok. 200, 500 i 1 000 nm oraz na powierzchniach litych z niewielkimi obszarami włóknistymi. Materiały o litej morfologii zostały wytworzone z roztworów polimerów o tych samych stężeniach co materiały włókniste, przy zastosowaniu mniejszej odległości między dyszą a kolektorem (10 cm). W dalszej części pracy materiały te określano jako "lite" o średnicach włókien (w nielicznych obszarach włóknistych) 200, 500 lub 1 000 nm.

Wyniki uzyskane po 1 dniu prowadzenia hodowli wykazały, że adhezja komórek ECs była zbliżona niezależnie od typu analizowanej powierzchni i średnicy włókien (Rysunek 15 (B)). W trakcie prowadzenia hodowli (dzień 3) zaobserwowano większy odsetek pokrycia powierzchni komórkami ECs dla materiałów litych w porównaniu z włóknistymi. Po 6 dniach prowadzenia hodowli najwięcej komórek zaobserwowano na materiałach litych o średnich średnicach włókien wynoszących ok. 200 i 500 nm (ok. 60-65%) oraz na materiałach



Rysunek 15. Komórki śródbłonka rosnące na powierzchni materiałów po 6 dniach hodowli, skala: 100 μm (A); oraz **stopień pokrycia powierzchni** przez komórki (B). Na kolor zielony wybarwiono filamenty aktynowe, na kolor niebieski jądra. Po 6 dniach hodowli najwięcej komórek zaobserwowano na materiałach litych o średnich średnicach włókien wynoszących ok. 200 i 500 nm oraz na materiałach włóknistych o średnicach włókien wynoszących ok. 200 nm. Na tych powierzchniach wykazano obecność obszarów, gdzie widoczna była monowarstwa komórek śródbłonka. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P4** [131] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

włóknistych o średnicach włókien wynoszących ok. 200 nm (46%). Na tych powierzchniach wykazano obecność obszarów, gdzie widoczna była monowarstwa komórek ECs (Rysunek 15 (A)). Najsłabszy wzrost komórek zaobserwowano na materiałach o średnicach włókien 1 000 nm niezależnie od morfologii powierzchni (lita/włóknista). Średnica włókien miała także wpływ na morfologię komórek. Morfologię "kostki brukowej", prawidłową dla komórek ECs rosnących w warunkach statycznych, wykazywały komórki rosnące na materiałach włóknistych o najmniejszych średnicach włókien. Wraz ze wzrostem średnicy włókien komórki cechowały się bardziej wydłużonym kształtem. W przypadku materiałów litych nie zaobserwowano żadnych nieprawidłowości ani zmian w morfologii komórek.

Ocena wpływu twardości PU i średnicy włókien na adhezję płytek krwi

Warto podkreślić, że oprócz wspierania adhezji i wzrostu komórek, morfologia powierzchni biomateriałów ma również istotny wpływ na interakcje z elementami morfotycznymi krwi.

W Publikacji **P1** oceniono wpływ twardości PU i średnicy włókien na adhezję płytek krwi. Badaniom poddano materiały wytworzone z PU o twardościach: 75A, 83A, 90A, 45D i 75D i średnich średnicach włókien wynoszących ok. 200, 500 i 1 000 nm. Obrazy SEM materiałów włóknistych po kontakcie z pełną krwią przestawiono na Fig 5. w Publikacji **P1**.

Po kontakcie materiałów z pełną krwią, płytki krwi pokrywały mniej niż 1% powierzchni materiałów niezależnie od twardości PU i średnicy włókien (Rysunek 16). Wśród obserwowanych płytek krwi wyróżniono płytki o morfologiach odpowiadających różnym stadiom aktywacji, tj. płytki o kształcie sferycznym, eliptycznym, sferycznym z filopodiami, płaskim rozpłaszczonym. Zaobserwowano również pojedyncze agregaty płytek. Analiza obrazów SEM wykazała, że na materiałach o większych średnicach włókien widocznych jest więcej płytek o kulistym kształcie. Jednakże, nie wykazano żadnej korelacji między twardością poliuretanu, a kształtem płytek oraz wielkością i ilością agregatów. Ponadto, na powierzchniach próbek nie zaobserwowano obecności innych elementów morfotycznych krwi, co wskazuje na ograniczoną aktywność materiału w kontekście indukcji krzepnięcia. Tak **niski stopień pokrycia powierzchni przez płytki, świadczy o tym, że materiał nie promuje adhezji płytek krwi.**

Badania opisane w Publikacjach **P3** i **P4** skupiające się nad oceną odpowiedzi komórek budujących ściany oraz powierzchnię wewnętrzną naczyń krwionośnych na kontakt z powierzchniami włóknistymi o różnych morfologiach pozwoliły na wytypowanie materiałów spełniających założenia koncepcyjne pracy związane z opracowaniem rusztowań komórkowych do zastosowania jako protezy naczyń krwionośnych. Wykazano, że powierzchnie ukierunkowane o średnicach włókien ≥500 nm promują wzrost komórek zasiedlających ścianę naczynia krwionośnego, natomiast powierzchnie lite z obszarami włóknistymi o średnicach ≤500 nm i włókniste o średnicach włókien wynoszacych ok. 200 nm wspierają wzrost i tworzenie monowarstwy komórek ECs wyściełających światło naczynia krwionośnego. Na podstawie uzyskanych wyników wytworzono warstwowe struktury cylindryczne, których właściwości opisano w Publikacji P5.



Rysunek 16. Stopień **pokrycia powierzchni materiałów włóknistych przez płytki krwi** w zależności od twardości PU z którego wytworzono włókna i średniej średnicy włókien. Po kontakcie z pełną krwią płytki krwi pokrywały mniej niż 1% powierzchni badanych materiałów niezależnie od twardości PU i średnicy włókien, co świadczy o tym, że materiał nie promuje adhezji płytek krwi. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji P1 [126] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

4.3 Otrzymanie protez naczyń krwionośnych o strukturze dobranej w toku dotychczasowych badań i ocena ich właściwości

Dotychczas opisane badania obejmowały dobór najkorzystniejszych parametrów procesu rozdmuchu roztworu polimeru w celu otrzymania włóknin o zróżnicowanej morfologii (Publikacje **P1**, **P2**, **P3**), a następnie ocenę wpływu morfologii materiałów na zachowanie komórek pokrywających powierzchnię wewnętrzną i budujących ścianę naczynia krwionośnego (Publikacje **P3**, **P4**) oraz wpływu twardości poliuretanu i średnicy włókien na adhezję płytek krwi do powierzchni biomateriałów (Publikacja **P1**). Badania te prowadzono na materiałach w **formie płaskiej**. Na podstawie uzyskanych wyników dobrano parametry procesu rozdmuchu roztworu polimeru pozwalające na wytworzenie **trójwymiarowych** biomateriałów odwzorowujących budowę i funkcje naczynia krwionośnego. W rezultacie wytworzono dwa rodzaje cylindrycznych protez naczyń krwionośnych z wysokoelasycznego PU o twardości 75A różniących się morfologią powierzchni wewnętrznej, których właściwości opisano w Publikacji **P5**. Włókniste protezy charakteryzowały się warstwową budową (Rysunek 17) oraz średnicą wewnętrzną i grubością ściany wynoszącymi odpowiednio 5 mm i ok. 700 μm. Struktura poszczególnych warstw (średnice włókien, ukierunkowanie, porowatość) została dobrana na podstawie wyników badań opisanych w Publikacjach **P1-P4**.

Ściana obu typów cylindrycznych biomateriałów zbudowana była z następujących warstw (w kolejności od zewnętrznej do wewnętrznej, Rysunek 17):

- warstwy zewnętrznej, którą stanowiły ukierunkowane włókna o średnich średnicach włókien wynoszących ok. 1 000 nm, wspierającej adhezję i proliferację komórek tworzących ścianę naczynia krwionośnego. Dalej określanej jako warstwa o mikrowłóknach ukierunkowanych;
- warstwy wytworzonej z włókien nieukierunkowanych o średnich średnicach włókien wynoszących ok. 1 000 nm, wspierającej wnikanie komórek budujących ścianę naczynia w głąb struktury w celu zasiedlenia ściany protezy. Dalej określanej jako warstwa o mikrowłóknach nieukierunkowanych;
- warstwy o niskiej porowatości, charakteryzującej się litą morfologią powierzchni z niewielkimi obszarami włóknistymi (stanowiącymi ok. 14% powierzchni wewnętrznej), zapewniającej szczelność protezy. Dalej określanej jako warstwa lita;
- warstwy wewnętrznej stanowiącej powierzchnię wzrostu dla komórek śródbłonka.

Warstwa lita stanowiła warstwę wewnętrzną protez określanych w dalszej części jako "Mikro". Natomiast warstwę wewnętrzną dla drugiego typu protez określanych dalej jako "Nano" stanowiły włókna o średnich średnicach wynoszących ok. 250 nm (Rysunek 17).



Rysunek 17. Porównanie **budowy ścian protez Nano i Mikro**, skala: 200 μm. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P5** [132] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Warstwy mikrowłókniste (ukierunkowana i nieukierunkowana) stanowiły odpowiednio ok. 10% oraz ok. 80% grubości ściany protezy. Warstwa o lita stanowiła ok. 10% grubości ściany. Warstwa nanowłóknista o grubości kilku nanometrów stanowiła 1-3% grubości ściany protezy. W przypadku wewnętrznej powierzchni protez Mikro obszary włókniste stanowiły ok. 14% powierzchni. Porowatość wytworzonych protez wynosiła ok. 40% dla obu typów materiałów.

Wyniki badań szczelności protez w warunkach przepływowych potwierdziły szczelność wytworzonych materiałów zarówno w przypadku testów z wykorzystaniem soli fizjologicznej,

jak i krwi. Nie zaobserwowano również rozwarstwiania ściany protezy w badaniach długoterminowych (30 dni). Dodatkowo, wykazano, że badane powierzchnie nie powodują hemolizy (stopień hemolizy <1% dla obu typów badanych powierzchni).

Badania adhezji płytek krwi do powierzchni protez przeprowadzone przez innych członków Zespołu potwierdziły wyniki uzyskane w ramach badań opisanych w Publikacji **P1** i wykazały, że poliuretanowe protezy nie są trombogenne. Ocena adhezji płytek krwi do powierzchni wewnętrznych materiałów wykazała, że morfologia powierzchni wewnętrznej ma znikomy wpływ na stopień pokrycia powierzchni płytkami.

Wyniki badań wytrzymałościowych wytworzonych protez potwierdziły wysoką elastyczność i wytrzymałość mechaniczną biomateriałów wytworzonych z PU o twardości 75A. Podczas przeprowadzania statycznej próby rozciągania zaobserwowano, że poszczególne warstwy protezy mają różną wytrzymałość na rozciąganie. Typowe krzywe przyłożonej siły od wydłużenia przedstawiono na Fig. 3B w Publikacji **P5**. Jako pierwsze zerwaniu ulegały zewnętrzne warstwy mikrowłókniste (moment ich zerwania oznaczono na wykresie na Fig. 3B w Publikacji **P5** symbolem *), następnie dalszemu rozciąganiu ulegała warstwa niskoporowata (protezy Mikro) lub warstwy niskoporowata i nanowłóknista (protezy Nano). Test kończył się w momencie ich zerwania (oznaczony na Fig. 3B w Publikacji **P5** symbolem #). Charakterystyczny przebieg próby rozciągania świadczy o tym, że warstwa niskoporowata wykazuje największą wytrzymałość mechaniczną na zerwanie. Protezy charakteryzowały się MY wynoszącymi ok. 2,5 MPa oraz maksymalnymi naprężeniami o wartości 10-11 MPa. Brak znaczących różnic w otrzymanych wynikach pomiarów właściwości mechanicznych dla protez Nano i Mikro jest rezultatem zbliżonej struktury obu typów materiałów. Obecność bardzo cienkiej warstwy nanowłóknistej nie wpłynęła na zmianę właściwości mechanicznych protez.

W trakcie drugiego stażu badawczego na University Hospital Erlangen, Section of Experimental Medicine and Nanotechnology (Staż **S2**) opracowano metodę magnetycznego zasiedlania powierzchni zewnętrznej cylindrycznej protezy z wykorzystaniem magnetycznych nanocząstek żelaza (SPIONs). Przeprowadzone badania wykazały, że możliwe jest zasiedlenie powierzchni zewnętrznej protezy komórkami z wykorzystaniem magnetycznych nanocząstek wprowadzanych do komórek i pola magnetycznego wytwarzanego przez magnesy neodymowe umieszczone wewnątrz cylindrycznej struktury (Rysunek 18). Uzyskane wyniki potwierdzają, że zewnętrzna powierzchnia protezy (o włóknach ukierunkowanych o średnich średnicach wynoszących ok. 1 000 nm) wspiera adhezję i wzrost perycytów. Wyniki te nie zostały jeszcze opublikowane.



Rysunek 18. Perycyty zasiedlające zewnętrzną powierzchnię cylindrycznej protezy Nano po 7 dniach prowadzenia hodowli, skala: 200 µm. Na kolor zielony wybarwiono filamenty aktynowe.

Badania przeprowadzone przez innych członków Zespołu potwierdziły, że morfologia powierzchni wewnętrznych protez ma istotny wpływ na wzrost komórek ECs w warunkach 2D (hodowle prowadzono na próbkach płaskich otrzymanych w wyniku rozcięcia cylindrycznych protez). Wykazano, że powierzchnie o morfologii nanowłóknistej (protezy Nano) sprzyjają tworzeniu monowarstwy komórek śródbłonka, osiągając pokrycie powierzchni w zakresie 60–85% po 7 dniach hodowli. Dla porównania, na powierzchniach wewnętrznych protez Mikro obserwowano niższy stopień pokrycia (20–65%), co podkreśla znaczenie morfologii powierzchni w kontekście wspierania adhezji i proliferacji komórek ECs (Rysunek 19 (A) oraz Fig. 6 (A) w Publikacji **P5**)).

W warunkach 3D (materiały cylindryczne) zaobserwowano, że morfologia powierzchni wpływa na adhezję komórek ECs (po 1 dniu hodowli więcej komórek zaobserwowano na powierzchniach wewnętrznych protez Nano), jednak nie była ona wystarczająca do uzyskania jednorodnego i kompletnego pokrycia. Po 7 dniach hodowli odnotowano obecność zarówno obszarów o wysokiej gęstości komórek, jak i przestrzeni słabo skolonizowanych (Fig. 7 (A) w Publikacji **P5**). Stopień pokrycia powierzchni komórkami po 7 dniach hodowli był niższy niż w przypadku hodowli 2D i nie przekraczał 30% dla obu typów protez (Rysunek 19 (B)).

Otrzymany wynik nie jest zaskakujący. Od początku prac przyjęto założenie, że wewnętrzna powierzchnia protezy będzie w kolejnych etapach badań poddawana modyfikacjom chemicznym w celu uzyskania wyższego stopnia pokrycia powierzchni przez komórki ECs. Wyniki uzyskane w modelu 3D potwierdzają słuszność obranej strategii – pokazują, że morfologia to istotny czynnik, który może wspierać wprowadzane w przyszłości modyfikacje chemiczne powierzchni.

Wyniki badań opisane w Publikacji **P5** potwierdziły, że rezultaty uzyskane w ramach wcześniejszych etapów pracy (Publikacje **P1-P4**), obejmujących dobór najkorzystniejszych parametrów procesu SBS oraz analizę wpływu morfologii powierzchni i struktury materiałów włóknistych na ich właściwości mechaniczne i biologiczne, umożliwiły opracowanie rusztowań komórkowych spełniających założone podstawowe kryteria protez naczyń krwionośnych. Otrzymane protezy charakteryzowały się odpowiednią warstwową architekturą, wysoką elastycznością, wytrzymałością mechaniczną oraz nie aktywowały procesów hemolitycznych.



Rysunek 19. Stopień pokrycia powierzchni wewnętrznej protez przez komórki śródbłonka: w warunkach 2D (materiały płaskie) (A); w warunkach 3D (materiały cylindryczne) (B). Morfologia powierzchni wewnętrznych protez ma istotny wpływ na wzrost komórek śródbłonka w warunkach 2D. Zaadaptowano i przetłumaczono na podstawie Publikacji **P5** [132] na licencji Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

5. Dyskusja wyników

Koncepcja niniejszej rozprawy zakładała trzy główne etapy badań. Pierwszy etap koncentrował się na procesie wytwarzania poliuretanowych materiałów włóknistych i ocenie możliwości precyzyjnego projektowania produktów o założonych parametrach (strukturalnych i mechanicznych). Drugi etap wprowadził komponent biologiczny, niezbędny z perspektywy zastosowań biomedycznych projektowanych implantów biomedycznych i skupiał się na badaniach adhezji i proliferacji komórek tworzących ściany naczyniowe. Natomiast trzeci etap stanowił zwieńczenie prac i doprowadził do otrzymania końcowego produktu – protezy naczyniowej, a także zweryfikował spełnienie założonych wymagań.

Procesem produkcyjnym badanym w pracy jest rozdmuch roztworu polimeru (SBS). SBS jest procesem umożliwiającym wytwarzanie materiałów włóknistych i wykazującym wiele podobieństw do szeroko opisanego w literaturze elektroprzędzenia (ES). Porównanie obu procesów oraz zalety procesu SBS względem ES przedstawiono w podrozdziale 2.4. W kontekście projektowania protez naczyniowych główną zaletą techniki SBS, która przesądziła o jej wyborze, jest wysoka wydajność procesu, istotna zarówno z perspektywy laboratoryjnej, jak i potencjalnego zastosowania przemysłowego.

W ramach badań wstępnych porównano właściwości materiałów włóknistych wytwarzanych w procesie ES i SBS z roztworów tych samych polimerów o jednakowych stężeniach. W warunkach najkorzystniejszych dla każdej z metod oraz przy jednakowym czasie trwania procesu, w procesie SBS wytworzono materiały o grubości ok. 100-krotnie większej niż w przypadku procesu ES (dane nieopublikowane). Podobne porównanie przeprowadzili inni członkowie zespołu. Wojasiński i Ciach [133] wykazali, że wydajność procesu SBS jest co najmniej 10x wyższa niż ES. Tak znacząca różnica w wydajności wynika przede wszystkim z możliwości stosowania znacznie wyższych natężeń przepływu roztworu w procesie SBS, co bezpośrednio przekłada się na ilość deponowanego materiału w jednostce czasu [134]. Wszystkie wspomniane zalety SBS zadecydowały o wyborze tego procesu do wytwarzania prezentowanych protez naczyniowych.

Punktem wyjściowym badań był dobór odpowiedniego polimeru, z którego wytwarzane będą protezy naczyniowe. Uzasadnienie wyboru poliuretanów jako tworzywa do wytwarzania biomateriałów przeznaczonych do leczenia schorzeń sercowo-naczyniowych przedstawiono w podrozdziale 2.3.

Ocena przędzalności pięciu PU różniących się twardością wykazała, że dla każdego z nich możliwe było otrzymanie włókien o średnicach wynoszących ok. 200 nm i 1000 nm. Wybór

tych konkretnych średnic włókien wynika z ich biologicznego znaczenia. Nanowłókna o średnich średnicach ok. 200 nm naśladują skalę elementów macierzy pozakomórkowej, co sprzyja adhezji i proliferacji komórek śródbłonka (ECs) [135], [136]. Natomiast włókna o średnich średnicach ok. 1 000 nm odwzorowują strukturę podporową naturalnych tkanek, wspierając organizację i wydłużony fenotyp komórek budujących ścianę naczynia krwionośnego [69], [136]. Obie populacje włókien (200nm i 1000 nm) zostały poddane szczegółowym analizom strukturalnym i biologicznym w kolejnych etapach pracy, jak również wykorzystane do projektowania końcowego produktu (protezy naczyniowej) opisanego w Publikacji **P5**.

Średnie średnice otrzymanych włókien wzrastały wraz ze wzrostem stężenia polimeru w roztworze dla wszystkich badanych PU, co jest zależnością oczekiwaną i potwierdzoną licznymi badaniami [11], [117], [137]. Wzrost lepkości roztworu wynikający m.in. z wyższego stężenia polimeru w roztworze lub masy cząsteczkowej polimeru ogranicza możliwość rozciągania strugi roztworu podczas procesu, co skutkuje powstawaniem włókien o większych średnicach. W odpowiednich warunkach (oknie przędzalności) możliwe jest uzyskanie stabilnych, jednorodnych struktur włóknistych bez defektów morfologicznych. Zależność tę potwierdzono m.in. w badaniach [138], [139], [140].

Wykazano, że parametry procesu SBS, takie jak ciśnienie powietrza oraz, w nieco mniejszym stopniu, natężenie przepływu roztworu polimeru istotnie wpływają na morfologię (ilość defektów) otrzymywanych materiałów włóknistych. Wyższe wartości ciśnienia powietrza prowadziły do zwiększenia liczby defektów. Zjawisko to zostało potwierdzone również w innych badaniach [139], [141], [142], gdzie wykazano, że przy zbyt wysokim ciśnieniu powietrza proces traci stabilność, a materiał staje się bardziej niejednorodny. Wzrost natężenia przepływu roztworu również może prowadzić do powstawania defektów. Nadmiar dostarczanego materiału może powodować tworzenie się zgrubień i nieregularności w strukturze włókien, co niekorzystnie wpływa na ich jednorodność i powtarzalność [107]. Przeprowadzone badania pozwoliły na wyznaczenie najkorzystniejszych wartości parametrów procesowych (ciśnienia powietrza oraz natężenia przepływu roztworu polimeru) prowadzących do otrzymywania możliwie jednorodnych materiałów włóknistych przy jednoczesnym zachowaniu stabilności procesu SBS.

Kolejnym istotnym etapem prowadzonych badań była analiza możliwości kontrolowanego ukierunkowania poliuretanowych włókien w procesie SBS oraz wpływu ukierunkowania na strukturę i właściwości materiałów poliuretanowych. Uzyskane wyniki wykazały, że jednym z kluczowych czynników umożliwiających kontrolę stopnia uporządkowania włókien jest ich średnica. Przeprowadzone badania udowodniły, że ukierunkowanie włókien w poliuretanowym materiale jest możliwe, gdy średnia średnica włókien jest ≥500 nm. Wykazano, że wpływ prędkości obrotowej kolektora na możliwość ukierunkowania włókien jest uzależniony od fizykochemicznych właściwości roztworu, w szczególności od stopnia splątania łańcuchów polimerowych. W przypadku roztworów o niskich lepkościach (niskich stężeniach), wytwarzane włókna są bardziej podatne na lokalne interakcje włókno–włókno oraz fluktuacje w strumieniu powietrza niż na siły wynikające ze zwiększonej prędkości obrotowej kolektora [120]. W przypadku roztworów polimerów o wyższych lepkościach (stężeniach), z których powstają bardziej jednorodne włókna o większych średnicach, wykazano wyraźny związek pomiędzy prędkością obrotową kolektora, a stopniem orientacji włókien. Włókna o większych średnicach, charakteryzujące się większą masą i sztywnością, są zwykle dłuższe i mniej podatne na zakłócenia przepływu powietrza. Dzięki temu, porywane przez obracający się kolektor, lepiej porządkują się wzdłuż jego obwodu [120], [122], [143].

Wyniki badań jednoznacznie wykazały wpływ orientacji włókien na właściwości mechaniczne produktu. W przypadku włókien o największych analizowanych średnicach (1 000 nm) zaobserwowano znaczący wpływ ukierunkowania włókien na właściwości wytrzymałościowe wyrobów. Materiały o włóknach ukierunkowanych charakteryzowały się wyraźnie wyższym modułem Younga (MY) i większą odpornością na rozciąganie w kierunku osiowym, przy jednoczesnym zmniejszeniu wydłużenia przy zerwaniu. Zjawisko to wynika z faktu, że w materiałach ukierunkowanych większość włókien jest ustawiona zgodnie z kierunkiem działania siły, a co za tym idzie występuje również większe ukierunkowanie łańcuchów polimeru. W wyniku tego więcej włókien aktywnie przenosi naprężenia wzdłuż określonej osi. Skutkuje to wyższą sztywnością materiału. Dla próbek nieukierunkowanych włókna ułożone są losowo, co oznacza, że tylko część z nich efektywnie wspomaga przenoszenie sił, a pozostałe działają jako "amortyzatory", zwiększając elastyczność kosztem odporności mechanicznej [144]. Brak obserwowanych różnic we właściwościach mechanicznych dla materiałów o średnich średnicach włókien 500 nm wskazuje, że mimo obserwowanego kierunkowego ułożenia włókien efekt ten był mniejszy. Przyczyną obserwowanego zjawiska mógł być fakt, że cieńsze włókna schną szybciej, przez co zbierane są na kolektorze już jako częściowo wysuszone i przez to gorzej zlepiają się z innymi włóknami.

Taka struktura jest bardziej porowata, ma mniejszą gęstość i mniejszą wytrzymałość mechaniczną.

Włókniny rozciągane w kierunku zgodnym z kierunkiem ułożenia włókien (osiowym) charakteryzowały się wyraźnie wyższą wytrzymałością na rozciąganie oraz większym MY w porównaniu z materiałami testowanymi w kierunku poprzecznym (wzdłużnym). Zjawisko to potwierdza, że właściwości mechaniczne materiałów włóknistych są silnie anizotropowe i zależne od ich wewnętrznej architektury, co również zostało wykazane w literaturze [145]. Możliwość kontrolowania tych właściwości poprzez odpowiedni dobór parametrów procesu SBS jest istotną zaletą tej metody w kontekście projektowania funkcjonalnych materiałów.

Zaobserwowano także, że zwiększanie odległości między dyszą a kolektorem prowadzi do istotnego zmniejszenia liczby defektów strukturalnych w wytwarzanych materiałach włóknistych. Wynika to przede wszystkim z wydłużonego czasu lotu strumienia roztworu polimerowego, co umożliwia bardziej efektywne odparowanie rozpuszczalnika oraz stabilniejsze formowanie włókien przed ich osadzeniem na kolektorze [146]. Z kolei zmniejszanie tej odległości może prowadzić do zatracenia włóknistej morfologii materiału. Mniejsza odległość przelotu nie zapewnia dostatecznego czasu na odparowanie rozpuszczalnika, co zaburza proces formowania włókien [118]. W procesie ES proces parowania jest zwykle znacznie krótszy ze względu na znacznie mniejszą szybkość procesu oraz większe prędkości względne włókien w stosunku do otaczającego gazu. Powoduje to znacznie większe współczynniki wnikania masy i szybszy proces parowania rozpuszczalnika. Włókniny takie są przez to bardzie porowate (puszyste) w porównaniu do procesu SBS. Rzadziej też występuje skuteczne "sklejanie" się pojedynczych włókien w strukturze włókniny.

W przeciwieństwie do dobrze udokumentowanego procesu ES w literaturze naukowej wciąż jest stosunkowo niewiele prac poświęconych analizie wpływu parametrów procesu SBS na właściwości strukturalne otrzymywanych materiałów włóknistych. Dlatego też uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki stanowią istotny wkład w rozwój procesu SBS.

Zrozumienie zależności pomiędzy parametrami procesu SBS a właściwościami otrzymywanych materiałów włóknistych stanowi fundament dla świadomego projektowania biomateriałów o ściśle określonej strukturze i funkcjonalności. Jednak nawet bardzo dobrze kontrolowany proces wytwarzania nie jest wystarczający, aby zagwarantować powodzenie zabiegu implantacji protezy naczyniowej. Kluczowe znaczenie mają również cechy końcowego produktu, które muszą spełniać szereg rygorystycznych wymagań biologicznych, mechanicznych i funkcjonalnych.

W związku z powyższym przyjęto, że opracowane protezy powinny spełniać **założone podstawowe wymagania** stawiane protezom naczyń krwionośnych:

1. Struktura naśladująca warstwową budowę naczynia krwionośnego: poszczególne warstwy charakteryzują się odmienną morfologią, aby wspierać zasiedlanie protezy różnymi typami komórek budujących naczynia krwionośne i zapewniać odpowiednią szczelność protezy;

2. Właściwości mechaniczne zbliżone do właściwości naczyń ludzkich (MY < 10 MPa);

3. Kontakt wewnętrznej powierzchni protezy z krwią skutkujący niską adhezją płytek krwi, zbliżoną do wartości uzyskanych dla protez referencyjnych wytworzonych z ePTFE;

4. Powierzchnia protezy wykazująca właściwości niehemolityczne.

Morfologia powierzchni protezy odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu interakcji komórek z biomateriałem, wspierając ich adhezję oraz proliferację. Parametry takie jak średnica włókien, ich gęstość upakowania oraz porowatość wpływają zarówno na tworzenie kontaktów komórka-rusztowanie, jak i interakcje komórka-komórka, które sa niezbędne do efektywnego formowania ciągłej monowarstwy komórek ECs [69], [147], [148]. W kontekście zastosowań naczyniowych jednym z głównych celów jest promowanie przez biomateriał procesu endotelializacji, czyli zasiedlenia wewnętrznej powierzchni protezy przez komórki ECs. Jest to proces kluczowy dla długoterminowego sukcesu implantacji, ponieważ warstwa ECs pomaga w utrzymaniu homeostazy naczyniowej, regulując przepływ krwi, zapobiegając aktywacji układu krzepnięcia i ograniczając adhezję komórek zapalnych oraz płytek krwi [149]. Brak odpowiedniej endotelializacji wiąże się z podwyższonym ryzykiem powstawania zakrzepów, reakcji zapalnych oraz hiperplazji błony wewnętrznej, co w efekcie może prowadzić do zamknięcia światła protezy. Dlatego też jednym z głównych celów projektowania rusztowań do regeneracji naczyń krwionośnych jest stworzenie środowiska, które nie tylko umożliwia, ale również aktywnie wspiera szybkie i stabilne zasiedlenie powierzchni przez komórki ECs [150]. Morfologia powierzchni, właściwości mechaniczne oraz ewentualne dalsze modyfikacje bioaktywne mają na celu przyspieszenie procesu endotelializacji i zwiększenie biozgodności protezy.

W dostępnej literaturze istnieje wiele doniesień, że morfologia powierzchni biomateriałów reguluje zachowanie komórek ECs, co potwierdza wyniki otrzymane w niniejszej pracy. W badaniu [151] wykazano, że materiały o średnich średnicach włókien wynoszących 500 nm znacznie zwiększają proliferację komórek ECs w porównaniu do materiałów o średnich

średnicach włókien wynoszących 2µm. Natomiast w pracy [152] porównano wzrost komórek ECs na powierzchniach litych (folie) i włóknistych. Zaobserwowano, że komórki rosnące na foliach jedynie rozpłaszczają się po adhezji, natomiast te rosnące na włóknach zakotwiczały się do podłoża, co pomagało w ich rozprzestrzenianiu się po powierzchni materiału. W pracy [153] opisującej badania na modelu zwierzęcym (szczury) wykazano, że poliuretanowe włókniste struktury wspierają rozwój komórek ECs. Po 4 tygodniach od implantacji na badanych protezach zaobserwowano całkowite odtworzenie monowarstwy komórek ECs, w przeciwieństwie do protez referencyjnych wytworzonych z ePTFE.

Poza komórkami ECs kluczowym elementem funkcjonalnej ściany naczynia krwionośnego jest warstwa mięśniowa zbudowana głównie z komórek mięśni gładkich (ang. *vascular smooth muscle cells*, vSMCs). W fizjologicznym naczyniu komórki te są zorganizowane w warstwy otaczające światło naczynia. Taka orientacja umożliwia aktywną regulację średnicy naczynia, ciśnienia krwi i przepływu oraz uczestniczy w utrzymaniu integralności ściany naczynia i dynamicznie reaguje na bodźce biochemiczne oraz mechaniczne [154].

Interakcje komórek vSMCs z biomateriałem są znacznie bardziej złożone niż w przypadku ECs. Wymagają one nie tylko odpowiedniego podłoża do adhezji, ale również przestrzennej organizacji i możliwości przenoszenia naprężeń mechanicznych. Badania wskazują, że wydłużona, ukierunkowana morfologia włókien sprzyja wydłużeniu i jednorodnym zorientowaniu komórek mięśniowych, co z kolei wpływa na ich fenotyp i funkcje biologiczne. Właściwa orientacja włókien może stymulować fenotyp kurczliwy, który przeciwdziała niekontrolowanej proliferacji vSMCs i zachowaniom prozapalnym [155].

W pracy [130] wykazano, że komórki vSMCs rosnące na włóknach o średnicach ok. 750 nm wykazują fenotyp kurczliwy w przeciwieństwie do komórek rosnących na materiałach o większych średnicach włókien (6 µm). Ponadto w badaniu [156], gdzie analizowano wpływ ukierunkowania włókien na wzrost komórek vSMCs udowodniono, że fenotyp kurczliwy wykazują komórki vSMCs zasiedlające protezy naczyniowe o włóknach ukierunkowanych (w przeciwieństwie do komórek rosnących na protezach o włóknach nieukierunkowanych).

W niniejszej pracy zamiast komórek vSMC zastosowano perycyty, których fenotyp oraz wymagania środowiskowe pod względem morfologii rusztowania i sygnałów mechanicznych są zbliżone do komórek vSMC. Perycyty wykazują zdolność do adhezji, migracji i elongacji na włóknistych podłożach, a także odgrywają istotną rolę w regeneracji monowarstwy komórek ECs i stabilizacji nowo powstałych naczyń, co czyni je wartościowym modelem do oceny właściwości nowoopracowanych protez naczyniowych [33], [34], [157].

Skuteczna regeneracja naczynia krwionośnego wymaga zróżnicowanego podejścia do projektowania rusztowania, które odpowiadałoby potrzebom biologicznym poszczególnych typów komórek. W ramach niniejszej pracy opracowano warstwową strukturę włóknistą, która odwzorowuje naturalną budowę ściany naczynia krwionośnego. Warstwy zaprojektowanej protezy zostały celowo dostosowane do wymagań biologicznych komórek budujących naczynia krwionośne.

Wewnętrzna warstwa kontaktująca się bezpośrednio z krwią o morfologii nanowłóknistej (protezy Nano) lub litej z niewielkimi obszarami włóknistymi (protezy Mikro) została zaprojektowana pod kątem wspierania szybkiej i stabilnej endotelializacji. Z kolei warstwa zewnętrzna została zaprojektowana w taki sposób, aby wspierać zasiedlanie przez komórki mięśni gładkich (mikrowłókna o średnich średnicach ok. 1 µm) z uwzględnieniem ich potrzeby orientacji (włókna ukierunkowane) i kontaktu mechanicznego. Zastosowanie ukierunkowanych mikrowłókien o średnicach ok. 1 µm ma na celu stymulację komórek mięśniowych do jednorodnego zorientowania i przyjęcia fenotypu kurczliwego.

Dodatkowo, zgodnie z normą ISO 7198:2016 [158] budowa protezy powinna zapobiegać przepływowi krwi przez ścianę implantu, co zostało uzyskane poprzez wprowadzenie warstwy litej zapewniającej szczelność produktu.

Opracowanie opisanych warstwowych protez naczyniowych o zróżnicowanych morfologiach powierzchni wewnętrznej (dla ECs) i zewnętrznej (dla vSMCs) pozwoliło na spełnienie założonego **warunku 1.**

W literaturze naukowej wielokrotnie podkreślano kluczową rolę elastyczności protezy w zapewnieniu jej prawidłowego funkcjonowania, w szczególności w kontekście utrzymania drożności naczynia. Elastyczność podłoża polimerowego, najczęściej wyrażana za pomocą MY, ma istotny wpływ na zachowanie komórek ECs, regulując ich adhezję, proliferację, fenotyp oraz funkcje biologiczne [159], [160], [161], [162]. Niezgodność mechaniczna pomiędzy protezą a naturalną tkanką naczyniową może prowadzić do zaburzeń przepływu krwi (hemodynamiki), co z kolei negatywnie wpływa na kolonizację protezy przez komórki ECs, a jednocześnie może stymulować niepożądaną aktywację komórek vSMCs, sprzyjając rozwojowi hiperplazji błony wewnętrznej [63]. Zjawisko to szerzej omówiono w podrozdziale 2.2.

Zagadnienie to zostało również poruszone w pracy [163], w której wykorzystano modelowanie komputerowe do porównania właściwości hemodynamicznych protez wytworzonych z PU w procesie ES oraz komercyjnie dostępnych protez z ePTFE, które są
najczęściej stosowane w leczeniu chirurgicznym. Wyniki symulacji wykazały, że protezy poliuretanowe generują mniejsze zaburzenia przepływu krwi oraz charakteryzują się lepszą zgodnością mechaniczną z naczyniami krwionośnymi w porównaniu do protez ePTFE.

W badaniach eksperymentalnych właściwości mechaniczne protez naczyniowych ocenia się zazwyczaj poprzez testy wytrzymałości na rozciąganie. W niniejszej pracy badania te przeprowadzono zgodnie wytycznymi zawartymi w normach ASTM F3225-17 [164] oraz ISO 7198:2016 [158]. Uwzględniając zastosowanie opracowanych protez w procedurze CABG, przyjęto założenie, że ich właściwości mechaniczne, w szczególności MY, powinny mieścić się w zakresie charakterystycznym dla naczyń wieńcowych oraz naczyń najczęściej stosowanych jako autografty. Dane literaturowe wskazują na znaczne zróżnicowanie wartości MY dla naczyń krwionośnych, wynikające zarówno z różnic osobniczych, jak i metod pomiarowych. Przykładowo: dla tętnicy piersiowej podaje się wartości MY od ok. 1,5 MPa [165] do ok. 16,8 MPa [166], dla żyły odpiszczelowej od ok. 23,7 MPa [167] do ok. 130 MPa [166], a dla naczyń wieńcowych ok. 1,5 MPa [168]. Na podstawie analizy powyższych danych, jako graniczną wartość MY dla opracowywanych protez przyjęto 10 MPa, uznając ją za wartość zapewniającą odpowiednią elastyczność i zgodność mechaniczną z naturalną tkanką naczyniową.

W literaturze dostępne są również opisy protez włóknistych otrzymywanych w procesie ES, dla których MY mieści się w podobnym zakresie. Znane są protezy wykonane z PU o MY wynoszącym 3,62 MPa [169], z PCL z dodatkiem kolagenu o MY wynoszącym 2,5MPa [170] oraz z PLLA z dodatkiem kolagenu i elastyny o MY wynoszącym 2,08 MPa [171]. W innym badaniu [172] porównano eksperymentalnie właściwości protez ePTFE z protezami PU/PCL wytworzonymi w procesie ES. Protezy PU/PCL charakteryzowały się geometrią zbliżoną do geometrii protez opracowanych w niniejszej pracy (średnica wewnętrzna 6 mm). Ich MY mierzony w kierunku wzdłużnym (ang. *longitudinal*) wyniósł 13,8 ± 4,4 MPa. Dla porównania, analizowana w tym samym badaniu proteza ePTFE (wersja cienkościenna, grubość ściany 454 μ m), która jest obecnie najczęściej stosowana w leczeniu niedrożności maczyń charakteryzowała się MY równym 36,0 ± 3,9 MPa. Na tle tych danych wartości MY otrzymane dla protez opracowanych w niniejszej pracy (MY wynoszący 2,5 MPa dla wariantu Nano i 2,4 MPa dla wariantu Mikro) są zbliżone do wartości MY uzyskiwanych dla protez włóknistych otrzymywanych w procesie elektroprzędzenia i **spelniają założony warunek 2**.

Ocena hemozgodności nowoopracowanych materiałów przeznaczonych do kontaktu z krwią stanowi istotne wyzwanie badawcze. Normy skupiające się na ocenie materiałów do

kontaktu z krwią (ISO 10993-4 [173], ASTM F756-17 [174], ASTM F2888-19 [175]) zalecają ocenę hemozgodności, w tym analizę adhezji płytek krwi, jednak nie definiują konkretnych wartości granicznych dla tego parametru, których przekroczenie stanowiłoby jednoznaczne kryterium odrzucenia materiału. W środowisku naukowym podkreśla się potrzebę standaryzacji metod badawczych w ocenie hemozgodnoości biomateriałów [176], [177]. Analiza adhezji płytek krwi może być przeprowadzana zarówno w warunkach statycznych, jak i dynamicznych (przy użyciu układów układy przepływowych lub rotacyjnych [178]), stymulujących fizjologiczne siły ścinające. Różnorodność dotyczy również sposobu przedstawiania wyników. Wynik może być przedstawiony jako liczba płytek na jednostkę powierzchni (liczba płytek/mm²) [179], odsetek powierzchni zajętej przez płytki lub wskaźnik retencji płytek (ang. *Platelet Retention Index,* PRI) [162].

W związku z brakiem jednoznacznych kryteriów liczbowych dotyczących oceny adhezji płytek krwi, w niniejszej pracy wyniki badań odniesiono do materiału referencyjnego, jakim była powierzchnia protezy ePTFE. Ocena wykonana w warunkach statycznych wykazała, że: dla protez Mikro powierzchnia zajęta przez płytki krwi wynosiła 8,6%, dla protez Nano 6,2%, podczas gdy dla protez ePTFE 7%. Otrzymane wyniki wskazują, że adhezja płytek krwi do powierzchni badanych protez jest porównywalna lub niższa niż do komercyjnego materiału referencyjnego, co pozwala uznać, że spełniony został założony w pracy **warunek 3.**

Z godnie z wytycznymi normy ASTM F756-17 [174] materiał biomedyczny może zostać uznany za niehemolityczny, jeśli powoduje hemolizę krwinek czerwonych nieprzekraczającą 2%. W niniejszej pracy wartość ta została przyjęta jako wartość graniczna, której spełnienie stanowiło jedno z założeń funkcjonalnych dla opracowywanej protezy. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zarówno w przypadku protez Nano, jak i Mikro stopień hemolizy nie przekroczył 1%, co potwierdzają wyniki przedstawione w Publikacji P5. Tym samym spełniono warunek 4, dotyczący zgodności hemolitycznej materiału.

Należy podkreślić, że chociaż przedstawione w niniejszej rozprawie badania nie obejmują pełnego spektrum analiz koniecznych do całościowej oceny właściwości nowoopracowanej protezy naczyniowej, to ich zakres pozwolił spełnić założone **podstawowe kryteria i dotrzeć do etapu pierwszych badań** *in vivo* na modelu świńskim.

Badania *in vivo* stanowią niezwykle istotny etap w procesie oceny biomateriałów, pozwalając na weryfikację wcześniej przyjętych założeń, a także ocenę bezpieczeństwa i efektywności działania nowego implantu w warunkach rzeczywistego środowiska biologicznego. W przypadku protez naczyniowych obejmuje to: ocenę ogólnego stanu zdrowia

zwierząt (obserwacje kliniczne, parametry hematologiczne, markery zapalne, tj. CRP, wskaźniki krzepnięcia krwi: APTT, PT), ocenę funkcjonalności protezy (badania Dopplerowskie USG, pomiary prędkości przepływu krwi, drożność naczynia), analizę histopatologiczną eksplantów, pozwalającą na ocenę integracji tkankowej oraz odpowiedzi zapalnej.

Na dzień złożenia pracy opracowane protezy zostały z powodzeniem wszczepione do tętnic szyjnych świń (N = 8). Zwierzęta pozostają pod stałą obserwacją, a ich stan ogólny oceniany jest jako bardzo dobry. Wszczepione protezy funkcjonują prawidłowo od ponad trzech tygodni przy bardzo dobrym stanie ogólnym zwierząt, nie wykazując objawów powikłań ani zakrzepicy.

6. Dalsze badania

Przeprowadzone badania nad zasiedlaniem poliuretanowych protez komórkami ECs potwierdziły wcześniejsze założenia, że hydrofobowa powierzchnia poliuretanu, w warunkach trójwymiarowych, może wymagać dalszej modyfikacji w celu optymalnego wsparcia adhezji i proliferacji komórek. Już na etapie projektowania struktury protezy przewidywano, że uzyskanie w pełni funkcjonalnej warstwy wewnętrznej, wspierającej odbudowę monowarstwy komórek ECs, będzie wymagało zastosowania odpowiednio dobranych modyfikacji chemicznych lub biologicznych.

Uzyskane wyniki stanowią więc nie tylko ważny element oceny biologicznej opracowanych materiałów, ale także potwierdzają trafność przyjętej strategii etapowego podejścia do projektowania protez. Pierwszy, kluczowy etap – opracowanie struktury i procesu wytwarzania warstwowej, mechanicznie stabilnej protezy – został z sukcesem zrealizowany. Kolejnym krokiem, zgodnym z zaplanowaną ścieżką badawczą, jest dobór i wdrożenie modyfikacji powierzchni wewnętrznej w celu dalszej poprawy interakcji z komórkami ECs. Prace te są już w toku.

Dotychczas opracowano metodę modyfikacji powierzchni protez polikatecholaminami i potwierdzono, że wprowadzone modyfikacje powierzchni wpływają na zwiększenie adhezji i proliferacji komórek na powierzchni materiałów (manuskrypt w przygotowaniu). Na "Implant cylindryczny modyfikowany poli(katecholaminą)" otrzymano patent, którego jestem współautorką (Patent **Pat1**). Ponadto, opatentowane protezy są aktualnie w fazie badań *in vivo* na modelu świńskim, których celem jest potwierdzenie biozgodności protez oraz oszacowanie ich drożności.

Dodatkowo opracowałam sposób wytwarzania dwuwarstwowych włókien typu rdzeńotoczka (ang. *core-shell*) metodą rozdmuchu roztworu polimeru, wydzielających substancje z rdzenia włókien. Jestem współautorką dwóch zgłoszeń patentowych dotyczących sposobu wytwarzania włókna (Zgłoszenie patentowe **ZP1**) oraz samego włókna typu rdzeń-otoczka (Zgłoszenie patentowe **ZP2**). Pomimo rosnącego zainteresowania procesem SBS w literaturze naukowej wciąż jest niewiele doniesień dotyczących zastosowania tego procesu do wytwarzania włókien typu rdzeń–otoczka, zwłaszcza w kontekście inżynierii naczyń krwionośnych. Wyniki prac dotyczących włókien typu rdzeń-otoczka wytwarzanych w procesie SBS zostały już pozytywnie ocenione i przyjęte do publikacji w recenzowanym czasopiśmie naukowym (Journal of Materials Research, IF=2,7 (2023)). Włókniny typu rdzeń–otoczka mogą być wykorzystane do kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie czynnych, w tym czynników przeciwbakteryjnych i/lub przeciwzakrzepowych, co ma szczególne znaczenie w projektowaniu nowoczesnych protez naczyniowych. Opracowane podejście stanowi rozszerzenie wcześniej prowadzonych badań nad materiałami włóknistymi, a jednocześnie otwiera nowe możliwości w zakresie funkcjonalizacji powierzchni protez naczyń krwionośnych poprzez nadanie im właściwości uwalnianjących substancje bioaktywne. Wzbogacenie struktury protez o włókna rdzeń–otoczka pozwoli nie tylko na poprawę ich zgodności biologicznej, ale również może przeciwdziałać powikłaniom pozabiegowym, takim jak zakrzepica czy infekcja, co stanowi kluczowy krok w dalszym rozwoju opracowanych materiałów.

Opracowanie techniki wytwarzania włókien typu rdzeń-otoczka w procesie SBS stanowi istotny wkład w rozwój nowoczesnych materiałów do zastosowań biomedycznych i świadczy o kompleksowym i wieloaspektowym podejściu do tworzenia rusztowań tkankowych nowej generacji. Uzyskane wyniki potwierdzają potencjał rozwoju w kierunku dalszej optymalizacji poliuretanowych materiałów włóknistych jako realnej alternatywy dla obecnie stosowanych protez naczyniowych.

Ponadto, zdobyta wiedza i doświadczenie w zakresie doboru parametrów procesu SBS umożliwiły mi skuteczne wytwarzanie materiałów włóknistych do innych zastosowań biomedycznych. W ramach współpracy z Zespołem z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej byłam zaangażowana w opracowanie nanowłókien o właściwościach magnetycznych, przeznaczonych do wspomagania terapii chorób serca. Efektem tej współpracy jest zgłoszenie patentowe dotyczące sposobu otrzymywania funkcjonalnych nanomateriałów o działaniu terapeutycznym (Zgłoszenie patentowe **ZP3**).

7. Podsumowanie

W ramach przeprowadzonych badań zrealizowano wszystkie trzy szczegółowe cele, składające się na główny cel pracy, którym było opracowanie poliuretanowej protezy naczyniowej o warstwowej strukturze włóknistej, spełniającej założone wymagania biologiczne oraz mechaniczne.

W pierwszym etapie pracy, odpowiadającym Celowi 1, dokonano szczegółowej analizy wpływu wybranych parametrów procesu rozdmuchu roztworu polimeru na właściwości poliuretanowych materiałów włóknistych. Wykazano, że możliwe jest formowanie włóknin o kontrolowanej średnicy włókien, porowatości i orientacji przestrzennej, przy zachowaniu wymaganych cech wytrzymałościowych. Uzyskane dane umożliwiły identyfikację najkorzystniejszych warunków procesu rozdmuchu roztworu polimeru prowadzących do otrzymywania poliuretanowych materiałów o zadanych właściwościach, co jednoznacznie potwierdziło Tezę 1.

W ramach Celu 2 oceniono wpływ morfologii poliuretanowych materiałów włóknistych na zachowanie komórek budujących naczynia krwionośne oraz ich interakcję z płytkami krwi. Zaobserwowano wyraźne różnice w adhezji, proliferacji i organizacji przestrzennej komórek w zależności od średnicy i orientacji włókien oraz porowatości i rozmiaru porów w badanych biomateriałach.

Bazując na wynikach uzyskanych w ramach Celu 1 i 2, zrealizowano Cel 3 i zaprojektowano, a następnie wytworzono warstwową strukturę włóknistą, odwzorowującą architekturę naczynia krwionośnego. Protezy te spełniły przyjęte kryteria strukturalne i mechaniczne, wykazały zgodność z krwią oraz selektywnie wspierały zasiedlanie przez odpowiednie typy komórek. Wyniki te potwierdziły Tezę 2, wskazującą na możliwość wykorzystania metody rozdmuchu roztworu polimeru do otrzymywania rusztowań naczyniowych spełniających wymagania funkcjonalne protez naczyń krwionośnych.

Przeprowadzone badania uzupełniają wyraźną lukę w literaturze, wskazującą na brak doniesień dotyczących wytwarzania poliuretanowych protez naczyniowych w procesie rozdmuchu roztworu polimeru. Uzyskane wyniki stanowią zatem oryginalny wkład w rozwój inżynierii biomateriałów oraz inżynierii chemicznej i stanowią przykład skutecznego wykorzystania inżynierii procesu i inżynierii produktu w projektowaniu struktur o zadanych właściwościach funkcjonalnych. Opracowana metoda wytwarzania implantów naczyniowych charakteryzuje się nie tylko wysoką kontrolowalnością parametrów, ale również zwiększoną wydajnością w porównaniu do elektroprzędzenia, co podkreśla jej potencjał aplikacyjny.

Skróty i symbole

2D - model dwuwymiarowy

3D – model trójwymiarowy

75A, 80A, 93A, 45D, 75D - twardości poliuretanów w skali Shore'a

- CLSM mikroskopia konfokalna (ang. confocal laser scanning microscopy)
- CVDs choroby sercowo-naczyniowe (ang. cardiovascular diseases)
- ePTFE ekspandowany politetrafluoroetylen (ang. *expanded polytetrafluoroethylene*)
- ECs komórki śródbłonka (ang. endothelial cells)
- MY moduł Younga
- NK włókna nieukierunkowane (ang. non-aligned)
- PCL polikaprolakton (ang. *polycaprolantone*)
- PET politereftalan etylenu (ang. polyethylene terephthalate)
- PLLA kwas polimlekowy (ang. *poly-L-lactic acid*)
- PU poliuretan(y) (ang. polyurethane(s))
- SBS rozdmuch roztworu polimeru (ang. solution blow spinning)
- SEM skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. scanning electron microscopy)
- UK włókna ukierunkowane (ang. aligned)

vSMCs – komórki mięśni gładkich ściany naczynia krwionośnego (ang. vascular smooth muscle cells)

Spis rysunków

Rysunek 1. Główne przyczyny zgonów w Polsce w latach 2015 i 2022
Rysunek 2. Budowa dyszy wykorzystywanej do wytwarzania włókien metodą rozdmuchu
roztworu polimeru
Rysunek 3. Schemat stanowiska do wytwarzania materiałów włóknistych metodą rozdmuchu
roztworu polimeru
Rysunek 4. Średnica włókien w zależności od stężenia polimeru w roztworze dla poliuretanów
o różnych twardościach w skali Shore'a
Rysunek 5. Obrazy SEM materiałów o średnich średnicach włókien 200, 500 i 1 000 nm
wytworzonych z PU o różnych twardościach w skali Shore'a
Rysunek 6. Właściwości mechaniczne materiałów włóknistych o różnych średnicach
wytworzonych z PU o różnych twardościach w skali Shore'a: moduł Younga (A), maksymalne
naprężenia (B), wydłużenie przy zerwaniu (C)43
Rysunek 7. Obrazy SEM materiałów o średniej średnicy włókien 1 000 nm wytworzonych
z PU o twardości 75A pod ciśnieniem (A) 0,1 MPa, (B) 0,125 MPa, (C) 0,15 MPa, (D) 0,175
MPa, (E) 0,2 MPa
Rysunek 8. Obrazy SEM materiałów włóknistych o średniej średnicy włókien 1 000 nm
wytworzonych z PU 75A przy prędkości obrotowej kolektora: (A) 200 rpm, (B) 400 rpm, (C)
1 000 rpm, (D) 5 000 rpm, (E) 10 000 rpm, (F) 15 000 rpm, (G) 20 000 rpm, (H) 48
Rysunek 9. Zmiana ukierunkowania włókien (A) oraz zmiana średnicy włókien (B)
w materiałach włóknistych w zależności od prędkości obrotowej kolektora
Rysunek 10. Schemat przedstawiający sposób nakładania włókien nieukierunkowanych
i ukierunkowanych na kolektor wraz zaznaczonymi kierunkami wykonywania pomiarów
właściwości mechanicznych
Rysunek 11. Właściwości mechaniczne materiałów włóknistych o włóknach
nieukierunkowanych (NK) i ukierunkowanych (UK) i średnich średnicach włókien 500
i 1000 nm w zależności od kierunku rozciągania: moduł Younga (A), wydłużenie przy
zerwaniu (B), maksymalne naprężenia (C)
Rysunek 12. Obrazy SEM materiałów wytworzonych z PU o twardości 75A i średnich
średnicach włókien 200 i 1 000 nm przy odległościach dysza-kolektor wynoszących 10, 30
i 50 cm
Rysunek 13. Wpływ odległości dysza-kolektor w zakresie 10–50 cm na porowatość materiałów
włóknistych o średnicach włókien 200 nm i 500 nm

Rysunek 14. Perycyty rosnące na materiałach o włóknach nieukierunkowanych
i ukierunkowanych, o średnich średnicach włókien wynoszących 500 i 1 000 nm56
Rysunek 15. Komórki śródbłonka rosnące na powierzchni materiałów po 6 dniach hodowli (A)
oraz stopień pokrycia powierzchni przez komórki (B) 58
Rysunek 16. Stopień pokrycia powierzchni materiałów włóknistych przez płytki krwi
w zależności od twardości PU z którego wytworzono włókna i średniej średnicy włókien 60
Rysunek 17. Porównanie budowy ścian protez Nano i Mikro
Rysunek 18. Perycyty zasiedlające zewnętrzną powierzchnię cylindrycznej protezy Nano po
7 dniach prowadzenia hodowli
Rysunek 19. Stopień pokrycia powierzchni wewnętrznej protez przez komórki śródbłonka:
w warunkach 2D (materiały płaskie) (A); w warunkach 3D (materiały cylindryczne) (B) 65

Bibliografia

- [1] "World Health Organization." www.who.int, dostęp: 11.06.2025
- S. S. Martin *et al.*, "2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 149, no. 8, pp. 347–913, 2024, doi: 10.1161/CIR.00000000001209.
- [3] Główny Urząd Statystyczny, "Polska w liczbach 2024." https://stat.gov.pl/files/ gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5501/14/17/1/polska_w_liczbach_2024_p 1_pi.pdf, dostęp: 11.06.2025
- [4] Główny Urząd Statystyczny, "Trwanie życia w 2023 r." https://stat.gov.pl/obszarytematyczne/ludnosc/trwanie-zycia/trwanie-zycia-w-2023-roku,2,18.html, dostęp: 11.06.2025
- [5] V. R. Netala, S. K. Teertam, H. Li, and Z. Zhang, "A Comprehensive Review of Cardiovascular Disease Management: Cardiac Biomarkers, Imaging Modalities, Pharmacotherapy, Surgical Interventions, and Herbal Remedies," *Cells*, vol. 13, no. 1471, 2024, doi: 10.3390/cells13171471.
- [6] "National Center for Health Statistics." https://wonder.cdc.gov/mcd.html, dostęp: 11.06.2025
- [7] P. Severino *et al.*, "Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: From plaque activation to microvascular dysfunction," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 21, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/ijms21218118.
- [8] D. Adhikary, S. Barman, R. Ranjan, and H. Stone, "A Systematic Review of Major Cardiovascular Risk Factors: A Growing Global Health Concern," *Cureus*, vol. 14, no. 10:e30119, 2022, doi: 10.7759/cureus.30119.
- [9] K. S. Ibrahim, N. R. Alwaqfi, and R. K. Ibdah, "Coronary artery bypass as a treatment of stent dislodgement: A case report," *Ann. Med. Surg.*, vol. 47, no. 1, pp. 47–49, 2019, doi: 10.1016/j.amsu.2019.09.013.
- [10] N. Taglieri *et al.*, "Impact of coronary bypass or stenting on mortality and myocardial infarction in stable coronary artery disease," *Int. J. Cardiol.*, vol. 309, pp. 63–69, 2020, doi: 10.1016/J.IJCARD.2020.01.054.
- [11] V. S. Thakare, N. G. Sontakke, P. Wasnik Sr., and D. Kanyal, "Recent Advances in Coronary Artery Bypass Grafting Techniques and Outcomes: A Narrative Review," *Cureus*, vol. 15, no. 9, 2023, doi: 10.7759/cureus.45511.
- [12] M. Ruel and J. Chikwe, "Coronary Artery Bypass Grafting: Past and Future,"

Circulation, vol. 150, no. 14, pp. 1067–1069, 2024, doi: 10.1161/ CIRCULATIONAHA.124.068312.

- [13] L. Melly, G. Torregrossa, T. Lee, J. L. Jansens, and J. D. Puskas, "Fifty years of coronary artery bypass grafting," *J. Thorac. Dis.*, vol. 10, no. 3, pp. 1960–1967, 2018, doi: 10.21037/jtd.2018.02.43.
- B. J. Bachar and B. Manna, Coronary Artery Bypass Graft. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507836/, dostęp: 11.06.2025
- [15] G. Hirnle *et al.*, "Gender Differences in Survival after Coronary Artery Bypass Grafting—13-Year Results from KROK Registry," *J. Clin. Med.*, vol. 13, no. 14, 2024, doi: 10.3390/jcm13144080.
- [16] G. Hirnle *et al.*, "Does the Coronary Artery Bypass Grafting Impact the Survival of Men and Women Equally Compared to General Population? Results from KROK Registry and Polish Central Statistical Office," *J. Clin. Med.*, vol. 13, no. 7440, 2024, doi: 10.3390/jcm13237440.
- [17] S. G. Raja, "Coronary artery bypass grafting : yesterday, today & tomorrow," *AME Med.* J., vol. 5, no. 13, pp. 2019–2021, 2020, doi: 10.21037/amj.2020.02.05.
- P. Mallis, A. Kostakis, C. Stavropoulos-Giokas, and E. Michalopoulos, "Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering," *Bioengineering*, vol. 7, no. 4, 2020, doi: 10.3390/bioengineering7040160.
- [19] H. A. Al-Sabti, A. Al Kindi, K. Al-Rasadi, Y. Banerjee, K. Al-Hashmi, and A. Al-Hinai, "Saphenous vein graft vs. radial artery graft searching for the best second coronary artery bypass graft," *J. Saudi Hear. Assoc.*, vol. 25, no. 4, pp. 247–254, 2013, doi: 10.1016/j.jsha.2013.06.001.
- [20] G. Cuminetti, S. Gelsomino, S. Curello, R. Lorusso, J. G. Maessen, and J. C. A. Hoorntje,
 "Contemporary use of arterial and venous conduits in coronary artery bypass grafting: Anatomical, functional and clinical aspects," *Netherlands Hear. J.*, vol. 25, no. 1, pp. 4– 13, 2017, doi: 10.1007/s12471-016-0919-2.
- [21] H. Jouda, L. L. Murillo, and T. Wang, "Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications," *Cells*, vol. 11, no. 3, pp. 1–21, 2022, doi: 10.3390/cells11030493.
- [22] M. Carrabba and P. Madeddu, "Current strategies for the manufacture of small size tissue engineering vascular grafts," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. 41, pp. 1–12, 2018,

doi: 10.3389/fbioe.2018.00041.

- [23] S. Goldman *et al.*, "Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: Results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 44, no. 11, pp. 2149–2156, 2004, doi: 10.1016/j.jacc.2004.08.064.
- [24] K. E. Brownson and A. Dardik, "Next generation ECM-based vascular biomaterials," in *Extracellular Matrix-derived Implants in Clinical Medicine*, Elsevier Inc., 2016, pp. 19–40. doi: 10.1016/B978-0-08-100166-0.00003-7.
- [25] J. Chen, D. Zhang, L. P. Wu, and M. Zhao, "Current Strategies for Engineered Vascular Grafts and Vascularized Tissue Engineering," *Polymers (Basel).*, vol. 15, no. 9, 2023, doi: 10.3390/polym15092015.
- [26] H. Yuan, C. Chen, Y. Liu, T. Lu, and Z. Wu, "Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 108, no. 3, pp. 426–445, 2020, doi: 10.1002/jbm.a.36825.
- [27] K. C. Rustad, M. Sorkin, B. Levi, M. T. Longaker, and G. C. Gurtner, "Strategies for organ level tissue engineering," *Organogenesis*, vol. 6, no. 3, pp. 151–157, 2010, doi: 10.4161/org.6.3.12139.
- [28] J. G. Nemeno-Guanzon *et al.*, "Trends in tissue engineering for blood vessels,"
 J. Biomed. Biotechnol., no. 956345, pp. 1–14, 2012, doi: 10.1155/2012/956345.
- [29] L. Zhang, J. Zhou, Q. Lu, Y. Wei, and S. Hu, "A Novel Small-Diameter Vascular Graft: In Vivo Behavior of Biodegradable Three-Layered Tubular Scaffolds," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 99, no. 4, pp. 1007–1015, 2008, doi: 10.1002/bit.21629.
- [30] D. B. Camasão and D. Mantovani, "The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review," *Mater. Today Bio*, vol. 10, no. 100106, 2021, doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100106.
- [31] K. Hu *et al.*, "History, progress and future challenges of artificial blood vessels: a narrative review," *Biomater. Transl.*, vol. 3, no. 1, pp. 81–98, 2022, doi: 10.12336/biomatertransl.2022.01.008.
- [32] A. W. Zia, R. Liu, and X. Wu, "Structural design and mechanical performance of composite vascular grafts," *Bio-Design Manuf.*, vol. 5, no. 4, pp. 757–785, 2022, doi: 10.1007/s42242-022-00201-7.
- [33] W. He et al., "Pericyte-based human tissue engineered vascular grafts," Biomaterials,

vol. 31, no. 32, pp. 8235–8244, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.034.

- [34] Y. Hattori, "The Multiple Roles of Pericytes in Vascular Formation and Microglial Functions in the Brain," *Life*, vol. 12, no. 11, p. 1835, Nov. 2022, doi: 10.3390/life12111835.
- [35] Y. Roina, F. Auber, D. Hocquet, and G. Herlem, "ePTFE-based biomedical devices: An overview of surgical efficiency," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 110, no. 2, pp. 302–320, 2022, doi: 10.1002/jbm.b.34928.
- [36] B. B. J. Leal, N. Wakabayashi, K. Oyama, H. Kamiya, D. I. Braghirolli, and P. Pranke,
 "Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 7, no. 592361, 2021, doi: 10.3389/FCVM.2020.592361.
- [37] Y. Shen *et al.*, "Development of Biodegradable Polymeric Stents for the Treatment of Cardiovascular Diseases," *Biomolecules*, vol. 12, no. 9, 2022, doi: 10.3390/biom12091245.
- [38] F. Kawecki and N. L'Heureux, "Current biofabrication methods for vascular tissue engineering and an introduction to biological textiles," *Biofabrication*, vol. 15, no. 2, 2023, doi: 10.1088/1758-5090/acbf7a.
- [39] F. Hess, "History of (micro) vascular surgery and the development of small-caliber blood vessel prostheses (with some notes on patency rates and re-endothelialization)," *Microsurgery*, vol. 6, no. 2, pp. 59–69, 1985, doi: 10.1002/MICR.1920060202.
- [40] N. Singh and R. W. Quan, "Damage Control: Considerations for Vascular Conduit in the Repair of Vascular Injury," in *Rich's Vascular Trauma*, Elsevier Inc., 2015, pp. 206– 214. doi: 10.1016/B978-1-4557-1261-8.00018-7.
- [41] L. Xue and H. P. Greisler, "Biomaterials in the development and future of vascular grafts," vol. 37, pp. 472–480, 2003, doi: 10.1067/mva.2003.88.
- [42] R. Zizhou, X. Wang, and S. Houshyar, "Review of Polymeric Biomimetic Small-Diameter Vascular Grafts to Tackle Intimal Hyperplasia," ACS Omega, vol. 7, no. 26, pp. 22125–22148, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c01740.
- [43] M. J. Moore, R. P. Tan, N. Yang, J. Rnjak-Kovacina, and S. G. Wise, "Bioengineering artificial blood vessels from natural materials," *Trends Biotechnol.*, vol. 40, no. 6, pp. 693–707, 2022, doi: 10.1016/j.tibtech.2021.11.003.
- [44] G. A. Guida and G. D. Angelini, "Pathophysiology and Mechanisms of Saphenous Vein Graft Failure," *Brazilian J. Cardiovasc. Surg.*, vol. 37, no. Special Issue 1, pp. 32–37,

2022, doi: 10.21470/1678-9741-2022-0133.

- [45] S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, and F. Claeyssens, "The tissue-engineered vascular graft -Past, present, and future," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 22, no. 1, pp. 68–100, 2016, doi: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
- [46] W. Wu *et al.*, "Mature vascular smooth muscle cells, but not endothelial cells, serve as the major cellular source of intimal hyperplasia in vein grafts," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, no. 8, pp. 1870–1890, 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314465.
- [47] Y. Zhuang *et al.*, "Challenges and strategies for in situ endothelialization and long-term lumen patency of vascular grafts," *Bioact. Mater.*, vol. 6, no. 6, pp. 1791–1809, 2021, doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.11.028.
- [48] K. Wadey, J. Lopes, M. Bendeck, and S. George, "Role of smooth muscle cells in coronary artery bypass grafting failure," *Cardiovasc. Res.*, vol. 114, no. 4, pp. 601–610, 2018, doi: 10.1093/cvr/cvy021.
- [49] F. Zhang and M. W. King, "Immunomodulation Strategies for the Successful Regeneration of a Tissue-Engineered Vascular Graft," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 11, no. 12, pp. 1–24, 2022, doi: 10.1002/adhm.202200045.
- [50] B. Ratner, "Vascular Grafts: Technology Success/ Technology Failure," *BME Front.*, vol. 4, pp. 1–11, 2023, doi: 10.34133/bmef.0003.
- [51] J. M. Behr, Y. S. Wong, and S. Venkatraman, "Small-Diameter Blood Vessel Substitutes: Biomimetic Approaches to Improve Patency," *Biomimetics*, vol. 9, no. 2, pp. 1–13, 2024, doi: 10.3390/biomimetics9020097.
- [52] H. K. Raut, R. Das, Z. Liu, X. Liu, and S. Ramakrishna, "Biocompatibility of Biomaterials for Tissue Regeneration or Replacement," *Biotechnol. J.*, vol. 15, no. 12, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1002/biot.202000160.
- [53] M. C. Bonferoni *et al.*, "Biomaterials for soft tissue repair and regeneration: A focus on italian research in the field," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091341.
- [54] M. Weber *et al.*, "Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. 99, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00099.
- [55] M. Gorbet, C. Sperling, M. F. Maitz, C. A. Siedlecki, C. Werner, and M. V. Sefton, "The blood compatibility challenge. Part 3: Material associated activation of blood cascades and cells," *Acta Biomater.*, vol. 94, pp. 25–32, 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.020.

- [56] J. Kuchinka, C. Willems, D. V. Telyshev, and T. Groth, "Control of blood coagulation by hemocompatible material surfaces—A review," *Bioengineering*, vol. 8, no. 12, pp. 1–26, 2021, doi: 10.3390/bioengineering8120215.
- [57] A. Bhattacharjee, A. V. Savargaonkar, M. Tahir, A. Sionkowska, and K. C. Popat, "Surface modification strategies for improved hemocompatibility of polymeric materials: a comprehensive review," *RSC Adv.*, vol. 14, no. 11, pp. 7440–7458, 2024, doi: 10.1039/d3ra08738g.
- [58] L. A. Feng, J. Shi, J. Y. Guo, and S. F. Wang, "Recent strategies for improving hemocompatibility and endothelialization of cardiovascular devices and inhibition of intimal hyperplasia," *J. Mater. Chem. B*, vol. 10, no. 20, pp. 3781–3792, 2022, doi: 10.1039/d2tb00478j.
- [59] J. Zhao and Y. Feng, "Surface Engineering of Cardiovascular Devices for Improved Hemocompatibility and Rapid Endothelialization," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 18, pp. 1–25, 2020, doi: 10.1002/adhm.202000920.
- [60] M. Gaudino *et al.*, "Mechanisms, consequences, and prevention of coronary graft failure," *Circulation*, vol. 136, no. 18, pp. 1749–1764, 2017, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027597.
- [61] F. O. Obiweluozor *et al.*, "Considerations in the Development of Small-Diameter Vascular Graft as an Alternative for Bypass and Reconstructive Surgeries: A Review," *Cardiovasc. Eng. Technol.*, vol. 11, no. 5, pp. 495–521, 2020, doi: 10.1007/s13239-020-00482-y.
- [62] D. Radke *et al.*, "Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 15, pp. 1–24, 2018, doi: 10.1002/adhm.201701461.
- [63] Y. Jeong, Y. Yao, and E. K. F. Yim, "Current understanding of intimal hyperplasia and effect of compliance in synthetic small diameter vascular grafts," *Biomater. Sci.*, vol. 8, no. 16, pp. 4383–4395, 2020, doi: 10.1039/d0bm00226g.
- [64] S. Ozdemir, I. Yalcin-Enis, B. Yalcinkaya, and F. Yalcinkaya, "An Investigation of the Constructional Design Components Affecting the Mechanical Response and Cellular Activity of Electrospun Vascular Grafts," *Membranes*, vol. 12, no. 929, 2022, doi: 10.3390/membranes12100929.
- [65] X. Wang *et al.*, "Nonlinear Elasticity of Blood Vessels and Vascular Grafts," ACS Biomater. Sci. Eng., vol. 10, no. 6, pp. 3631–3654, 2024, doi:

10.1021/acsbiomaterials.4c00326.

- [66] D. Wang, Y. Xu, Q. Li, and L. S. Turng, "Artificial small-diameter blood vessels: Materials, fabrication, surface modification, mechanical properties, and bioactive functionalities," *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 9, pp. 1801–1822, 2020, doi: 10.1039/c9tb01849b.
- [67] G. Lutzweiler, A. N. Halili, and N. E. Vrana, "The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, pp. 1–29, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070602.
- [68] I. Bružauskaitė, D. Bironaitė, E. Bagdonas, and E. Bernotienė, "Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects," *Cytotechnology*, vol. 68, no. 3, pp. 355–369, 2016, doi: 10.1007/s10616-015-9895-4.
- [69] V. S. Chernonosova and P. P. Laktionov, "Structural Aspects of Electrospun Scaffolds Intended for Prosthetics of Blood Vessels," *Polymers*, vol. 14, no. 9, 2022, doi: 10.3390/polym14091698.
- [70] F. Mukasheva, L. Adilova, A. Dyussenbinov, B. Yernaimanova, M. Abilev, and D. Akilbekova, "Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 12, pp. 1–21, 2024, doi: 10.3389/fbioe.2024.1444986.
- [71] P. Xia and Y. Luo, "Vascularization in tissue engineering: The architecture cues of pores in scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 110, no. 5, pp. 1206–1214, 2022, doi: 10.1002/jbm.b.34979.
- [72] X. Yuan *et al.*, "Tri-Layered Vascular Grafts Guide Vascular Cells' Native-like Arrangement," *Polymers (Basel).*, vol. 14, no. 7, 2022, doi: 10.3390/polym14071370.
- [73] L. E. Niklason and J. H. Lawson, "Bioengineered human blood vessels," *Science*, vol. 370, no. 185, 2020, doi: 10.1126/science.aaw8682.
- [74] V. Sgarminato, C. Tonda-Turo, and G. Ciardelli, "Reviewing recently developed technologies to direct cell activity through the control of pore size: From the macro- to the nanoscale," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 108, no. 4, pp. 1176–1185, 2020, doi: 10.1002/jbm.b.34467.
- [75] M. B. Elliott and S. Gerecht, "Three-dimensional culture of small-diameter vascular grafts," J. Mater. Chem. B, vol. 4, no. 20, pp. 3443–3453, 2016, doi: 10.1039/c6tb00024j.
- [76] S. Lampridis and S. J. George, "Nonautologous Grafts in Coronary Artery Bypass Surgery: A Systematic Review," Ann. Thorac. Surg., vol. 112, no. 6, pp. 2094–2103,

2021, doi: 10.1016/J.ATHORACSUR.2020.11.028.

- [77] L. C. Rusu, L. C. Ardelean, A. A. Jitariu, C. A. Miu, and C. G. Streian, "An insight into the structural diversity and clinical applicability of polyurethanes in biomedicine," *Polymers (Basel).*, vol. 12, no. 5, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/POLYM12051197.
- S. Azarmgin *et al.*, "Polyurethanes and Their Biomedical Applications," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 11, pp. 6828–6859, 2024, doi: 10.1021/ ACSBIOMATERIALS.4C01352.
- [79] H. Wang, T. Li, J. Li, R. Zhao, A. Ding, and F. J. Xu, "Structural engineering of polyurethanes for biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 151, no. 101803, 2024, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2024.101803.
- [80] Z. Miri, S. Farè, Q. Ma, and H. J. Haugen, "Updates on polyurethane and its multifunctional applications in biomedical engineering," *Prog. Biomed. Eng.*, vol. 5, no. 4, 2023, doi: 10.1088/2516-1091/acef84.
- [81] T. M. Crescentini, J. C. May, J. A. McLean, and D. M. Hercules, "Mass spectrometry of polyurethanes," *Polymer*, vol. 181, no. 121624, 2019, doi: 10.1016/ j.polymer.2019.121624.
- [82] S. Fathi-Karkan, B. Banimohamad-Shotorbani, S. Saghati, R. Rahbarghazi, and S. Davaran, "A critical review of fibrous polyurethane-based vascular tissue engineering scaffolds," *J. Biol. Eng.*, vol. 16, no. 6, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1186/s13036-022-00286-9.
- [83] S. H. Ajili, N. G. Ebrahimi, and M. Soleimani, "Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 5, pp. 1519–1530, 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2008.12.014.
- [84] J. Li, Z. Chen, and X. Yang, "State of the Art of Small-Diameter Vessel-Polyurethane Substitutes," *Macromol. Biosci.*, vol. 19, no. 5, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1002/mabi.201800482.
- [85] K. Navas-Gómez and M. F. Valero, "Why Polyurethanes Have Been Used in the Manufacture and Design of Cardiovascular Devices: A Systematic Review," *Materials*, vol. 13, no. 15, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/MA13153250.
- [86] E. M. Christenson, M. Dadsetan, M. Wiggins, J. M. Anderson, and A. Hiltner, "Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: In vivo studies," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 69, no. 3, pp. 407–416, 2004, doi: 10.1002/ jbm.a.30002.

- [87] H. Khatoon and S. Ahmad, "Polyurethane: A Versatile Scaffold for Biomedical Applications," *Significances Bioeng. Biosci.*, vol. 2, no. 3, pp. 144–146, 2018, doi: 10.31031/sbb.2018.02.000536.
- [88] A. P. Rickel, X. Deng, D. Engebretson, and Z. Hong, "Electrospun nanofiber scaffold for vascular tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 129, no. 112373, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112373.
- [89] M. Rahmati *et al.*, "Electrospinning for tissue engineering applications," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 117, no. 100721, 2021, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100721.
- [90] G. G. Flores-Rojas, B. Gómez-Lazaro, F. López-Saucedo, R. Vera-Graziano, E. Bucio, and E. Mendizábal, "Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering: A Review," *Macromol*, vol. 3, no. 3, pp. 524–553, 2023, doi: 10.3390/macromol3030031.
- [91] H. Othman *et al.*, "Electrospinning Process Parameters and application: a review," *J. Text. Color. Polym. Sci.*, vol. 22, pp. 59–66, 2024, doi: 10.21608/jtcps. 2024.259004.1268.
- [92] B. A. Chinnappan, M. Krishnaswamy, H. Xu, and M. E. Hoque, "Electrospinning of Biomedical Nanofibers/Nanomembranes: Effects of Process Parameters," *Polymers*, vol. 14, no. 18, pp. 1–20, 2022, doi: 10.3390/polym14183719.
- [93] L. Zhao et al., "Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts in vivo," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 118, no. 111441, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111441.
- [94] T. Zhu *et al.*, "Covalent grafting of PEG and heparin improves biological performance of electrospun vascular grafts for carotid artery replacement," *Acta Biomater.*, vol. 119, pp. 211–224, 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2020.11.013.
- [95] R. Dorati *et al.*, "Electrospun tubular vascular grafts to replace damaged peripheral arteries: A preliminary formulation study," *Int. J. Pharm.*, vol. 596, no. 120198, 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120198.
- [96] B. Zavan *et al.*, "Electrospun pcl-based vascular grafts: In vitro tests," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 3, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/nano11030751.
- [97] M. A. Rodriguez-Soto *et al.*, "Blood-Vessel-Inspired Hierarchical Trilayer Scaffolds: PCL/Gelatin-Driven Protein Adsorption and Cellular Interaction," *Polymers*, vol. 14, no. 11, 2022, doi: 10.3390/polym14112135.
- [98] S. Guo, Y. Jiang, J. Jiao, Y. Shi, T. Zhu, and L. Li, "Electrospun gelatin-based biomimetic scaffold with spatially aligned and three-layer architectures for vascular

tissue engineering," Int. J. Biol. Macromol., vol. 242, no. 125039, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125039.

- [99] X. Chen, D. Chen, X. Ai, R. Hu, and H. Zhang, "A new method for the preparation of three-layer vascular stents: A preliminary study on the preparation of biomimetic threelayer vascular stents using a three-stage electrospun membrane," *Biomed. Mater.*, vol. 15, no. 5, 2020, doi: 10.1088/1748-605X/ab920a.
- [100] L. Maduna and A. Patnaik, "Challenges Associated with the Production of Nanofibers," *Processes*, vol. 12, no. 10, 2024, doi: 10.3390/pr12102100.
- [101] M. Tebyetekerwa and S. Ramakrishna, "What Is Next for Electrospinning?," *Matter*, vol. 2, no. 2, pp. 279–283, 2020, doi: 10.1016/j.matt.2020.01.004.
- [102] R. Li, Y. Feng, H. Zhang, J. Liu, and J. Wang, "Recent advances in fabricating, characterizing, and applying food-derived fibers using microfluidic spinning technology," *Food Hydrocoll.*, vol. 144, pp. 1–20, 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.108947.
- [103] M. Ahmadi Bonakdar and D. Rodrigue, "Electrospinning: Processes, Structures, and Materials," *Macromol*, vol. 4, no. 1, pp. 58–103, 2024, doi: 10.3390/macromol4010004.
- [104] Y. Gao et al., "Recent progress and challenges in solution blow spinning," Mater. Horizons, vol. 8, no. 2, pp. 426–446, 2021, doi: 10.1039/d0mh01096k.
- [105] J. Carriles, P. Nguewa, and G. González-Gaitano, "Advances in Biomedical Applications of Solution Blow Spinning," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 19, 2023, doi: 10.3390/ijms241914757.
- [106] M. Mobaraki, M. Liu, and A. Masoud, "Biomedical Applications of Blow-Spun Coatings, Mats, and Scaffolds — A Mini-Review," J. Compos. Sci., vol. 7, no. 86, pp. 1–17, 2023, doi: 10.3390/jcs7020086.
- [107] E. S. Medeiros, G. M. Glenn, A. P. Klamczynski, W. J. Orts, and L. H. C. Mattoso, "Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 113, no. 4, pp. 2322–2330, 2009, doi: 10.1002/app.30275.
- [108] M. Khalilur, R. Khan, and M. N. Hassan, "Solution Blow Spinning (SBS): A Promising Spinning System for Submicron/Nanofibre Production," *Text. Leather Rev.*, vol. 4, no. 3, pp. 181–200, 2021, doi: 10.31881/TLR.
- [109] F. Liang *et al.*, "Fabrication of three-dimensional micro-nanofiber structures by a novel solution blow spinning device," *AIP Adv.*, vol. 7, no. 2, 2017, doi: 10.1063/1.4973719.

- [110] G. C. Dadol *et al.*, "Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: Materials, methods, and applications," *Mater. Today Commun.*, vol. 25, no. 101656, 2020, doi: 10.1016/j.mtcomm.2020.101656.
- [111] K. R. Khan and M. N. Hassan, "Solution Blow Spinning (SBS): A Promising Spinning System for Submicron / Nanofi bre Production," *Text. Leather Rev.*, vol. 4, no. 3, pp. 181–200, 2021, doi: https://doi.org/10.31881/TLR.2021.04.
- [112] R. Atif *et al.*, "Solution blow spinning of polyvinylidene fluoride based fibers for energy harvesting applications: A review," *Polymers*, vol. 12, no. 6, 2020, doi: 10.3390/polym12061304.
- [113] M. Wojasiński and T. Ciach, "Shear and elongational rheometry for determination of spinnability window of polymer solutions in solution blow spinning," J. Appl. Polym. Sci., vol. 139, no. 36, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1002/app.52851.
- [114] J. L. Daristotle, A. M. Behrens, A. D. Sandler, and P. Kofinas, "A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning," ACS Appl. Mater. Interfaces, vol. 8, no. 51, pp. 34951–34963, 2016, doi: 10.1021/acsami.6b12994.
- [115] M. M. O. Simbara, A. R. Santos, A. J. P. Andrade, and S. M. Malmonge, "Comparative study of aligned and nonaligned poly(ε-caprolactone) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 107, no. 5, pp. 1462–1470, 2019, doi: 10.1002/jbm.b.34238.
- [116] J. Li, G. Song, J. Yu, Y. Wang, J. Zhu, and Z. Hu, "Preparation of Solution Blown Polyamic Acid Nanofibers and Their Imidization into Polyimide Nanofiber Mats," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 11, 2017, doi: 10.3390/NANO7110395.
- [117] D. D. da Silva Parize *et al.*, "Solution blow spinning: Parameters optimization and effects on the properties of nanofibers from poly(lactic acid)/dimethyl carbonate solutions," *J. Mater. Sci.*, vol. 51, no. 9, pp. 4627–4638, 2016, doi: 10.1007/s10853-016-9778-x.
- [118] R. J. Souza, J. E. Soares Filho, T. A. Simões, J. E. Oliveira, and E. S. Medeiros, "Experimental Investigation of Solution Blow Spinning Nozzle Geometry and Processing Parameters on Fiber Morphology," ACS Appl. Polym. Mater., vol. 6, no. 16, pp. 9735–9743, 2024, doi: 10.1021/acsapm.4c01273.
- [119] R. Atif *et al.*, "Study of air pressure and velocity for solution blow spinning of polyvinylidene fluoride nanofibres," *Processes*, vol. 9, no. 6, 2021, doi: 10.3390/pr9061014.
- [120] K. Czarnecka, M. Wojasiński, T. Ciach, and P. Sajkiewicz, "Solution Blow Spinning of

Polycaprolactone—Rheological Determination of Spinnability and the Effect of Processing Conditions on Fiber Diameter and Alignment," *Materials (Basel).*, vol. 14, no. 6, 2021, doi: 10.3390/MA14061463.

- [121] M. M. O. Simbara, A. R. Santos, A. J. P. Andrade, and S. M. Malmonge, "Comparative study of aligned and nonaligned poly(ε-caprolactone) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 107, no. 5, pp. 1462–1470, 2019, doi: 10.1002/jbm.b.34238.
- [122] J. González-Benito, M. A. Lorente, D. Olmos, and A. Kramar, "Solution Blow Spinning to Prepare Preferred Oriented Poly(ethylene oxide) Submicrometric Fibers," *Fibers*, vol. 11, no. 79, 2023, doi: 10.3390/fib11090079.
- [123] A. M. C. Santos, E. L. G. Medeiros, J. J. Blaker, and E. S. Medeiros, "Aqueous solution blow spinning of poly(vinyl alcohol) micro- and nanofibers," *Mater. Lett.*, vol. 176, pp. 122–126, 2016, doi: 10.1016/j.matlet.2016.04.101.
- [124] "https://omnexus.specialchem.com/product/e-advansource-biomaterials-chronoflex-c-75d." dostęp: 11.06.2025
- [125] International ASTM, "ASTM D 638-02a Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics," 2013, doi: 10.1520/D0638-10.1.
- [126] I. Łopianiak, B. A. Butruk-Raszeja, and M. Wojasiński, "Shore hardness of bulk polyurethane affects the properties of nanofibrous materials differently," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 161, no. 2024, 2025, doi: 10.1016/j.jmbbm.2024.106793.
- [127] I. Łopianiak *et al.*, "Characterization of Blow-Spun Polyurethane Scaffolds-Influence of Fiber Alignment and Fiber Diameter on Pericyte Growth," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 7, pp. 4388–4399, 2024, doi: 10.1021/acsbiomaterials.4c00051.
- [128] D. E. Heath, J. J. Lannutti, and S. L. Cooper, "Electrospun scaffold topography affects endothelial cell proliferation, metabolic activity, and morphology," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1195–1204, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32802.
- [129] S. Chen *et al.*, "Development of Electrospinning Setup for Vascular Tissue-Engineering Application with Thick-Hierarchical Fiber Alignment," *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 195–210, 2025, doi: 10.1007/s13770-024-00691-9.
- [130] J. A. Reid, A. McDonald, and A. Callanan, "Electrospun fibre diameter and its effects on vascular smooth muscle cells," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 32, no. 10, 2021, doi: 10.1007/s10856-021-06605-8.
- [131] I. Łopianiak, M. Wojasiński, A. Kuźmińska, P. Trzaskowska, and B. A. Butruk-Raszeja,

"The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds," *J. Biol. Eng.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1186/s13036-021-00278-1.

- [132] I. Łopianiak, W. Rzempołuch, M. Civelek, I. Cicha, T. Ciach, and B. A. Butruk-Raszeja, "Multilayered blow-spun vascular prostheses with luminal surfaces in Nano/Micro range: the influence on endothelial cell and platelet adhesion," *J. Biol. Eng.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–17, 2023, doi: 10.1186/s13036-023-00337-9.
- [133] M. Wojasiński and T. Ciach, "Analiza porównawcza wpływu wybranych parametrów procesowych na strukturę nanowłóknin PLLA wytwarzanych metodą elektroprzędzenia i rozdmuchu roztworu polimeru," *Inżynieria i Apar. Chem.*, vol. 53, no. 1, pp. 44–45, 2014, doi: 10.1002/app.
- [134] J. E. Oliveira, L. H. C. Mattoso, W. J. Orts, and E. S. Medeiros, "Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2013, no. 409572, 2013, doi: 10.1155/2013/409572.
- [135] Y. G. Ko *et al.*, "Growth behavior of endothelial cells according to electrospun poly(D,Llactic-co-glycolic acid) fiber diameter as a tissue engineering scaffold," *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 343–351, 2016, doi: 10.1007/s13770-016-0053-7.
- [136] C. Xu, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Electrospun Nanofiber Fabrication as Synthetic Extracellular Matrix and Its Potential for Vascular Tissue Engineering," *Tissue Enigneering*, vol. 10, no. 7–8, pp. 1160–1168, 2004, doi: 10.1089/TEN.2004.10.1160.
- [137] R. Singh, F. Ahmed, P. Polley, and J. Giri, "Fabrication and Characterization of Core-Shell Nanofibers Using a Next-Generation Airbrush for Biomedical Applications," ACS Appl. Mater. Interfaces, vol. 10, no. 49, pp. 41924–41934, 2018, doi: 10.1021/acsami.8b13809.
- [138] K. Czarnecka, M. Wojasiński, T. Ciach, and P. Sajkiewicz, "Solution blow spinning of polycaprolactone-rheological determination of spinnability and the effect of processing conditions on fiber diameter and alignment," *Materials*, vol. 14, no. 6, 2021, doi: 10.3390/ma14061463.
- [139] M. Wojasiński, M. Pilarek, and T. Ciach, "Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly(L-Lactic Acid) materials for biomedical engineering," *Polish J. Chem. Technol.*, vol. 16, no. 2, pp. 43– 50, 2014, doi: 10.2478/pjct-2014-0028.

- [140] J. Oliveira, G. S. Brichi, J. M. Marconcini, L. H. C. Mattoso, G. M. Glenn, and E. S. Medeiros, "Effect of solvent on the physical and morphological properties of poly(lactic acid) nanofibers obtained by solution blow spinning," *J. Eng. Fiber. Fabr.*, vol. 9, no. 4, pp. 117–125, 2014, doi: 10.1177/155892501400900414.
- [141] Z. Yang, H. Peng, W. Wang, and T. Liu, "Crystallization behavior of poly(εcaprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites," J. Appl. Polym. Sci., vol. 116, no. 5, pp. 2658–2667, 2010, doi: 10.1002/app.
- [142] J. Li, G. Song, J. Yu, Y. Wang, J. Zhu, and Z. Hu, "Preparation of solution blown polyamic acid nanofibers and their imidization into polyimide nanofiber mats," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 11, 2017, doi: 10.3390/nano7110395.
- [143] N. Nikolić, D. Olmos, A. Kramar, and J. González-Benito, "Effect of Collector Rotational Speed on the Morphology and Structure of Solution Blow Spun Polylactic Acid (PLA)," *Polymers (Basel).*, vol. 16, no. 191, 2024, doi: 10.3390/polym16020191.
- [144] R. Saraczyn, M. Deroszewska, T. Kowaluk, E. Skołek, W. Rządkowski, and D. Myszka, "Supported by 2D and 3D Imaging Methods Investigation of the Influence of Fiber Orientation on the Mechanical Properties of the Composites Reinforced with Fibers in a Polymer Matrix," *Adv. Sci. Technol. Res. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 170–183, 2023, doi: 10.12913/22998624/166101.
- [145] J. F. Ganghoffer, I. Goda, K. ElNady, and Y. Rahali, "Prediction of the Effective Mechanical Properties of Regular and Random Fibrous Materials Based on the Mechanics of Generalized Continua," in *Mechanics of Fibrous Materials and Applications*, Springer, Cham, 2020, pp. 63–122. doi: 10.1007/978-3-030-23846-9_2.
- [146] A. Patanaik, V. Jacobs, and R. D. Anandjiwala, "Role of Jet Path on Uniformity of Electrospun Nanofibers," J. Nanosci. Nanotechnol., vol. 11, no. 2, pp. 1103–1110, 2011, doi: 10.1166/JNN.2011.3611.
- [147] V. Milleret, T. Hefti, H. Hall, V. Vogel, and D. Eberli, "Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 12, pp. 4349–4356, 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.07.032.
- [148] K. S. Miller, R. Khosravi, C. K. Breuer, and J. D. Humphrey, "A hypothesis-driven parametric study of effects of polymeric scaffold properties on tissue engineered neovessel formation," *Acta Biomater.*, vol. 11, no. 1, pp. 283–294, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.046.
- [149] A. Krüger-Genge, A. Blocki, R. Franke, and F. Jung, "Vascular Endothelial Cell

Biology: An Update," Int. J. Mol. Sci., vol. 20, no. 4411, 2019, doi: 10.3390/ijms20184411.

- [150] J. T. Wolfe, A. Shradhanjali, and B. J. Tefft, "Strategies for Improving Endothelial Cell Adhesion to Blood-Contacting Medical Devices," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 28, no. 5, pp. 1067–1092, 2022, doi: 10.1089/TEN.TEB.2021.0148.
- [151] X. Li et al., "Effects of aligned and random fibers with different diameter on cell behaviors," Colloids Surfaces B Biointerfaces, vol. 171, pp. 461–467, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.045.
- [152] S. François, N. Chakfé, B. Durand, and G. Laroche, "A poly(1-lactic acid) nanofibre mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2418–2428, 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.03.013.
- [153] Z. Zhang, Z. Wang, S. Liu, and M. Kodama, "Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses," *Biomaterials*, vol. 25, no. 1, pp. 177–187, 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00478-2.
- [154] X. Wu, J. Zhou, and D. Li, "Orientation of the Mitotic Spindle in Blood Vessel Development," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. 583325, pp. 1–7, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.583325.
- [155] C. D. Devillard and C. A. Marquette, "Vascular Tissue Engineering: Challenges and Requirements for an Ideal Large Scale Blood Vessel," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, no. 721843, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.721843.
- [156] Y. Wang *et al.*, "Electrospun tubular scaffold with circumferentially aligned nanofibers for regulating smooth muscle cell growth," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 4, pp. 2958–2962, 2014, doi: 10.1021/am405556x.
- [157] A. Armulik, G. Genové, and C. Betsholtz, "Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises," *Dev. Cell*, vol. 21, no. 2, pp. 193–215, 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- [158] International Organization for Standardization, "ISO 7198:2016: Implants for surgery Vascular prostheses — Tubular vascular prostheses and vascular patches," 2016.
- [159] H. Zhang *et al.*, "Effect of Polyelectrolyte Film Stiffness on Endothelial Cells during Endothelial-to-Mesenchymal Transition," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 11, pp. 3584–3593, 2015, doi: 10.1021/acs.biomac.5b01057.
- [160] Y. T. Yeh *et al.*, "Matrix Stiffness Regulates Endothelial Cell Proliferation through Septin 9," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046889.

- [161] H. Chang *et al.*, "Stiffness of polyelectrolyte multilayer film influences endothelial function of endothelial cell monolayer," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 149, pp. 379–387, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.012.
- [162] I. C. P. Rodrigues *et al.*, "Extracellular matrix-derived and low-cost proteins to improve polyurethane-based scaffolds for vascular grafts," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-09040-z.
- [163] S. Quicken, Y. de Bruin, B. Mees, J. Tordoir, T. Delhaas, and W. Huberts, "Computational study on the haemodynamic and mechanical performance of electrospun polyurethane dialysis grafts," *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 19, no. 2, pp. 713–722, 2020, doi: 10.1007/s10237-019-01242-1.
- [164] International ASTM, "ASTM F3225-17: Standard Guide for Characterization and Assessment of Vascular Graft Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)," 2022.
- [165] C. J. Kostelnik, K. J. Crouse, W. Carver, and J. F. Eberth, "Longitudinal Histomechanical Heterogeneity of the Internal Thoracic Artery," *Physiol. Behav.*, vol. 116, pp. 1–27, 2021, doi: 10.1177/0022146515594631.Marriage.
- [166] G. Singh and A. Chanda, "Mechanical properties of whole-body soft human tissues: A review," *Biomed. Mater.*, vol. 16, no. 6, 2021, doi: 10.1088/1748-605X/ac2b7a.
- [167] L. Soletti *et al.*, "A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 1, pp. 110–122, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2009.06.026.
- [168] A. Tajaddini, D. L. Kilpatrick, P. Schoenhagen, E. M. Tuzcu, M. Lieber, and D. G. Vince, "Impact of age and hyperglycemia on the mechanical behavior of intact human coronary arteries: An ex vivo intravascular ultrasound study," *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.*, vol. 288, no. 1, pp. 1–25, 2005, doi: 10.1152/ajpheart.00646.2004.
- [169] S. Maleki, A. Shamloo, and F. Kalantarnia, "Tubular TPU/SF nanofibers covered with chitosan-based hydrogels as small-diameter vascular grafts with enhanced mechanical properties," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-10264-2.
- [170] X. He et al., "Electrospun gelatin / PCL and collagen / PLCL scaffolds for vascular tissue engineering," Int. J. Nanomedicine, vol. 9, pp. 2335–2344, 2014.
- [171] P. Uttayarat *et al.*, "Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 11, pp. 4229–4237, 2010, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2010.06.008.
- [172] M. Bouchet, M. Gauthier, M. Maire, A. Ajji, and S. Lerouge, "Towards compliant small-

diameter vascular grafts: Predictive analytical model and experiments," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 100, pp. 715–723, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.023.

- [173] International Organization for Standardization, "ISO 10993-4: Biological evaluation of medical devices," 2021.
- [174] International ASTM, "ASTM F756-17: Standard Practice for Platelet Leukocyte Count—An In-Vitro Measure for Hemocompatibility Assessment of Cardiovascular Materials," 2017.
- [175] International ASTM, "ASTM F2888-19: Standard Practice for the Assessment of Hemolytic Properties of Materials," 2019.
- [176] S. Braune, R. A. Latour, M. Reinthaler, U. Landmesser, A. Lendlein, and F. Jung, "In Vitro Thrombogenicity Testing of Biomaterials," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 8, no. 21, 2019, doi: 10.1002/adhm.201900527.
- [177] W. van Oeveren, "Obstacles in Haemocompatibility Testing," *Scientifica (Cairo).*, vol. 2013, no. 392584, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1155/2013/392584.
- [178] R. Major *et al.*, "In vitro haemocompatibility assessment of acrylic acid deposited on solid, polyurethane substrate," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 199, no. 111562, 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111562.
- [179] C. K. Hashi *et al.*, "Antithrombogenic modification of small-diameter microfibrous vascular grafts," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 8, pp. 1621–1627, 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.208348.

Pełne teksty publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja P1

<u>Łopianiak I.</u>, Butruk-Raszeja B.A. Wojasiński M., (2025). *Shore hardness of bulk polyurethane affects the properties of nanofibrous materials differently.* Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 161, 1-10.

DOI: <u>10.1016/j.jmbbm.2024.106793</u> IF (2025) = 3,3 Punktacja MNiSW (2025) = 100 CiteScore = 6,800

Wkład w wykonanie badań:

- Wytworzenie materiałów włóknistych;
- Przeprowadzenie analiz właściwości wytworzonych materiałów: analiza mikroskopowa i spektroskopowa oraz pomiar średnic, porowatości, właściwości mechanicznych, adhezji płytek krwi;
- Opracowanie danych pomiarowych;
- Analiza uzyskanych wyników wraz z pozostałymi Autorami.

Wkład w przygotowanie publikacji:

- Przygotowanie koncepcji manuskryptu wraz z Autorem korespondencyjnym;
- Przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu wraz z Autorem korespondencyjnym;
- Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz manuskryptu po recenzjach wraz z Autorem korespondencyjnym;
- Przygotowanie koncepcji rysunków i wykresów wraz z Autorem korespondencyjnym.

journal of the mechanical behavior of biomedical materials 161 (2025) 106793



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials



journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmbbm

Shore hardness of bulk polyurethane affects the properties of nanofibrous materials differently

Iwona Łopianiak a,b, Beata Butruk-Raszeja a, Michał Wojasiński a,*

^a Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland ^b Doctoral School of Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords: Polyurethane Tensile strength Nanofibers Solution blow spinning Platelets adhesion Hemocompatibility The present study shows the effect of the hardness of bulk polyurethane on the properties of nanofibrous materials produced in the solution blow spinning process. This study focuses on nanofibrous materials made from medical-grade polyurethanes with different hardness values on the Shore scale, from 75A to 75D. We aimed to determine the effect of the intrinsic properties of polyurethane used to produce nanofibers on the tensile properties of the resulting nanofibrous materials and *ir vitro* platelet adhesiveness. This study used a solution blow spinning process to produce nanofibrous materials from polyurethane solutions. It evaluates their properties using scanning electron microscopy, followed by porosity determination, tensile testing, and platelet adhesion assays. Generally, the bulk polymer's Shore hardness affects nanofibrous products' porosity and tensile properties. In the tested Shore hardness range, the most visible differences in material properties were observed for the fibers produced from the hardest (75D) and softest (75A) polyurethanes. The nanofibrous material produced using 75D polyurethane exhibited the highest porosity, up to approximately 0.87, owing to the low packing density of the stiff nanofibers. It also remained the stiffest, with the highest Young's modulus. On the other hand, the softest 75A polyurethanes. All tested nanofibrous materials retained their platelet adhesion resistance upon processing into nanofibers, with a mean platelet coverage below 1 % of the nanofibrous materials, which can be useful in various biomedical applications, particularly in produced is polyurethane and the trained their platelet adhesion resistance upon processing into nanofibers, with a mean platelet coverage below 1 % of the nanofibrous materials, which can be useful in various biomedical applications, particularly in producing tissue-engineered vascular grafts.

1. Introduction

The most characteristic property of nanofibrous materials is their high surface-to-volume ratio. However, nanofibers, especially polymeric nanofibers, range in size from a few nanometers to a few hundred nanometers (or up to at least 1 μ m) (Kenry and Lim, 2017; Mahalingam and Ediristinghe, 2013). Even though such a range escapes the standard definition of nanoscale, polymeric submicron fibers with a high surface-to-volume ratio remain nanomaterials called nanofibers. These two properties, small size and high surface area, combine to define an instrumental group of nanomaterials that can be produced using electrospinning, solution blow spinning, or centrifugal spinning in an efficient and scalable manner (Huang et al., 2019; Stojanovska et al., 2016).

Nanofibrous materials are widely used in biomedical engineering, such as dressings, tissue/organ replacement, drug release, and tissue growth support (Gao et al., 2022; Grasl et al., 2021; Liu et al., 2022; Weigel et al., 2022) because of their ease in controlling their physical (shape and structure) and mechanical properties. As mentioned above, properties such as mean fiber diameter, fiber arrangement, pore size, and porosity can be easily controlled during the manufacturing process, leading to a well-developed surface area (Dadol et al., 2020; Daristotle et al., 2016; Khan and Hassan, 2021). In addition, the toughness and strength of nanofibers depend on their size and increase with a decrease in the fiber diameter (Papkov et al., 2013; Wu and Dzenis, 2007). However, the mechanical properties of nanofibrous materials strongly depend on the chemical and mechanical properties of the bulk polymers. It is worth noting that the interaction of nanofibrous materials with human organs and tissues requires rigorous evaluation of their biological properties, as per every biomaterial (Podgórski et al., 2022). Biocompatibility, defined as the ability of a certain biomaterial to create

* Corresponding author.

```
E-mail address: michal.wojasinski@pw.edu.pl (M. Wojasiński).
```

https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106793

Received 19 February 2024; Received in revised form 17 October 2024; Accepted 1 November 2024

Available online 1 November 2024 1751-6161/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

a stable system with the biological material it is in contact with, must be defined for each system (Williams, 2008, 2009, 2014). Hence, to avoid side effects after implantation, such as allergenicity, toxic reaction symptoms, inflammation, or rejection, *in vitro* and *in vivo* testing should be performed (Frisch et al., 2023; Sharma et al., 2019).

Furthermore, in the case of blood-contacting biomaterials (e.g., stents, vascular grafts, and heart valves), blood-material interaction (hemocompatibility) should be thoroughly investigated. Blood component adhesion to the biomaterial surface, platelet activation, coagulation, and thrombus formation after contact with blood limits the clinical applicability of biomaterials. Thrombosis, which arises as a result of breaking the continuity of a blood vessel, is one of the major causes of blood-contacting material implantation failure (Gaudino et al., 2017; Lentz, 2003; Raghav et al., 2021; Safi et al., 2017; Sarkar et al., 2007). Platelet adhesion and aggregation are crucial factors for prothrombotic surface formation (Geffen et al., 2016; Ruggeri and Mendolicchio, 2007).

Blood-contacting materials built from nanofibrous structures often appear in the literature as tissue-engineered vascular grafts (TEVCs) or scaffolds for engineering vascular tissue (Goins et al., 2018; Li et al., 2018; Rohringer et al., 2023; Zhou et al., 2023). Although a wide range of biomaterials, especially polymers, can be used to produce TEVGs or scaffolds, polyurethanes are used the most intensively because of their elasticity and tunability of chemical properties, such as biodegradability and chemical resistance (Fortin et al., 2022; Li et al., 2019, 2024; Zhang et al., 2021).

Thus far, we have developed a fabrication method for nanofibrous structures with desired properties, including polyurethane nanofibrous materials (Kopeć et al., 2020; Łopianiak et al., 2020; Tomecka et al. 2017). We initially tested the processability of these materials to build vascular prostheses or scaffolds for TEVGs (Kopeć et al., 2022; Lopianiak et al., 2023). Moreover, we deeply evaluated the influence of nanomaterial properties (fiber size and alignment, pore size, porosity, and mechanical properties) on cell behavior (Lopianiak et al., 2021, 2023 2024). In this study, we considered that the structure and mechanical properties of fibrous materials and platelet adhesion are affected by the properties of bulk polyurethane. We designed and produced well-defined nanofibrous structures from polyurethanes varying hardness on the Shore scale to test this hypothesis. We systematically subjected them to tensile tests followed by in vitro platelet adhesion studies. We aimed to determine whether nanofibrous nonwovens' tensile and platelet adhesion properties depend on the polyurethane's intrinsic properties used to produce nanofibers.

2. Materials and methods

2.1. Fibrous materials preparation

Medical grade polyurethanes (PUs) ChronoFlexC® (AdvanSource Biomaterials) with five different hardness values on the Shore scale (75A, 80A, 93A, 45D, and 75D) were used to produce five different types of fibrous materials. The PU solutions were prepared by dissolving the polymer pellets in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, 99 %, FluoroChem) overnight at 20 °C using a magnetic stirrer. Concentrations presented in this study are expressed as weight-to-weight percent (% w/ w) and "%" for short. Fibrous materials were produced from PU solutions using the solution blow spinning (SBS) process, as described elsewhere (Lopianiak et al., 2020; Lopianiak and Butruk-Raszeja, 2020; Wojasiński et al., 2014). Briefly, each polymer solution was fed into the inner nozzle of the concentric nozzle system, while compressed air under a pressure of 1 bar flowed through the outer nozzle, pulled out the polymer solution, and directed to the rotating collector.

The first step of this study was to produce fibrous materials from every type of PUs from solutions with concentrations of 2-10 % to evaluate the possibility of producing fibrous materials from such a range of concentrations. The PU solution concentrations and volumes were then chosen to obtain materials with nanofiber diameters of 200, 500, and 1000 nm and thicknesses of the nanofibrous mat in the 200–300 μm range for each type of PU.

Nanofibrous materials were produced using the following SBS process parameters: solution flow rate of 30 mL/h, air pressure of 1 bar, nozzle-collector distance of 30 cm, collector rotational speed of 30000 rpm, inner nozzle diameter of 1 mm, and outer nozzle diameter of 4 mm. Time required to produce samples of nanofibrous mats with thickness in the range of 200–300 μm determined the volume of solution used in the process. Those values are listed in Table 1.

Fibers were collected on a cylindrical rotating collector with dimensions: 1.2 cm in diameter and 12 cm in length. When the SBS process was completed, the material was cut along the collector and removed. The obtained rectangular fibrous mats with 3.8×12 cm dimensions were subjected to further analysis.

2.2. Fiber size determination

Samples (0.5 × 0.5 cm) of each submicron fibrous material were prepared for scanning electron microscopy (SEM). Samples were glued to SEM stubs with carbon tape and covered with a 15 nm layer of gold using a sputter coater (K550 Emitech, Quorum Technologies), and n = 10 SEM images at magnification ×5000 were taken using scanning electron microscope Phenom G1 (PhenomWord, now ThermoFisher Scientific) for every sample. The size distribution was determined based on n = 100 fiber sizes measured using ImageJ software (Schindelin et al., 2012). Measurements were performed in triplicates for each type of fibrous material. The results were averaged and are presented as the mean \pm SD.

2.3. Porosity determination

The material porosity (ϵ) was calculated using the formula: $\epsilon = \begin{bmatrix} 1 & -1 \end{bmatrix}$

 $\frac{m_{B_{S}}}{\rho_p}$, where m_S is the sample mass [g], δ_S is a sample thickness [cm], S_S

is the sample surface area [cm²], and ρ_P is the density of ChronoFlex® polyurethane, $\rho_P = 1.2$ g/cm³ (Padsalgikar, 2017). For each type of material, three samples (1.0 × 1.0 cm) were prepared and weighed using an analytical lab scale to determine the sample weight. Samples (n = 3) were glued vertically to the SEM stubs and covered as described above. SEM images of the sample cross-section at magnification ×300 were taken (n = 6) using Phenom G1 SEM. Next, n = 5 thickness measurements from each image were obtained using the ImageJ software. The results were averaged to determine the sample thickness δ_s . Material thickness and porsity measurements were performed in triplicate and are presented as the mean ± SD.

2.4. Characteristic group's presence determination

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to identify the characteristic groups associated with PUs in the produced nanofibrous mats. The analysis was conducted using a Nicolet 6700 spectrometer (Thermo Fisher Scientific) that featured a Smart Orbit highperformance diamond single-bounce attenuated total reflectance (ATR) attachment. The resulting spectra were examined using OMNIC 8.3 software (Thermo Fisher Scientific).

2.5. Tensile properties measurements

To evaluate the tensile properties of the produced materials, n=15 samples with dimensions of 0.5 \times 7.0 cm were prepared for each type of material to evaluate their tensile properties. The samples were subjected

2

Table 1

Codification, designed fiber diameter, fabrication time, and solution volume for production of nanofibrous mats with a designed thickness of 200–300 µm with a flow rate of 30 mL/h, and measured structural properties of polyurethane nanofibrous materials produced from polymers with an increasing hardness on the Shore scale.

Solution blow spinning process conditions				Nanofibrous product properties		
Polymer	Polymer concentration [% w/w]	Designed fiber diameter [nm]	Fabrication time [min]/the used volume of the polymer solution [mL]	Mean fiber diameter ± SD [nm]	Nanofibrous mat thickness \pm SD [µm]	Nanofibrous mat porosity \pm SD [-]
75A	2.0	200	120/60	204 ± 86	225 ± 31	0.65 ± 0.09
	4.0	500	30/15	514 ± 172	229 ± 38	0.56 ± 0.07
	5.0	1000	20/10	925 ± 356	225 ± 31	0.63 ± 0.05
80A	4.0	200	60/30	244 ± 137	225 ± 31	0.59 ± 0.07
	6.0	500	30/15	485 ± 168	277 ± 36	0.62 ± 0.07
	8.0	1000	20/10	1178 ± 401	276 ± 39	0.65 ± 0.06
93A	4.0	200	60/30	176 ± 76	212 ± 21	0.70 ± 0.08
	6.0	500	30/15	475 ± 202	252 ± 42	0.70 ± 0.07
	8.0	1000	20/10	1102 ± 514	273 ± 36	0.65 ± 0.06
45D	2.0	200	240/120	206 ± 93	228 ± 26	0.67 ± 0.05
	4.0	500	60/30	530 ± 203	283 ± 35	0.63 ± 0.04
	6.0	1000	30/20	1029 ± 391	288 ± 31	0.57 ± 0.07
75D	4.0	200	50/25	294 ± 103	256 ± 45	0.87 ± 0.03
	5.5	500	30/15	564 ± 254	229 ± 38	0.84 ± 0.04
	7.0	1000	20/10	1033 ± 493	222 ± 41	0.83 ± 0.07

to a uniaxial stretching test following established protocols based on ASTM standards (Designation: D 882-02 and D 638-02a). The experiment utilized an Instron 3345 model (Instron) operating at room temperature and humidity with a crosshead speed of 10 mm/min and a sample initial length of 5 cm. Load-strain curves were acquired along with the maximum load and elongation at break. Notably, porosity measurements and SEM images indicate that only a portion of each sample's thickness is occupied by fibers (1-e), implying that the applied load is supported only by the fraction of the thickness of the sample. This was considered during data processing to calculate the maximum stress (Kopeć et al., 2020). Fifteen samples were analyzed for each type of fibrous material (n = 15). The results were averaged and presented as

2.6. Platelet adhesion

Fresh blood was collected from healthy volunteers in 4.5 ml tubes containing citrate (BD Vacutainer) just before the experiment. For this test, two samples in the shape of a disc with a diameter of 8 mm for each type of fibrous polyurethane material were placed in a 48-well plate. Next, 500 µm of 0.9 % NaCl solution (STANLAB) in Milli-Q ultrapure water was added to each well and incubated for 30 min at 37 °C. After incubation, the NaCl solution was removed, 500 µL of whole blood was added to the wells, and the plates were incubated at 37 °C for 90 min. Finally, blood was removed, samples were thoroughly rinsed with 0.9 % NaCl solution to remove blood residues, and 500 µL of 4 % paraformaldehyde (PFA \geq 95 %, Sigma-Aldrich) in phosphate-buffered saline (Dulbecco's formula, DPBS, ThermoFisher Scientific) was added to each well to fix platelets adhered to the material surface. The plates were then incubated at 4 °C for 24 h. The experiments were performed in triplicate; in each experiment, materials were used in duplicate.

Next, samples were prepared for SEM analysis. First, the samples were washed with PBS (Sigma-Aldrich) for 5 min. The platelets on the surface of the PU fibrous materials were then dehydrated using ethanol solutions at increasing concentrations of 50, 60, 70, 80, 90, and 100 %, and in 1:2 hexamethyldisilazane:ethanol (HMDS:EtOH), 2:1 HDMS: EtOH, and 100 % HDMS solutions (HMDS, 99,99 %; Sigma-Aldrich; EtOH, 99.8 %; Pol-Aura). The dehydrated samples were immersed in 500 μ L of each ethanol solution for 10 min and in 500 μ L of each HDSM solutions for 10 min and in 500 μ L of each ethanol solution for 10 min and in 500 μ L of each ethanol solution for 10 min and in 500 μ L of each ethanol solution for 10 min and in 500 μ L of each ethanol solution for 20 min. Next, 500 μ L of 100 % HDSM was added to the wells with the samples, and the plates were left in a fume hood until the HDMS evaporated and the materials dried. Finally, the samples were glued to the SEM stubs and covered with a layer of gold, as described in Section 2.2. SEM images were taken at a magnification of \times 3000 (n = 10 images

per sample) using a Phenom G1 SEM. Then, the number of platelets and the sample area covered by platelets were measured using the ImageJ software. The results were averaged and are presented as the mean \pm SD.

2.7. Statistical analysis

The normality of the distributions of fiber size, porosity, tensile properties, and platelet adhesion test results were tested using the Shapiro–Wilk test (p < 0.05). The differences among the properties of the analyzed materials that followed the normal distribution were tested using one-way ANOVA (p < 0.05) with post-hoc Tukey's test for multiple comparisons. Otherwise, the Kruskal–Wallis test (p < 0.05) with post-hoc nonparametric Dunn's test for multiple comparisons used.

3. Results and discussion

This study systematically evaluated the influence of bulk polymer hardness on the tensile properties and platelet adhesion to the surfaces of nanofibrous materials. For this purpose, we used the solution blow spinning method to produce fibrous materials from five polyurethanes (PUs). Bulk PUs with the Shore scale hardness values of 75A, 80A, 93A. 45D, and 75D were chosen for this study. Initially, the capability to blow spun fibers from solutions with concentrations range 2-10 % from each PU was evaluated. The results presented in Supplementary Fig. S1 show that the production of fibers is possible only in a specific range of solution concentrations, and this range (spinning window) is different for each of the tested PUs. For PU 75A, fibers were obtained from solution concentrations in the range of 2.0-7.0 %, for PU 80A in the range of 3.0-10.0 %, for PU 93A in the range of 3.0-8.0 %, for PU 45D in the range of 4.0-7.5 %, and for PU 75D in the range of 3.0-7.0 %. Based on the results presented in Supplementary Fig. S1, we chose appropriate concentrations of PUs in HFIP solutions to produce nanofibers with mean fiber sizes of 200, 500, and 1000 nm for each tested polyurethane. The determined concentrations for designing samples for further tensile properties and platelet activation studies are presented in Table 1.

As expected, the nanofiber diameter increased with increasing polymer concentration, regardless of PU. Such an effect is typical for the solution blow spinning (SBS) process, regardless of the reported polymer, as described by Medeiros et al. (2009). The smallest fiber diameter obtained for each tested polyurethane was approximately 200 nm, whereas the largest was approximately 1000 nm (PU 93A) to approximately 2500 nm (PU 45D) (Fig. S1). No clear correlation was observed between the bulk PU's hardness and the spinnability range or the

³

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 161 (2025) 106793

obtained nanofiber sizes. The observed increase in nanofiber size with increasing polymer concentration is typical for the SBS process and has been extensively reported in the literature (Lou et al., 2013; Oliveira et al., 2011; Parize et al., 2016; Shi et al., 2013; Singh et al., 2019). Moreover, it confirms our previous results showing that the increase in the PU concentration leads to an increase in the mean nanofiber size (Lopianiak et al., 2020). Furthermore, nanofiber sizes typically range

from 100 nm to several micrometers (Daristotle et al., 2016; Silva et al., 2023). However, only fibers with sizes of up to 1 μ m are considered nanofibers (Kenry and Lim, 2017). Thus, in this study, we use the term "nanofibers" for all tested nanofibrous materials ranging from 200 to 1000 nm.

Subsequently, the PU solution volumes used in a single blow spinning process of each PU nanofibrous material were chosen to obtain



Fig. 1. Scanning electron microscope (SEM) images of polyurethane nanofibers produced from a) 75A, b) 80A, c) 93A, d) 45D, and e) 75D polyurethanes.

materials with designed thicknesses in the 200-300 µm range (see Table 1). Thus, sample comparability was achieved.

The SEM images of the surface morphologies of the analyzed materials are shown in Fig. 1. All the images show porous nanofibrous structures of the blow spun PU materials, indicating proper fiber formation within the determined range of polymer concentrations. Nanofibers are arranged randomly, with scarce defects in a nodus- and stainsshape, typical for materials produced by the solution blow spinning method.

The nanofiber size and mat thickness measurements are shown in Fig. 2. The mean nanofiber diameters obtained for the produced materials were in the designed range, that is, 200, 500, and 1000 nm, as shown in Fig. 2a, and the precise results are shown in Table 1. Moreover, to maintain the similarities in the nanofibrous mat samples for tensile properties tests, the mat thicknesses were designed to range from 200 to 300 µm. All the tested PU nanofibrous material samples maintained their thicknesses at the designed level after SBS production, as shown in Fig. 2b and Table 1.

It is widely acknowledged that the SBS technique allows the production of highly porous materials with a porosity of up to 0.95 (Tutak et al., 2013). The obtained results indicated differences in the material porosity depending on the mechanical properties of the bulk PUs. The mats' porosities (Fig. 2c) ranged from about 0.56 for PU 75A to about 0.87 for PU 75D. The highest porosity value (approximately 0.87) was obtained for PU 75D. Lower values (approximately 0.7) were obtained for PU 93A. The remaining PUs materials' porosity values were about 0.55–0.65 (see). The porosity differences between the materials with varying nanofiber diameters produced from the 80A, 93A, and 75D PUs were statistically insignificant. For PU 75A, the porosity of the 500 nm mats was significantly lower than that of the 200 nm mats (p < 0.05),

and for PU 45D, a similar dependence was observed for the 1000 nm mats in comparison to the 200 nm and 500 nm mats (p < 0.05). The porosity differences were the first structural differences among the tested properties in the SBS PU nanofibrous materials owing to the differences in bulk PU hardness on the Shore scale.

The difference in material porosity also resulted from the nanofiber packing density. Fibrous materials produced from harder PUs (45D and 75D) are expected to be more loosely packed than those made from less hard PUs (75A, 80A, and 93A). The results showed no clear correlation between the bulk PU hardness and fibrous material porosity; however, the hardest PU (75D) resulted in the most loosely packed and highporosity nanofibrous material.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) allowed for the determination of the presence of the characteristic functional groups in



Fig. 3. Fourier transform infrared spectra of polyurethane nanofibrous mats measured for samples with designed nanofiber diameter of 500 nm for each tested polyurethane.



Fig. 2. Structural properties of polyurethane nanofibrous materials: a) fiber size distribution (n = 100), b) thickness of nanofibrous mat distribution (n = 270), and c) nanofibrous mat porosity (n = 9). Each graph column represents a different polyurethane: 75A, 80A, 93A, 45D, and 75D.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 161 (2025) 106793

the produced nanofibrous materials, which indicates that the SBS process did not affect the PUs composition (Fig. 3). We identified the presence of the signal derived from the carbonyl (C=O) group around 1700-1750 $\rm cm^{-1}$ indicating that the density of urethane linkages decreases with the increase of the polymer hardness. In general, the higher concentrations of urethane linkages typically lead to increased tensile strength, which corresponds with the Shore hardness defined by tested PUs producer and with results of the tensile strength test presented below (Fig. 4b) for nanofibrous materials built with those polymers. A peak close to 3325 cm-1 position signifies N-H stretching bonds. However, the signal intensity in this position did not vary among the tested samples. Lastly, the C-0 stretching bonds representing ether or ester linkages appeared around the 1060 cm^{-1} position. In general, those bonds correspond with the flexibility of the PUs, but in the presented case, the intensity and shape of those peaks remain constant among the tested PUs. The identified characteristic groups described above and those with peaks corresponding with -CH2 (2940 and 2865 cm-1) stretching and other modes of -CH $_2$ vibrations (1530 and 1470 cm $^{-1}$) are characteristic of PUs (Asefnejad et al., 2011; Banc

The tensile properties of nanofibrous PU materials are shown in Fig. 4. The Young's modulus values measured for the 75A, 80A, 93A, and 45D PUs mats did not exceed 3 MPa (regardless of the fiber diameter) (Fig. 4a). Moreover, for 75A, 80A, and 93A PUs mats these values decreased with increasing nanofiber size (Supplementary Table S1). For the C45D PUs materials, Young's modulus values did not differ for the 200 nm and 500 nm mats but decreased for mats with fiber diameters of 1000 nm. For the 75D PU, the Young's modulus values were in the range of 6.7–22.6 MPa. In addition, a trend of increasing Young's modulus vith increasing concentration was observed. Young's modulus results indicated that the stiffest materials were produced from 75D, PU. In contrast, all other tested nanofibrous materials (produced from 75A, 80A, 93A, and 45D PUs) showed similar high flexibility and bulk polymer mechanical properties.

The results shown in Fig. 4b indicate that the most resistant to deformation are fibrous materials produced from 75A PU, and the least resistant are materials with diameters of 200 nm and 500 nm made from 75D PU. The tensile strengths of the materials produced from 80A, 93A, 45D, and 1000 nm 75D PU exhibited intermediate values

(Supplementary Table S1). For materials produced from the softest PUs (75A, 80A), resistance to deformation decreased with increasing fiber diameter, showing the expected increase in tensile strength with decreasing nanofiber size, as reported by Papkov et al. (2013) (Supplementary Table S1). Reverse dependence is observed for materials produced from the hardest PU (75D); tensile strength significantly increases with diameter increasing, from 1.88 \pm 0.44 MPa for 200 nm mats by 2.67 \pm 1.90 MPa for 500 nm mats until 6.53 \pm 1.26 MPa 1000 nm mats. For materials produced from 93A to 45D PUs, no specific relationship between fiber diameter and tensile strength was observed (Supplementary Table S1).

The greatest elongation during the tensile test (approximately 2.00 mm/mm) was observed for the materials produced from 75A PU (Fig. 4c). The smallest elongations (0.30–0.60 mm/mm) were observed for materials made from 75D PU. Again, such behavior was expected because 75A is the softest PU from the tested group, while 75D is the hardest.

Again, the results of the tensile tests are shown in Fig. 4, and in summary, they indicate that the materials produced from 75D PU had the lowest tensile strength. Simultaneously, the 75D PU was the stiffest on the Shore scale (among the evaluated PUs). The remaining PUs (75A, 80A, 93A, and 45D) exhibited similar mechanical properties with a slight superiority of 75A in tensile strength and elongation at break. The results indicated that when the size of a single nanofiber and the size of the nanofibrous mat sample were maintained, the tensile properties depended on the hardness of the polymer used; however, the effect was most prominent when comparing polymers on the edges of the hardness spectrum.

In general, healthy human blood vessels exhibit Young's modulus value of about 2–6 MPa for a typical artery (Ebrahimi, 2009); however, the result may vary depending on the mode of stretching (circumferential or longitudinal) and range up to 16.8 MPa for internal mammary artery and 23.7 MPa for saphenous vein when measured longitudinally (Camasão and Mantovani, 2021). Similarly, the tensile strength and elongation at the break of the mentioned blood vessels depend on the mode of measurement, and for longitudinal elongation, the stress at break and elongation at break reach 4.3 MPa and 59 %, respectively, for internal mammary artery and 6.3 MPa and 83 % respectively for the saphenous vein (Camasão and Mantovani, 2021). Thus, the results



Fig. 4. Tensile properties of polyure than nanofibrous materials: a) Young's modulus (n = 15), b) tensile strength (n = 15), and c) elongation at break (n = 15). 6

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 161 (2025) 106793

presented in Fig. 4 suggest that the proposed group of PUs in the form of nanofibrous materials demonstrates the potential for use as a scaffolding material for TEVGs in terms of mechanical similarity to native human blood vessels. However, meticulous design and validation of cylindrical forms of such scaffolds remain imperative. Furthermore, the influence of PU hardness on the surface properties

of nanofibrous materials on platelet adhesion was evaluated. Representative SEM images of the surfaces of the analyzed nonwovens after sentative searchinges of the surfaces of the surfaces indivorus and contact with whole blood are shown in Fig. 5. Platelets were observed on the surfaces of all the tested materials. They vary in shape from discoid and spherical, through spherical with filopodia, to flat and spread. We also observed the presence of single platelet aggregates. Various



Fig. 5. SEM images of polyurethane nanofibers after contact with whole blood a) 75A, b) 80A, c) 93A, d) 45D, and e) 75D polyurethanes. Platelets that adhered to the surface of the nanofibrous material are colored purple.

7

morphologies indicate different levels of platelet activation (Shin et al., 2017). The platelets present on the materials showed both an inactivated form, loosely attached to the surface, and an activated, strongly adhered form. Small aggregates were also observed. Analysis of the SEM images showed that the greater the diameter of the nanofibers, the more spherical and flattened the platelets on the material surface. No specific correlation was observed between the type of PU, that is, PU hardness or nanofiber size, and the number and size of the platelets.

Additionally, the number of platelets per unit of the sample surface (mm²) of nanofibrous PU materials (including single platelets and aggregates) and material coverage with platelets were determined. The average percentage of area occupied by platelets was less than 1 % for all analyzed PUs and nanofiber sizes (Fig. 6a). There were no significant differences among the results as a function of nanofiber size for a single type of bulk polymer or among groups of nanofibrous PU materials produced from different PUs. Moreover, the average number of objects (platelets) on the material ranged from 700 to 1600 platelets/mm² (Fig. 6b). Again, there were no significant differences among the results as a function of nanofiber size for a single type of bulk polymer and among the groups of nanofibrous PU materials produced from different PUs.

Such low plate adhesion proves the high PU hemocompatibility of

the nanofibrous materials produced in the present study, regardless of the type of bulk polyurethane and the resulting fiber size (Ding et al., 2015; Fedel et al., 2009; Weber et al., 2018). Furthermore, for medical-grade PUs such as ChronoFlex C, the hemocompatibility of each tested polymer remained unchanged during the nanofiber formation process in the SBS system. Thus, SBS is a promising technique for efficiently producing PU nanofibrous structures with potential applications in TEVG or scaffolds for vascular tissue engineering.

Nanomaterials are utilized in both industrial and medical fields to enhance the performance and durability of various tools and materials. In industrial applications, nanomaterials such as TiN and TiAlN coatings on high-speed steel (HSS) tools improve wear resistance, reduce friction, and extend the lifespan of the tools by minimizing wear and preventing crack propagation. These coatings are crucial for maintaining tools' hardness and edge quality during machining operations (Khan and Jamshed, 2023). Similarly, in the medical field, nanomaterials like zirconia are used in dental frameworks for their flexibility and wear resistance, ensuring long-lasting dental applications. When designing the TEVGs, the structural and mechanical properties remain crucial. However, determining and modifying the surface properties with nanocoating, like polydopamine or its analogs, should be a future direction for nanofibrous TEVG development.



Fig. 6. a) Platelet coverage (n = 6), b) number of platelets normalized per surface unit (#/mm²) (n = 6) for polyurethane nanofibers upon contact with whole blood.
I. Lopianiak et al.

4. Conclusions

In this work, we assessed the influence of the Shore hardness of bulk polyurethane on the tensile properties of nanofibrous materials produced by solution blow spinning. The results showed that the bulk polymer's Shore hardness affected the nanofibrous products' porosity and tensile properties. The differences among the tested samples were the most prominent when we compared nanofibrous materials produced from the softest and hardest polyurethane from the tested range. The producer markets all the polyurethanes tested in this study as hemocompatible polymers. Testing the stability of the hemocompatibility, partially described by the platelet adhesion, of ChronoFlex C polyurethanes upon their processing into nanofibrous mats proved that the mechanical properties of bulk polyurethane and nanofiber diameter did not influence material platelet adhesion resistance. Thus, all nanofibrous materials from medical-grade polyurethanes retained the platelet adhesion resistance of the bulk polyurethanes used as raw materials in the solution blow spinning process. These results could significantly impact the development of tissue engineering, especially tissue-engineered vascular grafts. Based on the presented results, when selecting a polymer for a desired application, the properties of the produced material should be considered instead of the properties of the bulk polymer.

CRediT authorship contribution statement

Iwona Lopianiak: Writing - review & editing, Writing - original draft, Validation, Methodology, Investigation. Beata Butruk-Raszeja: Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition. Michał Wojasiński: Writing - review & editing, Writing - original draft, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

While preparing this work, the authors used Paperpal (Copilot functionality) to improve language and readability. After using this tool/service, the authors reviewed and edited the content as needed and took full responsibility for the content of the publication.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Data available in the external public repository. https://osf.io/hb4gv/?view_only=1a40646dd52e4cfd8c5f040 99f28fd40.

The work was supported by the National Science Centre, Poland (grant no. UMO-2020/39/I/ST5/01131), and the National Centre for Research and Development, Poland (grant no. LIDER/18/0104/L-8/16/ NCBR/2017).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi. org/10.1016/j.jmbbm.2024.106793.

Data availability

Data available in the external public repository: https://osf. io/hb4gv/?view_only=1a40646dd52e4cfd8c5f04099f28fd40.

References

- Asefnejad, A., Khorasani, M.T., Behnamghader, A., Farsadzadeh, B., Bonakdar, S., 2011. Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay. Int. J.
- Nanomed. 6, 2375–2384. https://doi.org/10.2147/jin.s15586.
 Bandekar, J., Klima, S., 1991. FT-IR spectroscopic studies of polyurethanes Part I.
 Bonding between urethane C O C groups and the NH Groups. J. Mol. Struct. 263, 45–575. https://doi.org/10.1101/070078
- 45–57. https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)80054-8. Camasão, D.B., Mantovani, D., 2021. The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. Mater. Today Bio 10, 100106. https://doi.org/
- 10. Order JmBB. 2021. IOOLO. Bodol, G.C., Klick, A., Tijing, L.D., Lim, K.J.A., Cabaringan, L.K., Tan, N.P.B., Stojanovska, E., Polat, Y., 2020. Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: materials, methods, and applications. Mater. Today Commun. 25, 101656. https://doi.org/10.1016/j.mitcomm.2020.101656.
- 101656. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101656.
 Daristotte, J.J., Behrens, A.M., Sandler, A.D., Kofinas, P., 2016. A review of the fundamental principles and applications of solution blow spinning. Acs Appl M Inter 8, 34951–34963. https://doi.org/10.1021/acsami.6b12994.
 Ding, Y., Yang, M., Yang, Z., Luo, R., Lu, X., Huang, N., Huang, P., Leng, Y., 2015.
 Cooperative control of blood compatibility and re-endothelialization by immobil block and advance advance and advance and the primeric of the 10 Advance of the primeric of ng. Acs Appl Mater
- ialization by immobilized heparin and substrate topography. Acta Biomater. 15, 150-163. https://doi.org/ 10.1016/j.actbio.2014.12.014 himi, A.P., 2009. Mechanical pr
- erties of normal and diseased cerebroy
- Eurannii, A.F., 2009. Mechanical properties of normal and obsense cereprovascular system. J. Vasc. Interv. Neurol. 2, 155–162.Fedel, M., Motta, A., Maniglio, D., Migliaresi, C., 2009. Surface properties and blood compatibility of commercially available diamond-like carbon coatings for cardiovascular devices. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 90B, 338–349. 10.1002/ibm.b.31 91.
- with a 191-504. https
- Frisch, E., Clavier, L., Belhamdi, A., Vrana, N.E., Lavalle, P., Frisch, B., Heurtault, B.,
- Frisch, E., Galvier, L., Beinamdi, A., Vrana, N.E., LaVaile, P., Frisch, D., Heurtauit, Gribova, V., 2023. Preclinical in vitro evaluation of implantable materials: conventional approaches, new models and future directions. Front. Bioeng. Biotechnol. 11, 1193204. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1193204.
 Gao, Y., Qiu, Z., Liu, L., M., Xu, B., Yu, D., Qi, D., Wu, J., 2022. Multifunctional fib wound dressings for refractory wound healing. J. Polym. Sci. 60, 2191–2212. https://doi.org/10.1002/pol.20220008.
- Gaudino, M., Antoniades, C., Benedetto, U., Deb, S., Franco, A.D., Giammarco, G.D., Austri, M., Antoniades, C., Benedetto, U., Deb, S., Franco, A.D., Giammarco, G.D., Fremes, S., Glineur, D., Grau, J., He, G.-W., Marinelli, D., Ohmes, L.B., Patrono, C., Puskas, J., Tranbaugh, R., Girardi, L.N., Taggart, D.P., Ruel, M., Bakaeen, F.G., 2017. Mechanisms, consequences, and prevention of coronary graft failure. Circulation 136, 1749–1764. https://doi.org/10.1161/circulationah.117.027597.
- Geffen, J.P. van, Swieringa, F., Heemskerk, J.W.M., 2016. Platelets and coagulation thrombus formation: aberrations in the Scott syndrome. Thromb. Res. 141, S12-S16. https://doi.org/10.1016/s0049-3848(16)30355-3.
- https://www.setaina.com/setaina/setain 018.1
- Grasl, C., Stoiber, M., Röhrich, M., Moscato, F., Bergmeister, H., Schima, H., 2021. Electrospinning of small diameter vascular grafts with preferential fiber directions and comparison of their mechanical behavior with native rat aortas. Mater. Sci. Eng. C 124. 112085. https://doi.org/10.1016/j.mscr.2021.112085. C 124, 112085.
- Huang, Y., Song, J., Yang, C., Long, Y., Wu, H., 2019. Scalable manufacturing and applications of nanofibers. Mater. Today 28, 98–113. https://doi.org/10.1016/j.
- Kenry, Lim, C.T., 2017. Nanofiber technology: current status and emerging developments. Prog. Polym. Sci. 70, 1–17. https://doi.org/10.1016/j. progpolymsci.2017.03.002.
- Khan, M.K.R., Hassan, M.N., 2021. Solution Blow Spinning (SBS): A Promising Sp System for Submicron/Nanofibre Production. Text. Leather Rev. 4, 181–200. ng Spinning doi.org/10.31881/tlr.2021.04.
- Khan, S.U., Jamshed, W., 2023. Finite element analysis and wear rate analysis of nano ted high speed steel tools for industrial application. Babylon. J. Mech. Eng 2023, 13-19.
- 13–19. https://doi.org/10.30499/pjme/a020/0044 Kopeć, K., Wojasiński, M., Clach, T., 2020. Superhydrophilic polyurethane/ polydopamine nanofibrous materials enhancing cell adhesion for application in polydopamine nanofibrous materials enhancing cell adhesion for a tissue engineering. Int. J. Mol. Sci. 21, 6798. https://doi.org/10.32
- (Jubartob 76). Kopeć, K., Wojasiński, M., Eichler, M., Genç, H., Friedrich, R.P., Stein, R., Singh, R., Alexiou, C., Hlawaty, H., Ciach, T., Cicha, I., 2022. Polydopamine and gelatin coating for rapid endothelialization of vascular scaffolds. Biomater. Adv. 134, 113844 112544. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112544. Lentz, S.R., 2003. Thrombosis of vein grafts. Circ. Res. 92, 12–13. https://doi.org/
- Li, J., Chen, Z., Yang, X., 2019. State of the art of small-diameter vessel-polyurethane substitutes. Macromol. Biosci. 19, 1800482, https://doi.org/10.1002/ romol. Biosci. 19, 1800482. https:/
- Li, S., Yang, L., Zhao, Z., Yang, X., Lv, H., 2024. A polyurethane-based hydrophilic
- elastomer with multi-biological functions for sn all-diameter vascular grafts. Acta Biomater, http
- Li, Z., Zhou, P., Zhou, F., Zhao, Y., Ren, L., Yuan, X., 2018. Antimicrobial eugenol-loaded electrospun membranes of poly(e-caprolactone)/gelatin incorporated with REDV for

I. Lopianiak et al.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 161 (2025) 106793

- vascular graft applications. Colloids Surf. B Biointerfaces 162, 335-344. https://doi.
- Liu, Y., Li, C., Feng, Z., Han, B., Yu, D.-G., Wang, K., 2022. Adva nces in the preparation of nanofiber dressings by electrospinning for promoting diabetic wound healing. Biomolecules 12, 1727. https://doi.org/10.3390/biom12121727. Biomolecules 12, 1727. https://
- Lopianiak, I., Butruk-Raszeja, B.A., 2020. Evaluation of sterilization/disinfection
- Lopianiak, L., Butruk-Raszeja, B.A., 2020. Evaluation of sterilization/disinfection methods of fibrous polymerthane scaffolds designed for tissue engineering applications. Int. J. Mol. Sci. 21, 8092. https://doi.org/10.3390/ijms21218092.Lopianiak, L., Kawecka, A., Civelek, M., Wojastiński, M., Cicha, I., Clach, T., Butruk-Raszeja, B.A., 2024. Characterization of blow-spun polymethane scaffolds-influence of fiber alignment and fiber diameter on pericyte growth. ACS Biomater. Sci. Eng. rg/10.102
- Logianiak, J., Rzempotuch, W., Civelek, M., Cicha, I., Ciach, T., Butruk-Raszeja, B.A., 2023. Multilayered blow-spun vascular prostheses with luminal surfaces in Nano/ Micro range: the influence on endothelial cell and platelet adhesion. J. Biological Doc 1971. Sector 2010. Sector 2010. Sector 2010. Eng. 17, 20. htt
- Lopianiak, I., Wojasiński, M., Butruk-Raszeja, B., 2020. Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning. Chem. Process Eng. 41, 267-276. https://doi.org/10.24425/cpe.2020.136012.
- 207–276. https://doi.org/10.24453/cpt.2020.130012.
 Lopianiak, L, Wojasiński, M, Kużmińska, A, Trzaskowska, P., Butruk-Raszeja, B.A., 2021. The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds. J. Biol. Eng. 15, 27. https://doi.org/ 021-0027
- 10.186/s13036-021-0278-17 Lou, H., Li, W., Li, C., Wang, X., 2013. Systematic investigation on parameters of solution blown micro/nanofibers using response surface methodology based on box-Behnken design. J. Appl. Polym. Sci. 130, 1383–1391. https://doi.org/10.1002/app.39317. Mahalingam, S., Edirisinghe, M., 2013. Forming of polymer nanofibers by a pressurised gyration process. Macromol. Rapid Commun. 34, 1134–1139. https://doi.org/ 10.1002/app.20130030
- Medeiros, E.S., Glenn, G.M., Klamczynski, A.P., Orts, W.J., Mattoso, L.H.C., 2009. Solution blow spinning: a new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. J. Appl. Polym. Sci. 113, 2322-2330. https://doi.org/10.10
- Oliveira, J.E., Moraes, E.A., Costa, R.G.F., Afonso, A.S., Mattoso, L.H.C., Orts, W.J., Mederos, E.S., 1011. Nano and submicrometric fibers of poly(DL-lactide) obtained by solution blow spinning: process and solution variables. J. Appl. Polym. Sci. 122, 3396–3405. https://doi.org/10.1002/pnp.34410.
- 3396–3405. https://doi.org/10.1002/app.34410.
 salgikar, A.D., 2017. 3 speciality plastics in cardiovascular applications. In: Plastics in Medical Devices for Cardiovascular Applications, Plastics Design Library. William Andrew Publishing, pp. 53-82. https://doi.org/10.1016/b978
- Papkov, D., Zou, Y., Andalib, M.N., Goponenko, A., Cheng, S.Z.D., Dzenis, Y.A., 2013. Simultaneously strong and tough ultrafine continuous nanofibers. ACS Nano 7, 3324-3331
- 3324–3331. https://doi.org/10.1021/infe600260.
 Parize, D.D. da S., Oliveira, J.E. de, Foschini, M.M., Marconcini, J.M., Mattoso, L.H.C.,
 2016. Poly(lactic acid) fibers obtained by solution blow spinning: effect of a greener solvent on the fiber diameter. J. Appl. Polym. Sci. 133. https://doi.or 10.1002 n/a-n/a.
- Podgórski, R., Wojasiński, M., Ciach, T., 2022. Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays. Sci. Rep. 12, 9047. https://doi.org/10.1038/s41598-022-
- Raghav, V., Midha, P., Sharma, R., Babaliaros, V., Yoganathan, A., 2021. Transca
- Kagnay, V., Midna, F., Sharma, K., Babaiaros, V., Yoganathan, A., 2021. Franscatheter aortic valve thrombosis: a review of potential mechanisms. J. R. Soc. Interface 18, 20210599. https://doi.org/10.1098/rsif.2021.0599.
 Rohringer, S., Grasl, C., Ehrmann, K., Hager, P., Hahn, C., Specht, S.J., Walter, I., Schneider, K.H., Zopf, L.M., Baudis, S., Liska, R., Schima, H., Podesser, B.K., Bergmeister, H., 2023. Biodegradable, self-reinforcing vascular grafts for in situ tissue engineering approaches. Adv. Healthcare Mater. 12, e2300520. https://doi. org/10.1002/en/bm.20200520
- Ruggeri, Z.M., Mendolicchio, G.L., 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. Circ.
- Ruggeri, Z.M., Mendolicchio, G.L., 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. Circ. Res. 100, 1673–1685. https://doi.org/10.1161/01/ens.0002027878.97021.ab, Safi, M., Akbarzadeh, M.A., Azinfar, A., Namazi, M.H., Khaheshi, I., 2017. Upper extremity deep venous thrombosis and stenosis after implantation of pacemakers and defibrillators; A prospective study. Rom. J. Intern. Med. 55, 139–144. https:// doi.org/10.1515/rjim-2017-0018.

- Sarkar, S., Sales, K.M., Hamilton, G., Seifalian, A.M., 2007. Addressing thrombogenicity in vascular graft construction. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 82B, 100–108. https://doi.org/10.1002/jbm.b.30710.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods 9, 676-682. https://doi.org/
- Sharma, K., Mujawar, M.A., Kaushik, A., 2019. State-of-Art functional biomaterials for tissue engineering. Front. Mater. 6, 172. https://doi.org/10.3389/ ats.2019.00172
- Shi, L., Zhuang, X., Tao, X., Cheng, B., Kang, W., 2013. Solution blowing nylon 6 nanofiber mats for air filtration. Fibers Polym. 14, 1485–1490. https://doi.org/ https://do
- Shin, E.-K., Park, H., Noh, J.-Y., Lim, K.-M., Chung, J.-H., 2017. Platelet shape changes and cytoskeleton dynamics as novel therapeutic targets for anti-thrombotic drugs. Biomol. Ther. 25, 223-230, https doi.c /10.4062
- Silva, M.J., Dias, Y.J., Varin, A.L., 2023. Electrically-assisted supersonic solution blowing and solution blow spinning of fibrous materials from natural rubber extracted from havea brasilienses. Ind. Crop. Prod. 192, 116101. https://doi.org/10.1016/j. indusr.0001.116011
- Singh, R., Khan, S., Basu, S.M., Chauhan, M., Sarviya, N., Giri, J., 2019. Fabrication, characterization, and biological evaluation of airbrushed gelatin nanofibers. ACS Appl. Bio Mater. 2, 5340-5348. https://
- Appr. and Mater. 2, 3540-5346. https://doi.org/10.1021/acadmi.9000506. inovska, E., Canbay, E., Pampal, E.S., Calisri, M.D., Agan, O., Polat, Y., Simsek, R., Gundogdu, N.A.S., Akgul, Y., Kilic, A., 2016. A review on non-electro nanofibre spinning techniques. RSC Adv. 6, 83783–83801. https://doi.org/10.1039/ Stoja
- Tomecka, E., Wojasinski, M., Jastrzebska, E., Chudy, M., Ciach, T., Brzozka, Z., 2017. Beckar, E., Wojadikar, M., Davizetosan, E., Chudy, M., Cutth, T., Dizotak, E., ZO Poly(L-lacit caid) and polyurethane nanofibers fabricated by solution blow spin as potential substrates for cardiac cell culture. Mater. Sci. Eng. C 75, 305–316. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.055
- https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.055.
 Tutak, W., Sarkar, S., Lin-Gibson, S., Farooque, T.M., Jyotsnendu, G., Wang, D., Kohn, J., Bolikal, D., Simon, C.G., 2013. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. Biomaterials 34, 2389-2398. 10167 h rials 2012 12.020
- Meber, M., Steinle, H., Golombek, S., Han, L., Schlensak, C., Wendel, H.P., Avci-Adali, M., 2018. Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility. Front. Bioeng. Biotechnol. 6, 99. https://doi.org/10.3389/
- Weigel, T., Makmus, C., Weigel, V., Wußmann, M., Berger, C., Brennecke, J., Groeber-Becker, F., Hansmann, J., 2022. Fully synthetic 3D fibrous scaffolds for stromal tissues—replacement of animal-derived scaffold materials demonstrated by multilayered skin. Adv. Mater. 34, e2106780. https://doi.org/10.1002/
- Williams, D.F., 2014. There is no such thing as a biocompatible material. Biomaterials 35, 10009-10014, htt Williams, D.F., 2009. On the nature of biomaterials. Biomaterials 30, 5897-5909.
- rials 20 wighs://uci.urg/10.1010/j.nommaterials.2009.07.027.
 Williams, D.F., 2008, On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials 29, 2941–2953. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- 2941–2953. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.Wojasiński, M., Pilarek, M., Ciach, T., 2014. Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly(L-lactic acid) materials for biomedical engineering. Pol. J. Chem. Technol. 16, 43–50.
- https://doi.org/10.2478/piet-2014-0028.
 Wu, X.-F., Dzenis, Y.A., 2007. Size effect in polymer nanofibers under tension. J. Appl. Phys. 102, 044306. https://doi.org/10.1063/1.2769266.
 Zhang, B., Xu, Y., Ma, S., Wang, L., Liu, C., Xu, W., Shi J., Qiao, W., Yang, H., 2021.
 Small-diameter polyurethane vascular graft with high strength and excellent compliance. J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 121, 104614. https://doi.org/10.1016/
- Jimoun. 2021 (1990). Zhou, S.-Y., Li, L., Xie, E., Li, M.-X., Cao, J.-H., Yang, X.-B., Wu, D.-Y., 2023. Small-diameter PCL/PU vascular graft modified with heparin-aspirin compound for preventing the occurrence of acute thrombosis. Int. J. Biol. Macromol. 249, 126058. org/10.1016/i.ijbiomac.2023.126058

1 Supporting information for

2 Shore hardness of bulk polyurethane affects the

³ properties of nanofibrous materials differently

4 Iwona Łopianiak^{1,2}, Beata Butruk-Raszeja¹, Michał Wojasiński^{1,*}

- 5 Affiliations
- 6 ¹ Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw,
- 7 Poland
- 8 ² Doctoral School of Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland
- 9 *Corresponding author
- 10



11

12 Figure S1 Fiber size distribution vs. polymer concentration for polyurethane nano- and submicron fibers solution

13 blow spun from a) 75A, b) 80A, c) 93A, d) 45D, and e) 75D polyurethanes.

- 14 Tab. S1. Tensile properties (n=15, mean \pm SD): Young's modulus, tensile strength, and elongation at break.
- 15 Hemocompatibility results (n=6, mean \pm SD): platelet coverage and normalized platelet count of the tested PU
- 16 nanofibrous materials.

Tensile properties					Hemocompatibility results		
Polymer	Fiber síz e [nm]	Young's modulus [MPa]	Tensile strength [MPa]	Elongation at break [mm/mm]	Platelet coverage [%]	Normalized platelet count [#/mm ²]	
75A	200	2.35 = 0.53	9.96 = 1.43	1.88 = 0.24	0.61 = 0.44	1452 ± 362	
	500	1.87 = 0.44	7.54 = 1.83	2.01 = 0.23	0.71 = 0.45	1581 ± 446	
	1000	1.22 - 0.17	6.14 - 0.90	2.01 - 0.21	0.57 - 0.20	1380 ± 424	
80A	200	2.50 = 0.17	6.89 = 1.00	1.56 = 0.10	0.46 = 0.25	1238 ± 481	
	500	1.61 = 0.25	5.33 = 0.47	1.56 = 0.12	0.56 = 0.24	1344 ± 718	
	1000	0.84 = 0.26	3.63 = 1.04	1.77 = 0.19	0.25 = 0.12	714 ± 227	
93A	200	2.28 ± 0.41	5.17 ± 0.83	1.09 - 0.09	0.45 ± 0.25	1166 ± 491	
	500	1.80 - 0.22	6.57 - 1.54	1.36 - 0.25	0.49 - 0.19	1262 ± 409	
	1000	1.35 = 0.22	4.97 = 0.74	1.62 = 0.19	0.37 = 0.34	698 ± 265	
45D	200	2.39 = 0.12	6.80 ± 0.81	1.28 = 0.13	0.74 = 0.37	1385 ± 493	
	500	2.44 = 0.24	7.17 = 0.89	1.50 = 0.13	0.44 = 0.28	923 ± 307	
	1000	1.55 = 0.26	5.40 = 0.79	1.78 = 0.13	0.68 = 0.37	1427 ± 402	
751)	200	6.72 - 1.45	1.88 ± 0.44	0.33 0.08	0.54 ± 0.24	1224 ± 316	
	500	9.47 = 5.08	2.67 = 1.91	0.45 = 0.19	0.84 = 0.49	1074 ± 267	
	1000	22.55 ± 10.98	6.53 - 1.26	0.60 0.08	0.60 ± 0.36	1036 ± 346	

Publikacja P2

<u>Łopianiak I.</u>, Wojasiński M., Butruk-Raszeja B.A. (2020). *Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning*. Chemical and Process Engineering, 41(4), 267-276.

DOI: <u>10.24425/cpe.2020.136012</u> IF (2020) = 0,485 Punktacja MNiSW (2025) = 100 CiteScore = 1,400

Wkład w wykonanie badań:

- Przeprowadzenie wszystkich prac badawczych: wytworzenie materiałów i przeprowadzenia analiz: mikroskopowej, zwilżalności, właściwości mechanicznych, pomiar średnic, porowatości i wielkości porów;
- Analiza wpływu parametrów procesu rozdmuchu roztworu polimeru na właściwości materiałów;
- Wybór najkorzystniejszych parametrów procesu.

Wkład w przygotowanie publikacji:

- Pierwszy autor i autor korespondencyjny;
- Przygotowanie koncepcji manuskryptu wraz z Promotorem;
- Przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu;
- Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz manuskryptu po recenzjach (główny autor);
- Przygotowanie wszystkich rysunków i wykresów.

w.czasopisma.pan.pl Chemical and Process Engineering 2020, 41 (4), 267–276 DOI: 10.24425/cpe.2020.136012

PROPERTIES OF POLYURETHANE FIBROUS MATERIALS PRODUCED BY SOLUTION BLOW SPINNING

Iwona Łopianiak*, Michał Wojasiński, Beata Butruk-Raszeja

Warsaw University of Technology, Faculty of Chemical and Process Engineering, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

The study aimed to produce nano- and microfibrous materials from polyurethane (ChronoFlex®C75A/ C75D in 1,1,1,3,3,3–hexafluoro–2–propanol) by solution blow spinning. Experiments were carried out in order to determine the impact of solution blow spinning parameters on fibre diameter and quality of produced materials. The following properties of produced fibre scaffolds were investigated: fibre size, porosity and pore size, wettability, and mechanical properties. The results confirmed that produced nano- and microfibrous materials could be potentially used as scaffolds in three-dimensional cell and tissue cultures.

Keywords: nano- and microfibres, 3D cell culture, solution blow spinning, polyurethanes, scaffolds

1. INTRODUCTION

A monolayer covered with medium is the most popular method of cell culture. It has many advantages, such as optimal growth conditions, good availability of biological material, and high repeatability of results. Unfortunately, this method of cell culture can lead to changes in cell morphology, physiology, proliferation, and expression of cell genes and proteins (Bhattacharya et al., 2013; Kitel et al., 2013).

Three-dimensional (3D) cell culture involves growing cells on synthetic supports called scaffolds. The main role of scaffolds for 3D cell culture is to provide cells with an environment close to *in vivo* conditions (Edmondson et al, 2014). Scaffolds are usually made of highly porous biomaterials and act as templates for cell culture or tissue regeneration. They replace the extracellular matrix (ECM), which creates a three-dimensional network of macromolecules supporting cells and mediating the transmission of signals between them (Theocharis et al., 2016). The highly porous structure of scaffolds ensures cells to penetrate the scaffold and provides nutrient transport (Edmondson et al, 2014; Kim, 2005). Thereby, cell-cell, cell-ECM interactions, and cell morphology are close to cell behaviour *in vivo*. Tissue engineering techniques use scaffolds to regenerate various types of tissues, among others: bone, cartilage, ligaments, skin, blood vessels, nerves, and muscles (Chanjuan and Yonggang, 2016). Many of human tissues obey hierarchical structure (from micro- to nanoscale). Therefore, it is important to provide nano- and microstructures (or not unitary structures) for 3D cell culture and tissue engineering (Jun et al., 2018).

It is not possible to produce a universal scaffold enabling the growth of any tissue. The most commonly used materials for producing scaffolds are polymers. They are distinguished by various properties that can be specifically selected depending on the type of tissue they are to replace (Yamamoto et al., 2014). There

^{*} Corresponding author, e-mail: iwona.lopianiak.dokt@pw.edu.pl

Iwona Łopianiak, Michał Wojasiński, Beata Butruk-Raszeja, Chem. Process Eng., 2020, 41 (4), 267–276

are many types of scaffolds and fabrication methods (Behrens et al., 2014; Borden et al., 2014; Hutmacher et al., 2014; Khan et al., 2009; Kurzydłowski and Lewandowska, 2010; Singh et al., 2016; Subbiah et al., 2005).

In this paper, the method for production of nano- and microfibrous structures as potential scaffolds for three-dimensional cell culture has been presented and described. Also, the impact of selected process parameters on the properties of the final product has been analysed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials fabrication

Nano- and microfibrous structures were produced from polyurethanes ChronoFlex C75A (C75A) and ChronoFlex C75D (C75D) (AdvanSource Biomaterials). Nanofibrous (nanofibres) means that average fibre diameter of produced material was less than 1 μ m, while microfibrous (microfibres) means that average fibre diameters in the material was greater than 1 μ m. Two types of materials produced from polymers differing in hardness (75A and 75D in Shore scale) were examined. Polymers were dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (> 99.0%, TCI Chemicals). Polymer solutions were prepared in concentrations 2, 3, 4, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 and 8.5% w/w for C75A polymer and 2, 3, 4, 7, 7.5, 8, 8.5 and 9% w/w for C75D polymer; the solutions were stirred overnight prior to the spinning process.

Fibrous materials were fabricated using solution blow spinning (SBS) process. SBS setup is shown in Fig. 1. The main part of this setup is the concentric nozzle system. The polymer solution was supplied through the inner nozzle, while the compressed gas (air) was supplied through the outer nozzle. The polymer solution flow rate was controlled with the syringe pump (KDS 100, KDS Scientific Inc., USA). The driving force of the SBS process is a high-speed compressed dry airflow. The polymer solution was formed by the compressed air and dragged towards the collector. The working distance was fixed at 30 cm, and the speed of the collector was 3000 rpm.



Fig. 1. Solution blow spinning setup

Materials were fabricated at polymer solution flow rates: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ml/h and at gas pressures: 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2 MPa. Various combinations of polymer concentration, gas pressure, and polymer solution flow rate permitted to find the best parameters to produce materials with a minimum number of defects. We obtained mainly nanofibers with 2% polymer solution used, and mainly microfibers for blow spinning of 8% polymer solution.

Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning

2.2. Scaffold characterization

2.2.1. Fibre diameter, pore size, porosity

Samples (n = 3) of each produced material were coated with a 15 nm layer of gold using a sputter coater (K550 Emitech, Quorum Technologies) and subjected to scanning electron microscopy (SEM, Phenom G1, PhenomWorld). Samples were photographed in 200×, 600×, 5000× or 7500× magnification. Images were used for fibre diameter (n = 100 fibre diameters were measured for each material), and pore size (n = 50 pore sizes were measured for each material) measurements using Fiji software (Schindelin et al., 2012) and for sample surface evaluation. Average fibre diameter and average pore size were determined as an arithmetic mean value of all measurements. The porosity of the materials, η , was determined using the formula:

 $\eta = 1 - \frac{\rho_s}{\rho_p}$

where:

$$\rho_s = \frac{m}{S \cdot \delta} \tag{2}$$

 $\rho_p = 1200 \text{ kg/m}^3$ (Padsalgikar, 2017).

To determine density and then porosity of the produced materials, three square-shaped samples of each material (n = 3) with dimensions of about 1 cm×1 cm were used. Their dimensions were accurately measured, and the average area (S) was calculated. Each sample was weighed (m) on an analytical balance, and then a narrow strip (n = 1) was cut, glued vertically to the SEM microscope stub and images (n = 5 for each sample) at 300x magnification were taken. Images were used to determine the thickness (δ) of materials using Fiji software, n = 25 measurements of material thickness were made. Results are presented as a mean value ±SD.

2.2.2. Number of surface defects

SEM material images (n = 5) in magnification of 200× were used to count the number of surface defects. Nodules, spindles, and stains were defined as defects. Various surface defects are shown in Fig. 2. Defects were counted from the central part of the image, and the top and right edge.



Fig. 2. Defect classification scheme

http://journals.pan.pl/cpe

(1)

Iwona Łopianiak, Michał Wojasiński, Beata Butruk-Raszeja, Chem. Process Eng., 2020, 41 (4), 267-276

2.2.3. Wettability

Material wettability was measured using a drop shape analyser (DSA–100s, KRÜSS) controlled by Krüss ADVANCE computer software. The contact angle between liquid and solid was measured. Samples (n = 3) of each material were glued to a glass slide, and then a drop (5 µl) of distilled water was placed on it. The contact angle of n = 10 drops was measured for each sample. Results are presented as a mean value ±SD.

2.2.4. Mechanical properties

Materials were analysed in the form of a 5 mm width and a 5 cm long flat samples. They were placed in the holders of the Instron 3345 testing machine and stretched at a rate of 5 mm/min following ASTM D638-02a. Computer software enabling control of the testing machine automatically determined the Young's Modulus, elongation at break, and ultimate tensile stress for a porous sample. n = 5 samples of each material were analysed. Results are presented as a mean value ±SD.

Ultimate tensile stress for porous sample, σ_{por} , was determined using the formula:

$$\sigma_{por} = \frac{F_{\text{max}}}{A(1-\eta)} \tag{3}$$

Young's modulus, E, was determined using the formula:

$$E = \frac{\sigma_{por}}{\varepsilon}, \qquad \varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \tag{4}$$

3. RESULTS

3.1. Best process parameters



Fibre diameter measurement results for various concentrations of polymer solutions are shown in Fig. 3.



Fig. 3. Average fibre diameter (n = 100) in the function of polymer solution concentration

The study aimed to produce two types of fibrous materials: microfibrous with average fibre diameter $d \ge 1 \ \mu\text{m}$ and nanofibrous with average fibre diameter $d \le 1 \ \mu\text{m}$ ($d \approx 0.25 \ \mu\text{m}$). Based on the diameter measurement, polymer concentrations of 2% (C75A) and 3% (C75D) were selected for further fabrication and analysis of nanofibres. Simultaneously polymer concentration of 8% (C75A and C75D) were selected for further fabrication and analysis of microfibres.

Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning

www.czasopisma.pan.pl PAN www.journals.pan.pl

3.1.2. Number of surface defects

The conducted tests revealed that two parameters, namely compressed air pressure and polymer solution flow rate, exerted a significant impact on the number and the size of surface defects. In the case of samples with a very large number of defects, difficult to count, the sign ∞ was used.

In the case of microfibrous materials, it was not possible to produce materials at a compressed air pressure below 0.1 MPa due to the very high viscosity of polymer solutions. The results of the analysis of surface defects are shown in Table 1.

Table 1. Number of surface defects obtained at different compressed air pressure and different polymer solution flow rates

		Number of defects			
		C75A 2%	C75D 3%	C75A 8%	C75D 8%
	0.05	46	26	-	-
	0.075	38	14	-	-
Compressed air pressure [MPa]	0.1	34	34	39	37
combreases an breases from al	0.125	48	23	35	52
	0.15	51	29	38	50
	0.175	46	42	39	00
	0.2	00	34	50	∞
	10	45	41	39	43
	15	32	33	32	36
Polymer solution flow rate [m]/h]	20	34	32	45	45
r offiner portation non rate [man]	25	36	46	48	40
	30	37	36	35	37
	40	47	42	32	00
	50	46	32	31	00

In addition to the number, the defect sizes were also taken into account. A detailed analysis of all surface images, together with the number of defects, allowed to find the optimal values of compressed air pressure and polymer solution flow rate. The results of the analysis are shown in Table 2.

Table 2. The parameters selected to produce fibrous materials with the desired properties

	Type of polymer					
Process parameters	C	75A	C75D			
	nanofibres	microfibres	nanofibres	microfibres		
Polymer solution concentration [%]	2	8	3	8		
Compressed air pressure [MPa]	0.1	0.1	0.1	0.1		
Polymer solution flow rate [ml/h]	30	30	30	30		

Iwona Łopianiak, Michał Wojasiński, Beata Butruk-Raszeja, Chem. Process Eng., 2020, 41 (4), 267–276

3.2. Pore size and porosity

Results of porosity and pore size measurements are shown in Figs. 4. and 5.



The porosity of nanofibres produced from C75D is higher than that of microfibres. This is because when the average fibre size is reduced, the specific surface area of the material increases and thus its porosity. In the case of C75A, the porosity of nanofibres is similar to the porosity of microfibres. No change in material porosity can explain its high elasticity. Stretched elastic nanofibres shrink after removal from the collector, which reduces the pore volume, and slightly increases the diameter of fibres, leading to a decrease of the material porosity.

Regardless of the type of polymer, the values of pore sizes for nanofibrous and microfibrous materials were similar. The average pore size in microfibrous materials is about ten times larger than in nanofibrous materials. The relationship observed for the average fibre diameter is visible in a similar way for the pore sizes (both characteristics take values about 10 times higher for microfibrous materials). Thus, increasing the fibre size results in the expected increase in pore size in the produced materials (Eichhorn and Sampson, 2005).

3.3. Wettability

The results of wettability analysis are shown in Fig. 6.

272



The values of contact angles do not differ significantly for all four material variants. Based on the obtained contact angle values it can be stated that the produced fibrous materials are hydrophobic. In order to use materials as scaffolds in a three-dimensional cell culture, their surface should be modified (Safinia et al., 2005).

3.4. Mechanical properties

The analysis of the mechanical properties is shown in Table 3.

Polymer	Polymer solution concentration	Young's modulus ±SD [MPa]	Elongation at break ±SD [%]	Ultimate tensile stress for porous sample ±SD [MPa]
C75A	2%	2.9 ± 0.4	63.4 ± 7.3	4.3 ± 0.4
CIJA	8%	0.6 ± 0.1	156 ± 17.5	2.3 ± 0.2
C75D	3%	4.7 ± 0.4	27.3 ± 2.9	2.4 ± 0.2
CID	8%	64.1 ± 10.1	20.2 ± 2.0	5.8 ± 0.6

Table 3. Mechanical properties of fabricated materials

In general, materials produced from C75A polymer have a lower Young's modulus values than materials made of C75D polymer. Therefore, materials produced from C75A polymer are more flexible than materials produced from C75D polymer. This was also reflected by the values of the elongation at break. Samples made from C75A achieve much higher elongation at break values than samples fabricated from C75D.

The highest value of ultimate tensile stress for porous samples for C75D 8% material exhibits the best mechanical properties. C75D 3% materials are the least resistant to stretch. In the case of elastic materials (produced from C75A), better mechanical properties were exhibited by nanofibrous materials. In general, all produced materials present mechanical properties appropriate for use in biomedical applications.

http://journals.pan.pl/cpe

www.czasopisma.pan.pl Iwona Łopianiak, Michał Wojasiński, Beata Burruk-Raszeja, Chem. Process Eng., 2020, 41 (4), 267–276

4. CONCLUSIONS

The selection of appropriate process parameters allowed the production of fibres of the desired size and required quality (the smallest number and size of defects). The research showed that the concentration of the polymer solution had a significant impact on the size of fibres. The average fibre diameter increased when the polymer solution concentration increased.

The analysis of the surface of produced samples proved that compressed air pressure and polymer solution flow rate strongly influenced the quality (number and size of defects) of fibrous materials. During the tests, it was shown that high concentration (high viscosity) of polymer solutions required a higher driving force (compressed air pressure) of the process.

A detailed SEM image analysis of the surfaces allowed to find optimal values of compressed air pressure and polymer solution flow rate. The application of the selected process parameters minimized the size and amount of all types of surface defects and ensured the highest efficiency and the least energy consumption of the process while maintaining its stability. Regardless of the concentration of the polymer solution and the type of polymer, the following process parameters were selected: compressed air pressure of 0.1 MPa and polymer solution flow rate of 30 ml/h.

The nanofibrous material pore size was about ten times smaller than the microfibrous material pore size for samples made of both types of polymers. It shows that the fibre size of the produced materials strongly influenced the pore size. The porosity of nanofibrous materials produced from C75D polymer was higher than that of microfibrous materials produced from the same polymer. This is what was expected because as the pore size decreased, the surface area of the material increased and thus its porosity.

The contact angles of all produced fibrous materials are similar for every type of material and amount to about 120°. Thus, the fabricated fibrous materials are hydrophobic.

Analysis of Young's modulus and elongations at break of the samples showed that microfibrous materials made from C75A polymer were more flexible than materials made from C75D polymer, which confirmed that the mechanical properties of materials strongly depended on the initial hardness of the polymer. Similar ultimate tensile stress for all types of mats suggested that change in the diameter of the fibres in the materials did not affect their mechanical properties.

This work developed a method for producing fibrous materials, which can be used as scaffolds in threedimensional cell cultures. It has been shown that it is possible to minimize structure defects and change the diameter of the fibres from about 0.2 μ m to about 3 μ m. Production of two types of nonwovens, with microand nanofibres, significantly broadens the spectrum of potential applications of the presented materials.

This work was supported by the National Centre for Research and Development in the LIDER programme and research grant: "BioGraft – biomimetic vascular prostheses of small diameters", Project Contract No. LIDER/18/0104/L-8/16/NCBR/2017.

SYMBOLS

A sample cross-section area, m²

- E Young's Modulus, Pa
- F_{max} maximum force acting on the sample, N
- L sample deformation, m

274

Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning

- L_0 initial length of sample, m
- ΔL change of sample length, m
- m sample mass, kg
- n number of measured values, -
- S sample area, m²

Greek symbols

- ε sample strain, –
- η sample porosity, –
- δ sample thickness, m
- ρ_s sample density, kg/m³
- ρ_p polymer density, kg/m³
- σ_{por} ultimate tensile stress for porous sample, Pa

REFERENCES

ASTM D638 - 02a - Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics.

- Behrens A.M., Casey B.J., Sikorski M.J., Wu M.J., Tutak K.L., Sandler A.D., Kofinas P., 2014. In situ deposition of PLGA nanofibres via solution blow spinning. *ASC Macro Letters*, 3, 249–254. DOI: 10.1021/mz500049x.
- Bhattacharya M., Malinen M.M., Lauren P., Lou Y., Kuisma S.W., Kanninen L., Lille M., Corlu A., GuGuen-Guillouzo C., Ikkala O., Laukkanen A., Urtti A., Yliperttul M., 2013. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. J. Controlled Release, 164, 291–298. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.039.
- Borden M., Attawia M., Khan Y., Laurencin C.T., 2002. Tissue engineered microsphere based matrices for bone repair, design and evaluation. *Biomaterials*, 23, 551–559. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00137-5.
- Chanjuan D., Yonggang L.V., 2016. Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers*, 8, 42–56. DOI: 10.3390/polym8020042.
- Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L., 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *ASSAY Drug Dev. Technol.* 12(3), 207–218. DOI: 10.1089/ adt.2014.573.
- Eichhorn S.J., Sampson W.W., 2005. Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. J. R. Soc. Interface, 2, 309–318. DOI: 10.1098/rsif.2005.0039.
- Hutmacher D.W., Woodfield T.B.F., Dalton P.D., 2015. Scaffold Design and Fabrication. In: van Blitterswijk C., De Boer J. (Eds.), *Tissue Engineering*. 2nd edition, Academic Press, 311–346.
- Indong J., Han H. S., Edwards J. R., Jeon H., 2018. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 745. DOI: 10.3390/ijms19030745.
- Kim J.B., 2005. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.*, 365–377. DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
- Kitel J., Czarnecka J., Rusin A., 2013. Trójwymiarowe hodowle komórek zastosowania w badaniach podstawowych i inżynierii tkankowej. *Postępy Biochemii*, 59, 305–321.
- Khan F., Tare R.S., Oreffo R.O. C., Bradley M., 2009. Versatile biocompatible polymer hydrogels: Scaffolds for cell growth. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 978–982. DOI: 10.1002/anie.200804096.
- Kurzydłowski K., Lewandowska M., 2010. Nanomateriały inżynierskie konstrukcyjne i funkcjonalne. Wydawnictwo Naukowe PWN, 256–284.
- Padsalgikar A.D., 2017. Plastics in medical devices for cardiovascular applications. William Andrew, Elsevier Inc., United Kingdom, 64. DOI: 10.1016/B978-0-323-35885-9.00003-5.
- Safinia L., Datan N., Hohse M., Mantalaris A., Bismarck A., 2005. Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, 26, 7537–547.

Iwona Łopianiak, Michał Wojasiński, Beata Butruk-Raszeja, Chem. Process Eng., 2020, 41 (4), 267–276

- Singh M.R., Patel S., Singh D., 2016. Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering, In: Grumezescu A.M. (Ed.), Nanobiomaterials in soft tissue engineering. Applications of Nanobiomaterials Volume 5. William Andrew Applied Science Publishers. 231–260. DOI: 10.1016/B978-0-323-42865-1.00009-X.
- Subbiah T., Bhat G.S., Tock R.W., Parameswaran S., Ramkumar S.S., 2005. Electrospinning of nanofibers. J. Appl. Polym. Sci., 96, 557–569. DOI: 10.1002/app.21481.
- Schindelin J., Arganda–Carreas Frise E., Kaynig V., Lingair M., Pierzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmdt B., Tinevez J., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 28, 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K., 2016. Extracellular matrix structure. Adv. Drug Delivery Rev., 97, 4–27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Yamamoto M., Rafii S., Rabbany S. Y., 2014. Scaffold biomaterials for nano-pathophysiology. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 74, 104–114. DOI: 10.1016/j.addr.2013.09.009.

Received 29 April 2020 Received in revised form 9 November 2020 Accepted 18 November 2020

Publikacja P3

<u>Łopianiak I.</u>, Kawecka A., Civelek M., Wojasiński M., Cicha I., Ciach T., Butruk-Raszeja B.A. (2024). *Characterization of blow-spun polyurethane scaffolds–influence of fiber alignment and fiber diameter on pericyte growth*. ACS Biomaterials Science&Engineering, 10(7), 4388–4399.

DOI: <u>10.1021/acsbiomaterials.4c00051</u> IF(2024) = 5,5

Punktacja MNiSW (2025) = 140

CiteScore = 10,300

Wkład w wykonanie badań:

- Współtworzenie planu badawczego wraz z Promotorem;
- Opracowanie metody wytwarzania materiałów o włóknach ukierunkowanych w procesie rozdmuchu roztworu polimeru;
- Wytworzenie materiałów o zadanych średnich średnicach włókien i ukierunkowaniu i przeprowadzenia analiz: mikroskopowej, właściwości mechanicznych, pomiar średnic i ukierunkowania włókien, porowatości i wielkości porów;
- Nadzorowanie części prac badawczych realizowanych przez Dyplomantkę;
- Wykonanie hodowli komórkowych i analiz mikroskopowych;
- Analiza uzyskanych wyników wraz z analizą statystyczną;
- Część prac badawczych wykonana podczas wyjazdu stażowego, na który samodzielnie zdobyłam finansowanie (Mobility PW).

Wkład w przygotowanie publikacji:

- Pierwszy autor i autor korespondencyjny;
- Przygotowywanie koncepcji manuskryptu wraz z Promotorem;
- Przygotowywanie pierwszej wersji manuskryptu;
- Przygotowywanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz manuskryptu po recenzjach (główny autor);
- Przygotowanie wszystkich rysunków i wykresów.



pubs.acs.org/journal/abseba

Open Access
This article is licensed under <u>CC-BY 4.0</u> ()
Article

Characterization of Blow-Spun Polyurethane Scaffolds-Influence of Fiber Alignment and Fiber Diameter on Pericyte Growth

Iwona Łopianiak,* Aleksandra Kawecka, Mehtap Civelek, Michał Wojasiński, Iwona Cicha, Tomasz Ciach, and Beata A. Butruk-Raszeja

Cite This: AC	S Biomater. Sci. Eng. 2024, 10, 4388–4	1399	Read Online	
ACCESS	Lul Metrics & More		Recommendations	Supporting Information

ABSTRACT: In this study, fibrous polyurethane (PU) materials with average fiber diameter of 200, 500, and 1000 nm were produced using a solution blow spinning (SBS) process. The effects of the rotation speed of the collector (in the range of 200–25 000 rpm) on the fiber alignment and diameter were investigated. The results showed that fiber alignment was influenced by the rotation speed of the collector, and such alignment was possible when the fiber diameter was within a specific range. Homogeneously oriented fibers were obtained only for a fiber diameter ≥500 nm. Moreover, the changes in fiber orientation and fiber diameter (resulting from changes in the rotation speed of the collector) were more noticeable for materials with an average fiber diameter of 1000 nm in comparison to 500 nm, which suggests that the larger the fiber diameter, the better the controlled architectures that can be



obtained. The porosity of the produced scaffolds was about 65-70%, except for materials with a fiber diameter of 1000 nm and aligned fibers, which had a higher porosity (76%). Thus, the scaffold pore size increased with increasing fiber diameter but decreased with increasing fiber alignment. The mechanical properties of fibrous materials strongly depend on the direction of stretching, whereby the fiber orientation influences the mechanical strength only for materials with a fiber diameter of 1000 nm. Furthermore, the fiber diameter and alignment affected the pericyte growth. Significant differences in cell growth were observed after 7 days of cell culture between materials with a fiber diameter of 1000 nm (cell coverage 96-99%) and those with a fiber diameter of 500 nm (cell coverage 70-90%). By appropriately setting the SBS process parameters, scaffolds can be easily adapted to the cell requirements, which is of great importance in producing complex 3D structures for guided tissue regeneration.

KEYWORDS: aligned fibers, mechanical properties, solution blow spinning, polyurethane, pericytes

INTRODUCTION

The main role of scaffolds in tissue engineering is to provide structural support for cells, facilitate cell proliferation, sustain the mechanical properties of the replaced tissue, and create space for tissue regeneration. Due to their complex role, scaffolds are required to meet specific architectural and mechanical demands.¹⁻³ Among the various scaffolds that can be selected for tissue engineering applications, fibrous scaffolds have attracted the attention of researchers owing to their unique topographical features. Fibrous constructs resemble the topography of an extracellular matrix (ECM), which provides a native microenvironment for cell adhesion, proliferation, differentiation, and migration.^{1,4-6} Furthermore, the ECM maintains the structure of the tissue and ensures its mechanical resistance, which is especially important when replacing tissues exposed to high forces, such as blood vessels. The ECM of blood vessels is formed by structural proteins (mainly collagens, elastin, and glycoproteins), the contents of which vary depending on the type of vessel. In addition to proteins, the vascular ECM constitutes a depot of resident growth factors and cytokines that regulate cell behavior.⁷⁻¹² Pericytes play crucial roles in angiogenesis and vascular

development. Together with endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs) they build blood vessel walls and ensure proper morphogenesis and homeostasis.¹³ Many layers of SMCs that build the tunica media are circumferentially wrapped around the ECs monolayer, providing vessel stability and regulating the blood flow. In contrast to SMCs, pericytes are directly embedded in the basement membranes of smaller vessels. Direct contact with ECs plays a crucial role in maintaining barrier function, cell-cell

Received:January 10, 2024Revised:April 4, 2024Accepted:May 6, 2024Published:June 10, 2024



https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00051 ACS Biomater. Sci. Eng. 2024, 10, 4388–4399



© 2024 The Authors. Published by American Chemical Society

communication, and signal transmission along the length of the blood vessel.^{14–16} The complex and diverse characteristics of pericytes simultaneously stabilize hemodynamic processes, transmit signals along the vessel, and regulate blood flow, making them multifunctional and extremely important components of the circulatory system.

As each type of cell has different requirements regarding the matrix architecture, designing a suitable structure of scaffold is crucial to provide appropriate conditions for tissue reconstruction. The type of bulk polymer from which the scaffolds are made also influences their properties. Due to their high mechanical strength and degradation rate, PUs are attractive materials for tissue engineering applications, especially in vascular graft designing, $^{18-20}$ Solution blow especially in vascular graft designing,. spinning (SBS) is an emerging technique for fiber production that allows the fabrication of morphologically various wellcontrolled fibrous architectures that are increasingly used in tissue engineering.²¹ The properties of fibrous materials produced using this method can be easily customized to meet the requirements of tissue engineering applications. Heart, bone, skin, and vascular scaffolds have been widely produced using SBS.^{20,24–29}

Several studies have been performed to define the influence of SBS process parameters, such as the polymer solution concentration, gas pressure, polymer solution flow rate, rotation speed of the collector, working distance, and nozzle design, on the fiber and fibrous material properties.^{30,31} It was concluded that there are dependent characteristics for each parameter (e.g., solution concentration influences fiber diameter and pore size,³² increasing the collector rotational speed results in fiber orientation,³³ and reducing the working distance reduces the porosity of the material²⁸), although the final properties of the fibrous scaffold result from the utilized polymer and the overall combination of all process parameters.

In this study, three types of fibrous PU materials with different fiber diameters (200, 500, and 1000 nm) were produced using the SBS method. Each of them was manufactured at rotation speeds of 200, 400, 1000, 5000, 10 000, 15 000, 20 000, and 25 000 rpm while maintaining the remaining process parameters constant. The main goal was to provide a comprehensive assessment of the influence of the rotation speed of the collector in the SBS process on PU fiber alignment depending on the fiber diameter as well as to evaluate the effect of the change in fiber alignment on the fiber diameter. Furthermore, the pore size, porosity, and mechanical properties of the fibrous materials with aligned and nonaligned diameter on pericyte growth was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Polymer Solutions Preparation and Fibrous Scaffold Fabrication. The fibrous PU materials were produced from medicalgrade PU ChronoFlexC7SA (AdvanSource Biomaterials). To prepare polymer solutions, bulk PU was dissolved overnight in 1,1,1,3,3,3hexafluoro-2-popanol (>99.0%, TCI Chemicals) using a magnetic stirrer at 25 °C. In this study, fibers were produced from PU solutions with concentrations of 2, 4, and 5% (weight/weight). The given concentrations were chosen to obtain materials with average fiber diameters of approximately 200, 500, and 1000 nm. Fibrous materials were produced using the SBS method as described in detail elsewhere.^{32,34} Briefly, PU solutions were placed in syringes and sprayed onto a rotating collector by using a concentric nozzle system. The nozzle system consisted of an inner diameter of 4 mm. The



nozzle lengths were 25 and 23 mm, respectively. The tip of the inner nozzle was protruded ahead of the tip of the outer nozzle by 2 mm. The polymer solution supplied through the inner nozzle is spun using a stream of compressed air supplied through the outer nozzle of the concentric nozzle system. The compressed air draws out the polymer solution from the inner nozzle and directs the polymer stream toward the rotating collector. The collector was mounted on the specific holder to move back and forward perpendicular to the fiber's production direction, and the collector rotation was driven by an electric motor. A simple brush electric motor with a rotational speed in a range of 100-2000 rpm and with an operating voltage range of 1-7 V was used for production materials with a rotation speed of the collector 200-1000 rpm and brush electric motor for car models (Rally special 3, 17T super racer) with rotational speed up to 29 300 rpm and with operating voltage range of 3.7-9.6 V was used for production of the materials with a rotation speed of the collector 5000-25 000 rpm. Both motors were mounted on the same holder and connected to the collector pin. An appropriate nozzle-collector distance allows the solvent to evaporate from the polymer solution and collect fibers on the collector.

All materials were produced using the following process parameters: polymer solution flow rate of 30 mL/h, air pressure of 0.1 MPa, and working distance (between nozzle system and collector) of 30 cm for 120 min (200 nm), 30 min (500 nm), or 20 min (1000 nm) to obtain materials with a thickness of 300 μ m. To investigate the influence of the rotation speed of the collector on fiber alignment, fibrous materials were produced at eight different rotation speeds: 200, 400, 1000, 5000, 10 000, 15 000, 20 000, and 25 000 rpm. The materials were collected on a cylindrical collector with a diameter of 12 mm, cut open, and analyzed as flat samples. 2.2. Scaffolds Characterization. 2.2.1. SEM Analysis. Material

2.2. Scaffolds Characterization. 2.2.1. SEM Analysis. Material surface analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM) (Phenom G1, Phenom World). To measure the fiber diameter, pore size, and fiber alignment, square samples with dimensions of 5×5 mm were glued to SEM stubs with conductive carbon adhesive tape and covered with a 15 nm thick gold layer using a sputter coater (K550 Emitech, Quorum Technologies). The samples were analyzed along the direction of wrapping the fibers on the collector, which was simultaneously the fiber alignment direction for the aligned materials (Figure 1). Images were taken at 600×,



Figure 1. Schematic diagram of fibrous materials with nonaligned and aligned fibers and directions for analysis and measurements. Created in BioRender.com.

1000×, and 5000× magnification. To perform the material thickness analysis, samples with dimensions of 10 × 10 mm were glued upright to SEM stubs with conductive carbon adhesive tape and covered with a 15 nm thick gold layer using a sputter coater. Images were taken at 300× magnification.

2.2.2. Fiber Diameter and Pore Size. SEM images at 5000x magnification were used to measure the fiber diameter and pore area. The n = 100 fiber diameters and n = 100 pore areas of each sample were measured using the Fiji (ImageJ) software.³⁵ The diameter of each analyzed fiber was measured using the Straight tool. Only the fiber diameters in the SEM images in the foreground were measured. The fiber diameter measurement results are presented as the average fiber diameter \pm SD. To measure pore areas, the pores in the foreground of the SEM images were visualized with a Threshold tool

> https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00051 ACS Biomater. Sci. Eng. 2024, 10, 4388-4399



Figure 2. SEM images of fibrous materials with an average diameter of 200 nm produced at collector rotation speeds of (A) 200 rpm, (B) 400 rpm, (C) 1000 rpm, (D) 5000 rpm, (E) 10 000 rpm, (F) 15 000 rpm, (G) 20 000 rpm, and (H) 25 000 rpm at a magnification of 600× and 5000×.

and then the pore surfaces were measured with a Wand tool. To determine the pore size, the circular shape of the pores was assumed. The pore area (A_i) measurement results were used to determine the pore size (d_n) according to the following equation:

$$d_{\rm p_i} = \sqrt{\frac{4A_i}{\pi}}$$
(1)

The pore size measurement results are presented as average pore size ± SD.

2.2.3. Fiber Alignment. SEM images at 1000× magnification were used to determine the fiber alignment depending on the rotational speed of the collector in each material. For this purpose, n = 150 fiber angle deviations from the alignment direction were measured using Fiji (ImageJ) software. A line perpendicular to the bottom edge of the image was assumed to be the alignment direction. The angles between fiber and alignment direction line were measured using a Straight tool. It was presumed that an angle deviation of $<30^{\circ}$ indicated preferably oriented (aligned) fibers. The results are presented as the average fiber deviation angle ± SD. 2.2.4. Material porosity. The gravimetric method was used to

determine the material porosity. For each type of analyzed material, n = 3 samples with dimensions of 10×10 mm were weighed on an analytical balance to determine the sample mass (m_i. Photographs of the samples were taken, and their surface areas (A_i) were determined using Fiji (ImageJ) software. The SEM images (n = 5) of each sample Using Ph (image) solvate: The older magnet (n - j) of elements of a sample thickness. Subsequently, n = 6 thickness measurements were performed for each SEM image and the average thickness (δ_i) was determined. The scaffold density $(
ho_{\rm s})$ was calculated by using the following formula:

$$\rho_{\rm si} = \frac{m_{\rm i}}{A_i \delta_i} \tag{2}$$

The porosity (e) was determined according to the equation:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{si}}{\rho_p}$$
(3)

where the polymer density is $\rho_p = 1.2 \text{ g/cm}^{3.36}$ The results are presented as the average material porosity \pm SD. 2.2.5. Mechanical Properties. A static tensile test was performed using an hereros²²⁴⁶

using an Instron3345 instrument equipped with a 50 N static load cell. The materials were subjected to mechanical tests along and across the direction of wrapping the fibers on the collector as presented in Figure 1. Rectangular samples with dimensions of 70×5 mm (n = 5) were cut from each material in both directions and placed in the pneumatic jaws of the Instron machine. The distance between the jaws and the initial sample length was set at 5 cm. The samples were stretched at a rate of 5 mm/min until they broke. Dedicated Bluehill software automatically determined the Young's modulus, elongation at break, and maximum tensile stress for each sample. The results are presented as average values \pm SD.

Article

2.3. Pericytes Culture and Seeding. Human pericytes from placenta tissue (hPC-PL, Promocell, Germany) were thawed according to the manufacturers' instructions and cultured in supplemented pericyte growth medium (Pericyte Growth Medium 2, Promocell, Germany) at 37 $^\circ\rm C$ in a 5% CO_2 humidified atmosphere, in cell 75 cm³ cell culture flasks (TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland). The medium was changed every 2 days. Accutase solution (Promocell, Germany) was used to harvest cells. Cells at passage 5 were used in the experiments. The experiment was repeated 3 times.

For each type of analyzed material, n = 2 round samples were sterilized with 70% ethanol for 20 min and washed with sterile PBS (3 × 5 min). Sterile samples were mounted on cell culture inserts (Scaffdex, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and placed in 48-well plates. Before cell seeding, the samples were incubated in the medium for 1 h at 37 °C. Then, a pericyte suspension in growth medium (3 \times 10⁴ cells/sample) was added to each well with the sample. Well plates were incubated at 37 $^\circ\mathrm{C}$ in a humidified atmosphere containing 5% CO2 for 1, 3, and 7 days. Culture media were changed 24 h after seeding and every second day thereafter.

2.4. Cell Adhesion Analysis. After each culture period, cells growing on fibrous samples were fixed at 4 °C for 15 min in 4% buffered paraformaldehyde (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Afterward, the samples were washed with PBS (3×5 min), and the cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS (8 min). After washing with PBS (3×5 min), a staining solution containing 1% Alexa488-phalloidin (Invitrogen, Thermo Fisher) and 0.1% Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher) was used to stain F-actin filaments and nuclei, respectively. Finally, the samples were washed with PBS $(3 \times 5 \text{ min})$ and prepared for

fluorescence imaging. Images of each sample (n = 5 images per sample) at $10 \times$ magnification were obtained using a Zeiss Axio Observer Z1 fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). Cell coverage was measured on each image using Fiji (ImageJ) software. The results are presented as the average cell coverage, ± SD. 2.5. Statistical Analysis. The statistical significance of the

differences was analyzed using single-factor analysis of variance (ANOVA) for $p \leq 0.05$, with posthoc Tukey's test (OriginPRO 2021b).

https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00051 ACS Biomater. Sci. Eng. 2024, 10, 4388–4399



Figure 3. SEM images of fibrous materials with an average diameter of 500 nm produced at collector rotation speeds of (A) 200 rpm, (B) 400, (C) 1000, (D) 5000, (E) 10 000, (F) 15 000, (G) 20 000, and (H) 25 000 rpm at a magnification of 600× and 5000×.



Figure 4. SEM images of fibrous materials with an average diameter of 1000 nm produced at collector rotation speeds of (A) 200 rpm, (B) 400 rpm, (C) 1000 rpm, (D) 5000 rpm, (E) 10 000 rpm, (F) 15 000 rpm, (G) 20 000 rpm, and (H) 25 000 rpm at a magnification of 600x and 5000x.

Table 1. Results of Fiber Alignment and Fiber Diameter Measurements (AVR ± SD)

	E	Deviation angle (de	g)	Fiber diameter (nm)			
Rotation speed of collector (rpm)	200 nm	500 nm	1000 nm	200 nm	500 nm	1000 nm	
200	47 ± 23	37 ± 21	40 ± 21	250 ± 58	585 ± 193	979 ± 337	
400	46 ± 22	40 ± 18	34 ± 18	255 ± 63	548 ± 185	1126 ± 370	
1000	53 ± 20	42 ± 20	46 ± 20	214 ± 45	628 ± 195	1127 ± 370	
5000	43 ± 22	37 ± 19	34 ± 19	236 ± 68	546 ± 160	1014 ± 305	
10 000	44 ± 20	34 ± 24	24 ± 16	225 ± 65	514 ± 167	916 ± 278	
15 000	47 ± 21	28 ± 19	24 ± 15	223 ± 65	547 ± 153	895 ± 254	
20 000	41 ± 20	28 ± 18	25 ± 17	258 ± 72	471 ± 129	924 ± 296	
25 000	39 ± 19	24 ± 18	20 ± 13	253 ± 79	435 ± 116	818 ± 217	

RESULTS

3.1. Fiber Alignment. First part of this study, the influence of the rotational speed of the collector on the fiber alignment of materials with different average fiber diameters was evaluated. SEM images of fibrous materials with average fiber diameters of 200, 500 and 1000 nm, produced with different collector rotational speeds (200, 400, 1000, 5000, 10 000, 15 000, 20 000, and 25 000 rpm) are presented in Figures 2-4.

Additionally, in Figure 5(A), the results of the fiber alignment measurements are shown.

Representative SEM images of materials surface morphology (Figures 2-4) show typical morphology of fibrous PU materials produced by SBS method, characterized by the presence of fibers and single defects in the form of stains.^{28,32,34} There were no significant differences in the fiber alignment, depending on the rotation speed of the collector in materials with an average fiber diameter of 200 nm (Figure 2). Differences in fiber alignment appeared in the SEM

4391

tps://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00051 ACS Biomater, Sci. Eng. 2024, 10, 4388-4399

Article

images of the materials with average fiber diameters of 500 and 1000 nm. At low rotation speeds (200, 400, 1000, and 5000 rpm), the fibers were randomly oriented regardless of the average fiber size. However, with an increase in the rotation speed to 10 000, or 15 000 rpm, a more uniform arrangement of fibers was observed, whereas at rotation speeds of 20 000 and 25 000 rpm, homogeneously oriented (aligned) fibers were visible (Figures 3 and 4).

The results of the qualitative analysis of the surface of each material were quantitatively confirmed by measuring the fiber deviation angles from the preferred orientation direction (Table 1, Figure S(A)). The deviation angles obtained for materials with an average fiber diameter of 200 nm were about $40-50^{\circ}$ regardless of the rotation speed of the collector. The fiber deviation angles obtained for materials with average fiber diameters of 500 nm and 1000 nm produced at rotation speeds in the range of $200-500^{\circ}$ pm were in the range of $30-45^{\circ}$, whereas increasing the rotation speed above 10 000 pm allowed us to obtain deviation angles below 30° . Lower deviation angles were obtained for materials with an average fiber diameter of 1000 nm in comparison with 500 nm for the same rotation speed of the collector.

The fiber deviation angle distributions in the form of histograms are presented in Figure S1. The graphs show a noticeable change in the fiber alignment for materials with an average diameter of 500 and 1000 nm and no change for materials with an average fiber diameter of 200 nm. For the analyzed materials with diameters of 500 nm and 1000 nm, the change in fiber alignment occurred when the rotation speed of the collector was 10 000 rpm or more. Statistical analysis showed no significant differences in the fiber alignment for materials with an average fiber diameter of 200 nm, regardless of the rotation speed. Furthermore, significant changes in the fiber alignment for materials with average fiber diameters of 500 and 1000 nm produced at rotation speed 5000 rpm and 25 000 rpm ($p \le 0.001$) were observed. A fiber deviation angle <30° indicating aligned (homogeneously oriented) fibers has been achieved at a rotational speed ≥15 000 rpm for materials with an average fiber diameter of 500 nm, and ≥10 000 rpm for materials with an average fiber diameter of 1000 nm. Thus, in further analysis, materials with average fiber diameters of 500 nm and 1000 nm produced at rotation speed of 5000 and 25 000 rpm were considered as nonaligned and aligned, respectively.

Additionally, in Figure S2 the results of fiber thickness measurements depending on the rotation speed of the collector are shown. Moreover, representative SEM images used for material thickness determination are presented in Figure S3. The average thickness of the materials is in the range of 250–350 μ m regardless of the collector rotation speed.

3.2. Fiber Diameter. The results of the evaluation of the influence of the rotation speed of the collector on the fiber diameter are presented in Figure S(B). For materials with an average fiber diameter of 200 nm, no significant differences in the fiber diameter were observed, whereas for materials with average fiber diameters of 500 and 1000 nm, a slight decrease in the fiber diameter was observed with an increase in the rotational speed of the collector. The results of the fiber diameter measurements are presented in Table 1.

The fiber diameter distributions in the form of histograms are presented in Figure S4. For materials with average diameters of 500 and 1000 nm, the distributions became



Figure 5. (A) Fiber alignment, AVR \pm SD, 150; (B) fiber diameter, AVR \pm SD, 100; the square in the middle of the box of the box plot indicates the mean value, the box indicates the interquartile range (IQR) (2sth-75th percentile), and the whiskers indicate the range within 1.5IQR (5th-95th percentile). For materials with an average fiber diameter of 200 nm the change of collector rotational speed did not significantly influence an average fiber alignment as well as fiber alignment obtained for 5000 rpm and 25 000 rpm for materials with an average fiber diameter of 500 nm and 1000 nm ($p \leq 0.001$). Furthermore, for materials with an average fiber diameter of 500 nm and 1000 nm significant decrease in fiber diameter was noticed, whereas a more significant decrease was observed for materials with an average fiber diameter of 1000 nm ($p \leq 0.03$ and $p \leq 0.001$ for materials with an average fiber diameter S00 and 1000 nm, respectively).

narrower as the rotation speed of the collector increased. Moreover, a slight shift in the distributions toward smaller diameters was observed. For materials with an average fiber diameter of 200 nm, no change in the fiber diameter distribution was observed regardless of the rotation speed. For materials with an average fiber diameter of 500 nm and 1000 nm, significant decrease in fiber diameter was noticed with increasing rotation speed, whereby a more significant

4392

decrease was observed for materials with an average fiber diameter of 1000 nm ($p \le 0.05$ and $p \le 0.001$ for materials with an average fiber diameter 500 and 1000 nm, respectively).

In the next part of this study, the properties of fibrous materials with diameters of 500 and 1000 nm with nonaligned (NA) and aligned (A) fibers were compared. The materials were produced with collector rotational speeds of 5000 and 25 000 rpm for nonaligned and aligned fibers and marked as 500 NA, 500 A, 100 NA, and 1 000 A, respectively.

3.3. Porosity and Pore Size. The results of the pore size and porosity measurements are shown in Figure 6 and Table 2.



Figure 6. Scaffold (A) pore size and (B) porosity depending on the fiber diameter and alignment, AVR \pm SD, n = 50; the square in the middle of the box of the box plot indicates the mean value, the box indicates the interquartile range (IQR) (25th–75th percentile), and the whiskers indicate the range within 1.5IQR (5th–95th percentile). An increase in pore size value was observed only for aligned fibers with an average fiber diameter of 1000 nm ($p \leq 0.001$). There were no significant changes in material porosity regardless of fiber diameter and alignment.

The pore size (Figure 6(A)) of the fibrous scaffolds increased with the fiber diameter. Moreover, for materials with an average diameter of 1000 nm, fiber alignment influenced the pore size. For scaffolds with aligned fibers (d = 1000 nm), the pore size values were significantly lower ($p \leq 0.001$). No significant changes in the pore size were observed for the materials with an average fiber diameter of 500 nm. Moreover, there were no significant changes in material porosity (Figure 6(B)). The average porosity of the scaffold was >65%, regardless of fiber diameter and alignment.

3.4. Mechanical Properties. Fibrous materials were subjected to static tensile tests in two directions: along and

Article

across the direction of wrapping the fibers on the collector, hereinafter referred to as directions: along and across. The results presented in Figure 7 indicate distinct differences in the mechanical properties of the samples depending on the stretching direction. The measured mean values of the mechanical properties of the materials are listed in Table 2.

The Young's modulus (YM) measurement (Figure 7(A)) showed a significant difference in material elasticity depending on the stretching direction. The YM values obtained for materials stretched across the direction of wrapping fibers on the collector (independent of fiber alignment and diameter) are decidedly lower than those obtained for materials stretched along. Moreover, a significant reduction in the YM value was observed for samples with nonaligned fibers in comparison to aligned fibers ($p \le 0.001$) only for materials with an average fiber diameter of 1000 nm stretched along. In the remaining variants, the fiber alignment did not significantly affect the elasticity of the material.

The elongation at break values (Figure 7(B)) was greater for more elastic materials (lower YM values), but no meaningful differences were observed regardless of the stretching direction, fiber diameter, or alignment.

The maximum tensile stress values (Figure 7(C)) were higher for materials stretched along regardless of the fiber diameter and alignment. In these samples, a significant increase ($p \le 0.05$) in the maximum tensile stress was observed for the aligned materials with an average fiber diameter of 1000 nm.

3.5. Cellular Response. To investigate cell-material interactions depending on fiber diameter and alignment, pericytes were cultured on nonaligned and aligned materials with fiber diameters of 500 and 1000 nm. Images of the cells growing on the respective materials after 1, 3, and 7 days are presented in Figure 8. The cell-coverage measurement results are presented in Figure 9 and Table 3.

At day 1 postseeding, pericytes attached to aligned materials with an average fiber diameter of 500 nm were more elongated than cells attached to aligned materials with an average fiber diameter of 1000 nm. Cell coverage after 1 day of cell culture was similar for all of the analyzed materials. After 3 days of cell culture, pericytes growing on aligned materials (500_A, 1 000_A) were more elongated in shape than cells growing on nonaligned fibers (500_NA, 1 000_NA), and the cell coverage was likewise slightly higher for aligned materials. There were no significant differences in cell coverage after 1 and 3 days of cell culture, regardless of the type of material. Independent of fiber diameter, after 7 days of cell culture, pericytes were elongated, homogeneously oriented, and formed a firm layer on the aligned materials. In contrast, some empty areas that were not fully colonized by cells were visible on the nonaligned

Table 2. Results of Pore Size, Porosity, and Mechanical Parameters Measurements (AVR ± SD)

		Sample			
		500_NA	500_A	1 000_NA	1 000_A
Pore size (µm)		26 ± 15	18 ± 11	72 ± 45	51 ± 40
Porosity (%)		67 ± 3	76 ± 6	69 ± 4	66 ± 1
Young's modulus (MPa)	along	6.6 ± 2.0	6.5 ± 0.8	4.3 ± 1.1	7.5 ± 0.5
	across	1.7 ± 0.7	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Elongation at break (%)	along	123 ± 23	85 ± 36	143 ± 28	141 ± 30
	across	216 ± 39	215 ± 11	250 ± 49	227 ± 11
Maximum tensile stress (MPa)	along	14.1 ± 2.0	12.3 ± 5.3	13.4 ± 1.1	20.3 ± 4.2
	across	8.0 ± 0.4	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.4	4.8 ± 0.3

4393



Figure 7. Mechanical properties of fibrous samples with diameters 500 and 1000 nm with nonaligned and aligned fibers subjected to static tensile test along and across fibers alignment direction; (A) Young's modulus, (B) maximum force, (C) maximum tensile stress, AVR \pm SD, n = 5; the square in the middle of the box of the box plot indicates the mean value, the box indicates the interquartile range (IQR) (25th–75th percentile), and the whiskers indicate the range within 1.5IQR (5th–95th percentile). For materials with an average fiber diameter of 1000 nm stretched in a along direction, a significant reduction in Young's modulus value was observed for samples with nonaligned fibers in comparison to aligned ($p \le 0.001$); Samples elongation at break values were greater for more elastic materials (lower YM values), however, there were no meaningful differences regardless of stretching direction, fiber diameter, or alignment. For samples stretched in the along direction, a significant increase ($p \le 0.05$) of maximum tensile stress was observed for aligned materials with an average fiber diameter of 1000 nm.

materials. Moreover, on nonaligned samples, pericytes were randomly oriented and single, not fully elongated cells were observed. However, the cell coverage (after 7 days of cell culture) was similar (\geq 89%) for aligned materials with a fiber diameter of 500 nm and both aligned and nonaligned fibers with a diameter of 1000 nm. Moreover, there was notably lower cell coverage (68%) on nonaligned materials with fiber diameter of 500 nm compared to other types of analyzed materials ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$).

4. DISCUSSION

Although the influence of process parameters on the properties of fibers produced by electrospinning has been extensively investigated, 3^{7-41} relatively little is known about how the SBS process parameters affect the characteristics of the produced fibers. Although electrospinning and SBS are similar methods,

considerable process differences prevent direct comparisons or extrapolations between these methods.

In this study, a comprehensive assessment of the impact of the rotation speed of the collector during the SBS process on the fiber morphology and the physical and mechanical properties of the scaffold, depending on the fiber diameter, is presented. Furthermore, we evaluated the cell-material interactions depending on the fiber diameter and their alignment. The rotation speed of the collector is one of the SBS process parameters that affects fiber morphology. According to literature, uniformly arranged fibers are acquired in the SBS process by increasing the rotation speed of the collector.^{33,42,43} In our previous study, we evaluated the influence of the polymer solution concentration, compressed gas pressure, and polymer solution flow rate on the fiber diameter and number of defects on the scaffold surface.³²

4394



Figure 8. Pericyte adhesion on aligned (A) and nonaligned (NA) fibers of materials with an average fiber diameter of 500 and 1000 nm, after 1, 3, and 7 days in magnification $10\times$.



Figure 9. Pericyte coverage of the analyzed materials; the square in the middle of the box of the box plot indicates the mean value, the box indicates the interquartile range (IQR) (25th–75th percentile), and the whiskers indicate the range within 1.5IQR (5th–95th percentile). Cell coverage after 1 day of cell culture was similar for all analyzed materials; There were no significant differences in cell coverage after 1 and 3 days of cell culture, regardless of the type of material. The cell coverage (after 7 days of cell culture) was \geq 89% for aligned materials with a diameter of 500 nm and aligned fibers and 1000 nm for both aligned and nonaligned samples. There was a notably lower cell coverage (68%) for nonaligned materials with fiber diameter of 500 nm compared to other types of analyzed materials ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$).

Here, we investigated the impact of the rotation speed of the collector on the PU fiber alignment with respect to the fiber diameter.

We successfully produced \sim 300 μ m thick fibrous materials with average fiber diameters of 200, 500, and 1000 nm using 8

4395

pubs.acs.org/journal/abseba

Table 3. Results of Cell Coverage Measurements, AVR \pm SD

	Cell coverage (%)						
	500_NA	500_A	1 000_NA	1 000_A			
Day 1	10 ± 5	14 ± 13	13 ± 11	10 ± 4			
Day 3	29 ± 10	40 ± 19	34 ± 10	40 ± 8			
Day 7	68 ± 15	89 ± 9	96 ± 3	99 ± 1			

different rotation speeds of collector. After evaluating the fiber alignment, we observed that the fiber diameter limits the possibility of obtaining parallel polyurethane fibers (Figure 2, Figure 5(A-B)). For materials with an average fiber diameter of 200 nm, no change in fiber alignment was observed with an increasing rotation speed, and the change in rotation speed did not influence the average fiber diameter. The fiber deviation from the alignment direction was 40-45° for all analyzed rotation speeds of the collector, which is characteristic of nonaligned, randomly distributed polyurethane fibrous materials produced by the SBS method. A similar effect was reported by Pimenta et al.,²⁰ who produced poly(e-caprolactone) (PCL) fibers with an average diameter of approximately 200 nm at rotation speeds of 200 and 750 rpm. The authors did not observe the influence of the rotation speed of the collector on the fiber diameter, and changing the rotation speed did not affect the fiber alignment. In contrast, Simbara et al.33 obtained aligned PCL fibers with an average diameter of approximately 300 nm at a rotational speed of 300 rpm. In general, there are only a few reports showing the modeling of fiber alignment in spinning processes such as solution blow spinning. Sinha-Ray et al. showed that by increasing the collector movement in their model, the fibers were collected on a moving screen, and the placement of the fibers became ordered.44 They confirmed their results further for a wider range of collector speeds and published them in a book.⁴⁵ Thus, the presence of fiber alignment was partially predicted numerically in the work of Sinha-Ray et al. and Yarin et al., where the fiber sizes varied from 300 nm to 2 mm.

The results obtained in this study showed that increasing the rotation speed of the collector during the production of materials with an average fiber diameter of ≥500 nm resulted in a decrease in the average fiber deviation from the alignment direction values down to 20-25°. A significant change in the fiber alignment for materials with an average fiber diameter of 500 and 1000 nm was observed when the rotation speed was 25 000 rpm. According to the SEM images and fiber alignment measurements, materials with diameters ≥500 nm, produced at rotation speeds of 5000 and 25 000 rpm, were clearly distinguishable as nonaligned and aligned (homogeneously oriented), respectively. Moreover, the change in fiber orientation resulted in a slight decrease in the average fiber diameter values for materials with average fiber diameters of 500 and 1000 nm. A significant decrease in fiber diameter was noticed when the rotation speed was 25 000 rpm, whereas the change was more significant for materials with an average fiber diameter of 1000 nm. Additionally, fiber alignment as well as fiber diameter distributions for materials with average fiber diameters of 500 and 1000 nm became narrower when the rotation speed of the collector increased. The observed relationship may result from the fact that as the collector rotational speed increases the fibers are wound onto the collector faster, resulting in their stretching, which is observed as a decrease in diameter. Moreover, at higher rotational



speeds, fibers with larger diameters may deposit on the collector worse due to greater inertia in relation to the centrifugal force of the collector.

Czarnecka et al. performed a correlative analysis of fiber size as a function of polymer concentration and rotational speed of the collector for PCL fibers produced in SBS.46 Although the slight correlation between fiber size and rotational speed is visible for the largest fibers (about 500 nm for polymer concentration of 9%w/w) appeared, and the mean fiber size drops slightly with rotational speed, the authors explicitly stated that "No significant influence of collector rotational speed on average fiber diameter was found".⁴⁶ Furthermore, as described by González-Benito et al.,⁴³ thinner poly(ethylene oxide) fibers were produced by increasing the rotation speed of the collector. Additionally, their results showed that together with a decrease in the average fiber diameter, the fiber size homogeneity increases (diameter distribution narrows), which was also observed in this study (Figures S1 and S4). Variations in fiber orientation and diameter were more noticeable for materials with an average fiber diameter of 1000 nm in comparison to 500 nm, which suggests that the greater the fiber diameter, the better control over the produced architectures is achievable. The results confirmed that it is possible to obtain aligned fibers by the solution blow spinning. However, this is the preferred direction, not the ideal alignment.

Concerning the mechanical properties of fibrous scaffolds (Figure 8), the obtained results showed that they strongly depend on the direction of stretching, whereas fiber orientation influences the mechanical strength more strongly for materials with a fiber diameter of 1000 nm. The elasticity of scaffolds stretched in the along direction was lower than scaffolds stretched across (Young's modulus values 4.3-7.5 and 0.8-1.7 MPa for samples stretched along and across fibers, respectively), while the opposite was observed for the mechanical strength. Fiber alignment significantly influences the mechanical properties of materials with an average fiber diameter of 1000 nm, stretched only along (parallel to aligned fibers). Aligned samples were less elastic (Young's modulus values: 4.3 and 7.50 MPa for nonaligned and aligned fibers) but showed greater tensile strength than nonaligned materials (maximum tensile stress values were 13 and 20 MPa for aligned and nonaligned materials, respectively). For materials with an average fiber diameter of 500 nm stretched in both directions, the fiber alignment did not influence the mechanical strength. In our previous study,⁴⁷ we observed similar dependences in Young's modulus and tensile stress values for PLLA and PU nanofibers tested in two directions: parallel and perpendicular to fibers orientation. Moreover, Simbara et al.³³ also reported an increase in stress values for samples stretched along the oriented fibers. These results suggest that the method of fiber formation has the greatest influence on the mechanical properties of the fibrous materials.

In our study, the fibers were wrapped around the collector, which means that regardless of the rotation speed, the topography of the scaffold was formed by fibers arranged more or less uniformly along the collector. The highest mechanical strength of the materials stretched parallel to the aligned fibers seems to result from a larger number of fibers arranged in this direction. Presumably, this larger number of fibers arranged in one direction reduced the ability of the material to return to its original shape, which was observed as a decrease in the elasticity of the material. The difference in the pubs.acs.org/journal/abseba



mechanical properties of the aligned and nonaligned scaffolds was only observed when the fiber diameter was 1000 nm, which confirms the previous conclusion that by increasing the fiber diameter, materials with a better-controlled architecture can be obtained. Simbara et al.³³ compared the mechanical resistance of aligned and nonaligned fibrous scaffolds in two directions. Their results also suggested that material strength strictly depends on the direction of stretching, much more than on fiber alignment.

The properties of scaffolds should be adjusted according to the requirements of the tissue to be replaced.⁴⁸ This study aimed to produce polyurethane (PUs) scaffolds for potential vascular engineering applications. The results of mechanical tests showed similarities to autologous vessels (e.g., the elastic modulus values of human arteries are 1-8 MPa^{49,50}). The high porosity and adequate pore size of the scaffolds are other important factors that enable tissue reconstruction. In a study by Pimenta et al.,²⁰ vascular scaffolds with a porosity of 50-75% and pore sizes of 7–30 μ m were successfully populated with cells. The porosity of the produced scaffolds was about 65-70%, with the exception of materials with a fiber diameter of 1000 nm and aligned fibers, which had a higher porosity (76%). The scaffold pore size increased with increasing fiber diameter but decreased with increasing fiber alignment (26 μ m for nonaligned versus 18 μ m for aligned materials with a fiber diameter of 500 nm, and 72 μ m for nonaligned and 50 μ m for aligned materials with a fiber diameter of 1000 nm). This porosity range seemed appropriate for vascular regeneration.

In addition to providing mechanical support, the scaffold architecture is a topographic guide for cells.⁵¹ In vascular applications, the topography of the prosthesis should be layered to reproduce the structure of a native vessel, and the architecture of each layer should satisfy the requirements of distinct cell types.⁵² Pericytes are known to exhibit characteristics similar to SMC and play an important role in blood vessel formation, 14,15 but their structural demands for effective scaffold colonization are not fully known. Therefore, we evaluated the influence of fiber alignment and diameter on the human pericyte growth. The presence of slightly elongated cells after 24 h of culture suggested that pericytes readily adhered to the PU scaffolds, although the fiber diameter and alignment did not affect cell coverage within the first 3 days of culture (30-40% for all analyzed materials). However, changes in cell morphology were observed after 3 days of culture, whereby pericytes grown on aligned fibers were more elongated and their mutual alignment was more uniform. Significant differences in cell growth and morphology between aligned and nonaligned materials were observed after 7 days of cell culture. Pericytes on aligned scaffolds were elongated, homogeneously oriented, and created dense layers, whereas nonaligned materials were not fully covered by the less elongated cells. Regarding fiber diameter, cell coverage was significantly higher on materials with a fiber diameter of 1000 nm (96-99%) in comparison to 500 nm (70-90%). The results demonstrated that fibrous PU scaffolds supported the pericyte growth. Moreover, pericyte proliferation was better on scaffolds with larger average fiber diameters, which is also characteristic of SMCs, as shown in our previous study.

In this work, we examined the influence of fiber alignment on pericyte growth, and the results showed that the tested cells (pericytes) grow better on aligned fibers. The mechanism by which some cell types grow better on aligned fibers is not fully understood. Davidson et al. stated that mechanical intercellular

4396

communication between cells ensures stable cell-cell connections and proper tissue formation. Aligned fibers are one of the factors supporting mechanical intercellular communication. Aligned topography may promote contact guidance cues and enhance force transmission between cells, which enable cell directional extension and migration toward each other." Additionally, Fee et al. examined the influence of fiber alignment on genes expression. Performed analysis showed that the fibers alignment results in "upregulated gene expression in fibroblasts, especially the genes associated with actin production, actin polymerization and focal adhesion formation".⁵⁴ Jia et al. described that fiber alignment increases mechanical properties, morphological orientation and protein promotion of smooth muscle cells.⁵⁵ Mural cells such as smooth muscle cells and pericytes are characterized by similar phenotypes; thus, the better growth of pericytes on aligned fibers observed in this work may arise from better mechanical intercellular communication and gene/protein expression.

5. CONCLUSIONS

This study aimed to evaluate the influence of the collector rotational speed on the physical and mechanical properties of PU scaffolds produced using the SBS method. The results showed that obtaining aligned PU fibers is limited by the fiber diameter, as homogeneously oriented fibers were achieved only for fiber diameters of ≥500 nm. Moreover, variations in fiber orientation and fiber diameter were more noticeable for materials with an average fiber diameter of 1000 nm in comparison to 500 nm, which suggests that a greater fiber diameter enables better control over the scaffold. The mechanical properties of the produced materials strongly depend on the direction of stretching, but the orientation of the fibers influences the mechanical strength only for materials with a fiber diameter of 1000 nm. The results further demonstrated that pericyte growth was improved on scaffolds with aligned fibers and the largest average fiber diameter (1000 nm) in the tested range.

In summary, by appropriately setting the SBS process parameters, scaffolds can be easily adapted to the cell requirements, which is of great importance in the production of complex 3D structures for guided tissue regeneration. Obtained results can be used for controlled design and production of scaffolds that act as a guide for the favorable regeneration of tissues. Materials with aligned fibers can be produced in tubular form as guiding scaffolds for vascular vessels regeneration.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.4c00051.

Figure S1, fiber deviation angle distributions, n = 150; Figure S2, materials thickness, AVR \pm SD, n = 90; Figure S3, representative SEM images of cross-sections of materials produced at collector rotation speeds of (A) 200 rpm, (B) 400 rpm, (C) 1 000 rpm, (D) 5000 rpm, (E) 10 000 rpm, (F) 15 000 rpm, (G) 20 000 rpm, and (H) 25 000 rpm at a magnification of 300×; Figure S4, fiber diameter distributions, n = 100 (PDF)

pubs.acs.org/journal/abseba

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Iwona Lopianiak – Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-645, Poland; Doctoral School of Warsaw University of Technology, Warsaw 00-661, Poland; Occid.org/0000-0002-3411-9793; Email: iwona.lopianiak.dokt@pw.edu.pl

Authors

- Aleksandra Kawecka Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-645, Poland
- Mehtap Civelek Section of Experimental Oncology und Nanomedicine (SEON), Else Kröner-Fresenius-Stiftung-Professorship, ENT-Department, Universitätsklinikum, Erlangen 91054, Germany
- Michał Wojasiński Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-645, Poland; orcid.org/0000-0001-6046-2061
- Iwona Cicha Section of Experimental Oncology und Nanomedicine (SEON), Else Kröner-Fresenius-Stiftung-Professorship, ENT-Department, Universitätsklinikum, Erlangen 91054, Germany; Orcid.org/0000-0002-7399-5307
- Tomasz Ciach Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-645, Poland; orcid.org/0000-0002-8726-8944
- Beata A. Butruk-Raszeja Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-645, Poland; orcid.org/0000-0002-2074-1944

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00051

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. I.E.: methodology, investigation, data analysis, writing—original draft, visualization; A. K.: investigation; M.C.: supervision; M. W.: conceptualization, supervision, methodology; I.C.: supervision, project administration, funding acquisition, writing—review and editing; T.C.: supervision, project administration, funding acquisition, writing—review and editing; B.B-R.: conceptualization, supervision, project administration, funding acquisition, writing—review and editing.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Science Centre, Poland (grant no. UMO-2020/39/I/ST5/01131), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation; grant no. CI 162/4–1), the National Centre for Research and Development, Poland (grant no. LIDER/18/ 0104/L-8/16/NCBR/2017), and Warsaw University of Technology in the frame of project Excellence Initiative Research University, Mobility PW V programme.

4397



REFERENCES

 Chan, B. P.; Leong, A. K. W. Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. *Eur. Spine J.* 2008, 17 (S4), 467–479.

(2) Tran, T.; Hamid, Z.; Cheong, K. Y. A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering: Aloe Vera Composites Characterization of Polyethylene-Starch Based Film at a Different Percentage of Crude Palm Oil And. J. Phys. Conf. Ser. 2018, 1082, 012080.

(3) Shimojo, A. A. M.; Rodrigues, I. C. P.; Perez, A. G. M.; Souto, E. M. B.; Gabriel, L. P.; Webster, T. Scaffolds for Tissue Engineering: A State-of- the- Art Review Concerning Types, Properties, Materials, Processing, and Characterization. *Racing Surf. Antimicrob. Interface Tissue Eng.* 2020, 647–676.

(4) Zhang, W.; Liu, Y.; Zhang, H. Extracellular Matrix: An Important Regulator of Cell Functions and Skeletal Muscle Development. *Cell Biosci.* 2021, 11 (1), 1–13.

(5) Rustad, K. C.; Sorkin, M.; Levi, B.; Longaker, M. T.; Gurtner, G. C. Strategies for Organ Level Tissue Engineering. Organogenesis 2010, 6 (3), 151–157.

(6) Yue, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. J. Glaucoma 2014, 23 (8), S20-S23.
(7) Eble, J.; Niland, S. The Extracellular Matrix of Blood Vessels.

(7) Eble, J.; Niland, S. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. Curr. Pharm. Des. 2009, 15 (12), 1385–1400.

(8) Xu, J.; Shi, G. P. Vascular Wall Extracellular Matrix Proteins and Vascular Diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1842, 2106–2119.

(9) Wagenseil, J. E.; Mecham, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol. Rev.* 2009, 89 (3), 957–989.

(10) Chaqour, B.; Karrasch, C. Eyeing the Extracellular Matrix in Vascular Development and Microvascular Diseases and Bridging the Divide between Vascular Mechanics and Function. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21 (10), 3487.

(11) Pashneh-Tala, S.; MacNeil, S.; Claeyssens, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft - Past, Present, and Future. *Tissue Eng.* -*Part B Rev.* 2016, 22 (1), 68–100.

(12) Kular, J. K.; Basu, S.; Sharma, R. I. The Extracellular Matrix: Structure, Composition, Age-Related Differences, Tools for Analysis and Applications for Tissue Engineering. J. Tissue Eng. 2014, 5, 204173141455711.

(13) Mazurek, R.; Dave, J. M.; Chandran, R. R.; Misra, A.; Sheikh, A. Q.; Greif, D. M. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Adv. Pharmacol.* **2017**, *78*, 323–350.

(14) Bergers, G.; Song, S. The Role of Pericytes in Blood-Vessel Formation and Maintenance. *Neuro. Oncol.* 2005, 7 (4), 452–464.

(15) Hattori, Y. The Multiple Roles of Pericytes in Vascular Formation and Microglial Functions in the Brain. *Life* 2022, 12 (11), 1835.

(16) Hellström, M.; Gerhardt, H.; Kalén, M.; Li, X.; Eriksson, U.; Wolburg, H.; Betsholtz, C. Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. J. Cell Biol. 2001, 153 (3), 543–553.

(17) Eltom, A.; Zhong, G.; Muhammad, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2019**, 2019, 1.

Adv. Mater. Sci. Eng. 2019, 2019, 1. (18) Hu, Z.-j.; Li, Z.-l.; Hu, L.-y.; He, W.; Liu, R.-m.; Qin, Y.-s.; Wang, S.-m. The in Vivo Performance of Small-Caliber Nanofibrous Polyurethane Vascular Grafts. BMC Cardiovasc. Disord. 2012, 12 (115), 1–11.

(19) Zhang, B.; Xu, Y.; Ma, S.; Wang, L.; Liu, C.; Xu, W.; Shi, J.; Qiao, W.; Yang, H. Small-Diameter Polyurethane Vascular Graft with High Strength and Excellent Compliance. J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2021, 121, 104614.

(20) Pimenta, F. A.; Carbonari, R. C.; Malmonge, S. M. Nanofibrous Tubular Scaffolds for Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts — Development Using SBS Fabrication Technique and Mechanical Performance. Res. Biomed. Eng. 2022, 38 (3), 797–811. (21) Carriles, J.; Nguewa, P.; González-Gaitano, G. Advances in

(21) Carriles, J.; Nguewa, P.; González-Gaitano, G. Advances in Biomedical Applications of Solution Blow Spinning. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24 (19), 14757. pubs.acs.org/journal/abseba

(22) Daristotle, J. L.; Behrens, A. M.; Sandler, A. D.; Kofinas, P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. ACS Appl. Mater. Interfaces **2016**, 8 (51), 34951– 34963.

(23) Gao, Y.; Zhang, J.; Su, Y.; Wang, H.; Wang, X. X.; Huang, L. P.; Yu, M.; Ramakrishna, S.; Long, Y. Z. Recent Progress and Challenges in Solution Blow Spinning. *Mater. Horizons* 2021, 8 (2), 426–446. (24) Lorente, M. A.; Corral, A.; González-Benito, I. PCL/Collagen

Blends Prepared by Solution Blow Spinning as Potential Materials for Skin Regeneration. J. Appl. Polym. Sci. 2021, 138, 21. (25) Kobuszewska, A.; Kolodziejek, D.; Wojasinski, M.; Jastrzebska,

(25) Robusterska, R., Robusters, D., Wojashish, M., Jacretoska, E., Ciach, T.; Brzozka, Z. Lab-on-a-Chip System Integrated with Nanofiber Mats Used as a Potential Tool to Study Cardiovascular Diseases (CVDs). Sensors Actuators, B Chem. 2021, 330, 129291.

(26) Łopianiak, I.; Wojasiński, M.; Kuźmińska, A.; Trzaskowska, P.; Butruk-Raszeja, B. A. The Effect of Surface Morphology on Endothelial and Smooth Muscle Cells Growth on Blow-Spun Fibrous Scaffolds. J. Biol. Eng. 2021, 15 (1), 1–17.

(27) Tutak, W.; Sarkar, S.; Lin-Gibson, S.; Farooque, T. M.; Jyotsnendu, G.; Wang, D.; Kohn, J.; Bolikal, D.; Simon, C. G. The Support of Bone Marrow Stromal Cell Differentiation by Airbrushed Nanofiber Scaffolds. *Biomaterials* 2013, 34 (10), 2389–2398.

(28) Łopianiak, I.; Rzempołuch, W.; Civelek, M.; Cicha, I.; Ciach, T.; Butruk-Raszeja, B. A. Multilayered Blow-Spun Vascular Prostheses with Luminal Surfaces in Nano/Micro Range: The Influence on Endothelial Cell and Platelet Adhesion. J. Biol. Eng. **2023**, *17* (1), 1– 17.

(29) Wojasiński, M.; Ciach, T. Solution Blow Spun Poly-L-Lactic Acid/Ceramic Fibrous Composites for Bone Implant Applications. *Chem. Process Eng.* 2021, 42 (3), 275–289.
(30) Dadol, G. C.; Kilic, A.; Tijing, L. D.; Lim, K. J. A.; Cabatingan,

(30) Dadol, G. C.; Kilic, A.; Tijing, L. D.; Lim, K. J. A.; Cabatingan, L. K.; Tan, N. P. B.; Stojanovska, E.; Polat, Y. Solution Blow Spinning (SBS) and SBS-Spun Nanofibers: Materials, Methods, and Applications. *Mater. Today Commun.* 2020, 25, 101656.

(31) Khan, K. R.; Hassan, M. N. Solution Blow Spinning (SBS): A Promising Spinning System for Submicron/Nanofi Bre Production. *Text. Leather Rev.* 2021, 4 (3), 181–200. (32) Lopianiak, I; Wojasiński, M.; Butruk-Raszeja, B. Properties of

(32) Łopianiak, I.; Wojasiński, M.; Butruk-Raszeja, B. Properties of Polyurethane Fibrous Materials Produced by Solution Blow Spinning. *Chem. Process Eng.* 2020, 41 (4), 267–276.

(33) Simbara, M. M. O.; Santos, A. R.; Andrade, A. J. P.; Malmonge, S. M. Comparative Study of Aligned and Nonaligned Poly(e-Caprolactone) Fibrous Scaffolds Prepared by Solution Blow Spinning. J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 2019, 107 (5), 1462– 1470.

(34) Łopianiak, I.; Butruk-Raszeja, B. A. Evaluation of Sterilization/ Disinfection Methods of Fibrous Polyurethane Scaffolds Designed for Tissue Engineering Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8092.

(35) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. Nat. Methods 2012, 9 (7), 676-682.

(36) Padsalgikar, A. D. Speciality Plastics in Cardiovascular Applications. In Plastics in Medical Devices for Cardiovascular Applications; Elsevier, 2017; pp 53–82.

(37) Kanu, N. J.; Gupta, E.; Vates, U. K.; Singh, G. K. Electrospinning Process Parameters Optimization for Biofunctional Curcumin/Gelatin Nanofibers. *Mater. Res. Express* 2020, 7, 035022.
(38) Mhetre, H. V.; Krishnarao, K. Y.; Naik, N. Optimization of Electrospinning Process Parameters to Develop the Smallest ZnO + PVP Nanofibres Using Taguchi Experimental Design and ANOVA. *J. Mater. Sci. Mater.* 2023, 34 (20), 1–15.

(39) Haider, A.; Haider, S.; Kang, I. K. A Comprehensive Review Summarizing the Effect of Electrospinning Parameters and Potential Applications of Nanofibers in Biomedical and Biotechnology. *Arab. J. Chem.* 2018, 11 (8), 1165–1188.

4398



(40) Someswararao, M. V.; Dubey, R. S.; Subbarao, P. S. V.; Singh,
S. Electrospinning Process Parameters Dependent Investigation of TiO2 Nanofibers. *Results Phys.* 2018, 11, 223-231.
(41) Al-Okaidy, H. S.; Waisi, B. I. The Effect of Electrospinning

(41) Al-Okaidy, H. S.; Waisi, B. I. The Effect of Electrospinning Parameters on Morphological and Mechanical Properties of PAN-Based Nanofibers Membrane. *Baghdad Sci. J.* 2023, 20 (4), 1433– 1441.

(42) Lorente, M.; González-Gaitano, G.; Valero, M.; González-Benito, J. Solution Blow Spun Poly(Ethylene Oxide)/Poly-e-Caprolactone System: Properties and Dissolution in Water. ACS Appl. Polym. Mater. 2023, 5, 6562-6573.

Appl. Polym. Mater. 2023, 5, 6562–6573.
(43) González-Benito, J.; Lorente, M. A.; Olmos, D.; Kramar, A. Solution Blow Spinning to Prepare Preferred Oriented Poly(Ethylene Oxide) Submicrometric Fibers. *Fibers* 2023, 11 (79), 79.

Oxide) Submicrometric Fibers Fibers 2023, 11 (79), 79. (44) Sinha-Ray, S.; Sinha-Ray, S.; Yarin, A. L.; Pourdeyhimi, B. Theoretical and Experimental Investigation of Physical Mechanisms Responsible for Polymer Nanofiber Formation in Solution Blowing. Polymer (Guildf). 2015, 56, 452–463.

(45) Yarin, A. L.; Pourdeyhimi, B.; Ramakrishna, S. Fundamentals and Applications of Micro- and Nanofibers; Cambridge University Press, 2014.

(46) Czarnecka, K.; Wojasiński, M.; Ciach, T.; Sajkiewicz, P. Solution Blow Spinning of Polycaprolactone—Rheological Determination of Spinnability and the Effect of Processing Conditions on Fiber Diameter and Alignment. *Mater. 2021, Vol. 14, Page 1463* 2021, *14* (6), 1463.

(47) Bosworth, L. A.; Gibb, A.; Downes, S. Gamma Irradiation of Electrospun Poly (e -Caprolactone) Fibers Affects Material Properties but Not Cell Response. *J Polym Sci B Polym Phys* **2012**, 50, 870–876.

but Not Cell Response. J Polym Sci B Polym Phys 2012, 50, 870–876. (48) Abruzzo, A.; Fiorica, C.; Palumbo, V. D.; Altomare, R.; Damiano, G.; Gioviale, M. C.; Tomasello, G.; Licciardi, M.; Palumbo, F. S.; Giammona, G.; Lo Monte, A. I. Using Polymeric Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. Int. J. Polym. Sci. 2014, 2014, 1.

(49) Faturechi, R.; Hashemi, A.; Abolfathi, N.; Solouk, A. Mechanical Guidelines on the Properties of Human Healthy Arteries in the Design and Fabrication of Vascular Grafts: Experimental Tests and Quasi-Linear Viscoelastic Model. Acta Bioeng. Biomech. 2019, 21 (3), 13–21.

(50) Stekelenburg, M.; Rutten, M. C. M.; Snoeckx, L. H. E. H.; Baaijens, F. P. T. Dynamic Straining Combined with Fibrin Gel Cell Seeding Improves Strength of Tissue-Engineered Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng. - Part A* 2009, 15 (5), 1081–1089.

(51) Declercq, H. A.; Desmet, T.; Dubruel, P.; Cornelissen, M. J. The Role of Scaffold Architecture and Composition on the Bone Formation by Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng. - Part A* 2014, 20 (1–2), 434–444.

(52) Devillard, C. D.; Marquette, C. A. Vascular Tissue Engineering: Challenges and Requirements for an Ideal Large Scale Blood Vessel. Front. Bioeng. Biotechnol. 2021, 9, 721843.

(53) Davidson, C. D.; Mideksas, F. S.; DePalma, S. J.; Kamen, J. L.; Wang, W. Y.; Jayco, D. K. P.; Wieger, M. E.; Baker, B. M. Mechanical Intercellular Communication via Matrix-Borne Cell Force Transmission During Vascular Network Formation. Adv. Sci. 2024, 11 (3), 2306210.

(54) Fee, T.; Surianarayanan, S.; Downs, C.; Zhou, Y.; Berry, J. Nanofiber Alignment Regulates NIH3T3 Cell Orientation and Cytoskeletal Gene Expression on Electrospun PCL+Gelatin Nanofibers. PLoS One 2016, 11 (5), No. e0154806.

fibers. PLoS One 2016, 11 (5), No. e0154806. (55) Chi, J.; Wang, M.; Chen, J.; Hu, L.; Chen, Z.; Backman, L. J.; Zhang, W. Topographic Orientation of Scaffolds for Tissue Regeneration: Recent Advances in Biomaterial Design and Applications. Biomimetics 2022, 7 (3), 131.

https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00051 ACS Biomater. Sci. Eng. 2024, 10, 4388-4399

Article

pubs.acs.org/journal/abseba

Characterization of blow-spun polyurethane scaffolds – influence of fiber alignment and fiber diameter on pericyte growth

Iwona Lopianiak^{1,2,*}, Aleksandra Kawecka¹, Mehtap Civelek³, Michał Wojasiński¹, Iwona Cicha³, Tomasz Ciach¹, Beata A, Butruk-Raszeja¹

¹ Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

² Doctoral School of Warsaw University of Technology, Plac Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland

³ Section of Experimental Oncology und Nanomedicine (SEON), Else Kröner-Fresenius-Stiftung-Professorship, ENT-Department, Universitätsklinikum, GluckstraBe 10a, 91054 Erlangen, Germany

*Corresponding author email adress: iwona.lopianiak.dokt@pw.edu.pl

AUTHOR INFORMATION

*Corresponding Author

Iwona Łopianiak – Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland, iwona.lopianiak.dokt@pw.edu.pl

Authors

Aleksandra Kawecka – Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

Mehtap Civelek – Section of Experimental Oncology und Nanomedicine (SEON), Else Kröner-Fresenius-Stiftung-Professorship, ENT-Department, Universitätsklinikum Erlangen, Glueckstraβe 10a, D-91054 Erlangen, Germany

Michał Wojasiński – Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

Iwona Cicha – Section of Experimental Oncology und Nanomedicine (SEON), Else Kröner-Fresenius-Stiftung-Professorship, ENT-Department, Universitätsklinikum Erlangen, Glueckstraβe 10a, D-91054 Erlangen, Germany

Tomasz Ciach – Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

Beata A. Butruk-Raszeja – Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Figures



Figure S1 Fiber deviation angle distributions, n=150



Figure S2 Materials thickness, AVR \pm SD, n=90



Figure S3 Representative SEM images of cross-sections of materials produced at collector rotation speeds of (A) 200 rpm, (B) 400 rpm, (C) 1 000 rpm, (D) 5 000 rpm, (E)10 000 rpm, (F) 15 000 rpm, (G) 20 000 rpm, and (H) 25 000 rpm at a magnification of x300.


Figure S4 Fiber diameter distributions, n=100

S7

Publikacja P4

<u>Łopianiak I.</u>, Wojasiński M., Kuźmińska A., Trzaskowska P.A., Butruk-Raszeja B.A. (2021). *The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds*. Journal of Biological Engineering, 15(27).

DOI: <u>10.1186/s13036-021-00278-1</u>

IF (2021) =6,248 Punktacja MNiSW (2025) = 140 CiteScore = 9,000

Wkład w wykonanie badań:

- Współtworzenie metodyki analiz biologicznych: analizy adhezji komórkowej i testów cytotoksyczności;
- Wykonanie hodowli komórek śródbłonka na powierzchni biomateriałów i przeprowadzenie: barwienia komórek, obserwacji mikroskopowych, testów cytotoksyczności (testy AlamarBlue oraz LDH);
- Opracowanie danych z przeprowadzonych badań (wyznaczenie liczby komórek/mm2, wyznaczenie % powierzchni zajętej przez komórki, wyznaczenie żywotności).

Wkład w przygotowanie publikacji:

- Autorka rozdziału Introduction i współautorka rozdziału Materials and Methods;
- Analiza i opracowywanie wyników dotyczących badań komórkowych wraz z Promotorem;
- Przygotowywanie wykresów wraz z Promotorem.

Lopianiak et al. Journal of Biological Engineering https://doi.org/10.1186/s13036-021-00278-1

(2021) 15:27

Journal of Biological Engineering





The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds



Iwona Łopianiak¹, Michał Wojasiński¹, Aleksandra Kuźmińska¹, Paulina Trzaskowska² and Beata A. Butruk-Raszeja^{1*}

Abstract

This study aimed to analyze the growth of two types of blood vessel building cells: endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs) on surfaces with different morphology. Two types of materials, differing in morphology, were produced by the solution blow spinning technique. One-layer materials consisted of one fibrous layer, resulting in two different surfaces. Bi-layer materials consisted of one fibrous-solid layer and one fibrous layer, resulting in two different surfaces. Additionally, materials with different average fiber diameters (about 200, 500, and 900 nm) were produced for each group. It has been shown that it is possible to obtain structures with a given morphology by changing the selected process parameters (working distance and polymer solution concentration). Both morphology (solid versus fibrous) and average fiber diameter (submicron fibers versus microfibers) of scaffolds influenced the growth of ECs. However, this effect was only visible after an extended period of culture (6 days). In the case of SMCs, it was proved that the best growth of SMCs is obtained for micron fibers (with an average diameter close to 900 nm) compared to the submicron fibers (with an average diameter below 900 nm).

Keywords: One-layer vascular graft, Bi-layer vascular graft, Solution blow spinning, Polyurethane, Endothelial cells, Smooth muscle cells

Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs), classified as civilization diseases, are currently the major cause of death globally [1]. Among them, coronary heart disease and peripheral arterial disease are the most common and dangerous for human life [2]. In advanced stages, these diseases lead to heart attacks or strokes caused by the complete clogging of the blood vessels. Coronary artery bypass grafting is one of the treatment methods of advanced ischemic heart disease. Patients' autologous blood vessels (e.g., saphenous veins) are currently the most frequently used as bypasses [3, 4]. However, in many cases, the poor

* Correspondence: Beata.Raszeja@pw.edu.pl ¹Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland Full list of author information is available at the end of the article

l list of author information is available at the end of the art

condition of the patient's vein makes it impossible to use for transplant. Moreover, there are problems with the long-term patency of the transplanted blood vessel, which necessitates the need for further surgical interventions [5, 6]. The low availability of autologous blood vessels and problems after implantation generate the need to look for other solutions to save patients' health and life [7]. An alternative solution is synthetic polymer prostheses that imitate the structure, functions, and properties (mechanical and morphological) of native vessels [8, 9]. Meaning that prostheses' porous structure and appropriate mechanical properties should provide proper conditions for cells to infiltrate the prosthesis, proliferate and grow [10, 11].

Two types of cells: endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs), build native blood vessels. Mimicking the blood vessel layered structure is an essential



© The Author(s), 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons (lence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, wish thtp://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/ applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

aspect during vascular prostheses designing. The inner layer should promote the formation of the endothelium, enable oxygen and nutrients transport, and prevent the migration of cells through this layer. In contrast, the outer layer should allow the migration of SMCs inside the prosthesis structure [12].

Previous studies show that among the numerous factors determining the proper development and activity of cells, one of the most important is the surface morphology. In the case of fibrous materials, the fiber diameter and the pore size seem to be crucial. According to the results presented by other authors, fibers with diameters <1 um are optimal for endothelial cells' growth. Ju et al. showed that endothelial cells growing on nanofibers (approx. fiber diameter = 270 nm) presented numerous actin fibers and formed stronger focal adhesion contacts than those growing on microfibers [12]. Similar results were presented by others [13]. The diameter of the fibers also influences the development of SMCs. It has been shown that increasing fiber diameter reduced SMC proliferation and increased SMC infiltration [14]. In turn, studies have shown that reducing the diameter of the fibers accelerates the proliferation and maturation of SMCs [15]. Finally, pore size is crucial parameter during neotissue formation[16]. The answer to these diverse needs is the creation of layered prosthesis in which the properties of the inner and outer layers are different, in order to better support the development of a specific type of cells.

Work by Goins et al. review techniques used in the production of layered vascular prostheses [17]. Techniques for fabrication of layered prosthesis are mainly based on electrospinning (ES) [18-21]. In addition, various processes combining ES and other techniques have been proposed: melt electrowriting [22], knitting [23], phase separation [24]. Compared to ES, solution blow spinning (SBS) technique is distinguished by several advantages, i.e. a simpler system, not requiring the use of electric voltage, and higher production efficiency, which is especially important in the case of multi-layer structures production with a thickness of up to several hundred micrometers. So far, it has been proposed to modify the internal prosthesis by applying the blow spun fibers [25]. Also, layered prosthesis produced by SBS combined with dip spinning [26] were produced.

In this paper, one- and bi-layer fibrous materials with different fiber diameters were fabricated using only one technique - SBS. In contrast to the above-mentioned works, based on ES or mixed techniques, we propose a simple SBS-based process that allows to control the critical parameters of the manufactured prosthesis, i.e. the average diameter of the fibers, the number and thickness of layers in the prosthesis' wall. Obtaining the appropriate product is possible thanks to the change of basic process parameters, i.e. working distance, concentration of the polymer solution. The presented technology is the subject of a patent. Medical-grade polyurethane was used as a polymer of choice, due to its relatively high hemocompatibility.

Three groups of materials differing in average fiber diameter (about 200, 500 and 900 nm) and two groups of materials with different structures (one-layer and bilayer) were produced. One-layer (1L) scaffolds consisted of one fibrous layer. Bi-layer (2L) scaffolds consisted of one fibrous-solid layer and one fibrous layer. After characterizing the physical and mechanical properties of the obtained structures, the influence of surface morphology on the growth of ECs and SMCs was examined. ECs were seeded on the surface marked as inner (IS, collector side). The opposite surface, labeled as the outer (OS), served as the surface for SMCs growth. The analysis of cell growth allowed for selecting the most favorable surfaces for the growth of both types of cells, which will allow for the appropriate design of the structure of the blow-spun vascular prosthesis.

The main goal of this study was to analyze the various morphological types of surfaces obtained with the SBS technique. In particular, we focused on the influence of morphology on the growth of ECs and SMCs. The presumed result was the selection of materials that present high coverage of ECs and high infiltration of SMCs. The selected surfaces will enable further, more detailed work, i.e. cell cultures in flow, analysis of specific cell activity markers.

Materials and methods Scaffold fabrication

Polyurethane (ChronoFlex C75A, AdvanSource Biomaterials) nano/microfibrous materials in the form of cylindrical scaffolds were produced in the SBS process, described in detail elsewhere [27]. Here, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (>99.0%, TCI Chemicals) was used as a solvent. Polymer solutions were prepared overnight in concentrations of 2, 4, and 5% w/w. To produce nano/ microfibrous materials, each polyurethane solution was supplied through the inner nozzle of the concentric nozzles system in the SBS apparatus with a constant flow rate of 30 ml/h. Simultaneously, the airstream was supplied through the outer nozzle of the SBS nozzles system with a pressure of 0.1 MPa. Fibers were produced by shear-drag elongation of the polymer solution by the stream of air on the distance between the nozzles system and the surface of the collector (working distance). Nano/microfibrous materials were prepared as one-layer materials and bi-layer materials. One-layer scaffolds were produced using a 30 cm working distance. Bi-layer scaffolds were produced by changing working distance during the process. The first layer was produced using a

Page 3 of 17

10 cm working distance and by blowing 20% of the total polymer solution volume. The second laver was produced using a 30 cm working distance and by blowing 80% of the total polymer solution volume. The volume of polymer solution for the scaffold production was adjusted to fabricate cylindrical scaffolds with wall thickness in the range from 300 to 500 µm. Detailed process parameters are presented in Table 1. The rotating cylinder (cylinder diameter: 3 mm, length: 120 mm, rotational speed: 3 000 rpm) was used as a collector. Cylindrical samples were pulled off the collector and kept in ventilated containers overnight to ensure complete solvent evaporation. For microscopic analyzes and cell culture, cylindrical samples were cut open and flattened. The inner surface of the cylinder (from the collector side) was marked as IS, while the opposite outer surface was marked as OS.

Scaffold characterization

Fiber diameter, pore size

Rectangular samples were subjected to scanning electron microscopy (SEM, Phenom G1, PhenomWorld). Samples were coated with a 15 nm layer of gold/palladium alloy (80/20 at%) using a sputter coater (K550 Emitech, Quorum Technologies). Ten randomly selected spots were photographed with 5000x magnification, and the images were used for fiber diameter and pore size measurements. All measurements were performed using Fiji software [28]. Results are presented as fiber size distributions (n = 100), mean fiber diameter, standard deviation, minimum and maximum fiber diameter. Pore sizes were measured using the same images, and mean pore size (n = 100) \pm standard deviation is reported. Microscopic analysis was performed for both surfaces of cylindrical scaffolds (OS and IS).

Surface wettability

Materials in the form of cylinders were cut open to obtain flat mats. Both the inner (IS) and outer (OS) surfaces were subjected to wettability analysis. Samples were glued to a glass slide, and a drop of distilled water (5 μ l) was placed on a clean and dry surface. The contact angle was measured automatically using Kruss DSA 100 software; the measurement was performed in at least 10 randomly selected spots on analyzed material. Each material variant was tested in triplicate (n = 30).

Porosity

The porosity of all types of polyurethane cylindrical scaffolds was measured using the gravimetric method, described in detail elsewhere [29]. In general, the thickness of each sample (n = 25) was measured based on the SEM images of scaffolds cross-section (n = 5), and then the volume of the sample (V_s) was calculated (inner diameter of the scaffold was 3 mm). Each sample (n = 5) was weighted (m_s), and the apparent density (ρ_{app}) for all samples was calculated using the following equation: $\rho_{app} = m_s \cdot V_s^{-1}$ [g/cm³]. Then, the scaffold porosity (ε , n = 5) was calculated using the following equation: $\varepsilon = 1 - \rho_{app} - \rho_p^{-1}$, where $\rho_p -$ polyurethane density (1.2 g/cm³) [30].

Mechanical properties

Cylindrical samples (3 mm inner diameter, 70 mm length) of fibrous scaffolding materials underwent a uniaxial stretching test according to protocols established based on ASTM standards (Designation: D 882-02 and D 638-02a). The experiment was conducted using an Instron 3345 model with pneumatic jaws within 50 mm of each other. The 10 mm long tips of samples were placed in the pneumatic jaws of the testing machine, so that the central part of the sample (50 mm length) was stretched with crosshead speed 5 mm \cdot min⁻¹ at room

 Table 1
 Parameters of the SBS process applied during material fabrication. The numbers in brackets correspond to the volumes of polymer solution used to produce the first and the second layer in bi-layer scaffolds

Sample	Polymer solution concentration [% w/w]	Number of layers [-]	Polymer solution volume (1st layer/ 2nd layer) [ml]	Working distance (1st layer/2nd layer) [cm]
C75A_1L_ 200	2	1	20	30
C75A_1L_ 500	4	1	5	
C75A_1L_ 900	5	1	5	
C75A_2L_ 200	2	2	20 (4/16)	10/30
C75A_2L_ 500	4	2	5 (1/4)	
C75A_2L_ 900	5	2	5 (1/4)	

temperature and humidity. Load-strain curves were recorded, as were the maximum load and strain at rupture. It is emphasized that according to porosity measurements and SEM images, only a fraction of each sample thickness is occupied with fibers $(1-\varepsilon)$, which implies that the applied load is supported by only such a fraction of the sample's thickness. This effect was accounted for in the data processing for maximum stress calculation. For each type of scaffold, results of Young's modulus, elongation at break, and tensile strength are presented as mean values \pm standard deviation (n = 5).

Cell culture

All materials before culture were placed in a 1% v/v antibiotic/antimycotic solution (100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate, and 0.25 µg/ml amphotericin B) diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h at 4 °C for sterilization. Then, scaffolds were washed three times with sterile deionized water on a roller for 5 min each time.

ECs (ATCC) were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere using MCDB-131 medium with phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum (ATCC), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), 10 mM L-glutamine (Gibco), 1 μ g/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich) and 10 ng/ml endothelial growth factor (Life Technologies).

SMCs (Lonza) were cultured in an incubator (37 °C, 5% CO_2 humidified atmosphere). Cells were grown in Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (PromoCell), supplemented with fetal calf serum (0.05 ml/ml), epidermal growth factor (0.5 mg/ml), basic fibroblast growth factor (2 mg/ml), insulin (5 µg/ml).

Sterile scaffolds were placed in the 24-well plates, mounted with inserts, and incubated with medium for 1 h at 37 °C. Cells (ECs or SMCs) were harvested, seeded on the material at the seeding density of $1 \times$ 10^5 cells/ml, and cultured at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cultures with different types of cells were carried out on different surfaces of the scaffolds (Fig. 1). ECs were cultured on the inner surface of scaffolds (IS), whereas SMCs were cultured on the outer surface (OS).

Cell viability

ECs viability was tested using alamarBlueTM assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Cells were seeded on materials' surfaces as described above. Cells cultured in wells with no material (seeding density = 1×10^5 cells/ml) were used as a control for viability calculation. After 1 d and 7 d of



culture, the medium was removed from wells, and 500 µl of alamarBlueTM working solution (alamarBlueTM reagent 10x diluted in fresh DMEM without phenol red) was added (500 µl/well). Materials were incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (protected from light). Following incubation, 100 µl of alamarBlueTM solution was transferred in triplicate to a 96-well plate (black), and fluorescence (Ex. = 550 nm, Em. = 590 nm) was measured. Samples were washed with PBS (3x, 5 min on a plate shaker), incubated with fresh DMEM, and used for further viability measurements. Viability results are presented as the percentage of positive control according to the equation:

where:

FI sample – fluorescence intensity of the sample after "n" days of culture,

FI control - fluorescence intensity of the control after 1 day of culture.

LDH release

LDH release during ECs culture was evaluated using CyQUANTTM LDH Cytotoxicity assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's setup. ECs were seeded on the materials as described above. After 1 d, 3 d, and 7 d of culture, 50 μ l MCDB-1 medium from over the material was transferred to 96-well plate triplicate, and LDH reagent (Substrate Mix) was added. After 30 min of incubation at room temperature, stop solution was added, and absorbance (490 nm and 680 nm) was measured. The medium was changed 24 h before the test each time. The LDH release was calculated as a percentage of LDH released from control, according to the equation:

where:

Abs sample – absorbance of the sample after "n" days of culture,

Abs control - absorbance of the control after 1 day of culture.

Collagen secretion

Collagen I alpha 1 ELISA Kit (ab210966, Abcam) was used to measure collagen secretion during SMCs culture. SMCs were seeded as described above. On the given day of culture (D1, D5, D7, D10, D14), the medium was collected from the materials, centrifuged at 2000 x g for 10 min, and diluted 1: 4 with Sample Diluent. Solutions were stored at -20 °C until samples from all time points were collected. The test was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 μ l of the sample and 50 μ l of the Antibody Cocktail were added to a well of a 96-well plate and incubated for 1 h at RT. After this time, each well was washed 3 × 350 μ l 1X Wash Buffer. Then 100 μ l of TMB Development Solution was added to each well, incubated in the dark for 10 min. Finally, 100 μ l of Stop Solution was added to each well, and the plate was shaken for 1 min. Absorbance was measured at 450 nm. The amount of released collagen was calculated based on the standard curve equation prepared from the standards provided in

Cell adhesion

the kit.

The number of surface-adhered cells was calculated using a confocal microscope (LSM 880, Zeiss) equipped with ZEISS ZEN software (Zen 2). After a given time of culture, samples were washed with PBS (4x, 5 min on a plate shaker) and fixed with 4% w/v paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, 500 µl/well). Plates were incubated at 4 °C for 24 h and washed with PBS (3x, 5 min on a plate shaker). Then cells were permeabilized by adding 500 µl/well of 0.2% Triton X-100 for 8 min. Materials were washed with PBS (4x, 5 min on a plate shaker). Next, materials were incubated with AlexaFluor 488 (300 µl/well, Thermo-Fisher Scientific) for 1 h in the dark, washed with PBS (4x, 5 min on a plate shaker), and incubated with 300nM DAPI (300 µl/well, ThermoFisher Scientific) at room temperature for 6 min in the dark. Finally, samples were washed with PBS (4x, 5 min on a plate shaker), placed on microscope slides with a drop of glue (ProLong Diamond Antifade Mountant, Invitrogen), covered with cover slides and observed using the confocal microscope. Cell nuclei were stained with DAPI dye. Images in magnification 20x were taken for each type of sample (n = 6). Cell number per mm² and cell coverage (calculated as the ratio of the area occupied by the cells to the area of the sample) were counted using Fiji software [28] based on the number of visible nuclei (cell number) or area of actin-stained cells (cell coverage). SMCs infiltration was calculated from CLSM images using Zeiss software and z-stacking function.

Statistical analysis

Statistical significance of differences was analyzed using single-factor analysis of variance (ANOVA) for p < 0.05 with post hoc Tukey's test (OriginPRO 2020b).

Results Scaffold characterization Morphology

Figure 1 summarizes the idea of the study. All materials were obtained in the form of cylindrical scaffolds in which the inner (collector side, IS) and outer (OS) surfaces were distinguished. Cells were grown on different sides of the scaffold surfaces, depending on the cells analyzed: ECs on the inner surface and SMCs on the outer surface. ECs were cultured on six types of material, differing in morphology (one-layer and bi-layer) and an average fiber diameter (designated as C75A_1L_200, C75A_1L_500 and C75A_1L_900, C75A_2L_200, C75A_ 2L_500 and C75A_2L_900). As the outer surface (OS) for 1L- and 2L-type materials were produced in the same way, SMCs were cultured only on three types of material differing in average fiber diameter (designated as C75A_200, C75A_500, and C75A_900).

Materials were made in two morphological variants: a one-layer (1L) and a bi-layer (2L) and Table 2 lists the material variants analyzed in the study. A homogeneous fibrous structure in cross-section characterized 1L-type materials - both surfaces (IS and OS) consisted of fibers of similar morphology. A structure variety in crosssection characterized 2L-type materials - the outer layer (OS) was made of fibers, while the inner surface (IS) was made of mixed fibrous and solid areas. Bi-layer scaffolds were obtained in one two-step SBS process. It was possible thanks to the use of the variable nozzle-collector working distance: shorter (10 cm) during the production of the first laver and longer (30 cm) during the production of the second laver. Additionally, three different polymer concentrations were used to obtain three different size groups of fibers within each material group. The concentrations of polymer were selected to obtain fibers with an average diameter in the range of 200-300 nm (1L_200, 2L_200), 500-600 nm (1L_500, 2 L_500), and 900-1000 nm (1L_900, 2L_900).

Figures 2 and 3 show the morphology of 1L-type and 2L-type materials. It was possible to produce fibers in the assumed diameter ranges: 200-300 nm for a polymer concentration of 2% w/w, 500-600 nm for a

Table 2 Material variants analyzed in the study

concentration of 4% w/w, and 900-1000 nm for a concentration of 5% w/w. In the case of 1L-type materials, the inner surface was characterized by the presence of local defects in the form of solid, non-fibrous areas. The number of such defects was higher on materials made from the lowest polymer concentration (C75A_1L_200). The number of defects on the outer surface of the materials was much smaller. Figure 2 also shows a crosssection of the obtained materials. It can be noticed that the materials show a homogeneous fibrous structure along the cross-section, while local defects in the form of solid areas appear on the inner surface. In the case of 2L materials (Fig. 3), the inner surface mostly showed a solid structure (film), with local areas composed of fibers with the average diameters depending on the polymer concentration used in the process. The outer surface was made of fibers, and it appears to have the same structure as both surfaces in the case of 1L-type materials. SEM images of the cross-sections show a change in the structure along the cross-section - on the inner surface, there is a thin layer of solid film, then the material changes into a fibrous structure. For both types of scaffolds (1L and 2L), the material thickness is similar, and it remains in the 300 - 500 µm range.

Figure 4A presents histograms of fiber diameter distribution. As expected, the average fiber diameter increases as the polymer solution concentration increases. Also, the average fiber diameter obtained for the different polymer solution concentrations was statistically different (p < 0.001). For one-layer structures, these values are respectively: 232 ± 89 nm (C75A_1L_200), 524 ± 15 nm (C75A_1L_500) and 936 ± 302 nm (C75A_5_1L_900). The average fiber diameters obtained for bi-layer structures are similar: 245 ± 90 nm (C75A_2L_200), 572 ± 140 nm (C75A_2L_500), 987 ± 287 nm (C75A_2L_900). No statistically significant differences were found between the average fiber diameter for analogous materials from the 1L- and 2L-type group.

As the polymer solution concentration increases, the values of minimum (d_{min}) and maximum (d_{max}) diameter also increases. Narrow diameter distributions were obtained from the polymer solution with the lowest concentration (2% w/w). This result was obtained for both,

Sample	Polymer solution concentration [% w/w]	Number of layers [-]	Inner surface (IS)	Outer surface (OS)
C75A_1L_200	2	1	fibers	fibers
C75A_1L_500	4	1	fibers	fibers
C75A_1L_900	5	1	fibers	fibers
C75A_2L_200	2	2	film/fibers	fibers
C75A_2L_500	4	2	film/fibers	fibers
C75A_2L_900	5	2	film/fibers	fibers

Page 7 of 17



one-layer and bi-layer structure. d_{min} values were respectively 97 nm (C75A_1L_200) and 81 nm (C75A_2L_200). d_{max} values were 493 nm (C75A_1L_200) and 636 nm (C75A_2L_200) respectively. Samples obtained from a 4% w/w polymer solution were characterized by a wider range of fiber diameters. d_{min} values were 158 nm (C75A_1L_500) and 310 nm (C75A_2L_500). d_{max} values were 1133 nm (C75A_1L_500) and 1054 nm (C75A_2L_500). The widest diameter distribution was obtained for the material obtained from a 5% w/w polymer solution. d_{min} values were 434 nm (C75A_1L_900) and 399 nm (C75A_2L_900). d_{max} values were 1705 nm (C75A_1L_900) and 1829 nm (C75A_2L_900).

Figure 4B presents pore size distribution. There were no significant differences between one- and bi-layer structures. As expected, the average pore size increases as the average fiber diameter increases, however only for the group with the lowest average fiber diameter, the average pore size was significantly different from other groups (p < 0.001). For materials with an average fiber diameter of about 200 nm, the average pore size was approximately 2 μ m (C75A_1L_200: 2.2 \pm 0.9 μ m, C75A_2L_200: 2.2 \pm 0.7 μ m). For these materials, the minimum pore size

was slightly above 1 μ m (C75A_1L_200: 1.1 μ m, C75A_2L_200: 1.1 μ m). The maximum pore size was less than 10 μ m (C75A_1L_200: 6.6 μ m, C75A_2L_200: 4.8 μ m). For materials with average fiber diameter in the 500-600 nm range, the average pore size was approximately 5 μ m (C75A_1L_500: 4.8 \pm 2.5 μ m, C75A_2L_500: 4.6 \pm 1.9 μ m). The minimum pore size was above 1 μ m (C75A_1L_500: 1.3 μ m, C75A_2L_500: 1.7 μ m).

The maximum pore size has exceeded the value of 10 μ m (C75A_1L_500: 12.0 μ m, C75A_2L_500: 10.0 μ m). Similar pore size values were obtained for materials with the highest average fiber diameter (900-1000 nm). The average pore size or those materials was also approximately 5 μ m (C75A_1L_900: 5.2 ± 2.4 μ m, C75A_2L_900: 5.4 ± 2.6 μ m). The minimum pore size was slightly above 1 μ m (C75A_1L_900: 1.0 μ m, C75A_2L_900: 1.3 μ m). The maximum pore size exceeded the value of 10 μ m (C75A_1L_900: 13.6 μ m, C75A_2L_900: 12.7 μ m).

Surface wettability

The results of water contact angle (WCA) measurement are shown in Table 3. All analyzed surfaces were hydrophobic (WCA>90°).

Page 8 of 17



The outer surface (OS) showed similar wettability values for all tested variants (above 120°). There were no statistically significant differences in the WCA values for analogous materials from the 1L- and 2L-type groups. This was expected since the outer surface is produced in the same way in both groups. There was no relationship between the value of WCA and the average diameter of the fibers building the surface - similar values were obtained for both surfaces composed of micron and submicron fibers.

In the inner surface (IS) case, higher WCA values were obtained for 1L-type scaffolds than the 2L-type. However, the differences were not statistically significant (p > 0.05).

For each analyzed material, the WCA values obtained for IS were lower than those obtained for OS.

Mechanical properties

The results of mechanical properties analysis are shown in Fig. 4. Materials were analyzed in the form of cylinders with an inner diameter of 3 mm. It has been shown that both the morphology type and fiber diameter affect the mechanical properties of the materials. In both cases, 1L-type and 2L-type materials, the Young's modulus (Fig. 4C) value decreased with an increase of average fiber diameter. The highest Young's modulus value was obtained for materials composed of fibers with the lowest diameter (1.8 \pm 0.3 MPa for C75A_1L_200, 1.9 \pm 0.2 MPa for C75A_2L_200). The values were statistically significantly different (p < 0.05) from the values obtained for other materials.

An inverse relationship was observed for the elongation at break values (Fig. 4D). Higher values were obtained for materials with higher average fiber diameter. Comparison of 1L-type and 2L-type materials shows that in most cases, values of elongation are higher for 1Ltype materials. The exceptions are materials with the smallest average fiber diameter (C75A_200), where this relationship was inverse. The elongation values are about 300% for materials with average fiber diameter in the 500-1000 nm range and about 150% for materials with average fiber diameter in the 200-300 nm range.

A similar relationship presented itself for the tensile strength values (Fig. 4E). The values increased with the increase in the fiber's average diameter. This relationship was observed in both the 1L- and 2L-type groups. The highest values were obtained for materials composed of micron fibers (3.5 ± 0.3 MPa for C75A_1L_900, 3.1 ± 0.4 MPa for C75A_2L_900). There were no statistically significant



differences in the tensile strength values between the analogous materials from the 1L- and 2L-type groups.

Endothelial cells growth

Endothelial cells viability

ECs viability (Fig. 5A) after 1 day of culture on scaffolds' inner surface (IS) was similar for all types of analyzed

samples. The viability values ranged from 66% (C75A_ 2L_900) to 78% (C75A_2L_200). No relationship between surface morphology and the viability of the cells was observed.

After 7 days of culture, cell viability for most tested materials increased compared to the 1 day of culture. Only for C75A_2L_200, the viability decreased. The

Table 3 Water contact angle values measured for inner (IS) and outer (OS) surfaces of the materials. MV \pm SD, n = 30

Sample	OS water contact angle [°]	IS water contact angle [°]					
C75A_1L_200	122 ±2	109±3					
C75A_1L_500	127±4	121±3					
C75A_1L_900	130±3	120±6					
C75A_2L_200	123±4	91±5					
C75A_2L_500	121±7	100±4					
C75A_2L_900	125±3	109±14					

viability values were in the range from 68% (C75A_2L_ 500) to 89% (C75A_2L_200).

After 1 day of culture, the amount of LDH released by cells growing on materials was lower than the amount of LDH released by the control (Fig. 5B). The lowest values were obtained for the 1L-type materials. The percentage of LDH release was in the range of 60-80%. In the case of 2L-type materials, this ratio was >80%.



After 7 days of culture, the amount of released LDH was on a similar level for all 1L-type materials, and the values were slightly below 100%. For the 2L-type materials, the LDH release was, in most cases, smaller; however, the differences were not statistically significant (p > 0.05).

Endothelial cells adhesion

Figure 6 shows ECs growing on the inner surface (IS) of the analyzed materials after 1, 3, and 6 days of culture. The number of cells per mm^2 and cell coverage are shown in Fig. 7.

After 1 day of culture, all analyzed materials presented surface-adhered cells with normal morphology. Cell growth was homogeneous - there were no areas with significantly fewer or more cells noticed. In the case of 1L-type materials, the number of cells per mm² decreased with the increase of the average fiber diameter and was: 364 ± 103 cells/mm² for C75A_ 1L_200, 290 ± 63 cells/mm² for C75A_1L_500 and 233 ± 188 cells/mm² for C75A_1L_900 respectively. The same relationship was observed for 2L-type materials. The number of cells per mm² was: 431 ± 86 cells/mm² for C75A_2L_200, 290 ± 139 cells/mm² for C75A_2L_500, and 227 ± 193 cells/mm² for C75A_ 2L_900 respectively. Again, the differences between the individual material variants were not statistically significant (p > 0.05). The values of cell coverage were similar for all tested surface variants and were smaller than 0.2. In the case of 1L-type materials, they were 0.19 ± 0.05, 0.19 ± 0.02, 0.14 ± 0.03 respectively for C75A_1L_200, C75A_1L_500, and C75A_1L_900. For 2L-type materials, the cell coverage was similar: 0.19 \pm 0.05, 0.18 \pm 0.06, 0.16 \pm 0.03 for C75A_2L_200, C75A_2L_500, and C75A_2L_900 respectively.

After 3 days of culture, the number of cells per mm² increased for all materials. On 1L-type materials, there was a decrease in the number of cells and the cell coverage with the increase in the average fiber diameter clearly visible. The number of cells per mm² was: 757 ± 131 cells/mm², 580 ± 169 cells/mm², 497 $\pm~258~cells/mm^2$ corresponding to C75A_1L_200, C75A_1L_500, and C75A_1L_900. The cell coverage was respectively: 0.48 \pm 0.04, 0.37 \pm 0.09, and 0.27 \pm 0.12 for C75A_1L_200, C75A_1L_500, and C75A_1L_ 900. The relationship was different for 2L-type materials. The number of cells per mm² was similar for all three types of materials and amounted to: 600 ± 313 cells/mm², 617 ± 289 cells/mm², 603 ± 439 cells/ mm², respectively for C75A_2L_200, C75A_2L_500, and C75A_2L_900. The values of cell coverage were also similar for all materials but showed great differentiation - there were areas with a large number of cells as well as areas without them. The values of cell coverage were slightly below 0.5 and amounted to: 0.48 \pm 0.26, 0.49 \pm 0.28, and 0.38 \pm 0.20 for C75A_2L_200, C75A_2L_500, and C75A_2L_900, respectively.

After 6 days of culture, the differences in cell growth on individual materials were clearly visible. The highest cell coverage was obtained on the surfaces C75A_2L_200 (0.57 \pm 0.15) and C75A_2L_500 (0.66 \pm 0.09). Microscopic observations confirmed uniform cell growth on these surfaces. On 1L-type surfaces, the decrease in cell number and cell coverage with the increase of average fiber diameter was still maintained. The values of the number of cells per mm² were: 804 \pm 208 cells/mm², 744 \pm 147 cells/mm², 585 \pm 158 cells/mm² for C75A_1L_200, C75A_1L_500, and C75A_1L_900, respectively. The cell coverage was: 0.46 \pm 0.13, 0.37 \pm 0.07, and 0.27 \pm 0.07 for C75A_1L_200, C75A_1L_500, and C75A_1L_900, respectively.

Smooth muscle cells growth

Smooth muscle cells adhesion and infiltration

Figure 8 shows SMCs growing on the outer surface (OS) of the analyzed materials after 7 days of culture. The number of cells per mm² and cell coverage are shown in Fig. 5C and D. As the outer surface (OS) for 1L- and 2L-type materials were produced in the same way, SMC culture was performed only for materials differing in average fiber diameter (designated as C75A_200, C75A_500, and C75A_900).

Analysis of SMCs growth on the materials' outer surface (OS) after 7 days of culture showed a significantly higher number of cells on the C75A_900 materials. The number of cells per mm² was: 691 ± 270 cells/mm², 422 ± 104 cells/mm² and 1172 ± 61 cells/mm² for C75A_200, C75A_500, and C75A_900, respectively. The cell coverage values were: 0.19 ± 0.10, 0.10 ± 0.02, and 0.39 ± 0.17 for C75A_200, C75A_500, and C75A_900, respectively.

Figure 5E shows infiltration depth after 1 and 7 days of culture. Both after 1 and 7 days of culture, the infiltration depth was significantly higher for the C75A_900 material and amounted to 133 \pm 15 μm and 148 \pm 16 μm after 1 and 7 days of culture, respectively. For each of the tested materials, the infiltration depth after 7 days of culture was greater than the value achieved after 1 day.

Collagen secretion

The analysis of collagen secretion during the 14-day culture showed that during the first 10 days, the amount of secreted collagen increased for all analyzed material variants (Fig. 5F). On the 14th day of culture, the amount of

Page 12 of 17





collagen decreased compared to day 10. On individual days, the differences between the material variants were minor and, in most cases, were not statistically significant. Only on the first day of culture, statistically significantly higher (p <0.05) collagen secretion was obtained on the C75A_500 material (2.82 ± 0.08 ng/ml) vs. C75A_200 (1.72 ± 0.02 ng/ml). In the case of all analyzed materials, the highest values of secreted collagen were achieved on the 10th day of culture, and they were: 3.84 ± 0.08 ng/ml, 3.76 ± 0.67 ng/ml, and 3.98 ± 0.11

ng/ml, respectively, for C75A_200, C75A_500, and C75A_900.

Discussion

The presented work aimed to determine the influence of the structure of fibrous scaffolds on the growth of two types of cells building blood vessels: ECs and SMCs. The materials were produced by the SBS technique using a medical-grade polyurethane solution. Design of the production process aimed at fabrication of one-layered and



bi-layered cylindrical scaffolds in one process, advantageous to other – two-step approaches [31, 32]. The produced materials in the form of cylinders were cut open, and two surfaces were separately analyzed. The growth of ECs was analyzed on the inner (collector side) surface, whereas the SMCs growth was analyzed on the outer surface.

Two types of material were prepared, differing in the morphology of the inner surface and the cross-section structure. The first type were fibrous materials of homogenous cross-section structure, designated as onelayer (1L). Scaffolds were produced with a constant nozzle-collector working distance of 30 cm. The second type of materials presented variable structure. The inner surface consisted of non-fibrous (solid) areas and fibrous areas. Such a structure was obtained by reducing the nozzle-collector working distance (10 cm) during the production of the first inner layer. The second, fibrous outer layer, was produced with an increased nozzlecollector distance (30 cm). In this way, materials of variable structure, designated as bi-layer (2L), were obtained. Within each type, 3 groups of materials were produced, differing in the range of fiber and pore size. The first group obtained from the 2% w/w polymer solution was characterized by an average fiber diameter in the range of 200-300 nm and average pore size of approximately 2 µm. The second group obtained from the 4% w/w solution was characterized by an average fiber diameter in the range of 500-600 nm and average pore size of approximately 5 μ m. The third group obtained from a 5% w/w solution was characterized by an average fiber diameter in the range of 900-1000 nm and average pore size of approximately 5 µm. This evident influence of polymer solution concentration on fiber size and, consequently, on pore size was expected, as previously reported in the body of research concerning the solution blow spinning process [33-36]. Dependence of average

fiber diameter on polymer concentration in solution allowed for the design of scaffolds for this study.

The culture of ECs was carried out for a week with observations after 1, 3, and 6 days of culture. The results showed that cell growth was similar on all types of materials after the first day of culture, regardless of the morphology. The fraction of the area occupied by the cells was approximately 0.2. After 3 days of culture, the number of cells on all materials increased, which confirmed the proper cell growth. There was also variation in the surface area occupied by cells depending on the type of material. In the group of 1L-type materials, a decrease in the number of cells was observed, along with an increase in the average fiber diameter. The same relationship was observed for the cell coverage. However, in the group of 2L-type materials, there was no difference in the number and cell coverage depending on the average diameter of the fibers. What is more, it was observed that the growth of cells was uneven - large standard deviations characterized both tested parameters. Microscopic analysis showed that the cells were mainly growing on fiber-free areas composed of a solid polymer film. The fibrous areas were characterized by a much smaller number of cells. After 6 days of culture on 1L-type materials, the relationship mentioned earlier was maintained - both the mean number of cells and the cell coverage increased as the average diameter of the fibers decreased. Greater differentiation appeared in the group of 2L-type materials. Statistically significant differences were obtained in both the number of cells and the cell coverage. The highest values were obtained for materials with average fiber diameter in the range of 200-300 nm and 500-600 nm. For these materials, the values of cell coverage exceeded 0.6. For 2L-type materials with the largest average fiber diameter (900-1000 nm range), the smallest cell coverage (approximately 0.2) was observed.

In the case of SMCs, the growth on the surface marked as outer was analyzed. It was assumed that this surface should be fibrous to promote SMCs infiltration and blood vessel formation. Therefore, in the case of the outer surface, mixed structures composed of solid and fibrous areas were not analyzed. As in the case of ECs, the growth of SMCs was investigated on surfaces with an average fiber diameter ranging from 200 to 300 nm, 500-600 nm, and 900-1000 nm. The results clearly indicated that the best growth after 7 days of culture was obtained on the fibers with the largest diameters studied (900-1000 nm). The highest cell infiltration depth was also obtained for these materials, which can be attributed to the largest pore sizes among tested materials. At the same time, there were no significant differences in the amount of collagen secreted by SMCs growing on fibers of different diameters.

The study showed that the morphology of the materials significantly influences the rate of monolayer formation by ECs. The study aimed to select the inner surface of cylindrical blow spun scaffolds to obtain a fast rate of endothelial monolayer formation. In particular, the research aimed to compare one-layer structures made of fibers alone with bi-layer structures made of fibrous and solid areas.

Many studies show that cell growth is strongly dependent on the surface roughness, and in the case of fibrous materials, on the average diameter of the fibers. The nature of this relation depends on the type of cells. In the case of ECs growing on the surface of vascular prostheses, the main goal is to increase adhesion and create a monolayer on the prosthesis surface without the cells infiltrating the material. It has been shown that the increase of roughness at the nanoscale promotes adhesion of ECs [37]. A similar study was carried out for polylactide materials, which showed better growth of ECs on solid surfaces than fibrous ones [38]. Xu et al. suggests that the best solution in the case of vascular prostheses may be mixed structures created by combining solvent casting and electrospinning techniques. Most studies suggest better adhesion of ECs to nanofibers compared to microfibers. However, there are studies indicating the opposite relationship [39].

In the case of SMCs growth, many studies show that better growth is achieved on surfaces with higher roughness and larger average fiber diameter. Ju et al. showed that SMCs need fibers with an average diameter > 1 μ m for proper development and infiltration [12]. Han et al. showed that increasing the fiber diameter increases the infiltration of SMCs but reduces their proliferation [14].

It is worth mentioning that the morphology, particularly the roughness and the size of the fibers, also has a significant impact on the adhesion of blood components, particularly platelets [40], which is of crucial importance in the case of vascular prostheses. That is why it is essential to select the appropriate morphology in the design of modern, biocompatible vascular prostheses. The presented results clearly indicate that in the case of fibrous vascular prostheses, multilayer structures composed of fibers of various sizes and solid non-fibrous areas are a promising solution. We proved that the best growth of SMCs is obtained for micron fibers (with an average diameter in the 900-1000 nm range) compared to the submicron fibers (with an average diameter below 900 nm). In the case of ECs, it seems that mixed structures composed of fibrous and solid areas are the best solution. Therefore, the best solution is a prosthesis consisting of a microfiber outer layer and a mixed inner layer containing fibrous and solid areas. Such a mixed, multilayer structure can be obtained using the SBS technique by appropriate selection of the process parameters (concentration of the polymer solution, working distance of the nozzle-collector). The solid regions promote the adhesion of ECs and accelerate the formation of the monolaver. On the other hand, the outer surface composed of micron fibers promotes the growth and infiltration of the SMCs.

Conclusions

Fibrous structures with different morphology were obtained using SBS technique. The materials differed in the average diameter of the fibers and the number of layers. The study investigated the effect of surface morphology on the growth of ECs and SMCs. In the case of ECs, we compared cell growth on fibrous surfaces (1L-type) with different average fiber diameters and mixed surfaces (2L-type) composed of solid and fibrous areas. ECs showed a higher cell coverage on mixed surfaces. These differences between surfaces became clearly visible after 6 days of culture. In the case of SMCs, better growth was shown on micron fibers compared to submicron fibers.

Abbreviations

EC: Endothelial cells, ES - electrospinning; IS: Inner surface; OS: Outer surface; SBS: Solution blow spinning; SMC: Smooth muscle cells

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

LŁ, A.K, P.T: methodology, investigation, writing—review & editing, M.W.: conceptualization, methodology, investigation, writing—review & editing, B.B-R: conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, resources, writing—original draft, visualization, supervision, project administration, funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The research was funded by the National Centre for Research and Development in Project Contract No. LIDER/18/0104/L-8/16/NCBR/2017. Availability of data and materials ease contact author for data requests

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable

Consent for publication Not applicable

Competing interests authors declare that they have no competing interests.

Author details

Laboratory of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warynskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland. ²Centre for Advanced Materials and Technologies CEZAMAT, Warsaw University of Technology, Poleczki 19, 02-822 Warsaw, Poland.

Received: 13 September 2021 Accepted: 14 November 2021 Published online: 19 December 2021

- Zoghbi WA, Duncan T, Antman E, Barbosa M, Champagne B, Chen D, et al. Sustainable development goals and the future of cardiovascular health: a statement from the global cardiovascular disease taskforce. J Am Coll Cardiol 2014:64(13):1385-7
- Williamson MR, Black R, Kielty C. PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells. Biomaterials. 2006;27(19): 3608-16.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR. Inter society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC 3. II), J Vasc Surg. 2007;45:55–67. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeyssens F. The tissue-engineered vascula
- 4 rasimeen aa a, makeen a, caeysen an the associating meeted vascual graft - past, present, and future. Tissue Eng - Part B Rev. 2016;22(1):68–100. McKenna KA, Hinds MT, Sarao RC, Wu PC, Maslen CL, Glanville RW, et al.
- 5. Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials. Acta Biomater. 2012;8(1):225–33.
- Wise SG, Byrom MJ, Waterhouse A, Bannon PG, Ng MKC, Weiss AS. A 6. multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft
- with tailored mechanical properties. Acta Biomater. 2011;7(1):295-303 Abruzzo A, Florica C, Palumbo VD, Altomare R, Damiano G, Gioviale MC, et al. Using polymeric scaffolds for vascular tissue engineering. Int J Polym 7
- Sci. 2014. https://doi.org/10.1155/2014/689390. Rustad KC, Sorkin M, Levi B, Longaker MT, Gurtner GC. Strategies for organ 8.
- level tissue engineering. Organogenesis. 2010;6:151–7. De Mel A, Murad F, Seifalian AM. Nitric oxide: a guardian for vascular grafts? 9. Chem Rev. 2011;111(9):5742-67.
- Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. Nat Mater. 2005; 10. 4(7):518-24.
- Wang W, Nie W, Zhou X, Feng W, Chen L, Zhang Q, et al. Fabrication of heterogeneous porous bilayered nanofibrous vascular grafts by two-step 11.
- heterogeneous porous bioyeer chanolocitus vascular grans by two-step phase separation rechnique. Acta Biomater. 2018;79:168–81. Ju YM, Choi JS, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ, Bilayered scaffold for engineering cellularized biodo vessels. Biomaterials. 2010;31(15):4313–21. Available from: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010;2002. Singh R, Etitler D, Morelle R, Friedrich RP, Dietel B, Alexiou C, et al. 12.
- 13. Optimization of cell seeding on electrospun PCL-silk fibroin scatfolds. Eur Polym J. 2020;134: 109838. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109838
- Han DG, Ahn CB, Lee JH, Hwang Y, Kim JH, Park KY, et al. Optimization of electrospun poly(caprolactone) fiber diameter for vascular scaffolds to 14. maximize smooth muscle cell infiltration and phenotype modulation Polymers. 2019;11(4):643. https://doi.org/10.3390/polym11040643.
- Forymers, 2019;11(9):060-5, https://doi.org/10.309/p0iyim10-060-5. Reid JA, McConald A, Callanan A, Electrospun fibre diameter and its effects on vascular smooth muscle cells. J Mater Sci Mater Med, 2021;32(10):131. https://doi.org/10.1007/s10856-021-06605-8. Matsuzaki Y, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang YC, Miyamoto S, Kelly J, et al. The effect of pore diameter on neo-tissue formation in electrospun 15.

biodegradable tissue-engineered arterial grafts in a large animal model. Acta Biomater. 2020;115:176-84.

- 17. Goins A. Webb AR. Allen JB. Multi-laver approaches to scaffold-based small diameter vessel engineering: a review. Mater Sci Eng C. 2019;97(November 2018):896-912.
- Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR, et al. 18. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. Acta Biomater, 2014;10(1):11-25. Available from: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2 013/08/022
- Elsayed Y, Lekakou C, Labeed F, Tomlins P. Fabrication and characterisation of biomimetic, electrospun gelatin fibre scaffolds for tunica media-19. equivalent, tissue engineered vascular grafts. Mater Sci Eng C. 2016;61:473– 83. Available from: https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.081.
- McClure MJ, Sell SA, Simpson DG, Walpoth BH, Bowlin GL. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using 20 polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study. Acta Biomater. 2010;6(7):2422-33. Available from: https://doi.org/10.1016/j.a ctbio.2009.12.029.
- 21. Ye L, Cao J, Chen L, Geng X, Zhang A-Y, Guo L-R, et al. The fabrication of double layer tubular vascular tissue engineering scaffold via coaxial electrospinning and its 3D cell coculture. J Biomed Mater Res A. 2015; 103(12):3863-71. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35531.
- Browning MB, Dempsey D, Guiza V, Becerra S, Rivera J, Russell B, et al. 22. Multilayer vascular grafts based on collagen-mimetic proteins. Acta Biomater, 2012;8(3):1010-21, Available from: https://doi.org/10.1016/j.a ctbio.2011.11.015.
- Zhang F, Xie Y, Celik H, Akkus O, Bernacki SH, King MW. Engineering small-caliber vascular grafts from collagen filaments and nanofibers with 23 comparable mechanical properties to native vessels. Biofabrication, 2019; 1(3):035020. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab15ce
- 24 Soletti L, Hong Y, Guan J, Stankus JJ, El-Kurdi MS, Wagner WR, et al. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. Acta Biomater. 2010;6(1):110–22. Available from: http://www. pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3200232&too pmcentrez&rendertype=abstract.
- François S, Chakfé N, Durand B, Laroche G. A poly(L-lactic acid) nanofibre mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses. Acta Biomater, 25. 2009;5(7):2418-28. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1 9345622.
- Akentjew TL, Terraza C, Suazo C, Maksimuck J, Wilkens CA, Vargas F, et al. Rapid fabrication of reinforced and cell-laden vascular grafts structurally 26 Inspired by human coronary arteries. Nat Commun. 2019;10(1):1–16. Available from: https://doi.org/10.1038/s41467-019-11090-3.
- Wojasiński M, Pilarek M, Ciach T. Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly[L-27 Lactic Acid) materials for biomedical engineering. Polish J Chem Technol 2014;16(2):43-50.
- Schindelin J, Arganda-carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, 28. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676-82. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.
- Tomecka E, Wojasinski M, Jastrzebska E, Chudy M, Clach T, Brzozka Z. Poly(Llactic acid) and polyurethane nanofibers fabricated by solution blow spinning as potential substrates for cardiac cell culture. Mater Sci Eng C. 2017;75:305–16.
- Eoplaniak I, Wojasiński M, Butruk-Raszeja B. Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning. Chem Process Eng. 30. 2020:41(4):267-76
- Mi HY, Jing X, Yu E, McNulty J, Peng XF, Turng LS. Fabrication of triple 31. layered vascular scaffolds by combining electrospinning, braiding, and thermally induced phase separation. Mater Lett. 2015;161:305–8. Available
- from: https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.08.119. Al Kayal T, Maniglio D, Bonani W, Losi P, Migliaresi C, Soldani G. A combined 32 method for bilayered vascular graft fabrication. J Mater Sci Mater Med. 2015; 26(2):96. https://doi.org/10.1007/s10856-015-5458-7. Yang Z, Peng H, Wang W, Liu T. Nano and submicrometric fibers of poly(D).-lactide) obtained by solution blow spinning: process and solution
- 33. blow spinning: process and solution variables. J Appl Polym Sci. 2010;116(5): 2658-67
- Da Silva Parize DD. De Oliveira JE. Foschini MM. Marconcini JM. Mattoso 34 LHC. Poly(lactic acid) fibers obtained by solution blow spinning: effect of a greener solvent on the fiber diameter. J Appl Polym Sci. 2016;133(18):1–10.

- Lou H, Li W, Li C, Wang X. Systematic investigation on parameters of solution blown micro/nanofibers using response surface methodology based on box-Behnken design: J Appl Polym Sci. 2013;130(2):1383–91.
 Czarmecka K, Wojasński M, Clach T, Sajkëwicz P. Solution blow spinning of polycaprolactone-rheological determination of spinnability and the effect of processing conditions on fiber diameter and alignment. Materials. 2021; 14(6):1463. https://doi.org/10.3390/mai14061463.
 Chung TW, Liu DZ, Wang SY, Wang SS. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. Biomaterials. 2003;24(25):4655–61.
 Xu C, Yuon F, Wang S. Pamakrishna S. In vitro study of human vascular.

- Biomaterials. 2003;24(25):4655–61.
 Xu C, Yang F, Wang S, Ramakrishna S. In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. J Biomed Mater Res Part A. 2004;71(1):154–61.
 Rüder C, Sauter T, Kratz K, Haase T, Peter J, Jung F, et al. Influence of fibre diameter and orientation of electrospun copolyetheresterurethanes on smooth muscle and endothelial cell behaviour. Clin Hemorheol Microcirc. 2013;65:1612–27
- 2013;55(4):513–22. 40. Milleret V, Hefti T, Hall H, Vogel V, Eberli D. Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. Acta Biomater. 2012;8(12):4349–56. Available from: https://doi.org/10.1016/j.a ctbio.2012.07.032.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- · gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations maximum visibility for your research: over 100M website views per year
- At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Publikacja P5

<u>Lopianiak I.</u>, Rzempołuch W., Civelek M., Cicha I., Ciach T., Butruk-Raszeja B.A. (2023). *Multilayered blow-spun vascular prostheses with luminal surfaces in Nano/Micro range: the influence on endothelial cell and platelet adhesion*. Journal of Biological Engineering, 17(20), 1-17.

DOI: <u>10.1186/s13036-023-00337-9</u>

IF (2023) = 5,7 Punktacja MNiSW (2025) = 140 CiteScore (2023) = 11,500

Wkład w wykonanie badań:

- Opracowanie koncepcji budowy i metody wytwarzania dwóch rodzajów warstwowych protez naczyń krwionośnych spełniających założone kryteria;
- Wytworzenie i zbadanie właściwości protez (właściwości mechaniczne, ocena właściwości struktury, testy szczelności i ocena podatności na rozwarstwianie, analiza mikroskopowa);
- Przeprowadzenie badań hemolizy;
- Opracowanie danych z przeprowadzonych badań;
- Analiza uzyskanych wyników wraz z analizą statystyczną;
- Część badań (opracowanie metodyki wytworzenia protez) wykonana w ramach projektu "Hemozgodność struktur nano/mikrowłóknistych", na który samodzielnie pozyskałam finansowanie i którym kierowałam.

Wkład w przygotowanie publikacji:

- Opracowanie koncepcji manuskryptu wraz z Promotorem;
- Przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu wraz z Promotorem;
- Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz manuskryptu po recenzjach wraz z Promotorem;
- Autorka wszystkich wykresów;
- Współautorka koncepcji wszystkich rysunków.

Lopianiak et al. Journal of Biological Engineering (2023) 17:20 36-023-00337-9

RESEARCH

Journal of Biological Engineering

Open Access

Multilayered blow-spun vascular prostheses with luminal surfaces in Nano/Micro range: the influence on endothelial cell and platelet adhesion

Iwona Łopianiak^{1,2}, Wiktoria Rzempołuch¹, Mehtap Civelek³, Iwona Cicha³, Tomasz Ciach^{1,4} and Beata A. Butruk-Raszeja^{1*}

Abstract

Background In this study, two types of polyurethane-based cylindrical multilayered grafts with internal diameters ≤ 6 mm were produced by the solution blow spinning (SBS) method. The main aim was to create layered-wall prostheses differing in their luminal surface morphology. Changing the SBS process parameters, i.e. working distance, rotational speed, volume, and concentration of the polymer solution allowed to obtain structures with the required morphologies. The first type of prostheses, termed Nano, possessed nanofibrous luminal surface, and the second type, Micro, presented morphologically diverse luminal surface, with both solid and microfibrous areas.

Results The results of mechanical tests confirmed that designed prostheses had high flexibility (Young's modulus value of about 2.5 MPa) and good tensile strength (maximum axial load value of about 60 N), which meet the requirements for vascular prostheses. The influence of the luminal surface morphology on platelet adhesion and the attachment of endothelial cells was investigated. Both surfaces did not cause hemolysis in contact with blood, the percentage of platelet-occupied area for Nano and Micro surfaces was comparable to reference polytetrafluoroethylene (PTFE) surface. However, the change in morphology of surface-adhered platelets between Nano and Micro surfaces was visible, which might suggest differences in their activation level. Endothelial coverage after 1, 3, and 7 days of culture on flat samples (2D model) was higher on Nano prostheses as compared with Micro scaffolds. However, this effect was not seen in 3D culture, where cylindrical prostheses were colonized using magnetic seeding method.

Conclusions We conclude the produced scaffolds meet the material and mechanical requirements for vascular prostheses. However, changing the morphology without changing the chemical modification of the luminal surface is not sufficient to achieve the appropriate effectiveness of endothelialization in the 3D model.

Keywords Multilayered small-diameter vascular grafts, Hemocompatibility, Endothelial cells, Solution blow spinning, Nanofibers, Magnetic seeding

*Correspondence: Beata A. Butruk-Raszeja Beata.Raszeja@pw.edu.pl Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) were responsible for 32% of all deaths worldwide in 2019 [1]. In advanced stages of CVD, the only choice is the surgical intervention, in which damaged arteries are replaced with autologous vessels or synthetic prostheses. However, the clinical success of this procedure is limited by low availability of autologous blood vessels. Also, commercially available synthetic grafts made of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) or polyethylene terephthalate (PET) with diameters ≤ 6 mm frequently fail. The poor patency rate of synthetic prostheses [2–5] compels researchers to look for new approaches and solutions.

Although intimal hyperplasia or inflammatory complications may negatively affect the patency of the artificial vessels upon implantation, the main reason for prosthetic graft failure is occlusion caused by thrombosis [2-5]. In physiological conditions, the lumen of the blood vessel is covered with endothelial cells (ECs). which actively counteract the processes of platelet aggregation and blood coagulation through the synthesis and secretion of various bioactive substances e.g.: nitric oxide, heparan sulphate, prostacyclin [6]. In addition, intact endothelial monolayer inhibits the proliferation of smooth muscle cells (SMCs), limiting the risk of intimal hyperplasia. Implantation of synthetic grafts without this endothelium barrier may lead to surface protein adsorption followed by platelet adhesion, activation, and aggregation. Several strategies have been proposed towards quick endothelialization of prosthesis' luminal surface. One of them is in vitro endothelialization. i.e. colonization of the prosthesis with the patient's cells before the implantation procedure. Another approach, in situ endothelialization, is based on colonization with ECs in the patient's body, which is possible through transanastomotic growth, transmural infiltration, and endothelialization with endothelial progenitor cells circulating in bloodstream [7].

Regardless of the approach chosen, the surface of the prosthesis must enhance the adhesion and proliferation of ECs, to enable restoration of a functional endothelium and, as a result, to reduce clotting processes. The literature proposes various strategies to improve EC attachment. One of them is based on the modulation of the surface topography e.g. by adding nanostructures to the lumen surface. This strategy assumes that introduction of nanostructures, e.g. nanofibres, increases surface to volume ratio and provides more binding sites for cell adhesion and biomolecule adsorption [8].

The ideal small-diameter vascular grafts (with diameter ≤ 6 mm) should mimic the layered structure of the native blood vessels and exhibit comparable mechanical properties. This leads to the idea of a layered prosthesis, where the inner surface is designed to provide an environment and topography suitable for reconstructing the endothelial layer, whereas the outer layers are tailored to fulfill other, specific purposes, i.e. ensuring appropriate mechanical properties and suitable porosity to enable the ingrowth of capillaries. To date, electrospinning has been the most universal and popular method of manufacturing fibrous vascular prostheses [9]. This technique enables the production of prostheses containing both micro- and nanofibers, as well as layered prostheses containing fibers of various sizes [10]. Nonetheless, electrospinning has a number of limitations related to high voltage requirements, low production rate, and limited number of suitable solvents [11]. Our group has developed an alternative technique for fabrication of fibrous vascular prosthesis, namely the solution blow spinning (SBS) method [12, 13]. The SBS system is similar to the electrospinning system but does not require the presence of an electric field. The driving force of the process is the pressure of the working gas, which is fed to the nozzle together with polymer solution. The pressure forms fibers at the outlet of the nozzle and deposit them on the rotating collector. SBS has several advantages over electrospinning, including low cost, easiness to scale and control of the parameters, as well as no need for high voltage [14, 15].

Vascular grafts can be made of natural or synthetic polymers. Of the synthetic materials, PET or ePTFE were originally used. These materials are still the most commonly used in clinical practice for peripheral vessel replacement, but they have some disadvantages. Most importantly, their surface does not promote cell adhesion and they are quite resistant to chemical modifications. This is a significant disadvantage because the majority of synthetic polymers require surface modification in order to improve their biological properties. PUs are a chemically diverse group of polymers that are often studied in the context of biomedical applications. Heart valve, cartilage, skin, blood vessel and bone scaffolds have been successfully produced from PUs [16-23]. The versatility of PU-based scaffolds arises from material bio- and hemocompatibility, its easy processing, and appropriate mechanical properties [24]. Furthermore, the mechanical properties of PUs, including elasticity, strength, hardness, and resiliency, are easily controllable by changing the ratio of soft and hard segments. [25, 26]. Moreover, PUs present attractive biological properties probably due to the fact that urethane bond is similar to the peptide bond. Cells, including ECs, are able to adhere to the PU surface, even without the application of chemical modifications. This makes it possible to study the influence of the topography (fiber diameter etc.) on the cell-surface

interactions. In this study, medical grade Chrono-Flex PU was selected because of its reportedly high athrombogenicity.

In our previous study, we evaluated the influence of fibrous surface morphology on endothelial and smooth muscle cell (SMC) growth [27]. We have shown that both morphology (solid versus fibrous) and average fiber diameter (submicron fibers versus microfibers) of scaffolds influenced the growth of ECs. Here, we designed layered cylindrical prostheses that differ in the morphology of the luminal surface. The aim of the present work was to compare two types of prostheses with multilayered walls. The outer layer is made of aligned microfibers, with an average diameter of about 1000 µm, which are intended to support the SMCs development. The middle layer with total layer thickness of about 500 µm, containing nonaligned microfibers with an average diameter of about 1000 µm is expected to give the prosthesis adequate flexibility and mechanical strength. Finally, the internal laver is composed of dense microfibers presenting with two morphological types of luminal surface. This layer is designed to support the attachment of ECs by ensuring the appropriate topography, either a mixed solid/microfiber structure or a nanofiber structure. The prosthesis termed "Micro" has a luminal surface composed of solid areas (flat, film-like surfaces without fibrous structures) and microfibers, while in the prosthesis termed "Nano" the luminal surface is composed of nanofibers. Following the fabrication of the prostheses, their physical properties were characterized. Further, hemocompatibility of the distinct luminal morphologies was compared using human platelets, and two cell seeding models were used to evaluate the growth of ECs on Nano versus Micro surfaces.

Materials and methods

Vascular prostheses fabrication

Prostheses were produced from medical grade polyurethane solution by SBS method, as described elsewhere [12, 27]. Briefly, polyurethane ChronoFlex®C75A (Advanced Biomaterials, USA) was dissolved overnight in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (>99%Fluorochem Ltd, UK) on magnetic stirrer. The polymer solution was transferred into syringe and fed to the inner nozzle of concentric nozzle system. The polymer solution flow rate was controlled by syringe pump. The inner diameters of inner and outer nozzles were 1.1 and 10 mm, respectively. Fibers were collected on rotating collector, 6 mm in diameter and 12 cm in length, mounted 10-30 cm away from the tip of inner nozzle. Prior to the SBS process, the collector was covered with a thin laver of 10% w/v poly(ethylene) glycol 2000 (Sigma Aldrich, Germany) solution in distilled water in order to simplify removal of the prosthesis from the collector surface. After the prosthesis deposition and its immersion (together with the collector) in distilled water for 2 min, the prosthesis was gently slid off the collector. The slight shrinking of the prostheses after the removal resulted in a final inner diameter of 5 mm.

Two variants of layered prostheses were produced: (a) Nano and (b) Micro. As shown in Fig. 1A, Nano prosthesis consists of the following layers: nanofibers (luminal), dense microfibers, microfibers, and aligned microfibers (outermost). Micro prosthesis consists of the following layers: dense microfibers (luminal), microfibers, and aligned microfibers (outermost). The SBS process parameters used for producing individual layers are shown in Table 1.

Morphology of the prostheses

The prostheses were cut open and flat samples with dimensions 0.5×0.5 cm were glued to the SEM stubs with conductive carbon adhesive tape. Samples of internal (n=3) and external surfaces (n=3) were prepared. To characterize cross-sectional sample's morphology, samples of prostheses 0.5 cm in length (n=3 for each type) were glued upright to SEM stubs. The samples were then coated with 15 nm of gold using sputter coater (K550 Emitech, Quorum Technologies). Images of every sample (n=10) were taken at magnifications $\times 200, \times 600$, and $\times\,5000$ using scanning electron microscopy Phenom G1 (Phenom World). SEM images were used to determine fiber diameter, pore size, and prostheses thickness. To determine the percentage of fibrous area on the internal luminal surface of Micro prostheses, the percentage of fibrous surface was measured in n = 20 SEM images. In every sample, n = 100 fiber diameters were measured using Fiji software. For nanofibrous internal surface of Nano prostheses, pore size was determined using SEM images of luminal surface at magnification \times 5000. For this, the threshold tool (Fiji software) was used to delineate the most surface pores and the area of n = 100 pores was measured using Fiji software The pores were approximated to be circular in shape and the pore size (diameter) was determined using the circle area formula.

3D view of cylindrical structures was provided by a stereoscopic microscope Leica M205 C (Leica Microsystems GmbH).

Porosity was determined individually for every prosthesis. Two prosthesis ends, 1 cm in length were cut off and weighted on analytical lab scale. Afterward, the samples (n=2 for each prosthesis) were glued upright to SEM stubs and coated with 15 nm of gold as described above. SEM images (n=6) at magnification 200 × were taken, and n=30 wall thickness measurements were made for each sample to determine individual layers'



Fig. 1 A Layers arrangement in Nano and Micro prosthesis, (B) Cross section of Nano and Micro prosthesis' wall, (C) stereoscopic image of Nano and Micro prosthesis, (D) macroscopic image of prostheses (Nano and Micro mix)

 Table 1
 SBS process parameters applied for each layer in Nano and Micro prostheses. The layer that is present in a given prosthesis type is marked with "+", a layer that is absent is marked with "-"

Layer	Nano	Micro	Polymer conc. [% _{w/w}]	Solution vol. [ml]	Collector-nozzle tip distance [cm]	Collector rotational speed [rpm]	Solution flow rate [ml/h]	Air flow rate [MPa]
nanofibers	+		2	3	50	3 000	30	0.1
dense microfibers	+	+	5	6	10	3 000	30	0.1
microfibers	+	+	5	20	30	3 000	30	0.1
aligned microfibers	+	+	5	4	30	20 000	30	0.1

 polyurethane ChronoFlex®C75A, $\rho_p=1.2g/cm^3$ [28], S_s is a sample's side surface determined using formula $S_s=2\pi(r+\delta)L$, where r is a prosthesis inner

radius, r = 0.25 cm and L is a sample length L = 1 cm. The results are presented as mean value \pm SD.

Mechanical properties

Prostheses of 5 cm in length (n=5 for each type) were placed in the pneumatic jaws of the testing machine Instron 3345 equipped with 50 kN static load cell. Prostheses were stretched at the rate of 10 mm/min until the break. Dedicated Bluehill software automatically determined maximum load, elongation at break. Young's modulos, and ultimate tensile stress. The results are presented as a mean value \pm SD.

Leakage and delamination tests

The leakage test was carried out as follows: prostheses of 4 cm length (n-3) for each type) were mounted in a closed flow system connected to a peristaltic pump Zalipm PPIB-05A (Zalipm) and 0.9% NaCl solution was circulated in the system (through the prosthesis) for 1 h at a flow rate of 20 ml/min. During the test, samples were checked for any signs of leakage through the prostheses' walls. After the leakage test, prostheses were dried at 20 'C for 24 h. Then, the samples were glued to SEM stubs with conductive carbon adhesive tape and covered with 15 nm layer of gold. Materials cross-sections were analyzed using scanning electron microscopy Phenom G1.

The above-described flow system was also used to test the permeability of the prostheses' walls in contact with blood. Freshly drawn whole blood was connected to the flow system and the prostheses were perfused for 1 h at a flow rate of 20 ml/min. During that time, macroscopic observations were carried out to assess whether there is any blood leakage through the prosthesis' wall.

Additionally, a static delamination test was carried out. Prostheses of 1.5 cm length $(n = 3 \text{ for each type of pros$ theses and for each timepoint) were prepared and placedin 1.5 ml Eppendorf⁵⁶ test tubes fully filled with 0.9%NaCl solution. Test tubes were closed and placed in anincubator at 37 °C for 7, 14, or 30 days. After this time,the prostheses were dried at 20 °C for 24 h and investigated using scanning electron microscopy Phenom G1.

Hemocompatibility of materials

Blood tests were performed using fresh human blood from healthy volunteers. Blood was collected in 1.8 ml test tubes containing citrate (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA).

Static platelet adhesion

For static analysis, round shape samples (n=2 for each) type of material) were placed in 24-well plate with the luminal surface of the prosthesis facing up. In order to

stabilize and flatten the material, each sample was placed in CellCrown (Sigma Aldrich) inserts. Subsequently, $500\,\mu l$ of 0.9% NaCl solution in ultrapure water was added to wells with samples and plate was incubated at 37 $^\circ\mathrm{C}$ for 30 min. Then, NaCl solution was removed and 200 µl of platelet-rich plasma (PRP) was added to every well containing the samples. PRP was prepared using two "slow" centrifugations: 150 g for 14 min (first centrifugation) and 150 g for 12 min (second centrifugation). The platelet density in PRP was 1×10^6 platelets/µL. Plate with materials was incubated at 37 °C for 90 min. Next, PRP was removed, and samples were thoroughly rinsed with 0.9% NaCl to remove blood residues. Finally, samples were prepared for SEM analysis. Briefly, materials were incubated in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4 °C. Next, the samples were dehydrated by 10 min immersion steps in 50, 60, 70, 80, 90, and 100% ethanol solution (EtOH), and for 20 min in 1:2 hexamethyldisilazane:ethanol (HMDS:EtOH), 2:1 HDMS:EtOH and 100% HDMS solution. Finally, the samples were glued to SEM stubs with conductive carbon adhesive tape (luminal surface of prostheses up) and covered with 15 nm layer of gold. The % of platelet-coated area was counted from SEM images of every sample, taken at 3000 × magnification. Additionally, pictures at magn = $5000 \times$ were taken in order to present the morphology of surface-adhered platelets in detail. The platelet adhesion assay was done in triplicate, with change of blood donor each time. For every sample n = 10 SEM images were taken. The average values for all materials were calculated from 60 images (10 images $\times 3$ experiments \times 2 samples).

In this assay, PTFE was cut from vascular prosthesis (FlowLine Bipore, Jotec) and used as a reference material that induces low platelet adherence.

Hemolysis

Round samples with diameter of 14 mm (n=3 for each type of prosthesis) were placed in 48-well plate with the luminal surface of the prosthesis facing up. To separate erythrocytes from plasma, fresh blood was centrifuged at 700 g for 5 min and plasma was removed from blood tubes. Then, erythrocytes were diluted $20 \times in$ ultracold PBS and 500 µl of erythrocyte suspension was added to wells with materials. PBS was used as a negative control and 0.2% TritonX-100 as a positive control. Triplicate samples were placed on a shaker at 300 rpm for 1 h, at 37 °C. Afterward, 600 µl of solution from every well was centrifuged at 700 g for 1 min, and 200 µl of supernatant was transferred triplicate to 96-well plate. The absorbance at 540 nm was measured using a plate reader Epoch Biotek (Biokom).

Hemolysis rate was calculated using the following formula:

$$HR = \frac{A_S - A_{CN}}{A_{CP} - A_{CN}} * 100\%$$

where: A_S – sample absorbance, A_{CP} – mean positive control absorbance, C– mean negative control absorbance. Results are presented as mean hemolysis rate ± SD.

Endothelial cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from freshly collected umbilical cords (kindly provided by the Dept. of Gynaecology, University Hospital Erlangen) and grown in supplemented endothelial cell growth medium (EGM-2, Promo Cell, Germany). Accutase solution was used for cell harvesting. Cells from passages 1 or 2 were used in experiments. All experiments were repeated 3 times, in each experiment the material was used in duplicate. The use of human material was approved by the local ethics committee at the University Hospital Erlangen (review number 14-85_3-B from 01.02.2022).

Static cell seeding on flat materials - 2D model

Flat samples were cut off from cylindrical grafts, sterilized with 70% ethanol, washed with sterile PBS, and placed in 24 well cell culture inserts. Then, materials were seeded with HUVECs (5×10^4 cells/sample) and incubated at 37 °C for 1, 3, and 7 days. Culture media were changed 24 h after seeding and then every second day.

To analyze cell viability, Alamar Blue assay was performed according to manufacturer's protocol. Briefly, after 1, 3, or 7 days of cell culture, materials with cells growing on the surface were transferred to a new 24-well plate and gently washed with sterile PBS. Then Alamar Blue working solution was added to each well (500 μ l/ well) and incubated with samples at 37 °C for 18 h in the dark. The fluorescence of the Alamar Blue solution was measured at Ex./Em=550/590 nm using a plate reader (SpectraMax iD3, Molecular Devices).

Magnetic cell seeding on cylindrical prostheses – 3D model Cell seeding was also performed on cylindrical vascular prostheses. For this, all materials were cut to equal length of 5 cm. Samples were sterilized with 70% ethanol, washed with sterile PBS, and placed in transparent cell culture tubes. 1% agarose solution was used to fix the prostheses in a vertical position inside the cell culture tubes. Before cell seeding prostheses were preincubated

with EGM-2 medium for at least 1 h. HUVECs were seeded on the lumen of the prostheses using magnetic seeding technique. Cells were pre-incubated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in cell culture flasks for 24 h at 37 °C as described before [29]. After incubation, the SPION-loaded cells were harvested and counted. HUVECs were suspended in the culture media and transferred into the luminal space of each prosthesis (1×10^6 cells/prosthesis). Immediately after transferring the cell suspension, the scaffolds were exposed to a radially symmetric magnetic field for 15 min using the VascuZell endothelizer (Vascuzell Technologia S.L., Madrid, Spain). The cell culture tubes with prostheses were then carefully removed from the endothelizer and placed in the incubator for 1, 3, or 7 days. The culture medium was changed 24 h after seeding and then every second day.

Cell staining and image analysis

After the given cell culture period, cells growing on the lumen surface were fixed with 4% buffered paraformaldehyde (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in PBS. F-actin filaments were stained by Alexa488-phalloidin (Invitrogen, Thermo Fisher) and visualized using fluorescence microscope Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss, Jena, Germany) at $10 \times$ magnification. To observe cells growing inside cylindrical prostheses, the materials were cut along the longitudinal axis, pressed to the glass slides, and then visualized using multiple mode (2 × 5). Cell counting was performed using the ImageJ software (Fiji, version 1.47v).

Data analysis and statistical analysis

2D cell culture model and platelet adhesion assay

Cell coverage was calculated in 6 circular samples with a diameter of 11 mm (2 replicates \times 3 independent experiments). For each sample, at least 3 microscopic images (magnification = 10x) were taken in randomly selected places and the cell coverage was calculated for every image. The average coverage was then calculated for each sample and the resulting boxplot was based on these 6 average values for all 6 samples. A boxplot in a%-b% range indicates that in a given group of materials, there was at least one sample with a% coverage and at least one sample with b% coverage.

3D cell culture model

Cell coverage was calculated in 5 cylindrical samples (diameter 6 mm, length 5 cm) from 3 independent experiments). For each sample, at least 2 multi-tile scan microscopic images (magnification = 10x) were taken. Each "tile" represents the standard analysis area at $10 \times$ and the multi-tile scans covered the surface of 2 tiles (prosthesis circumference) \times 5 tiles (prosthesis length), corresponding to an area of approx. 1.3 mm \times 4.5 mm. For each sample, 2 multi-tile scans were performed and the results were averaged. Based on 5 averaged values for all 5 samples a boxplot was plotted in a%-b% range, indicating

that in a given group of materials, there was at least one sample with a% coverage and at least one sample with b% coverage.

The results of the other measurements (mechanical analysis, delamination assay, hemolysis) were presented as mean values \pm SD. Statistical significance of differences was analyzed using single-factor or two-factor analysis of variance (ANOVA) for p <0.05 with post-hoc Tukey's test (OriginPRO 2020b).

Results

Morphology of prostheses

In the first part of this study, we produced and compared two types of vascular prostheses. The wall of prostheses consisted of several layers, each of which should fulfill specific functions. A schematic diagram comparing the arrangement of layers in the respective types of prostheses is shown in Fig. 1A, while Fig. 1B shows SEM pictures of their wall cross-sections. Essentially, the two scaffold types differed by the presence of nanofibrous layer on the luminal side of the Nano prosthesis. Our earlier studies have shown that prostheses made only of microfibers are leaky. Therefore, we decided to include a layer of densely arranged microfibers in both types of prostheses. This layer, whose thickness was about 10% of the total wall thickness acted as a sealing. The thickness of this layer was selected as a result of our previous work (data not shown), and the prostheses' permeability was tested in a flow system using saline (see below). The next layer to the outside is a layer of loosely arranged microfibers, intended mainly to ensure appropriate mechanical properties of the prostheses (e.g., flexibility) and to achieve the desired wall thickness. This is the thickest layer of the graft, constituting about 80% of the total wall thickness. The thin outermost layer, representing about 10% of the total wall thickness consists of circumferentially aligned fibers and is designed to promote attachment of SMCs. Figure 1C and Fig. 1D show microscopic (stereoscopic microscopic appearance of both types of prostheses. The macroscopic appearance of both types of prostheses was similar.

The evaluation of fiber diameter on internal surfaces of both types of prostheses is presented in Fig. 2. Average fiber diameters of luminal surfaces of Nano and Micro prostheses were 262 ± 68 nm and 991 ± 251 nm, respectively. Additionally, pore size measurements were performed on the luminal surface of prostheses. Average size of pores was 2.5 ± 0.9 µm for Nano and 3.7 ± 1.7 µm for Micro scaffold. It must be noted that in Micro prosthesis, the fibrous areas covered only about 14% of luminal surface.

The described SBS process allowed to obtain prostheses with comparable properties, but with differing lumen topography. The luminal surface of Nano prostheses was characterized by nanofibers with single defects (beaded fibers) present on the surface (as indicated by the arrows in the Fig. 2B), while the luminal surface of Micro prostheses had a more heterogenous structure, including areas of smooth solid surface with pores and small fibrous areas with large, flattened fibers.

Mechanical properties of prostheses

As shown in Fig. 3A, the mechanical properties of Nano and Micro prostheses were similar. No significant



Fig. 2 A Fiber diameter distribution and (B) internal surface morphology (arrows indicate defects present on the surface) for internal surface of Nano and Micro prostheses



Fig. 3 A Mechanical properties of Nano and Micro prosthesis (n = 5), (B) Load-extension curve for Nano and Micro prostheses.^{***} indicates a change-point related to the rapture of the two outer microfiber layers, # indicates a change-point related to the rapture of the internal dense microfiber layer

differences regarding wall thickness were observed between the two types of prostheses. The total wall thickness was 698 ± 44 µm for Nano and 680 ± 45 µm for Micro scaffolds. The thickness of innermost nanolayer for Nano prostheses was 9 ± 2 µm, whereas the thickness of dense microfibers' layer was 88 ± 9 µm for Nano and 97 ± 12 µm for Micro.

In accordance with this, no significant differences were detected in mechanical properties of the prostheses. Both types presented elastic behavior with high elongation at break values. Porosity was similar and equaled $43 \pm 10\%$ for Nano and $40 \pm 8\%$ for Micro. Young's modulus values for Nano and Micro prostheses were 2.5 ± 0.2 MPa and 2.4 ± 0.1 MPa, respectively, while the respective maximum load values were 58.3 ± 3.8 N and 61.2 ± 3.2 N. Ultimate tensile stress for porous sample was 10.9 ± 1.8 MPa for Nano and 10.0 ± 0.8 MPa for Micro prostheses. Elongation at break value was lower for Nano ($407 \pm 46\%$) than for Micro prostheses (478 \pm 30%), but the difference was not statistically significant. Figure 3B shows a typical load-extension curve. The shape of the curve is similar for both types of prostheses. The first change-point (marked as "") in the curve is related to the rupture of the two outer microfibrous (aligned and non-aligned) layers of the prosthesis. The test ended when the remaining layer (dense microfibers) was ripped up (the second change-point marked as "#").

Prosthesis leakage and delamination test

During 1 h contact between Nano or Micro prostheses and 0.9% NaCl solution in flow system, no soaking or leakage was observed. No leakage was also observed during blood contact analysis in flow system. Additionally, no delamination of layers was observed either after 1 h contact with 0.9% NaCl solution in a flow system during dynamic delamination test, or after 30 days of incubation in 0.9% NaCl (static delamination test). Representative SEM images of Nano and Micro prostheses, showing their cross-sections after 30 days of static incubation in 0.9% NaCl solution, are presented in Fig. 4A. Crosssection SEM images of Nano and Micro prostheses after dynamic (1h) and static (7 and 14 days) analysis are presented in supplementary data. Figure 4B presents the results of wall thickness measurements before and after 7, 14, and 30 days of static delamination. No significant changes in wall thickness were observed, regardless of duration of the test and the type of prosthesis.

Biological evaluation

The detailed characterization of produced scaffolds demonstrated that Nano and Micro prostheses differ only in their luminal surface morphology. In the second part of this study, we, therefore, evaluated the influence of this structural difference on hemocompatibility and endothelial cell attachment to the produced scaffolds.

Platelet adhesion

The luminal surface of the materials after the platelet adhesion test is shown in Fig. 5A. The percentage of the platelet-occupied area is shown in Fig. 5B. The average values obtained for all tested materials were similar and no statistically significant differences were detected (p>0.05 for all pairs). However, SEM images pointed to the differences in the morphology of the adherent platelets. On the Nano surfaces, platelet aggregates formed strongly flattened structures. There was a relatively large variation in platelet coverage between samples, ranging from 1 to 19% and the average value of platelet coverage was 8.6 %. In the case of Micro materials, a different morphology of the adhered platelets was observed. The cells formed relatively large aggregates, which had a spherical, rounded form. Highly flattened aggregates were rare. The variation in platelet coverage values between the samples was similar to Nano, in the range of 2-17% and the average value of platelet coverage was 6.2%. The average platelet coverage values for both types of prostheses were close to those observed on the surface of PTFE (7.0%). In the case of PTFE, the adherent platelets formed highly flattened layer and no spherical aggregates were observed.

Hemolysis

The results presented in Table 2 demonstrated that hemolysis rate upon blood contact with Nano or Micro prostheses was < 1%. The produced prostheses thus do not cause blood hemolysis.

Endothelial cell culture

Static seeding on flat materials - 2D model

The results of cell culture on flat samples (the 2D model) are shown in Fig. 6. Microscopic analysis showed that the cells showed the correct morphology and adhered to the surface of the fibers (Fig. 6A). Starting from the first day of culture (D1) a higher percentage of cell-covered area (Fig. 6B) was detected on Nano surfaces, but the differences were not statistically significant. Cellular coverage for the Nano surface was in the range of 5-30%, with an average value of 20%. For Micro surfaces, cellular coverage values ranged from 5 to 20%, with an average of 13%. A similar relationship was obtained on the third day of culture (D3). In the case of Nano surfaces, the cellular coverage values were higher and ranged from 25 to 65%, with an average value of 42%. For the Micro surface, the values ranged from 20 to 55%, with an average value of 35%. On the 7th day of culture (D7), the differences between the cellular coverage values for Nano and Micro



Fig. 4 A Prostheses cross-section SEM images after 30 days of static delamination tests, (B) Prostheses wall thickness before and after static delamination test

surfaces increased and were in the range of 60–85% and 20–65%, respectively. The average endothelial cell coverage was 73% for Nano and was significantly larger than for Micro samples (43%, p < 0.05).

Cell viability analysis (Fig. 6C) confirmed the microscopic observations. At each time point, the fluorescence value was higher for Nano than Micro surfaces.

Magnetic seeding on cylindrical material – 3D model

The results of cell seeding in the 3D cylindrical scaffolds are shown in Fig. 7. Both, morphology of the ECs (Fig. 7A) and the cell coverage values (Fig. 7B) indicate that no significant differences were observed between Nano and Micro prostheses. It is worth emphasizing that cell growth was highly heterogeneous, especially in the later days of culture. On the 7th day of culture, both types of prostheses showed areas of cells forming monolayer-like spots, but there were also areas without any adherent cells. Generally, in both cases, the cellular coverage values were significantly lower than in the 2D culture, being in the range of 5%–30% for Nano and 5%- 25% for Micro prostheses. There were also large differences in the values obtained between multiplicate experimental samples.

Discussion

Previous studies on small-diameter vascular grafts have revealed that layered structure of vascular prostheses significantly improves their mechanical properties and better mimics the structure and functions of native blood vessel [30]. Each layer of such prosthesis should



Fig. 5 A Morphology of surface-adhered platelets (magn. = 5 kx) and (B) percentages (n = 6) of platelet-occupied area for Nano and Micro surfaces. PTFE was used as a low-thrombogenic reference material

fulfill certain requirements to enable vessel multifunctionality including anti-thrombogenic function, inhibition of intimal hyperplasia, reduction of inflammation, and enhancement endothelialization after implantation.

Table 2 Hemolysis rate of Nano and Micro prostheses

	Nano	Micro
Hemolysis rate [% of positive control]	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1

Many research groups have previously developed multilayered prostheses, however, most commonly each layer was produced by a different method and often from different polymers. For instance, Yuan et al. created prostheses in which inner, middle, and outer layers were produced by ink printing, wet spinning, and electrospinning, respectively. The authors claimed that only the combined use of the 3 methods allowed for the production of prostheses with the desired wall thickness and mechanical properties [31]. By combining E-jet



Fig. 6 Cell culture with flat materials: (A) HUVECs growth, (B) cell coverage and (C) cell viability after 1,3 and 7 days of culture (n = 6)

3D printing and electrospinning methods, Huang et al. produced tri-layered prostheses, which exhibited better mechanical properties in comparison to electrospun monolayer grafts [30]. Generally, fibrous constructs are very popular in vascular engineering, due to their 3D structure properties mimicking extracellular matrix. Moreover, they offer the possibility to customize fibrous scaffold surface properties (fiber diameter, fiber alignment, material porosity) during production, depending on the requirements of the selected cell type [32].

In this study, multi-step solution blow spinning of medical grade PU enabled us to produce two types of layered fibrous vascular prostheses that differ in their luminal surface morphology. Both types of prostheses were made of three main layers. The outer layer, identical to the Micro and Nano type, was made of microfibers with an average diameter of 1 μ m. This layer was designed to support the development of SMCs that build the walls of native blood vessels. In our previous studies, the growth of SMCs on fibers with average diameters in the range of 200, 500, and 900 μ m was analyzed [27], showing that SMC growth on fibrous scaffolds with fiber diameters of ~1 μ m is improved in comparison to smaller diameters. In addition, other studies suggested that not only the size but also the orientation of fibers supports the process of SMC attachment and growth [33, 34]. Based on those results, the outer surfaces of both types of prostheses were designed to contain homogeneous, circumferentially oriented microfibers with average fiber diameter of ~1 μ m.

A similar diameter was selected to produce a middle layer of the prostheses, composed of loose, non-aligned




microfibers. The main task of this~560 µm thick intermediate layer was to ensure the appropriate mechanical properties, which are an important factor determining the success of grafts upon implantation. In vivo, blood vessels are constantly exposed to pulsatile pressure and undergo constant deformation [35], so the prostheses should be produced from highly elastic materials. Furthermore, differences in mechanical properties between the implanted prosthesis and the native vessel can lead to aneurysm formation [36] or anastomotic intimal hyperplasia [37]. Mechanical properties of small-diameter vascular grafts should therefore be similar to properties of native vessels, which they are intended to replace (e.g. coronary artery), or to the commonly used autografts, such as saphenous vein, with longitudinal elastic modulus about 24 MPa and ultimate tensile stress about 6 MPa, or internal thoracic (mammary) artery, with longitudinal elastic modulus about 17 MPa and ultimate stress about 4 MPa [38]. In this study, maximum load values of about 60 N and ultimate tensile stress values of about 10 MPa confirmed high mechanical strength of the produced scaffolds. The prostheses had Young's modulus values of about 2.5 MPa, which proves their elasticity. It must be noted that Young's modulus of electrospun polyurethane prostheses strongly depends on the type of polymer used, e.g. values reported for Cardiomat were below 1 MPa [39] and for Tecothane around 6 MPa [40]. Grasl et al. reported electrospun Pellethane prostheses with an average fiber diameter of about 900 nm and axial Young's modulus reaching 10 MPa [41].

The mechanical properties of prostheses change with the change in the average diameter of the fibers that build their walls [42]. As the morphology and thickness of the intermediate layer were the same for Nano and Micro prostheses, it was expected that their mechanical properties will be comparable. The additional nanofiber layer in the Nano-type prostheses was only about 10 µm thick and had therefore no significant effect on the mechanical properties of the entire prosthesis.

Generally, porous structures that mimic extracellular matrix provide a suitable microenvironment for cell growth and tissue regeneration. However, in the case of vascular grafts, they pose a risk of leakage [43]. To overcome this problem, a low-porosity, impermeable compact layer made of densely arranged microfibers was added during fabrication by changing the nozzle-collector working distance, so that the resulting final porosity of the wall was about 40%. This approach allowed us to effectively prevent the leakage as demonstrated in the closed flow system perfusion tests.

The main goal of this study was to evaluate whether the change in the morphology of the internal surface of the prosthesis, without the change in its mechanical properties, has a significant impact on the adhesion of platelets and ECs. Previous studies indicated that cell growth on unmodified polymers including PU is at most moderate and that chemical modifications of the surface, e.g. by introducing peptides, are necessary in order to create a stable laver of the endothelium [44, 45]. On the other hand, many studies reported a strong influence of fiber diameter on cell adhesion. Taking this into account, we analyzed the adhesion of platelets and ECs on the internal surfaces of the prostheses. The adhesion of blood platelets to the inner surface of the prosthesis is an undesirable phenomenon that may lead to the formation of a clot and thrombotic occlusion of the prosthesis lumen. It is also known that the process of platelet adhesion can be influenced by the physical properties of the surface, i.e. roughness [46], topography [47], sub-micron texturing [48]. Studies of platelet adhesion to a solventcast film coated with electrospun nanofibers made from poly[acrylonitrile-co-(N-vinyl-2-pyrrolidone)] (PANCNVP) [49] demonstrated that while the platelets did not adhere to the surface of the film, they did adhere to the surface of the nanofibers. In the micro range, however, Milleret et al. reported that electrospun PU scaffolds with smaller fiber diameters (<1 µm) reduce platelet adhesion [50]. Authors stated that not only size of the surface features (e.g. fibers). but also differences in roughness are very likely responsible for the differential platelet adhesion. Our study showed that changing the morphology of the internal surface of the prostheses within the range reported here had a negligible effect on the total percentage of platelet-covered surface. Interestingly, however, the change in luminal surface morphology did influence the morphology of the adherent platelets. Nano-type surface promoted the strong flattening of platelets and their aggregates, while on Micro-type surfaces mostly spherical clusters were formed. Such a difference in the morphology of the adherent platelets may affect the level of their activation and, as a result, the probability of thrombosis. In the context of thrombogenicity, it is worth emphasizing that platelet adhesion to our PU prostheses was overall comparable to the PTFE, which is considered a low-thrombogenic material. The ChronoFlex PU used in this study is also characterized by low platelet adhesiveness and has been successfully used in the production of artificial heart, among others.

One of the key aspects of successful small-diameter vascular grafting is a rapid endothelialization of prostheses [7]. Endothelial monolayer lining the inner surface of arteries, veins and capillaries constitutes a barrier between blood and tissues [51]. Furthermore, vascular endothelium controls and regulates blood flow. Also, an intact and tight endothelium prevents platelet activation, adhesion, and aggregation. This helps to maintain the patency of vascular graft after implantation [52]. In this study, we hypothesized that changing the prostheses' luminal surface morphology by introducing layer of nanofibers would enhance the EC attachment and ability to form monolayer. Similar effect was previously reported by Chung et al. who increased roughness of the smooth PU films by grafting PU chains with different molecular weights and chain lengths, showing that increased nanoscale surface roughness enhances the adhesion and growth of ECs [53]. Furthermore, studies of endothelial cell growth on the surface of PLC/collagen fibers with diameters of 0.27. 1, 2.39, 4.45 µm showed that cells grown on 0.27 µm fibers formed strong focal adhesion, whereas cells grown on 2.39 and 4.45 µm fibers presented a spindle-shaped morphology with very few focal adhesion points [42]. In our study, the process of cell colonization in 2D (flat samples, cell seeding by sedimentation) was faster on Nano-type surfaces. The difference in the percentage of cell-covered area between the Micro and Nano prostheses was particularly evident in the later days of the culture. After 7 days of culture, the cellular coverage on the Nano surfaces was in the range of 60-85% and the cell growth was relatively uniform on the entire analyzed surface. On Micro surfaces, the cell coverage values were not only lower, but the cell growth was also patchy and non-uniform. This is certainly related to the greater heterogeneity of the surface morphology of the Micro type, which likely translates into non-uniform cell growth. To investigate whether nanofibrous surface morphology promotes endothelialization of 3D constructs, we employed the magnetic cell seeding method, which was successfully used to populate other types of cylindrical biomaterials [29, 54]. However, the obtained cell coverage values were overall lower than in 2D samples (30% after 7 days of culture) and did not significantly differ between both Nano and Micro prostheses. This trend was observed for both types of materials, for all observation time points. The mechanisms of this effect are unclear thus far but may be related to the differences in the seeding process between 2 and 3D samples. In the case of the 2D model, the cell suspension was applied to the upper surface of the flat samples placed in CellCrown inserts and incubated for 24 h, allowing the cells to sediment onto the material under the influence of gravity. In the 3D model, cylindrical samples placed in a vertical position in cell culture tubes were filled with cell suspension and exposed to magnetic field for 15 min. Consequently, the period when the cells had a chance to adhere to the luminal, cylindrical surface of the prosthesis was much shorter in case of 3D samples that were subsequently placed in the incubator and remained in a vertical position during the whole culture time. Thus, the cells that did not effectively attach to the luminal surface during the 15 min exposure to the magnetic field would have fallen to the bottom of the culture tube. Expectedly, gravity did not work in favor of cell adhesion in vertically placed scaffolds leading to relatively

poor attachment of endothelial cells to the cylindrical wall of 3D model and explaining the differences in endothelial coverage between 2 and 3D samples.

In summary, multilayered cylindrical prostheses produced from medical-grade PU by solution blow spinning method, represent a promising alternative to autologous vessels or synthetic polymers. While differing in luminal surface morphology, the designed prostheses showed a high elasticity, good mechanical strength, and a platelet adhesion level comparable to PTFE. Changing the luminal surface morphology by adding a nanofibrous layer significantly improved endothelialization of the flat samples. However, this morphological enhancement was not strong enough to show a significant effect during colonization of the entire cylindrical prostheses, which is a more demanding process. Thus, in order to achieve successful cell colonization of 3D cylindrical prostheses, it will be necessary to introduce additional chemical modifications of their surface (such as introduction of bioactive endothelial cell-selective adhesive molecules, e.g. REDV, IKAV) to overcome current limitations and improve endothelialization efficacy.

Conclusions

This study aimed to develop non-thrombogenic smalldiameter vascular grafts with appropriate mechanical properties and to evaluate the influence of luminal surface morphology on scaffold hemocompatibility and endothelial cell attachment. Collectively, our data demonstrate that multistep solution blow spinning method allows to produce cylindrical structures with layers of tailorable thickness and porosity, whose mechanical properties conform to small-diameter vascular grafts. The developed prostheses did not cause hemolysis in contact with blood and there was no significant difference in the percentage of platelet-covered area for Nano and Micro surfaces. Nanofibrous surfaces promoted stronger adhesion of platelets and their aggregates, resulting in the presence of flattened structures. On the contrary, Micro surfaces were characterized by the presence of spherical aggregates, which indicates their weaker adhesion. This variation in surface-adhered platelets might indicate differences in their activation level.

Endothelial coverage after 1, 3, and 7 days of 2D culture was higher on Nano prostheses. However, this effect was not seen in 3D culture, where cylindrical prostheses were colonized using magnetic seeding method. Taken together, the produced scaffolds meet the material and mechanical requirements for vascular prostheses, but their biological properties must be further improved to enhance endothelialization efficiency.

Abbreviations ECs Endothelial cells

EtOH Ethanol

- HMD5 Hexamethyldisilazane
- HUVECs Human umbilical vein endothelial cells PBS Phosphate buffer saline
- PBS Phosphate buffer saline PET Polyethylene terephthalate
- PRP Platelet-rich plasma
- PTFE Polytetrafluoroethylene
- PUs Polyurethanes SBS Solution blow spinning
- SEM Scanning electron microscopy
- SMCs Smooth muscle cells

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi. org/10.1186/s13036-023-00337-9.

Additional file 1: Figure. Cross-sectional SEM images of Nano and Micro prostheses after static (7 and 14 days) and dynamic (1h) delamination test.

Authors' contributions

Lt: methodology, investigation, data analysis, writing—original draft, visualization, W. Rz: investigation, M. C: investigation, data analysis, TC: supervision, project administration, funding acquisition, writing—review & editing, LC: methodology, supervision, project administration, funding acquisition, writing—review & editing, B.B-R: conceptualization, methodology, investigation, data analysis, writing—original draft, visualization, supervision, project administration, funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The work was supported by the National Science Centre, Poland (grant no. UMO-2020/39//ST5/01131), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation; grant no. CI 162/4–1), the National Centre for Research and Development, Poland (grant no. LIDER/18/0104/L-8/16/ NCBR/2017), Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology (grant agreement no. 504/04627) and the Polish National Agency for Academic Exchange (NAWA) under The Bekker Programme, (grant no. BRV/BEK/2021/1/00434/U/00001).

Availability of data and materials

The datasets generated during the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics and approval and consent to participate

The use of human material was approved by the local ethics committee at the University Hospital Erlangen (review number 14-85_3-B from 01.02.2022).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland. ⁴Doctoral School of Warsaw University of Technology, Warsaw University of Technology, PI. Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland. ⁴Section of Experimental Oncology Und Nanomedicine (SEON), Else Kröner-Fresenius-Stiftung-Professorship, ENT-Department, Universitätsklinikum, Erlangen, Germany, ⁴Centre for Advanced Materials and Technologies CEZAMAT, Warsaw University of Technology, Poleczki 19, 02-822 Warsaw, Poland.

Page 15 of 17

Received: 3 January 2023 Accepted: 5 March 2023 Published online: 13 March 2023

References

- WH0. https://www.who.int/. Accessed 9 Mar 2023
- Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghirolli DI, Pranke P, Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts, Front Cardiovasc Med. 2021;7:592361.
- Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. Regen 3. Med. 2010;5(1):107.
- 4. Mi HY, Jiang Y, Jing X, Enriquez E, Li H, Li Q, et al. Fabrication of triple layered vascular grafts composed of silk fibers, polyacrylamide hydrogel, and polyurethane nanofibers with biomimetic mechanical properties. Mater Sci Eng C. 2019;98:241–9.
- Aslani S. Kabiri M. Kehtari M. Hanaee-Ahvaz H. Vascular tissue engineer 5. ing: Fabrication and characterization of acetylsalicylic acid-loaded electrospun scaffolds coated with amniotic membrane lysate. J Cell Physiol. 2019;234(9):16080–96. Rotmans JI, Heyligers JMM, Stroes ESG, Pasterkamp G. Endothe-
- 6. lial progenitor cell-seeded grafts: Rash and risky. Can J. Cardiol. 2006;22(13):1113–6.
- 7 Sánchez PF, Brey EM, Briceño JC. Endothelialization mechanisms in vascu-lar grafts. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(11):2164–78.
- Zhuang Y, Zhang C, Cheng M, Huang J, Liu Q, Yuan G, et al. Challenges and strategies for in situ endothelialization and long-term lumen patency of vascular grafts. Bioact Mater . 2021;6(6):1791–809. 8.
- Durán-Rey D, Crisóstomo V, Sánchez-Margallo JA, Sánchez-Margallo FM. Systematic Review of Tissue-Engineered Vascular Grafts. Front Bioeng 9 Biotechnol. 2021;9:771400.
- De Valence S, Tille JC, Giliberto JP, Mrowczynski W, Gurny R, Walpoth BH, 10. et al, Advantages of bilayered vascular grafts for surgical applicability and tissue regeneration. Acta Biomater. 2012;8(11):3914–20.
- Pimenta FA, Carbonari RC, Malmonge SM, Nanofibrous tubular scaffolds for tissue engineering of small-diameter vascular grafts development using SBS fabrication technique and mechanical performance. Res Biomed Eng. 2022;38(3):797–811, 12. Łopianiak I, Wojasiński M, Butruk-Raszeja B. Properties of polyurethane
- fibrous materials produced by solution blow spinning. Chem Process Eng Inz Chem i Proces. 2020;41(4):267–76.
- Lopianiak I, Butruk-Raszeja BA. Evaluation of Sterilization / Disinfection Methods of Fibrous Polyurethane Scaffolds Designed for Tissue Engineer-13. ing Applications Int I Mol Sci. 2020;21(21):1-18
- Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LHC. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. J Appl Polym Sci. 2009;113(4):2322–30. Daristotle JL, Behrens AM, Sandler AD, Ko P. A Review of the Fundamental
- 15. Principles and Applications of Solution Blow Spinning. ACS Appl Mater Interfaces. 2016;8(51):34951–63.
- Cooke ME, Ramirez-GarciaLuna JL, Rangel-Berridi K, Park H, Nazhat SN, Weber MH, et al. 3D Printed Polyurethane Scaffolds for the Repair of Bone 16. Defects, Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:1190. Sheikholeslam M, Wright MEE, Cheng N, Oh HH, Wang Y, Datu AK, et al.
- Electrospun Polyurethane-Gelatin Composite: A New Tissue-Engineered Scaffold for Application in Skin Regeneration and Repair of Complex Wounds. ACS Biomater Sci Eng. 2020;6(1):505–16.
- Thierfelder N, Koenig F, Bombien R, Fano C, Reichart B, Wintermantel E, et al. In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homo-18.
- grafts after seeding and conditioning. ASAIO J. 2013;59(3):309–16. Puperi DS, Kishan A, Punske ZE, Wu Y, Cosgriff-Hernandez E, West JL 19. et al. Electrospun Polyurethane and Hydrogel Composite Scaffolds as Biomechanical Mimics for Aortic Valve Tissue Engineering. ACS Biomater Sci Eng. 2016;2(9):1546-58.
- Tsai MC, Hung KC, Hung SC, Hsu S hui. Evaluation of biodegradable elas-20. tic scaffolds made of anionic polyurethane for cartilage tissue engineer-ing. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015;125:34–44. Punnakitikashem P, Truong D, Menon JU, Nguyen KT, Hong Y, Electrospun
- 21. biodegradable elastic polyurethane scaffolds with dipyridamole releas for small diameter vascular grafts. Acta Biomater. 2014;10(11):4618–28.

- 22. Williamson MR, Black R, Kielty C. PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: Attachment, prolifera-tion and bioactivity of human vascular endothelial cells. Biomaterials 2006;27(19):3608-16.
- Crad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. The use of biodegrad-able polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. Biomaterials. 2003;24(28):5163–71. Luo K, Wang L, Chen X, Zeng X, Zhou S, Zhang P, et al. Biomimetic polyu-
- rethane 3d scaffolds based on polytetrahydrofuran glycol and polyethyl-ene glycol for soft tissue engineering. Polymers (Basel). 2020;12(11):1–12. Jiang L, Ren Z, Zhao W, Liu W, Liu H, Zhu C. Synthesis and structure/prop-
- 25 erties characterizations of four polyurethane model hard segments. R Soc Open Sci. 2018;5(7):180536.
- Jin X, Guo N, You Z, Tan Y. Design and Performance of Polyurethane Elastomers Composed with Different Soft Segments. Mater (Basel, Switzerland). 2020;13(21):1–26. Łopianiak I, Wojasiński M, Kuźmińska A, Trzaskowska P, Butruk-Raszeja BA.
- The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds. J Biol Eng. 2021;15(1):1–17.
- Padsalgikar AD. Speciality Plastics in Cardiovascular Applications. In: Plas-tics in Medical Devices for Cardiovascular Applications. Plastics Design 28. Library.2017:53-82.
- Kopeć K, Wojasiński M, Eichier M, Genç H, Friedrich RP, Stein R, et al
- Polydopamine and gelatin coating for rapid endothelialization of vascular scaffolds. Biomater Adv. 2022;134: 112544. Huang R, Gao X, Wang J, Chen H, Tong C, Tan Y, et al. Triple-Layer Vascular 30. Grafts Fabricated by Combined E-Jet 3D Printing and Electrospinning. Ann Biomed Eng. 2018;46(9):1254–66. Arrangement N, Yuan X, Li W, Yao B, Li Z, Kong D, et al. Tri-Layered
- 31. /ascular Grafts Guide Vascular Cells' Native-like Arrangement. Polymers. 2022;14(7):1370.
- Gao Y, Zhang J, Su Y, Wang H, Wang XX, Huang LP, et al. Recent progr and challenges in solution blow spinning. Mater Horiz 2021;8:426-446
- Agrawal A, Lee BH, Irvine SA, An J, Bhuthalingam R, Singh V, et al. Smooth muscle cell alignment and phenotype control by melt spun polycaprolactone fibers for seeding of tissue engineered blood vessels. Int J Biomater. 2015;2015:434876.
- Kuppan P. Sethuraman S. Krishnan UM. Interaction of human smooth 34 muscle cells with nanofibrous scaffolds. Effect of fiber orientation on cell adhesion, proliferation, and functional gene expression. J Biomed Mater Res Part A. 2015;103(7):2236–50. Zizhou R, Wang X, Houshyar S. Review of Polymeric Biomimetic Small-
- 35. Diameter Vascular Grafts to Tackle Intimal Hyperplasia. ACS Omega 2022;7(26):22125–48.
- Quaglini V, Villa T, Migliavacca F, Carmo M, Settembrini P, Contro R, et al. An in Vitro Methodology for Evaluating the Mechanical Properties of
- Anti Viuo Mentodoggi of zvalading die Mechanical roppentes of Aortic Vascular Prosthesse, Artif Organs. 2002;26(6):555–64. Walden R, Litalien GJ, Megerman J, Abbott WM. Matched Elastic Proper ties and Successful Arterial Grafting. Arch Surg. 1980;115(10):1166–9. Steklenburg M, Rutten MCM, Snoeck LHEH, Baaijens FPT. Dynamic Straining Combined with Fibrin Gel Cell Seeding Improves Strength of
- Tissue-Engineered Small-Diameter Vascular Grafts. 2008;15(5):1081–9 Matsuda T, Ihara M, Inoguchi H, Kwon IK, Takamizawa K, Kidoaki S.
- Mechano-active scaffold design of small-diameter artificial graft made of electrospun segmented polyurethane fabrics. J Biomed Mater Res Part A. 2005;73A(1):125–31. Uttayarat P, Perets A, Li M, Pimton P, Stachelek SJ, Alferiev I, et al. Micropat-
- terning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts. Acta Biomater. 2010;6(11):4229–37. Grasl C, Bergmeister H, Stoiber M, Schima H, Weigel G. Electrospun
- 41 polyurethane vascular grafts: In vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression. J Biomed Mater Res - Part A. 2010:93(2):716-23.
- 42. Ju YM, Choi JS, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. Biomaterials. 2010;31(15):4313–21. Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafoschi F, Mantovani D. Collagen-
- Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. Front Bioeng Biotechnol. 2019;7:166.
- Kuźmińska A, Wojciechowska A, Butruk-raszeja BA. Vascular Polyure-44 thane Prostheses Modified with a Bioactive Coating—Physicochemica Mechanical and Biological Properties. Int J Mol Sci. 2021;22(22):12183. nical.

- 45. Butruk-Raszeja BA, Kuźmińska A, Ciach T, Adipurnama I, Yang MC.
- Butruk-Haszeja BK, Nuzminska A, Clach I, Adipurnama I, Yang MC. Endothelial cell growth on polyurethane modified with acrylic acid and REDV peptide. Surf Innov. 2019;8(1–2):89–104.
 Tsunoda Nanae, Kokubo Ken-Ichi, Sakai Kiyotaka, Fukuda Makoto, Miyazaki Makoto, Hiyoshi T. Surface roughness of cellulose hollow fiber dialysis membranes and platelet adhesion. ASAIO J. 1999;45(5):418–23.
- Koh LB, Rodriguez I, Venkatraman SS. The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. Biomaterials. 2010;31(7):1533–45.
 Milner KR, Snyder AJ, Siedlecki CA. Sub-micron texturing for reducing platelet adhesion to polyurethane biomaterials. J Biomed Mater Res Part A 2002;61(7):1533–45. A. 2006:76A(3):561-70.
- Aux 2007 (2013) 50 70.
 Wan LS, Xu ZK, Polymer surfaces structured with random or aligned electrospun nanofibers to promote the adhesion of blood platelets. J Biomed
- Mater Res Part A. 2009;89A(1):168–75.
 Milleret V. Hefti T, Hall H, Vogel V, Eberli D. Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. Acta Biomater. 2012;8(12):4349–56.

- Acta Biomater. 2012;8(12):4349–56.
 Strüger-genge A, Blocki A, Franke R, Jung F, Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. Int J Mol Sci. 2019;20(18):4411.
 Michiels C. Endothelial Cell Functions. J of Cell Physiology. 2003;196:430–443.
 Chung TW, Liu DZ. Wang SY, Wang SS. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. Biomaterials. 2003;24(25):4655–61.
 Lindon B, Eldar D, Merollo B, Erdodich PB, Diatel P, Alexian C, et al. Optimi.
- Singh R, Elther D, Morelle R, Friedrich RP, Dietel B, Alexiou C, et al. Optimi-zation of cell seeding on electrospun PCL-silk fibroin scaffolds. Eur Polym J. 2020;134:109838.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in pub-lished maps and institutional affiliations.

Page 17 of 17

gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

thorough peer review by experienced researchers in your field

support for research data, including large and complex data types

• maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

• fast, convenient online submission

rapid publication on acceptance

Learn more biomedcentral.com/submissions

