

AUTOREFERAT

(zgodny z wzorem z Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz komunikatem CK nr 6/2011)

1. IMIĘ I NAZWISKO: Alicja UTRATA-WESOŁEK

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:

- czerwiec 2001 **magister** w zakresie specjalności Technologii Chemicznej i Chemii Polimerów
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Chemia Podstawowa i Stosowana, Uniwersytet
Opolski
- praca dyplomowa wyróżniona nagrodą PTChem im. Janiny Janikowej:
„Kopolimeryzacja etylenu z 1-heksenem wobec katalizatora cyrkonocenowego
na nośniku $MgCl_2(thf)_2$ ”
- promotor: prof. dr hab. inż. Krystyna Czaja
- lipiec 2006 **doktor nauk chemicznych**
Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach
- temat rozprawy: “Stimuli sensitive polymers based upon reactive polyethers”,
praca wyróżniona
- promotor: prof. dr hab. Andrzej Dworak; prof. dr hab. Brigitte Voit

3. PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ – INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Stanowiska:

- listopad 2001 – październik 2005 **doktorantka** na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej
- listopad 2005 – lipiec 2007 **specjalista** w Zakładzie Karbochemii PAN w Gliwicach w Pracowni Materiałów
Nano- i Mikrostrukturalnych
- lipiec 2007 – marzec 2017 **adiunkt** w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Pracowni Mate-
riałów Nano- i Mikrostrukturalnych
- marzec 2017 **asystent w** Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Pracowni
Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych

Funkcje:

- 2011-2014 Członek Rady Naukowej Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

(a) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięciem naukowym, wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz.882 ze zm. w Dz. U. z 2016 poz. 1311), który przedkładam jako rozprawę habilitacyjną jest:

jednotematyczny cykl publikacji zatytułowany: „BIOKOMPATYBILNE WARSTWY POLIMEROWE O KONTROLOWANYM POWINOWACTWIE DO WODY. SYNTEZA I ZASTOSOWANIE”

(b) WYKAZ JEDNOTEMATYCZNYCH ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, w ujęciu chronologicznym, z określeniem procentowanego udziału habilitantki w powstaniu każdej z prac:

Impact Factor (IF) - odpowiedni do roku publikacji

[H1]	Biocompatible cryogels of thermosensitive polyglycidol derivatives with ultra-rapid swelling properties P. Petrov, A. Utrata-Wesołek , B. Trzebicka, Ch. B. Tsvetanov, A. Dworak, J. Anioł, A. Sieroń European Polymer Journal 2011 , 47, 981-988	IF=2,739 (udział własny = 45 %)
[H2]	Photodegradation of polyglycidol in aqueous solutions exposed to UV irradiation A. Utrata-Wesołek , R. Trzcińska, K. Galbas, B. Trzebicka, A. Dworak Polymer Degradation and Stability 2011 , 96, 907-918	IF=2,769 (udział własny = 60 %)
[H3]	Antifouling surfaces in medical application A. Utrata-Wesołek [*] Polimery 2013 , 58, 685-695	IF=0,617 (udział własny = 100 %)
[H4]	Poly[tri(ethylene glycol) ethyl ether methacrylate] - coated surfaces for controlled fibroblasts culturing A. Dworak, A. Utrata-Wesołek , D. Szweda, A. Kowalczyk, B. Trzebicka, J. Anioł, A. L. Sieroń, A. Klama-Baryła, M. Kawecki ACS Applied Materials & Interfaces 2013 , 5, 2197-2207	IF=5,900 (udział własny = 40 %)
[H5]	Modified polyglycidol based nanolayers of switchable philicity and their interactions with skin cells A. Utrata-Wesołek , N. Oleszko, B. Trzebicka, J. Anioł, M. Zagdańska, M. Lesiak, A. Sieroń, A. Dworak European Polymer Journal 2013 , 49, 106-117	IF=3,242 (udział własny = 60 %)
[H6]	(Co)polymers of oligo(ethylene glycol) methacrylates – temperature-induced aggregation in aqueous solution B. Trzebicka, D. Szweda, S. Rangelov, A. Kowalczyk, B. Mendrek, A. Utrata-Wesołek , A. Dworak Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry 2013 , 51, 614-623	IF=3,245 (udział własny = 10 %)
[H7]	Poly(2-substituted-2-oxazoline) surfaces for dermal fibroblasts adhesion and detachment A. Dworak, A. Utrata-Wesołek , N. Oleszko, W. Wałach, B. Trzebicka, J. Anioł, A. L. Sieroń, A. Klama-Baryła, M. Kawecki Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2014 , 25, 1149-1163	IF=2,587 (udział własny = 50 %)

[H8]	Controlling the crystallinity of thermoresponsive poly(2-oxazoline)-based nanolayers to cell adhesion and detachment N. Oleszko, W. Wałach, A. Utrata-Wesołek , A. Kowalczyk, B. Trzebicka, A. Klama-Baryła, D. Hoff-Lenczewska, M. Kawecki, M. Lesiak, A. L. Sieroń, A. Dworak Biomacromolecules 2015 , 16, 2805-2813	IF=5,583 (udział własny = 40 %)
[H9]	Crystallization of Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) in Organic Solutions N. Oleszko, A. Utrata-Wesołek , W. Wałach, M. Libera, A. Hercog, U. Szeluga, M. Domański, B. Trzebicka, A. Dworak Macromolecules 2015 , 48, 1852-1859	IF=5,554 (udział własny = 20 %)
[H10]	Multiple and terminal grafting of linear polyglycidol for surfaces of reduced protein adsorption A. Utrata-Wesołek* , W. Wałach, J. Anioł, A. L. Sieroń, A. Dworak Polymer 2016 , 97, 44-54	IF=3,586 (udział własny = 80 %)
[H11]	Transfer of fibroblast sheets cultured on thermoresponsive dishes with membranes M. Kawecki, M. Kraut, A. Klama-Baryła, W. Łabuś, D. Kitala, M. Nowak, J. Glik, A. L. Sieroń, A. Utrata-Wesołek , B. Trzebicka, A. Dworak, D. Szweda Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2016 , 27, 111	IF=2,272 (udział własny = 5 %)
[H12]	Photocrosslinking of polyglycidol and its derivative – route to thermoresponsive hydrogels A. Utrata-Wesołek* , I. Żymełka-Miara, A. Kowalczyk, B. Trzebicka, A. Dworak Photochemistry and Photobiology DOI: 10.1111/php.12819	IF= 2,121 (udział własny = 70 %)

Sumaryczny IF powyższych 12 prac wynosi 40,215

SPIS TREŚCI

1.	WPROWADZENIE.....	5
2.	HYDROFILOWE WARSTWY POLIETEROWE DO OCHRONY PRZED ADSORPCJĄ PROTEIN	9
2.1.	Immobilizacja liniowych polimerów glicydolu – synteza warstw i analiza struktury	9
2.2.	Właściwości warstw poliglicydolowych a zdolność do redukcji adsorpcji protein.....	13
2.3.	Podsumowanie	15
3.	WARSTWY TERMOCZUŁYCH POLIMERÓW DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ	16
3.1.	Termoczule warstwy samonośne oparte na poliglicydolu – synteza i właściwości	17
3.2.	Termoczule warstwy polimerowe immobilizowane na podłożach	23
3.2.1.	Termoczuly poliglicydol immobilizowany na podłożu.....	23
3.2.2.	Termoczule poli(metakrylany glikoli oligoetylenowych) na podłożu	26
3.2.3.	Termoczule poli(2-podstawione-2-oksazoliny) na podłożu	29
3.3.	Warstwy termoczulych polimerów w hodowli i odczepianiu komórek skóry w postaci arkusza.....	34
3.3.1.	Hodowla arkusza komórek skóry.....	35
3.3.2.	Transfer arkuszy komórek skóry za pomocą membrany.....	38
3.3.3.	Biologiczna charakterystyka komórek skóry po hodowli	39
4.	PODSUMOWANIE.....	40

(c) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW, OPISANYCH W CYKLU PUBLIKACJI „BIOKOMPATYBILNE WARSTWY POLIMEROWE O KONTROLOWANYM POWINOWACTWIE DO WODY. SYNTEZA I ZASTOSOWANIE”

1. WPROWADZENIE

Współczesna medycyna do leczenia różnych schorzeń niejednokrotnie wykorzystuje materiały i urządzenia wytworzone z metali, ceramiki, materiałów węglowych oraz polimerów (zarówno naturalnych jak i syntetycznych) [1, 2]. Stenty wieńcowe, protezy naczyniowe, kolanowe czy biodrowe, sztuczne zastawki serca, różnego rodzaju implanty czy soczewki kontaktowe to produkty uzyskiwane z biomateriałów, które odgrywają znaczącą rolę w poprawie zdrowia i jakości życia osób chorych. W ostatnich latach znaczący postęp nastąpił również w badaniach wykorzystujących biomateriały do celowanego transportu leków, terapii genowej, medycyny rekonstrukcyjnej czy inżynierii tkankowej.

Materiały biomedyczne mające kontakt z płynami ustrojowymi lub tkankami muszą charakteryzować się specyficznymi właściwościami dostosowanymi do konkretnego zastosowania. Kluczowe jest więc zrozumienie oddziaływań biomateriału z substancjami biologicznie aktywnymi, na przykład proteinami lub komórkami. Za oddziaływanie te w głównej mierze odpowiada powierzchnia biomateriału [3]. Dlatego też możliwość kontroli właściwości powierzchniowych biomateriałów np. poprzez pokrywanie ich warstwą polimeru ma szczególne znaczenie dla ich zastosowań w medycynie.

Głównym problemem badawczym, któremu poświęcony jest omawiany cykl publikacji, stanowiący podstawę postępowania habilitacyjnego jest opracowanie oraz charakterystyka nowych, biozgodnych warstw polimerowych o właściwościach pozwalających na ich zastosowanie w medycynie rekonstrukcyjnej jako powłoki redukujące adsorpcję protein lub w inżynierii tkankowej do hodowli i odczepiania warstw komórkowych. Aby to uzyskać należy ustalić, jak warstwy te oddziałują z proteinami i komórkami.

Aktualność problemu powoduje, że prace prowadzone w zakresie wykorzystania materiałów syntetycznych do zastosowań w biomedycynie są prowadzone intensywnie i w szerokim zakresie. Synteza warstw polimerowych (zbudowanych z polimerów np. o strukturze liniowej w postaci tzw. „szczotki polimerowej”, czy polimerów usieciowanych, o strukturze gwieździstej, dendrytycznej lub powłok tzw. warstwie-po-warstwie) jest opisana [3, 4]. Niestety, na podstawie przedstawianych wyników wciąż jeszcze nie można wyciągnąć wniosków korelujących właściwości warstw polimerowych przeciwdziałających osadzaniu się protein bądź sprzyjających hodowli komórek ze strukturą molekularną czy topologią makrocząsteczki tworzącą powłokę, sposobem pokrycia powierzchni ani grubością warstwy polimerowej.

Badania prowadzone w ramach pracy habilitacyjnej miały na celu opracowanie i porównanie nowych biozgodnych warstw polimerowych o różnym składzie i strukturze i ustalenie zależności między właściwościami powierzchni pokrytej polimerami z wybranej grupy, a ich oddziaływaniem z proteinami lub komórkami.

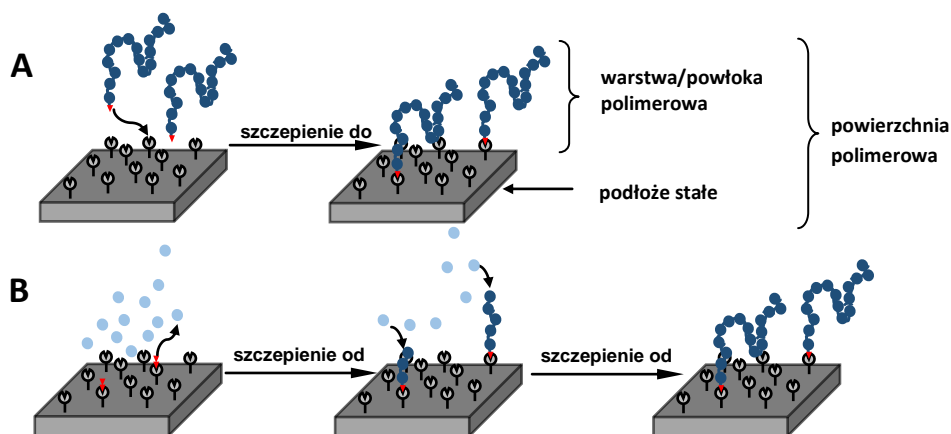
Do konstrukcji warstw polimerowych redukujących adsorpcję protein zastosowano biokompatybilne, hydrofilowe polimery glicydotu. W pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych CMPW PAN, w której prowadzone były badania, opracowano metody kontrolowanej syntezy poliglicydotu o różnej topologii makrocząsteczki [5, 6]. W oparciu o tę wiedzę oraz o fakt, że w literaturze nie było danych dotyczących wykorzystania poliglicydotu, za wyjątkiem dendrytycznego poliglicydotu, jako powłoki przeciwdziałające osadzaniu się protein [7-9], **w pracy habilitacyjnej podjęto badania nad otrzyma-**

niem warstw opartych na liniowym poliglicydolu i jego kopolimerach z glikolem etylenowym oraz określeniem ich oddziaływań z proteinami.

Biokompatybilne warstwy polimerowe badano także pod kątem ich wykorzystania jako podłoża do hodowli komórkowych. Do tego celu wykorzystano polimery termoczułe. Możliwe było więc sterowanie powinowactwem do wody warstw utworzonych przez te polimery, tylko poprzez zmiany temperatury otoczenia. Właściwość ta pozwala na ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej do hodowli i odzepiania komórek w postaci arkusza. W wyniku wcześniej przeprowadzonych prac opracowano sposób modyfikacji hydrofilowego poliglicydolu do termoczułych polimerów [10]. Wykorzystując tę wiedzę, **podjęto badania nad otrzymaniem termoczułych powłok opartych na modyfikowanym poliglicydolu i określeniem ich oddziaływań z komórkami. Do prac wykorzystano także inne termoczułe polimery: poli(metakrylany glikoli oligoetylenowych) oraz poli(2-podstawione-2-oksazoliny), gdyż dotąd stosowany poli(*N*-izopropylakryloamid) (PNIPAM) lub jego kopolimery, jako element termoczułych powłok do hodowli komórkowych, nie jest pozbawiony wad (np. nie posiada dostępnych do modyfikacji grup funkcyjnych, wykazuje histerezę przejścia fazowego, może ulegać agregacji czy oddziaływać ze związkami biologicznymi t.j. aminokwasy czy proteiny [11, 12]).**

Do syntezy polimerów zastosowano żyjące i kontrolowane polimeryzacje anionową i kationową oraz kontrolowaną polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu (ATRP). Metody te pozwalają na precyzyjne sterowanie strukturą warstwy polimerowej, co zapewnia kontrolę zachowania uzyskanego materiału polimerowego w zadanych warunkach.

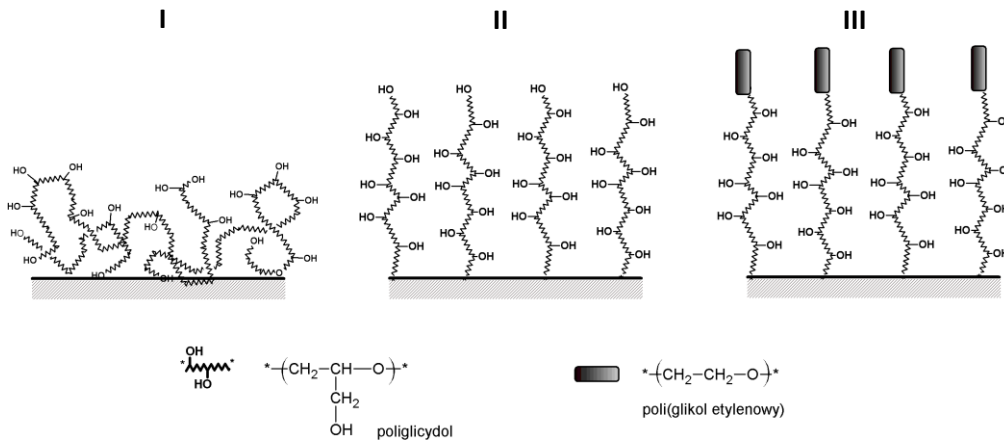
W pracy otrzymano warstwy polimerowe w postaci zarówno tzw. warstw samonośnych (żele) jak i immobilizowanych na podłożach stałych. Do związania polimeru z podłożem wykorzystano techniki szczepienia do podłoża oraz szczepienia od podłoża (rys. 1.1). Obie metody zapewniają kowalencyjne związanie polimeru z podłożem i uzyskanie stabilnej warstwy.



Rys. 1.1. Schemat kowalencyjnego związania polimeru z podłożem stałym z wykorzystaniem techniki (A) szczepienia do podłoża i (B) szczepienia od podłoża

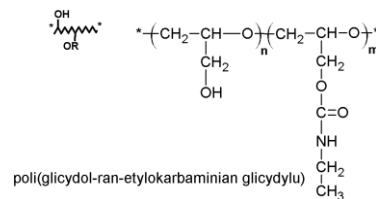
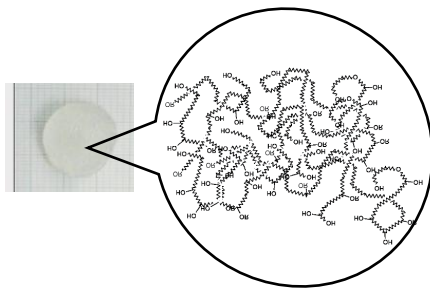
Struktury wszystkich warstw polimerowych badanych w pracy habilitacyjnej przedstawiono na rysunku 1.2. Zbadano zdolność oddziaływania hydrofilowych lub termoczułych warstw polimerowych z proteinami lub komórkami dla warstw o różnej budowie chemicznej i topologii.

HYDROFILOWE WARSTWY POLIMEROWE PRZECIWDZIAŁAJĄCE OSADZANIU SIĘ PROTEIN

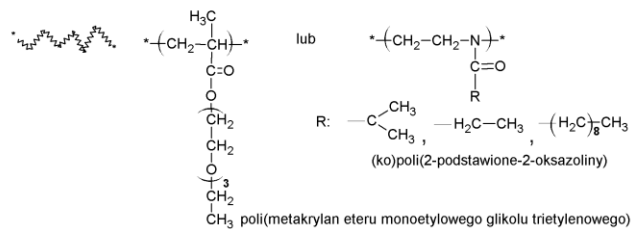
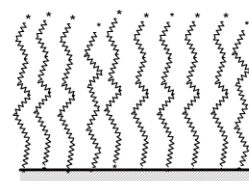
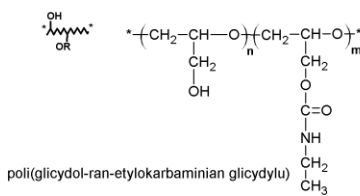
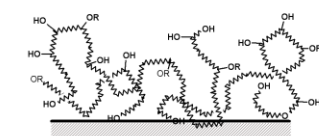


TERMOCZUŁE WARSTWY POLIMEROWE DO HODOWLI ARKUSZY KOMÓREK

A. Warstwy polimerowe samonośne



B. Warstwy polimerowe immobilizowane na podłożu



Rys. 1.2. Warstwy polimerowe będące przedmiotem pracy habilitacyjnej.

W opracowaniu opisane zostały prace autorki obejmujące:

1. Syntezę i charakterystykę hydrofilowych warstw polimerowych opartych na poliglicydolu [**H3, H10**].
2. Określenie wpływu struktury poliglicydolu i właściwości otrzymanych powierzchni polimerowych na ich odporność na niespecyficzną adsorpcję białek [**H10**].
3. Syntezę i charakterystykę termoczułych warstw polimerowych jako:
 - a) warstw samonośnych [**H1, H2, H12**],
 - b) powłok opartych na poliglicydolu [**H5**], poli(metakrylanie eteru monoetylowego glikolu trietylenowego) [**H4, H6**] i (ko)poli(2-podstawionych-2-oksazolinach) [**H7, H8, H9**] immobilizowanych na podłożach.
4. Określenie wpływu składu i struktury polimerów oraz właściwości termoczułych powierzchni polimerowych na zdolność hodowli i odczepiania komórek z uwzględnieniem:
 - a) adhezji, proliferacji i odczepiania arkuszy komórek [**H1, H4, H5, H7, H8**],
 - b) transferu arkuszy komórek [**H8, H11**],
 - c) biologicznej charakterystyki komórek po hodowli na termoczułym podłożu [**H7**].

Wszystkie opisane w rozprawie prace autorki skoncentrowane są na możliwości kontroli syntezy polimerów i ich szczepienia z podłożem tak, by można było wpływać na właściwości otrzymanych warstw polimerowych. Szczególnego podkreślenia wymaga ustalenie wpływu właściwości warstw na ich zdolność do redukcji adsorpcji protein lub na możliwość hodowli i odczepiania arkuszy komórek. Taka analiza pozwoliła, w ramach przedstawianej pracy habilitacyjnej, na określenie możliwości potencjalnego zastosowania otrzymanych materiałów w medycynie rekonstrukcyjnej i w inżynierii tkankowej.

Publikacje stanowiące jednotematyczny cykl są pracami zbiorowymi, w których udział habilitantki został określony i opisany w tabeli zawartej w załączniku 5 B.

2. HYDROFILOWE WARSTWY POLIETEROWE DO OCHRONY PRZED ADSORPCJĄ PROTEIN

Niekontrolowana adsorpcja związków biologicznie aktywnych na powierzchni biomateriałów to zjawisko niekorzystne. Implanty medyczne, niezależnie od ich budowy, zostają pokryte warstwą białek w ciągu kilku sekund po kontakcie z tkankami i płynami fizjologicznymi. W rezultacie aktywowany jest mechanizm obronny organizmu, co może prowadzić do reakcji zapalnej, powikłań zakrzepowozatorowych bądź pogorszenia funkcjonowania urządzenia [13]. Dlatego też materiały o właściwościach przeciwdziałających osadzaniu się protein lub komórek (ang. antifouling) są przedmiotem wielu badań prowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat [14-16]. Osadzaniu się protein może przeciwdziałać pokrycie wyrobów medycznych warstwą polimerową o odpowiednich właściwościach. W literaturze opisano dwie klasy polimerów zmniejszające ilość osadzających się protein: polimery hydrofilowe i polimery zawierające jony obojętne. Wśród tych polimerów najszerzej badane były powłoki z poli(glikolu etylenowego) [3], który jest nietoksyczny, nieimmunogeny i dobrze rozpuszczalny w wodzie. Poliglicydol (PGI) – analog poli(glikolu etylenowego), jest również polimerem biokompatybilnym, hydrofilowym oraz dodatkowo posiada grup funkcyjne zdolne do dalszej ewentualnej modyfikacji. Może być więc polimerem przydatnym do tego typu zastosowania.

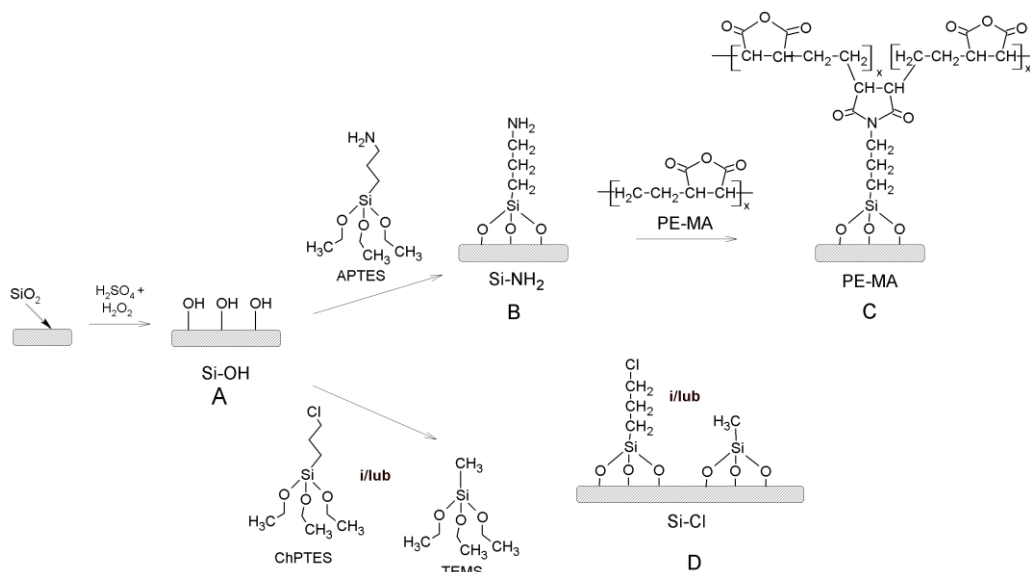
W pracowni habilitantki opracowano metody kontrolowanej polimeryzacji glicydolu i jego pochodnych do polimerów o strukturze liniowej [17], rozgałęzionej [6], dendrytycznej typu „pom-pom” [18] czy strukturze typu „bottle-brush” [19]. Pomimo osiągnięcia wysokiego zaawansowania prac związanych z syntezą poliglicydolu, jak również prób jego zastosowania w biomedycynie [20], w momencie rozpoczęcia pracy habilitacyjnej w literaturze ukazało się niewiele danych na temat jego wykorzystania jako powłoki przeciwbiałkowej [7-9]. Badania dotyczyły wyłącznie dendrytycznego poliglicydolu więc ustalenie zależności między strukturą polimeru, właściwościami i strukturą powierzchni nim pokrytej, a jej odpornością na niespecyficzną adsorpcję białek nie było możliwe.

W pracy habilitacyjnej podjęto zagadnienie związane z opracowaniem warstw polimerowych opartych na liniowym poliglicydolu i jego kopolimerach z glikolem etylenowym zdolnych do redukcji osadzania się protein [H3, H10].

2.1. Immobilizacja liniowych polimerów glicydolu – synteza warstw i analiza struktury [H10]

Powierzchnie polimerowe zawierające warstwę poliglicydolu lub jego blokowych kopolimerów z glikolem etylenowym o strukturze liniowej (schemat na rys. 1.2), opisane w publikacji [H10], otrzymano wykorzystując metodę szczepienia do podłoża. Synteza obejmowała dwa etapy: modyfikację stałych podłoży w celu wprowadzenia reaktywnych grupy funkcyjnych oraz immobilizację na tych podłożach wcześniej syntezowanych polimerów glicydolu.

Schemat modyfikacji podłoży krzemowych przedstawia rysunek 2.1.



Rys. 2.1. Schemat przedstawiający modyfikację podłoża krzemowych (A) hydroksylacja, (B) i (D) sililowanie, (C) związanie warstwy pośredniej PE-MA [H10].

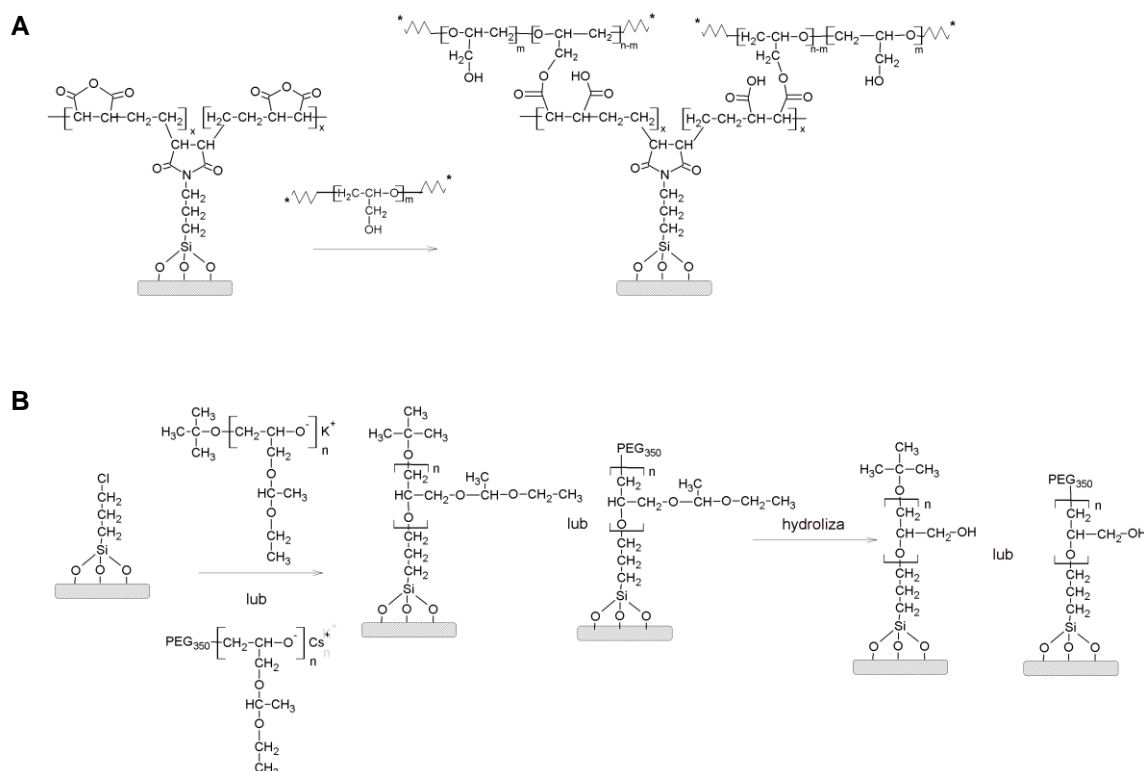
Modyfikacja podłoża krzemowych polegała na ich hydroksylacji (rys. 2.1 A), a następnie reakcji ze związkiem sililoorganicznym (3-(aminopropyl)trietoksylanem) – APTES lub (3-chloropropyl)-trietoksylanem – ChPTES; rys. 2.1 odpowiednio B i D). Ilość reaktywnych grup chloropropylowych na podłożu (Si-Cl), a więc i gęstość szczeplenia, regulowano zmianą stosunku molowego aktywnego związku ChPTES do nieaktywnego związku sililoorganicznego – trietoksymetylosilanu TEMS (w zakresie od 1 do 0,1 mola). Podłoża z grupami aminowymi (Si-NH₂) dodatkowo modyfikowano kopolimerem etylenu i bezwodnika maleinowego (PE-MA) by otrzymać tzw. warstwę pośrednią (rys. 2.1 C).

Na tak zmodyfikowane podłożo nanoszono syntezowane uprzednio polimery glicydolu. Wykorzystując procedury opracowane wcześniej w Pracowni habilitantki [21], dla celów pracy otrzymano liniowy poliglicydol o niskiej (LPG_L, LPG_{LT}) i wysokiej (LPG_H) masie molowej metodą odpowiednio anionowej i koordynacyjnej polimeryzacji glicydolu z chronioną grupą hydroksylową (eter 2,3-epoksypropylo-(1-etoksy)-etylowy). Kopolimery glicydolu i glikolu etylenowego (L(EO-PG)_{LT}) otrzymano na drodze anionowej polimeryzacji glicydolu z chronioną grupą hydroksylową inicjowaną makroinicjatorem poli(glikolu etylenowego) o M_n = 350 g/mol (PEG₃₅₀). Masy molowe i rozkłady mas molowych syntezowanych polimerów wyznaczono chromatografią żelową z detektorem wielokątowego rozpraszania światła. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Charakterystyka liniowych polimerów glicydolu [H10]

Oznaczenie polimeru w publikacji	Polimer	M _n [g/mol]	M _w /M _n
LPG _H	poliglicydol	1,9·10 ⁶	1,40
LPG _L		8·10 ³	1,04
LPG _{LT}		8·10 ³	1,04
L(EO-PG) _{LT}	kopolimer glicydolu i glikolu etylenowego	6·10 ³	1,10

Otrzymane i scharakteryzowane polimery glicydolu immobilizowano na zmodyfikowanych podłożach krzemowych (rys. 2.2).



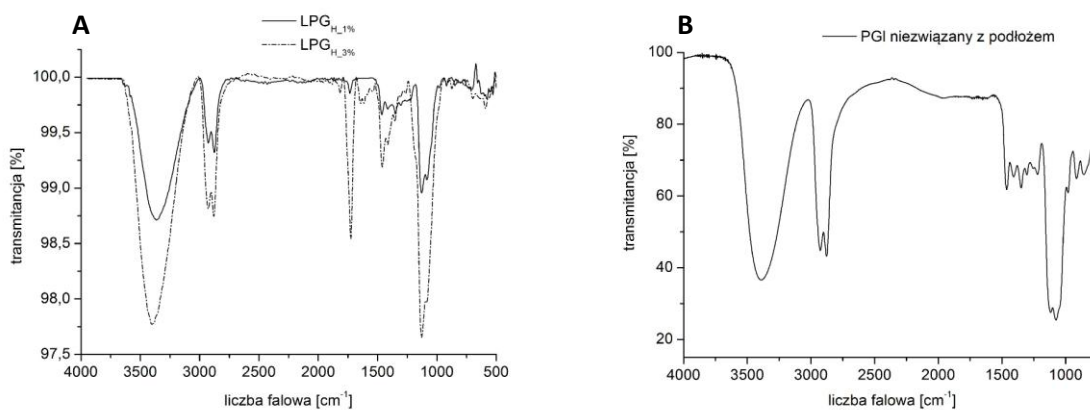
Rys. 2.2. Schemat przedstawiający kowalencyjne związanie polimerów glicydolu z modyfikowanym podłożem poprzez (A) reakcję grup funkcyjnych obecnych wzdłuż łańcucha polimerowego, (B) reakcję terminacji żyjącego łańcucha polimerowego [H10].

Otrzymano dwa typy warstw polimerowych: o strukturze przenikających się łańcuchów wielokrotnie szczepionych z podłożem (rys. 1.2 I oraz rys. 2.2 A) i o strukturze „szczotki polimerowej” (rys. 1.2 II i III oraz rys. 2.2 B).

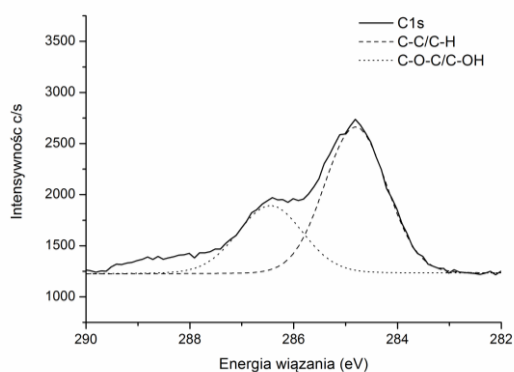
W pierwszym wypadku poliglicydol o wysokiej (LPG_H) i niskiej masie molowej (LPG_L) kowalencyjnie związano z podłożem w wyniku reakcji grup hydroksylowych polimeru (rozłożonych wzdłuż łańcucha polimerowego) z funkcyjnymi grupami bezwodnikowymi podłoża pochodzącymi od PE-MA (rys. 2.2 A). W tym celu metodą rozwirowania (spin-coatingu) nanoszono na podłoże roztwory poliglicydolu w metanolu o stężeniu od 0,5 do 10 %, aby uzyskać warstwy polimerowe o różnej grubości. Podłoża oznaczono następująco: $LPG_{H,0.5\%}$, $LPG_{H,1\%}$, $LPG_{H,2\%}$, $LPG_{H,3\%}$ i $LPG_{L,3\%}$, $LPG_{L,10\%}$.

W drugim wypadku szczepienie polimeru uzyskano w wyniku terminacji żyjących łańcuchów poliglicydolu z chronioną grupą hydroksylową lub łańcuchów kopolimeru glicydolu z chronioną grupą hydroksylową i glikolu etylenowego grupami chloropropylowymi podłoża (odpowiednio LPG_{LT} i $L(EO-PG)_{LT}$; rys. 2.2 B). Dzięki zastosowaniu podłoży o zmiennej liczbie reaktywnych grup Si-Cl można było zmieniać gęstość szczepienia łańcuchów polimerowych. Uzyskane podłoża oznaczono następująco: $LPG_{LT,1}$, $LPG_{LT,0.5}$, $LPG_{LT,0.1}$, $L(EO-G)_{LT,1}$ i $L(EO-G)_{LT,0.1}$.

Immobilizację poliglicydolu i jego kopolimerów na podłożach stałych potwierdzono wykorzystując techniki spektroskopowe FT-IR (dla struktur o przenikających się łańcuchach wielokrotnie szczepionych z podłożem – rys. 2.3) i XPS (dla struktur typu „szczotka polimerowa” – rys. 2.4).



Rys. 2.3. Widmo FT-IR przykładowej warstwy poliglicydolu (A) immobilizowanej na podłożu oraz dla porównania (B) poliglicydolu nie związanego z podłożem [H10].



Oznaczenie podłoża w publikacji	C1s	O1s	Si2p	Cl2p	C/O
Si-OH	19,0	37,0	44,0	0,00	0,51
Si-Cl	22,3	37,0	39,7	1,00	0,60
L(EO-G) _{LT_1}	53,4	23,1	23,5	0,00	2,31

Rys. 2.4. Analiza XPS przykładowej warstwy o strukturze „szcztoki polimerowej”: widmo pasma C1s warstwy L(EO-G)_{LT_1} oraz w tabeli skład podłoża modyfikowanego ChPTES i pokrytego polimerem L(EO-G)_{LT_1} [H10].

Na widmach FT-IR warstwy poliglicydolu na podłożu widoczne są charakterystyczne pasma absorpcji pochodzące od grup obecnych w tym polimerze (rys. 2.3). Dodatkowo pasmo widoczne przy 1730 cm⁻¹, odpowiadające drganiom rozciągającym grupy karbonylowej wiązania estrowego, świadczy o przereagowaniu grup hydroksylowych poliglicydolu z grupami bezwodnikowymi warstwy PE-MA, czyli o trwałym związaniu tego polimeru z podłożem.

W wypadku warstw o strukturze „szcztoki polimerowej” ilościowa analiza składu wykonana techniką XPS wykazała związanie z podłożem krzemowym zarówno związku siloorganicznego, jak i łańcuchów poliglicydolu. Wskazuje na to obecność sygnału chloru po reakcji modyfikacji, jak i jego zanik po reakcji terminacji żyjącym łańcuchem poliglicydolowym. Po reakcji terminacji obserwuje się również charakterystyczny pik C-O-C przy 286,4 eV (rys. 2.4), wzrost stosunku C/O oraz spadek stężenia krzemu.

Zastosowane w pracy techniki szczipienia liniowego poliglicydolu do podłoża nie wymagają modyfikacji łańcuchów polimerowych przed reakcją szczipienia, co odróżnia je od metod dotychczas opisanych [22,23]. Ponadto możliwe jest w stosunkowo szybki i łatwy sposób kowalencyjne związanie dobrze zdefiniowanych, liniowych poliglicydoli o różnych masach molowych z podłożem stałym. W wypadku powierzchni poliglicydolowych o strukturze „szcztoki polimerowej”, do ich otrzymania wykorzystano po raz pierwszy terminację żyjących łańcuchów polimeru przez grupy funkcyjne podłoża.

2.2. Właściwości warstw poliglicydolowych a zdolność do redukcji adsorpcji protein [H10]

Kluczowymi badaniami prowadzonymi w pracy habilitacyjnej w zakresie podłoży zdolnych do redukcji adsorpcji protein było określenie zależności między strukturą i właściwościami powierzchni pokrytej poliglicydołem a jej odpornością na niespecyficzną adsorpcję białek. Dlatego też morfologię warstwy, jej chropowatość (RMS - średni współczynnik chropowatości), grubość (h) oraz powinowactwo do wody skorelowano z ilością proteiny zaadsorbowanej na podłożu polimerowym.

Parametry warstw uzyskane technikami mikroskopii sił atomowych (AFM), elipsometrii oraz kąta zwilżania (θ) (pomiar dla warstwy polimerowej w stanie suchym oraz po inkubacji w wodzie) przedstawiono w tabeli 2.3.

Tabela. 2.3. Charakterystyka warstw polimerowych opartych na liniowym poliglicydołu i jego kopolimerach z glikolem etylenowym [H10]

	Oznaczenie warstw w publikacji	Kąt zwilżania [°]			Grubość warstwy h [nm]	Gęstość szczeplenia σ [łańcuch/nm ²]	RMS [nm]
		Θ_1 (suche podłoża)	Θ_2 (woda 20 °C)	$\Delta\Theta$ ($\Theta_1 - \Theta_2$)			
Warstwa o strukturze łańcuchów wielokrotnie szczeplonych z podłożem	LPG _{H_0.5} %	78±2	73±2	5	15±0,3	_a	0,15
	LPG _{H_1} %	72±1	65±1	7	31±0,3		0,25
	LPG _{H_2} %	64±2	55±2	9	61±0,5		0,39
	LPG _{H_3} %	55±1	43±2	12	120±0,7		0,41
	LPG _{L_3} %	54±1	52±1	2	7±0,3		0,42
	LPG _{L_10} %	50±1	43±1	7	140±0,7		0,21
Warstwa o strukturze „szczotki polimerowej”	LPG _{LT_1}	34±1	33±1	1	1,5±0,3	0,113	0,30
	LPG _{LT_0.5}	30±1	28±1	2	1,4±0,3	0,105	0,15
	LPG _{LT_0.1}	32±1	31±1	1	1,1±0,3	0,083	0,10
	L(EO-G) _{LT_1}	33±1	33±1	0	2,3±0,3	0,230	0,15
	L(EO-G) _{LT_0.1}	31±1	30±1	1	1,7±0,3	0,170	0,15

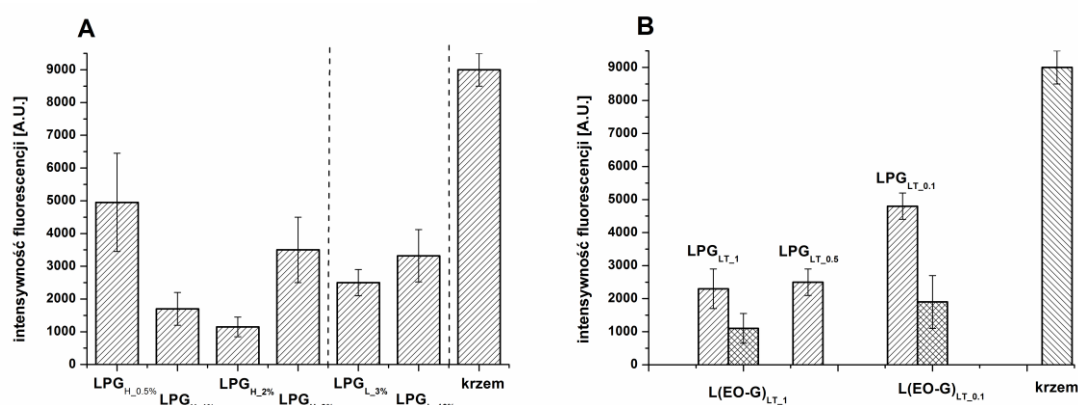
^anie wyznaczono z uwagi na specyficzny sposób związania polimeru z podłożem

Analiza AFM wykazała, że wszystkie otrzymane warstwy polimerowe charakteryzują się gładką strukturą powierzchni (średnia chropowatość od 0,1 do 0,42 nm, tabela 2.3). RMS nieznacznie rósł w każdej badanej grupie warstw wraz ze wzrostem grubości warstwy i gęstości szczeplenia polimerów.

Grubość warstw liniowego poliglicydołu wynosiła od 1,1 nm do 140 nm [H10]. Zależała ona od stężenia roztworu poliglicydołu stosowanego podczas immobilizacji, masy molowej polimeru, sposobu związania polimeru z podłożem oraz gęstości jego szczeplenia. Dla warstw poliglicydołu o strukturze przenikających się łańcuchów wielokrotnie szczeplonych z podłożem (LPG_H lub LPG_L) grubość warstwy rosła ze wzrostem stężenia polimeru oraz jego masy molowej. Warstwy polimerowe o strukturze „szczotki polimerowej” charakteryzowały się niewielką grubością warstwy, która rosła od 1,1 do 1,5 nm dla serii LPG_{LT} i od 1,7 do 2,3 nm dla serii L(EO-G)_{LT} wraz ze wzrostem liczby grup terminujących na podłożu. Gęstość szczeplenia łańcuchów polimerowych dla tego typu powierzchni wynosiła 0,105-0,230 łańcuchów/nm².

Powinowactwo do wody warstwy polimerowej określono poprzez pomiary kątów zwilżania powierzchni suchych i inkubowanych w wodzie w 20°C. Kąty te wynosiły od 30° do 78°, w zależności od składu immobilizowanego polimeru i struktury uzyskanej warstwy. Najniższą wartość θ uzyskano dla podłoży krzemowych pokrytych warstwą poliglicydolu o strukturze „szczotki polimerowej”.

Warstwy o właściwościach opisanych w tabeli 2.3 wykorzystano do badań adsorpcji protein. Badania te prowadzono we współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej i Genetyki, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Jako modelową proteinę zastosowano fibrynogen z ludzkiego osocza (sprzężony z barwnikiem fluorescencyjnym), który odgrywa kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi. Mierzono intensywność fluorescencji proteiny zaadsorbowanej na otrzymanych powierzchniach. Wyniki przedstawiono na rys. 2.5.



Rys. 2.5. Intensywność fluorescencji fibrynogenu zaadsorbowanego na podłożach pokrytych warstwą (A) liniowego poliglicydolu o strukturze przenikających się łańcuchów polimerowych, (B) liniowego poliglicydolu o strukturze „szczotki polimerowej” [H10].

Zaobserwowano, że otrzymane podłoża redukują adsorpcję fibrynogenu o 45-90 % w stosunku do podłoży niepokrytych polimerem.

Ilość proteiny zaadsorbowanej na warstwach polimerowych liniowego poliglicydolu (rys. 2.5 A) oraz jego kopolimerów z glikolem etylenowym (rys. 2.5 B) zależy od masy molowej immobilizowanego polimeru, grubości warstwy, gęstości szczepienia oraz sposobu związania polimeru z podłożem [H10]. Powierzchnie LPG_L o niższej masie molowej i strukturze jak pokazano na rys. 1.2 I wykazują mniejszą zdolność do przeciwdziałania osadzeniu się fibrynogenu niż te pokryte poliglicydolem o wyższej masie molowej (LPG_H). Dla warstwy LPG_H pokazano, że wraz ze wzrostem jej grubości spada adsorpcja fibrynogenu, przy czym dla powierzchni o największej grubości warstwy (LPG_{H,3%}) następuje ponowny wzrost adsorpcji proteiny. Zależność tą zaobserwowano również dla powierzchni pokrytej polimerem o niskiej masie i wyższej grubości warstwy (LPG_{L,10%}). W wypadku obu warstw (LPG_{H,3%} i LPG_{L,10%}) prawdopodobnie łańcuchy polimeru (bez względu na zastosowaną masę molową) utworzyły powłokę wielowarstwową luźno związaną z podłożem prowadząc do jej niejednorodności. Spowodowało to, że białko przenikało przez warstwę i osadzało się na podłożu. Podobne zachowanie obserwowano w innych pracach [24,25]. Dla powłoki o strukturze „szczotki polimerowej” (LPG_{LT} i L(EO-G)_{LT}) adsorpcja fibrynogenu rośnie wraz ze zmniejszaniem się gęstości szczepienia. Zależność tą można wytłumaczyć w oparciu o model określający stopień pokrycia powierzchni łańcuchami polimerowymi (tzw. „chain overlapping”) [26]. Uwzględnia on odległości pomiędzy szczepionymi łańcuchami oraz promień bezwładności łańcuchów polimerowych. Tylko dla powierzchni LPG_{LT,0.1} (o najniższej

otrzymanej gęstości szczeplenia łańcuchów) stopień pokrycia powierzchni łańcuchami polimerowymi jest niewystarczająco wysoki, co związane jest z występowaniem wolnych przestrzeni między łańcuchami. Prowadzi to do przenikania białka przez warstwę polimerową i jego adsorpcję na powierzchni. Powłoki o strukturze „szczotki polimerowej” oparte na kopolimerach glicydolu z glikolem etylenowym lepiej redukują adsorpcję fibrynogenu w porównaniu do powierzchni pokrytych samym poliglicydolem. Porównując adsorpcję fibrynogenu dla wszystkich powłok o strukturze liniowego polimeru zaobserwowano, że powłoki o strukturze „szczotki polimerowej” najefektywniej redukują ilość osadzającej się proteiny, co związane jest z gęstym upakowaniem hydrofilowych łańcuchów polimerowych na powierzchni.

2.3. Podsumowanie

- Zastosowanie metod szczeplenia do podłoża pozwoliło na uzyskanie warstw polieterowych opartych na liniowym poliglicydolu i jego kopolimerach w glikolem etylenowym o różnej strukturze warstwy (przeplatające się łańcuchy wielokrotnie szczeplone z podłożem lub „szczotka polimerowa”), o różnych masach molowych i różnej gęstości szczeplenia.
- Warstwy poliglicydolowe wykazywały powinowactwo do wody i grubość warstwy zależne od masy molowej immobilizowanego polimeru, jego składu i sposobu związania z podłożem oraz gęstości szczeplenia.
- Ustalono zależności pomiędzy składem polimerów, sposobem ich związania z podłożem, właściwościami otrzymanych powierzchni (powinowactwo do wody, grubość warstwy, morfologia) a odpornością uzyskanej powierzchni polimerowej na adsorpcję białek.
- Uzyskano warstwy polieterowe na podłożach krzemowych, które redukują adsorpcję fibrynogenu o 90 % w stosunku do podłoża niepokrytych badanymi polimerami. Powierzchnie, które najlepiej redukują ilość osadzających się protein to powierzchnie pokryte liniowymi kopolimerami glicydolu i glikolu etylenowego o strukturze „szczotki polimerowej” o wysokiej gęstości szczeplenia.

3. WARSTWY TERMOCZUŁYCH POLIMERÓW DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

Dotychczas opisane badania wykazały, że możliwe jest otrzymanie hydrofilowych warstw polimerowych opartych na poliglicydolu, które przeciwdziałają osadzeniu się protein. **Interesującym było określenie możliwości sterowania powinowactwem do wody otrzymanych powłok polimerowych (balans hydrofilowo-hydrofobowy) oraz możliwości „przełączania” tego powinowactwa w zależności od warunków zewnętrznych.** Takie zachowanie powłok może być wykorzystane do kontrolowanej adhezji komórek. Wiadomo, że komórki chętniej ulegają adhezji do podłoża hydrofobowych, natomiast powłoki hydrofilowe przeciwdziałają ich przyczepieniu się. Uzyskanie powłok o przełączalnym powinowactwie do wody otwiera więc drogę do ich wykorzystania w inżynierii tkankowej.

W praktyce do hodowli komórek stosuje się podłoża wykonane z modyfikowanego polistyrenu (TCPS). Dobrą adhezję komórek do tych podłoży uzyskano w wyniku odpowiedniego sterowania ich balansem hydrofilowo-hydrofobowym. Aby oddzielić namnożone komórki od TCPS stosuje się metody enzymatyczne, które prowadzą jednak do zniszczenia pewnej liczby komórek i naruszają ich integralność. W takim wypadku otrzymuje się zawiesinę pojedynczych komórek. Wykorzystanie takiej zawiesiny w medycynie regeneracyjnej jest powszechne. Zaobserwowano jednak pewne ograniczenia w jej stosowaniu np. trudności w kontroli lokalizacji wprowadzonych komórek czy powstawanie agregatów komórek często niepołączonych z tkanką gospodarza. W wypadku rusztowań zasiedlonych zawiesiną komórek problemem jest wzbudzenie reakcji zapalnych przez rusztowania, czy toksyczność produktów degradacji w wypadku rusztowań biodegradowalnych. W wielu wypadkach problemy te można by ominąć hodując komórki w postaci arkusza, a następnie po oddzieleniu go od rusztowania zastosować na miejsce zmienione chorobowo.

Do opracowania takiego rusztowania można wykorzystać polimery wrażliwe na zmiany temperatury (tzw. polimery termoczule). Zmiana temperatury pozwala zmieniać ich powinowactwo do wody. Polimery te są rozpuszczalne poniżej pewnej temperatury, a po jej przekroczeniu (tzw. temperatura przejścia fazowego – T_{CP}) przestają się rozpuszczać w wyniku utworzenia silnych oddziaływań wewnątrz- i międzylańcuchowych. Immobilizacja termoczulych polimerów na podłożu umożliwia uzyskanie powierzchni o termoprzełączalnych właściwościach, których powinowactwo do wody, morfologia i grubość ulegają odwracalnym zmianom w zależności od temperatury otoczenia [27].

W momencie rozpoczęcia pracy habilitacyjnej do hodowli arkuszy komórek i ich nieinwazyjnego odczepiania wykorzystywano termoprzełączalne powierzchnie polimerowe oparte głównie na poli(*N*-izopropylakryloamidzie) (PNIPAM) i jego kopolimerach. Ideę tę, zwaną inżynierią warstw komórkowych, zainicjował i rozwinął T. Okano [11]. Hodowlę komórek prowadzi się w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego polimeru termoczulego, kiedy powierzchnia jest hydrofobowa. Gdy komórki utworzą arkusz, temperatura zostaje obniżona, powierzchnia staje się hydrofilowa i arkusz komórek spontanicznie oddziela się od podłoża. Zbędne jest wówczas stosowanie enzymatycznych metod oddzielania komórek.

Początkowo uwaga skupiała się na polimerach opartych na PNIPAM. Polimery te charakteryzują się wartością temperatury T_{CP} w okolicach temperatury fizjologicznej, co czyni je atrakcyjnymi dla zastosowań biomedycznych. Jednak PNIPAM nie posiada łatwo dostępnych do modyfikacji grup funkcyjnych, wykazuje histerezę przejścia fazowego, może ulegać agregacji, a ponadto oddziałuje ze związkami biologicznymi t.j. aminokwasy czy proteiny. W miarę rozwoju badań na polimerami inteligentnymi poznano wiele termoczulych polimerów, pod wieloma względami bardziej obiecujących [28].

W pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych CMPW, w której prowadzone były prace, opracowano (z moim wiodącym udziałem) sposób modyfikacji poliglicydolu tak, by otrzymać termoczułe kopolimery wykazujące T_{CP} w zakresie od 10 °C do 90 °C [10, 29]. Poprzez odpowiednią modyfikację możliwe jest sterowanie powinowactwem do wody otrzymanych kopolimerów glicydolu tylko poprzez zmianę temperatury otoczenia.

Wykorzystując uzyskaną wiedzę, **w pracy habilitacyjnej podjęto badania nad opracowaniem powłok polimerowych opartych na modyfikowanym poliglicydolu, o sterowalnym temperaturą powinowactwie do wody i określeniem ich oddziaływań z komórkami. Badania rozszerzono również na inne termoczułe polimery: poli(metakrylany glikoli oligoetylenowych) oraz poli(2-podstawione-2-oksazoliny). Celem pracy było określenie przydatności tych powłok do hodowli i nieinwazyjnego odczepiania komórek w postaci arkusza.**

Wykorzystując techniki szczepienia od i do podłoża otrzymano termoczułe warstwy polimerowe immobilizowane na podłożu stałym (szklanym lub krzemowym). Podjęto również prace mające na celu ustalenie, czy można otrzymać termoczułe warstwy polimerowe o wystarczających parametrach mechanicznych (tzw. warstwy samonośne), aby mogły być one stosowane do hodowli komórek bez immobilizacji na podłożu.

Dla jasności autoreferatu, najpierw opisane zostaną syntezy i właściwości termoczułych warstw polimerowych zarówno samonośnych jak i immobilizowanych na podłożu (rozdział 3.1 i 3.2). Rozdział 3.3 związany będzie z określeniem wpływu składu i struktury polimerów oraz właściwości termoczułych powierzchni na zdolność hodowli i odczepiania komórek.

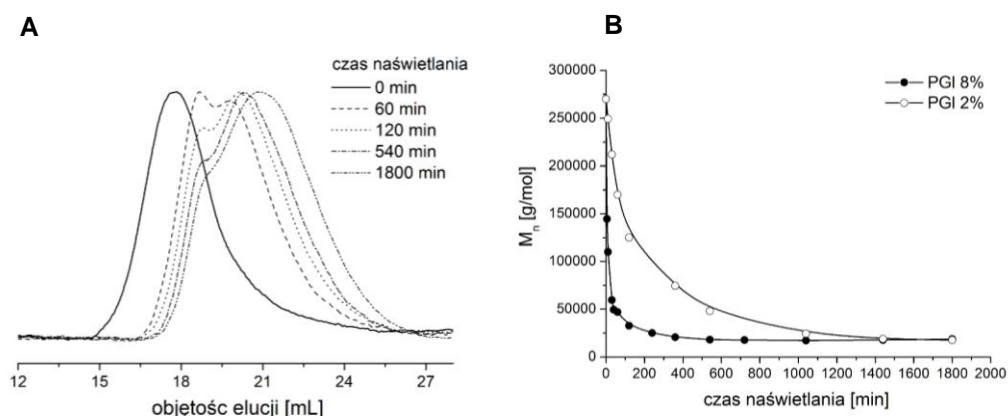
3.1. Termoczułe warstwy samonośne oparte na poliglicydolu – synteza i właściwości [H1, H2, H12]

Termoczułe warstwy samonośne (w postaci żeli polimerowych) oparte na polimerach glicydolu otrzymano wykorzystując metodę sieciowania fotochemicznego. Ta metoda otrzymywania żeli, w porównaniu do metod chemicznego sieciowania, jest prosta i nie wymaga stosowania wielu reagentów. Celem było opracowanie warunków fotosieciowania polimerów glicydolu tak, by otrzymać termoczułe warstwy o optymalnych parametrach mechanicznych do hodowli i odczepiania komórek.

Prace z zastosowaniem promieniowania UV wymagały najpierw ustalenia wpływu tego promieniowania na stabilność i ewentualną degradację łańcucha poliglicydolu. Zagadnienie to jest również istotne z uwagi na fakt, że ten rodzaj naświetlania wykorzystuje się w procesach sterylizacji biomateriałów. Zachowanie poliglicydolu pod wpływem promieniowania UV i jego ewentualna fotodegradacja nie były dotąd badane, więc w pracy [H2] podjęto to zagadnienie.

W pracy [H2] określono zachowanie wodnych roztworów poliglicydolu (o różnym stężeniu) pod wpływem naświetlania promieniowaniem UV. Zmiany właściwości fizycznych i chemicznych śledzono z wykorzystaniem chromatografii żelowej (SEC-MALLS), spektroskopii FT-IR i NMR.

W trakcie napromieniowania kształt chromatogramów zmienił się z monomodalnego na bimodalny, a ilość frakcji o niższej masie molowej wzrastała z czasem fotodegradacji. Masy molowe mierzone dla dwóch składowych bimodalnych chromatogramów różniły się o połowę. Nie zaobserwowano żadnego sygnału w zakresie niskich mas molowych, co wskazuje na brak oligomerycznych produktów rozkładu fotochemicznego (rys. 3.1 A). Może to wskazywać, że naświetlanie UV roztworów poliglicydolu prowadzi do fragmentacji łańcuchów polimeru, która następuje w wyniku rozszczepiania w centrum łańcucha polimerowego, ale nie na jego końcach.

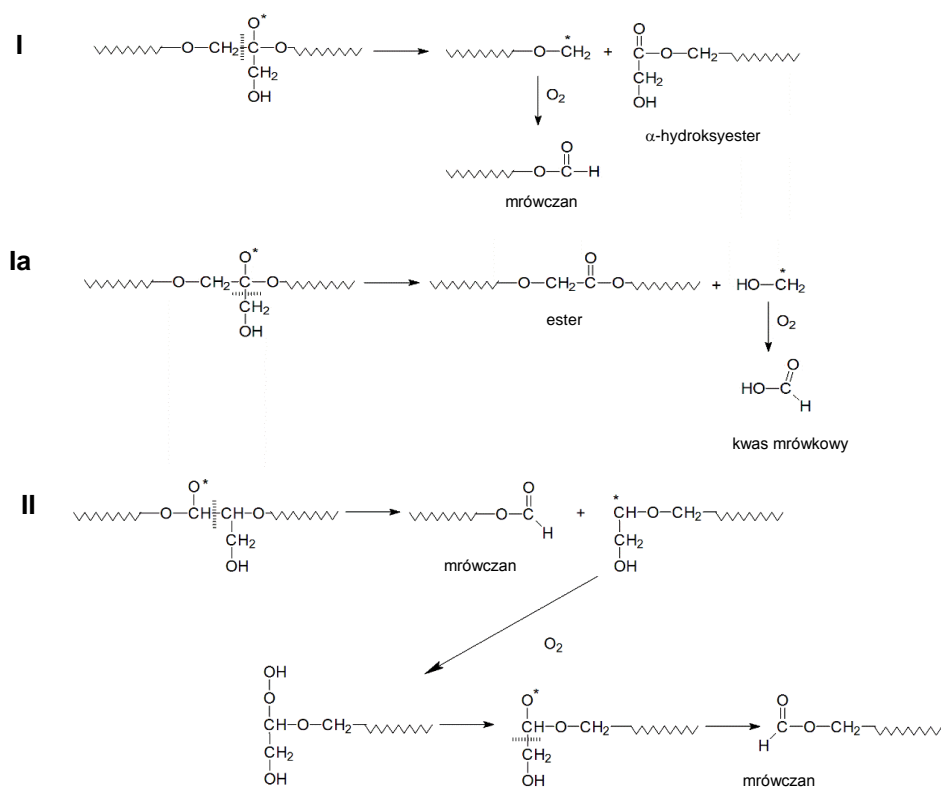


Rys. 3.1. (A) Chromatogramy poliglicydolu i produktów powstałych podczas jego naświetlania promieniowaniem UV; (B) Zmiany mas molowych poliglicydolu w funkcji czasu naświetlania ich roztworów wodnych o różnym stężeniu.

Masy molowe poliglicydolu spadały znacząco w funkcji czasu naświetlania. Dla roztworów o wyższym stężeniu masa molowa zmniejszyła się do połowy jej początkowej wartości już po 10 min działania promieniowania UV. Niezależnie od stężenia polimeru masa molowa zdegradowanego poliglicydolu osiągała wartość graniczną około 17 000 g/mol.

Degradacji fotochemicznej poliglicydolu towarzyszyło silne zakwaszenie roztworów. pH zmniejszyło się z 7 do 3. Oznacza to, że w czasie degradacji do roztworu uwalniane są protony z grup kwasowych. Analiza FT-IR oraz ^1H NMR i ^{13}C NMR wykazała, że po naświetlaniu powstałe produkty degradacji zawierają grupy estrowe, α -hydroksyestrowe i mrówczanowe.

W oparciu o uzyskane dane zaproponowano mechanizm fotochemicznej degradacji poliglicydolu [H2] (rys. 3.2).



Rys. 3.2. Proponowany mechanizm degradacji poliglicydolu pod wpływem promieniowania UV [H2]. Cięcie łańcucha polimerowego w wyniku rozkładu rodników utworzonych na trzecio- (I i Ia) i drugorzędowym atomie węgla (II).

Proces degradacji rozpoczyna się od powstania wodoronadtlenków przy atomie węgla grupy metyle-
nowej w pozycji α do atomu tlenu grupy eterowej. Nadtlenki te ulegają rozkładowi tworząc rodniki
alkoksyłowe. Uwzględniono możliwość tworzenia rodników na obu atomach węgla łańcucha główne-
go (rys. 3.2 I i Ia). Rodniki alkoksyłowe powodują cięcie łańcucha polimerowego pomiędzy atomami
węgla w łańcuchu głównym lub w grupie bocznej. Prowadzi to do powstania grup estrowych w łańcu-
chu polimerowym oraz do grup mrówczanowych i α -hydroksyestrowych na końcach łańcucha poli-
merowego (rys. 3.2). W wyniku tych reakcji możliwe jest również tworzenie kwasu mrówkowego,
co przekłada się na silne zakwaszenie roztworów podczas naświetlania. Grupy mrówczanowe, estro-
we i α -hydroksyestrowe mogą hydrolizować tworząc grupy hydroksyłowe na końcach łańcucha poli-
merowego oraz wolny kwas mrówkowy.

W pracy [H2] wykazano, że naświetlanie poliglicydolu promieniowaniem UV o długości fali 254 nm
powoduje degradację tego polimeru. Ustalono, że promieniowanie UV generuje rodniki na łańcuchu
poliglicydolu, które w określonych warunkach powodują jego rozkład. Rodniki wygenerowane na
łańcuchu polimerowym mogą jednak również w odpowiednio zadanych warunkach rekombinować
prowadząc do sieciowania łańcuchów polimerowych i tworzenia żelu [30]. Powyższe założenie wyko-
rzystano w pracy [H12], gdzie w obecności fotouczulacza aktywowanego promieniowaniem UV prze-
prowadzono proces sieciowania pochodnych poliglicydolu.

Do sieciowania wykorzystano niemodyfikowany poliglicydol oraz poliglicydol, którego grupy hydrok-
syłowe modyfikowano izocyjanianem etylu uzyskując termoczuły polimer [10]. Użyto poli(glicydol-
ran-etylokarbaminian glicydylu) (PGI_URE) o różnym stopniu podstawienia grup hydroksyłowych
grupami hydrofobowymi, a zatem o różnej wartości T_{CP} (tabela 3.1). Zastosowano fotouczulacze:

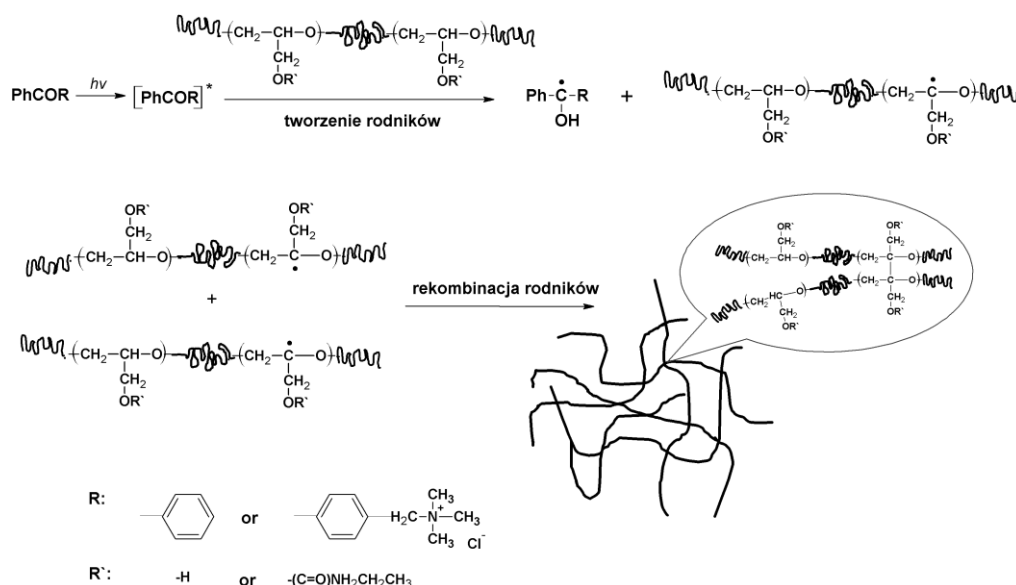
benzofenon (BP) oraz jego pochodną – chlorek (4-benzoilobenzyl)trimetyloamoniowy (BBTMAC) o stężeniu 2 %, 5 % lub 10 %. Z mieszaniny modyfikowany poliglicydol/fotouczulacz wylewano folie, które następnie naświetlano promieniowaniem UV [H12].

Tabel. 3.1. Charakterystyka polimerów użytych do fotosieciowania [H1, H12]

Oznaczenie polimeru w publikacji	M_n [g/mol]	M_w/M_n	[OH]:[EtIz]	St. modyfikacji [%]	T_{CP} [°C]
PGI	$1,25 \cdot 10^6$	1,37	-	-	a)
PGI_URE1	$1,45 \cdot 10^6$	1,40	1:0,41	40	28
PGI_URE2	$1,40 \cdot 10^6$	1,40	1:0,38	37	33
PGI_URE3	$1,30 \cdot 10^6$	1,57	1:0,34	32	46

a) polimer całkowicie rozpuszczalny w mierzalnym zakresie temperatur

W wyniku absorpcji fotonu BP lub BBTMAC ulegają fotodysocjacji na rodniki, które zdolne są do generowania rodników na łańcuchu polimerowym. W wyniku rekombinacji rodników powstałych na łańcuchach następuje sieciowanie polimeru i tworzenie żelu (rys. 3.3).



Rys. 3.3. Schemat fotosieciowania poliglicydolu i jego pochodnych [H12].

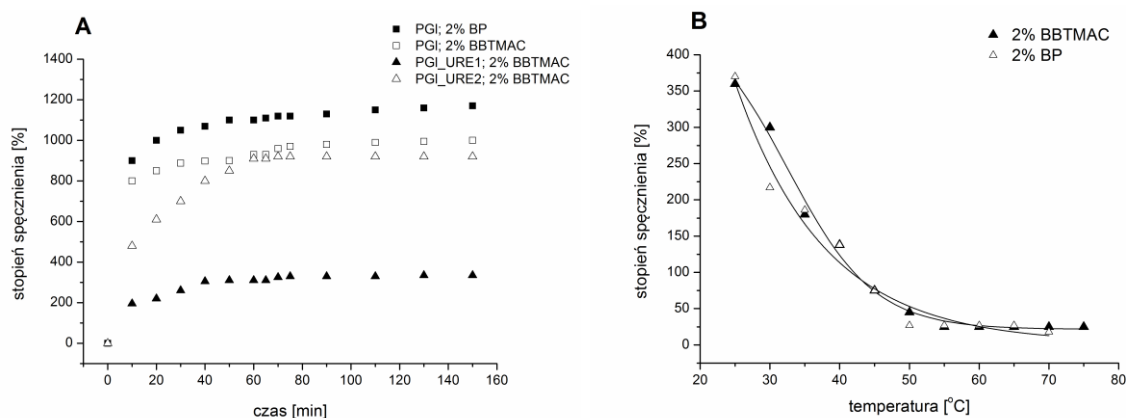
Określono wpływ składu wyjściowego kopolimeru, rodzaju użytego fotouczulacza i jego stężenia na wydajność sieciowania (określaną jako ilość frakcji żelowej) oraz na stopień spęcznienia żelu w temperaturze pokojowej i podwyższonej.

Ilość frakcji żelowej, bez względu na rodzaj użytego fotouczulacza, spadała wraz ze stężeniem fotouczulacza. Zaobserwowano, że najlepszą wydajność sieciowania (90 % dla obu fotouczulaczy) osiągnięto stosując stężenie fotouczulacza równe 2 %. Sieciowanie modyfikowanych poliglicydoli (PGI_URE) zachodzi ze znacznie niższą wydajnością niż niemodyfikowanego PGI. Ilość frakcji żelowej wynosi wówczas tylko około 35 %, niezależnie od rodzaju użytego fotouczulacza. Wydaje się, że obecność hydrofobowych grup etylokarbaminowych w polimerze hamuje tworzenie się rodników na łańcuchu, tłumiąc proces fotosieciowania.

Stwierdzono stosunkowo niską wydajność sieciowania oraz zmniejszenie się ilości frakcji żelowej przy wzroście ilości fotouczulacza. Badania frakcji rozpuszczalnej żelu po jego naświetleniu promieniowa-

niem UV wykazały, że następuje spadek masy molowej polimerów oraz poszerzenie rozkładu mas molowych. Na tej podstawie ustalono, że podczas tworzenia żelu procesowi fotosieciowania towarzyszy również degradacja łańcuchów polieterowych [H12].

W pracy [H12] ustalono również optymalne parametry sieciowania, dla których degradacja zachodzi w stopniu minimalnym, a otrzymane żele charakteryzują się stosunkowo wysokim stopniem usieciowania. Dla tych materiałów zbadano ich zachowanie się w wodzie w zakresie temperatur od 25 °C do 75 °C (przykładowe dane na rys. 3.4), co ma istotne znaczenie z uwagi na ich potencjalne wykorzystanie jako podłoża do hodowli komórkowych.



Rys. 3.4. (A) Kinetyka pęcznienia przykładowych żeli uzyskanych podczas fotosieciowania poliglicydolu i modyfikowanego poliglicydolu; (B) Stopień spęcznienia żeli otrzymanych w wyniku fotosieciowania PGI_URE1, w funkcji temperatury.

Równowagowe stopnie spęcznienia żeli otrzymanych z PGI wynoszą od 900 do 1700 % i zależą od ilości użytego fotouczulacza. Można zauważyć, że żele sieciowane BBTMAC wykazywały nieco niższy stopień spęcznienia niż te sieciowane BP. Żele uzyskane z modyfikowanego poliglicydolu (PGI_URE1, 2 i 3 sieciowane w obecności tej samej ilości tego samego fotouczulacza) wykazują niższą absorpcję wody niż żele PGI (rys. 3.4 A). Wynika to z obecności hydrofobowych grup etylokarbaminowych ograniczających tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami polimeru a cząsteczkami wody.

Otrzymane żele PGI_URE były termoczułe. Wykazywały one objętościowe przejście fazowe (spadek stopnia spęcznienia ze wzrostem temperatury), choć w dość szerokim zakresie temperatur (przykładowe dane na rys. 3.4 B). Temperatura objętościowego przejścia fazowego żeli (T_{VPT}) wynosiła dla PGI_URE1 30 °C (bez względu na typ fotouczulacza), dla PGI_URE2 35 °C (bez względu na typ fotouczulacza) oraz dla PGI_URE3 40 °C (BP) lub 45 °C (BBTMAC).

Zaobserwowano, że niektóre żele nie były wystarczająco stabilne mechanicznie. W trakcie pęcznienia bądź kurczenia rozrywały się na mniejsze fragmenty. Dodatkowo ponieważ procesowi sieciowania towarzyszyła degradacja polimeru, a odpowiedź żelu na zmianę temperatury była wolna, postanowiono nie wykorzystywać otrzymanych żeli do badań ich oddziaływań z komórkami.

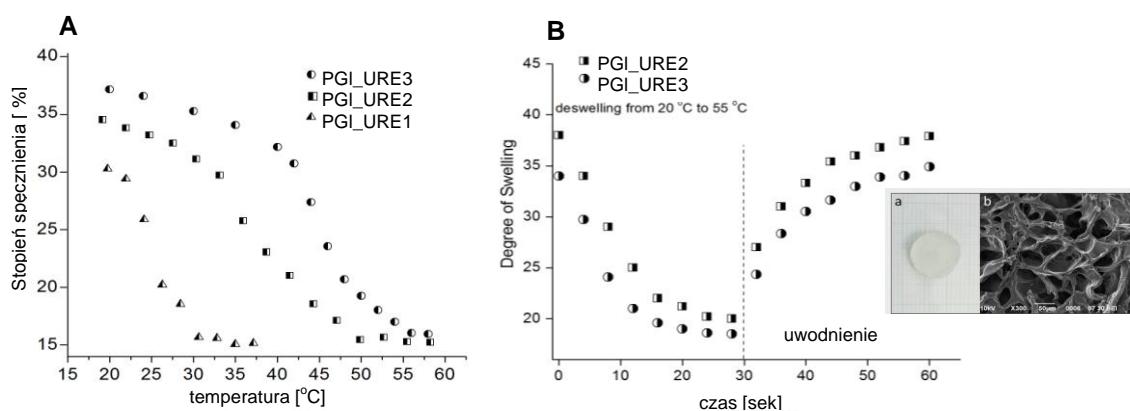
By zwiększyć wytrzymałość mechaniczną termoczułych żeli, polepszyć ich zachowanie w wodzie pod wpływem zmian temperatury i przede wszystkim by wyeliminować degradację łańcucha polimerowego spowodowaną promieniowaniem UV, w pracy habilitacyjnej [H1] proces fotosieciowania przeprowadzono dla wodnej mieszaniny polimer/fotouczulacz po jej zamrożeniu otrzymując tzw. kriożele. Podczas zamrażania woda tworzy kryształy lodu a rozpuszczone w niej związki akumulują się w tzw. niezamrożonej fazie ciekłej. Naświetlanie promieniowaniem UV powoduje, że sieciowanie

i tworzenie żelu zachodzi właśnie w tej fazie, a kryształy lodu działają jako porogen. Z tego względu czas naświetlania można zminimalizować ograniczając ewentualną degradację polimeru. Dodatkowo kriożele w porównaniu do konwencjonalnych żeli charakteryzują się znacznie szybszą reakcją na uwodnienie i dehydratację.

Poliglicydol i jego termowrażliwe pochodne PGI_URE1, PGI_URE2 i PGI_URE3 omówione wcześniej (tabela 3.1) zamrażano w obecności fotouczulacza BBTMAC, a następnie krótko naświetlano promieniowaniem UV. Mechanizm sieciowania polimerów w niezamrożonej fazie ciekłej przebiega tak jak w wypadku fotosieciowania bez zamrażania (rys. 3.3). W pracy badano wpływ składu kopolimeru, jego stężenia podczas sieciowania i czasu naświetlania na efektywność tworzenia kriożeli (frakcja żelowa) oraz na ich właściwości (równowagowy stopień spęcznienia oraz T_{VPT}).

Otrzymano kriożele z wydajnością 73-88 %, charakteryzujące się stosunkowo wysoką zdolnością do pęcznienia w wodzie. Kriożele otrzymane z poliglicydolu pęczniały do 7000 %, podczas gdy kriożele z termoczułych polimerów PGI_URE do 5200 %. Niższy stopień spęcznienia materiałów PGI_URE spowodowany był obecnością hydrofobowych grup etylokarbaminowych w łańcuchu polimerowym.

Kriożele PGI_URE charakteryzowały się termoczułością (rys. 3.5). Ich stopień spęcznienia ulegał odwracalnym zmianom wraz ze zmianami temperatury otoczenia. Skład wyjściowego kopolimeru poddanego fotosieciowaniu znacząco wpływał na wartość T_{VPT} . Im wyższa zawartość grup hydrofobowych w kopolimerze tym niższa wartość T_{VPT} (rys. 3.5 A). Otrzymane kriożele bardzo szybko reagowały na zmiany temperatury (rys. 3.5 B). Takie ultra-szybkie zmiany pęcznienia i kurczenia się kriożeli są związane z ich makroporowatą strukturą.



Rys. 3.5. (A) Zmiany stopnia spęcznienia kriożeli otrzymanych z termoczułych PGI_URE o różnym składzie w funkcji temperatury; (B) Kinetyka pęcznienia/kurczenia kriożeli PGI_URE.

Kriożele PGI_URE wykazywały cykliczne zmiany pęcznienia-kurczenia w funkcji temperatury, co jest korzystne z uwagi na możliwość ich wielokrotnego wykorzystania. Ustalono, że do piątego cyklu kriożele osiągają ten sam stopień spęcznienia. Oznacza to, że materiał ten jest w stanie odtworzyć swoją wewnętrzną strukturę i objętość po przejściu zmian ze stanu spęcznionego do skurczonego bez utraty właściwości mechanicznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono optymalny czas naświetlania i stężenie polimeru konieczne do otrzymania kriożeli o wysokiej frakcji żelowej, stopniu spęcznienia oraz szybkiej i odwracalnej reakcji na zmieniającą się temperaturę otoczenia. Kriożele te wykorzystano jako warstwy samonośne do badań oddziaływań z komórkami.

Opisane w pracach [H1, H2, H12] badania pozwoliły na:

- określenie granicznych parametrów (t.j. stężenie polimeru, czas naświetlania), w których następuje rozpad łańcucha polimeru pod wpływem promieniowania UV. Należy mieć to na uwadze planując przewidywane zastosowania poliglicydolu;
- otrzymanie samonośnych warstw poliglicydolu i jego termoczulych pochodnych (poli(glicydol-ranetylokarbaminian glicydylu)) w wyniku fotosieciowania promieniowaniem UV mieszanin polimer/fotouczulacz. Uzyskano żele, które są termoczule, a wartości ich T_{VPT} można sterować poprzez skład wyjściowego polimeru poddanego sieciowaniu. Żele te nie wykazywały jednak zadowalających właściwości mechanicznych, ponadto w trakcie naświetlania polimerów procesowi sieciowania towarzyszyła ich degradacja;
- otrzymanie tzw. kriożeli w wyniku zastosowania techniki fotosieciowania mieszaniny termoczulę poliglicydol/fotouczulacz po jej zamrożeniu. Kriozele te charakteryzowały się wysoką wytrzymałością mechaniczną, nie ulegały degradacji podczas naświetlania oraz, co istotne, wykazywały szybką reakcję (sekundy) na uwodnienie i odwodnienie pod wpływem zmiany temperatury otoczenia;
- Otrzymane w pracy habilitacyjnej termoczule kriozele, których temperatura objętościowego przejścia fazowego wynosiła 25 °C, wykorzystano do badań ich oddziaływań z komórkami. Wybór uzasadniony jest tym, że ten kriożel w warunkach prowadzenia hodowli komórkowych (temp. 37 °C) jest hydrofobowy, może więc sprzyjać adhezji i namnażaniu komórek.

3.2. Termoczule warstwy polimerowe immobilizowane na podłożach

Jak wcześniej wspomniano, w pracy habilitacyjnej podjęto również badania związane z określeniem możliwości wykorzystania do hodowli i odczepiania komórek termoczulych warstw polimerowych, opartych na modyfikowanym poliglicydolu, ale immobilizowanych na podłożu. Z uwagi na znaczący postęp jaki nastąpił w dziedzinie chemii polimerów wykazujących wrażliwość na temperaturę badania te rozszerzono ponadto na inne termoczule polimery: poli(metakrylany glikoli oligoetylenowych) oraz poli(2-podstawione-2-oksazolin).

W rozdziale tym najpierw opisana zostanie synteza i właściwości warstw modyfikowanego poliglicydolu immobilizowanego na podłożu (podrozdział 3.2.1), a następnie warstw poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) (podrozdział 3.2.2) i poli(2-podstawionych-2-oksazolin) (podrozdział 3.2.3). W rozdziale 3.3 przedstawione zostanie wykorzystanie tych podłoży do hodowli i odczepiania komórek.

3.2.1. Termoczulę poliglicydol immobilizowany na podłożu [H5]

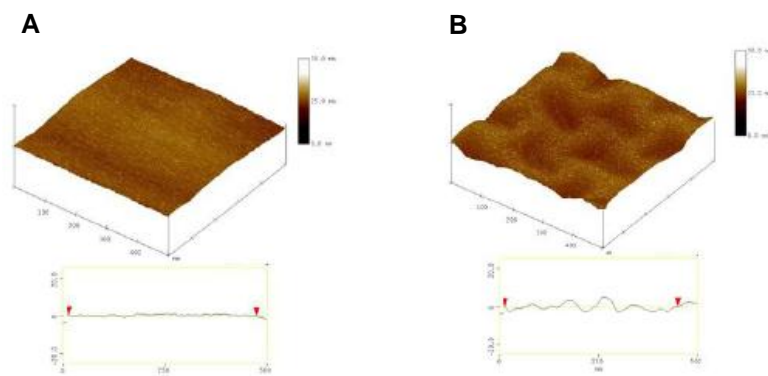
Powierzchnie polimerowe zawierające warstwę termoczulych pochodnych poliglicydolu (rys. 1.2 B_I) otrzymano wykorzystując technikę szczepienia do podłoża. Synteza termoczulych warstw była analogiczna do przedstawionej w rozdziale 2.1 syntezy warstw poliglicydolowych badanych pod kątem osadzania się protein. Obejmowała ona dwa etapy: modyfikację podłoży stałych w celu wprowadzenia reaktywnych grup bezwodnikowych (rys. 2.1 A, B i C), a następnie immobilizację na takich podłożach wcześniej syntezowanych polimerów glicydolu (rys. 2.2 A), w tym wypadku termoczulych.

Do badań wykorzystano poli(glicydol-ran-etylokarbaminian glicydylu) o $M_n = 2 \cdot 10^6$ g/mol, $M_n/M_w = 1,3$, mający 40 % grup etylokarbaminowych w łańcuchu polimerowym. Polimer ten (mPGL – oznaczenie polimeru w publikacji) wykazuje temperaturę przejścia fazowego w 25 °C. Wybór polimeru o takiej wartości T_{CP} podyktowany był koniecznością prowadzenia hodowli komórkowej w temperaturze 37 °C. W tej temperaturze polimer jest hydrofobowy, czyli może sprzyjać adhezji i namnażaniu komórek.

Na podłoża krzemowe lub szklane zawierające warstwę PE-MA nanoszono powyższy polimer w różnym stężeniu (od 0,25 % do 10 %). W wyniku reakcji grup bezwodnikowych podłoża z grupami hydroksylowymi mPGL uzyskano warstwę polimerową, w której łańcuchy były wielokrotnie, kowalencyjnie szczipione z podłożem (rys. 1.2 B I).

Obecność polimeru na podłożu potwierdzono techniką FT-IR. W widmie obserwowano charakterystyczne pasma absorpcji pochodzące od grup obecnych w mPGL. Po reakcji szczipienia polimeru mPGL znika także obecne wcześniej pasmo absorpcyjne przy 1850 cm^{-1} pochodzące od grupy bezwodnikowej C=O w warstwie PE-MA. Dowodzi to, że większość grup bezwodnikowych warstwy PE-MA przereagowała z grupami hydroksylowymi poli(glicydolu-ran-etylokarbaminianu glicydylu).

Obserwacje warstw mPGL metodą AFM pokazały, że ich morfologia zależy od stężenia roztworu polimeru użytego podczas nanoszenia na podłoże. Dla stężeń od 0,25 % do 1 % otrzymano gładkie i regularne warstwy polimerowe (RMS = 0,09-0,18 nm) (rys. 3.6 A). Zastosowanie bardziej stężonego roztworu (10 %) prowadziło do otrzymania warstwy o „pofałdowanej”, nieregularnej strukturze (RMS 1,3 nm) (rys. 3.6 B).



Rys. 3.6. Zdjęcia AFM i profil chropowatości podłoża pokrytych mPGL o stężeniu 0,25 % (A) i 10 % (B).

Wykorzystując pomiary elipsometryczne zmierzono grubości warstw polimerowych, a pomiary kąta zwilżania dostarczyły informację o ich powinowactwie do wody (tabela 2.5). Badania wykonano dla warstw suchych oraz inkubowanych w wodzie w temperaturze 20 °C oraz 40 °C, czyli w warunkach poniżej i powyżej temperatury T_{CP} termoczulego polimeru immobilizowanego na powierzchni. Pozwoliło to oszacować, czy otrzymane warstwy wykazują termowrażliwość i mogą być wykorzystane do badań związanych z adhezją komórek, ich namnażaniem i oddzieleniem od podłoża w postaci arkusza.

Tabela 2.5. Grubość warstw mPGL oraz ich powinowactwo do wody

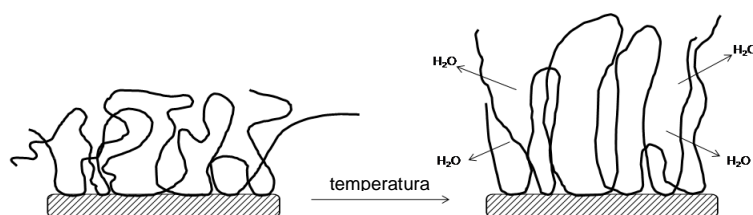
Stężenie roztworu mPGL podczas immobilizacji	Kąt zwilżania [°]		Grubość warstwy [nm]		
	woda/20 °C	woda/40 °C	sucha	woda/20 °C	woda/40 °C
0,25 %	60±3	68±2	20±0,7	30±0,5	36±0,5
0,5 %	55±3	65±4	28±0,5	31±0,4	33±0,4
1 %	50±3	70±2	34±0,5	38±0,4	41±0,5
10 %	30±3	55±2	24-60±0,5 ^a	27-60±0,5 ^a	47±0,5
PGL	50±3	51±3		---	^b

^awarstwa charakteryzowała się różną grubością w zależności od miejsca pomiaru

^bnie mierzono

Średni kąt zwilżania warstw mPGL w temperaturze 20 °C zmieniał się między 30 a 60 °, w zależności od stężenia roztworu polimerowego stosowanego do immobilizacji. W temperaturze 40 °C powinowactwo podłoży do wody uległo zmianie i wartość kąta zwilżania wzrosła. Wskazuje to na wzrost hydrofobowości podłoży po przekroczeniu T_{CP} immobilizowanego polimeru. Dla porównania zwilżalność podłoży pokrytych niemodyfikowanym poliglicydolem, który jest hydrofilowy i nie wykazuje termowrażliwości, nie uległa zmianie przy wzroście temperatury.

Grubość warstwy polimerowej „suchej” rosła od 20 nm do 34 nm wraz ze wzrostem stężenia nanoszonego mPGL. Dla 10 % stężenia roztworu polimeru otrzymano warstwę nierównomierną i „pofałdowaną” o grubości od 24 do 60 nm (niejednorodność warstwy potwierdziły również zdjęcia AFM, rys. 3.6 B). Grubość wszystkich warstw inkubowanych w wodzie w 20 °C zwiększyła się, co świadczy o ich pęcznieniu na skutek absorpcji wody. Nieoczekiwanie wzrost temperatury do 40 °C (czyli powyżej temperatury T_{CP} mPGL) powodował dalszy, choć nieznaczny wzrost grubości warstw. Wiadomo, że dla warstw o strukturze „szczotki polimerowej” grubość zmniejsza się pod wpływem ogrzewania na skutek kurczenia się łańcuchów polimerowych [31]. Obserwowane w pracy [H5] zachowanie warstw mPGL może być wynikiem ich specyficznej struktury powstającej w wyniku przeplatania się łańcuchów wielokrotnie szczepionych z podłożem (rys. 3.7). Ogrzewanie układu powoduje, że pomimo dehydratacji warstwy, łańcuchy polimerowe ulegają „rozciąganiu” na skutek oddziaływań hydrofobowych między nimi.



Rys. 3.7. Schemat reakcji warstwy poli(glicydolu-ran-etylokarbaminianu glicydylu) na zmiany temperatury otoczenia.

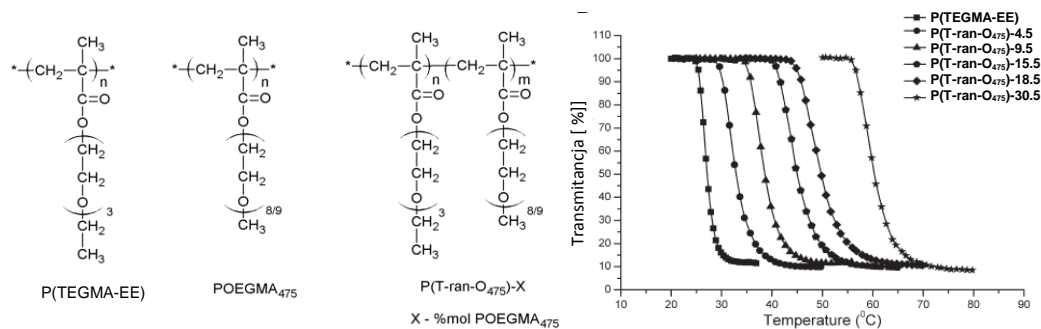
Otrzymane powierzchnie poli(glicydolu-ran-etylokarbaminianu glicydylu) wykazywały termoczułość – wraz ze wzrostem temperatury zmieniały swoje powinowactwo do wody. W dalszej części pracy habilitacyjnej posłużyły zatem do badań związanych z hodowlą i odczepianiem komórek.

3.2.2. Termoczułe poli(metakrylany glikoli oligoetylenowych) na podłożu [H4, H6]

Do otrzymania termoczułych powłok polimerowych oprócz modyfikowanego poliglicydolu wykorzystano również poli(metakrylany glikoli oligoetylenowych) (POEGMA). Jest to szeroka grupa polimerów, która w ostatnich latach wzbudziła znaczne zainteresowanie [32]. Większość monomerów metakrylanów glikoli oligoetylenowych jest komercyjnie dostępna i łatwo polimeryzowalna przy użyciu technik kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej (w szczególności kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu - ATRP). Amfifilowa struktura tych polimerów (gdzie łańcuch boczny glikolu oligoetylenowego jest odpowiedzialny na rozpuszczalność i tworzenie wiązań wodorowych z cząsteczkami wody, a łańcuch główny za konkurujące oddziaływania hydrofobowe) powoduje, że wiele z nich wykazuje termoczułość. W porównaniu z powszechnie stosowanym PNIPAM, termoczułe POEGMA mają wiele zalet np. charakteryzują się wąskim przejściem fazowym o nieznacznej histerezie, a wpływ czynników zewnętrznych na wartości ich T_{CP} jest niewielki. **W momencie prowadzenia badań, w literaturze nie opisano wykorzystania poli(metakrylanów glikoli oligoetylenowych) immobilizowanych na powierzchni do hodowli i odczepiania komórek w postaci arkuszy.**

➤ Wybór polimeru o żądanej temperaturze przejścia fazowego [H6]

W ramach pracy habilitacyjnej, wykorzystując technikę ATRP zsyntezowano szereg (ko)polimerów opartych na metakrylanie eteru monoetylowego glikolu trietylenowego (TEGMA-EE). Jako drugi komonomer wybrano metakrylan eteru monometylowego glikolu oligoetylenowego – OEGMA₄₇₅, gdzie 475 to masa molowa jednostek glikolu etylenowego w merze. Celem badań było określenie wpływu składu kopolimeru na temperaturę jego przejścia fazowego, a następnie wybór polimeru wykazującego T_{CP} w warunkach sprzyjających hodowli komórek (rys. 3.8) [H6].

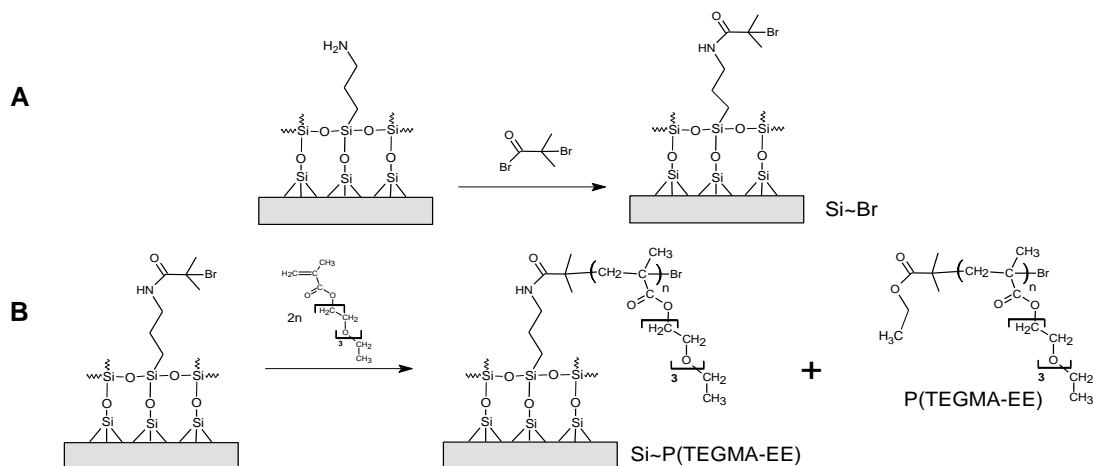


Rys. 3.8. Struktury chemiczne otrzymanych (ko)polimerów TEGMA-EE oraz wykres zależności transmitancji ich wodnych roztworów od temperatury (stężenie 0,5 g/L).

Z wykorzystaniem technik ¹H NMR oraz FT-IR potwierdzono strukturę chemiczną otrzymanych kopolimerów oraz obliczono ich skład. Skład kopolimerów od 4,5 % mol do 30,5 % mol OEGMA₄₇₅ był w każdym przypadku zbliżony do składu wyjściowego mieszaniny reakcyjnej. Masy molowe wyznaczone techniką SEC-MALLS mieściły się z zakresie od 24 500 g/mol do 50 200 g/mol. Chromatogramy wszystkich (ko)polimerów były monomodalne i symetryczne, a M_w/M_n nie przekraczała wartości 1,34. W zależności od składu i masy molowej (ko)polimery wykazywały temperaturę przejścia fazowego w zakresie 25-60 °C (rys. 3.8).

Do syntezy powierzchni polimerowych wytypowano poli(metakrylan eteru monoetylowego glikolu trietylenowego) (P(TEGMA-EE)), którego wartość temperatury T_{CP} wynosiła 25 °C (dla stężenia 5 g/L).

➤ Immobilizacja poli(metakrylanu eteru monoetylowego glikolu trietylenowego) na podłożu [H4]
 Powierzchnie polimerowe otrzymano wykorzystując szczepienie od podłoża [H4], w którym grupy bromkowe immobilizowane na podłożu krzemowym lub szklanym inicjowały polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu (SI-ATRP) monomeru TEGMA-EE. Do syntezy warstw Si~P(TEGMA-EE) zastosowano czteroetapową procedurę złożoną z hydroksylacji podłoża, ich aminosililowania, wprowadzenia inicjatora ATRP oraz SI-ATRP TEGMA-EE (rys. 3.9).



Rys. 3.9. Schemat syntezy warstw Si~P(TEGMA-EE): (A) wprowadzenie inicjatora ATRP na podłoże; (B) SI-ATRP metakrylanu eteru monoetylowego glikolu trietylenowego.

Etap hydroksylacji i aminosililowania (wprowadzenia na podłoże grup aminowych pochodzących od APTES) przebiegał analogicznie do tego opisanego w rozdziale 2.1 (rys. 2.1 B). Inicjator SI-ATRP, powstały w reakcji grup aminowych podłoża z bromkiem 2-bromo-2-metylopropionylowym ($\text{Si}^{\sim}\text{Br}$), inicjował następnie polimeryzację monomeru TEGMA-EE. Otrzymano warstwę o strukturze „szczotki polimerowej” ($\text{Si}^{\sim}\text{P(TEGMA-EE)}$, rys. 1.2 B_II).

Wiadomo [33], że w przypadku ATRP inicjowanej od podłoża, małe stężenie grup inicjujących znajdujących się wyłącznie na podłożu prowadzi do niekontrolowanego wzrostu łańcucha. By zapewnić kontrolę przebiegu polimeryzacji do układu wprowadzono niezwiązany z podłożem inicjator tzw. „wolny inicjator” („sacrificial initiator”). Polimeryzacja zachodziła wtedy równocześnie w roztworze i na podłożu. Masy molowe polimeru powstającego w roztworze można było więc odnieść do tych na podłożu [33].

Masa molowa polimeru powstałego w roztworze wzrastała od 23 000 do 189 000 g/mol wraz z czasem polimeryzacji. Chromatogramy wszystkich próbek P(TEGMA-EE) były monomodalne i wąskie. Dyspersyjność mas molowych polimeru dla pierwszych 6 godzin prowadzenia polimeryzacji była niższa od 1,3 po czym wzrosła do wartości 2,3.

Analiza składu modyfikowanych podłoży wykonana techniką XPS potwierdziła reakcję aminosililowania oraz wprowadzenie inicjatora ATRP. Wskazuje na to wzrost zawartości azotu oraz węgla w składzie powierzchniowym podłoża, a następnie pojawienie się sygnału atomów bromu (tabela 2.6). Utworzenie warstwy $\text{Si}^{\sim}\text{P(TEGMA-EE)}$ spowodowało, że sygnał atomów azotu wygasł, natomiast intensywność sygnału krzemu znacząco spadła. Wzrósł natomiast stosunek intensywności sygnałów C/O z wartości 0,5 (dla warstwy pośredniej $\text{Si}^{\sim}\text{Br}$) do wartości 2,77 (dla warstwy $\text{Si}^{\sim}\text{P(TEGMA-EE)-21h}$). Teoretyczny, wyliczony dla metakrylanu eteru monoetylowego glikolu trietylenowego stosunek C/O wynosi 2,4, co zgadza się z wartością zmierzoną.

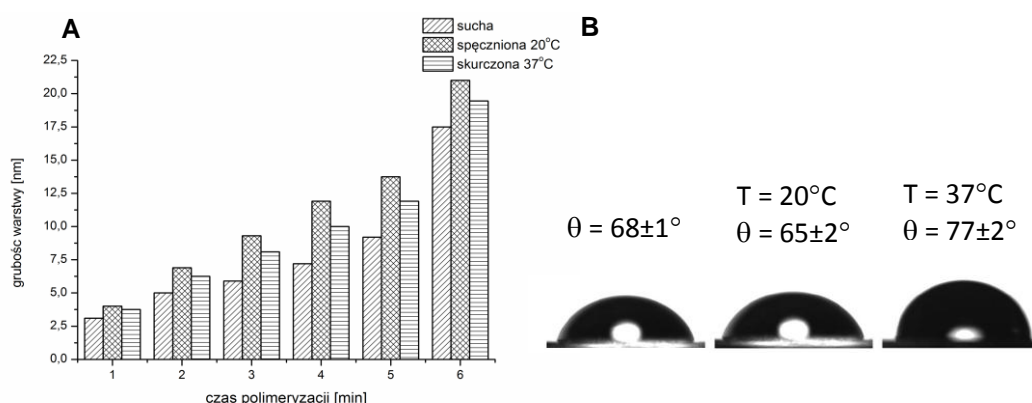
Tabela 2.6. Skład powierzchni modyfikowanej i pokrytej polimerem P(TEGMA-EE)

Oznaczenie warstwy w publikacji	C1s	O1s	Si2p	N1p	Br
Si~OH	17,2	57,4	24,7	0,7	0,0
Si~NH ₂	28,8	47,7	20,8	2,7	0,0
Si~Br	25,9	51,3	20,5	2,2	0,1
Si~P(TEGMA-EE)	72,5	26,2	1,23	0,0	0,0

➤ Analiza właściwości warstw Si~P(TEGMA-EE) [H4]

Chropowatość warstw Si~P(TEGMA-EE) zmienia się z czasem polimeryzacji, co związane jest ze wzrostem łańcuchów polimerowych. RMS wzrastał od początkowej wartości 0,24 nm (po jednej godzinie polimeryzacji), do wartości maksymalnej 0,62 nm dla warstwy po 4 godzinach polimeryzacji. Dalszy wzrost czasu polimeryzacji powodował utworzenie jednolitego filmu (na skutek wydłużenia się łańcuchów polimerowych), a tym samym spadek RMS do wartości 0,21 nm.

Grubość warstwy Si~P(TEGMA-EE) oraz jej powinowactwo do wody mierzono dla warstw suchych oraz inkubowanych w wodzie w temperaturze 20 °C (<T_{CP}) oraz 37 °C (>T_{CP}) (rys. 3.10).



Rys. 3.10. (A) Grubość warstw Si~P(TEGMA-EE) w stanie suchym i po inkubacji w wodzie w 20 °C i 37 °C w funkcji czasu polimeryzacji; (B) Zdjęcia kropli wody i kąt zwilżania dla warstw Si~P(TEGMA-EE) w różnych warunkach.

Grubość warstwy polimerowej w stanie suchym wzrastała z czasem prowadzenia reakcji polimeryzacji od 3 nm do 18 nm (rys. 3.10 A), znacząco w czasie pierwszych 6 godzin polimeryzacji. Dalsze wydłużenie czasu polimeryzacji powodowało spowolnienie przyrostu grubości warstwy z uwagi m.in. na spadek stężenia monomeru w układzie reakcyjnym, utratę centrów aktywnych i obniżoną szybkość dyfuzji monomeru. Inkubacja powierzchni w wodzie w 20 °C powodowała jej pęcznienie i wzrost grubości warstwy. Podwyższenie temperatury do 37 °C powodowało spadek grubości warstwy na skutek kurczenia się łańcuchów polimerowych w wyniku osłabienia wiązań wodorowych między cząsteczkami wody a polimerem. Dehydratacja powłoki polimerowej ma także odzwierciedlenie w większych wartościach kąta zwilżania (rys. 3.10 B). Powłoka Si~P(TEGMA-EE) wraz ze zmianą temperatury zmieniała więc swoje powinowactwo do wody.

Zmiany grubości warstwy oraz kątów zwilżania spowodowane wzrostem temperatury wskazują na termoczule właściwości warstw Si~P(TEGMA-EE). Zmiany te predysponują otrzymane materiały do badań ich oddziaływania z komórkami, w szczególności do badań hodowli i odczepiania arkuszy komórek.

3.2.3. Termoczule poli(2-podstawione-2-oksazoliny) na podłożu [H7, H8, H9]

Inną grupą termoczulych polimerów, które wykorzystano do badań oddziaływań z komórkami były poli(2-podstawione-2-oksazoliny) (POx).

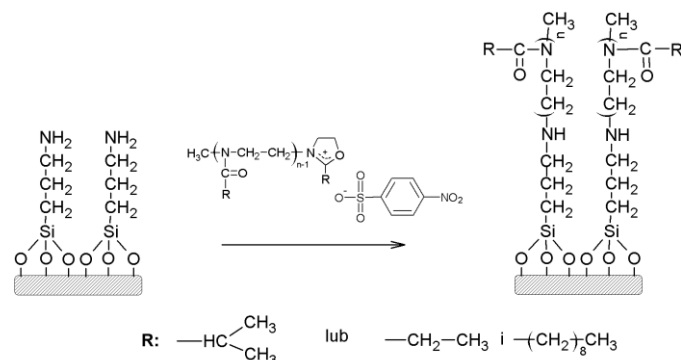
POx, zwane pseudopeptydami, są nietoksyczne i biokompatybilne [34] oraz nie kumulują się w tkankach [35]. Pomimo, że mechanizm polimeryzacji jak i same polimery 2-oksazolin znane są już od kilku dziesięcioleci, to ze względu na ich ciekawe właściwości polimery te „odkryto” na nowo. Wykazano, że możliwe jest otrzymanie kopolimerów POx z różnymi łańcuchami bocznymi lub grupami końcowymi i o różnej architekturze [36]. Znane są liczne potencjalne zastosowania POx w medycynie i biotechnologii np. konjugaty POx-proteina czy nośniki DNA (poliopleksy) [37]. Niektóre POx są termowrażliwe, co dodatkowo zwiększa ich atrakcyjność dla zastosowań biomedycznych.

W momencie prowadzenia badań w literaturze można było znaleźć niewiele prac związanych z immobilizowaniem POx na podłożach [38]. Żadna z nich nie opisywała otrzymywania warstw poli(2-podstawionych-2-oksazolin) o strukturze „szczotek” z wykorzystaniem terminacji żyjących łańcuchów POx grupami funkcyjnymi podłoża. Nie podejmowały one ponadto tematyki związanej z termoczulością powłok polimerowych, również w aspekcie ich oddziaływania z komórkami.

➤ Immobilizacja POx na podłożach [H7, H8]

Do badań w ramach pracy habilitacyjnej wytypowano kopolimery 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny (PENOX) oraz homopolimer 2-izopropyl-2-oksazoliny (PIPOx).

Powierzchnie polimerowe zawierające immobilizowaną warstwę termoczulej POx otrzymano wykorzystując technikę szczepienia do podłoża [H7, H8]. W tym celu żyjące centra wzrostu w postaci kationów oksazolinowych na końcu łańcuchów kopolimerów PENOX lub homopolimerów PIPOx terminowano grupami aminowymi wprowadzonymi na podłoże (pochodzącymi od APTES). W wyniku tej reakcji utworzone zostało wiązanie kowalencyjne i otrzymano warstwę o strukturze „szczotki polimerowej” (rys. 1.2 B_II oraz rys. 3.11).



Rys. 3.11. Schemat szczepienia żyjącej POx do podłoża zawierającego grupy aminowe.

Właściwości (ko)polimerów oksazolin, które szczepiono na podłożu zestawiono w tabeli 2.7.

Tabela 2.7. Charakterystyka (ko)poli(2-podstawionych-2-oksazolin) w roztworze, szczepionych następnie na modyfikowanym podłożu [H7,H8]

Oznaczenie polimeru w publikacji	M_n (SEC-MALLS)	M_w/M_n	mol % of NOx (NMR)	T_{CP} [°C]	t_{POL} [dni] ^a
sPIPOx0					0
sPIPOx2	20800	1,01	---	37	2
sPIPOx4					4
sPIPOx7					7
PIPOx1	22500	1,02	---	37	12
PIPOx2	40000	1,06	---	35	12
PENox1	15000	1,04	14	22	12
PENox2	18000	1,27	14	22	
PENox3	14000	1,27	10	31	12
PENox4	21800	1,30	10	31	
PENox5	15300	1,09	6	36	12

^{a)} Czas, po którym szczepiono polimer z podłożem, od momentu osiągnięcia 100 % konwersji

Żyjące (ko)polimery PIPOx i PENox nanoszono na podłoża po różnym czasie od momentu osiągnięcia 100 % konwersji (t_{POL} równe od 0 do 12 dni, tabela 2.7).

Podczas analizy AFM zaobserwowano, że na warstwach PIPOx tworzyły się fibrylarne struktury. Obecność tych struktur wynikała z częściowej krystalizacji łańcuchów poli(2-izopropyl-2-oksazolin) w acetonitrylu, rozpuszczalniku stosowanym do polimeryzacji. **Ponieważ zaobserwowane zjawisko nie zostało do tej pory wyjaśnione, w pracy habilitacyjnej [H9] podjęto badanie procesu krystalizacji PIPOx w acetonitrylu.**

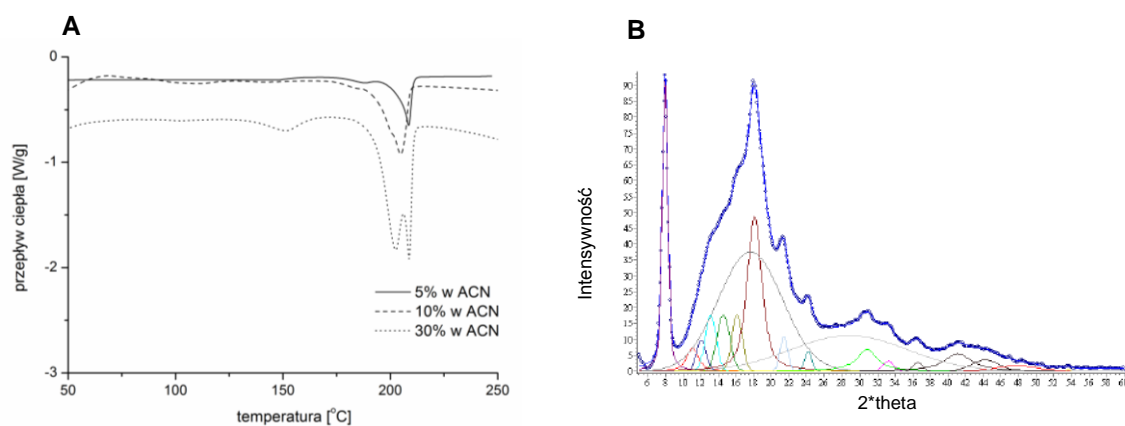
➤ Krystalizacja POx w rozpuszczalnikach organicznych [H9]

W literaturze opisano zdolność do krystalizacji poli(2-podstawionych-2-oksazolin) w roztworach wodnych oraz w roztworach wodnych z dodatkiem rozpuszczalników organicznych [39, 40]. Krystalizacja POx w tych rozpuszczalnikach jest indukowana odpowiednio długim ogrzewaniem roztworu powyżej temperatury przejścia fazowego polimeru (T_{CP}). Zasadnicza rola w mechanizmie krystalizacji

została przypisana więc dehydratacji łańcuchów polimerów towarzyszącej przejściu fazowemu i utworzeniu tzw. fazy bogatej w polimer (polymer rich phase) [39].

Obserwowana w pracy [H7, H8] krystalizacja poli(2-izopropyl-2-oksazolinu) zachodziła w rozpuszczalniku organicznym, w którym polimer nie wykazuje separacji fazowej związanej z termowrażliwością. Wydaje się to przeczyć powyższej interpretacji, wedle której obecność wody jest konieczna dla procesu krystalizacji POx. Dlatego podjęto prace, opisane w [H9], związane ze zbadaniem procesów krystalizacji PIPOx w acetonitrylu (ACN), sulfotlenku dimetylu (DMSO) i węglanie propylenu (PC). W autoreferacie przedstawiono wyniki krystalizacji PIPOx tylko w ACN, gdyż taka mieszanina wykorzystana została do immobilizacji polimeru na podłożach, a powstała warstwa do badań oddziaływań z komórkami.

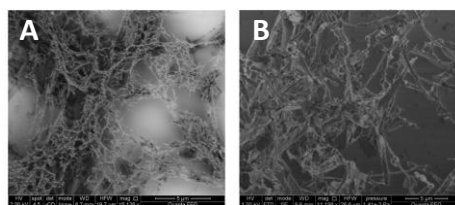
Roztwory PIPOx ($M_n = 20\ 800$ g/mol, $M_w/M_n = 1,01$) w acetonitrylu o stężeniu 5 %, 10 % i 30 % ogrzewano w 50°C przez 20 dni. W tym czasie mieszaniny stawały się mętne i powstawał osad, który poddano analizie DSC i WAXS (rys. 3.12).



Rys. 3.12. (A) Krzywe DSC dla PIPOx wykrystalizowanej z roztworu ACN o różnym stężeniu (pomiar 10°C/min) i (B) krzywe dyfrakcyjne krystalitów uzyskanych z 5 % roztworu PIPOx w ACN.

Termogramy DSC osadów powstałych we wszystkich roztworach PIPOx wykazały obecność endotermicznego piku świadczącego o tym, że próbka zawierała frakcję krystaliczną, która uległa topnieniu. Wartość entalpii topnienia wzrastała wraz ze wzrostem stężenia roztworu od 20 J/g dla 5 % roztworu do 41 J/g dla 30 % roztworu. Analiza metodą szerokokątowej dyfrakcji promieni rentgenowskich wykazała dwa główne piki dyfrakcyjne przy $2\theta = 7,93^\circ$ i $18,11^\circ$. Identyczne piki dyfrakcyjne i wartości odległości międzypłaszczyznowych zostały otrzymane dla PIPOx krystalizowanej w wodzie [41]. Oznacza to, że PIPOx krystalizowana w rozpuszczalnikach organicznych ma taką samą komórkę elementarną co PIPOx krystalizowana w wodzie. Najwyższy udział frakcji krystalicznej χ_c wynoszący 68 % uzyskano dla PIPOx z 30 % roztworu w ACN.

Morfologię PIPOx krystalizowanej w rozpuszczalniku organicznym obrazowano SEM (rys. 3.13).



Rys. 3.13. Zdjęcia SEM PIPOx wykrystalizowanej z roztworu ACN 30 % (A) i 5 % (B) (skala 5 μm).

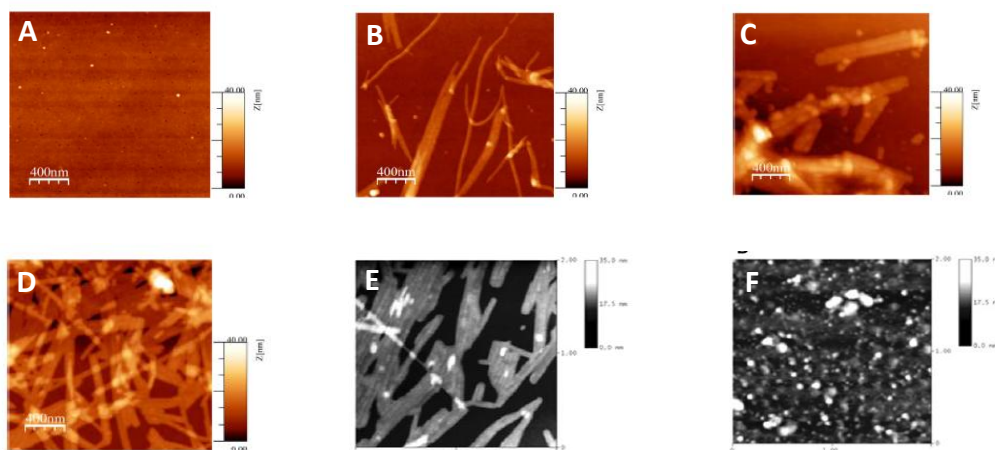
Zaobserwowane fibrylarne struktury PIPOx wzajemnie się przeplatają i tworzą gęstą sieć (rys. 3.13). Długość fibryli sięga kilku mikronów, a ich grubości około 50 nm. Wykazano, że stężenie roztworu, z którego krystalizował PIPOx, ma niewielki wpływ na morfologię powstałych struktur.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że PIPOx krystalizuje w rozpuszczalniku organicznym (bez udziału wody), a proces ten nie jest związany z termoczułością polimeru.

➤ Analiza właściwości warstw poli(2-podstawionych-2-oksazolin) [H7, H8]

Z uwagi na zaobserwowaną krystalizację PIPOx w rozpuszczalniku polimeryzacyjnym [H9], jego immobilizację na podłożu przeprowadzono zaraz po osiągnięciu pełnej konwersji (sPIPOx0) oraz po 2 (sPIPOx2), 4 (sPIPOx4), 7 (sPIPOx7) oraz 12 (PIPOx1) dniach wygrzewania roztworu polimeryzacyjnego (tabela 2.7). Umożliwiło to określenie wpływu liczby krystalitów na właściwości powierzchni, w tym termoczułość oraz na ich zdolność do oddziaływania z komórkami. Kopolimery PENOx nie krystalizowały z roztworu, więc immobilizowano je na podłożach po 12 dniach od osiągnięcia pełnej konwersji.

Morfologie otrzymanych warstw polimerowych przedstawiono na rysunku 3.14.



Rys. 3.14. Zdjęcia AFM warstw sPIPOx0 (A), sPIPOx2 (B), sPIPOx4 (C), sPIPOx 7 (D), PIPOx2 (E) oraz PENOx1 (F).

Powierzchnie PIPOx są gładkie, bez fibrylarnych struktur a współczynnik chropowatości jest niski (0,4 nm), gdy polimer szczepiony jest do podłoża bezpośrednio po osiągnięciu pełnej konwersji (rys. 3.14 A). Wydłużenie czasu, po którym polimer został zaszczipiony na podłożu powoduje, że wzrasta stopień pokrycia powierzchni fibrylami (od 20 % do 70 %; rys. 3.14 B-E) i rośnie chropowatość warstwy (do 6-12 nm). Równocześnie obserwuje się wzrost grubości warstwy od 5 nm do 11 nm. Długość fibryli osadzonych na powierzchni wynosi kilka mikronów.

Aby usunąć krystality z podłoża, powierzchnie wygrzewano w 210 °C (powyżej T_m PIPOx), a następnie chłodzono szokowo i płukano. Uzyskana w ten sposób warstwa była homogeniczna i gładka (RMS = 0.5 nm), a jej grubość (5 nm) odpowiadała grubości warstwy otrzymanej w wyniku szczepie-

nia sPIPOx0 do podłoża zaraz po osiągnięciu pełnej konwersji. Oznacza to, że krystaliny osadzone w warstwie polimeru są niekowalencyjnie związane z podłożem i mogą być łatwo stopione i usunięte.

Powierzchnie oparte na kopolimerach 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny (PENOX) były chropowate i niehomogeniczne (rys. 3.14 F). Pomimo, że homopolimer 2-nonylo-2-oksazoliny jest polimerem krystalicznym [42], jego kopolimery z 2-etylo-2-oksazoliną są amorficzne. Dlatego na otrzymanych powierzchniach PENOX nie obserwowano obecności fibryli. Morfologia warstwy PENOX zależy od składu kopolimeru. Zmniejszenie zawartości NOx w łańcuchu kopolimeru powodowało otrzymanie powierzchni o bardziej regularnej morfologii i niższej chropowatości (spadek RMS z 1,1 nm do 0,25 nm dla NOx % odpowiednio 14 % i 6 %).

W pracy badano również powinowactwo do wody oraz grubości warstw PENOX i PIPOx w celu oceny wpływu mas molowych, składu kopolimerów czy obecności krystalitów (niewykazujących termowrażliwości) na zachowanie warstw inkubowanych w wodzie w różnych temperaturach (tabela 2.8).

Tabela 2.8. Grubość warstw PENOX i PIPOx oraz ich powinowactwo do wody w stanie suchym oraz po inkubacji w wodzie w 20 °C i 40 °C

Oznaczenie warstwy w publikacji	Liczba krystalitów na podłożu [%] <i>lub</i> % NOx	Kat zwilżania [°]			Grubość warstwy [nm]		
		Θ ₁	Θ ₂	Θ ₃	h ₁	h ₂	h ₃
		suche podłoża	woda 20 °C	woda 40 °C	suche podłoża	woda 20 °C	woda 40 °C
sPIPOx0	0	65	54	64	5	12	7
sPIPOx2	20	68	58	67	6	12	7
sPIPOx4	40	69	58	68	7	13	9
sPIPOx7	70	73	60	64	9	13	11
PIPOx1	70	77	62	75	9	13,5	12
PIPOx2	70	72	60	70	11	16	13
PENOX1	14	78	55	70	5	7	6,5
PENOX2	14	71	60	68	6	9	7
PENOX3	10	67	58	65	4	5,5	4
PENOX4	10	57	50	56	8	12	9
PENOX5	6	-	-	-	5	8	6,5

Zaobserwowano, że kąt zwilżania suchych powierzchni PENOX zależy od składu oraz masy molowej immobilizowanego kopolimeru. Komonomer NOx jest hydrofobowy i jego większa zawartość w łańcuchu powoduje, że warstwa ma mniejsze powinowactwo do wody. W wypadku warstw o tej samej zawartości NOx, warstwa jest bardziej hydrofilowa, gdy większa jest masa molowa immobilizowanego polimeru. Powinowactwo do wody warstw PIPOx zależy od stopnia pokrycia ich powierzchni krystalitami i maleje wraz ze wzrostem liczby fibryli na powierzchni, potwierdzając ich hydrofobowy charakter. Zwilżalność wszystkich otrzymanych powierzchni inkubowanych w wodzie w 20 °C wzrasta w porównaniu do warstw suchych. Jest to spowodowane solwatacją łańcuchów polimerowych w wyniku penetracji wody do warstwy.

Grubość otrzymanych warstw POx mieści się w zakresie od 4 do 11 nm i zależy od masy molowej immobilizowanego polimeru oraz od liczby krystalitów obecnych na podłożu. Inkubacja podłoży w wodzie w 20 °C powoduje pęcznienie warstw polimerowych – obserwowany jest wzrost grubości warstwy. Dla warstw PIPOx przyrost grubości warstwy (h_2-h_1 , tabela 2.8) maleje wraz ze wzrostem liczby krystalitów na powierzchni. Hydrofobowe krystality na powierzchni zapobiegają penetracji wody do warstwy polimerowej i dlatego ograniczają jej zdolność do pęcznienia.

W temperaturze 40 °C, powyżej T_{CP} immobilizowanej POx, warstwy stają się hydrofobowe. Obserwowany jest jednoczesny spadek grubości warstwy, niemal do jej początkowej wartości. Świadczy to o dehydratacji i kurczeniu się łańcuchów polimerowych szczepionych na podłożu w wyniku zaburzenia sfery solwatacyjnej. Odpowiedź warstwy sPIPOx7, zawierającej 70 % krystalitów na powierzchni, na zmianę temperatury ($\Theta_3-\Theta_2 = 4$) była najmniejsza.

Indukowane temperaturowo pęcznienie (poniżej T_{CP}) oraz kurczenie się (powyżej T_{CP}) otrzymanych w pracy warstw (ko)poli(2-podstawionych-2-oksazolin) przy jednoczesnych zmianach ich powinowactwa do wody jest charakterystyczne dla termowrażliwych warstw. Powierzchnie te w dalszych etapach prac zostały więc wykorzystane do badań adhezji i odczepiania komórek w postaci arkusza.

W ramach prac [H4-H9]:

- Wykorzystując metody szczepienia do podłoża otrzymano i scharakteryzowano warstwy polimerowe oparte na (ko)polimerach glicydotu i (ko)polimerach 2-podstawionych-2-oksazolinach. W pierwszym przypadku uzyskano warstwę o strukturze przenikających się łańcuchów wielokrotnie szczepionych z podłożem, w drugim warstwy o strukturze „szczotki polimerowej”
- Wykorzystując metody szczepienia od podłoża uzyskano warstwy o strukturze „szczotki polimerowej” oparte na metakrylanie eteru monoetylowym glikolu trietylenowego
- Ustalono, że otrzymane warstwy oparte na mPGL, Si~P(TEGMA-EE) oraz PIPOx i PENOx wykazują termoczułość - wraz ze zmianą temperatury otoczenia zmienia się ich grubość i powinowactwo do wody. Dlatego też warstwy te wykorzystano do badań oddziaływania z komórkami

3.3. Warstwy termoczułych polimerów w hodowli i odczepianiu komórek skóry w postaci arkusza [H1, H4, H5, H7, H8, H11]

W pracy określono zdolność otrzymanych termoczułych warstw opartych na poliglicydotu (zarówno samonośnych jak i immobilizowanych na podłożach), poli(metakrylanie glikolu trietylenowym) oraz (ko)poli(2-podstawionych-2-oksazolinach) do ich oddziaływań z komórkami, a w szczególności do możliwości tworzenia ciągłego arkusza komórek i jego odczepienia w niezmienionej postaci bez stosowania enzymatycznych metod oddzielania komórek. W badaniach wykorzystano komórki skóry (fibroblasty i keratynocyty), które uzyskane w postaci arkusza mogłyby być stosowane na rany spowodowane przez oparzenia lub choroby przewlekłe.

Przedłużające się gojenie ran i trudne metody ich zaopatrywania stanowią duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Nowoczesne specjalistyczne opatrunki biologiczne i chemiczne niestety nie gwarantują skutecznego leczenia z uwagi na możliwość odrzucenia przeszczepu, tworzenie niepożądanych blizn czy możliwość przeniesienia patogenów. Współczesne metody inżynierii tkankowej dają

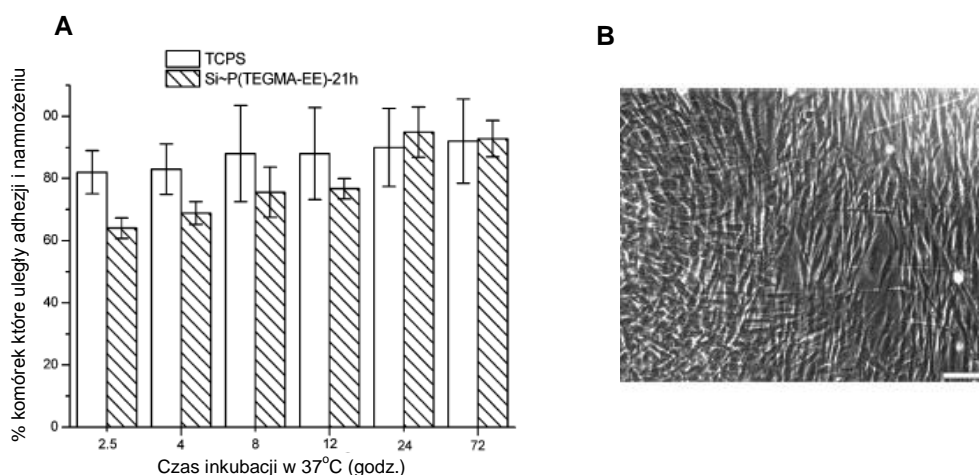
szereg możliwości wykorzystania hodowli komórkowych i tkankowych do leczenia wielu chorób w tym również oparzeń i przewlekłych ran. Badania nad zasiedlaniem matryc komórkami własnymi pacjenta bądź stosowania ich w formie zawiesiny bezpośrednio na ranę dowodzą ograniczonej ich stosowalności. Zastosowanie więc podłoża o termosterowalnych właściwościach do otrzymanie arkusza pseudotkanki np. naskórka wyhodowanego z komórek własnych pacjenta wydaje się stanowić interesujące rozwiązanie.

Badania hodowli i odczepiania komórek skóry prowadzono we współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej i Genetyki, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich.

3.3.1. Hodowla arkusza komórek skóry [H1, H4, H5, H7, H8]

➤ Adhezja i namnażanie komórek

Badania przeprowadzono wykorzystując warstwy zarówno samonośnych kriożeli opartych na modyfikowanym poliglicydolu jak i immobilizowanych na podłożu polimerach glicydolu, metakrylanu glikolu trietylenowego oraz 2-podstawionych 2-oksazolinach. Komórki skóry wysiewano na wszystkie badane warstwy polimerowe w temperaturze 37 °C. W tej temperaturze, znacznie powyżej T_{CP} badanych polimerów, warstwy jak wykazano i opisano wcześniej są hydrofobowe. Żywność komórek mierzono po określonych godzinach hodowli komórkowej, stosując test AlamarBlue. Jako podłoże kontrolne stosowano TCPS – standardowo wykorzystywane podłoże do hodowli komórek. Zaobserwowano, że w badanych warunkach właściwości wszystkich otrzymanych warstw sprzyjają adhezji komórek i ich namnażaniu (przykładowy wykres przedstawiono dla warstwy Si~P(TEGMA-EE) na rys. 3.15 A).



Rys. 3.15. (A) Procent komórek które uległy adhezji i namnożeniu na warstwach Si~P(TEGMA-EE) w porównaniu do podłoża kontrolnych TCPS; (B) Morfologia komórek fibroblastów wyhodowanych w postaci arkusza na podłożach Si~P(TEGMA-EE) po 24 h hodowli w 37 °C (skala 100 μm)

Po 24 godzinach hodowli od 60 do 100 % komórek (w zależności od typu badanej warstwy) uległo adhezji na termoczulych warstwach, w porównaniu do podłoża kontrolnego. Po pewnym czasie komórki uległy namnożeniu na każdej z badanych warstw polimerowych i utworzyły zintegrowany arkusz, w obrębie którego ściśle przylegały do siebie i były połączone macierzą zewnątrzkomórkową (rys. 3.15 B) [H1, H4, H5, H7, H8].

Ustalono, że 60 % komórek fibroblastów ulega adhezji do samonośnych warstw opartych na kriożelach z modyfikowanego poliglicydolu [H1]. Natomiast w wypadku warstw polimerowych opartych na modyfikowanym poliglicydolu immobilizowanym na podłożu, liczba komórek, które uległy adhezji, zależy od grubości warstwy. Dodatkowo grubość warstwy ma istotny wpływ na jednolitość powstałego arkusza komórek [H5]. Na powierzchni o największej grubości komórki tworzyły nieciągły arkusz. Obserwowano zarówno nieporośnięte przez komórki miejsca jak i skupiska komórek. Było to prawdopodobnie spowodowane niejednorodnością utworzonej warstwy polimerowej (rys. 3.6 B, rozdział 3.2.1). Fibroblasty gromadziły się z zagłębieniach otrzymanej warstwy, czyli tam, gdzie warstwa była cieńsza. Hodowla keratynocytów wykazała natomiast, że komórki te słabiej niż fibroblasty uległy adhezji do podłoża mPGL. Dodatek lamininy (główny składnik substancji międzykomórkowej) do medium hodowlanego zwiększył stopień adhezji keratynocytów i umożliwił ich namnażanie się.

Dla podłoży Si~P(TEGMA-EE) zaobserwowano, że grubość warstwy nie miała znaczącego wpływu na stopień adhezji fibroblastów [H4]. Po 24 godzinach hodowli prawie 100 % komórek uległo przyklejeniu do każdej z badanych warstw. Po tym czasie komórki namnażały się i tworzyły ciągły arkusz.

Dla warstw opartych na PIPOx liczba komórek, które uległy adhezji i namnożeniu, wzrasta wraz ze wzrostem stopnia pokrycia powierzchni krystalitami oraz chropowatością warstwy (rys. 3.14, rozdział 3.2.3) [H8]. Liczba komórek wyhodowanych po 24 godzinach na warstwie sPIPOx0 (0 % krystalitów) wzrosła co najmniej półtora razy w porównaniu do liczby komórek wysianych. Natomiast dla warstwy sPIPOx7 (70 % krystalitów) liczba komórek wzrosła aż trzykrotnie. Wydaje się, że hydrofobowe, krystaliczne włókna PIPOx osadzonej na powierzchni przypominają ułożenie i rozmiar białek włóknistych (t.j. kolagen, elastyna czy fibronektyna) w macierzy zewnątrzkomórkowej, co może sprzyjać adhezji komórek. Ponadto, siatkowe ułożenie krystalitów może ułatwiać cyrkulację płynów dostarczających tlen i składniki odżywcze do komórek, co czyni hodowlę bardziej skuteczną. Ustalono ponadto, że stopień adhezji fibroblastów do podłoży PIPOx był większy niż dla podłoży opartych na kopolimerach PENOx [H7]. W wypadku podłoży PENOx zaobserwowano, że ani masa molowa ani zawartość hydrofobowej nonylooksazoliny nie miały znaczącego wpływu na adhezję komórek. Po 24 godzinach hodowli fibroblasty na wszystkich warstwach PENOx dokonały adhezji w tym samym stopniu jak w próbie kontrolnej.

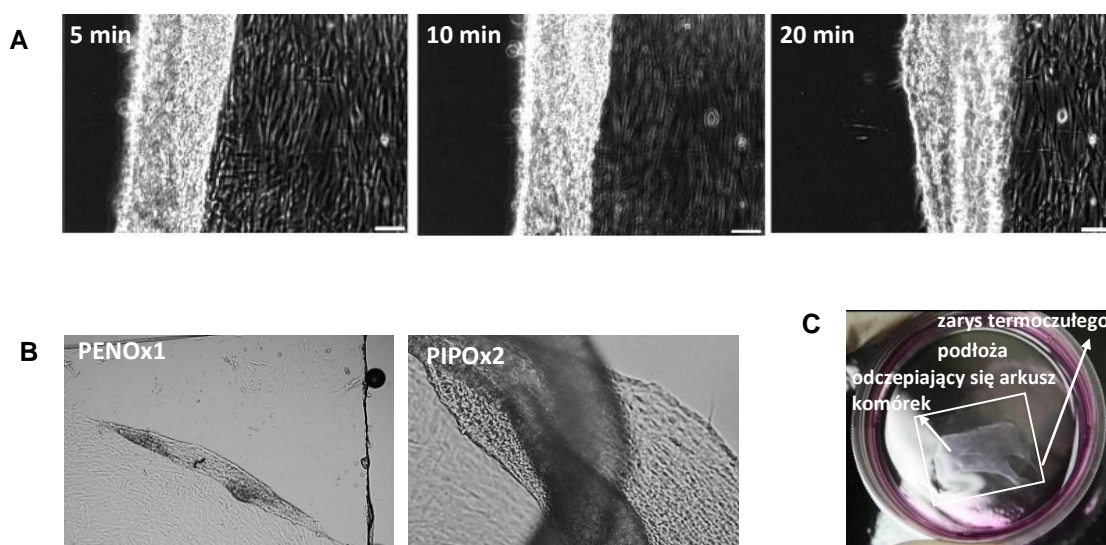
➤ Odczepianie arkusza komórek

Po utworzeniu przez komórki ciągłego arkusza, temperatura hodowli została obniżona poniżej T_{CP} immobilizowanego polimeru (do 20°C lub 17,5°C w zależności od podłoża). Jak wykazano w badaniach przeprowadzonych w pracy habilitacyjnej, wszystkie otrzymane warstwy polimerowe zmieniały w tych warunkach swoje właściwości: stawały się hydrofilowe oraz zmieniła się ich grubość (rys. 3.5 i 3.10 oraz tabela 2.5 i 2.8). Zmiana właściwości otrzymanych warstw powinna sprzyjać spontanicznemu oddzieleniu się komórek w postaci jednolitego arkusza.

Dla żadnej warstwy termoczułego poliglicydolu (ani samonośnej ani immobilizowanej na podłożu) po obniżeniu temperatury hodowli do 20°C nie zaobserwowano zadawalającego efektu samoczynnego odczepiania arkusza fibroblastów nawet po wydłużonym czasie [H1, H5]. W wypadku warstwy samonośnej, jej porowata struktura, która obok hydrofobowości sprzyjała hodowli komórek, prowadziła prawdopodobnie do „pułapkowania” komórek w trakcie namnażania. Uniemożliwiało to prawdopodobnie odczepienie arkusza podczas zmiany właściwości warstwy w obniżonej temperaturze. Z kolei

w wypadku warstw termoczułego poliglicydolu immobilizowanego na podłożu za zaistniałą sytuację odpowiedzialna jest prawdopodobnie nietypowa struktura warstwy – przenikające się łańcuchy wielokrotnie szczepione z podłożem. Pomimo, że po zmniejszeniu temperatury hodowli poniżej T_{CP} warstwy ulegały hydratacji i stawały się hydrofilowe, to równocześnie ich grubość zmniejszała się (rys. 3.7, tabela 2.5). Pod wpływem tak nietypowo przebiegających zmian, siły rozciągające cytoskielet komórek nie były prawdopodobnie wystarczające by spowodować zmianę kształtu komórki z wrzecionowatego na sferyczny, a tym samym, by odcepić arkusz fibroblastów od podłoża.

Natomiast w wypadku podłoży Si~P(TEGMA-EE) oraz PIPOx i PENOx obniżenie temperatury hodowli indukowało spontaniczne odcepienie się arkusza wyhodowanych na nich komórek (rys. 3.16).



Rys. 3.16. (A) Odczepianie arkusza fibroblastów z warstwy Si~P(TEGMA-EE) po określonym czasie inkubacji w 17,5 °C (skala odpowiada 100 μ m); (B) i (C) Odczepianie arkusza fibroblastów z warstw poli(2-podstawionych-2-oksazolin) po inkubacji w 20 °C [H4, H7, H8].

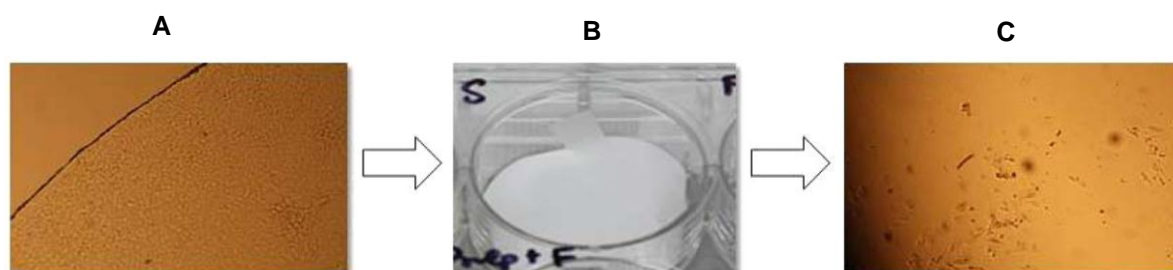
Ustalono, że w wypadku warstw Si~P(TEGMA-EE), optymalną temperaturą niezbędną do odcepienia komórek w postaci arkusza jest 17,5 °C. Badania odcepienia komórek prowadzone w zakresie temperatur 18-20 °C pokazały, że komórki w tych warunkach odcepiły się w postaci fragmentów arkusza lub nie odcepiły się wcale. W temperaturze 17,5 °C arkusz komórek fibroblastów ulegał całkowitemu odcepieniu w ciągu 40-60 min. Arkusz odcepiął się szybciej od grubszych warstw.

W wypadku warstw (ko)poli(2-podstawionych-2-oksazolin) zdolność komórek do samoistnego odcepienia, po obniżeniu temperatury do 20 °C zależała od składu kopolimeru oraz od liczby krystalitów na powierzchni. Dla warstw PENOx, odcepienie pełnego arkusza fibroblastów obserwowano jedynie w wypadku warstwy PENOx1. Warstwa ta była najbardziej chropowata (RMS około 1 nm) oraz charakteryzowała się największą różnicą w kątach zwilżania pomiędzy warstwą uwodnioną a dehydratowaną (Θ_3 - Θ_2 , tabela 2.8). W wypadku pozostałych warstw PENOx komórki uległy odcepieniu od podłoża jedynie w pojedynczych miejscach. Komórki ulegały odcepieniu w postaci arkusza również od warstw PIPOx. Zdolność do odcepienia się zależy jednak od liczby krystalitów na powierzchni – im mniej krystalitów, tym więcej komórek ulega odwarstwieniu. Wyższa zawartość krystalitów osłabia odpowiedź warstwy PIPOx na zmianę temperatury, co potwierdziły badania grubości warstwy i powinowactwa do wody (tabela 2.8), a to wpływa na możliwość samoistnego odcepienie się arkusza fibroblastów. Po obniżeniu temperatury do 20 °C ciągły arkusz fibroblastów odkleił się od podłoża PIPOx2 w ciągu 30 minut.

3.3.2. Transfer arkuszy komórek skóry za pomocą membrany [H8, H11]

Arkusz komórek w trakcie odzlepiania od powierzchni polimerowej ulegał zwijaniu. Aby temu zapobiec i by w niezmienionej postaci przenieść arkusz wyhodowany na termoczułym podłożu na miejsce docelowe, zbadano możliwość jego transferu z wykorzystaniem odpowiedniej membrany [H8, H11]. Testowano membrany SURPATHEL® oraz Biobrane. Do badań wykorzystano termoczułe podłoża Si~P(TEGMA-EE) oraz sPIPOx0 i sPIPOx7.

W tym celu po hodowli komórek na termoczułej powierzchni polimerowej i uzyskaniu pełnego arkusza, komórki zostały pokryte membraną do transferu SURPATHEL® lub Biobrane. Komórki uległy adhezji do membrany. Następnie temperatura hodowli została obniżona co spowodowało, że komórki uległy spontanicznemu odwarstwieniu od termoczułej powierzchni i wraz z membraną zostały „podniesione” z naczynia hodowlanego. Z uwagi na fakt, że komórki były przyłączone do membrany możliwe było swobodne przeniesienie arkusza komórek, bez jego zwijania się, do nowego naczynia hodowlanego (na rys. 3.17 przedstawiono dla przykładu przeniesienie komórek z podłoża sPIPOx0).



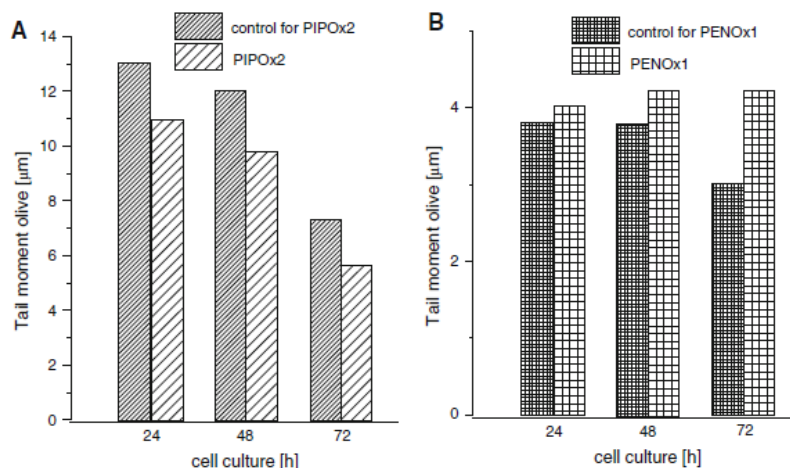
Rys. 3.17. Odzlepianie i transfer arkusza komórek z termoczułej powierzchni sPIPOx0: (A) wyhodowany arkusz fibroblastów; (B) pokrycie arkusza komórek membraną SURPATHEL®; (C) podłoże po usunięciu arkusza komórek (brak widocznego arkusza komórek).

Badania wykazały, że za pomocą membrany SURPATHEL®, w porównaniu do membrany Biobrane, możliwe jest efektywniejsze przeniesienie arkusza komórek. Aż 90 % komórek arkusza ulega przeniesieniu z powierzchni sPIPOx0 i 60 % z powierzchni sPIPOx7. Powierzchnia sPIPOx7 pokryta w 70 % krystalitami charakteryzuje się słabą odpowiedzią właściwości fizykochemicznych na zmianę temperatury. Powoduje to, że wydajność transferu komórek jest dla tej powierzchni niższa. W wypadku Si~P(TEGMA-EE) wydajność przeniesienia arkusza komórek wyniosła 92 %. Wykazano, że komórki po zabiegu przeniesienia do nowego naczynia hodowlanego zachowują swoją żywotność i są zdolne do dalszych podziałów komórkowych i namnażania.

Podobny eksperyment został przeprowadzony dla komórek wyhodowanych na standardowym, nietermoczułym podłożu hodowlanym TCPS. W tym wypadku, komórki nie uległy oddzieleniu od podłoża i nie było możliwe przeniesienie arkusza. Potwierdza to fakt, że termoczułe właściwości otrzymanych w pracy powierzchni są niezbędne do odzepienia całego arkusza w niezmienionej postaci.

3.3.3. Biologiczna charakterystyka komórek skóry po hodowli [H7]

Mając na uwadze przydatność otrzymanych powierzchni polimerowych w biomedycynie przeprowadzono badania pozwalające scharakteryzować komórki po hodowli na termoczulych powierzchniach. Przeprowadzono badania genotoksyczności warstw polimeru opartych na poli(2-podstawionych-2-oksazolinach), fenotypu komórek i ekspresji genów komórek hodowanych na powyższych warstwach polimerowych. Wyniki badań wykazały, że komórki podczas hodowli nie zmieniają swojego fenotypu, nie obserwuje się uszkodzeń DNA komórek (rys. 3.18) ani znaczących zmian ekspresji ich genów [H7].



Rys. 3.18. Wyniki testów genotoksyczności na podstawie testu kometkowego dla fibroblastów hodowanych na (A) PIPOx2 i (B) PENOx1. Jako kontrolę stosowano TCPS.

Na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że termoczule powierzchnie POx są w pełni biokompatybilne, a zatem odpowiednie do hodowli i odczepiania fibroblastów w postaci ciągłego arkusza komórek.

W ramach prac [H1, H4, H5, H7, H8, H11] wykazano, że:

- otrzymane termoczule powierzchnie polimerowe oparte na Si~P(TEGMA-EE) o określonej grubości warstwy oraz (ko)poli(2-podstawionych-2-oksazolinach) o określonej zawartości krystalitów są przydatne do hodowli i nieinwazyjnego odczepiania komórek w postaci arkusza,
- możliwe jest przeniesienie wyhodowanego arkusza na miejsce docelowe z wykorzystaniem membrany SURPATHEL®, a zabieg ten nie wpływa na żywotność komórek,
- wykazano, że badane podłoża są biokompatybilne i nie szkodzą hodowanym komórkom, co czyni je atrakcyjnymi ze względu na potencjalne wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej.

Otrzymane wyniki badań pozwoliły więc przeprowadzić wstępny eksperyment medyczny (dane nie publikowane), gdzie komórki pacjenta hodowano na powierzchni termoczulej warstwy. Następnie arkusz komórek za pomocą membrany przeniesiono na rany pacjenta. W ciągu kilku następných dni zaobserwowano gojenie rany.

4. PODSUMOWANIE

Głównym celem prowadzonych prac, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, było opracowanie oraz charakterystyka biogodnych warstw polimerowych do zastosowań w medycynie regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej.

Opracowano metodę otrzymywania hydrofilowych warstw polimerowych opartych na poliglicydolu o właściwościach redukujących osadzanie się protein. Uzyskano warstwy o różnym składzie i strukturze (polimery o strukturze liniowej tworzące warstwę o strukturze przenikających się łańcuchów wielokrotnie szczepionych z podłożem lub „szczotek polimerowych”). Określono, jak skład i struktura polimeru wpływają na właściwości uzyskanych warstw polimerowych, w tym przede wszystkim na powinowactwo do wody, a tym samym na redukcję osadzania się protein. Na podstawie uzyskanych wyników przedstawiono możliwość zastosowania uzyskanych biokompatybilnych, hydrofilowych warstw poliglicydolowych w medycynie rekonstrukcyjnej.

W pracy opracowano również metody otrzymywania termoczułych warstw polimerowych opartych na polimerach glicydolu, metakrylanu glikolu oligoetylenowego oraz oksazolin i określono ich oddziaływanie z komórkami. Ustalono jak skład i struktura polimeru wpływają na właściwości uzyskanych warstw polimerowych, w tym przede wszystkim na powinowactwo do wody zarówno w temperaturze otoczenia, jak i w podwyższonej temperaturze. Warstwy są hydrofobowe w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego immobilizowanego polimeru. W warunkach tych sprzyjają hodowli komórek skóry. Obniżenie temperatury hodowli poniżej temperatury przejścia fazowego immobilizowanego polimeru zmienia właściwości podłoża a tym samym umożliwia odzepienie komórek w postaci arkusza. Powiązano właściwości uzyskanych warstw z ich wpływem na rozwój komórek i tworzenie arkusza, a tym samym ustalano możliwości zastosowania otrzymanych materiałów w inżynierii tkankowej.

Uzyskana wiedza pozwoliła na przedstawienie możliwości zastosowania otrzymanych materiałów w biomedycynie: do przeciwdziałania adsorpcji protein oraz hodowli i odzepiania arkuszy komórkowych.

8 LITERATURA

1. red. M. Olszówka, K. Maciąg „Nowoczesne trendy w medycynie” Lublin **2015**, wyd. fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL.
2. red. B. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J.E. Lemons “Biomaterials science” USA **1990**, wyd. Academic Press.
3. V. K. Vendra, L. Wu, S. Krishan “Polymer thin films for biomedical application” w “Nanomaterials for the Life Sciences Vol.5: Nanostructured Thin Films and Surfaces” **2010**, wyd. Challa S. S. R. Kumar WILEY-VCH.
4. J. R. Smith, D. A. Lamprou Transactions of the IMF The International Journal of Surface Engineering and Coatings **2014**, 92(1), 9-19.
5. A. Dworak, B. Trzebicka, W. Wałach, Macromol. Chem. Phys. **1995**, 196, 1963-1970.
6. W. Wałach, A. Kowalczyk, B. Trzebicka, A. Dworak, Macromol. Rapid Commun. **2001**, 22, 1272-1277.
7. P.Y. Yeh, R. Kainthan, Y. Zou, M. Chiao, J. Kizhakkedathu, Langmuir **2008**, 24, 4907-4916.
8. M. Wyszogrodzka, R. Haag, Langmuir **2009**, 25, 5703- 5712.
9. M. Wyszogrodzka, R. Haag, Biomacromolecules **2009**, 10, 1043-1054.
10. M. Jamróż-Piegza, A. Utrata-Wesołek, B. Trzebicka, A. Dworak, Eur. Polymer J. **2006**, 42, 2497-2506.
11. Z. Tang, Y. Akiyama, T. Okano, Polymers **2012**, 4, 1478-1498.
12. M. Keerl, V. Simirnovas, R. Winter, W. Richtering, Angew. Chem. **2008**, 120, 344-347.
13. B. D. Ratner, J. Dent. Educ. **2001**, 65, 1340-1347.
14. S. R. Meyers, M. W. Grinstaff, Chem. Rev. **2012**, 112, 1615-1632.
15. M. Krishnamoorthy, S. Hakobyan, M. Ramstedt, J. E. Gautrot, Chem. Rev. **2014**, 114, 10976-11026.
16. Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dziubella, Ch. Wischke, A. T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff, R. Haag, Angew. Chem. Int. Ed. **2014**, 53, 8004-8031.
17. A. Dworak, I. Panchev, B. Trzebicka, W. Wałach, Macromol. Symp. **2000**, 153, 233-242.
18. W. Wałach, B. Trzebicka, J. Justyńska, A. Dworak, Polymer **2004**, 45, 1755-1762.
19. A. Mendrek, S. Mendrek, B. Trzebicka, D. Kuckling, W. Wałach, H.-J. Adler, Macromol. Chem. Phys. **2005**, 206, 2018-2026.
20. A. Thomas, S. S. Muller, H. Frey, Biomacromolecules **2014**, 15, 1935-1954.
21. A. Dworak, B. Trzebicka, A. Utrata, W. Wałach, Polym. Bull. **2003**, 50, 47-54.
22. M. Weinhart, T. Becherer, N. Schnurbusch, K. Schwibbert, H.-J. Kunte, R. Haag, Adv. Eng. Mater. **2011**, 13, B501-B510.
23. M. Weinhart, I. Grunwald, M. Wyszogrodzka, L. Gaetjen, A. Hartwig, R. Haag, Chem. Asian J. **2010**, 5, 1992-2000.
24. Ch. Xue, B.-Ch. Choi, S. Choi, P.V. Braun, D.E. Leckband, Adv. Funct. Mater. **2012**, 22, 2394-2401.
25. X. Wang, R. Berger, J.I. Ramos, T. Wang, K. Koynov, G. Liu, H.-J. Butt, S. Wu, RSC Adv. **2014**, 4, 45059-450564.
26. S.J. Sofia, V. Premnath, E.W. Merrill, Macromolecules **1998**, 31, 5059-5070.
27. Y.-J. Kim, Y.T. Matsunaga, J. Mater. Chem. B **2017**, 5, 4307-4321.
28. D. Roy, W. L. A. Brooks, B. S. Sumerlin, Chem. Soc. Rev. **2013**, 42, 7214-7243.
29. A. Dworak, B. Trzebicka, A. Utrata, W. Wałach, Polymer Bulletin **2003**, 50, 47-54.
30. M. Doycheva, E. Petrova, R. Stamenova, C. Tsvetanov, G. Riess, Macromol. Mater. Eng. **2004**, 289, 676-680.
31. K. Nagase, J. Kobayashi, T. Okano, J. R. Soc. Interface **2009**, 6(3), S293-309.
32. Z. Hu, T. Cai, Ch. Chi, Soft Matter **2010**, 6, 2115-2123.

33. Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, w Surface initiated polymerization I, Advances in polymer science; J. Jordan, wyd. Springer: Berlin, Heidelberg, **2006**; Vol. 197; p 1-45.
34. R. Hoogenboom, Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, 48, 7978-7994.
35. F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler, J. Controlled Release 2007, 119, 291-300.
36. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J. J. Robin, Macromol. Rapid Comm. **2012**, 33, 1600-1612.
37. R. Hoogenboom, H. Schlaad, Polymers **2011**, 3, 467-488.
38. G. Morgese, E. M. Benetti, Eur. Polym. J. **2017**, 88, 470-485.
39. M. Meyer, M. Antonietti, H. Schlaad, Soft Matter **2007**, 3, 430-431.
40. P.T. Guner, A. Miko, F.F. Schweinberger, A.L. Demirel, Polym. Chem. **2012**, 3, 322-324.
41. A. L. Demirel, M. Meyer, H. Schlaad, Angew. Chem. Int. Ed. **2007**, 46, 8622-8624.
42. C. Diehl, I. Dambrowsky, R. Hoogenboom, H. Schlaad, Macromol. Rapid Comm. **2011**, 32, 1753-1758.

Aliğa Ultrate - Wosolch