

ADSORPCJA BIAŁEK I TWORZENIE ICH WZORÓW NA POWIERZCHNI CIENKICH WARSTW POLIMERÓW

Joanna Zemła

Praca doktorska

Pod opieką

Prof. dr hab. Andrzeja Budkowskiego

ZAKŁAD INŻYNIERII NOWYCH MATERIAŁÓW

INSTYTUT FIZYKI

UNIwersytet Jagielloński

Kwiecień 2012

Spis treści

0. Wprowadzenie	7
1. Wstęp	9
1.1. Wstęp do adsorpcji białek	9
1.1.1. Czynniki kontrolujące adsorpcję białka	9
1.1.2. Zachowanie pojedynczych białek na powierzchni	11
1.1.3. Zachowanie białek w warstwie na powierzchni	12
1.1.4. Rola wody w adsorpcji białek do powierzchni	12
1.1.5. Adsorpcja białek do powierzchniowych wzorów polimerów	13
1.1.6. Literatura	17
1.2. Wstęp do osadzania z roztworu cienkich warstw polimerów	18
1.2.1. Parametr rozpuszczalności	18
1.2.2. Sieciowy model roztworu polimeru	19
1.2.2.1. Mieszaniny polimer-rozpuszczalnik	19
1.2.2.2. Mieszaniny polimer-polimer	20
1.2.2.3. Polimer A- Polimer B- rozpuszczalnik	21
1.2.3. Technika spin- castingu	22
1.2.4. Samo-organizacja w osadzanych cienkich warstwach mieszanin polimerowych	23
1.2.5. Literatura	24
2. Część eksperymentalna	26
2.1. Przygotowanie próbek	26
2.1.1. Techniki miękkiej litografii cienkich warstw polimerowych	26
2.1.1.1. Technika druku mikro-kontaktowego	27
2.1.1.2. Litografia sił kapilarnych	27
2.1.1.3. Technika odwróconego druku mikro-kontaktowego	27
2.1.1.4. Mikro-formowanie warstw wspomagane rozpuszczalnikiem	28
2.1.2. Sieciowanie warstw polimerów rozpuszczalnych w wodzie	28
2.1.3. Funkcjonalizacja powierzchni przez polimerowe pokrycia „inteligentne”	29
2.1.4. Adsorpcja białek do powierzchni polimerów	30
2.2. Techniki badawcze	31
2.2.1. Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna	31
2.2.2. Mikroskopia sił atomowych AFM	32
2.2.3. Pomiary kąta zwilżania wody	33
2.2.3.1. Równanie Younga	33
2.2.4. Spektrometria masowa jonów wtórnych TOF- SIMS	34
2.3. Analiza morfologii powierzchniowych wzorów domen polimerów i białek	35
2.3.1. Metoda geometrii całkowitej	35
2.3.2. Analiza Fouriera	37
2.4. Literatura	37
3. Wyniki	39
3.1. Adsorpcja białka do powierzchni polimerowych	
3.1.1. Określenie relatywnej ilości białka zaadsorbowanego do powierzchni różnych polimerów poprzez analizę obrazów fluorescencyjnych za pomocą metody geometrii całkowitej	40
3.1.1.1. Abstrakt	40
3.1.1.2. Wprowadzenie	41
3.1.1.3. Opis eksperymentu	42
3.1.1.4. Metody	44
3.1.1.4.1. Analiza obrazów fluorescencyjnych o jednorodnej dystrybucji białek	44
3.1.1.4.2. Analiza obrazów fluorescencyjnych o niejednorodnej dystrybucji białek	46
3.1.1.5. Wyniki i ich dyskusja. Adsorpcja białek do różnych podłoży polimerowych	47
3.1.1.6. Podsumowanie	51
3.1.1.7. Literatura	52
3.1.2. Kontrola za pomocą temperatury i pH adsorpcji białka do polimerowych pokryć „inteligentnych”	54

3.1.2.1. Abstrakt	54
3.1.2.2. Wstęp	55
3.1.2.3. Część eksperymentalna	56
3.1.2.3.1. Materiały	56
3.1.2.3.2. Charakterystyka podłoży polimerowych	56
3.1.2.4. Wyniki	58
3.1.2.4.1. Struktura i własności warstw oligoperoksyd- <i>graft</i> - PNIPAM	59
3.1.2.4.2. Temperaturowo i pH zależna odpowiedź szczotek PNIPAM	60
3.1.2.4.3. Kontrola za pomocą temperatury i pH adsorpcji białka do polimerowych pokryć „inteligentnych”	63
3.1.2.5. Podsumowanie i wnioski	67
3.1.2.6. Suplement	68
3.1.2.7. Literatura	68
3.2. Selektywna adsorpcja białka do izotropowych wzorów domen polimerów	71
3.2.1. Adsorpcja białka do domen warstw powstałych dzięki samo-organizacji mieszanin polimerów hydrofobowych i hydrofilowych	71
3.2.1.1. Abstrakt	71
3.2.1.2. Wprowadzenie	72
3.2.1.3. Część eksperymentalna	73
3.2.1.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych	73
3.2.1.3.2. Charakterystyka powierzchni	73
3.2.1.3.3. Adsorpcja białek	73
3.2.1.3.4. Analiza obrazów	74
3.2.1.4. Wyniki	75
3.2.1.4.1. Wzory polimerowe wytworzone przez samo- organizację.....	75
3.2.1.4.2. Adsorpcja białek do powierzchniowych wzorów polimerowych wytworzonych przez samo- organizację	76
3.2.1.5. Podsumowanie i wnioski	81
3.2.1.6. Suplement	82
3.2.1.7. Literatura	82
3.2.2. Sukcesywna adsorpcja białek do domen powierzchniowych mieszanin polimerów hydrofobowych i termo-czułych	85
3.2.2.1. Abstrakt	85
3.2.2.2. Wprowadzenie	85
3.2.2.3. Część eksperymentalna	86
3.2.2.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych	86
3.2.2.3.2. Adsorpcja białek	86
3.2.2.3.3. Charakterystyka powierzchni	87
3.2.2.4. Wyniki	87
3.2.2.4.1. Kontrolowana adsorpcja białek do jednorodnych podłoży PNIPAM- u	87
3.2.2.4.2. Mikro- wzory białkowe na PS/ PNIPAM	88
3.2.2.5. Podsumowanie	89
3.2.2.6. Literatura	90
3.3. Mikro-macierze białka jako wynik jego grupowania przez regularne wzory domen na powierzchniach polimerów	91
3.3.1. Adsorpcja białka do powierzchni polimeru o regularnym kontraście adsorpcji wprowadzonym przez miękką litografię	91
3.3.1.1. Abstrakt	91
3.3.1.2. Wstęp	92
3.3.1.3. Materiały i metody	93
3.3.1.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych	93
3.3.1.3.2. Adsorpcja białek.....	94
3.3.1.3.3. Charakterystyka powierzchni	94
3.3.1.3.4. Analiza obrazów	95
3.3.1.4. Wyniki	95

3.3.1.4.1. Mikro- wzory białkowe o odwróconym kontraście	97
3.3.1.4.2. Substruktury w mikro- wzorach białkowych	100
3.3.1.4.3. Analiza Fouriera mikro- wzorów białkowych.....	102
3.3.1.5. Wnioski	103
3.3.1.6. Literatura	104
3.3.2. Adsorpcja białka do regularnych struktur domenowych dwu polimerów wytworzonych przy pomocy miękkiej litografii	106
3.3.2.1. Abstrakt	106
3.3.2.2. Wstęp	107
3.3.2.3. Część eksperymentalna	107
3.3.2.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych	107
3.3.2.3.2. Charakterystyka powierzchni	107
3.3.2.3.3. Adsorpcja białek	107
3.3.2.3.4. Wzory wytworzone techniką mikro- formowania warstw SAMIM	108
3.3.2.4. Podsumowanie i wnioski	110
3.3.2.5. Literatura	111
3.3.3. Adsorpcja białka do samo-organizujących się domen mieszanin dwu polimerów o regularności narzuconej przez miękką litografię	112
3.3.3.1. Abstrakt	112
3.3.3.2. Wstęp	113
3.3.3.3. Część eksperymentalna	114
3.3.3.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych	114
3.3.3.3.2. Osadzanie mieszanin polimerów	115
3.3.3.3.3. Adsorpcja białka	115
3.3.3.3.4. Charakterystyka powierzchni	115
3.3.3.3.5. Analiza obrazów	116
3.3.3.4. Dyskusja wyników	117
3.3.3.4.1. Powierzchniowe wzory polimerów na jednorodnych substratach.....	117
3.3.3.4.2. Grupowanie białka do wzorów powierzchniowych wytworzonych przez samo- organizację o regularności narzuconej przez miękką litografię.....	121
3.3.3.5. Wnioski	130
3.3.3.6. Informacje uzupełniające	132
3.3.3.7. Literatura	133
4. Podsumowanie	136
5. Aneks	138

Wprowadzenie

Standardowym materiałem stosowanym w zestawach testów immunologicznych są polimery, ponieważ wykazują one wysoką adsorpcję oraz jednorodność pokrycia białkiem. W ostatnim dziesięcioleciu zainteresowanie przesuwa się z polimerowych materiałów masowych w kierunku cienkich warstw. Ich powierzchnie mogą być użyte do tworzenia wzorów gęsto (o odstępach < 200 mikrometrów) i regularnie ułożonych domen białek. Te tzw. mikro-macierze białek są podstawą konstrukcji zminiaturyzowanych odpowiedników klasycznych testów immunologicznych oraz mogą posłużyć jako podłoża do niejednorodnej hodowli komórek (zwłaszcza gdy białka, tak jak lektyny użyte w tej pracy, wiążą się specyficznym z grupami z powierzchni komórek). Sam problem kontroli pokrywania przez białka cienkich warstw polimerów jest też ważny dla rozwoju biosensorów i biomateriałów.

Głównym celem tej pracy był rozwój strategii tworzenia mikro-macierzy białek (lektyn) przez ich ***selektywną adsorpcję do regularnych powierzchniowych struktur domenowych wieloskładnikowych cienkich warstw polimerów funkcjonalnych***, w tym hydrofobowych, hydrofilowych, wrażliwych na bodźce środowiska („inteligentnych”) czy podatnych na techniki miękkiej litografii modyfikujące własności adsorpcyjne czy morfologię.

Podstawowe zagadnienia dotyczące preparatyki (m.in. sieciowania warstw polimerów rozpuszczalnych w wodzie), technik badawczych i analizy morfologicznej (procedur wykonywanych przez Autorkę osobiście za wyjątkiem tych opisanych w paragrafie 2.1.5 oraz 2.2.3-2.2.4) są przedstawione w **Sekcji 2**. Natomiast najważniejsze wyniki eksperymentalne pracy są przedstawione w **Sekcjach 3.1 do 3.3**.

Pierwszym etapem na drodze do zastosowania selektywnej adsorpcji w celu powierzchniowego grupowania białek jest ***wybór powierzchni polimerów o kontrastującej, najlepiej też łatwo kontrolowanej przez bodźce zewnętrzne, adsorpcji*** dla wybranych parametrów zarówno tworzenia cienkich warstw polimerów oraz samego procesu adsorpcji białka. Motywowało to,

niezależnie od problemu rozwoju biomateriałów, badania przedstawione w **Sekcji 3.1. Rozdział 3.1.1** porównuje ilość białka zaadsorbowanego do powierzchni różnych warstw polimerowych [m.in. polistyrenu PS, poli(tlenku etylenu) PEO i poli(metakrylanu metylu) PMMA] przez wprowadzoną analizę obrazów fluorescencyjnych za pomocą metody geometrii całkowitej. Następny **rozdział 3.1.2** stosuje to podejście, porównane z wynikami spektrometrii masowej jonów wtórnych TOF-SIMS, do opisu kontroli za pomocą temperatury i pH adsorpcji białka do pokryć „inteligentnych” [opartych o poli(N-izopropylakrylamid) PNIPAM polimeryzowany z nanowarstw oligoperoksydów].

Drugim etapem wiodącym do tworzenia regularnego powierzchniowego mikro-grupowania białka jest przedstawiona w **Sekcji 3.2 ocena i kontrola selektywności adsorpcji do izotropowych wzorów powierzchniowych** o dwu typach domen. Uzyskuje się je w trakcie osadzania cienkich warstw mieszanin polimerów dzięki procesowi samo-organizacji (separacji faz). Pomija się tu regularność grupowania białek, aby skupić się na relacji morfologicznej między wzorem domen polimerów i domen białek, opisanej (przy użyciu metody geometrii całkowitej) w **rozdziale 3.2.1**. Okazuje się, że ze względu na amfipatyczność białka nie każda para domen polimerów o kontrastującej adsorpcji [np. PS/ PEO tak, PS/ PMMA nie] daje selektywną adsorpcję do domen polimeru hydrofobowego. Kontrola tej selektywności uzyskana przy pomocy temperatury dla domen powierzchniowych cienkich warstw mieszaniny polimerów hydrofobowego i termo-czułego [PS/ PNIPAM] pozwoliła (patrz **rozdział 3.2.2**) na sukcesywną adsorpcję dwu różnych białek. Wynik ten to propozycja nowej, nie opartej o wielokrotny druk mikro-kontaktowy biomolekuł, strategii tworzenia mikrometrowych płytek testowych zawierających różne białka.

Bezpośrednie odniesienie do tworzenia mikro-macierzy białek mają przedstawione w **sekcji 3.3** badania nad ich grupowaniem za pomocą **adsorpcji do wzorów domen** na powierzchni polimerowej, **które są regularne dzięki zastosowaniu różnych technik miękkiej litografii**. Regularność ta jest testowana za pomocą analizy Fouriera. **Rozdział 3.3.1** przedstawia wyniki adsorpcji białka do powierzchni polimeru [PS zakończonego grupą aminową] o topografii zadanej przez litografię sił kapilarnych i kontraście adsorpcji wprowadzonym przed odwrócony druk mikro-kontaktowy [przy pomocy silanów zawierających PEO]. Z kolei następny **rozdział 3.3.2** opisuje adsorpcję do powierzchni powstałych przez wspomagane rozpuszczalnikiem mikro-formowanie górnej z dwu warstw polimerów osadzonych kolejno [PEO/ bromowany PS]. W końcu w **rozdziale 3.3.3** druk mikro-kontaktowy podłoża [Au za pomocą tioli zakończonych grupą metylową] wprowadza szablon, który porządkuje proces samo-organizacji mieszaniny dwu polimerów [PS/ PEO] w czasie osadzania cienkiej warstwy i prowadzi do regularnych wzorów powierzchniowych domen polimerów użytych do selektywnej adsorpcji białka.

Wyniki pracy są podsumowane w **Sekcji 4**.

Rozdział 1.1

Wstęp do adsorpcji białek

Adsorpcja białek do powierzchni ciał stałych jest powszechnym i skomplikowanym procesem, ważnym z punktu widzenia badań medycznych, farmaceutycznych, analitycznych, biotechnologii, biologii komórki oraz biofizyki.

Adsorpcja białek jest zjawiskiem częstym, ponieważ jest pierwszym etapem wielu reakcji biologicznych np. w przypadku syntetycznych macierzy zewnątrzkomórkowych adsorpcja białek jest kluczowym elementem umożliwiającym prawidłowy rozwój tkanki¹, podczas gdy w przypadku implantów biomedycznych, mających kontakt z krwią, adsorpcja białek może prowadzić do zakrzepicy.^{2,3} Ponadto zaadsorbowane białka mogą być inicjatorami adhezji innych cząsteczek, bakterii czy komórek.⁴⁻⁶ Na polu badań analitycznych niespecyficzna adsorpcja białek do powierzchni sensora, macierzy białkowej, płytki testowej jest poważnym problemem redukującym użyteczność tych urządzeń.⁷ Dlatego bez wątpienia poznanie mechanizmów oraz kontrola (nieuniknionej) adsorpcji białka do powierzchni różnych materiałów jest ważnym zagadnieniem.⁸

1.1.1. Czynniki kontrolujące adsorpcję białka

Wpływ środowiska zewnętrznego. Warunki, w których zachodzi adsorpcja białka wywierają zasadniczy wpływ na zachowanie tych molekuł. Są to: temperatura, pH, rodzaj buforu, siła jonowa. Temperatura wpływa nie tylko na równowagę termodynamiczną ale również na kinetykę adsorpcji białka. Podwyższona temperatura wywołuje wzmożoną dyfuzję białek w kierunku powierzchni adsorbentu. Główną siłą rządzącą adsorpcją białek jest wzrost entropii spowodowany uwolnieniem z ich powierzchni zaadsorbowanych cząsteczek wody oraz jonów soli, a także przeorganizowanie struktury białka. Ilość zaadsorbowanych białek rośnie wraz ze wzrostem temperatury.⁹

pH natomiast wpływa na stan elektrostatyczny białek. Kiedy pH równe jest punktowi izoelektrycznemu białka (pI) ładunki na powierzchni białka kompensują się, a cała molekula jest elektrycznie obojętna. W niskim pH (pI) białka są dodatnio naładowane, a w $pH > pI$ są naładowane ujemnie. Jeśli powierzchnia adsorbentu również jest naładowana to adsorpcja jest kontrolowana przez oddziaływania elektrostatyczne. Należy jednak pamiętać, że oprócz oddziaływania bio- molekuł z powierzchnią, adsorbujące białka oddziałują ze sobą nawzajem. Lateralne oddziaływanie białek może spowodować albo zwiększenie gęstości upakowania molekuł, albo efekt przeciwny związany z odpychającymi siłami elektrostatycznymi. Ponadto działanie sił jonowych sprzyja tworzeniu się agregatów białek.⁹

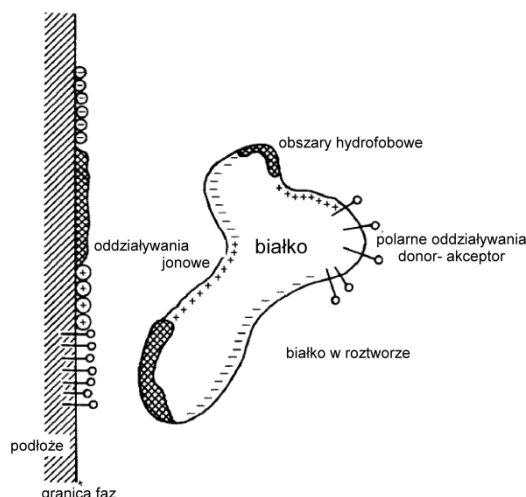
Wpływ własności białek na ich adsorpcję Białka to złożone biopolimery zbudowane z 20 aminokwasów budujących mery (z sekwencją określającą strukturę pierwszorzędową), do których dodatkowo mogą być dołączone łańcuchy boczne oligosacharydów, lipidów. Na skutek wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych formuje się struktura drugorzędowa białek (α - helisa, β - harmonijka), natomiast oddziaływania jonowe, hydrofobowe, mostki siarczkowe odpowiadają za strukturę trzeciorzędową białek. Z połączenia łańcuchów polipeptydowych, każdy o określonej strukturze 1-, 2- i 3- rzędowej, formuje się struktura czwartorzędowa białka.¹⁰ Ta wyjątkowa różnorodność podstawowych elementów budulcowych wpływa na złożoność struktury i funkcjonowania białek, przez co zagadnienie adsorpcji jest trudne.

Klasyfikując białka ze względu na ich oddziaływanie z powierzchnią uwzględnia się ich rozmiar, budowę, stabilność struktury. Małe i sztywne białka (np. lizozymy) wykazują słabą tendencję do zmian konformacyjnych na skutek adsorpcji. Podczas gdy u białek średnich, jak albumina czy immunoglobuliny, adsorpcja powoduje konformacyjną reorientację molekuł, powodującą ekspozycję różnych części molekuly o odmiennych własnościach hydrofobowych/ hydrofilowych, polarnych/ niepolarnych, naładowanych/ elektrycznie obojętnych.¹¹ W przypadku białek o dużych rozmiarach molekuł, glikoprotein czy glikolipidów, ich oddziaływanie z powierzchnią jest zdominowane przez oddziaływania ich łańcuchów bocznych.⁹

W roztworach wielu białek, ich adsorpcja do powierzchni wynika z efektów: transportu, adsorpcji i działania sił odpychających. Dyfuzja małych molekuł jest szybsza niż dużych białek, dlatego w pierwszym etapie adsorbują małe proteiny. Z drugiej strony duże białka wiążą się mocniej do powierzchni, ze względu na większy obszar kontaktu, oraz mogą wymuszać desorpcję mniejszych białek w czasie dyfuzji po powierzchni. W wyniku tego można zaobserwować lokalne maksimum na czasowej zależności adsorpcji białka. To zachowanie nazywa się efektem Vromana.^{9, 10}

Wpływ własności powierzchni na adsorpcję białek. Ważnymi dla adsorpcji białek parametrami charakteryzującymi powierzchnię są energia powierzchniowa, polarność, ładunek oraz morfologia i chropowatość (rysunek 1.1).¹² Wszystkie te parametry można łatwo określić dla pokryć polimerowych, które obok powierzchni modyfikowanymi molekułami samo- organizującymi się stanowią główną grupę materiałów, które są wykorzystywane do badań adsorpcji.⁹

Badania pokazały, że białka chętniej adsorbują do powierzchni niepolarnych niż polarnych, o wysokim napięciu powierzchniowym, a do powierzchni obojętnych elektrycznie adsorbują niechętnie.⁹ Jednak za główną, najważniejszą cechę podłoża determinującą adsorpcję białek uznaje się jego hydrofobowość.^{9, 10, 12}



Rysunek 1. 1 Schemat oddziaływania białka z dobrze scharakteryzowaną powierzchnią. Na powierzchni białka można wyróżnić obszary o różnych właściwościach (hydrofobowość, polarność, ładunek). Powierzchnia adsorbentu także składa się z obszarów o różnych właściwościach. Według [10].

1.1.2. Zachowanie pojedynczych białek na powierzchni

Orientacja białka. Białka są molekułami asymetrycznymi, w wyjątkowych wypadkach mają sferyczny kształt, najczęściej mają formę elipsoidy, lub bardziej wyszukane np. serco-kształtne BSA, czy Y-kształtne immunoglobuliny. W roztworze białka rotują swobodnie, natomiast zaadsorbowane do powierzchni przyjmują określoną orientację, która determinuje jaka część biomolekuły oddziałuje z powierzchnią, a która część jest eksponowana w roztworze. Obrona orientacja białka jest istotna, kiedy zaadsorbowane białka są enzymami, receptorami lub wykazują inną specyficzną bioaktywność, ponieważ niewłaściwa orientacja może zablokować dostęp ligandów do miejsc wiążących.⁹

Adsorbujące białka przyjmują orientację zapewniającą uzyskanie minimum energii swobodnej, co wynika z oddziaływań kulombowskich, van der Waals'a, wiązań wodorowych, wzrostu entropii. Ponieważ białka w różnych obszarach mają różne właściwości wynikające z lokalnej budowy (ładunek, hydrofobowość) sądzi się, że do podłoża hydrofobowych białka eksponują te fragmenty, które są bogate w residua hydrofobowe. Analogicznie, białka adsorbujące do naładowanych powierzchni eksponują fragmenty biomolekuły o ładunku przeciwnym. Jednak, w przypadku dużej gęstości zaadsorbowanych białek oddziaływania między 'sąsiadami' mogą być dominujące w porównaniu do oddziaływania białko-naładowana powierzchnia. Siły odpychające między białkami, mogą spowodować reorientację molekuł, tak że ładunek białka i podłoża będzie taki sam.⁹

Zmiany konformacyjne. Oddziaływanie białka z powierzchnią może prowadzić do zmian konformacyjnych molekuły. Jednak dowiedziono eksperymentalnie, że aktywność enzymów po adsorpcji do powierzchni może być niezmienną lub nieco osłabioną w porównaniu do wolnych enzymów jeśli miejsca wiążące są zorientowane w kierunku roztworu.^{9,10} Na przykładzie specyficznego oddziaływania pary karboksypeptydaza Y-konkanawalina A (glikoproteina- lektyna) pokazano, że adsorpcja do powierzchni polimerowej (PS/ PEO) nie wpłynęła na zdolność specyficznego wiązania Ca Y do Con A.¹³

1.1.3. Zachowanie białek w warstwie na powierzchni

Struktura warstwy białek. Białka mogą formować rzadko lub gęsto upakowaną monowarstwę. W specyficznych warunkach, promujących agregację molekuł lub hamujących oddziaływania odpychające, tworzą wielowarstwy. Obserwacje pokazują, że upakowanie monowarstwy zależy od elektrostatycznych oddziaływań między zaadsorbowanymi białkami (związek między pH a pI) oraz od koncentracji roztworu, masy cząsteczkowej białka.^{9, 14}

W przypadku braku innych oddziaływań białko- białko niż krótko- zasięgowe odpychanie, białka adsorbują w sposób przypadkowy.

Oddziaływania lateralne. O oddziaływaniach lateralnych^{9, 12} mówimy, gdy białka oddziałują nie tylko z powierzchnią adsorbentu, ale również ze sobą. Jest to możliwe, gdy pH jest różne od punktu izoelektrycznego białka oraz, gdy powierzchnia zostanie pokryta krytyczną ilością biomolekuł. Te oddziaływania elektrostatyczne mogą być dodatkowo modulowane przez jony buforu.

Zaobserwowano również efekt 'katalizy desorpcji', polegający na tym że na skutek zwiększającego się upakowania białek, zmniejszają się odległości między 'sąsiadami' i kolejne adsorbujące biomolekuły mogą powodować desorpcję wcześniej osadzonych białek. To zjawisko jest powiązane z opisanym wcześniej efektem Vromana.

Agregacja białek. Bardzo ważnym aspektem zjawiska adsorpcji białek jest tworzenie się ich agregatów a nawet klasterów.^{9, 14} Ten proces może powodować kumulowanie się dużej ilości białek na powierzchni adsorbenta i wpływać nie tylko na kinetykę adsorpcji ale również na strukturę warstwy białek. Agregaty mogą powstawać przez dyfuzję zaadsorbowanych białek w kierunku większych ich grup lub przez bezpośrednią adsorpcję białek z buforu do wcześniej zaadsorbowanych biomolekuł. Okazuje się, że białka preferują adsorbować w obszarach częściowo pokrytych już przez białka niż w obszarach pustych. Również rozmiar agregatu wpływa na adsorpcję kolejnych białek. Agregacja może wpływać na funkcjonalność płytek proteinowych służących do badania funkcji komórkowych.

1.1.4. Rola wody w adsorpcji białek do powierzchni

Adsorpcja białek to nie tylko oddziaływanie biomelekul ze sobą i z adsorbantem, ale również z cząsteczkami rozpuszczalnika. Większość eksperymentów adsorpcji białek przeprowadzana jest w buforze, czyli wodnym roztworze soli.

Woda jest specyficznym rozpuszczalnikiem, ponieważ cząsteczki wody łączą się ze sobą za pośrednictwem wiązań wodorowych lub sił dyspersyjnych Lifshitz- van der Waalsa. W efekcie woda to sieć połączonych molekuł- agregatów, gdzie około 75 % cząsteczek w temperaturze pokojowej jest połączonych z trzema, czterema 'sąsiadami'.¹⁴

Cząsteczki wody wiążą się również z powierzchnią adsorbenta, jak również z molekułami białek. Fizyko- chemiczny charakter wiązania woda- adsorbent zależy od własności fizyko- chemicznych powierzchni adsorbenta. Zastąpienie cząsteczek wody adsorbującymi białkami na powierzchni adsorbenta związane jest ze zmianą energii.

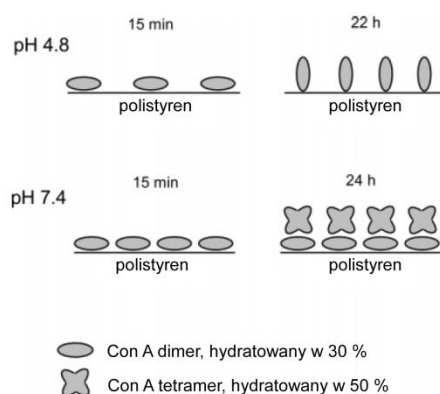
Adsorpcja białek jest kontrolowana przez kombinację oddziaływań białko/ powierzchnia, białko/ białko, białko/ woda, woda/ powierzchnia adsorbenta.¹⁵

1.1.5. Adsorpcja białek do powierzchni i wzorów polimerów

Adsorpcja Con A do polistyrenu. Mielczarski i in.¹⁶ przeprowadzili badania technikami spektroskopii fotoelektronów (XPS) oraz osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR- IR) warstwy zaadsorbowanej Con A do pokrycia polistyrenu (PS) w pH 4,8 oraz 7,4. Zbadano również wpływ czasu ekspozycji na strukturę warstwy zaadsorbowanych białek.

Zaobserwowano, że w środowisku o kwaśnym pH zaadsorbowana Con A tworzy monowarstwę. Czas ekspozycji wpływa na orientację bio- molekuł i tak w pH 4,8 po czasie 15 min dimery Con A adsorbują układając się osią długą równolegle do podłoża (orientacja 'side-on'), natomiast po 22 h oś długa bio- molekuly jest prostopadła do powierzchni PS (orientacja 'end-on') (rysunek 1.2).

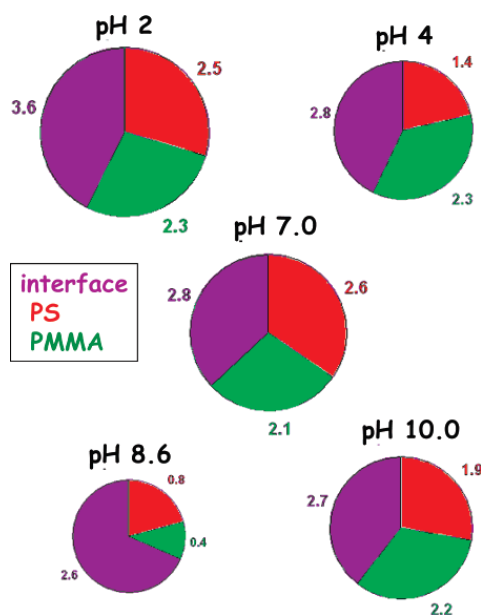
W pH neutralnym wydłużenie czasu adsorpcji do 24 h powoduje formowanie się wielowarstwy białek, ale dla krótkich czasów adsorpcji (15 min) powstaje monowarstwa (grubość 3 nm) Con A zawierająca 30 % wody.



Rysunek 1. 2 Schemat orientacji i struktury udokumentowanych eksperymentalnie etapów adsorpcji Con A do PS w pH 4,8 i 7,4. Według [16].

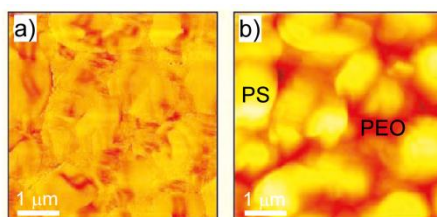
Badania adsorpcji białek do powierzchniowych wzorów domen mieszanin polimerów. Metodą rentgenowskiej fotoemisyjnej mikroskopii elektronowej (X- PEEM) zbadano adsorpcję albuminy (HSA) i fibrynogenu (Fg) do powierzchniowych wzorów mieszanin polistyrenu PS i poli(metakrylanu metylu) PMMA, PS/ poliaktydu PLA oraz PS/ politlenku etylenu PEO w warunkach różnego pH, temperatury, oraz w funkcji czasu adsorpcji i koncentracji białka.

Dla pokryć PS/ PMMA zaobserwowano wzmocnioną adsorpcję albuminy na powierzchniach rozdzielających domeny PS i PMMA.^{17, 18} Zaobserwowano również, że wydłużenie czasu ekspozycji oraz zwiększenie koncentracji białka powoduje pokrycie białkami wszystkich faz polimerowych powierzchni.¹⁷ Badania pokazały, że w warunkach różnego pH zmienia się stopień adsorpcji albuminy do domen faz PS i PMMA oraz do powierzchni międzyfazowej (rysunek 1.3).¹⁸



Rysunek 1. 3 Względna ilość zaadsorbowanej albuminy do różnych obszarów powierzchni PS/ PMMA w funkcji pH (czerwony- PS, zielony- PMMA, fioletowy- powierzchnia rozdziálu PS i PMMA) otrzymane z pomiarów X- PEEM. Liczby to średnia grubość (nm) warstwy w każdym obszarze. Pole każdego koła jest proporcjonalne do całkowitej ilości albuminy na powierzchni w danym pH. Według [18].

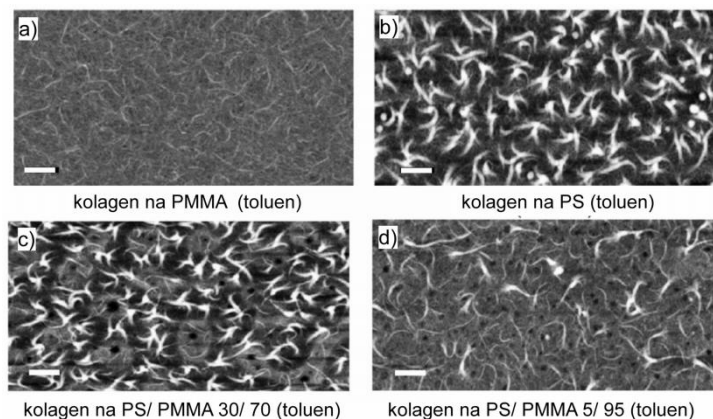
Leung i in.¹⁹ pokazali adsorpcję HSA do powierzchniowych wzorów mieszaniny wysokocząsteczkowych PS/ PEO (frakcja wagowa 3:2). Z pomiarów X- PEEM wynika, że otrzymane obszary nie zawierały domen fazowych czystego PS czy PEO. Po 18 h wygrzewania w 160 °C skład wytworzonych wzorów przedstawiał się następująco: obszar bogaty w PS zawierał około 70 % PS i 30 % PEO, natomiast obszar bogaty w PEO zawierał około 70 % PEO i 30 % PS (rysunek 1.4 c). Niecałkowita separacja fazowa może tłumaczyć zaobserwowaną adsorpcję do faz bogatych w PS i PEO oraz wzmocnioną adsorpcję HSA (z wody dejonizowanej) do powierzchni międzyfazowej (jednak niewiele wyższą niż do PS i PEO, porównaj rysunek 1.4 c).



c)		HSA concentration (mg/mL)		
		0.05	0.01	0.005
PS	PS	6.1	6.5	6.9
	PEO	3.1	2.7	2.6
	HSA	0.8	0.8	0.5
PEO	PS	2.7	3.8	3.1
	PEO	7.1	5.2	6.2
	HSA	0.8	1.0	0.7
interface	PS	4.8	4.7	4.9
	PEO	4.3	4.0	4.2
	HSA	1.0	1.3	1.0

Rysunek 1. 4 Obraz fazowy (a) oraz topograficzny AFM (b) wzorów powierzchniowych mieszaniny wysokocząsteczkowego PS i PEO (3:2). Tabela (c) zawiera informacje o koncentracji polimerów oraz białka (grubość w nm, niepewność $\pm 0,5$ nm) w różnych obszarach próbki. Pokrycia PS/ PEO eksponowano do wodnych roztworów HSA o stężeniu białka 0,05; 0,01 oraz 0,005 mg/mL. Według [19].

Zuydrehoff i in.²⁰ za pomocą mikroskopu AFM zobrazowali organizację kolagenu pokrywającego warstwy polimerowe PS oraz PMMA (rysunek 1.5). Zaobserwowano gęstsze upakowanie białka na powierzchni PS niż na PMMA. Badania adsorpcji kolagenu przeprowadzone dla pokryw mieszanin PS/ PMMA o różnej morfologii pokazały, że rozmiar domen PS (wyspy lub dołki) wpływa na orientację i konformację bio- molekuł.

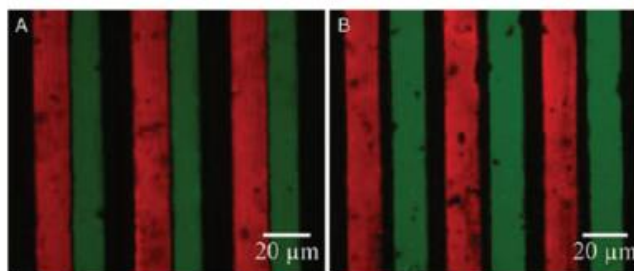


Rysunek 1. 5 Obrazy AFM ($5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$, $z = 30 \text{ nm}$, słupek skali 500 nm) zarejestrowane po adsorpcji kolagenu do jednorodnych podłoży PMMA (a) i PS (b) oraz wzorów powierzchniowych mieszanin PS i PMMA (c, d).

Tworzenie regularnych wzorów białek. Do wytwarzania regularnych wzorów jednego rodzaju lub wielu białek stosuje się metody oparte na technice druku mikro- kontaktowego (μCP).²¹⁻²⁵ Jako podkłady służą czyste^{21,23} lub zmodyfikowane chemicznie²² (przez warstwy molekuł samo- organizujących się, polimery) płytki szklane.

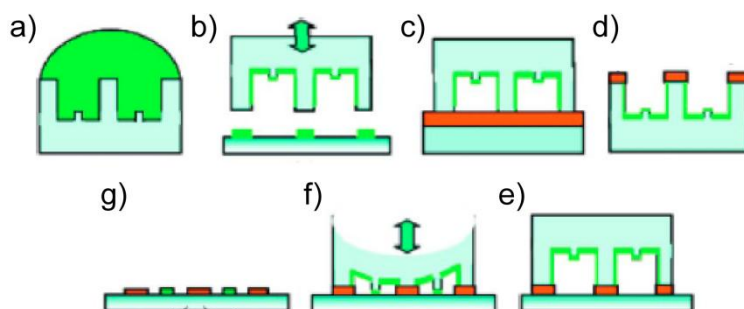
Inerowicz i in.²¹ zaproponowali tworzenie regularnych wzorów wielu białek w dwóch etapach. W pierwszym kroku techniką μCP nadrukowano wzór jednego białka (wiązanie kowalencyjne). W drugim kroku w wolnych obszarach substratu osadzono inne białko przez adsorpcję.

Eichinger i in.²⁴ również wytworzyli regularne wzory dwóch białek stosując μCP . Odpowiednie zmodyfikowanie stolika odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego umożliwiło precyzyjne zastosowanie μCP . Obserwując pod mikroskopem powierzchnię próbki pieczętką PDMS nadrukowano paski lamininy, następnie krok ten powtórzono dla agrekanu. Obserwacja mikroskopowa pozwala na precyzyjne przyłożenie drugiej pieczętki, tak aby uniknąć przekrywania się obszarów z nadrukowanymi białkami (rysunek 1.6).



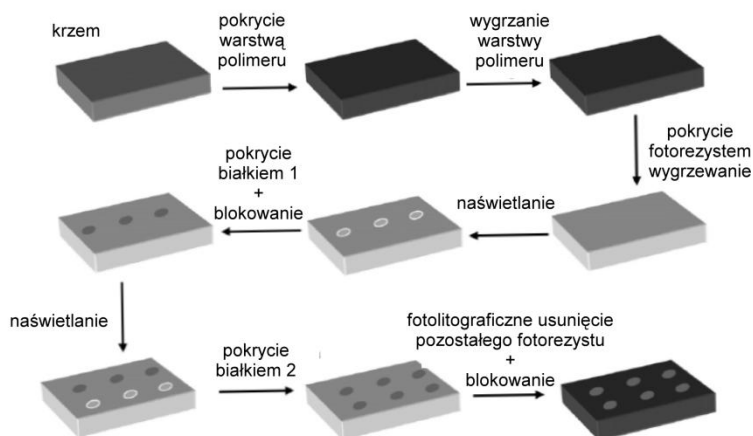
Rysunek 1. 6 Nadrukowane mikro- kontaktowo wzory lamininy (znakowanej fluorescencyjnie Alexa Fluor 488) oraz agrekanu (znakowanego fluorescencyjnie Alexa Fluor 592). Zamierzony odstęp między pasami $0 \mu\text{m}$ (a) oraz $5 \mu\text{m}$ (b). Według [24].

Chalmeau i in.²⁵ zaprezentowali jednocześnie nadrukowywanie dwóch różnych białek za pomocą wielopoziomowej pieczętki PDMS (jedno krokowy druk multi- mikro- kontaktowy, OSM- μ CP). Kluczowe znaczenie w tej metodzie ma geometria wzoru pieczętki oraz ciśnienie działające na pieczętkę.



Rysunek 1. 7 Schemat wytwarzania mikro-wzorów dwóch białek techniką multi-mikro-druku kontaktowego jednego kroku (OSM- μ CP). (a-d) procedura zwilżania pieczętki roztworami białek. (e-g) nadrukowywanie białek przez przyłożenie zewnętrznego ciśnienia. Według [25].

Wytworzono również wzory wielu białek na podłożach polimerowych stosując metodę fotolitografii (rysunek 1.8).²⁶ Przygotowano warstwę polimeru, na którą po wygrzaniu nałożono warstwę fotorezystora. Po przykryciu jej maską kwarcową próbkę naświetlano lampą rtęciową (350 W). Po czym warstwę fotorezystora wywołano tworząc regularne wzory. Następnie przez adsorpcję osadzono immunoglobuliny, a w kolejnym kroku powierzchnię pokryto roztworem blokującym. Później procedurę litograficzną powtórzono tworząc wzory dla następnego białka. W kolejnym etapie przeprowadzono eksperyment adsorpcji albuminy. Ponownie zastosowano procedurę blokowania. W ostatnim kroku usunięto warstwę fotorezystora, otrzymując warstwę polimerową pokrytą regularnymi wzorami wielu białek.



Rysunek 1. 8 Schemat procedury przygotowania wzorów białkowych na powierzchni polimerowej metodą fotolitografii. Według [26].

1.1.6. Literatura

- (1) Vogler, V.; Baneyx, G. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, 5, 441-463.
- (2) Walker, R. K.; Krishnawamy, S. J. *Biol. Chem.* **1994**, 269, 27441-27450.
- (3) Malmsten, M.; Muller, D.; Lassen, B. J. *Colloid Interface Sci.* **1997**, 193, 88-95.
- (4) Elofsson, U. M.; Paulsson, M. A.; Arnebrant, T. *Colloids Surf. B* **1997**, 8, 163-169.
- (5) Wahlgren, M.; Elofsson, U. J. *Colloid Interface Sci.* **1997**, 188, 121-129.
- (6) Kalasin, S.; Santore, M. M. *Colloids Surf. B* **2009**, 73, 229-236.
- (7) Dimilla, P. A.; Albeda, S. M.; Quinn, J.A. J. *Colloid Interface Sci.* **1992**, 153, 212-225.
- (8) Horbett, T. A.; Brash, J. L. *Proteins at interfaces II. Fundamentals and Applications* ACS: Waszyngton, **1995**.
- (9) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, 162, 87-106.
- (10) Andrade, J. D.; Hlady, V. *Adv. Polym. Sci.* **1986**, 79, 1-63.
- (11) Andrade, J. D.; Hlady, V.; Wei, A. P. *Pure Appl. Chem. B* **2009**, 113, 1777-1781.
- (12) Hlady, V.; Buijs, J.; Jennissen, H. P. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 402-429.
- (13) Zemła, J. *Adsorpcja białek do powierzchni i wzorów polimerowych*, praca magisterska, Uniwersytet Jagielloński: Kraków, **2007**.
- (14) Vogler, E. A. *Biomaterials* **2012**, 33, 1201-1237.
- (15) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. *Soft Matter* **2009**, 5, 1039-1047.
- (16) Mielczarski, J. A.; Dong, J.; Mielczarski, E. J. *Phys. Chem. B* **2008**, 112, 5228-5237.
- (17) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Robar, N.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Phys. Chem. B* **2006**, 110, 16763-16773.
- (18) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2150-2158.
- (19) Leung, B. O.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *Langmuir* **2010**, 26, 14759-14765.
- (20) Zuyderhoff, E. M.; Dupont- Gillian, C. C. *Langmuir* **2012**, 28, 2007-2014.
- (21) Inerowicz, H. D.; Howell, S.; Regnier, F. E.; Reifenger, R. *Langmuir* **2002**, 18, 5263-5268.
- (22) Corum, L. E.; Eichinger, C. D.; Hsiao, T. W.; Hlady, V. *Langmuir* **2011**, 27, 8316-8322.
- (23) Renault, J. P.; Bernard, A.; Bietsch, A.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E.; Kreiter, M.; Hecht, B.; wild, U. P. J. *Phys. Chem. B* **2003**, 107, 703-711.
- (24) Eichinger, C. D.; Hsiao, T. W.; Hlady, V. *Langmuir* **2012**, 28, 2238-2243.
- (25) Chalmeau, J.; Thibault, C.; Carcenac, F.; Vieu, C. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 133901-133903.
- (26) Petrou, P. S.; Chatzichristidi, M.; Douvas, A. M.; argitis, P.; Misiakos, K.; Kakabakos, S. E.; *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, 1994-2002.

Rozdział 1.2

Wstęp do osadzania z roztworu cienkich warstw polimerów

1.2.1. Parametr rozpuszczalności

Rozpuszczalnikiem nazywamy ciecz, która jest zdolna rozpuścić inne materiały, które nazywamy substancjami rozpuszczalnymi. Mieszaninę rozpuszczalnika i substancji rozpuszczanej nazywamy roztworem.

Molekuły cieczy (jak również ciał stałych) oddziałują ze sobą siłami van der Waalsa (polarne, dyspersyjne) oraz przez wiązania wodorowe. Kiedy rozpuszczalnik rozpuszcza substancję, jego cząsteczki wnikają między molekuły substancji rozpuszczanej osłabiając ich wzajemne oddziaływania powodują ich separację. Zatem proces rozpuszczania jest najbardziej efektywny, gdy oddziaływania molekuł rozpuszczalnika i rozpuszczanej substancji są podobne.

Parametr rozpuszczalności Hildebranda uwzględnia gęstość energii potrzebną do odseparowania wszystkich molekuł cieczy lub ciała stałego, zatem energię jaka musi być dostarczona układowi, aby doprowadzić go do stanu gazowego i wyrażony jest wzorem:

$$\delta = c^{0,5} = \frac{\Delta E_V}{V_m} \quad (1)$$

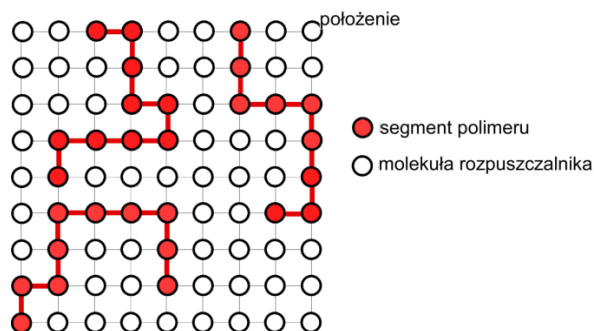
gdzie: c to gęstość energii kohezji, ΔE energia parowania, a V_m objętość molowa.

Wartość parametru rozpuszczalności często stosowanych rozpuszczalników mieści się w przedziale od 14 MPa^{1/2} (n- pentan) do 48 MPa^{1/2} (woda). 'Spektrum' rozpuszczalników można przedstawić szeregując je według wartości parametru rozpuszczalności. Jeśli wybrany rozpuszczalnik rozpuszcza dany materiał, rozpuszczalniki z jego najbliższego sąsiedztwa spektrum również wykażą te własności.

1.2.2. Sieciowy model roztworu polimeru.

1.2.2.1. Mieszaniny polimer- rozpuszczalnik

Flory, Huggins i Staverman w 1941 roku zaproponowali i opisali teorię modelu sieciowego dla roztworów polimerów.



Rysunek 1. 9 Sieciowy model roztworu polimeru. Miejsca zajęte przez segmenty polimeru (koła) oraz przez cząsteczki rozpuszczalnika (okręgi). Według [1].

Przedstawione podejście zakłada, że molekuły rozpuszczalnika i segmentów polimeru tworzą dwuwymiarową lub trójwymiarową sieć, gdzie każdy z węzłów sieci jest zajęty i ma taki sam rozmiar (rysunek 1.9). Zatem pojedynczy segment oddziałuje z wieloma sąsiadami (Z). Teoria bliskiego pola pomija korelacje położenia segmentów polimeru czy molekuł rozpuszczalnika. Załóżmy, że n_p łańcuchów polimerowych składających się z N segmentów jest zlokalizowanych w węzłach sieci (n liczba dostępnych pozycji). Więc $n_p \cdot N$ węzłów jest obsadzonych przez segmenty polimeru, a $\varphi = n_p \cdot N / n$ jest frakcją objętościową polimerów, $1 - \varphi = (n - n_p \cdot N) / n$ to frakcja rozpuszczalnika, którego molekuły zajmują $n_s = (1 - \varphi)n$ pozycji. Przed mieszaniem entalpię całkowitą można zapisać:

$$H_{przed} = H_{polimer} + H_{rozpuszczalnik} = \frac{n_p N Z}{2} \varepsilon_{PP} + \frac{(n - n_p N) Z}{2} \varepsilon_{SS} \quad (2)$$

Więc:

$$\frac{H_{przed}}{n} = \frac{Z}{2} [\varphi \varepsilon_{PP} + (1 - \varphi) \varepsilon_{SS}] \quad (3)$$

Po zmieszaniu segmenty polimeru (P) mogą być w kontakcie z cząsteczkami rozpuszczalnika (S) a prawdopodobieństwo kontaktu P-P i S-S ulega zmianie (Tabela 1.1).

kontakt	energia	prawdopodobieństwo przed mieszaniem	prawdopodobieństwo po mieszaniu
P-P	ε_{PP}	φ	φ^2
S-S	ε_{SS}	$1 - \varphi$	$(1 - \varphi)^2$
P-S	ε_{PS}	0	$2\varphi(1 - \varphi)$

Tabela 1. 1 Prawdopodobieństwo oraz energia kontaktu segmentów polimeru (P) i cząsteczek rozpuszczalnika (S).

Zatem entalpia takiej mieszaniny może być wyrażona:

$$\frac{H_{po}}{n} = \frac{Z}{2} [\varphi^2 \varepsilon_{PP} + (1 - \varphi)^2 \varepsilon_{SS} + 2\varphi(1 - \varphi) \varepsilon_{PS}] \quad (4)$$

Entalpię mieszania, zdefiniowaną jako różnicę obu entalpi można wyrazić:

$$\frac{\Delta H_m}{n} = \frac{\Delta H_{po} - \Delta H_{przed}}{n} = \dots = \frac{Z}{2} [2\varepsilon_{PS} - (\varepsilon_{PP} + \varepsilon_{SS})] \varphi(1 - \varphi) \quad (5)$$

Czyli:

$$\frac{\Delta H_m}{nk_B T} = \frac{z}{2k_B T} [2\varepsilon_{PS} - (\varepsilon_{PP} + \varepsilon_{SS})] \varphi(1 - \varphi) = \chi \varphi(1 - \varphi) \quad (6)$$

Współczynnik χ to parametr oddziaływania Florryego- Hugginsa zdefiniowany następująco:

$$\chi = \frac{z}{2k_B T} [2\varepsilon_{PS} - (\varepsilon_{PP} + \varepsilon_{SS})] \quad (7)$$

Entalpia swobodna Gibbsa mieszania (na jeden węzeł) może być wyrażona jako różnica ΔH_m i $\Delta S_m T$, gdzie ΔH_m i ΔS_m to entalpia i entropia mieszania:

$$S_m = -k_B n_P \ln \varphi - k_B n_S \ln(1 - \varphi) \quad (8)$$

$$\frac{G_m}{nk_B T} = \frac{\varphi}{N} \ln \varphi + [1 - \varphi] \ln(1 - \varphi) + \chi \varphi(1 - \varphi). \quad (9)$$

1.2.2.2. Mieszaniny polimer- polimer.

Podobne obliczenia wykonane dla dwóch polimerów A i B zbudowanych z N_A i N_B monomerów o frakcji objętościowej φ_A i φ_B ($\varphi_A + \varphi_B = 1$) dają entalpię swobodną mieszania na jeden węzeł w postaci:

$$\frac{G_m}{nk_B T} = \frac{\varphi_A}{N_A} \ln \varphi_A + \frac{\varphi_B}{N_B} \ln \varphi_B + \chi \varphi_A \varphi_B \quad (10)$$

W sytuacji, gdy $\varphi := \varphi_A$ wzór (10) można zapisać:

$$\frac{G_m}{nk_B T} = \frac{\varphi}{N_A} \ln \varphi + \frac{1-\varphi}{N_B} \ln(1 - \varphi) + \chi \varphi(1 - \varphi) \quad (11)$$

Równanie entalpii swobodnej mieszania $G_m(\varphi)$ jest pierwszym punktem analizy zachowania się faz. Obliczenia na nim oparte dla różnych temperatur, a zatem różnych wartości parametru $\chi(T)$, umożliwią uzyskanie krzywej współlistnienia faz (binoda, równanie (12)), spinody (równanie (13)) oraz wyznaczenie punktu krytycznego (równanie (14)).

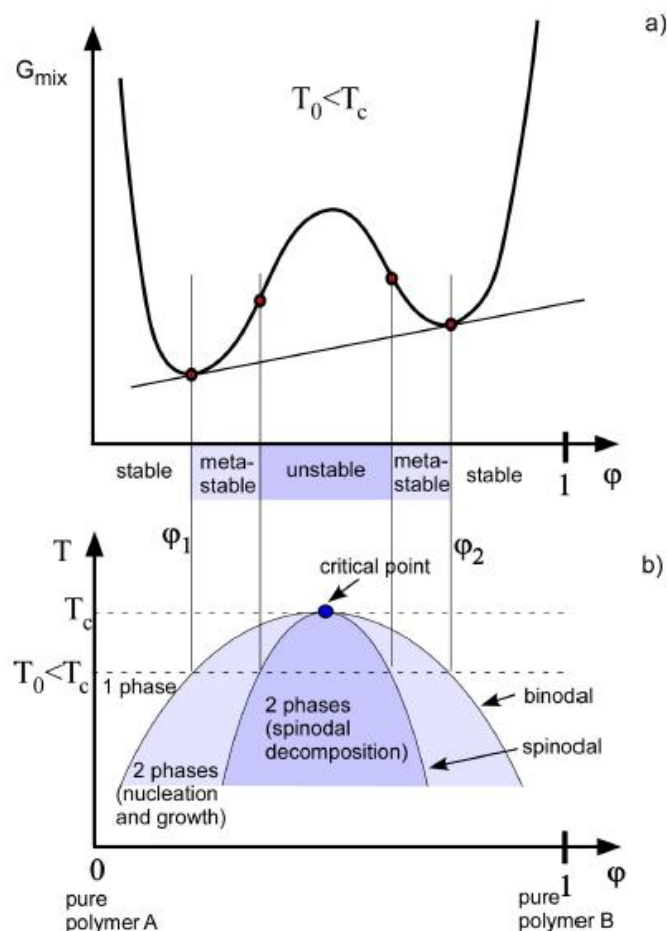
$$\frac{G_m \varphi_2 - G_m \varphi_1}{\varphi_2 - \varphi_1} = \frac{\partial G_m}{\partial \varphi} \Big|_{\varphi_1} = \frac{\partial G_m}{\partial \varphi} \Big|_{\varphi_2} \quad (12)$$

$$\frac{\partial^2 G_m}{\partial \varphi^2} = 0 \quad (13)$$

$$\frac{\partial^3 G_m}{\partial \varphi^3} = 0 \quad (14)$$

W danej temperaturze T_0 punkty styku definiują koncentracje (frakcje objętościowe) współlistniejących faz φ_1 i φ_2 . Jednorodna mieszanina polimer- polimer jest stabilna w obszarze nie obejmowanym przez binodę, metastabilna między binodą a spinodą (separacja fazowa przez nukleację i wzrost) oraz niestabilna w rejonie spinody (spontaniczna separacja fazowa w procesie dekompozycji spinodalnej).

W obszarze niestabilnym nawet niewielkie fluktuacje koncentracji spowodują obniżenie wartości entalpii swobodnej mieszania G_m . Nie ma tu żadnej termodynamicznej bariery ograniczającej ciągłą i spontaniczną separację fazową 'dekompozycję spinodalną'. W obszarze metastabilnym mieszanina jest stabilna względem niewielkich zmian kompozycji, ale duże zmiany koncentracji powodują redukcję wartości G_m . Takie fluktuacje prowadzą do tworzenia się ziaren. Wzrost ziaren zachodzi na skutek dyfuzji molekuł z obszarów o dużej do obszarów o niskiej koncentracji ('nukleacja i wzrost').



Rysunek 1. 10 Diagram fazowy mieszaniny polimer- polimer oraz odpowiadająca mu entalpia swobodna mieszania G_m wyznaczona dla zadanej temperatury T_0 .

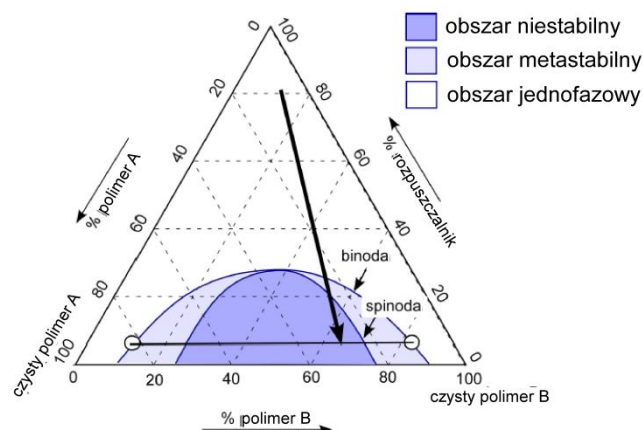
Typowy diagram fazowy przedstawiony na rysunku 1.10 odpowiada sytuacji tzw. górnej krytycznej temperatury rozpuszczania UCST, gdy separacja faz zachodzi z obniżeniem temperatury (poniżej UCST). Istnieją układy polimerów o dolnej krytycznej temperaturze rozpuszczania LCST, gdzie separacja faz jest inicjowana wzrostem temperatury (powyżej LCST).

1.2.2.3. Polimer A- Polimer B- rozpuszczalnik

Energia swobodna mieszania układu dwóch polimerów (A, B) i rozpuszczalnika (S) może być wyrażona zależnością:

$$\frac{G_m}{nk_B T} = \frac{\varphi_A}{N_A} \ln \varphi_A + \frac{\varphi_B}{N_B} \ln \varphi_B + \frac{\varphi_S}{1} \ln \varphi_S + \chi_{AB} \varphi_A \varphi_B + \chi_{AS} \varphi_A \varphi_S + \chi_{BS} \varphi_B \varphi_S \quad (15)$$

Oba polimery są rozpuszczalne w tym rozpuszczalniku, a więc $\chi_{AS} \ll \chi_{AB}$ oraz $\chi_{BS} \ll \chi_{AB}$ czyli termodynamika tego trójskładnikowego układu zależy głównie od parametru oddziaływania χ_{AB} . Ponieważ $\varphi_A + \varphi_B + \varphi_S = 1$ to tylko dwa parametry są niezależne, to w konsekwencji diagram fazowy można przedstawić na wykresie dwuwymiarowym zwanym trójkątem Gibbsa² (rysunek 1.11).



Rysunek 1. 11 Trójkąt koncentracji Gibbs'a pokazuje diagram fazowy układu polimer A- polimer B- rozpuszczalnik w temperaturze T_0 .

1.2.3. Technika spin- castingu

Technika spin- castingu to jednoetapowy proces wytwarzania cienkich warstw polimerowych. Kropla roztworu umieszczana jest na podłożu, które zostaje wprowadzone w ruch obrotowy i wiruje z prędkością w przez czas od kilku do kilkudziesięciu sekund.

Proces spin- castingu można podzielić na kilka etapów (rysunek 1.12), w pierwszym następuje zrzucenie większej części roztworu, a jego resztki zostają rozprowadzone na powierzchni substratu tworząc cienką jednorodną warstwę.³ W tym etapie główną rolę odgrywa działanie siły Coriolisa, bezwładność płynu i napięcie powierzchniowe.

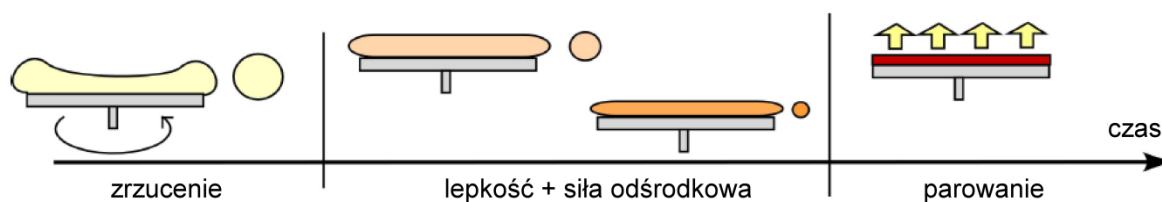
W kolejnym etapie następuje ścienianie warstwy polimerowej.³⁻⁶ Lepkość równoważy działanie siły odśrodkowej, która dąży do usunięcia roztworu z podłoża. Później ścienianie warstwy jest zdominowane przez odparowanie rozpuszczalnika. Na tym etapie, jeśli roztwór zawiera mieszaninę polimerów, odparowywanie rozpuszczalnika inicjuje proces separacji fazowej. Właściwości materiałowe zmieniają się w sposób ciągły ponieważ mocno zależą od stężenia rozpuszczalnika. Szybkie odparowywanie może spowodować zmianę temperatury jeśli ciepło parowania jest wysokie.

W przypadku mieszanin polimerów w późnym etapie spin- castingu, zachodzą także inne procesy. Jednym z nich jest samo- rozwarstwienie zwane także indukowaną przez powierzchnię dekompozycją spinodalną.⁷

Inne mechanizmy tworzenia się struktur wiążą się z kapilarnymi niestabilnościami^{8,9} granicy międzyfazowej polimer/ polimer, dwuwymiarowym wzrostem struktur poprzecznych^{8,10-12} oraz niestabilnościami konwekcyjnymi powierzchni swobodnej.^{13,14} Opisywany scenariusz tworzenia się struktur powstał w oparciu o eksperymenty przeprowadzone z użyciem różnych rozpuszczalników, polimerów, substratów (rysunek 1.13).^{8,15-17} Należy także nadmienić, że nie zawsze zachodzą wszystkie te procesy.

Gdy molekuly polimerów nie są już mobilne, proces separacji fazowej uznaje się za zakończony.¹⁸ Zaczyna się końcowy etap, kiedy głównie następuje usuwanie rozpuszczalnika przez parowanie. Jeśli uzyskano kwasi- dwuwymiarową strukturę domenową, to może ona tworzyć wzór topograficzny na powierzchni swobodnej ponieważ tempa zestalania się polimerów są różne co wynika z różnych wartości parametrów rozpuszczania⁸ lub temperatury zeszklenia.^{14,19} Zatem,

domeny bogate w jeden polimer mogą być wyższe od fazy bogatej w drugi polimer dla końcowych struktur cienkowarstwowych.



Rysunek 1. 12 Etapy spin- castingu.

Opis spin- castingu jest trudny ze względu na liczne mechanizmy wpływające na tworzenie się warstwy polimerowej. Ponadto parametry termodynamiczne takie jak koncentracja roztworu czy temperatura (spowodowane odparowywaniem rozpuszczalnika) szybko się zmieniają. Pomimo tego zaproponowano wiele modeli opisujących spin- casting.³ Większość z nich postuluje opisaną wyżej kolejność zdarzeń oraz podaje że grubość warstwy polimerowej h jest proporcjonalna do dwóch parametrów: prędkości kątowej ω i stężenia roztworu c_p :

$$h \sim c_p^n \omega^m, \quad (16)$$

gdzie wartości n , m zależą od modelu.

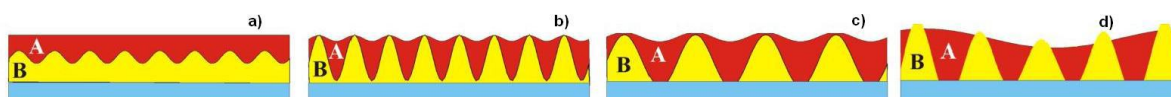
Najczęściej stosowany jest opis Lawrence'a³, który zakłada że grubość warstwy polimerowej h zależy:

$$h \sim \frac{c_p}{\omega^{0.5}}. \quad (17)$$

Eksperymenty pokazały, że ta zależność jest prawdziwa także dla polimerowych mieszanin wieloskładnikowych.⁴

1.2.4. Samo- organizacja w osadzanych cienkich warstwach mieszanin polimerów

Tworzenie struktur w osadzanych z roztworów cienkich warstwach mieszanin polimerów można traktować jako samo- organizację, czyli kolektywne spontaniczne porządkowanie się molekuł w uporządkowane nadstruktury. Samo- organizacja ta to głównie separacja fazowa (samo- stratyfikacja) i ewolucja rozseparowanych faz (niestabilności kapilarna i konwekcyjna, wzrost 2- wymiarowy).



Rysunek 1. 13 Mechanizmy kierujące formowaniem się struktur w czasie spin- castingu. (a) Samo- rozwarstwianie, (b) niestabilności kapilarne, (c) kwasi- dwuwymiarowy wzrost struktur poprzecznych, (d) niestabilności konwekcyjne powierzchni swobodnej.

Samo- rozwarstwianie. Obliczenia teoretyczne pokazują, że preferencyjna adsorpcja polimerowych składników mieszaniny do jednej z zewnętrznych powierzchni może powodować powstawanie prostopadłej do powierzchni tłumionej fali koncentracji.²⁰ Obserwowano również, że w przypadku gdy jeden ze składników preferował obie powierzchnie zewnętrzne powstawały dwie fale.

Mechanizm samo- rozwarstwiania zaobserwowano zarówno dla hartowania rozpuszczalnikowego²¹ jak i temperaturowego.²² Ten efekt jest odpowiedzialny za powstawanie struktur wielowarstwowych bogatych w fazy różnych polimerów.

Niestabilności kapilarne. Niestabilności kapilarne obserwuje się po wytworzeniu dwu- warstwy. Odparowywanie rozpuszczalnika powoduje zmianę koncentracji w warstwach, co może wpłynąć na ich destabilizację. Fluktuacje termiczne mogą wytworzyć fale powierzchniowe (fale kapilarne).

Mechanizm ten może być tłumiony przez ciśnienie Laplacea $\gamma/2R$ (γ - napięcie powierzchniowe, R - lokalny promień krzywizny powierzchniowej), ale może być wzmocniony przez dodatkowe ciśnienie powierzchniowe wynikające z działania sił van der Waalsa (warstwy cieńsze niż 10 nm) lub przez efekty Marangoniego. W wyniku wywieranych różnych ciśnień tylko niektóre fale fluktuacji (o określonej długości) mogą zostać wzmocnione. Następuje zniszczenie warstwowej struktury i tworzy się lateralna, dwuwymiarowa struktura domenowa.²³⁻²⁵

Niestabilności konwekcyjne. Szybkie odparowywanie rozpuszczalnika może spowodować oziębienie powierzchni swobodnej warstwy lub obniżenie koncentracji rozpuszczalnika przy powierzchni. Oba efekty mogą wpłynąć na pojawienie się niestabilności konwekcyjnych Marangoniego.^{13, 23, 26}

Konwekcja Marangoniego opisuje przepływ cieczy wywołowany gradientem napięcia powierzchniowego, które wynikają z różnicy temperatury lub koncentracji (rozpuszczalnika). Przepływ materiału z (bardziej ogrzanych lub o większej zawartości rozpuszczalnika) obszarów powierzchniowych o niższym napięciu powierzchniowym γ w kierunku obszarów o wyższej wartości γ musi być skompensowany wertykalnym przepływem cieczy (bardziej ogrzanej i o wyższym stężeniu rozpuszczalnika) z głębszych rejonów warstwy. To powoduje powstanie komórek konwekcyjnych.

Struktury hierarchiczne. Jeśli kilka niezależnych mechanizmów jest zaangażowanych w formowanie struktur i każdy z nich ma dominującą charakterystyczną skalę struktury można otrzymać struktury hierarchiczne, co pokazano dla wieloskładnikowych mieszanin polimerów PS/ PMMA/ PVP⁵ czy PMMA/ PS i PMMA/ PVP,²³ P3BT/ PS²⁷.

Podłoża o zadanym wzorze chemicznym. Eksperymenty pokazały, że możliwe jest odtworzenie wzoru chemicznego podłoża przez cienką warstwę polimerową, strukturyzowaną na skutek separacji fazowej polimerów wynikającej z hartowania temperaturowego lub rozpuszczalnikowego.^{4,29} Jakość wzorów powierzchniowych zależy od takich czynników jak: napięcie międzyfazowe, napięcie powierzchniowe, grubość warstwy, skład mieszaniny, asymetria wzoru czy stosunek charakterystycznej skali domenowej $2R$ do periodyczności wzoru λ .^{28,30,31}

Wyniki pokazują, że morfologia odtwarza najwierniej wzór podłoża gdy jego rozmiar λ jest porównywalny z $2R$, lub kiedy $2R \sim \lambda/n$.⁴

W tej pracy szablony do pozycjonowania białek przygotowano przez wylanie roztworów hydrofobowego PS i hydrofilowego PEO na podłoża z dwoma typami obszarów o różnych właściwościach fizykochemicznych.

1.2.5. Literatura

- (1) Teraoka, I. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. John Wiley and Sons, Nowy Jork, **2002**.
- (2) Albert, R. A.; Silbey, R. J. *Physical Chemistry*. John Wiley and Sons, New York, **1992**.
- (3) Lawrence, C. J. *Phys. Fluids* **1988**, *31*, 2786-2795.
- (4) Cyganik, P.; Budkowski, A.; Steiner, U.; Rysz, J.; Bernasik, A.; Walheim, S.; Postawa, Z.; Raczkowska, J. *Europhys. Lett.* **2003**, *62*, 855-861.
- (5) Cyganik, P.; Budkowski, A.; Raczkowska, J.; Postawa, Z. *Surf. Sci.* **2002**, 507-510, 700-706.
- (6) Ton- That, C.; Shard, A. G.; Bradley, R. H. *Langmuir* **2000**, *16*, 2281-2284.

- (7) Jones, R. A.; Richards, R. W. *Polymers at surfaces and interfaces*. Cambridge University Press, Cambridge, **1999**.
- (8) Walheim, S.; Böltau, M.; Mlynek, J.; Krausch, G.; Steiner, U. *Macromolecules* **1997**, 30, 4995-5003.
- (9) Ton-That, C.; Shard, A. G.; Bradley, R. H. *Polymer* **2002**, 43, 4973-4977.
- (10) Raczowska, J.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Lekki, J.; Lekka, M.; Bernasik, A.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* **2003**, 36, 2419-2427.
- (11) Dalnoki-Veress, K.; Forrest, J. A.; Stevens, J. R.; Dutcher, J. R. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* **1996**, 34, 3017-3024.
- (12) Dalnoki-Veress, K.; Forrest, J. A.; Stevens, J. R.; Dutcher, J. R. *Physica A*. **1997**, 87, 87-94.
- (13) Mitov, Z.; Kumacheva, E. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 81, 3427-3430.
- (14) Budkowski, A.; Bernasik, A.; Cyganik, P.; Raczowska, J.; Penc, B.; Bergues, B.; Kowalski, K.; Rysz, J.; Janik, J. *Macromolecules* **2003**, 36, 4060-4067.
- (15) Affrosman, S.; O'Neill, S. A.; Stamm, M. *Macromolecules* **1998**, 31, 6280-6288.
- (16) Gutmann, J. S.; Müller-Buschbaum, P.; Stamm, M. *Faraday Discuss.* **1999**, 112, 285-297.
- (17) Tanaka, K.; Takahara, A.; Kajiyama, T. *Macromolecules* **1996**, 29, 3232-3239.
- (18) Jukes, P. C.; Heriot, S. Y.; Sharp, J. S.; Jones, R. A. L. *Macromolecules* **2005**, 38, 2030-2032.
- (19) Raczowska, J.; Bernasik, A.; Budkowski, A.; Sajewicz, K.; Penc, B.; Lekki, J.; Lekka, M.; Rysz, J.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* **2004**, 37, 7308-7315.
- (20) Ball, R. C.; Essery, R. L. H. *J. Phys. Condens. Mat.* **1990**, 2(51), 10303-10320.
- (21) Geoghegan, M.; Jones, R. A. L. *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 2719-2724.
- (22) Bernasik, A.; Włodarczyk-Miśkiewicz, J.; Łużny, W.; Kowalski, K.; Raczowska, J.; Rysz, J.; Budkowski, A. *Synthetic Met.* **2004**, 144, 253-257.
- (23) Sprenger, M.; Walheim, S.; Budkowski, A.; Steiner, U. *Interface Sci.* **2003**, 11(2), 225-235.
- (24) Raczowska, J. *Self-organization, Structure Formation and Pattern Replication in Nanometer Polymer Blend Films*. Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, **2003**.
- (25) Walheim, S. *Micrometer and Sub-Micrometer Structure Formation of Phase Separating Polymer Films*. Praca doktorska, Konstanz University, **2000**.
- (26) de Gennes, P. *Eur. Phys. J. E* **2001**, 6, 421-424.
- (27) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Raptis, I.; Raczowska, J.; Goustouridis, D.; Rysz, J.; Sanopoulou, M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 105, 67-79.
- (28) Kielhorn, L.; Muthukumar, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, 111, 2259-2269.
- (29) Böltau, M.; Walheim, S.; Mlynek, J.; Krausch, G.; Steiner, U. *Nature* **1998**, 391, 877-879.
- (30) Budkowski, A.; Bernasik, A.; Cyganik, P.; Rysz, J.; Brenn, R. *e-Polymers* **2002**, 006, 1-21.
- (31) Shou, Z.; Chakrabarti, A. *Polymer* **2001**, 42, 6141-6152.

Rozdział 2

Część eksperymentalna

2.1. Przygotowanie próbek

2.1.1. Techniki miękkiej litografii cienkich warstw polimerowych

W miękkiej litografii stosuje się pieczętki elastomerowe, zazwyczaj wykonane z polidimetylosiloksanu PDMS, do przenoszenia wzoru na powierzchnię. Główną zaletą tych metod jest możliwość wytworzenia periodycznych wzorów na dużych obszarach w łatwy, szybki i tani sposób. Ponadto techniki te nie wymagają szczególnej czystości.^{1, 2}

Pieczętki PDMS wykonuje się przez wylanie prepolimeru na matrycę, który poddaje się procesowi wygrzewania w ustalonej temperaturze. Po oderwaniu pieczętki od matrycy jest ona gotowa do użycia. W tej pracy zastosowano zarówno płaskie pieczętki PDMS jak i o strukturze podłużnych pasków o periodyczności 4 i 8 μm .

W części doświadczalnej przedstawiono wyniki, które otrzymano stosując różne techniki miękkiej litografii, w tym technikę druku mikro-kontaktowego (μCP)², odwróconego druku mikro-kontaktowego (i- μCP)³⁻⁵, litografię sił kapilarnych (CFL)^{5, 6} i technikę mikro-formowania warstw wspomaganą rozpuszczalnikiem (SAMIM).^{1, 7}

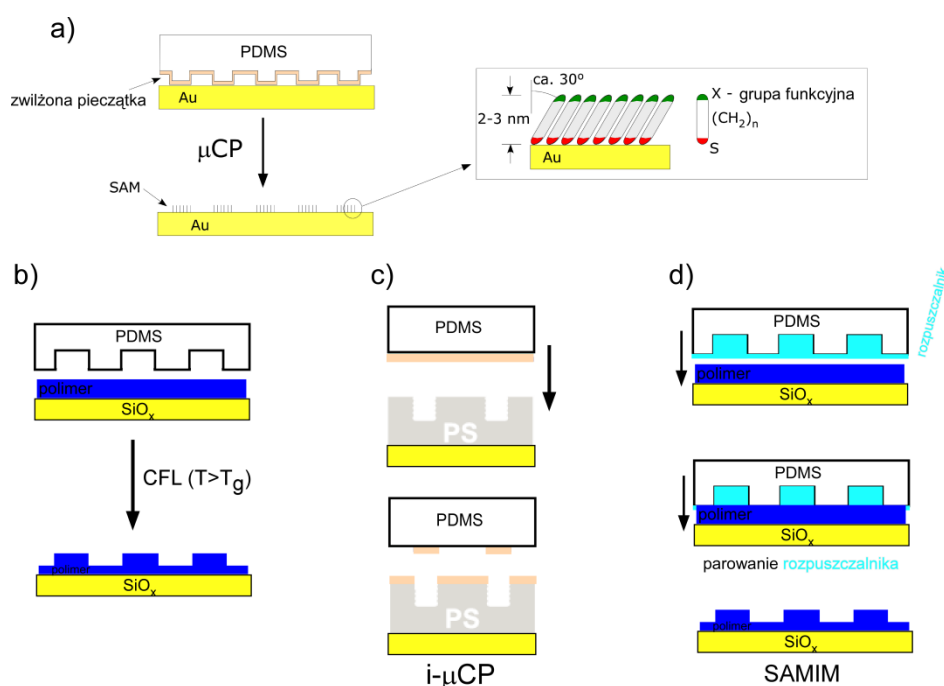
2.1.1.1. Technika druku mikro- kontaktowego μ CP

Pieczętki PDMS o periodyczności 4 i 8 μm posmarowano roztworem heksadekanotiolu rozpuszczonego w etanolu i przyłożono do powierzchni Au. Jako wynik tej czynności powierzchnie Au zostały nadrukowane obszarami samo- porządkujących się monowarstw (SAM) tioli. Po kilku sekundach pieczętki usunięto, a podłoża spłukano etanolem w celu usunięcia niezwiązanych molekuł SAM. Zmodyfikowanych chemicznie podłoży (rysunek 2.1 a) użyto do wytworzenia hierarchicznych wzorów domen polimerowych (rozdział 3.3.3).

2.1.1.2. Litografia sił kapilarnych

W tej technice pieczętkę PDMS przykładą się do powierzchni warstwy polimerowej. Próbkę z przylegającą do powierzchni pieczętką umieszczana jest w piecu i wygrzewana w temperaturze wyższej od temperatury zeszklenia polimeru przez czas do kilku godzin. W tych warunkach siły kapilarne powodują dopasowywanie się masy polimerowej do kształtu pieczętki. Po ostudzeniu w temperaturze pokojowej i usunięciu pieczętki powinno się otrzymać polimerowy wzór powierzchniowy komplementarny do wzoru pieczętki PDMS. Jednak może się zdarzyć, że siły kapilarne będą za słabe aby całkowicie wypełnić przestrzeń wzorów pieczętki (rysunek 2.1 b).

W tej pracy metody tej użyto do wytworzenia trójwymiarowych jednorodnych chemicznie wzorów powierzchniowych PS- NH_2 (rozdział 3.3.1).



Rysunek 2. 1 Schematyczne przedstawienie wytwarzania wzorów powierzchniowych technikami miękkiej litografii: (a) druku mikro- kontaktowego, (b) litografii sił kapilarnych, (c) odwróconego druku mikro- kontaktowego, (d) techniki mikro- formowania warstw wspomaganej rozpuszczalnikiem.

2.1.1.3. Technika odwróconego druku mikro- kontaktowego i- μ CP

Schemat ilustrujący metodę odwróconego druku mikro- kontaktowego (i- μ CP) jest pokazany na rysunku 2.1 c. Płaska pieczętka PDMS jest pokrywana roztworem zawierającym molekuły zdolne do tworzenia monowarstw SAM. Następnie pieczętka zostaje przyłożona i dociśnięta do

polimerowego wzoru powierzchniowego na czas od kilku do kilkunastu minut. Po usunięciu pieczętki otrzymujemy nie tylko zmodyfikowane chemicznie polimerowe wzory powierzchniowe, ale również otrzymujemy chemiczny wzór na płaskiej pieczętce PDMS.

W tej pracy technikę tę zastosowano do wytworzenia kontrastu chemicznego trójwymiarowych, regularnych struktur warstwy polistyrenu zakończonego grupą aminową (rozdział 3.3.1).

2.1.1.4. Mikro- formowanie warstw wspomagane rozpuszczalnikiem SAMIM

Inną techniką, dzięki której można uzyskać trójwymiarowe polimerowe wzory powierzchniowe jest mikro- formowanie warstw wspomagane rozpuszczalnikiem SAMIM. Pieczętka elastomerowa zostaje zwilżona dobrym rozpuszczalnikiem danego polimeru i zostaje umieszczona na powierzchni warstwy polimerowej. Rozpuszczalnik rozpuszcza lub wnika do cienkiej warstwy powodując jej pęcznienie. Rozmiękczone warstwa polimerowa dopasowuje się do topografii pieczętki. W czasie gdy pieczętka elastomerowa pozostaje w kontakcie z substratem rozpuszczony polimer zaczyna się zestalać, w wyniku parowania rozpuszczalnika (znikającego prawdopodobnie przez dyfuzję w pieczętce PDMS) i formuje się wzór polimerowy komplementarny do topografii pieczętki (rysunek 2.1 d).

SAMIM jest techniką łatwą w zastosowaniu. Kluczowym problemem jest właściwe zwilżenie pieczętki oraz właściwy kontakt pokrytej rozpuszczalnikiem pieczętki z warstwą polimerową. Efektywność tej metody, jakość wytworzonych struktur zależy od rozpuszczalnika, który powinien szybko rozpuszczać powierzchnię warstwy polimerowej jednakże nie powinien wnikać do pieczętki PDMS, powodując jej rozpuszczenie lub deformację wzoru.

Powierzchniowe wzory polimerowe wytworzone techniką SAMIM pokazano w rozdziale 3.3.2.

2.1.2. Sieciowanie warstw polimerów rozpuszczalnych w wodzie

W ostatnich latach na przykładzie podłoży PS/ PMMA pokazano że powierzchniowe wzory polimerowe mogą być stosowane do pozycjonowania białek.⁸⁻¹⁰ Szczególnie interesujące może być wykorzystanie wzorów powierzchniowych par polimer hydrofobowy/ polimer hydrofilowy, ponieważ takie układy mogą gwarantować selektywną adsorpcję białek (białka adsorbują do powierzchni hydrofobowych). Jednakże hydrofilowe własności polimeru w tym przypadku są zarówno jego zaletą jak i wadą, gdyż eksperymenty adsorpcji przeprowadza się w środowisku wodnym. Aby zapobiec rozpuszczeniu polimeru hydrofilowego konieczne było opracowanie metody sieciowania.

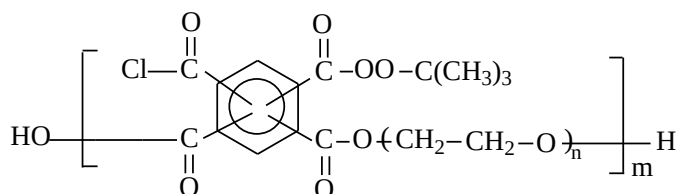
W przeprowadzonych badaniach wykorzystano mieszaniny polimerów zawierające hydrofilowy politlenek etylenu PEO, oraz termo- czuły poli(N- izopropylakrylamid) PNIPAM. Badania nad usieciowaniem wysokocząsteczkowego PEO prowadzone były przez Doytcheva i in.¹¹⁻¹⁴ Pokazano, że politlenek etylenu można usieciować przez oświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym próbki PEO domieszkowanej różnymi czynnikami sieciującymi: benzoiną, benzofenonem, acetofenonem czy triakrylanem pentaerytrytolu (PETA). Prawdopodobnie mechanizm sieciowania za pomocą PETA polega na polimeryzacji rodnikowej grup akrylowych w trójwymiarowej sieci, która wiąże molekuly wysokocząsteczkowego PEO. Na efektywność sieciowania

wpływ ma wiele czynników takich jak masa cząsteczkowa polimeru, ilość czynnika sieciującego, warunki naświetlania (temperatura, czas, odległość od próbki).¹¹⁻¹⁵

Sieciowanie PEO i PNIPAM przeprowadzono optymalizując metodę z referencji [13]. Do roztworów polimerów rozpuszczalnych w wodzie, i ich mieszanin, dodawano czynnika sieciującego PETA w ilości 20 % frakcji wagowej PEO (PNIPAM). Warstwy polimerowe ekspozowano na światło UV przez 2 h w temperaturze pokojowej.

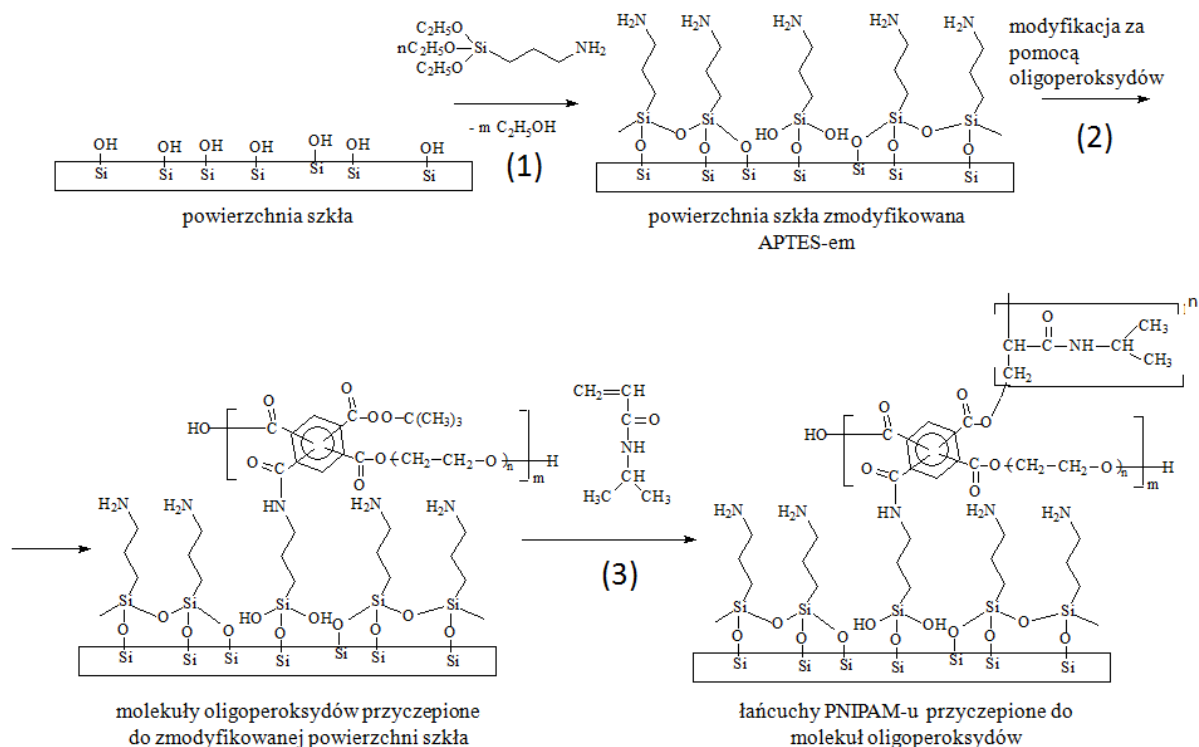
2.1.3. Funkcjonalizacja powierzchni przez polimerowe pokrycia „inteligentne”

Pierwszym krokiem modyfikacji powierzchni szkła jest utworzenie warstwy SAM zbudowanej z APTES-u (γ -aminopropylotrietoksylanu) przez zanurzenie ich w 0,2 % roztworze APTES w metanolu na czas 24 h. Molekuły APTES wiążą się kowalencyjnie do powierzchni szkła. Te które się nie związały są usuwane z powierzchni w trakcie przepłukiwania w aparacie Soxhleta. W kolejnym etapie procesu funkcjonalizacji podłoża przez 2 h są zanurzone w sporządzonym w dioksanie 1 % roztworze oligoperoksydu, który został zsyntetyzowany z tetrachloro-anhydrytu kwasu piromelitowego, glikolu polietylenowego PEG-9 i tert-butylo hydroperoksydu. Za pomocą grup aminowych molekuł APTES przywiązano do powierzchni szkła molekuły oligoperoksydu.



Rysunek 2. 2 Oligoperoksyd syntezowany z tetrachloro- anhydrytu kwasu piromelitowego, glikolu polietylenowego PEG-9 i tert-butylo hydroperoksydu. $n = 9$; $m = 3 \div 5$

Wolne oligoestry zmywano dioksanem w aparacie Soxhleta w ciągu 4 h. Tak przygotowane podłoża umieszczono w ampułkach z roztworami monomerów, które zostały uzupełnione argonem. Po zamknięciu ampułek wygrzewano je w temperaturze 90 °C w ciągu ustalonego czasu (2- 48 h). Zmodyfikowane podłoża po wydobyciu ich z ampułek, przemywano w aparacie Soxhleta przez czas 4 godzin. Poszczególne etapy przygotowania pokryć PNIPAM wykonanych przez grupę docenta Jurija Stetsyshyna z Politechniki Lwowskiej przedstawiono na rysunku 2.3.



Rysunek 2. 3 Przygotowanie pokryw opartych na PNIPAM: funkcjonalizacja powierzchni szkła za pomocą warstw samoorganizujących się APTES (1), modyfikacja otrzymanej w ten sposób powierzchni molekułami oligoperoxydów (2) i polimeryzacja łańcuchów PNIPAM z częstok oligoperoxydów (3).

2.1.4. Adsorpcja białek do powierzchni polimerów

Materiały polimerowe są powszechnie stosowane w inżynierii materiałowej, biomedycynie czy biotechnologii. W zależności od przeznaczenia powierzchnie polimerowe muszą być zaprojektowane w sposób sprzyjający lub blokujący adsorpcję bio- molekuł. Prowadzone dotychczas badania adsorpcji białek takich jak: fibrynogen czy albumina pokazują, że głównym czynnikiem wpływającym na adsorpcję białka jest hydrofobowość podłoża. Pokazano też, że ważną rolę mogą odgrywać oddziaływania elektrostatyczne. Podstawowym problemem związanym z immobilizacją białek na podłożach jest zachowanie struktury konformacyjnej białka, ponieważ tylko proteiny o nienaruszonej budowie zachowują zdolność specyficznego wiązania swoich ligandów.^{16, 17}

Należy także pamiętać, że białka to molekuły amfipatyczne, łatwo reagujące z podłożem, a podstawowym problemem nie jest adsorpcja sama w sobie a jej kontrola, ponieważ może ona być zakłócana chociażby przez oddziaływania między samymi białkami. Amfipatyczny charakter białek wywiera duży wpływ na ich adsorpcję na granicy faz o różnych własnościach powierzchni (hydrofobowość).

W tej pracy do badań wytypowano dwie znakowane fluorescencyjnie lektyny, czyli białka wiążące specyficznie reszty cukrowe. Ta identyfikacja zachodzi w wysoce specyficzny sposób i jest porównywalna z oddziaływaniami antygen- przeciwciało. Dlatego też lektyny są wykorzystywane do identyfikowania węglowodanów znajdujących się w błonach komórkowych oraz do badania tych oddziaływań. Wybrano konkanawalinę A z *Canavalia ensiformis* (Con A) oraz lektynę soczewicy z *Lens*

culinaris (LcH). Mimo, że białka te mają bardzo podobną budowę wykazują różnicę stopnia powinowactwa wiązania pochodnych sacharydów: glukopiranozy i mannopiranozy.¹⁸ W roztworze, Con A (poniżej pH 5,8) i LcH (dla różnych pH) występują w formie dimerów zbudowanych z podjednostek o wadze $M_w = 20\,000 - 30\,000$, a na jeden mer przypada jedno centrum wiążące węglowodany. Aby lektyny związały specyficznie węglowodany konieczna jest obecność jonów Mn^{2+} i Ca^{2+} . Z badań krystalograficznych kompleksów lektyny- mannopiranozy wynika, że miejsca specyficznego wiązania glikoprotein są zlokalizowane w bliskiej odległości od miejsc wiążących jony wapnia i manganu. Powyżej pH 6,9 Con A występuje w formie tetrameru, a każdy z merów jest zbudowany z łańcucha polipeptydowego zawierającego 237 miejsc aminokwasowych, podczas gdy mery lektyny soczewicy zbudowane są z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych o masach 6 000 (łańcuch α) i 18 000 (łańcuch β). LcH posiada mniej miejsc wiążących węglowodany, dlatego też wykazuje mniejszą specyficzność niż Con A.

W tej pracy pokazano wyniki eksperymentów adsorpcji lektyn do jednorodnych podłoży polimerowych w warunkach fizjologicznych oraz w środowisku o różnym pH i temperatury. Wytypowano do tych eksperymentów LcH, ponieważ w przeciwieństwie do innych lektyn¹⁹ dla LcH nie zaobserwowano wcześniej żadnych znaczących zmian w strukturze czwartorzędowej (dimer)¹⁹ ani też w drugorzędowej (stworzonej głównie przez β -harmonijki)^{20, 21} w zastosowanym przedziale temperatur i pH. Zaobserwowano jedynie niewielki stopień zmiany struktury trzeciorzędowej na bardziej zwartą w środowisku o pH 7,5 w porównaniu do pH 5 czy 10.^{20, 22} Wcześniejsze badania pokazują niewielki wzrost adsorpcji białka w punkcie izoelektrycznym¹⁷ ($pI_{LcH} = 8$ ²³), ale dowiedziono również niewielki wpływ oddziaływań elektrostatycznych na adsorpcję LcH.²³

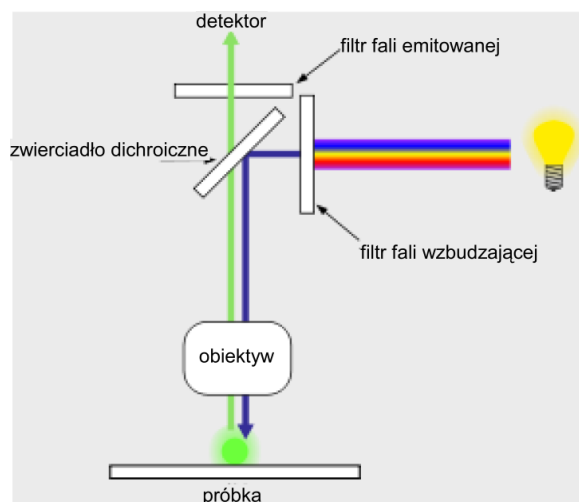
2.2. Techniki badawcze

2.2.1 Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna

Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna są powszechnie stosowane w badaniach biologicznych i medycznych. Mikroskop fluorescencyjny to mikroskop optyczny zaopatrzony w dodatkowe filtry umożliwiające obserwację światła fluorescencyjnego emitowanego przez badaną próbkę. Obserwowana próbka jest oświetlana promieniowaniem o określonej długości fali λ , które jest przez nią absorbowane, a wzbudzone molekuly preparatu stają się źródłem promieniowania o niższej energii. To promieniowanie pada na filtr fali emitowanej, który jest transparentny tylko dla światła fluorescencyjnego. Mikroskop wyposażony jest w źródło światła (najczęściej lampy rtęciowe), zestaw filtrów (selekcjonujących długość fali absorbowanej i światło emitowane) oraz zwierciadło półprzeźroczyste (rysunek 2.4).

W tej pracy techniki mikroskopii fluorescencyjnej użyto do identyfikacji znakowanych fluorescencyjnie zaadsorbowanych do powierzchni polimerowych białek. Były to lektyny konkanawalina A znakowana izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) absorbującym światło niebieskie ($\lambda_{abs} = 490\text{ nm}$) i emitującym światło zielone ($\lambda_{em} = 525\text{ nm}$), oraz lektyna soczewicy LcH znakowane izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC) absorbującym światło zielone ($\lambda_{abs} = 557\text{ nm}$), a emitującym światło czerwone ($\lambda_{em} = 576\text{ nm}$). Obserwację próbek przeprowadzono mikroskopem optycznym Olympus BX51 zaopatrzonym w lampę halogenkową o mocy 100 W, filtry U-MNB2

($\lambda_{\text{exit}} = 470\text{--}490\text{ nm}$, $\lambda_{\text{emit}} > 510\text{ nm}$) oraz U-MNG2 ($\lambda_{\text{exit}} = 530\text{--}550\text{ nm}$, $\lambda_{\text{emit}} > 590\text{ nm}$) i kamerę cyfrową typu DP72.



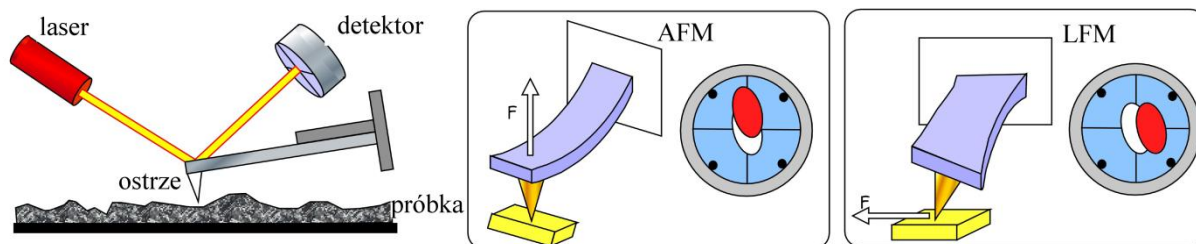
Rysunek 2. 4 Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego.

2.2.2 Mikroskopia sił atomowych AFM

Techniki mikroskopii skanującego próbnika, w tym mikroskopia sił atomowych AFM, są powszechnie używane do badania własności powierzchni różnego typu materiałów (stopy metali, polimery, materiały biologiczne).

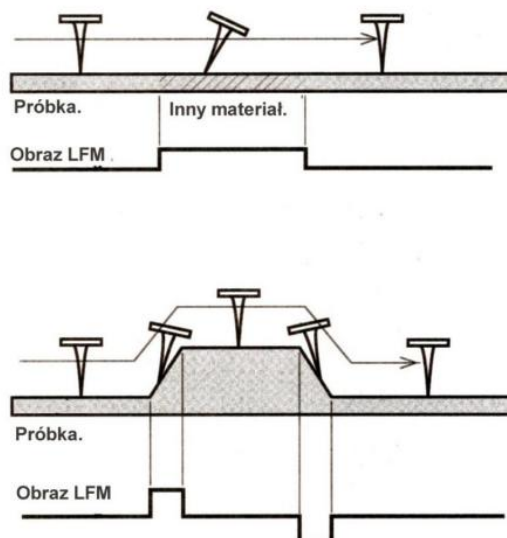
Pomiar AFM opiera się na oddziaływaniu ostrego próbnika z badaną powierzchnią. Rzeczywiste oddziaływanie jest dość skomplikowane, ale przyjmuje się, że w zależności od odległości próbnika od podłoża, działają siły przyciągające (daleko) lub odpychające (blisko) ostrze AFM. Siły oddziaływania próbnik- atomy powierzchni są opisane potencjałem Lenarda- Jonesa.

Podstawowe elementy aparatu AFM to laser, fotodetektor i skaner piezoelektryczny poruszający próbką lub ostrzem. Skupiona wiązka laserowa kierowana jest na koniec dźwigni AFM, która odbijając się pada na detektor. Siły działające na próbnik w trakcie pomiaru powodują skręcanie i uginanie się dźwigni, a więc zmienia się położenie odbitej wiązki światła w układzie współrzędnych podzielonego na cztery części detektora. Taka budowa detektora umożliwia jednoczesną rejestrację sił działających prostopadle i poprzecznie, więc możliwe jest uzyskanie nie tylko obrazu topograficznego powierzchni ale również mapy struktur domenowych.²⁴



Rysunek 2. 5 Schemat ilustrujący ideę pomiarów AFM i LFM. Działanie sił w kierunku normalnej do powierzchni (AFM) oraz sił lateralnych (LFM) oraz ich wpływ na położenie wiązki odbitej w detektorze. Według [24].

Metody pomiarów mikroskopem sił atomowych można podzielić na dwie grupy: kwasi-
statyczne kontaktowe i oscylacyjne bezkontaktowe. W trybie kontaktowym działają głównie siły
odpychające między próbką a ostrzem AFM: w kierunku prostopadłym do powierzchni (różnice
wysokości, AFM) oraz siły równoległe do powierzchni (różne własności materiału lub występowanie
krawędzi, LFM) (rysunek 2.6). W bezkontaktowym trybie pracy mierzone są amplituda i faza oscylacji
ostrza, spowodowane przez zmiany wysokości lub własności powierzchni. Istnieje jeszcze trzeci
sposób pracy mikroskopu AFM, przerywanego kontaktu, gdzie oscylująca igła uderza w powierzchnię
próbki.



Rysunek 2. 1 Boczne wychylenia dźwigni AFM spowodowane tarcie (u góry) lub zmianami w nachyleniu powierzchni (na dole).

W tej pracy pomiary wykonano używając mikroskopów AFM (Nanonics Imaging Ltd., Izrael oraz Agilent 5500, USA) pracujących w trybach kontaktowym i bezkontaktowym. Zarejestrowano obrazy topograficzne, obrazy LFM oraz obrazy kontrastu fazowego.

2.2.3 Pomiary kąta zwilżania wody

2.2.3.1 Równanie Younga

Na podstawie pomiarów kąta zwilżania θ można wyznaczyć wartość napięcia powierzchniowego ciała stałego.^{25,26} W 1850 roku Young zaproponował związek, który dla materiałów można zapisać jako:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (18)$$

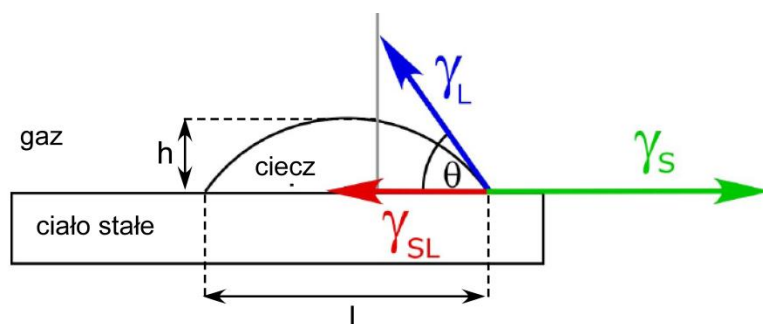
gdzie γ to napięcie powierzchniowe, a indeksy: S, L odpowiadają ciału stałemu i cieczy. Równanie to opisuje warunki konieczne, aby kropla pozostała w równowadze mechanicznej, kiedy działają te trzy rodzaje napięcia powierzchniowego.

Relacja (18) zawiera tylko dwie wielkości mierzalne, są to kąt zwilżenia θ oraz napięcie powierzchniowe cieczy γ_L . Dlatego też relacja Younga nie jest wystarczająca do wyznaczenia γ_S . Ale w połączeniu z równaniem, które wiąże γ_{SL} z γ_S i γ_L , tworzy układ równań umożliwiający wyznaczenie

wartości napięcia powierzchniowego warstwy polimerowej. Po połączeniu tych dwóch zależności Li i Neuman otrzymali następujący wzór:

$$\cos\theta = -1 + 2\left(\frac{\gamma_S}{\gamma_L}\right)^{0,5} e^{-\beta[\gamma_L - \gamma_S]^2} \quad (19)$$

Używając znanej wartości parametru β , można wyznaczyć energię powierzchniową podłoża. Wartości energii powierzchniowej γ są użyte w tej pracy dla porównania powierzchni różnych polimerów. Z kolei do charakteryzacji zmian własności badanych podłoży pod wpływem bodźców środowiska użyto zależności wyznaczonych dla kąta zwilżania θ .



Rysunek 2. 7 Rozkład napięć powierzchniowych wpływających na kształt kropli .

Pomiary kąta zwilżania. Statyczne pomiary kąta zwilżania wykonano techniką kropli leżącej używając aparatu EasyDrop (DSA 15) firmy Krüss wyposażonego w komorę temperaturową na bazie modułów Peltiera. Kropla cieczy, o dobrze określonej wartości napięcia powierzchniowego (woda), jest umieszczana za pomocą kapilary na badanym podłożu polimerowym. Następnie po zarejestrowaniu zdjęcia, analizowany jest kształt kropli (wysokość h , średnica kontaktu z podłożem l). Kąt przylegania można określić na podstawie wzoru ²⁷:

$$\theta = 2\arctan\left(2\frac{h}{l}\right) \quad (20)$$

Ciecz zastosowana w pomiarach nie może rozpuszczać badanej warstwy. W dalszej części pokazano wyniki pomiarów kąta zwilżenia wody wykonane dla pokryć PNIPAM oraz dla usieciowanych warstw dostępnego komercyjnie poli(N- izopropylakrylamidu).

2.2.4 Spektrometria masowa jonów wtórnych TOF- SIMS

Techniki mikroskopowe dają informację w postaci obrazów różnych domen na powierzchni (LFM, mikroskopia fluorescencyjna) oraz obrazów topografii powierzchni (AFM). Nie dają żadnych informacji o tym co znajduje się w próbce. Jedną z technik umożliwiającą zbadanie składu chemicznego jest spektrometria masowa jonów wtórnych SIMS. Technikę tę z powodzeniem stosuje się do badania materiałów, jednak od niedawna zaczęto ją stosować do badań próbek biologicznych.

Główna idea tej metody polega na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego jonów wtórnych, powstałych w wyniku bombardowania powierzchni próbki zjonizowaną wiązką pierwotną. W zależności od warunków rozpylania, tj. od ilości jonów pierwotnych na jednostkę powierzchni, rozróżniamy SIMS dynamiczny (d- SIMS, znaczne zniszczenie próbki) oraz SIMS statyczny (s- SIMS, analiza warstwy powierzchniowej).

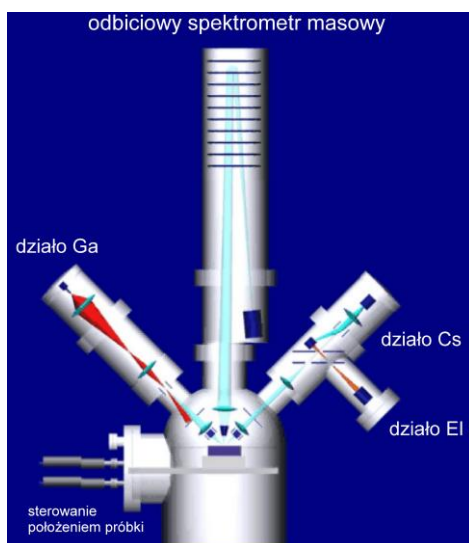
d- SIMS może pracować w różnych modach przez co uzyskuje się różne typy informacji. Można rejestrować zmianę intensywności kilku charakterystycznych dla danego układu polimerów oraz

substratu jonów wtórnych w funkcji czasu rozpylania, czyli odległości od powierzchni próbki. Zebrane wyniki można przedstawić jako profile głębokościowe zmian koncentracji polimerów. SIMS umożliwia również wykonanie powierzchniowych i przestrzennych, odpowiednio 2-dim i 3-dim map rozkładu różnych polimerów, na podstawie intensywności charakterystycznych jonów wtórnych zarejestrowanych w funkcji położenia (x, y, z).

W przypadku materiałów polimerowych, aby zapewnić warunki s-SIMS, dawka wiązki pierwotnej, czyli całkowita liczba jonów pierwotnych na jednostkę powierzchni wynosi $F_{stat} < 10^{11}$ jonów/cm².

Ważnymi parametrami charakteryzującymi spektrometr masowy jonów wtórnych są masowa zdolność rozdzielcza Δm , która determinuje możliwość identyfikacji jonów o porównywalnych masach oraz zdolność rozdzielcza względem głębokości Δz , a także powierzchniowa zdolność rozdzielcza Δx .

W tej pracy pokazano widma masowe, profile głębokościowe oraz mapy 2D czystych warstw polimerowych, a także warstw pokrytych białkami, wykonane na podstawie danych zarejestrowanych w czasie pomiarów statystycznych i dynamicznych SIMS w większości aparatem TOF.SIMS 5 (ION-TOF GmbH) wyposażonym w ciekło- metaliczne jonowe działo bizmutowe o energii 30 keV oraz działo C₆₀⁺ o energii 20 keV (wiązki analizujące) oraz wiązki rozpylające: tlenową O⁺, cezową Cs⁺ (od energii 250 eV do 2 keV). Aparat TOF.SIMS 5 wyposażony jest dodatkowo w działo elektronowe kompensujące ładowanie się analizowanej powierzchni. Aparat TOF.SIMS5 cechuje wysoka zdolność rozdzielcza $\Delta x < 60$ nm, $\Delta z < 5$ nm.



Rysunek 2. 8 Model aparatu TOF.SIMS 5.

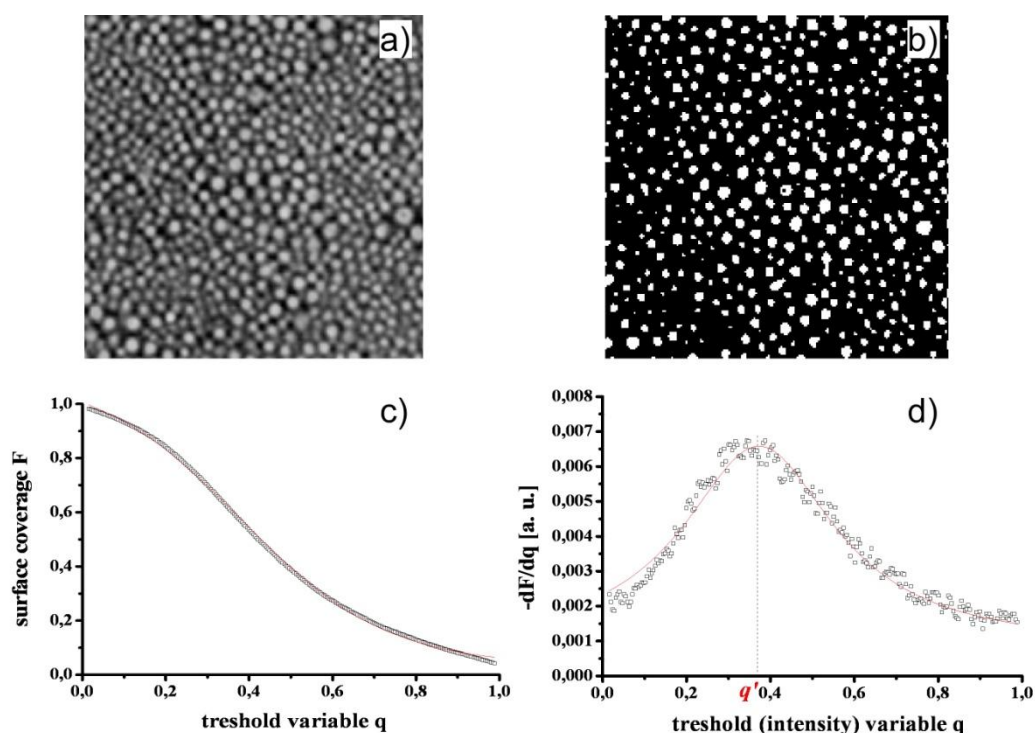
2.3 Analiza morfologii powierzchniowych wzorów domen polimerów i białek

2.3.1 Metoda geometrii całkowitej

Duża ilość informacji zawarta w obrazach topograficznych AFM bądź fluorescencyjnych musi być ograniczona do skończonej liczby istotnych parametrów, aby porównać ilościowo różne morfologie.²⁸ Standardowym narzędziem używanym do analizy obrazów jest transformata Fouriera,

która pozwala określić średnią odległość między centrami sąsiadujących domen R , ale nie daje informacji o morfologii wzorów powierzchniowych tj. ich pokryciu, kształcie i ciągłości. Metoda geometrii całkowitej pozwala na określenie wszystkich tych parametrów dla obrazu przetworzonego (przez odcięcie na skali wysokości lub natężenia fluorescencji dla charakterystycznej wartości q') w reprezentatywny obraz binarny (czarno- biały). Komplet miar morfologicznych (tzw. miar Minkowskiego) jest określony przez: frakcję pokrycia F powierzchni przez obszary białe, długość granic U między domenami białymi i czarnymi i parametr Eulera χ_E tj. różnicę liczby spójnych obszarów białych i czarnych. Miary Minkowskiego służą do wyznaczenia pochodnych parametrów, takich jak np. średnie pole powierzchni domeny $S = F / \chi_E$, średni promień krzywizny $r_c = U / 2\pi \chi_E$, średni rozmiar domeny $r_e = (S / \pi)^{1/2}$, współczynnik wydłużenia $c = r_d / r_e$, średnia odległość między domenami $\Lambda = 1 / \chi_E^{1/2}$.

Miary Minkowskiego (znormalizowane przez rozmiar analizowanego obszaru) określają typ morfologii wzorów powierzchniowych, a ich wartości ułatwiają ich porównywanie. Z kolei maksima na histogramach wysokości (dla obrazów AFM) czy natężenia światła (dla obrazów fluorescencyjnych), utworzonych przez wykresy pochodnej frakcji pokrycia $-dF/dq$ (czy długości granic U), pozwalają na określenie reprezentatywnej wartości q' parametru odcięcia q . Umożliwia to (dla znormalizowanych danych) porównanie adsorpcji białka ze znacznikiem fluorescencyjnym do różnych powierzchni polimerowych.

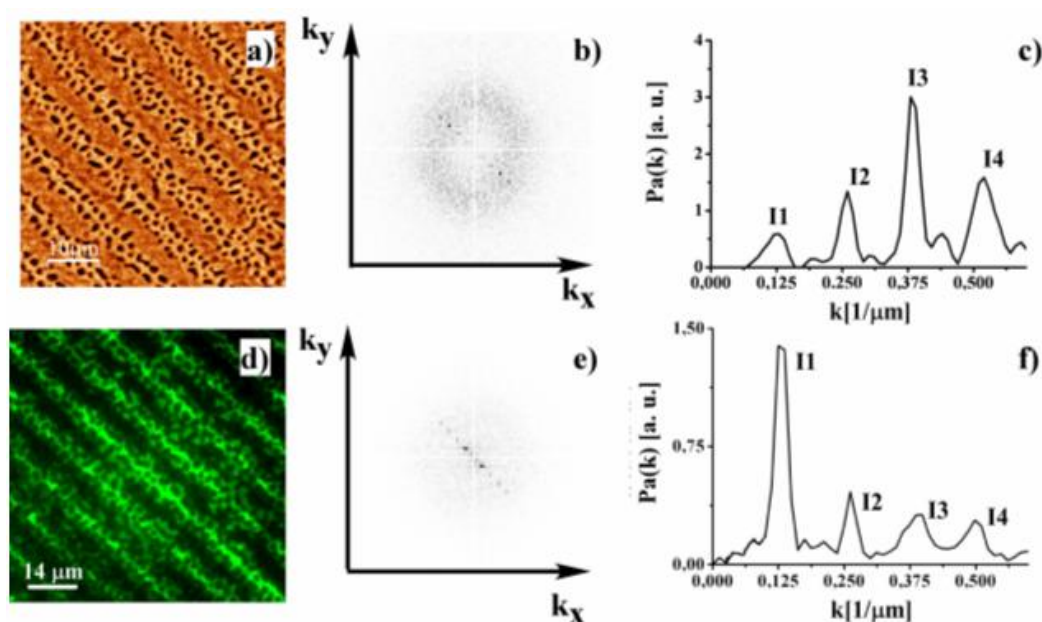


Rysunek 2. 9 Oryginalny obraz fluorescencyjny (w skali szarości) powierzchni pokrytej niejednorodną warstwą białek (a) i jego reprezentatywny obraz binarny wygenerowany dla poziomu odcięcia q' (b). (c) Frakcja pokrycia powierzchni $F(q)$ i (d) jej pochodna $-dF/dq$ w funkcji poziomu odcięcia q przedstawione dla (a).

2.3.2 Analiza Fouriera

Analiza cech morfologicznych badanych obrazów oparta jest na ich 2-wymiarowych transformatach Fouriera. Dla izotropowych wzorów powierzchniowych taka transformata daje rozmyty pierścień o promieniu $|\mathbf{k}|$ w jego maksimum, wyznaczony z uśrednionego radialnie spektrum potęgowe $P_i(k)$ (tj. zależności kwadratów amplitud fourierowskich od $|\mathbf{k}|$). Promień $|\mathbf{k}|$ określa charakterystyczną skalę struktury domenowej, jaką jest średnia odległość między centrami sąsiadujących domen $2R$ ($2R=1/|\mathbf{k}|$).

Transformata fourierowska morfologii o charakterze anizotropowym wykazuje dodatkową (oprócz rozmytego pierścienia) składową w kształcie linii silnych maksimum dyfrakcyjnych położonych w pozycjach $\mathbf{k} = n'\mathbf{k}_\lambda$, gdzie n' – jest liczbą całkowitą, natomiast kierunek i długość wektora $|\mathbf{k}_\lambda| = 1/\lambda$ są określone przez orientację i period anizotropowego wzoru powierzchni. Spektrum potęgowe $P(k)$ uśrednione dla wąskiego pasa wzdłuż linii $\mathbf{k} = n'\mathbf{k}_\lambda$, staje się po odjęciu składowej izotropowej $P_i(k)$ (uśrednionej radialnie dla płaszczyzny $\mathbf{k}$ bez pasa $\mathbf{k} = n'\mathbf{k}_\lambda$) spektrum potęgowym anizotropowej składowej $P_a(k)$ wzoru powierzchni. To spektrum $P_a(k)$ – określające daleko-zasięgowy charakter uporządkowania wzoru powierzchni – składa się z szeregu maksimum dla wektora falowego $n|\mathbf{k}_\lambda|$ ($\mathbf{k}_\lambda = 1/\lambda$, $n = 1, 2, 3$) scharakteryzowanych przez absolutne $J_n = J(n|\mathbf{k}_\lambda|)$ oraz znormalizowane wartości natężeń $I_n = J_n / \sum_m J_m$. Te intensywności określają wkład różnych modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazach powierzchni.



Rysunek 2. 10 Obraz topograficzny AFM (a) i obraz fluorescencyjny (d) oraz odpowiadające im transformaty Fouriera (odpowiednio b, e) oraz uzyskane z nich spektra potęgowe $P_a(k)$ anizotropowej składowej morfologii (odpowiednio c, f). I_n odpowiada znormalizowanym natężeniom maksimum dla wartości wektora falowego $n\mathbf{k}_\lambda$ i odzwierciedla wkład modów strukturalnych o częstości λ/n ($n = 1, 2, 3, 4$) do topografii wzoru polimerowego (c) i morfologii wzoru białkowego (f).

2.4. Literatura

- (1) Xia, Y.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 550-575.
- (2) Kumar, A.; Whitesides, G. M. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, 63, 2002-2004.
- (3) Dusseiller, M. R.; Schaefer, D.; Koch, M.; Kroschewski, R.; Textor, M. *Biomaterials* **2005**, 26, 5917-5925.
- (4) Chalmeau, J. Thibault, C.; Carcenac, F.; Vieu, C. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 133901-133903.

- (5) Zemła, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J.; Lekka, M. *Colloid. Surf. B* **2012**, 90, 144-151.
- (6) Kuipers, L.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N.; *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 1555-1565.
- (7) Zemła, J. Lekka, M.; Raczkowska, J.; Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2101-2109.
- (8) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Robar, N.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 16763-16773.
- (9) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2150-2158.
- (10) Leung, B. O.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *Langmuir* **2010**, 26, 14759-14765.
- (11) Doytcheva, M.; Dotcheva, D.; Stamenova, R.; Orahovats, A.; Tsvetanow, C.; Leder, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, 64, 2299-2307.
- (12) Doytcheva, M.; Stamenova, R.; Zvetkov, V.; Tsvetanow, C. *Polymer* **1998**, 26, 6715-6721.
- (13) Doytcheva, M.; Dotcheva, D.; Stamenova, R.; Tsvetanow, C. *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, 286, 30-33.
- (14) Doytcheva, M.; Petrova, E.; Stamenova, R.; Tsvetanow, C.; Riess, G. *Macromol. Mater. Eng.* **2004**, 289, 676-680.
- (15) Leung, B. O.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *Langmuir* **2009**, 10, 1835-1845.
- (16) Vogler, E. A. *Biomaterials* **2012**, 33, 1201-1237.
- (17) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, 162, 87-106.
- (18) Schwarz, P.; Puri, K. D.; Bhat, R. G.; Surolia A. *J. Biolog. Chem.* **1993**, 11, 7668-7677.
- (19) Marcos, M. J.; Cheihn, R.; Arrondo, J. L.; Zhadan, G. G.; Villar, E.; Shnyrov, V. L. *FEBS Lett.* **1999**, 443, 192-196.
- (20) Chehin, R.; Iloro, I.; Marcos; M. J.; Villar, E.; Shnyrov, V. L.; Arrondo, J. L. *Biochemistry* **1999**, 38, 1525-1530.
- (21) Ueta, R. R.; Diniz, F. B. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2008**, 61, 244-249.
- (22) Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L. *Biochem. Biophys. Acta* **1998**, 1383, 9-36.
- (23) Zemła, J.; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J. *Langmuir* **2008**, 24, 10253-10258.
- (24) Mironov, V. L. *Fundamentals of the scanning probe microscopy. The textbook for students of the senior courses of higher educational institutions.* The Russian Academy of Sciences Institute of Physics of Microstructures, Nizhniy Novgorod, **2004**.
- (25) Zenkiewicz, M. *Adhezja i modyfikowanie warstwy wierzchniej tworzyw wielkocząsteczkowych.* WNT, Warszawa, **2000**.
- (26) Kwok, D.; Neumann, A. W. *Adv. in Colloid and Interface Sci.* **1999**, 81, 167-249.
- (27) Mathieu, H.J.; Chevolot, Y.; Ruiz-Taylor, L.; Léonard, D. *Adv. Polym. Sci.* **2003**, 162, 1-34.
- (28) Raczkowska, J.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Lekki, J.; Lekka, M.; Bernasik, A.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* **2003**, 36, 2419-2427.

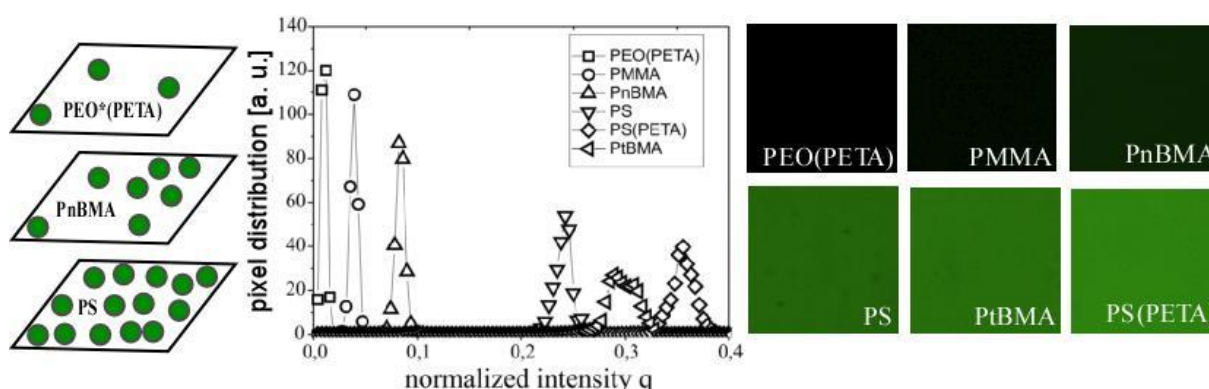
Rozdział 3

Wyniki

Rozdział 3.1

Adsorpcja białka do powierzchni polimerowych

3.1.1. Określenie relatywnej ilości białka zaadsorbowanego do powierzchni różnych polimerów poprzez analizę obrazów fluorescencyjnych za pomocą metody geometrii całkowej



3.1.1.1. Abstrakt

Większość metod rozwiniętych do badania białka osadzonego na różnych powierzchniach może tylko oznaczyć średnie powierzchniowe pokrycie białkiem lub dostarcza wyłącznie jakościowej informacji o jego rozkładzie powierzchniowym, czyli morfologii. Obie te cechy, tj. ilość białka i ilościowe parametry morfologii można rygorystycznie określić za pomocą analizy obrazów fluorescencyjnych przy pomocy metody geometrii całkowej. Metodę tą wprowadzono w pracy aby porównać relatywną ilość białek zaadsorbowanych do różnych powierzchni polimerowych: polistyrenu (PS), poli(metakrylanu metylu) (PMMA), poli(metakrylanu n-butyłu) (PnBMA), poli(metakrylanu tert-butyłu) (PtBMA), oraz zarówno PS (PETA) jak i usieciowanego poli(tlenku etylenu) (PEO*(PETA)) z domieszką triakrylanu pentaerytrytolu (PETA). Podłoża polimerowe były inkubowane przez 15 minut w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH= 7,4) zawierającym 125 µg/ mL znakowanych fluorescencyjnie lektyn: lektyny soczewicy (LcH z *Lens*

culinaris) albo konkanawaliny A (Con A z *Canavalia ensiformis*). Serie obrazów fluorescencyjnych zostały zarejestrowane w identycznych warunkach (ten sam bufor fizjologiczny, stały czas ekspozycji, powiększenie i wzmocnienie). Dla każdego obrazu, zarejestrowanego kilkakrotnie dla każdego polimeru, wyznaczono rozkład i średnią wartość znormalizowanego natężenia fluorescencji. Wyniki pokazują, że adsorpcja LcH do powierzchni PS (PETA), PtBMA, PS, PnBMA, PMMA i PEO*(PETA) może być wyrażona jako stosunek następujących wartości (średnia $\pm$ przedział ufności na poziomie 95%): $0,356 \pm 0,022$; $0,298 \pm 0,030$; $0,241 \pm 0,014$; $0,083 \pm 0,008$; $0,039 \pm 0,008$ i $0,010 \pm 0,006$. Natomiast względną adsorpcję Con A można opisać wartościami $0,252 \pm 0,016$; $0,217 \pm 0,014$; $0,222 \pm 0,016$; $0,046 \pm 0,006$; $0,116 \pm 0,008$; $0,006 \pm 0,002$. Niewielkie rozrzuty natężenia fluorescencji od wartości średnich wskazują na jednorodną dystrybucję zaadsorbowanych białek. Zaproponowane podejście pozwala w szybki i łatwy sposób nie tylko określić relatywną ilość zaadsorbowanych białek, ale także scharakteryzować ilościowo powierzchniową organizację ich dystrybucji, co zostało pokazane dla domen białka zaadsorbowanego do dwufazowej powierzchni mieszaniny polimerów.

3.1.1.2. Wprowadzenie

Materiały polimerowe mają wiele zastosowań biomedycznych, wykonuje się z nich implanty medyczne, biosensory służące do diagnostyki, systemy kontrolowanego dozowania leków i szablony do inżynierii tkankowej.¹⁻¹⁰ W zależności od obszaru stosowania, specyficzna adsorpcja protein do biomateriałów jest zjawiskiem pożądanym (biosensory, dostarczanie leków) lub niepożądanym (implanty), dlatego też wiedza o sposobach kontrolowania adsorpcji białek jest kluczowa. Poza specyficznymi oddziaływaniami, większość białek wykazuje tendencję do fizycznej adsorpcji do podłoży polimerowych, redukując ich funkcjonalność. Badania nad adsorpcją białek są ważne dla projektowania biogodnych powierzchni, gdzie eliminacja lub zredukowanie adsorpcji protein wpływa na ulepszenie ich działania.^{1,6} Jednym z głównych problemów pojawiających się po umieszczeniu implantu w ludzkim ciele, jest niespecyficzna adsorpcja białek do wszczepionego materiału mogąca zainicjować kaskadę zdarzeń, które w ostatnim etapie doprowadzają do otorbienia lub nawet odrzucenia tego materiału przez organizm. Nie jest możliwe wytworzenie powierzchni całkowicie blokującej adsorpcję białek *in vivo*, ale przez kontrolowanie i ograniczenie adsorpcji białek możliwe jest wyprodukowanie urządzeń, które mogą oddziaływać z ludzkim ciałem i innymi systemami biologicznymi bez niekorzystnych efektów.

Jak dotąd zaproponowano wiele strategii, mających na celu stłumienie niespecyficznej adsorpcji białek, opierających się głównie na wykorzystaniu powierzchni z politlenku etylenu oraz im podobnych.^{6, 11-15} Z drugiej strony warstwy białek zaadsorbowanych niespecyficznie do powierzchni polimerowych mogą pośredniczyć w późniejszych oddziaływaniach między powierzchnią polimerową (np. implanty chirurgiczne) a komórkami.^{6, 16-19} Monitorowanie adsorpcji protein może umożliwić inicjowanie i kontrolę pożądaných odpowiedzi komórkowych. Różnorodność wymagań stawianych adsorpcji białek do biomateriałów wzmacnia potrzebę całościowych badań tego zjawiska.

Aby opisać wiązanie białek do powierzchni różnych materiałów, co wymaga badań interdyscyplinarnych, rozwinięto wiele technik badawczych.^{3, 17, 19-25} Średnia ilość zaadsorbowanego białka jest określana metodami nieobrazującymi takimi jak pomiary radioaktywności,^{17, 20} spektroskopowe pomiary osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR),²¹ lub metodą pośrednią za pomocą testu (immuno absorpcji enzymatycznej) ELISA albo przez porównanie mikro-fotografii białek pozycjonowanych na różnych typach powierzchni.^{3, 17, 19, 20, 22-24} Niezależnie od tych

metod przestrzenne ułożenie immobilizowanych białek jest badane za pomocą takich technik jak mikroskopia fluorescencyjna, elektronowa mikroskopia skaningowa, rentgenowska fotoemisyjna mikroskopia elektronowa.^{3, 17, 19, 20, 25} Ale morfologia powierzchniowych ułożeń białek nie jest opisana ilościowo. Informacja zarówno o stopniu pokrycia jak i przestrzennej organizacji białek na powierzchni może być jednocześnie opisana przez zastosowanie metody geometrii całkowitej,^{26- 32} którą ostatnio zaproponowano do opisu morfologii wzorów powierzchniowych mieszanek polimerów zobrażowanych mikroskopem sił atomowych i spektrometrem masowym jonów wtórnych.³³⁻³⁵

W tej pracy po raz pierwszy zastosowano metodę geometrii całkowitej^{26- 32} aby porównać względną ilość znakowanych fluorescencyjnie białek zaadsorbowanych do różnych powierzchni polimerów. Analizę przeprowadzono dla kilku serii zdjęć fluorescencyjnych pozycjonowanych białek. Otrzymane dystrybucje prawdopodobieństwa intensywności fluorescencji pozwalają ocenić przestrzenną jednorodność pokrycia powierzchni. Ponadto kompletny zestaw miar morfologicznych (Minkowskiego) jest stosowany do opisu przestrzennej organizacji białek ułożonych niejednorodnie na powierzchni.

To podejście jest prezentowane dla lektyn tj. białek rozpoznających różne typy struktur cukrowych.³⁶⁻³⁸ Oddziaływanie lektyn z glikoproteinami jest jednym z trzech głównych biologicznych mechanizmów rozpoznawania (dwa pozostałe to oddziaływania białko- białko i białko- kwas nukleinowy).

Do eksperymentu wybrano dwie znakowane fluorescencyjnie lektyny (LcH i Con A), dla których zbadano adsorpcję do sześciu różnych warstw polimerowych: polistyrenu (PS), poli(metakrylanu metylu) (PMMA), poli(n-metakrylanu butylu) (PnBMA), poli(metakrylanu tert-butylu) (PtBMA), i PS (PETA) oraz usieciowanego politlenku etylenu (PEO*(PETA)), dwa ostatnie z domieszką triakrylanu pentaerytrytolu (PETA). Serie obrazów fluorescencyjnych zarejestrowano dla próbek zanurzonych w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS; pH= 7,4). Następnie dla każdego obrazu wyznaczono rozkład i średnią wartość znormalizowanego natężenia fluorescencji, która jest proporcjonalna do ilości zaadsorbowanego do powierzchni warstwy polimerowej białka.

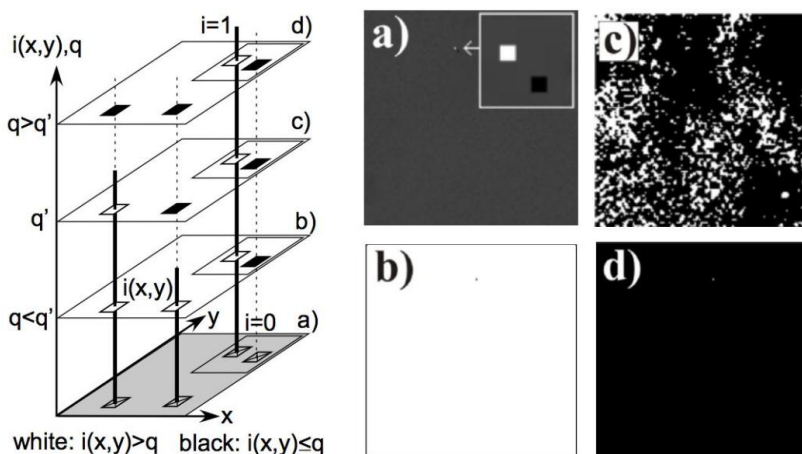
3.1.1.3. Opis eksperymentu

Przygotowanie podłoży polimerowych. Wszystkie użyte polimery zostały zakupione w firmie Aldrich. W eksperymencie użyto PS (średnia masa cząsteczkowa $M_w = 64\ 000$, polidispersyjność $M_w/M_n = 1,06$, temperatura zeszklenia $T_g = 100\ ^\circ\text{C}$), PMMA ($M_w = 31\ 000$, $M_w/M_n = 1,03$, $T_g = 105\ ^\circ\text{C}$), PnBMA ($M_w = 484\ 000$, $M_w/M_n = 1,07$, $T_g = 20\ ^\circ\text{C}$), PtBMA ($M_w = 554\ 000$, $M_w/M_n = 1,1$, $T_g = 122\ ^\circ\text{C}$) i PEO ($M_w = 42\ 700$, $M_w/M_n = 1,25$, $T_g = -63\ ^\circ\text{C}$). Wartości temperatury zeszklenia zaczerpnięto z pracy autorstwa Brandrup i in.³⁹ Wszystkie polimery, z wyjątkiem PEO, były rozpuszczone w toluenie (koncentracja polimeru $c_{\text{polimer}} = 15\ \text{mg/mL}$). Natomiast politlenek etylenu ($c_{\text{polimer}} = 15\ \text{mg/mL}$) oraz mieszanka PEO/ PS (stosunek wagowy 1:1, $c_{\text{polimer}} = 40\ \text{mg/mL}$) zostały rozpuszczone w chloroformie, do którego dodano czynnika sieciującego PETA (odpowiednio $c_{\text{PETA}} = 3$ i $4\ \text{mg/mL}$). Cienkie warstwy polimerów zostały wykonane metodą wylewania roztworu na wirujące wafle SiO_x przy użyciu spin-coatera KW-4A (Chemat Technology, prędkość obrotowa $\omega = 2\ \text{k rpm}$, czas $t = 30\ \text{s}$). Następnie podłoża były wygrzewane przez 25 minut w temperaturach $110\ ^\circ\text{C}$ (PS, PMMA i PtBMA) i $40\ ^\circ\text{C}$ (PnBMA) w celu usunięcia resztek rozpuszczalnika z cienkich warstw tych polimerów. W przypadku PEO i mieszanki PEO/ PS zamiast wygrzewania zastosowano sieciowanie za pomocą standardowej

procedury,⁴⁰⁻⁴² czyli ekspozycję warstw polimerowych na promieniowanie ultrafioletowe (światło wysokociśnieniowej lampy rtęciowej) przez 2 h. Dodatkowo, aby sprawdzić wpływ obecności czynnika sieciującego PETA w filmie polimerowym na adsorpcję białek, została wylana kontrolna próbka (z roztworu toluenu) zawierająca PS z domieszką PETA ($c_{\text{polimer}} = 15 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{PETA}} = 3 \text{ mg/mL}$).

Lektyny. Wybrane lektyny (konkanawalina A (ConA) z *Canavalia ensiformis* i lektyna soczewicy (LcH) z *Lens culinaris*) należą do grupy lektyn roślin motylkowatych, które wiążą się specyficznie z glikoproteinami zawierającymi reszty α -D- mannozy lub α -D-glukozy. Obydwa białka są zbudowane z identycznych podjednostek, gdzie znajdują się miejsca wiążące reszty cukrowe. Miejsca wiążące cukry zawierają silnie związane jony wapnia i magnezu, które utrzymują reszty aminokwasowe w pożądanych pozycjach, co jest kluczowe dla związania reszt cukrowych.

Con A występuje w formie dimeru (w pH 4,5- 5,6) oraz tetrameru (pH powyżej 7) i jest zbudowana z jednej polipeptydowej podjednostki (237 reszt aminokwasowych, $M_w = 26500$, wpis w PDB 1CVN). LcH jest dimerem zbudowanym z dwóch podjednostek, każda zawiera dwa związane nie kowalencyjnie łańcuchy polipeptydowe (łańcuch α , 52 reszty aminokwasowe, $M_r = 6000$; łańcuch β , 181 residua aminokwasowe, $M_w = 18000$, wpis w PDB 2LAL). Strukturalne podobieństwo tych dwóch lektyn stwierdzono na podstawie podstawowych analiz struktury oraz na podstawie badań krystalograficznych. Fałdowanie łańcuchów polipeptydowych w obszarach wiązania węglowodanów jest podobne, mimo różnic w sekwencji pierwotnej.⁴³ Jednak Con A i LcH wykazują różne powinowactwo do wiązania pochodnych sacharydów o konfiguracji mannopiranozy i glukopiranozy.⁴⁴ Do pomiarów wybrano parę lektyn Con A i LcH, których oddziaływanie specyficznie z ich ligandami oraz homologia centrów wiążących jest podobna, ale różni je ich powinowactwo do ligandów cukrowych.⁴⁵⁻⁴⁷



Rysunek 3. 1 Procedura przekształcania oryginalnego obrazu fluorescencyjnego (w skali szarości) (a), który jest macierzą pikseli (x, y) o ustalonym lokalnym poziomie szarości $i(x, y)$ w serię czarno-białych obrazów przez odcięcie na skali natężenia fluorescencji dla wartości q . Obraz (a) przetworzony dla różnych poziomów odcięcia (b) $q < q'$, (c) $q = q'$, (d) $q > q'$. Białe ($i(x, y) = 1$) i czarne ($i(x, y) = 0$) piksele dodane do obrazu (a) definiują skalę referencyjną.

Adsorpcja białek. Do przetestowania stopnia adsorpcji białek do różnych podłoży polimerowych użyto dwóch lektyn (Con A, LcH) znakowane izotiocyanianem fluoresceiny (FITC), który adsorbuje światło o długości fali $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$, a emituje światło fluorescencyjne o długości fali $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. Roztwory białek o stężeniu $c_{\text{LcH i ConA}} = 125 \text{ } \mu\text{g/mL}$ przygotowano z PBS (pH 7,4). Następnie kropla tego roztworu została umieszczona na każdym z podłoży. Czas inkubacji wyniósł $t = 15 \text{ min}$. Potem próbki

zostały ostrożnie przepłukane PBS w celu usunięcia niezwiązanych białek i umieszczone w buforze. Wszystkie zdjęcia fluorescencyjne zostały wykonane dla próbek zanurzonych w buforze PBS przy użyciu mikroskopu Olympus BX51 wyposażonego w 100 W lampę rtęciową (jednorodnie oświetlającą całą powierzchnię próbki), filtry U-MNG2 (λ_{ex} = 470- 490 nm, λ_{em} > 510 nm) oraz obiektyw (UPlanApo) o 40-krotnym powiększeniu. Zdjęcia wykonano 12 bitową kamerą cyfrową QICAM, która rejestruje obrazy o 1392× 1040 pikselach (1,4 miliona). Obrazy (N= 6, dla każdej próbki) zapisano za pomocą programu komputerowego QCapture przy stałych parametrach: czasu ekspozycji 4 s, wzmocnienia 1.

3.1.1.4. Metody.

3.1.1.4.1. Analiza obrazów fluorescencyjnych o jednorodnej dystrybucji białek.

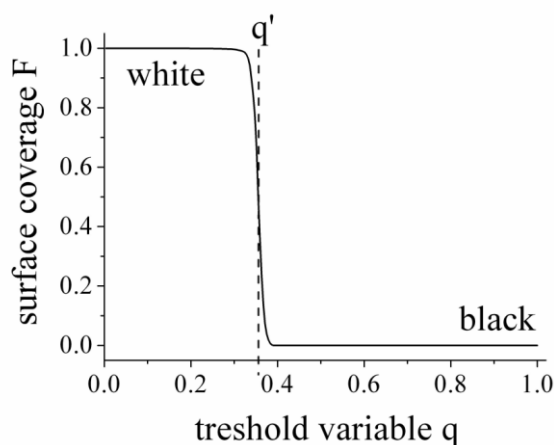
Metoda analizy geometrii całkowitej²⁶⁻³⁴ może być zastosowana do ilościowej analizy obrazów fluorescencyjnych wykazujących jednorodny rozkład znakowanych znacznikiem fluorescencyjnym protein. Aby przeprowadzić tę analizę potrzebny jest zestaw kilku obrazów fluorescencyjnych zarejestrowanych w tych samych warunkach. Zakłada się, że ilość zaadsorbowanych białek jest wprost proporcjonalna do intensywności fluorescencji. Zatem każde zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego jest macierzą pikseli o ustalonych, różnych lokalnych wartościach $i(x, y)$, proporcjonalnych do lokalnych wartości intensywności fluorescencji. Ta informacja jest lepiej zobrazowana dla obrazów w skali szarości, gdzie $i(x, y)$ reprezentuje lokalny poziom szarości (rysunek 3.1).

Każdy piksel obrazu może być zredukowany do białego lub czarnego piksela, w zależności czy jego wartość $i(x, y)$ jest wyższa lub niższa od poziomu odcięcia q . Dla danej wartości q obraz jest przetwarzany na obraz czarno-biały, którego cechy można w pełni opisać przez trzy miary morfologiczne (Minkowskiego) (patrz rozdział 3.1.1.4.2), odzwierciedlające pokrycie, kształt i ciągłość obszarów białych,²⁶⁻³² tj. obszarów o „zbyt wysokiej” intensywności $i(x, y) > q$. Taka procedura opisu jest powtarzana dla kolejnych wartości q i odpowiadającym im czarno-białym obrazom (rysunek 3.1b-d).

Aby określić średnią wartość (i dystrybucję) intensywności dla każdego obrazu fluorescencyjnego wystarczy wyznaczyć pierwszą miarę morfologiczną (znormalizowaną przez rozmiar obrazu) dla każdego obrazu czarno- białego, tj. stopień pokrycia powierzchni przez białe piksele $F(q)$. Dokładniej, taka analiza jest oparta na analizie zależności frakcji powierzchniowej białych rejonów $F(q)$ zmiennej q , odpowiadającej progowi odcięcia intensywności fluorescencji (patrz rysunek 3.1 i 3.2). Odpowiednie obliczenia zostały wykonane za pomocą programu komputerowego 2Danal,³² napisanego w oparciu o algorytm przedstawiony przez Michielsena i in.³⁰ mniej skomplikowany, ale równoważny temu opublikowanemu przez Mecke.²⁶

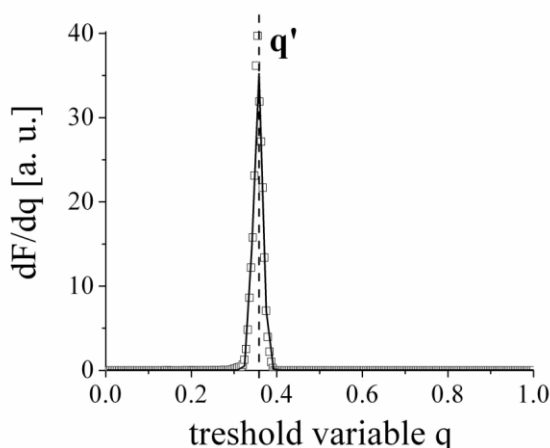
Powyższy ogólny opis metody musi być uzupełniony pewnymi szczegółami. Po pierwsze, aby skala wszystkich analizowanych obrazów była jednakowa dwa piksele o wartości $i(x, y)$ równej 0 i 1 zostały dodane do każdego obrazu. Te dwa referencyjne elementy zdjęć fluorescencyjnych odpowiadają czarnemu i białemu pikselowi na obrazach przedstawionych w skali szarości (rysunek 3.1 a). W przeciwieństwie do pozostałych elementów obrazu, te dwa piksele nie mogą zniknąć jednocześnie z obrazów binarnych. Jako że wartości $i(x, y)$ są proporcjonalne do (lokalnej) wartości

intensywności fluorescencji, powinno to zapewnić łatwość porównania stopnia wiązania białka wnioskowanego na podstawie różnych zdjęć fluorescencyjnych, ale zarejestrowanych przy tych samych parametrach. Po drugie, dla wszystkich obrazów z dodaną skalą odniesienia frakcja pokrycia $F(q)$ została obliczona jako funkcja poziomego odcięcia q , zmieniającego się od 0 do 1. W wyniku tego otrzymano wykresy podobne do tego przedstawionego na rysunku 3.2.



Rysunek 3. 2 Frakcja pokrycia powierzchni F przez piksele białe dla obrazów binarnych, wykreślona w funkcji poziomego odcięcia q .

W każdym przypadku, dla niskich wartości poziomego odcięcia q , $F(q) = 1$; następnie dla pewnej wartości q' frakcja pokrycia F szybko maleje od 1 do 0 i pozostaje stała ($F(q) = 0$) dla wyższych wartości q . Te trzy sytuacje odpowiednio odpowiadają czarno- białym obrazom: całkowicie białemu (z wyjątkiem referencyjnego piksela, rysunek 3.1 b), o najbardziej zróżnicowanej strukturze (rysunek 3.1 c) i całkowicie czarnemu (z wyjątkiem białego referencyjnego piksela, rysunek 3.1 d). Aby jednoznacznie wyznaczyć wartość poziomego odcięcia q' , odpowiadającego najszybszej zmianie $F(q)$, zależność $F(q)$ została zróżniczkowana (rysunek 3.3). Wartość q' , wyznaczona przez dopasowanie krzywej Gaussa, jest średnią wartością intensywności fluorescencji analizowanego obrazu.



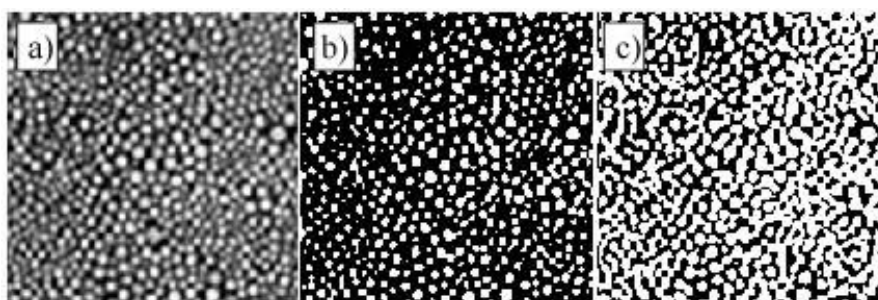
Rysunek 3. 3 Pochodna $-dF/dq$ w funkcji poziomego odcięcia q , pokazująca dystrybucję pomiędzy piksele znormalizowanego natężenia q . Linia ciągła to dopasowana do danych eksperymentalnych ($\square$) krzywa Gaussa, co umożliwia precyzyjne wyznaczenie średniej wartości natężenia fluorescencji q' .

Każdy wykres $-dF/dq$ reprezentuje również rozkład pomiędzy pikselami znormalizowanego natężenia, co odzwierciedla ilość pikseli (pola obszarów) o określonej ilości zaadsorbowanych białek

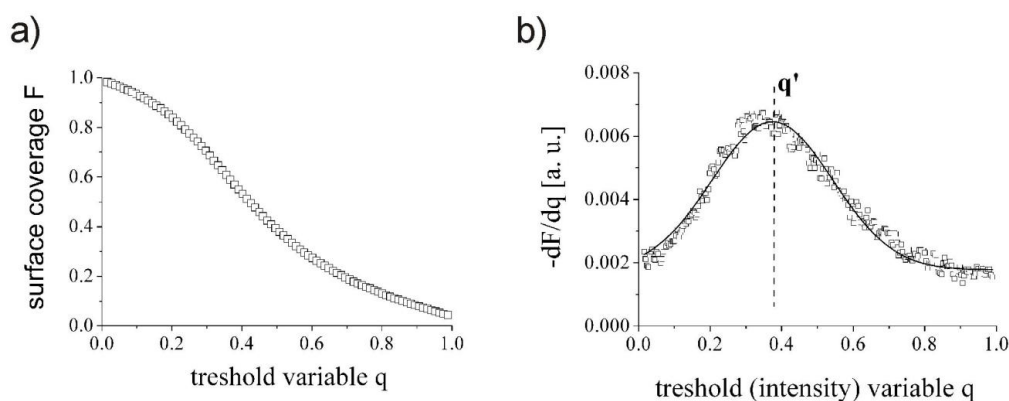
w różnych obszarach próbki (pikselach). Średnia wartość q' , otrzymana z dopasowania krzywej Gaussa, jest średnią intensywnością fluorescencji analizowanego obrazu. Natomiast szerokość piklu $-dF/dq$ odzwierciedla dyspersję, czyli pokazuje zakres różnych wartości poziomu odcięcia q , dla których otrzymuje się czarno-białe obrazy o najbardziej zróżnicowanej strukturze (rysunek 3.1 c). Z tego wynika, że wąskie piki $-dF/dq$ otrzyma się dla jednorodnego pokrycia powierzchni przez białka. Natomiast, w przypadku gdy białka adsorbują losowo tj. niezależnie od siebie, wykres $-dF/dq$ powinien mieć kształt rozkładu prawdopodobieństwa Poissona, o wariancji równej wartości średniej. Zatem dyspersja powinna rosnać ze średnią wartością q' . Mimo, że analizowane tu rozkłady nie są typu Poissonowskiego ta cecha jest zachowana (patrz rozdział 3.1.1.5), odzwierciedlając podobny charakter adsorpcji lektyn do różnych powierzchni polimeru.

3.1.1.4.2. Analiza obrazów fluorescencyjnych o niejednorodnej dystrybucji białek.

Aby analizować obrazy fluorescencyjne niejednorodnie zaadsorbowanych białek metoda geometrii całkowitej jest stosowana w dwóch krokach. W pierwszym kroku używa się pierwszej miary morfologicznej tj. miary pokrycia powierzchniowego $F(q)$, tak jak to było w przypadku powierzchni pokrytych jednorodną warstwą białek. Ten krok pozwala otrzymać nie tylko średnią wartość (znormalizowanej) intensywności fluorescencji q' , ale także określić jej dystrybucję pomiędzy piksele $(-dF/dq)$. Szerokość piklu $-dF/dq$ jest tutaj większa niż w przypadku powierzchni pokrytych białkami w sposób jednorodny. Drugi krok analizy wiąże się z zastosowaniem pozostałych miar Minkowskiego do ilościowego opisu powierzchniowej organizacji (niejednorodnie) zaadsorbowanych białek.



Rysunek 3. 4 Oryginalny obraz fluorescencyjny (w skali szarości) powierzchni o niejednorodnej dystrybucji zaadsorbowanych molekuł białka (a) oraz odpowiadające mu czarno- białe obrazy (b, c) wygenerowane dla poziomów odcięcia $q' + fwhm/2$ (b) oraz q' (c), gdzie q' to wartość średnia, a $fwhm$ to szerokość połówkowa krzywej Gaussa opisującej rozkład $-dF/dq$.



Rysunek 3. 5 Frakcja pokrycia powierzchni $F(q)$ (a) i jej pochodna $-dF/dq$ (b) w funkcji poziomu odcięcia (intensywności fluorescencji) q przedstawione dla rysunku 3.4 a.

Procedura analizy metodą geometrii całkowej niejednorodnego pokrycia powierzchni przez białka jest pokazana dla Con A immobilizowanej na usieciowanych powierzchniowych wzorach mieszaniny PEO/ PS domieszkowanej PETA. Reprezentatywny obraz fluorescencyjny (w skali szarości) oraz odpowiadające mu, wygenerowane dla różnych poziomów odcięcia q , obrazy czarno-białe są pokazane na rysunku 3.4. Zależność pokrycia w funkcji poziomu odcięcia $F(q)$ i jego pochodna $-dF/dq$ dla tego obrazu są pokazane odpowiednio na rysunkach 3.5 a i 3.5 b. Na rysunku 3.5 b widać rozrzut wartości intensywności lokalnej fluorescencji. Jest on opisany krzywą Gaussa, której szerokość połówkowa wynosi 0,40 i jest większa od średniej wartości intensywności fluorescencji q' wynoszącej 0,37, co świadczy o niejednorodnym pokryciu powierzchni przez białka. Aby zanalizować przestrzenne ułożenie zaadsorbowanych białek na podstawie obrazów fluorescencyjnych (rysunek 3.4 a) należy wykorzystać czarno- biały obraz wygenerowany dla poziomu odcięcia $q = q' + fwhm/2$. Ten obraz najwierniej odwzorowuje łaciętą strukturę obrazu oryginalnego. Czarno- białe obrazy otrzymane dla pozostałych poziomów odcięcia (np. q' , patrz rysunek 3.4 c), wykazują mniejsze podobieństwo do oryginału. Reprezentatywny czarno- biały obraz (rysunek 3.4 b) charakteryzują trzy morfologiczne miary otrzymane z funkcjonałów Minkowskiego:²⁶⁻³¹ (i) frakcja pokrycia F powierzchni przez obszary białe, (ii) długość granic biało- czarnych na jednostkę powierzchni U , (iii) charakterystyka Eulera χ_E , zdefiniowana jako różnica spójnych obszarów białych i czarnych. W dwuwymiarowej przestrzeni stanowią one kompletny zestaw miar morfologicznych (F , U , χ_E), zazwyczaj znormalizowanych przez rozmiar obrazu. Zatem łacięta struktura zaadsorbowanych białek może być opisana przez miary odzwierciedlające pokrycie F , lateralny kształt U , oraz topologiczną ciągłość χ_E łato- podobnych struktur o większej intensywności fluorescencji czyli większej ilości zaadsorbowanego białka. Na przykład powierzchniowa dystrybucja protein na rysunku 3.4 a jest opisana przez $F = 0.29$, $U = 1.08 \mu m^{-1}$ i $\chi_E = 0.19 \mu m^{-2}$. Miary F , U oraz χ_E mogą być użyte do określenia całkowitego przestrzennego rozkładu protein, a więc do testowania jakości wzorów białkowych wytworzonych do zastosowań bioanalitycznych.

Miary Minkowskiego mogą być również użyte do określenia parametrów, opisujących cechy domen indywidualnych rozkładu przestrzennego, takich jak: średnie pole powierzchni domeny $S = F / \chi_E$, średni promień krzywizny $r_c = U / 2\pi \chi_E$, średni rozmiar domeny $r_e = (S/\pi)^{1/2}$, współczynnik wydłużenia $c = r_c / r_e$, średnia odległość między domenami $\Lambda = 1 / \chi_E^{1/2}$.³⁰ Dla domen białek z rysunku 3.4 parametry opisujące ich indywidualne cechy mają wartości: $S = 1,53 \mu m^2$; $r_c = 0,91 \mu m$; $r_e = 0,70 \mu m$; $c = 1,30$; $\Lambda = 2,29 \mu m$. Średnie wartości parametrów, opisujących cechy pojedynczych domen zaadsorbowanych białek, mogą być użyte w celu testowania jakości pojedynczych mikro- kropek tworzących mikro- macierz białka.

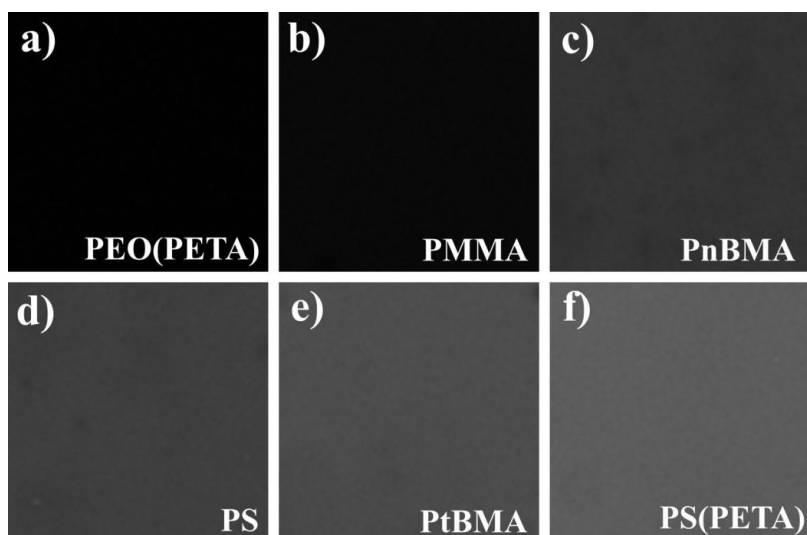
3.1.1.5. Wyniki i ich dyskusja. Adsorpcja białek do różnych podłoży polimerowych.

Reprezentatywne, oryginalne obrazy fluorescencyjne, pokazujące adsorpcję lektyny LcH do powierzchni polimerów o różnych własnościach fizycznych, są przedstawione na rysunku 3.6 w odcieniach skali szarości.

Poziom szarości obrazów pokazanych na rysunku 3.6, który jest proporcjonalny do intensywności fluorescencji, zmienia się wyraźnie od czarnego dla podłoża PEO*(PETA) do jasno szarego dla PS(PETA), przez pośrednie poziomy dla pozostałych polimerów. To pokazuje, że ilość LcH zaadsorbowanego do różnych polimerów silnie zależy od indywidualnych własności tych polimerów, co jest odzwierciedlone przez intensywność fluorescencji. Poprzednie eksperymenty,

przeprowadzone dla białek pozycjonowanych do różnych polimerów, wskazują że kluczowym czynnikiem promującym adsorpcję protein jest struktura łańcucha polimerowego determinująca oddziaływania elektrostatyczne, czy wiązania wodorowe lub oddziaływania hydrofobowe, które są odpowiedzialne za adsorpcję białek.^{1, 48-54}

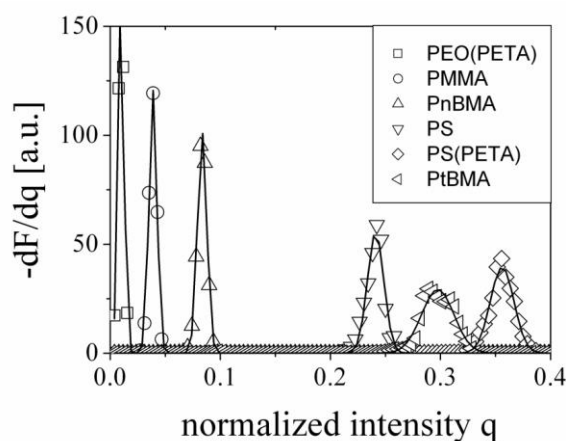
Aby określić ilościowo stopień adsorpcji LcH do warstw różnych polimerów, obrazy fluorescencyjne zanalizowano za pomocą geometrii całkowitej, według procedury opisanej w rozdziale 3.1.1.4.1. Otrzymane dystrybucje pikseli $-dF/dq$ o znormalizowanej intensywności q , która odzwierciedla znormalizowaną ilość związanego białka, są pokazane na rysunku 3.7 dla reprezentatywnych obrazów różnych powierzchni polimerowych pokrytych molekułami modelowego białka. Monotoniczny wzrost szerokości piksu (dyspersja) wraz z pozycją piksu dystrybucji pikseli (średnia wartość) świadczy o takiej samej naturze procesu adsorpcji białek do wybranych powierzchni polimerowych (co dyskutowano w sekcji 3.1.1.4.1). Z tego powodu obrazy o wysokiej intensywności fluorescencji (rysunek 3.6 dla PnBMA, PS, PtBMA i PS(PETA)) pokazują niewielką niejednorodność homogenicznie pokrytej powierzchni, co jest widoczne przy większym powiększeniu.



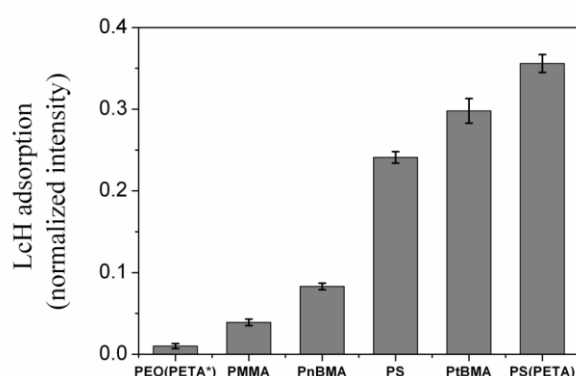
Rysunek 3. 6 Oryginalne obrazy fluorescencyjne LcH zaadsorbowanego do powierzchni cienkich warstw różnych polimerów: PEO(PETA) (a), PMMA (b), PnBMA (c), PS (d), PtBMA (e), PS(PETA) (f) pokazane w skali szarości. Zdjęcia wykonano i zarejestrowano w identycznych warunkach przy tych samych parametrach. Rozmiar obrazów 120x 120 μm .

Dla każdej powierzchni polimerowej, zanalizowano 6 zdjęć fluorescencyjnych, dla których wyznaczono pozycje pików q' (rysunek 3.7) i otrzymano średnią ilość zaadsorbowanych białek, co zostało przedstawione w formie histogramów (rysunek 3.8). Adsorpcja lektyny LcH, mierzona w tej samej skali znormalizowanej intensywności, wzrasta od wartości bliskiej zera $0,010 \pm 0,006$ (wartość średnia $\pm$ niepewność na poziomie 95 %) dla PEO*(PETA) do wartości $0,356 \pm 0,022$ dla PS(PETA), przez wartości pośrednie $0,039 \pm 0,008$ dla PMMA, $0,083 \pm 0,008$ dla PnBMA, $0,241 \pm 0,014$ dla PS i $0,298 \pm 0,030$ dla PtBMA. Test Studenta dla dwóch prób pokazał, że na poziomie ufności 0,05, średnie wartości względnej ilości białka zaadsorbowanego do różnych powierzchni polimerów są znacząco różne. Porządek w jakim wzrasta adsorpcja tej lektyny, pokazany na rysunku 3.8, w ogólności odwzorowuje wzrastającą hydrofobowość czystych polimerów, co wyraża się przez malejącą wartość składowej polarnej energii powierzchniowej polimerów $\gamma_p = 12,2; 11,5; 6,8$ i $3,7$ mJ/m^2 odpowiednio dla PEO, PMMA, PS i PtBMA.³⁹⁻⁵⁶ Wyjątkiem jest PnBMA ($\gamma_p = 4,9$ mJ/m^2)^{39,56} dla którego

obserwowana jest słaba adsorpcja, zwłaszcza w porównaniu do jego izomeru PtBMA o raczej rozgałęzionych (niż liniowych) bocznych grupach łańcucha metakrylanu butylu.⁵⁷ To pokazuje, że adsorpcja białek jest zależna od wielu oddziaływań białko- polimer, silnie zależących od struktury łańcucha.



Rysunek 3. 7 Ilościowa analiza adsorpcji LcH do powierzchni cienkich warstw badanych polimerów: reprezentatywne rozkłady $-dF/dq$ w funkcji znormalizowanej intensywności fluorescencji, odpowiadającej relatywnej ilości zaadsorbowanych molekuł LcH.

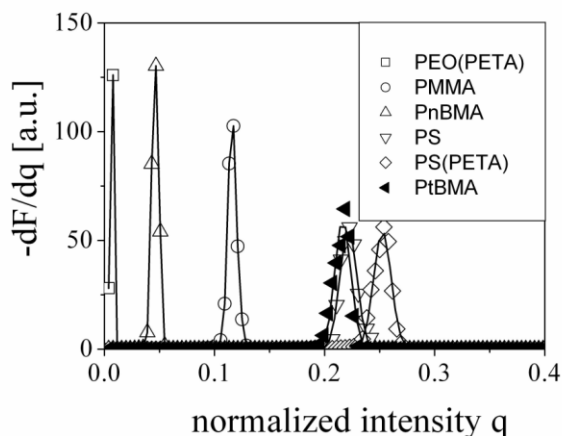


Rysunek 3. 8 Adsorpcja LcH do różnych typów powierzchni polimerów. Słupki reprezentują średnie wartości wraz z niepewnościami wyznaczonymi na poziomie ufności 95 %.

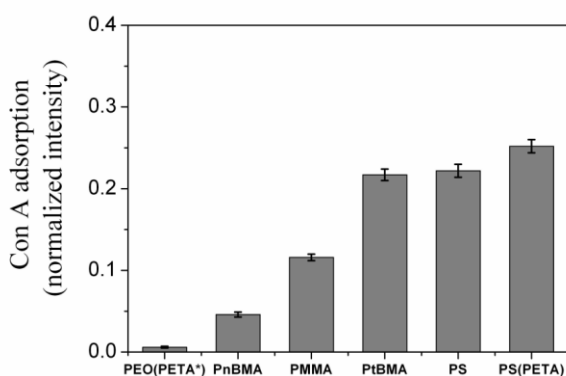
Porównanie danych, pokazanych na rysunku 3.8 dla czystego PS i polistyrenu domieszkowanego triakrylanem pentaerytrytolu PS(PETA) pokazuje, że dodanie PETA powoduje wzrost stopnia adsorpcji białka LcH o 50%. Ta informacja jest ważna ponieważ PETA jest czynnikiem sieciującym⁴⁰⁻⁴², zastosowanym tutaj aby zapobiec rozpuszczeniu PEO w wodnym roztworze PBS. Można powiedzieć, że obserwowany niewielki stopień adsorpcji do podłoża PEO*(PETA) jest spowodowany obecnością czynnika sieciującego PETA.

Dane dotyczące adsorpcji drugiej lektyny, ConA, zostały otrzymane na podstawie analizy wykonanej według opisanej powyżej procedury i są przedstawione na rysunkach 3.9 i 3.10. Rysunek 3.9 pokazuje rozkład pikseli znormalizowanej intensywności fluorescencji q , określonej dla reprezentatywnych obrazów adsorpcji Con A do różnych podłoży polimerowych. Rysunek 3.10

przedstawia histogramy pokazujące średnią względną ilość zaadsorbowanego białka Con A, uzyskaną ze wszystkich analizowanych obrazów.



Rysunek 3. 9 Ilościowa analiza adsorpcji Con A do powierzchni cienkich warstw badanych polimerów: reprezentatywne rozkłady $-dF/dq$ w funkcji znormalizowanej intensywności fluorescencji, odpowiadającej relatywnej ilości zaadsorbowanych molekuł Con A.



Rysunek 3. 10 Adsorpcja Con A do różnych typów powierzchni polimerów. Słupki reprezentują średnią względną ilość białka wraz z niepewnościami wyznaczonymi na poziomie ufności 95 %.

Wyniki prezentowane na rysunku 3.10 pokazują, że wiązanie Con A do powierzchni PS(PETA), PtBMA, PS, PnBMA, PMMA i PEO*(PETA) może być opisane (używając tej samej referencyjnej skali znormalizowanej intensywności) przez liczby: $0,252 \pm 0,016$; $0,217 \pm 0,014$; $0,222 \pm 0,016$; $0,046 \pm 0,006$; $0,116 \pm 0,008$ i $0,006 \pm 0,002$. t -test dla dwóch prób pokazał, że na poziomie ufności 0,05, średnie wartości względnej ilości białka Con A zaadsorbowanego do wybranych powierzchni polimerowych są znacząco różne z wyjątkiem tych dla czystego PS i PtBMA. Rosnąca hydrofobowość (malejąca wartość polarnej składowej energii powierzchniowej) czystych polimerów PEO(PETA), PMMA i PS wyjaśnia wzrost adsorpcji Con A, natomiast nie tłumaczy (sama w sobie) ilości Con A związanej do powierzchni PS i PtBMA.

Ostrożne porównanie adsorpcji dwóch lektyn, Con A i LcH, o identycznych znacznikach fluorescencyjnych i tej samej procedurze analizy, pozwala wyróżnić trzy polimery o takiej samej intensywności fluorescencji zaadsorbowanych białek: PEO*(PETA) ($0,006 \pm 0,002$ vs $0,010 \pm 0,006$), PnBMA ($0,046 \pm 0,006$ vs $0,083 \pm 0,008$) i PS ($0,222 \pm 0,016$ vs $0,241 \pm 0,014$). Natomiast dość istotne

różnice widać dla PMMA ($0,116 \pm 0,008$ vs $0,039 \pm 0,008$), PtBMA ($0,217 \pm 0,014$ vs $0,298 \pm 0,030$) i PS(PETA) ($0,252 \pm 0,016$ vs $0,356 \pm 0,022$). Te same wnioski wynikają z testu Studenta dla dwóch prób na poziomie ufności 0.05. Zachowanie PnBMA, inne w porównaniu z pozostałymi metakrylanami PMMA i PtBMA, może wynikać z długości i elastyczności bocznego łańcucha zawierającego grupę estrową, która ma możliwość wpływania na oddziaływania międzycząsteczkowe (tj. obniżenie T_g materiałów polimerowych).⁵⁷⁻⁵⁸ Obydwa badane białka, LcH (wpis w PDB 2LAL) i ConA (wpis w PDB 1CVN), wiążą specyficznie te same ligandy i mają takie same centra wiążące ale o innej strukturze.^{38, 59} Obserwowane różnice w intensywności fluorescencji pokazują, że nie tylko hydrofobowe, ale także (dyspersyjne lub) elektrostatyczne siły i wiązania wodorowe są ważne dla wiązania białek do polimerów. Ponadto różnica w strukturze trzeciorzędowej obu lektyn (dimer-LcH i tetramer-ConA dla użytych wartości pH) również może wpływać na proces adsorpcji. Te obserwacje zgadzają się z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi innych białek.^{1, 48- 55}

3.1.1.6. Podsumowanie

Rozszerzono zastosowanie analizy geometrii całkowitej o obrazy fluorescencyjne, aby porównać ilościowo względną adsorpcję białek do różnych powierzchni polimerowych. Średnie wartości i rozkład pomiędzy piksele intensywności fluorescencji (znormalizowanej dla wszystkich obrazów danej serii) są określone pierwszą miarą Minkowskiego, opisującą stopień pokrycia powierzchni. Te wyniki pozwoliły na bezpośrednie, szybkie, ilościowe i stosunkowo łatwe porównanie relatywnej adsorpcji białek do różnych (polimerowych) powierzchni bezpośrednio z obrazów fluorescencyjnych. Pokazane tu podejście może być z łatwością zastosowane do bardziej wnikliwej analizy przy użyciu pozostałych funkcjonałów Minkowskiego, opisujących (wraz z pierwszą miarą) przestrzenną organizację obszarów powierzchni pokrytych znakowanymi fluorescencyjnie białkami.⁶⁰

Analizę geometrii całkowitej pokazano tu dla dwóch białek, LcH i Con A, adsorbujących do sześciu różnych podłoży polimerowych, usieczonego PEO*(PETA), PMMA, PnBMA, PS, PtBMA i PS(PETA). Zasadniczo adsorpcja białek wzrasta wraz ze wzrostem hydrofobowości czystych polimerów, tj. wraz ze spadkiem wartości polarnej składowej energii powierzchniowej. Zarówno dla Con A jak i LcH wyjątkiem od tej reguły jest PnBMA. Wyniki fluorescencyjne uzyskane dla obu lektyn znakowanych tym samym fluoroforem i dla tej samej procedury przygotowania próbek, są porównywalne dla PnBMA ale różne dla pozostałych metakrylanów: PMMA i PtBMA. To sugeruje, że długi i elastyczny łańcuch boczny, zawierający grupę estrową, może wpływać na oddziaływania międzycząsteczkowe, prowadzące do efektywnie takiej samej adsorpcji różnych protein. Takie samo porównanie, przeprowadzone dla pozostałych polimerów, pokazuje że nie tylko oddziaływania hydrofobowe ale również inne siły (dyspersyjne, elektrostatyczne, wiązania wodorowe) są ważne w procesie adsorpcji lektyn. Ponadto można stwierdzić, że z dodaniem czynnika sieciującego PETA związany jest wzrost adsorpcji.

Głównym ograniczeniem zaproponowanej metody jest jej względnie ilościowy charakter, tzn. dostarcza nam ona tylko parametry proporcjonalne do rzeczywistej (bezwzględnej) ilości zaadsorbowanego białka. Jednakże, wyniki otrzymane tą metodą mogą być wykalibrowane np. mikrowagą kwarcową. Ta technika pozwala na pomiar nawet najmniejszych mas oraz na monitorowanie zmiany masy w czasie rzeczywistym.⁶¹ Pomimo braku natychmiastowej informacji o absolutnej ilości zaadsorbowanych białek, analiza geometrii całkowitej dostarcza parametr proporcjonalności, który można zastosować do scharakteryzowania relatywnych zmian w adsorpcji

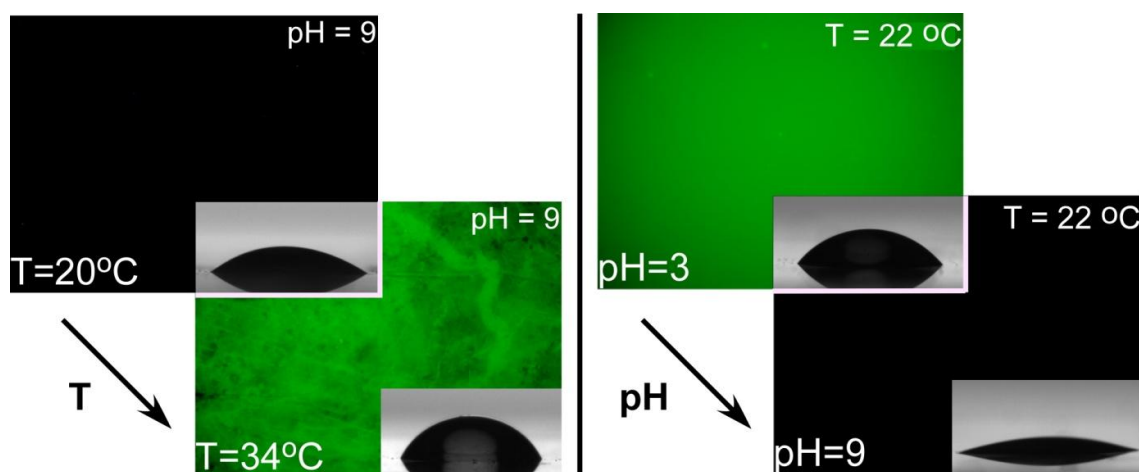
białek w sposób ilościowy. Ponadto można uzyskać kompletny zestaw miar morfologicznych, opisujących ilościowo organizację na powierzchni niejednorodnie adsorbującej białka (pokrycie powierzchni, kształt, i topologiczną ciągłość), jak to pokazano na przykładzie adsorpcji Con A do łatwo-podobnych domen PS w matrycy usieciowanego PEO.

3.1.1.7. Literatura

- (1) Seneratne, W.; Andruzii, L.; Ober, C. K. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2427–2448.
- (2) Adhikari, B.; Majumdar, S. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 699–766.
- (3) Petrou, P. S.; Chatzichristidi, M.; Douvas, A. M.; Argitis, P.; Misiakos, K.; Kakabakos, S. E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1994–2002.
- (4) Yang, J.; Yamato, M.; Okano, T. *MRS Bull.* **2005**, *30*, 189–193.
- (5) Davies, F.; Higson, S. P. J. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 1–20.
- (6) Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 28–60.
- (7) Aguilar, M. R.; Elvira, C.; Gallardo, A.; Vázquez, B.; Román, J. S. In *Topics in Tissue Engineering*; Ashammakhi, N., Reis, R., Chiellini, E., Eds.; 2007; Vol. 3, pp1–27. Biomaterials and Tissue Engineering Group, www.oulu.fi/pareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3
- (8) Schmidt, D.; Hoerstrup, S. P. *Swiss Med. Wkly.* **2005**, *135*, 618–623.
- (9) Labarre, D. *Trends Biomater. Artif. Organs* **2001**, *15*, 1–3.
- (10) Klee, D.; Höcker, H. *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *149*, 1–57.
- (11) Kenausis, G. L.; Voros, J.; Elbert, D. L.; Huang, N.; Hofer, R.; Ruiz-Taylor, L.; Textor, M.; Hubbel, J. A.; Spencer, N. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3298–09.
- (12) Mar, M. N.; Ratner, B. D.; Yee, S. S. *Sens. Actuators, B* **1999**, *54*, 125–131.
- (13) Li, J. T.; Caldwell, K. D. *Colloids Surf., B* **1996**, *7*, 9–22.
- (14) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714–10721.
- (15) Lopez, G. P.; Ratner, B. D.; Rapoza, R. J.; Horbett, T. A. *Macromolecules* **1993**, *26*, 3247–3253.
- (16) Sousa, A.; Sengonul, M.; Latour, R.; Kohn, J.; Libera, M. *Langmuir* **2006**, *22*, 6286–6292.
- (17) (a) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2150–2158. (b) Morin, C.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L.; Urquhart, S. G.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2004**, *137–140*, 785–794.
- (18) Suh, K. Y.; Seong, J.; Khademhosseini, A.; Laibinis, P. E.; Langer, R. *Biomaterials* **2004**, *25*, 557–563.
- (19) Douvas, A. M.; Petrou, P. S.; Kakabakos, S. E.; Misiakos, K.; Argitis, P.; Sarantopoulou, E.; Kollia, Z.; Cefalas, A. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1027–1032.
- (20) Kurosawa, S.; Kamo, N.; Aizawa, H.; Muratsugu, M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2598–2603.
- (21) Mielczarski, J. A.; Dong, J.; Mielczarski, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 5228–5237.
- (22) Petrou, P. S.; Chatzichristidi, M.; Douvas, A. M.; Argitis, P.; Misiakos, K.; Kakabakos, S. E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1994–2002.
- (23) Mack, N. H.; Dong, R.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7871–7881.
- (24) Quinn, A.; Mantz, H.; Jacobs, K.; Bellon, M.; Anten, L. *Europhys. Lett.* **2008**, *81*, 560031–560036.
- (25) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Robar, N.; Cornelius, R.; Brash, J. R.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7871–7881; *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16763–16773.
- (26) Mecke, K. R. *Phys. Rev. E* **1996**, *53*, 4794–4800.
- (27) Mecke, K. R.; Sofonea, V. *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, 3761–3764.
- (28) Mecke, K. R. *Int. J. Mod. Phys. B* **1998**, *12*, 861–899.
- (29) Mecke K. R. In *Statistical Physics and Spatial Statistics*; Mecke, K. R., Stoyan, D., Eds.; Lecture Notes in Physics Series, Vol. 554; Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 2000; s 111.
- (30) Michielsen, K.; de Raedt, H. *Phys. Rep.* **2001**, *347*, 461–538.
- (31) Sofonea, V.; Mecke, K. R. *Eur. Phys. J. B* **1999**, *8*, 99–112.
- (32) Raczowska, J.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Lekki, J.; Lekka, M.; Bernasik, A.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* **2003**, *36*, 2419–2427.
- (33) Raczowska, J.; Bernasik, A.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Kowalski, K.; Lekka, M.; Czuba, P.; Lekki, J. *Thin Solid Films* **2005**, *476*, 358–365.
- (34) Gutmann, J. S.; Müller-Buschbaum, P.; Stamm, M. *Faraday Discuss.* **1999**, *112*, 285–297.
- (35) Becker, J.; Grün, G.; Seemann, R.; Mantz, H.; Jacobs, K.; Mecke, K. R.; Blosssey, R. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 59–63.

- (36) Lis, H.; Sharon, N. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1–27.
- (37) Ni, Y.; Tizard, I. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *55*, 205–223.
- (38) Lekka, M.; Laidler, P.; Łabędź, M.; Kulik, A. J.; Lekki, J.; Zając, W.; Stachura, Z. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 505–512.
- (39) Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook*, Wydanie IV.; J. Wiley & Sons: Nowy Jork, 1999.
- (40) Doytcheva, M.; Stamenova, R.; Zvetkov, V.; Tsvetanow, C. *Polymer* **1998**, *39*, 6715–6721.
- (41) Doytcheva, M.; Dotcheva, D.; Stamenova, R.; Tsvetanow, C. *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, *286*, 30–33.
- (42) Doytcheva, M.; Petrova, E.; Stamenova, R.; Tsvetanow, C.; Riess, G. *Macromol. Mater. Eng.* **2004**, *289*, 676–680.
- (43) Foriers, A.; Neve, R. D.; Kanarek, L.; Strosberg, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 1136–1139.
- (44) Debray, H.; Decout, D.; Strecker, G.; Spik, G.; Montreuil, J. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *117*, 41–51.
- (45) Bradbrook, G. M.; Gleichmann, T.; Harrop, S. J.; Habash, J.; Raftery, J.; Kalb, J.; Yariv, J.; Hilliera, I. H.; Helliwell, J. R. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 1603–1612.
- (46) Loris, R.; Steyaert, J.; Maes, D.; Lisgarten, J.; Pickersgill, R.; Wyns, L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 8772–8781.
- (47) Schwarz, F. P.; Misquith, S.; Surolia, A. *Biochem. J.* **1996**, *316*, 123–129.
- (48) Matsudo, T.; Ogawa, K.; Kokufuta, E. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1794–1799.
- (49) Azegami, S.; Tsuboi, A.; Izumi, T. I.; Hirata, M.; Dubin, P. L.; Wang, B.; Kokufuta, E. *Langmuir* **1999**, *15*, 940–947.
- (50) Efremova, N. V.; Sheth, S. R.; Leckband, D. E. *Langmuir* **2001**, *17*, 7628–7636.
- (51) Latour, R. A. *J. Biomed. Mater. Res., A* **2006**, *78*, 843–854.
- (52) Ding, Y. S.; Qin, C.; Rabinow, B. E. *Med. Plast. Biomater. Mag.* **1996**, 42.
- (53) Kai, J.; Sohn, Y. S.; Ahn, C. H. *Proceedings of the 7th International Conference on Micro Total Analysis Systems (micro-TAS 2003)*, Transducer Research Foundation: Cleveland Heights San Diego, Kalifornia, 2003; 1101–1104.
- (54) Bosquet, Y.; Swart, P. J.; Schmitt-Colin, N.; Velge-Roussel, F.; Kuipers, M. E.; Meijer, D. K. F.; Bru, N.; Hoebeke, J.; Breton, P. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 141–147.
- (55) Angenendt, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1009*, 97–104.
- (56) Składowe polarne napięcia powierzchniowego ($\gamma_p = \gamma_{xp}$) obliczono na podstawie napięcia powierzchniowego, $\gamma(20^\circ\text{C}) = 42.9, 41.1, 40.7, 31.2$ i 30.4 , a polarność powierzchni $x_p = 0.284, 0.281, 0.168, 0.158$, i 0.120 , wartości ³⁹ dla PEO, PMMA, PS, PnBMA, i PtBMA.
- (57) Raczowska, J.; Bernasik, A.; Budkowski, A.; Sajewicz, K.; Penc, B.; Lekki, J.; Lekka, M.; Rysz, J.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7308–7315.
- (58) Meniszez, C.; Sixou, B.; David, L.; Wigier, G. *J. Non-Cryst. Solids* **2005**, *351*, 595–603.
- (59) Lebed, K.; Kulik, A. J.; Forro, L.; Lekka, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *299*, 41–48.
- (60) Zemła, J.; Lekka, M.; Raczowska, J.; Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2101–2109.
- (61) Lüthgens, E.; Janshoff, A. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 444–448.

3.1.2. Kontrola za pomocą temperatury i pH adsorpcji białka do polimerowych pokryw inteligentnych



3.1.2.1. Abstrakt

Pokrycia poli(N-izopropylakrylamidu) PNIPAM, wytworzone (w ramach wspólnego projektu przez grupę Y. Stetsyshyna ze Lwowa) za pomocą polimeryzacji „z powierzchni” oligoperoksydu przyczepionego do szklanego podłoża za pomocą amino-organicznego silanu (3-aminopropylotrietoksylsilanu), wykazują nie tylko temperaturową, ale również zależną od pH zmianę zwilżalności umożliwiając kontrolę adsorpcją białek. Struktura i własności pokryw PNIPAM, wytworzonych dla różnych czasów polimeryzacji, zostały sprawdzone przez pomiary kąta zwilżenia wody i za pomocą spektrometrii masowej jonów wtórnych metodą czasu przelotu TOF- SIMS. Reakcja zwilżalności na zmianę temperatury, mierzona pomiędzy 20 a 40 °C, była istotna dla pH 9 i 7 natomiast nieznaczna lub nieobserwowana dla pH 5 i 3, wskazując na blokowanie przez oligoperoksyd przejścia konformacyjnego szczotek PNIPAM-u z hydrofilowych rozwiniętych kłębków do hydrofobowych zwiniętych łańcuchów (globulek). Wyższa chropowatość powierzchni i drastyczny wzrost adsorpcji modelowego białka (lektyny soczewicy znakowanej izotiocyjanianem fluoresceiny), zaobserwowano za pomocą Mikroskopu Sił Atomowych i mikroskopu fluorescencyjnego dla fazy hydrofobowej, tj. dla pH 3 zmienianego przy stałej temperaturze 22 °C, oraz dla temperatury ok. 33 °C

zmienianej przy stałym pH 9. Reakcja adsorpcji białka na zmiany pH została potwierdzona przez analizę głównych składowych (Principal Component Analysis) przeprowadzoną dla wyników TOF-SIMS.

3.1.2.2. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się intensywny rozwój badań poświęconych materiałom polimerowym, które wykazują możliwości zmiany ich własności fizykochemicznych pod wpływem bodźca zewnętrznego jakim może być zmiana temperatury, pH, światło itp. Takie polimery są używane do dopasowywania na żądanie własności powierzchni takich jak hydrofilowość lub biokompatybilność. Powierzchnie polimerowe czułe na bodźce są ważne dla produkcji selektywnych membran, sensorów lub systemów separujących używanych do kontrolowanego uwalniania leków i translokacji nanocząstek, do wytwarzania mechanicznych siłowników i przetworników.¹⁻⁷ W szczególności obserwuje się wzmożone zainteresowanie badaniami powierzchni polimerowych mogących zmieniać swoje powinowactwo względem białek lub komórek pod wpływem zewnętrznego bodźca,¹⁻³ a co za tym idzie mogą mieć zastosowanie w biologii i medycynie.

Większość z obecnie testowanych wrażliwych na bodźce systemów może być stymulowana wyłącznie przez jeden rodzaj bodźca. Aby rozszerzyć zakres zastosowań, badania mają na celu wytworzenie systemów polimerowych wrażliwych na działanie wielu czynników. Przykładem mogą być polimery czułe na zmianę zarówno temperatury jak i pH zsyntetyzowane przez kopolimeryzację np. N-izopropylakrylamidu z kwasem metakrylowym^{8,9} lub przez dołączenie wrażliwych na zmiany temperatury łańcuchów bocznych do wrażliwego na zmiany pH łańcucha głównego.¹¹ Wytworzono również kopolimery wrażliwe na światło i temperaturę.¹² Innym ważnym przykładem systemów polimerowych są hydrożele zbudowane z penetrujących się nawzajem sieci temperaturowo czułego poli(N-izopropylakrylamidu) (PNIPAM) i pH- czułego polikwasu metakrylowego (PMAA), przygotowane przez sekwencyjną metodę polaryzacji.¹³ Multi- czułe mikro- żele wrażliwe na trzy rodzaje bodźców zewnętrznych: pH, temperaturę i światło zostały ostatnio zsyntetyzowane przez Garcia i in.¹⁴ Z kolei Frakhulin i in.^{15,16} wytworzyli biomimetyczne hybrydowe systemy polimer-komórki, które są magnetycznie- i pH- czułe.

Widoczny postęp w tworzeniu multi- czułych materiałów polimerowych⁸⁻¹⁶ wpłynął na badania nad przyczepianiem ich do powierzchni (np. krzemu, szkła, polimerów).^{17,18} Temperaturowo- i pH- czułe filmy polimerowe na krzemie zostały zsyntetyzowane metodą polimeryzacji rodnikowej kopolimeru N-izopropylakrylamidu i kwasu akrylowego ‘z powierzchni’ szczotek inicjatorów przyczepionych do powierzchni krzemu.¹⁷ W innym podejściu bi- czułe szczotki powstały gdy termo- czuły polimer (PNIPAM) i pH- czuły polimer (polikwas akrylowy lub poli(2-winylopirydyna)) zostały przyczepione razem ‘do powierzchni’ wafla krzemowych.^{18,19}

W ostatnim czasie zaproponowano inną metodę wytwarzania szczotek polimerowych o zadanych własnościach na podłożach szklanych.¹⁷⁻²² W tym przypadku szczotki są polimeryzowane ‘z powierzchni’ lub przyczepione ‘do powierzchni’ funkcjonalnych poliperoksydów lub oligoperoksydów.²¹ Pierwszym krokiem w tym podejściu jest przyczepienie peroksydów do różnych powierzchni plastikowych (polipropylenu, polioelfin, poli(tereftalanu etylenu)).²⁰⁻²²

Rozwinięciem powyższej strategii jest wytworzenie warstw polimerowych, przez przyczepienie do powierzchni szkła oligoperoksydów szczepionych z PNIPAM- em. Tak

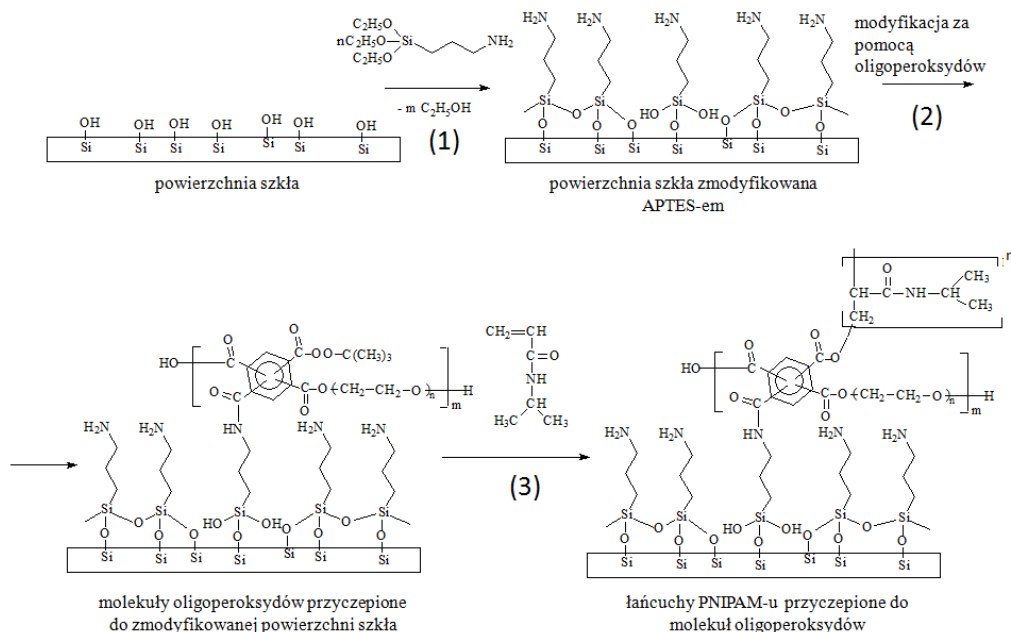
zaprojektowane pokrycia są wrażliwe na bodźce dwójakiego rodzaju. Wytworzono je metodą polimeryzacji szczotek PNIPAM- u 'z powierzchni' warstwy oligoperoksydów, które zostały przyłączone do szklanego podłoża za pośrednictwem aminosilanów (APTES). W tym rozdziale zbadano temperaturowo- i pH- zależną odpowiedź tych szczotek, oraz sprawdzono adsorpcję białek do tych podłoży w różnych warunkach środowiska tj. dla różnych wartości temperatury i pH.

3.1.2.3. Część eksperymentalna

3.1.2.3.1. Materiały

Pirydynę i pozostałe rozpuszczalniki organiczne oczyszczono metodą opisaną przez Weissbergera i in.²³ Poli(glikol etylenu) (PEG- 9) zakupiono w Merck Chem. Co. N- izopropylakrylamid (NIPAM) oraz (3- aminopropylotrietoksylan) (APTES) nabyto w Sigma- Aldrich. Białko znakowane fluorescencyjnie izotiocyanianem fluoresceiny, lektynę soczewicy (LcH- FITC) zakupiono w Biokom (Polska).

Przygotowanie podłoży. Przygotowanie podłoży opartych o PNIPAM opisano w rozdziale 2.1.3 i przedstawiono schematycznie na rysunku 3.11. W skrócie, tworzenie tych pokryć polega na (1) funkcjonalizacji szkła za pomocą monowarstw SAM opartych o APTES, (2) modyfikacji takiej powierzchni przy użyciu molekuł oligoperoksydów, (3) polimeryzacji szczotek PNIPAM z cząstek oligoperoksydów.



Rysunek 3. 11 Przygotowanie pokryć opartych na PNIPAM: funkcjonalizacja powierzchni szkła za pomocą warstw samo-organizujących się APTES (1), modyfikacja otrzymanej w ten sposób powierzchni molekułami oligoperoksydów (2) i polimeryzacja łańcuchów PNIPAM z cząstek oligoperoksydów (3).

3.1.2.3.2. Charakterystyka podłoży polimerowych.

Podłoża szczotek PNIPAM przyłączonych do powierzchni szkła metodą polimeryzacji 'z powierzchni', gdzie jako inicjatorów użyto oligoperoksydów przyłączonych do płytek szklanych za pomocą APTES- u, zostały przygotowane przez dr. Yuriya Stetsyshyna z Politechniki Lwowskiej.

Pomiary kąta zwilżania (CA). Statyczne pomiary kąta zwilżania wykonano techniką kropli leżącej używając aparatu EasyDrop (DSA 15) firmy Krüss wyposażonego w komorę temperaturową na bazie modułów Peltiera. Pomiary wykonano w kilku wybranych temperaturach między 20 a 40 °C, aby sprawdzić temperaturową odpowiedź pokryć oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM. Temperaturę kontrolowano przez cały czas trwania pomiarów za pomocą termopary będącej w kontakcie z powierzchnią próbki. Aby określić zwilżalność dla danego pH, przed pomiarem próbki zanurzono (15 min) w roztworze o tym pH, następnie osuszono je strumieniem azotu i umieszczono w komorze temperaturowej aparatu pomiarowego. Przed następnym pomiarem kąta zwilżania szczotek PNIPAM- u dla innego pH, próbki zanurzano na czas 30 min w wodzie dejonizowanej, osuszano i umieszczano w roztworze o innym pH. Wartości kąta zwilżania zostały podane jako wartości średnie obliczone na podstawie danych z 10 pomiarów wykonanych w różnych obszarach danej próbki.

Roztwór buforowego pH 9 sporządzono z 0,1 M wodnego roztworu boraksu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Bufory o pH wynoszącym 7, 5 i 3 przygotowano przez zmieszanie 0,2 M wodorofosforanu sodu (Na_2HPO_4) i 0,1 M kwasu cytrynowego w stosunku objętościowym, odpowiednio, 82,5 %, 51,0 % i 20,5 %.

Mikroskopia sił atomowych (AFM). Obrazy topograficzne pokryć oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM zostały zarejestrowane w różnych warunkach temperaturowych i pH za pomocą mikroskopu sił atomowych Agilent 5500 pracującym w trybie bezkontaktowym, przy użyciu super ostrych krzemowych próbników AFM. Temperaturowe pomiary AFM przeprowadzono *in situ*. Do tego celu użyto standardowego, podgrzewanego stolika AFM podłączonego do regulatora temperatury (LakeShore). Zbadano zmianę morfologii powierzchni w odpowiedzi na zmianę warunków termicznych dla próbki ze szczotkami PNIPAM- u utrzymanymi po 20 h polimeryzacji. Próbkę przez 15 minut umieszczona była w roztworze o pH= 9. Po osuszeniu wykonano pomiary AFM w temperaturach 20; 27,5; 30 i 32,5 °C.

Pomiary AFM zmian morfologii szczotek PNIPAM w odpowiedzi na różne pH wykonano dla warstwy uzyskanej po 48 h polimeryzacji PNIPAM- u. Próbkę przez 15 min zanurzona była w roztworze o zadanym pH. Po osuszeniu wykonano pomiary AFM. Przed powtórzeniem tego kroku (zanurzeniem w roztworze o innej wartości pH) próbkę zanurzono w wodzie dejonizowanej przez 30 min i suszono strumieniem azotu. Tę procedurę powtórzono dla kolejnych wartości pH.

Reprezentatywne obrazy AFM scharakteryzowano podając chropowatość (RMS) i skośność (SK), które definiują odpowiednio rozpiętość (RMS) i asymetrię (SK) dystrybucji wysokości w obrazach AFM. Te topograficzne parametry uzyskano stosując program komputerowy PicoImage, w który zaopatrzony jest mikroskop Agilent 5500.

Adsorpcja białek. Lektyna soczewicy znakowana izotiocyanianem fluoresceiny (LcH- FITC), adsorbującym światło o długości fali $\lambda_{\text{abs}} = 490$ nm, a emitującym światło fluorescencyjne o długości fali $\lambda_{\text{emit}} = 525$ nm, została wybrana jako białko modelowe do badania adsorpcji do powierzchni pokryć oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM w warunkach różnej temperatury i pH.

Przygotowano cztery roztwory LcH o różnych wartościach pH, ale o identycznej koncentracji białka wynoszącej 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, używając czterech różnych buforów. Użyto roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) jako buforu o neutralnym pH (pH= 7,4). Bufory o pH= 3 i 5

sporządzono przez dodanie kroplami kwasu solnego do PBS, natomiast bufor o pH= 9 powstał przez dodanie NaOH do buforu PBS.

Aby zbadać wpływ pH środowiska na adsorpcję białek kroplę (80 μL) każdego z roztworów LcH umieszczono na powierzchni szczotek PNIPAM (uzyskanych po 48 h polimeryzacji). Po 15 minutach każdą z próbek spłukano ostrożnie właściwym buforem tj. o tym samym pH co pH użytego roztworu białek. Następnie każda z próbek została ostrożnie wysuszona strumieniem azotu.

W celu sprawdzenia wpływu zmiany temperatury na adsorpcję protein, kroplę roztworu białek o pH= 9 eksponowano na powierzchni szczotek PNIPAM (po 24 h polimeryzacji PNIPAM- u) przez 15 min w temperaturach 20, 26, 29 i 34 $^{\circ}\text{C}$. Następnie wszystkie próbki przemyto buforem o pH= 9 aby usunąć niezaadsorbowane białka, a na końcu wysuszono strumieniem azotu.

Mikroskopia fluorescencyjna. Adsorpcję białek znakowanych fluorescencyjnie do powierzchni pokryć zobrazowano mikroskopem optycznym Olympus BX51 zaopatrzonym w lampę halogenkową o mocy 100 W, filtr U-MNG2 ($\lambda_{\text{exit}} = 470\text{--}490\text{ nm}$, $\lambda_{\text{emit}} > 510\text{ nm}$) oraz kamerę cyfrową typu DP72. Wszystkie zdjęcia suchych próbek wykonano używając programu CELL[^]F. Dla obu eksperymentów adsorpcji białek, badających zależność od temperatury i pH, wykonano serie zdjęć w tych samych warunkach w ramach każdej serii, co wynikało z faktu, że ilość zaadsorbowanego białka determinuje wybór czasu rejestracji zdjęcia.

TOF- SIMS. Aby zbadać skład chemiczny powierzchni próbek po każdym z kroków wytwarzania podłoży pokryć oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM oraz aby potwierdzić fluorescencyjne wyniki adsorpcji białek do warstw szczotek PNIPAM- u w środowisku o różnym pH, wykonano pomiary spektrometrem masowym jonów wtórnych czasu przelotu (TOF- SIMS) za pomocą aparatu TOF.SIMS 5 (ION- TOF GmbH) wyposażonego w ciekło- metaliczne jonowe działło bizmutowe o energii 30 keV. Klastery Bi_3 zostały użyte jako źródło jonów pierwotnych o jonowej gęstości dozy mniejszej niż 10^{12} jonów/ cm^2 , aby zapewnić statyczny tryb pracy. Pulsującego niskoenergetycznego działła elektronowego użyto, aby skompensować ładowanie się powierzchni w trakcie pomiaru. Dla każdej próbki zarejestrowano widma masowe o wysokiej rozdzielczości zebrane w dwóch różnych, nieprzekrywających się obszarach ($100 \times 100\text{ }\mu\text{m}^2$). Dla każdego widma minimalna rozdzielczość masowa ($m/\Delta m$) dla pików C_4H_5^+ była większa niż 7800. Kalibrację masową wykonano przez wykorzystanie pików H^+ , H_2^+ , CH^+ , C_2H_2^+ i C_4H_4^+ . Wielokrotne i złożone widma TOF- SIMS zarejestrowane dla próbek z białkami zaadsorbowanymi w środowisku o różnym pH zanalizowano za pomocą analizy głównych składników (PCA), która pozwala na pokazanie subtelnych różnic w składzie chemicznym powierzchni poszczególnych próbek.

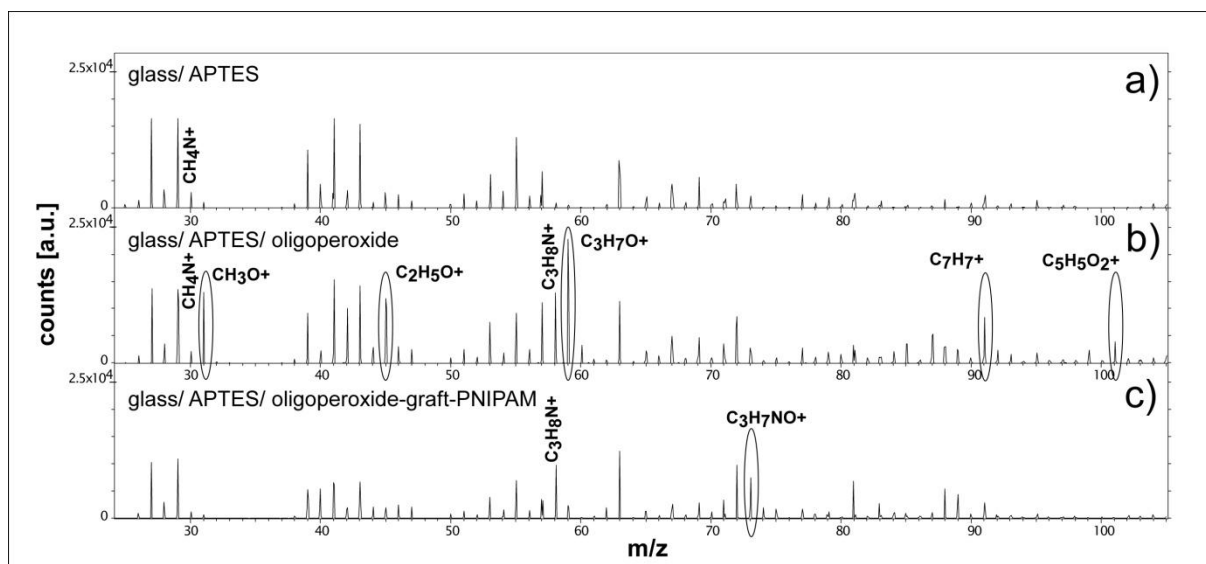
3.1.2.4. Wyniki

Warstwy oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM przyłączone do powierzchni szkła wytworzono w trójstopniowym procesie. W pierwszym etapie natywną powierzchnię szkła zmodyfikowano APTES- em. Następnie doczepiono oligoperoksydy wykorzystując oddziaływanie grup aminowych w warstwie APTES- u z fragmentami tetrachloro- anhydrytu kwasu piromelitowego, znajdującymi się w molekułach oligoperoksydów. W trzecim kroku wytworzono szczotki PNIPAM stosując metodę polimeryzacji „z powierzchni” warstwy oligoperoksydów.

Wielowarstwowa struktura pokryw oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM oraz wpływ temperatury i pH na ich zwilżalność, jak również adsorpcja białek do tych pokryw w funkcji pH i temperatury są opisane poniżej.

3.1.2.4.1. Struktura i własności warstw oligoperoksydów- *graft*- PNIPAM.

Wielowarstwowa struktura (TOF- SIMS). W trójstopniowym procesie wytworzono cienkie wielowarstwowe układy zbudowane ze szkła/ APTES- u/ oligoperoksydu- *graft*- PNIPAM. Aby potwierdzić tę wielowarstwową strukturę wykonano pomiary przy użyciu TOF- SIMS. Spektrometr masowy jonów wtórnych pracował w trybie statycznym, który charakteryzuje wysoka czułość analizy chemicznej (rozdzielczość masowa $m/\Delta m > 7800$) oraz głębokością próbkowania mniejszą niż 2 nm. Reprezentatywne widmo jonów dodatnich TOF- SIMS zarejestrowane dla powierzchni próbek po każdym z trzech kroków produkcji szczotek PNIPAM jest pokazane na rysunku 3.12. Obecność warstwy APTES- u (grubość warstwy $\sim 0,5$ nm wyznaczona elipsometrem we Lwowie) jest potwierdzona licznymi sygnałami pochodzącymi od węglowodorowych fragmentów oraz słabym, ale charakterystycznym pikiem CH_4N^+ . Przyczepienie łańcuchów oligoperoksydów (grubość warstwy 1 nm w danych warunkach) do powierzchni szkła pokrytego APTES- em skutkowało pojawieniem się dodatkowych pików (zaznaczone elipsami na rysunku 3.12 b), które odpowiadają fragmentom łańcuchów oligoperoksydów zawierającym tlen (CH_3O^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}^+$ i $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2^+$) oraz sygnał charakterystyczny dla kwasu piromelitowego C_7H_7^+ . Oprócz sygnału CH_4N^+ widoczny jest pik $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ potwierdzający przyczepienie oligoperoksydów do APTES- u. Również polimeryzacja PNIPAM- u „z powierzchni” oligoperoksydów jest potwierdzona pomiarami TOF- SIMS (rysunek 3.12 c), grubość warstwy w stanie uwodnionym wynosi > 25 nm. Jony wtórne zawierające tlen znikają (porównaj rysunek 3.12 b) ponieważ oligoperoksydy znajdują się poniżej głębokości próbkowania. Na widmach widoczne są silne piki charakterystyczne dla PNIPAM- u³²⁻³³ tj. $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ (izopropyl i NH) oraz $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}^+$ (część izopropylowa i amidowa).

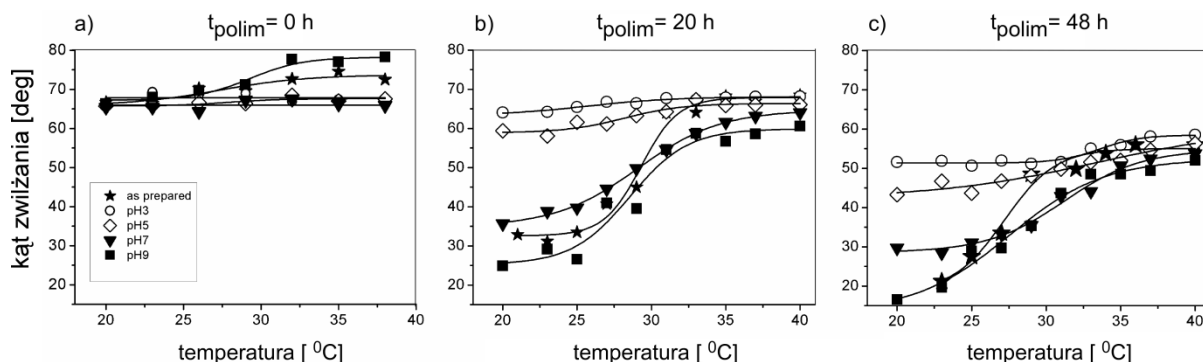


Rysunek 3. 12 Reprezentatywne widma masowe TOF- SIMS powierzchni szkła zmodyfikowanej APTES- em (a), po przyczepieniu oligoperoksydów (24 h) (b) i po 20 h polimeryzacji PNIPAM- u (c). Sygnały charakterystyczne dla kolejnych warstw oznaczono elipsami.

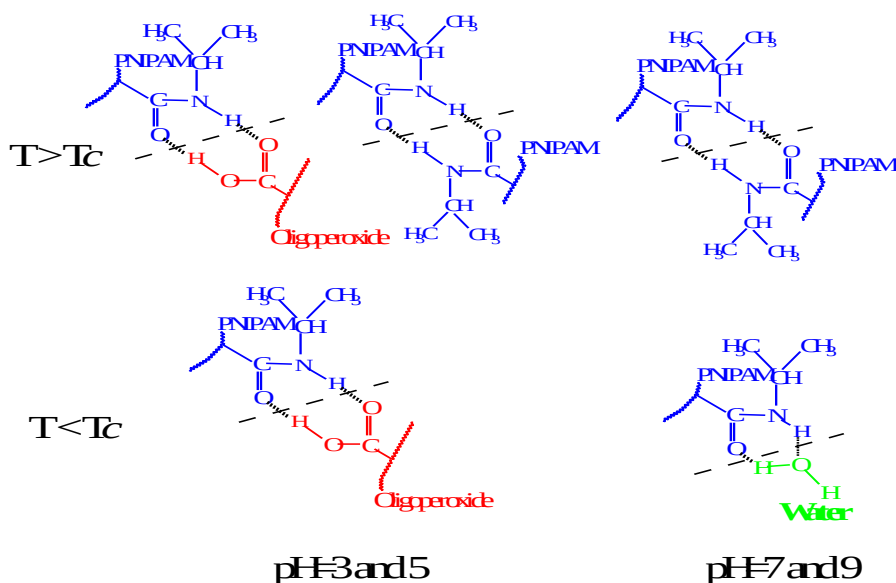
3.1.2.4.2. Temperaturowo i pH zależna odpowiedź szczotek PNIPAM

Reakcja zwilżalności modyfikowanej pH na zmianę temperatury (CA). Wykonano pomiary kąta zwilżania wody pokryć oligoperoksyd- *graft*-PNIPAM (dla różnych czasów polimeryzacji) w warunkach różnego pH, których wyniki porównano z wartościami kąta zwilżania próbki referencyjnej (rysunek 3.13). Jako referencji użyto pokryć PNIPAM- u bezpośrednio po ich utworzeniu. Zarówno pomiary kąta zwilżania w funkcji temperatury wykonane dla próbek referencyjnych, jak i próbek poddanych działaniu buforu o pH od 3 do 9, pokazują dużą czułość pokryć oligoperoksyd- *graft*-PNIPAM wytworzonych dla 20 i 48 h polimeryzacji N- izopropylakrylamidu (odpowiednio rysunek 3.13 b, c). Z kolei wyniki przedstawione na rysunku 3.13 a pokazują, że nie zaobserwowano żadnego wpływu pH na zwilżalność warstwy oligoperoksydów przyczepionych do szkła za pośrednictwem APTES- u (czas polimeryzacji PNIPAM- u 0 h). Wnikliwa analiza zmian kąta zwilżania w funkcji temperatury dla pokryć o zerowym czasie polimeryzacji PNIPAM- u (rysunek 3.13 a) ujawnia zmiany wartości kąta zwilżania (jednak niewiele wyższe od wartości niepewności pomiarowych) dla próbki referencyjnej (rysunek 3.13 a, ★) oraz dla tego pokrycia eksponowanego na roztwór pH 9, ale nie wykazuje podobnych zmian dla pomiarów wykonanych w pH 3, 5 i 7 (rysunek 3.13 a, ○, ◇, ▼). Ta (bardzo słaba) odpowiedź na działanie roztworu o pH 9 na bardzo cienką (<1,5 nm) warstwę oligoperoksydów może odzwierciedlać różnicę w temperaturowo- indukowanym obniżeniu powinowactwa do wody warstwy zawierającej protonowane (niskie pH) lub deprotonowane (wysokie pH) grupy karboksylowe.²⁶

Reakcja zwilżalności na zmianę temperatury przedstawiona na wykresie 3.12 b, c dla szczotek PNIPAM po 20 i 48 h polimeryzacji w pH 9 i 7 (■, ▼, odpowiednio) jest zgodna z odpowiedzią próbek referencyjnych (★). To zachowanie może tłumaczyć powstawanie między hydrofilowymi grupami amidowymi (H-N-C=O) fragmentów PNIPAM- u a cząsteczkami wody wiązań wodorowych, które dominują w niższych temperaturach, ale powyżej temperatury przejścia T_c są zastępowane przez wiązania wodorowe między grupami amidowymi łańcuchów PNIPAM (rysunek 3.13).^{11, 17} To wywołuje zmianę struktury PNIPAM- u z hydrofilowych luźnych kłębków do hydrofobowych zwiniętych łańcuchów (globulek). Temperatura przejścia z fazy hydrofilowej do hydrofobowej jest dolną krytyczną temperaturą rozpuszczania LCST dla układu PNIPAM- woda. Podczas gdy same łańcuchy PNIPAM nie są czułe na działanie roztworów o różnych pH^{19, 26} pokrycia oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM charakteryzują się silną wrażliwością na zmianę pH. Kiedy zmieniają się warunki środowiska z zasadowych na kwaśne (pH 5 i 3), temperaturowa odpowiedź zwilżalności jest nieznaczna lub nieobserwowalna ponieważ szczotki PNIPAM- u polimeryzowane z oligoperoksydów stają się hydrofobowe w całym zakresie temperatur (○ i ◇; rysunek 3.13 b, c). Musi to być spowodowane procesem (aktywnym w niskim pH), który uniemożliwia dostęp cząsteczkom wody do PNIPAM- u, a więc blokuje wiązanie się wody z grupami amidowymi. Często za ten proces odpowiadają konkurencyjne wiązania wodorowe grup amidowych¹¹ (lub innych struktur odpowiedzialnych za reakcje temperaturowe²⁷) i grup COOH różnych segmentów¹⁷, bloków^{11, 26}, łańcuchów¹⁹ lub warstw²⁷ (rysunek 3.14). Takie wiązania są naruszane w wyższych pH ponieważ grupy karboksylowe ulegają jonizacji. Ponieważ grupy karboksylowe znajdują się w oligoperoksydach, można zaproponować, że to one odpowiadają za reakcje zsyntetyzowanych pokryć na zmiany zarówno temperatury jak i pH, co jest silnie widoczne w wynikach zebranych na rysunku 3.13.



Rysunek 3. 13 Temperaturowa zależność kątów zwilżania wody, wyznaczona na pokryciach oligoperoksydy- *graft*- PNIPAM po 0 (a), 20 (b) i 48 h(c) polimeryzacji PNIPAM- u bezpośrednio po utworzeniu (syntezie) (★) oraz w warunkach pH 3 (○), 5 (◊), 7 (▼) i 9 (■). Linie ciągłe wygenerowane przez funkcję sigmoidalną.

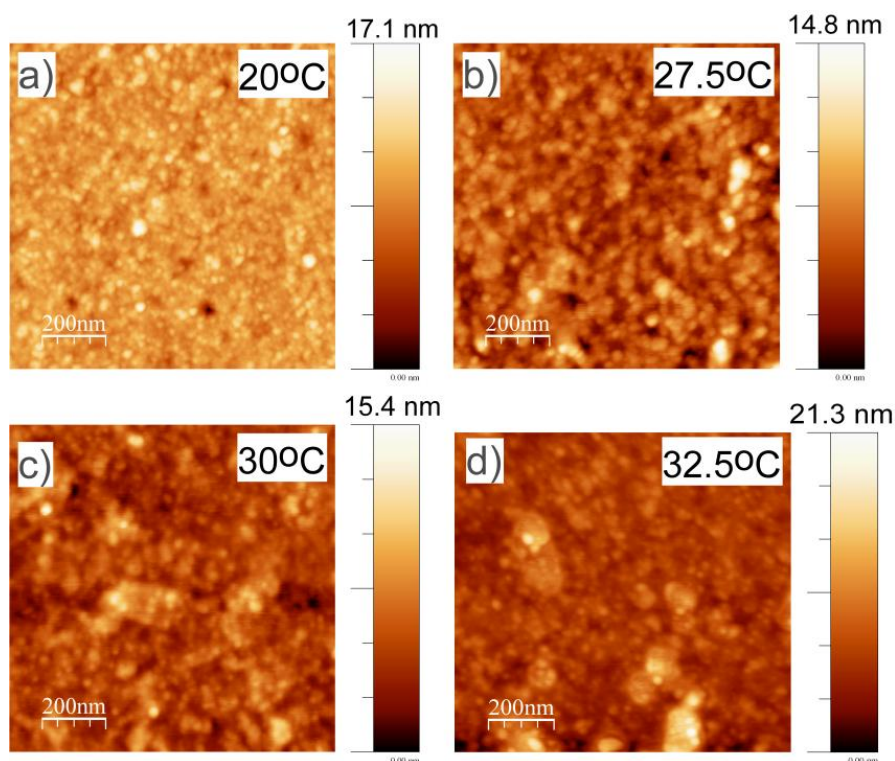


Rysunek 3. 14 Schemat hipotetycznych konformacji wiązań wodorowych między grupami amidowymi szczotek PNIPAM- u, a grupami karboksylowymi oligoperoksydu i cząsteczek wody zarówno w różnych temperaturach jak i pH.

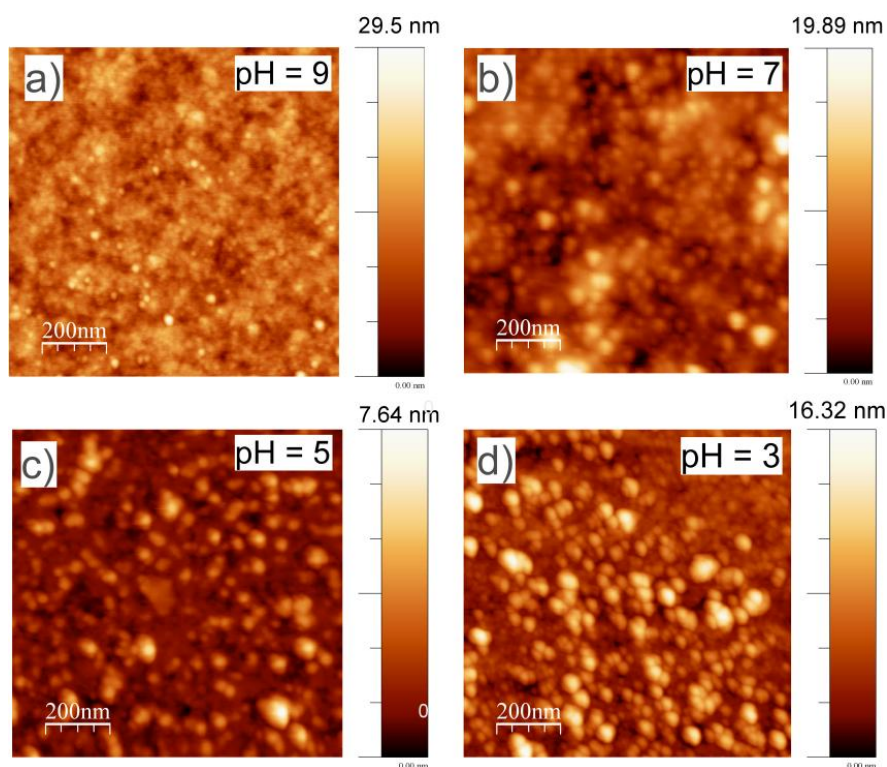
Zmiana morfologii warstwy oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM pod wpływem temperatury i pH (AFM).

Aby zbadać wpływ obu czynników: temperatury i pH na morfologię szczotek PNIPAM- u wykonano dwie serie pomiarów AFM pod kątem przejścia ze stanu uwodnionego do stanu hydrofobowego wywołanego zmianą temperatury (w niezmiennym pH) oraz zmianą pH (dla $T = \text{const}$, $T < T_{\text{LCST}} = 29^\circ\text{C}$). Wyniki przedstawione na rysunku 3.15 zarejestrowano dla warstw PNIPAM- u polimeryzowanego przez 20 h. Próbkę zanurzono w roztworze o pH 9 i osuszono przed pomiarami AFM. Obrazy powierzchni zarejestrowano kolejno w temperaturach 20,0; 27,5; 30,0; 32,5 $^\circ\text{C}$. Wraz ze wzrostem temperatury powierzchnia szczotek PNIPAM- u staje się zarówno bardziej chropowata jak i bardziej ustrukturyzowana z bardziej widocznymi wysokimi wyspami podobnymi strukturami. Aby w ilościowy sposób określić te zmiany użyto dwóch parametrów określających chropowatość (RMS) i skośność (SK) dystrybucji wysokości w obrazach AFM, które są miarą odpowiednio rozpiętości i asymetrii. Amplituda oscylacji wysokości jest odwzorowana wartościami RMS wynoszącymi 1,2; 1,7; 1,5 i 2,0 nm dla czterech kolejnych temperatur. Natomiast wyspy charakter jest wyrażony wartościami skośności wynoszącymi 0,30 (20,0 $^\circ\text{C}$); 0,60 (27,5 $^\circ\text{C}$); 0,75 (30,0 $^\circ\text{C}$) i 1,40 (32,5 $^\circ\text{C}$). Te zmiany morfologiczne obserwowane są w wyniku przejścia fazowego PNIPAM- u, czyli zmiany ułożenia

łańcuchów z rozwiniętych kłębków, tworzących relatywnie jednorodną powierzchnię do globulek tworzących widoczne agregaty.



Rysunek 3. 15 Obrazy AFM topografii powierzchni oligoperoxydów szczepionych z PNIPAM- em (po 20 h polimeryzacji PNIPAM- u) eksponowane w buforze o pH 9, wysuszone przed pomiarami, zarejestrowane w temperaturach 20,0 (a); 27,5 (b), 30 (c) i 32,5 °C (d).



Rysunek 3. 16 Obrazy AFM topografii powierzchni oligoperoxydów szczepionych z PNIPAM- em (po 48 h polimeryzacji PNIPAM- u) zarejestrowane w temperaturze 22 °C po zanurzeniu w buforach o pH wynoszącym 9 (a); 7 (b), 5 (c) i 3(d).

Wpływ przejścia ze stanu uwodnionego do hydrofobowego indukowanego zmianą pH środowiska jest pokazany na rysunku 3.16. Obrazy warstw szczotek PNIPAM (otrzymanych po 48 h polimeryzacji) zarejestrowano w temperaturze 22 °C po ekspozycji pokryw na działanie buforów o malejącym pH od 9 przez 7,4; 5 aż do pH= 3.

Podobnie jak poprzednio relatywnie płaska powierzchnia staje się bardziej chropowata, widoczne są struktury w kształcie wysp. Tę obserwację odzwierciedlają wartości parametrów opisujących cechy obrazów AFM tj. RMS wynoszący 0,7 (pH 9); 2,3 (pH 7); 3,1 (pH 5); 2,4 nm (pH 3) oraz SK o wartościach 0,2 (pH 9); 0,6 (pH 7); 1,5 (pH 5); 1,2 (pH 3). Na rysunku 3.16 pokazana jest zmiana morfologii od relatywnie jednorodnej powierzchni szczotek do agregatów zwiniętych łańcuchów i jest ona bardziej zaakcentowana niż w wyżej omówionym przypadku. Może to wynikać z rodzaju bodźca wywołującego przejście oraz od charakterystyki przejścia jak również z dłuższego czasu polimeryzacji PNIPAM- u (48 zamiast 20 h), a więc większego pokrycia powierzchni molekułami PNIPAM.

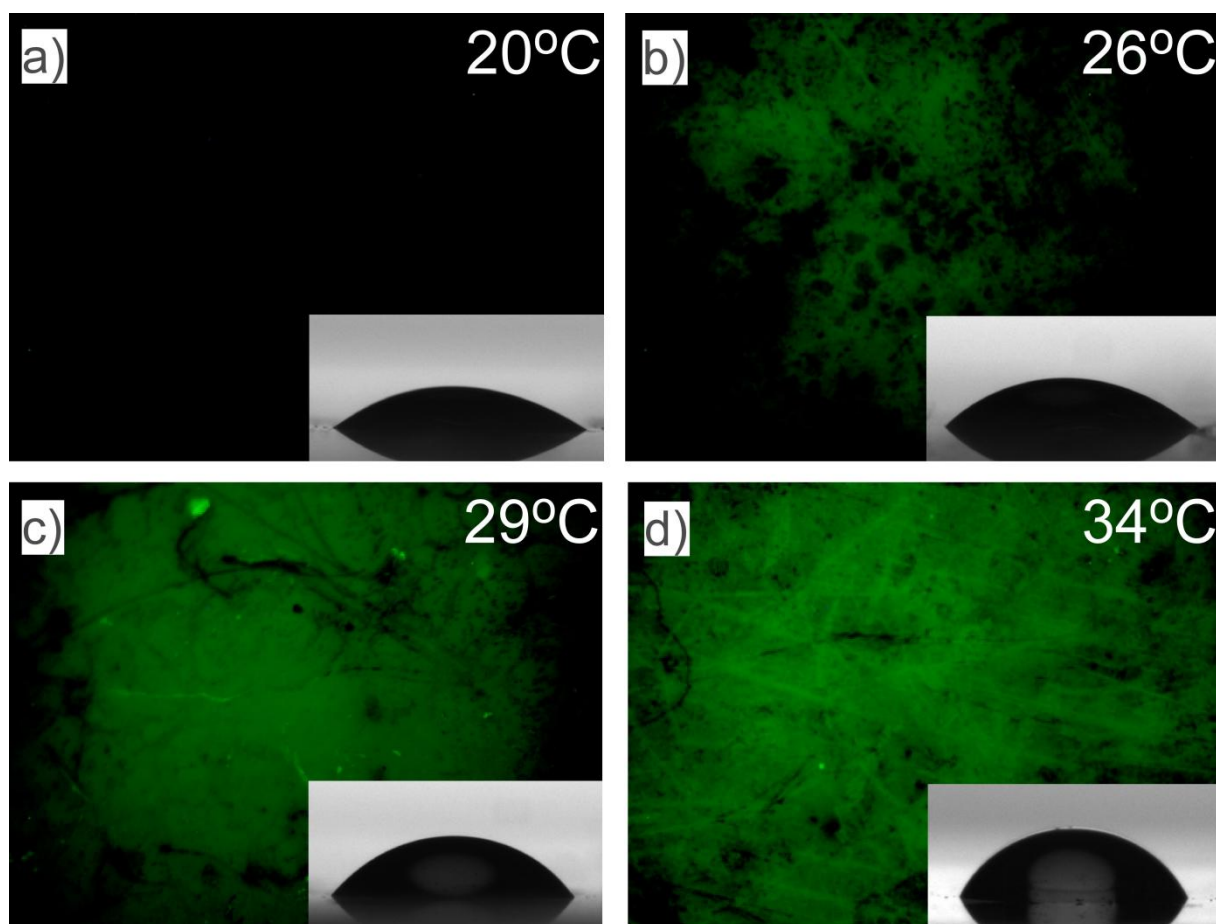
3.1.4.3. Kontrola za pomocą temperatury i pH adsorpcji białka do polimerowych pokryw „inteligentnych”

Aby zbadać adsorpcję białek ²⁸ do przygotowanych pokryw użyto modelowego białka znakowanego fluorescencyjnie izotiocyanianem fluoresceiny, lektyny soczewicy (LcH- FITC). Lektyny są białkami wiążącymi się specyficznie z węglowodanami ²⁹, w szczególności z α -D-mannozą występującą na powierzchniach komórek. ^{30, 31} Mogą identyfikować komórki posiadające receptory mannozy, wywołując ich adhezję lub stymulować reakcje biologiczne. ³² W związku z tym kontrola adsorpcji lektyny do pokryw „inteligentnych” może umożliwić zainicjowanie kilku procesów biologicznych na takich powierzchniach oraz ich kontrolę.

Adsorpcja białek zależy nie tylko od specyfiki podłoża, tutaj modyfikowanego przez zmianę temperatury lub pH, ale również od własności białek, których struktura również może być zmieniona przez działanie czynników zewnętrznych. ²⁸ Jednakże w przeciwieństwie do innych lektyn ³³ dla wybranego białka LcH nie zaobserwowano wcześniej żadnych znaczących zmian w strukturze czwartorzędowej (dimer) ³³ ani też w drugorzędowej (stworzonej głównie przez β - harmonijki) ^{34, 35} w zastosowanym przedziale temperatur i pH. Jedynie zaobserwowano niewielki stopień zmiany struktury trzeciorzędowej na bardziej zwartą w środowisku o pH 7,5 w porównaniu do pH 5 czy 10. ^{36, 34} Wcześniejsze badania pokazują niewielki wzrost adsorpcji białka w punkcie izoelektrycznym ²⁸ ($pI_{LcH} = 8$ ³⁷), ale dowiedziono również niewielki wpływ oddziaływań elektrostatycznych na adsorpcję LcH. ³⁷

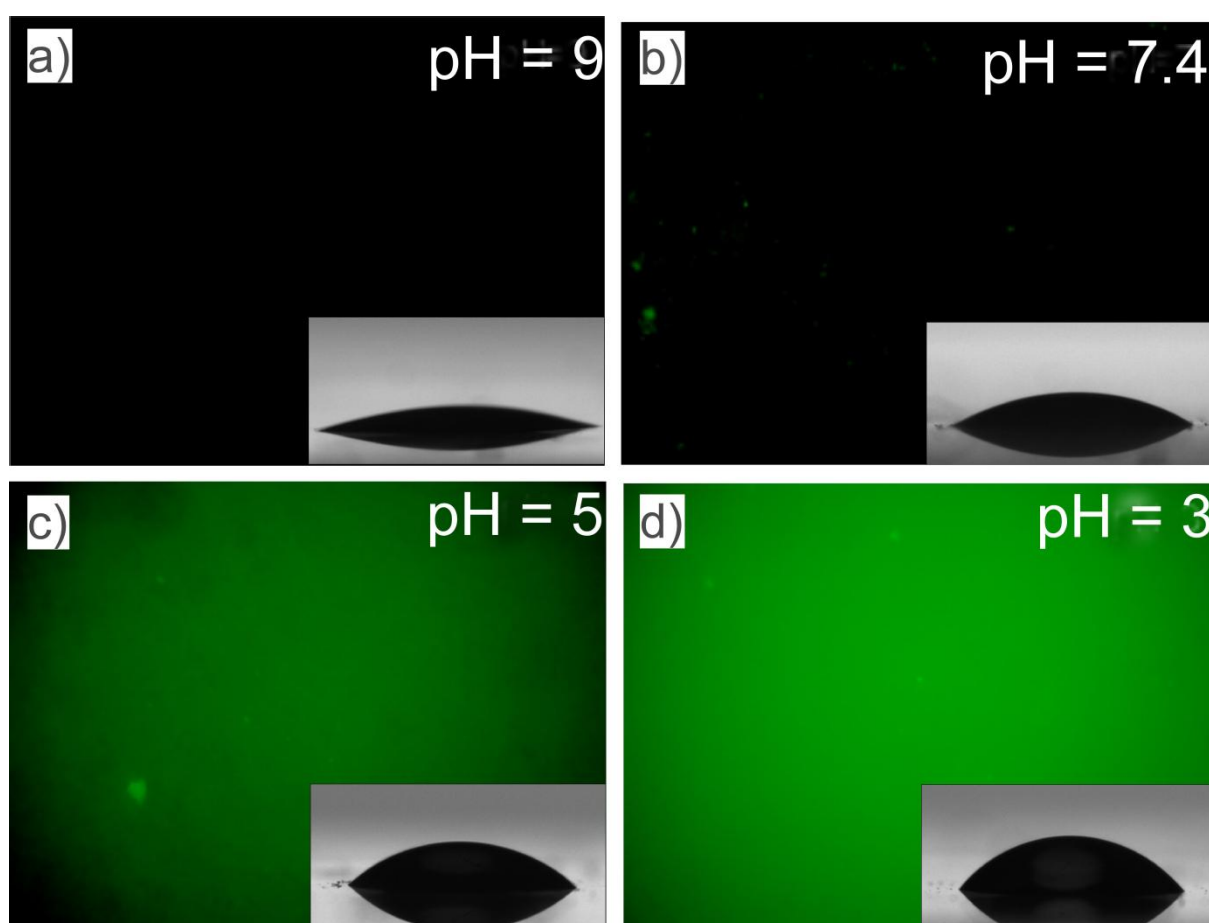
Temperaturowa i pH zależna adsorpcja białka znakowanego fluorescencyjnie do pokryw „inteligentnych” PNIPAM. Szczególnie interesującym zagadnieniem jak adsorpcja białek reaguje na wpływ przejścia konformacyjnego szczotek PNIPAM- u z hydrofilowych rozwiniętych kłębków do hydrofobowych globulek wywołane albo zmianą temperatury (w środowisku o stałym pH o wysokiej wartości) albo przez ekspozycję na bufor o różnym pH (ale stałej temperaturze o wartości mniejszej od dolnej krytycznej temperatury rozpuszczania LCST PNIPAM- u). Ponieważ pokrycia PNIPAM- u reagują zarówno na zmiany temperatury jak i pH wykonano dwie serie pomiarów.

Wyniki powyższej serii eksperymentów adsorpcji białka w postaci reprezentatywnych obrazów fluorescencyjnych przedstawione są na rysunku 3.17. Pokazują one adsorpcję znakowanej izotiocyjanianem fluoresceiny lektyny soczewicy do pokryw PNIPAM- u (polimeryzowanego przez 24 h „z powierzchni” oligoperoksydów) w temperaturach 20 (rysunek 3.17 a), 26 (rysunek 3.17 b), 29 (rysunek 3.17 c) i 34 °C (rysunek 3.17 d) przy stałym pH 9. W każdym przypadku niezaadsorbowane białka zostały usunięte przez ostrożne spłukanie próbek buforem. Po wysuszeniu próbek wykonano zdjęcia fluorescencyjne, na których zaobserwowano istotną różnicę stopnia pokrycia powierzchni białkami. W temperaturze 20 °C nie zaobserwowano adsorpcji, umiarkowaną adsorpcję lektyny zaobserwowano w 26 °C, natomiast w temperaturze 29 i 34 °C widoczna jest silna adsorpcja LcH. Aby ilościowo opisać adsorpcję LcH do pokryw PNIPAM- u użyto metody geometrii całkowitej, a więc wyznaczono średnie wartości znormalizowanego natężenia fluorescencji. Otrzymane wyniki pokazują, że adsorpcja LcH do szczotek PNIPAM- u może być opisana wartościami $0,01 \pm 0,01$ (20 °C); $0,10 \pm 0,01$ (26 °C); $0,21 \pm 0,01$ (29 °C) i $0,21 \pm 0,01$ (34 °C). To pozwala wnioskować o zmieniającym się hydrofobowym charakterze pokryw PNIPAM- u polimeryzowanych „z powierzchni” oligoperoksydów w temperaturze nieco poniżej dolnej krytycznej temperatury rozpuszczania, wynoszącej 29 °C, co dodatkowo potwierdzone jest przez zdjęcia kropeł wody umieszczonych na tym pokryciu w ustalonych warunkach temperatury i pH (rysunek 3.17 a-d, w prawych dolnych rogach)



Rysunek 3. 17 Reprezentatywne fluorescencyjne obrazy białka LcH zaadsorbowanego do pokryw „inteligentnych” PNIPAM (polimeryzowanych przez 24 h „z powierzchni” oligoperoksydów) przy stałym pH wynoszącym 9, a w różnych temperaturach 20 (a), 26 (b), 29 (c) i 34 °C (d). Rozmiar obrazów wynosi 437,7 μm x 329,6 μm . W prawych dolnych rogach obrazy kropeł wody położonych na powierzchni szczotek w danych warunkach.

Wyniki pokazujące wpływ różnego pH na adsorpcję lektyny są zaprezentowane na rysunku 3.18. Fluorescencyjne obrazy zarejestrowano po ekspozycji pokryw „inteligentnych” PNIPAM (uzyskanych po czasie polimeryzacji wynoszącym 48 h) na bufor o pH równym 9 (rysunek 3.18 a), 7,4 (rysunek 3.18 b), 5 (rysunek 3.18 c) i 3 (rysunek 3.18 d), a następnie na roztwory białka o odpowiadającym pH. Te eksperymenty przeprowadzono w takich samych warunkach tj. w stałej temperaturze 22 °C, użyto roztworów białek o takiej samej koncentracji, dla których zastosowano identyczny czas inkubacji. Zaobserwowano radykalną zmianę adsorpcji białka od śladowej, ledwie widocznej dla pH 9 i 7,4 do silniejszej dla pH 5 i bardzo mocnej dla pH 3. Średnie wartości znormalizowanego natężenia fluorescencji $\langle I \rangle$ wyznaczone metodą geometrii całkowitej pokazują, że adsorpcja LcH może być wyrażona wartościami $0,01 \pm 0,01$ (pH 9); $0,01 \pm 0,01$ (pH 7,4); $0,32 \pm 0,01$ (pH 5) i $0,38 \pm 0,01$ (pH 3). Modyfikacja adsorpcji białka zachodzi razem ze zmianą zwilżalności pokryw PNIPAM- u polimeryzowanego „z powierzchni” oligoperoksydów dla pH ~ 6 , co jest potwierdzone przez zdjęcia kropeł wody umieszczone w prawych dolnych rogach paneli rysunku 3.18.



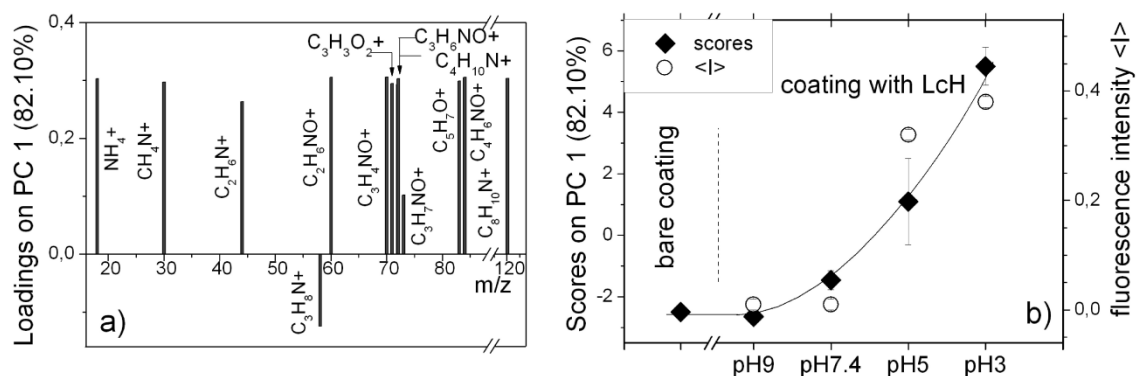
Rysunek 3. 18 Reprezentatywne fluorescencyjne obrazy lektyny LcH zaadsorbowanej do pokryw „inteligentnych” PNIPAM-u (polimeryzowanego przez 48 h „z powierzchni” oligoperoksydów) w temperaturze 22 °C, a w różnych pH 9(a), 7,4 (b), 5 (c) i 3 (d). Rozmiar obrazów wynosi 437,7 μm x 329,6 μm . W prawych dolnych rogach obrazy kropeł wody położonych na powierzchni szczotek w danych warunkach.

Reakcja adsorpcji białka na zmiany pH (TOF-SIMS). Analiza obrazów fluorescencyjnych lektyn, których adsorpcja była kontrolowana przez zmianę temperatury lub pH, umożliwiła określenie względnej ilości zaadsorbowanego białka. Adsorpcja LcH jest bardzo słaba dla pokryw PNIPAM- u w stanie hydrofilowym, który obserwowany jest w warunkach obniżania temperatury w środowisku zasadowym (pH 9) lub dla wzrostu pH w temperaturze pokojowej. Trudność analizy porównawczej

obrazów fluorescencyjnych, wynikająca z konieczności dostrojenia warunków rejestracji zdjęć do próbek o wysokiej intensywności^{38, 39}, nie pozwala na jednoznaczne stwierdzenie braku adsorpcji białka w temperaturze pokojowej i wysokim pH. Aby odróżnić pokrycia nieadsorbujące białek od tych z niewielką ilością zaadsorbowanego białka użyto spektroskopii masowej jonów wtórnych metodą czasu przelotu TOF- SIMS ze względu na jej wysoką czułość na skład chemiczny podłoża.^{40,41,42-44} Do otrzymanych wyników TOF- SIMS zastosowano analizę głównych składników (*Principal Component Analysis*), która pozwala na wyodrębnienie nawet subtelnych różnic w składzie chemicznym próbki.^{41, 43-46}

Wpływ temperatury na adsorpcję białek do pokryć PNIPAM był już badany techniką TOF- SIMS^{40, 42, 47} a analiza głównych składników przeprowadzona dla tych pomiarów wykazała, że poniżej temperatury przejścia T_c nie obserwuje się adsorpcji białek.^{41, 47} Jak dotąd nie przeprowadzono podobnej analizy dla adsorpcji lektyn kontrolowanej zmianą pH.

Pokrycia PNIPAM- u polimeryzowane „z powierzchni” oligoperoksydów zbadano techniką TOF- SIMS przed jak i po przeprowadzeniu eksperymentów adsorpcji białek w warunkach stałej temperatury wynoszącej 22 °C i pH o wartościach 9; 7,4; 5 i 3. Dla każdej z pięciu próbek serii zarejestrowano dwa widma masowe jonów dodatnich. Z palety pików wybrano dwa charakterystyczne dla PNIPAM- u, tj. sygnały $C_3H_8N^+$ i $C_3H_7NO^+$, oraz jedenaście sygnałów charakterystycznych dla lektyny. Sygnały wybrane z widma masowego odpowiadają fragmentom najliczniejszych aminokwasów⁴⁵ budujących LcH⁴⁸ i są to $C_8H_{10}N^+$ (Phe), $C_5H_7O^+$ (Val), $C_4H_6NO^+$ (Gln), $C_4H_{10}N^+$ (Val), $C_3H_6NO^+$ (Thr), $C_3H_3O_2^+$ (Ser), $C_3H_4NO^+$ (Asn), $C_2H_6NO^+$ (Ser), $C_2H_6N^+$ (Ala), CH_4N^+ (Gly) i NH_4^+ . Relatywne intensywności tych 13 sygnałów otrzymanych z 10 widm TOF- SIMS tworzą olbrzymi zbiór danych, które można sobie wyobrazić jako 10 punktów w przestrzeni 13- dim.⁴⁵ Analiza PCA pozwoliła określić główne kierunki nieskorelowanych głównych zmian tego zestawu danych tzw. składników głównych PC. Pierwszy składnik PC1 pokrywa 82,1 % całkowitej wariancji danych. Związek między PC1, a oryginalnymi pikami TOF-SIMS (13 pikami), pokazano na rysunku 3.19. PC1 jest zdominowane pozytywnymi ‘wkładami’ odpowiadającymi sygnałom pochodzącym od białka LcH, podczas gdy jedyny negatywny udział pików od grupy $C_3H_8N^+$ jest charakterystyczny dla pokrycia oligoperoksyd-*graft*-PNIPAM. Taka struktura wykresu ‘wkładów’ pików do PC1 pokazuje, że składowa PC1 jest właściwą zmienną do porównywania próbek o różnym stopniu pokrycia białkami. (Natomiast PC1 wraz z PC2, rozdzielają wszystkie wyniki TOF- SIMS na pięć grup, odpowiadających pięciu próbkom serii, patrz rysunek 3.20 w suplemencie).



Rysunek 3. 19 Analiza PCA widm masowych TOF- SIMS zarejestrowanych dla pokryw oligoperoksyd-*graft*-PNIPAM zarejestrowanych przed i po adsorpcji białka LcH w pH 9; 7,4; 5 oraz 3 ($T = 22^\circ\text{C}$). (a) Wykres wiążący pierwszy składnik główny PC1 z charakterystycznymi pikami TOF- SIMS. (b) Średnie wartości składu PC1, wartości średnie z dwóch pomiarów dla każdej z 5 próbek (pełne diamenty, lewa skala) porównane ze średnimi wartościami natężenia fluorescencji <I> (otwarte koła, prawa skala).

Na rysunku 3.19 (prawy panel) pokazano ‘średnie wartości składu’ PC1 (wypełnione diamenty), które odwzorowują adsorpcję LcH do pokryw oligoperoksydów-*graft*-PNIPAM, wcześniej wyznaczoną pół- ilościowo na podstawie zdjęć fluorescencyjnych (intensywność fluorescencji <I> zaznaczona jako otwarte koła). Adsorpcja białek jest dokładniej scharakteryzowana analizą PCA 13 sygnałów TOF- SIMS, ale zgadza się z oceną dokonaną na podstawie analizy intensywności fluorescencji. Podejście PCA pozwala również na porównanie wyników otrzymanych dla czystych pokryw PNIPAM z wynikami zarejestrowanymi po adsorpcji w pH 9 i $T = 22^\circ\text{C}$ (rysunek 3.18, prawy panel). To porównanie pozwala stwierdzić, że nie zaobserwowano mierzalnych ilości zaadsorbowanego białka do pokryw PNIPAM w stanie hydrofilowym.

3.1.2.5. Podsumowanie i wnioski

Przygotowano pokrycia PNIPAM przez polimeryzację „z powierzchni” oligoperoksydów metodą, która może być zastosowana do substratów innych niż użyte tutaj szkło.

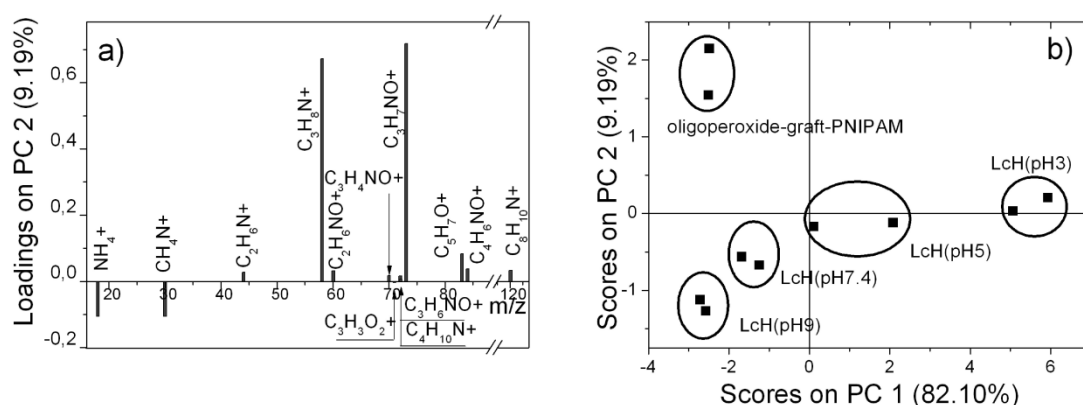
Wielowarstwowa struktura pokryw, szkło/ APTES/ oligoperoksyd- *graft*- PNIPAM została potwierdzona przez analizę danych otrzymanych z pomiarów statycznych TOF- SIMS, wykonanych po każdym etapie produkcji. Pomiar kąta zwilżania potwierdził wzbudzone temperaturą obniżenie zwilżalności powierzchni o 10 i 30 stopni dla pokryw otrzymanych po 2 i 20 h polimeryzacji. To odpowiada „mozaikowej” strukturze Cassiego PNIPAM- u na powierzchni, dla którego efektywny stopień pokrycia wynosi 25 % i 85 %. Wysoce czuła na zmiany temperatury zwilżalność przygotowanych pokryw PNIPAM pozwala wnioskować ich potencjalne zastosowanie w biomedycynie.⁴⁰

Termiczna odpowiedź zwilżalności, silnie zaznaczona w $T_c = 27- 30^\circ\text{C}$, była wyraźna dla pH 9 i 7, gdy następowało przejście konformacyjne szcetek PNIPAM- u z hydrofilowych rozwiniętych kłębków do hydrofobowych globulek, natomiast była nieznaczna i nie występowała odpowiednio dla pH 5 i 3, ze względu na wyłącznie hydrofobowy charakter powierzchni w całym przedziale temperatur. Ponieważ same łańcuchy PNIPAM- u nie są czułe na działanie różnego pH^{19, 26} można sądzić, że za te zmiany odpowiedzialne są oligoperoksydy. Przejściu ze stanu hydrofilowego do

hydrofobowego wywołanemu przez podniesienie temperatury przy zachowaniu stałego pH lub przez obniżenie pH ale przy stałej temperaturze (niższej niż T_c) towarzyszy zmiana morfologii powierzchni pokryć na bardziej chropowatą o widocznych agregatach zwiniętych łańcuchów.

Wrażliwość na bodźce pokryć PNIPAM wykorzystano do przeprowadzenia kontrolowanej (temperatura, pH) adsorpcji białka znakowanego izotiocyanianem fluoresceiny. Lektyna soczewicy, której użyto jako białka modelowego, może rozpoznawać komórki posiadające receptory mannozy.³² Zatem zaprezentowane wyniki z zasady mogą posłużyć do eksperymentów kontrolowanej adhezji komórek i do inicjowania odpowiedzi biologicznej. Adsorpcja białek kierowana przez warunki pH została potwierdzona również analizą TOF- SIMS. Analiza głównych składowych przeprowadzona dla wyników TOF-SIMS pozwoliła bardziej precyzyjnie oszacować relatywną ilość zaadsorbowanego białka w porównaniu do pół- ilościowej porównawczej metody fluorescencyjnej. W szczególności jednoznacznie stwierdzono brak adsorpcji do hydrofilowych pokryć PNIPAM- u polimeryzowanego „z powierzchni” oligoperoxydów w temperaturze 22 °C i przy pH 9. Analiza PCA po raz pierwszy została użyta do zbadania reakcji adsorpcji białka na zmiany pH.

3.1.2.6. Supplement



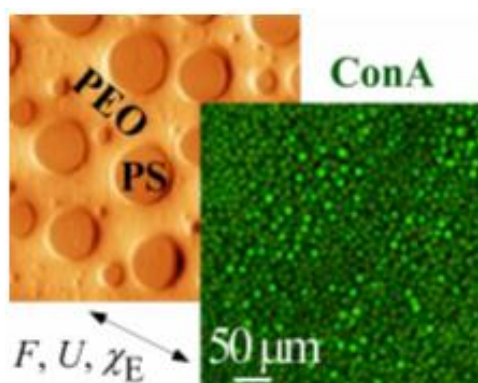
- (8) Zhang, K.; Wu, X. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5281-5291.
- (9) Tian, P.; Wu, Q.; Kun, L. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *108*, 2226–2232.
- (10) Fournier, D.; Hoogenboom, R.; Thijs, H. M. L.; Paulus, R. M.; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2007**, *40*, 915-920.
- (11) Chen, G.H.; Hoffman, A.S. *Nature* **1995**, *373*, 49–52.
- (12) Lee, H.; Pietrasik, J.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2006**, *39*, 3914–3920.
- (13) Zhang, J.; Peppas, N. A. *Macromolecules* **2000**, *33*, 102-107.
- (14) Garcia, A.; Marquez, M.; Cai, T.; Rosario, R.; Hu, Z. B.; Gust, D. *Langmuir* **2007**, *23*, 224–229.
- (15) Fakhruddin, R. F.; Zamaleeva, A. I.; Morozov, M. V.; Tazetdinova, D. I.; Alimova, F. K.; Hilmutdinov, A. K.; Zhdanov, R. I.; Kahraman, M.; Culha, M. *Langmuir* **2009**, *25*, 4628–4634.
- (16) Fakhruddin, R. F.; Paunov, V. N. *Chem. Commun.* **2009**, *18*, 2511–2513.
- (17) Xia, F.; Feng, L.; Wang, S.; Sun, T.; Song, W.; Jiang, W.; Jiang, L. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 432–436.
- (18) Burkert, S.; Bittrich, E.; Kuntzsch, M.; Muller, M.; Eichhorn, K. J.; Bellmann, C.; Uhlmann, P.; Stamm, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 1786–1795.
- (19) Bittrich, E.; Kuntzsch, M.; Eichhorn, K. J.; Uhlmann, P. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2010**, *48*, 1606–1615.
- (20) Medvedevskikh, Y. G.; Voronov, S. A.; Zaikov, G. E. *Conformation of Macromolecules*; Nova: New York, **2007**; 211-241.
- (21) Nosova, N.; Roiter, Y.; Samaryk, V.; Varvarenko, S.; Stetsyshyn, Y.; Minko, S.; Stamm, M.; Voronov, S. *Macromol. Symp.* **2004**, *210*, 339-348.
- (22) Stetsyshyn, Y.; Donchak, V.; Harhay, K.; Voronov, S. *Chemistry and Chemical Technology* **2008**, *2*, 185-189.
- (23) Riddick, J. A.; Bunger, W. B.; Sakano, T. K. *Organic solvents: physical properties and methods of purification*; Wiley: Nowy Jork, **1986**; 1325-1325.
- (24) Milas, N.; Surgenor, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 205-208.
- (25) Bayer, O.; Houben, J.; Muller, E. *Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)*; G. Thieme: Sztuttgart, **1952**; 8, 464-483.
- (26) Rahane, S. B.; Floyd, J. A.; Metters, A. T.; Kilbey, S. M. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1232–1240.
- (27) Tan, W. S.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F.; Sukhishvili, S. A. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1950-1957.
- (28) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. *Advan. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87–106.
- (29) Sharon, N.; Lis, H. *Science* **1989**, *246*, 227-246.
- (30) Loris, R.; Wyns, L. *Glycoconj. J.* **1994**, *11*, 507-517.
- (31) Salisbury, J. G.; Banga, J.P. *Thymus*. **1985**, *7*, 335-344.
- (32) Drickamer, K.; Taylor, M. E. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1993**, *9*, 237-264.
- (33) Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1383*, 9–36.
- (34) Marcos, M. J.; Chehin, R.; Arrondo, J. L.; Zhdan, G. G.; Villar, E.; Shnyrov, V. L. *FEBS Lett.* **1999**, *443*, 192-196.
- (35) Chehin, R.; Iloro, I.; Marcos, M. J.; Villar, E.; Shnyrov, V. L.; Arrondo, J. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1525-1530.
- (36) Plunkett, K. N.; Zhu, X.; Moore, J. S.; Leckband, D. E. *Langmuir* **2006**, *22*, 4259-4266.
- (37) Ueta, R. R.; Diniz, F. B. *Colloids Surf., B: Biointerfaces* **2008**, *61*, 244–249.
- (38) Zemła, J.; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczowska, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 10253-10258.
- (39) Zemła, J.; Lekka, M.; Raczowska, J.; Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2101–2109.
- (40) Heinz, P.; Bretagnol, F.; Mannelli, I.; Sirghi, L.; Valsesia, A.; Ceccone, G.; Gilliland, D.; Landfester, K.; Rauscher, H.; Rossi, F. *Langmuir* **2008**, *24*, 6166-6175.
- (41) Cole, M. A.; Jasieniak, M.; Thissen, H.; Voelcker, N. H.; Griesser, H. *J. Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6905-6912, 8654-8654.

- (42) Wald, J.; Muller, C.; Wahl, M.; Hoth-Hannig, W.; Hannig, M.; Kopnarski, M.; Ziegler, C. *Phys. Status Solidi A* **2010**, *207*, 831–836.
- (43) Park, J. W.; Cho, I. H.; Moon, D. W.; Paek, S. H.; Lee, T. G. *Surf. Interface Anal.* **2011**, *43*, 285–289.
- (44) Kim, Y. P.; Hong, M. Y.; Shon, H. K.; Moon, D. W.; Kim, H. S.; Lee, T. G. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *252*, 6801–6804.
- (45) Wang, H.; Castner, D. G.; Ratner, B. D.; Jiang, S. *Langmuir* **2004**, *20*, 1877–1887.
- (46) Wagner, M. S.; Castner, D. G. *Langmuir* **2001**, *17*, 4649–4660.
- (47) Cheng, X.; Canavan, H. E.; Graham, D. J.; Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Biointerphases* **2006**, *1*, 61–72.
- (48) Foriers, A.; Lebrun, E.; Rapenbusch, R.; de Neve, R.; Strosberg, A. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 5550–5560.
- (49) Schild, H. G. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17*, 163.

Rozdział 3.2

Selektywna adsorpcja białka do izotropowych wzorów domen polimerów

3.2.1. Adsorpcja białka do domen warstw powstałych dzięki samo-organizacji mieszanin polimerów hydrofobowych i hydrofilowych



3.2.1.1. Abstrakt

Cienkie warstwy o izotropowych powierzchniowych wzorach domen polimerowych zostały użyte jako podłoża do badania selektywnej adsorpcji dwóch białek (Con A i Lch) i do testowania jakości „odtworzenia” wzorów polimerowych przez zaadsorbowane białka. Metodę geometrii całkowitej użyto do ilościowego porównania morfologii domen białkowych (z obrazów fluorescencyjnych) z oryginalnymi izotropowymi wzorami domen polimerów (obrazów AFM), powstałych dzięki samo-organizacji (separacji faz) w czasie osadzania warstw mieszanin polimerów polistyrenu PS/ poli(metakrylanu metylu) PMMA oraz PS/ poli(tlenku etylenu) PEO. Stwierdzono preferencyjną adsorpcję obu lektyn do domen fazowych PMMA, wzmocnioną w obszarze powierzchni międzyfazowych PS/ PMMA. Natomiast dla układu PS/ PEO wnioskuje się wysoce selektywną adsorpcję protein do domen PS.

3.2.1.2. Wprowadzenie

Mikro- macierze białkowe tj. tablice wielu białek rozmieszczonych przestrzennie na bardzo małej powierzchni,¹ mają liczne zastosowania w wielu dziedzinach m. in. w biologii, urządzeniach biomedycznych, technologii biosensorów i w inżynierii tkankowej.²⁻¹⁸ Jest to związane z faktem, że oddziaływania między białkami, przeciwciałami i innymi molekułami odgrywają kluczową rolę w wielu biologicznych procesach: przekazywaniu sygnałów komórkowych, odpowiadają za reakcje układu odpornościowego, adhezję komórek, lub ich rozwój. Mikro- macierze białkowe są narzędziem umożliwiającym jednoczesną charakteryzację roztworów złożonych z wielu składników z uwzględnieniem wielu cech.¹ Może to być przydatne np. w diagnostyce medycznej, ponieważ możliwa jest nie tylko identyfikacja białek, ale również określenie ich ilości, co pozwala prognozować potencjalne choroby lub rozpoznać stopień zaawansowania choroby już trwającej.¹⁵ Mikro- macierze białkowe mogą być również użyte jako podłoża do hodowania komórek, co pozwala na kontrolowanie i obserwowanie oddziaływań komórka- komórka oraz komórka- macierz zewnątrzkomórkowa,^{3,19} a więc umożliwia zrozumienie procesów wzrostu komórki, jej różnicowania się oraz adhezji.¹⁶

Istnieje wiele technik wytwarzania macierzy białkowych.¹⁷ Białka mogą być nadrukowane na dane podłoże²⁰⁻²⁷ lub związane niespecyficznie²⁸ do powierzchni najczęściej polimerowej posiadającej pewien wzór. Powszechnie stosowanymi metodami wytwarzania macierzy proteinowych na powierzchniach polimerowych są: konwencjonalna fotolitografia, elektronolitografia, miękka litografia, pin spotting, oraz techniki mikro przepływowe.^{8, 11-14, 20, 29-38} Jednakże również niekonwencjonalne metody takie jak tworzenie mikro- wzorów białek na wzorach kondensacyjnych⁴ mogą być zaadoptowane do tych celów. Eksperymenty wykonane przez Morina i in.,³⁹ Souse i in.,⁴⁰ jak również Li i in.^{41,42} pokazują, że możliwa jest selektywna adsorpcja białek do rozseparowanych domen faz różnych polimerów. Warstwy mieszanin polimerów są interesujące ze względu na ich różnorodne własności powierzchni (np. hydrofobowość, ładunek), które mogą się zmieniać w skali od tej porównywalnej do pojedynczych molekuł (dziesiątki nanometrów) do tej odpowiadającej całym komórkom (dziesiątki mikrometrów).³⁹⁻⁴⁶

W tej części pracy badana jest selektywna adsorpcja białek do powierzchniowych wzorów polimerowych w kontekście odwzorowania tych wzorów przez zaadsorbowane białka. Wzory polimerowe powstały w procesie samo- organizacji (spontanicznej separacji faz) podczas spin-castingu. Dwie znakowane fluorescencyjnie lektyny: konkanawalinę A i lektynę soczewicy wykorzystano do badania adsorpcji do izotropowych wzorów mieszaniny polimerów PS/ PMMA i PEO/ PS powstałych w procesie samo- organizacji. Podłoża PEO/ PS zostały usieciowane za pomocą promieniowania ultrafioletowego.

Pokazano już, że przestrzenna organizacja zaadsorbowanych białek może być opisana metodą geometrii całkowitej,⁴⁷⁻⁵⁸ przez zastosowanie jej do obrazów fluorescencyjnych. Na podstawie tej analizy otrzymuje się kompletny zestaw miar morfologicznych odzwierciedlających pokrycie, kształt i topologiczną ciągłość domen zaadsorbowanych białek.⁵⁷ Tutaj porównam ilościowo wzory zaadsorbowanych białek, zobrazowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, z oryginalnymi izotropowymi wzorami polimerowymi PS/ PMMA i PEO/ PS, zobrazowanymi mikroskopem sił atomowych, przez zastosowanie tej samej metody.⁵³ Ponieważ w obu przypadkach wytworzono powierzchniowe mikro- wzory polimerów na obszarach makroskopowych, ich miary morfologiczne

(Minkowskiego) wyznaczono na podstawie serii wielu obrazów o różnych rozmiarach wykonanych w różnych rejonach próbek. Porównanie otrzymanych wartości miar morfologicznych umożliwia znalezienie cech wspólnych różnych wzorów powierzchniowych⁵² i pozwala ocenić jakość odtworzenia oryginalnego wzoru.⁵⁴ W innym, stosowanym dotychczas podejściu^{39, 41, 42} wykonywano analizę porównawczą wzorów białek i wzorów polimerów na podstawie pokrywających się obrazów tych samych obszarów próbek.

W moich wcześniejszych badaniach pokazałam na przykładzie pary Con A- karboksypeptydaza Y (Ca Y), że białka zaadsorbowane do powierzchni polimeru zachowują własność specyficznego wiązania lektyna- glikoproteina.⁵⁹

3.2.1.3. Część eksperymentalna

3.2.1.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych.

Do tych badań użyto polistyrenu PS (średnia masa cząsteczkowa $M_w = 64\ 000$, polidispersyjność $M_w/M_n = 1,06$, temperatura zeszklenia $T_g = 100^\circ\text{C}$), PMMA ($M_w = 31\ 000$, $M_w/M_n = 1,03$, $T_g = 105^\circ\text{C}$), PEO ($M_w = 42\ 700$, $M_w/M_n = 1,25$, $T_g = -63^\circ\text{C}$).

Izotropowe wzory polimerowe. Aby przygotować cienkie warstwy izotropowych wzorów polimerowych dwuskładnikowe mieszaniny PS/ PMMA (wagowo 1:2) i PEO/ PS (wagowo 1:1) rozpuszczono odpowiednio w toluenie i w chloroformie, całkowita koncentracja polimerów wynosiła $c_{\text{polimer}} = 40\ \text{mg/mL}$. Roztwory zawierające PEO wzbogacono czynnikiem sieciującym triakrylanem pentaerytrytolu (PETA, $c_{\text{PETA}} = 4\ \text{mg/mL}$). Warstwy polimerowe przygotowano techniką spin-castingu, czyli przez wylanie roztworów na wirujące podłoża SiO_x , przy użyciu spin-coatera KW- 4A (Chemat Technology). Podłoża PS/ PMMA nie poddano dodatkowej obróbce (np. nie zastosowano wygrzewania), natomiast warstwy PEO/ PS zostały dodatkowo usieciowane, stosując standardową procedurę^{60- 62} polegającą na oświetleniu próbek promieniowaniem ultrafioletowym (wysokociśnieniowa lampa Hg, 400 W), aby zapobiec rozpuszczeniu się PEO podczas deponowania białek.

3.2.1.3.2. Charakterystyka powierzchni.

Morfologia powierzchni oraz lateralne uporządkowanie domen w badanych filmach polimerowych zostały scharakteryzowane na podstawie obrazów topograficznych (AFM), obrazów tarcia (LFM) i obrazów fazowych (PDM) zarejestrowanych mikroskopem sił atomowych (The Academia System, Nanonics Imaging Ltd., Izrael) pracującym w modzie kontaktowym i niekontaktowym.^{63- 65} Fazy polimerów oraz ich wertykalne uporządkowanie dla wzorów wytworzonych przez samo- organizację zidentyfikowano po selektywnym wytrawieniu PS (zanurzenie podłoża w cykloheksanie przez 60 s).

3.2.1.3.3. Adsorpcja białek.

Aby sprawdzić adsorpcję białek do powierzchniowych wzorów polimerowych użyto dwóch lektyn (Biokom, Polska): konkanawaliny A (Con A) i lektyny soczewicy (LcH). Lektyny są białkami rozpoznającymi reszty cukrowe związane kowalencyjnie z białkami błonowymi. Ta identyfikacja zachodzi w wysoce specyficzny sposób, porównywalny do oddziaływania antygen- przeciwciała. Wybrane do eksperymentu białka różnią się stopniem powinowactwa do różnych oligosacharydów oraz strukturą trzeciorzędową w środowisku o pH 7,0 (Con A jest tetramerem, a LcH dimerem). Tych

lektyn użyto do zademonstrowania nowej metody analizy stopnia pokrycia powierzchni przez białka zaadsorbowane do różnych podłoży polimerowych- analizy geometrii całkowej.⁵⁸

Obie lektyny były znakowane fluorescencyjnie, Con A izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) absorbującym światło niebieskie ($\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$) i emitującym światło zielone ($\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$), natomiast LcH było znakowane izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC) absorbującym światło zielone ($\lambda_{\text{abs}} = 557 \text{ nm}$), a emitującym światło czerwone ($\lambda_{\text{em}} = 576 \text{ nm}$). Roztwory białek sporządzono z PBS (pH 7,4; Sigma) o koncentracji $c = 125 \mu\text{g}/\text{mL}$. Krople każdego z roztworów deponowano na powierzchni wzorów polimerowych przez 15 minut. Następnie próbki, po ostrożnym przepłukaniu zostały umieszczone w buforze PBS. Wszystkie pomiary fluorescencyjne wykonano dla próbek zanurzonych w buforze, używając mikroskopu Olympus BX51 wyposażonego w 100 W lampę rtęciową.

3.2.1.3.4. Analiza obrazów.

Szczególną uwagę poświęcono wykalibrowaniu skali obrazów fluorescencyjnych tak aby była identyczna jak skala obrazów AFM. Najpierw skale długości obrazów AFM wykalibrowano przez pomiary siatek kalibracyjnych. Następnie, próbki do kalibracji, izotropowe wzory polimerów PS i fluorescencyjnego poli(3- alkytiofenu)⁶³⁻⁶⁵ zostały zobrazowane obydwoma technikami mikroskopowymi (mikroskopia fluorescencyjna FM i AFM). W kolejnym kroku porównano wyniki analizy fourierowskiej obrazów AFM i FM w celu wykalibrowania skali obrazów fluorescencyjnych względem skali obrazów AFM.

Analiza geometrii całkowej. Do ilościowej analizy obrazów fluorescencyjnych zastosowano analizę geometrii całkowej⁴⁷⁻⁵⁷, używając procedury opisanej wcześniej.^{53, 58} Każdy obraz stanowi macierz pikseli o ustalonej lokalnej wartości $i(x, y)$ proporcjonalnej do lokalnej wartości wysokości (dla obrazów AFM) lub intensywności fluorescencji (dla obrazów fluorescencyjnych). Każdy piksel obrazka może zostać przetworzony na biały lub czarny w zależności od tego czy jego wartość $i(x, y)$ jest wyższa lub niższa od wybranego poziomu odcięcia q .

Procedura umożliwiająca wyznaczenie optymalnej wartości poziomu odcięcia q , konieczna do wygenerowania obrazów binarnych, została wcześniej rygorystycznie określona dla obrazów AFM⁵⁴ i fluorescencyjnych⁵⁹. Dla bimodalnego rozkładu pikseli w obrazach AFM, takich jak te zarejestrowane dla wzorów PS/ PMMA i PEO/ PS, poziom odcięcia wynosi $q = (h_1 + h_2)/2$ ⁵⁴ i zależy od dominujących poziomów wysokości h_1 i h_2 . Natomiast dla obrazów fluorescencyjnych o monodalnym rozkładzie pikseli optymalna wartość q odpowiada $q = f_0 + h_{\text{wmh}}/2$ i jest ona zależna od wartości średniej rozkładu i od szerokości połówkowej (patrz rozdział 3.2.1.6).

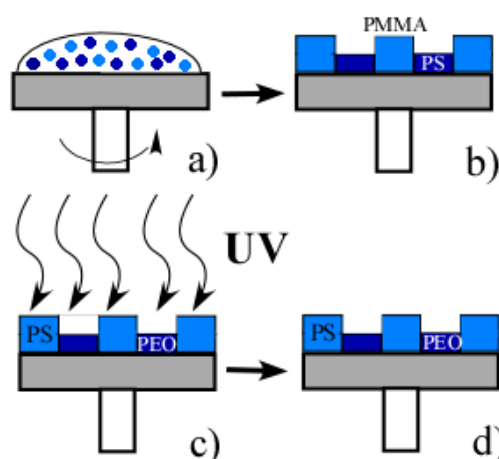
Każdy binarny (czarno- biały) obraz jest w pełni opisany przez komplet miar morfologicznych (Minkowskiego), określających frakcję pokrycia F powierzchni przez obszary białe, długość granic U między domenami białymi i czarnymi oraz parametr Eulera χ_E czyli różnicę liczby spójnych obszarów białych i czarnych.⁴⁸⁻⁵³ Te charakterystyczne miary (F , U , χ_E) jednoznacznie opisują topograficzne obrazy wzorów polimerowych oraz fluorescencyjne obrazy domen białek.⁵⁹ Dla każdego obrazu, wyznaczono miary Minkowskiego (znormalizowane przez rozmiar obrazu) za pomocą programu komputerowego opisanego w referencji [53], stosującego algorytm z referencji [51] (mniej skomplikowany jednak adekwatny do tego z referencji [47]). Ich średnie wartości ($\langle F \rangle$, $\langle U \rangle$, $\langle \chi_E \rangle$), uzyskane przez analizę kilku (do 9) obrazów o różnych rozmiarach zarejestrowanych w różnych

obszarach danej próbki, pozwalają na porównanie morfologii domen: wzorów polimerów i zaadsorbowanych białek.

3.2.1.4. Wyniki

3.2.1.4.1. Wzory polimerowe wytworzone przez samo- organizację.

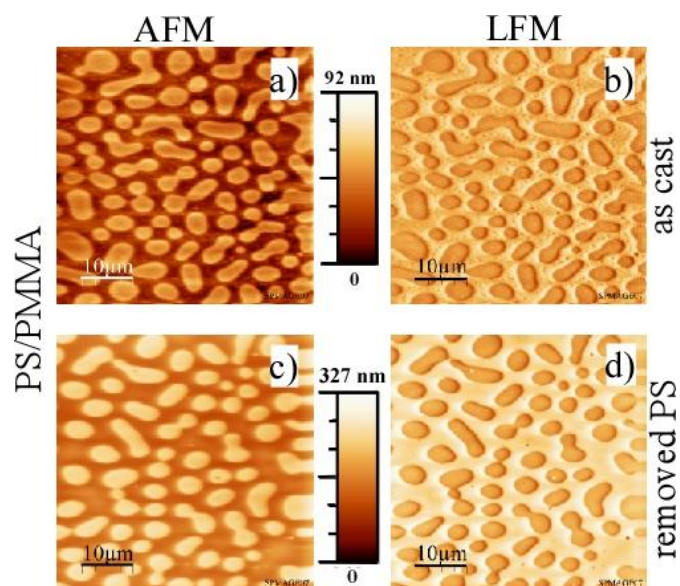
Procedura przygotowania warstw z domenami różnych polimerów powstałymi w procesie samo- organizacji jest przedstawiona schematycznie na rysunku 3.21. Wzory powierzchniowe o izotropowym rozmieszczeniu domen dwóch współistniejących faz polimerów silnie kontrastujących PS/ PMMA i PEO/ PS powstały przez wylanie ich roztworów (rysunek 3.21 a) na wirujące podłoża SiO_x . Mechanizm samo- organizacji polega tutaj na spontanicznej separacji faz, zainicjowanej przez odparowywanie rozpuszczalnika, prowadzącej do formowania się rozdzielonych domen widocznych na obrazach topografii powierzchni, tworzących strukturę lateralną co wynika z różnej rozpuszczalność poszczególnych polimerów.^{63- 65, 66} Filmy PEO/ PS (z domieszką PETA) zostały usieciowane za pomocą promieniowania UV (rysunek 3.21 c) aby uniknąć rozpuszczenia PEO podczas późniejszego procesu depozycji białek.



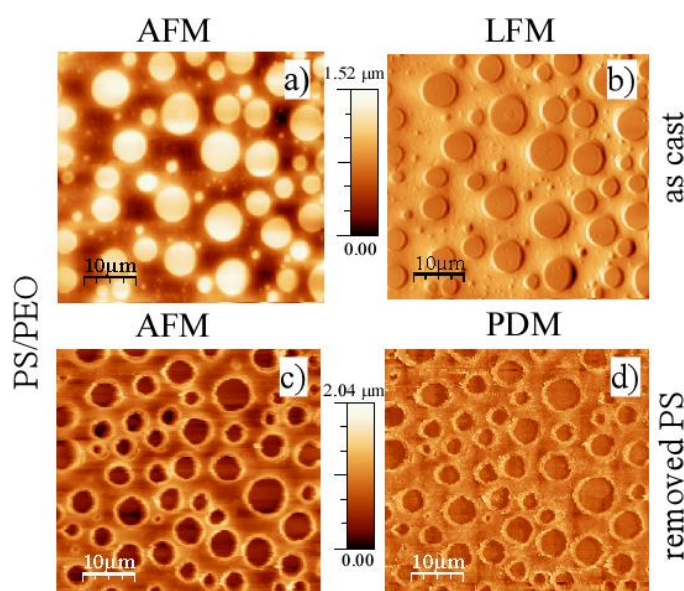
Rysunek 3. 21 Schemat powstawania wzorów polimerowych przez samo- organizację zachodzącą w czasie spin- castingu mieszanin polimerów PS/ PMMA i PEO/ PS. Cienkie warstwy PEO/ PS, wylane z roztworu zawierającego PETA, zostały usieciowane promieniowaniem UV, aby zapobiec rozpuszczeniu PEO w wodnym roztworze białek.

Otrzymana topografia i lateralne uporządkowanie domen PS/ PMMA w warstwie polimerowej, zbadane przy użyciu AFM, przedstawiono na rysunku 3.22. Porównanie obrazów AFM i LFM pozwala stwierdzić, że wyspo- podobne struktury wysokie widoczne w obrazie topograficznym (rysunek 3.22 a, b) oraz otaczające je obszary niskie są tworzone przez różne fazy polimerów. Dodatkowa analiza topografii wykonana mikroskopem AFM po rozpuszczeniu PS, przy użyciu selektywnego rozpuszczalnika (zanurzenie w cykloheksanie przez 60 s, rysunek 3.22 c, d), pokazuje że obszary wysokie odpowiadają fazie PMMA (co jest zgodne z [66], [67]).

Wyniki pomiarów przeprowadzonych dla wzorów PEO/ PS (z domieszką PETA) są pokazane na rysunku 3.23. Obrazy AFM, zarejestrowane przed (rysunek 3.23 a, b) i po (rysunek 3.23 c, d) selektywnym wytrawieniu PS, pozwalają sądzić że domeny wysokie to faza PS.



Rysunek 3. 22 Obrazy AFM (a, c) i LFM (b, d) powierzchni PS/ PMMA po spin- castingu (a, b) i po zanurzeniu w cykloheksanie w celu usunięcia PS (c, d).



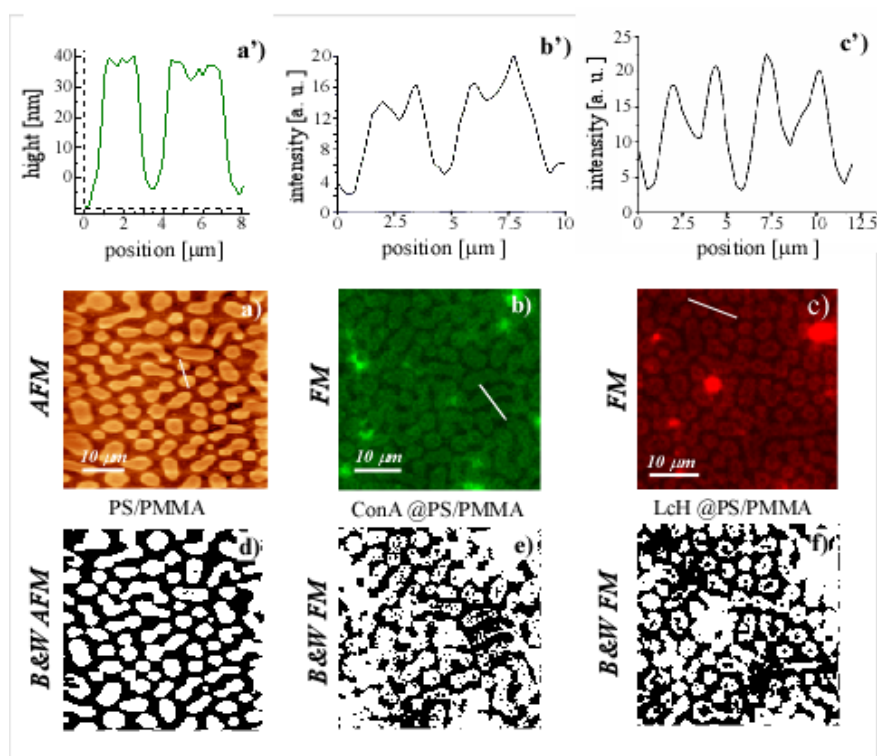
Rysunek 3. 23 Obrazy topograficzne AFM (a, c), LFM (b) i obraz fazowy (d) powierzchni PEO/ PS po spin-castingu (a, b) i po zanurzeniu w cykloheksanie w celu usunięcia PS (c, d).

3.2.1.4.2. Adsorpcja białek do powierzchniowych wzorów polimerów wytworzonych przez samo-organizację.

Cienkie warstwy izotropowych wzorów polimerów, PS/ PMMA i PEO/ PS, uzyskane metodą samo- organizacji zostały użyte jako podłoża do badania selektywnej adsorpcji dwóch znakowanych fluorescencyjnie lektyn: Con A i LcH.

Reprezentatywne wyniki uzyskane dla warstw PS/ PMMA są przedstawione na rysunku 3.24. Obraz AFM pokazujący oryginalny wzór powierzchni PS/ PMMA (rysunek 3.24 a) jest porównywany z obrazami fluorescencyjnymi lektyn, Con A (rysunek 3.24 b) i LcH (rysunek 3.24 c), zaadsorbowanych

do tych wzorów powierzchniowych. Z bezpośredniej oceny obrazów widać, że łaćciata struktura zaadsorbowanych białek odtwarza wyspo- podobne domeny fazy PMMA. Ponadto pojedyncze plamki o wyższej intensywności fluorescencji wskazują na tworzenie się agregatów białek, które mogą powstawać na powierzchni także przy ekspozycji na roztwory o niskim stężeniu białek.⁶⁸ Lokalizacja tych pojedynczych agregatów nie pokrywa się z wyspo- podobnymi strukturami polimeru. Bardziej dokładna analiza, oparta na zbadaniu profili intensywności fluorescencji (rysunek 3.24 b' i c'), wskazuje na preferencyjną adsorpcję białek do fazy PMMA (podwyższone plateau na rysunku 3.24 a') wzmocnioną w obszarze granicy faz PMMA i PS.



Rysunek 3. 24 Obraz AFM (a) wzoru PS/ PMMA powstałego w procesie samo- organizacji i obrazy fluorescencyjne (b, c) lektyn, Con A (b) i LcH (c), zaadsorbowanych do powierzchniowych wzorów polimerów. Profile topograficzne (a') i intensywności fluorescencji (b', c') odpowiadają liniom zaznaczonym na (a, b, c). Reprezentatywne binarne obrazy (d, e, f) są odwzorowaniem obrazów oryginalnych (a-c). Białe obszary, odpowiadające domenom fazy PMMA (d) i zaadsorbowanym lektynom: Con A (e) i LcH (f), są scharakteryzowane (patrz Tabela 3.1) przez współczynniki opisujące pokrycie F , długość granic U oraz topologiczną ciągłość χ_E (tj. różnicę liczby białych domen i czarnych dziur), znormalizowane przez rozmiar analizowanej powierzchni.

Aby zweryfikować tą specyficzną własność adsorpcji białek, obserwowaną lokalnie, zastosowano ilościowy i nielokalny sposób analizy tj. metodę geometrii całkowitej do serii kilku obrazów AFM (fluorescencyjnych). Zazwyczaj jakość odwzorowania wzoru jest analizowana przez porównanie dwóch wzorów: oryginalnego i odtwarzającego. Jednym ze sposobów rozwiązania tego zagadnienia, postulowanym przez Li i in.^{41, 42}, jest analiza względnego pokrycia różnych przekrywających się elementów obu wzorów na tym samym analizowanym obszarze. Takie podejście jednak nie pozwala na ilościowe porównanie obu wzorów oddzielnie, a zwłaszcza na uwzględnienie opisu ich morfologii.

Dlatego też do porównania morfologii oraz oceny jakości odtworzenia wzoru polimerów utworzonego na rozległych obszarach przez zaadsorbowane lektyny zastosowano metodę analizy geometrii całkowitej do serii obrazów topograficznych powierzchni i obrazów fluorescencyjnych

wzorów białka (o różnych wymiarach i zarejestrowanych w różnych obszarach próbek). Taki sposób analizy powierzchni pozwala na optymalny dobór próby statystycznej. Zatem miary morfologiczne (Minkowskiego),⁴⁸ charakteryzujące zarówno wzory polimerowe jak i białkowe, otrzymano dla serii reprezentatywnych obrazów. Na podstawie tych danych obliczono wartości średnie tych parametrów i ich niepewności. Otrzymane średnie wartości trzech miar Minkowskiego ($\langle F \rangle$, $\langle U \rangle$, $\langle \chi_E \rangle$), które charakteryzują morfologię domen fazy PMMA i zgrupowanych białek (Con A i LcH) zebrano w Tabeli 3.1.

PS/ PMMA	$\langle F \rangle$	$\langle U \rangle [\mu\text{m}^{-1}]$	$\langle \chi_E \rangle [\mu\text{m}^{-2}]$
PMMA	$0,46 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,02$	$0,019 \pm 0,002$
Con A	$0,51 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,04$	$-0,024 \pm 0,010$
LcH	$0,52 \pm 0,01$	$0,81 \pm 0,01$	$-0,002 \pm 0,001$

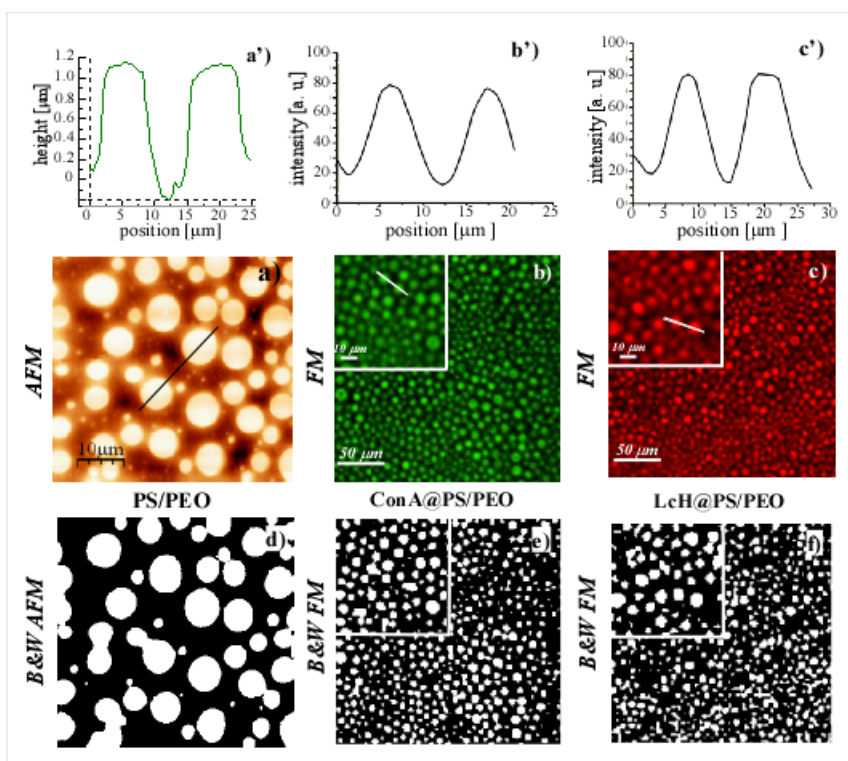
Tabela 3. 1 Średnie wartości miar Minkowskiego obliczone dla topograficznego obrazu domen fazy PMMA we wzorze PS/ PMMA- górny rząd oraz dla obrazów fluorescencyjnych lektyn, Con A – rząd środkowy i LcH- rząd dolny, zaadsorbowanych do tego wzoru polimerowego.

Przed interpretacją wartości zaprezentowanych w Tabeli 3.1 należy przypomnieć, że w tym podejściu^{54, 59} oryginalne obrazy (rysunek 3.24 a- c) są transformowane na reprezentatywne obrazy czarno- białe (odpowiednio rysunek 3.4 d- f), opisywane przez frakcję pokrycia F powierzchni przez obszary białe, długość granic U białych domen i parametr Eulera χ_E określający różnicę liczby spójnych obszarów czarnych i białych, gdzie białe domeny odpowiadają wysokiej fazie PMMA (rysunek 3.24 d) i zaadsorbowanym białkom (rysunek 3.24 e, f). Wszystkie miary morfologiczne są znormalizowane przez rozmiar obrazowanego obszaru, aby zapewnić łatwe porównanie między obrazami o różnych wymiarach geometrycznych.

Pokrycie powierzchni $\langle F \rangle$ przez domeny białek Con A i LcH wynosi odpowiednio $51 \pm 3 \%$ i $52 \pm 1 \%$ i jest nieznacznie wyższe w porównaniu do pokrycia powierzchni obszarami fazy PMMA, które wynosi $46 \pm 2 \%$ (patrz Tabela 3.1). Na tej podstawie można stwierdzić preferencyjną adsorpcję białek do domen fazy PMMA. Niewielki wzrost wartości $\langle F \rangle$ (frakcja powierzchniowa domen białych na rysunku 3.24 e, f w porównaniu do d) może wynikać z obecności pojedynczych klasterów białek, które nie replikują wzoru polimerowego. Z drugiej strony, gdyby takie klasterdominowały w morfologii, wpłynęłoby to na obniżenie średniej wartości parametru opisującego długość brzegów $\langle U \rangle$ domen proteinowych. Jednak w omawianym przypadku długość granic struktur powierzchniowych $\langle U \rangle$ wzrosła od $0,64 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ dla fazy PMMA do $0,85 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$ i $0,81 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ odpowiednio dla Con A i LcH. Wzrost wartości parametru U dla domen białkowych jest skorelowany z drastycznym obniżeniem wartości parametru opisującego ciągłość $\langle \chi_E \rangle$ ($0,019 \pm 0,002 \mu\text{m}^{-2}$ dla domen PMMA ale $-0,024 \pm 0,010 \mu\text{m}^{-2}$ i $-0,002 \pm 0,001 \mu\text{m}^{-2}$ dla Con A i LcH). Ujemne wartości $\langle \chi_E \rangle$ wynikają z występowania w przeważającym stopniu obszarów niepokrytych białkami wydzielonych wewnątrz domen białkowych (czarne dziury), o długości granicy większej od tej dla domen PMMA (porównaj białe domeny na rysunku 3.24 e, f i d). Wszystkie zmiany wartości parametrów Minkowskiego ($\langle F \rangle$, $\langle U \rangle$, $\langle \chi_E \rangle$) można wyjaśnić faktem wzmocnionej adsorpcji białek na granicy faz PS i PMMA. Dodatkowo wartość absolutna ciągłości $|\langle \chi_E \rangle|$ jest niższa dla zaadsorbowanego LcH niż dla Con A, co wskazuje na większą spójność nieadsorbujących białka obszarów wewnątrz domen białkowych (centralne części domen fazy PMMA). To daje bardziej

wyraźną adsorpcję lektyny LcH niż Con A do granicy rozdziálu PS i PMMA. Podobne wnioski można wysnuć na podstawie obserwacji lokalnego wiązania się białek, czyli analizy profili intensywności fluorescencji (rysunek 3.24 b' i c').

Zwiększona adsorpcja białek do granicy międzyfazowej PS/ PMMA była już wcześniej obserwowana dla dwóch innych protein: fibrynogenu Fg³⁹ i ludzkiej albuminy HSA (zaadsorbowanych z roztworów o niższej koncentracji).^{41, 42} Białka cechuje wysoka aktywność reakcji z podłożem i ich tendencja do wiązania się do obszarów granicy faz, wynikająca z amfipatyczności białek, (między fazą PS i PMMA eksponowanych na roztwór białka) może skutkować obniżeniem entalpii swobodnej układu.³⁹ Taka preferencyjna adsorpcja jest zakłócana w przypadku wzrostu zarówno stężenia białka jak i czasu adsorpcji.^{39, 41, 42} Te dwa parametry w połączeniu z pH roztworu białka kontrolują dystrybucję białka w obszarze międzyfazy i domen polimerów.^{39, 41, 42} W zależności od tych parametrów zaobserwowano obniżoną, identyczną lub zwiększoną względną adsorpcję dla PMMA w porównaniu do PS. Należy zwrócić uwagę na fakt, że sposób przygotowania podłoży polimerowych (bezpośrednie użycie po wylaniu warstw,^{40, 69} poddane wygrzewaniu,⁵⁹ termicznemu lub w obecności rozpuszczalnika⁴⁰) może istotnie wpłynąć na adsorpcję białek. Tym faktem należy tłumaczyć zaobserwowaną zwiększoną adsorpcję lektyn do domen fazy PMMA niż do fazy PS (dla podłoży, których po spin- castingu nie poddano procesowi wygrzewania), podczas gdy odwrotne zachowanie zaobserwowano dla warstw czystych polimerów poddanych wygrzewaniu.⁵⁹



Rysunek 3. 25 Obraz AFM (a) wzoru PEO/ PS powstałego w procesie samo- organizacji i obrazy fluorescencyjne (b, c) lektyn, Con A (b) i LcH (c), zaadsorbowanych do powierzchniowych wzorów polimerowych. Profile topograficzne (a') i intensywności fluorescencji (b', c') odpowiadają liniom zaznaczonym na (a, b, c). Reprezentatywne binarne obrazy (d, e, f) są odwzorowaniem obrazów oryginalnych (a-c). Białe obszary, odpowiadające domenom fazy PS (d) i zaadsorbowanym lektynom: Con A (e) i LcH (f), są scharakteryzowane (patrz Tabela 3.2) przez współczynniki opisujące pokrycie F, długość granic U oraz topologiczną ciągłość χ_E (tj. różnicę liczby białych domen i czarnych dziur), znormalizowane do rozmiaru powierzchni.

Główną rolę w procesie adsorpcji białek odgrywają oddziaływania hydrofobowe. Prawdopodobnie dlatego lektyny (tj. jedna z klas białek) zwiększają swoje zdolności wiązania wraz ze wzrostem hydrofobowości polimerów (tj. obniżeniem wartości polarnej składowej parametru rozpuszczalności polimerów $\delta_p = 17,4; 11,0$ i $5,7 \text{ MPa}^{0,5}$ odpowiednio dla PEO, PMMA i PS).⁹ Jednakże w sytuacji gdy badana jest adsorpcja białka do wzoru polimerów o podobnej hydrofobowości inne efekty zdają się w większym stopniu wpływać na adsorpcję, jak to było już wcześniej opisane.^{39, 41, 42} Na przykład białka mogą eksponować powierzchnię hydrofobową lub hydrofilową i przez to preferencyjnie zwiążą się z domenami wzoru polimerowego o niższej (faza PS) lub wyższej (faza PMMA) wartości energii powierzchniowej. W wyniku tego można zaobserwować zwiększoną adsorpcję białek w obszarze międzyfazowym PS i PMMA. Podobny efekt zaobserwowano wcześniej dla fibrynogenu i albuminy.^{39, 41, 42} O ile oddziaływania hydrofobowe są obserwowane zarówno dla PS jak i PMMA, to w przypadku tego drugiego polimeru mogą mieć również miejsce wiązania wodorowe (pomiędzy grupami karbonyłowymi polimeru a grupami amidowymi białek) oraz oddziaływania dipol-dipol. Równowaga między oddziaływaniami odpowiedzialnymi za adsorpcję białek do powierzchni polimerowej może być zachwiana przez obecność resztek rozpuszczalnika pozostałych po spin-castingu. Ten efekt może być wzmocniony, jeśli dany rozpuszczalnik preferuje jeden z polimerów (tj. więcej toluenu zostaje w fazie PS niż PMMA).⁶⁷ Ten fakt może tłumaczyć dlaczego lektyny zaadsorbowały w większej ilości do fazy PMMA niż PS, który jest powszechnie uważany za bardzo dobre podłoże dla białek.

Reprezentatywne obrazy wzorów powierzchniowych PEO/ PS okazano na rysunku 3.25. Obrazy fluorescencyjne prezentują struktury utworzone przez Con A (rysunek 3.25 b) i LcH (rysunek 3.25 c) zaadsorbowane do wzoru polimerowego. Struktura domen białkowych odzwierciedla strukturę fazy PS w oryginalnym wzorze, zobrazoną przez mikroskop AFM (rysunek 3.25 a). W przeciwieństwie do poprzedniego układu polimerów PS/ PMMA, tutaj lektyny adsorbują do fazy polimeru w sposób wysoce selektywny. Dodatkowa analiza profili intensywności fluorescencji (rysunek 3.25 b' i c') pokazuje brak adsorpcji lektyn w obszarze granicy faz polimer/ polimer (PEO/ PS).

Te wyjątkowe, obserwowane lokalnie własności adsorpcji białek do PEO/ PS, są potwierdzone przez ilościowe wyniki otrzymane z analizy geometrii całkowitej. Uzyskane średnie wartości miar Minkowskiego ($\langle F \rangle$, $\langle U \rangle$, $\langle \chi_E \rangle$), zamieszczone w Tabeli 3.2, charakteryzują morfologię domen wysokich fazy PS i łatwo- podobnych domen białek (Con A i LcH) pokazanych na reprezentatywnych obrazach binarnych (rysunek 3.25 d- f).

PEO/ PS	$\langle F \rangle$	$\langle U \rangle [\mu\text{m}^{-1}]$	$\langle \chi_E \rangle [\mu\text{m}^{-2}]$
PS	$0,32 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,04$	$0,024 \pm 0,005$
Con A	$0,25 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,03$	$0,023 \pm 0,002$
LcH	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,03$	$0,020 \pm 0,001$

Tabela 3. 2 Średnie wartości miar Minkowskiego obliczone dla topograficznego obrazu domen fazy PS we wzorze PEO/ PS - górny rząd oraz dla obrazów fluorescencyjnych lektyn, Con A – rząd środkowy i LcH- rząd dolny, zaadsorbowanych do tego wzoru polimerowego.

Długość granic $\langle U \rangle$ i parametr Eulera $\langle \chi_E \rangle$ wyznaczone dla obszarów fazy PS ($0,35 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$; $0,024 \pm 0,005 \mu\text{m}^{-2}$) są w granicach niepewności pomiarowej identyczne z wartościami otrzymanymi dla Con A ($0,34 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$; $0,023 \pm 0,002 \mu\text{m}^{-2}$) i LcH ($0,32 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$; $0,020 \pm 0,001 \mu\text{m}^{-2}$). Natomiast współczynnik pokrycia $\langle F \rangle$ dla lektyn ($25 \pm 4 \%$ dla Con A i $27 \pm 3 \%$ dla LcH) jest trochę niższy w porównaniu do wartości otrzymanej dla domen fazy PS ($32 \pm 4 \%$). Te charakterystyczne wartości miar Minkowskiego potwierdzają selektywne wiązanie się białek do domen fazy PS oraz brak adsorpcji do międzypowierzchni PEO/ PS. Dla domen białek brak adsorpcji w obszarze międzyfazowym powinien dać obniżenie wartości $\langle F \rangle$, znacznie mniejsze obniżenie wartości współczynnika $\langle U \rangle$ i nienaruszoną wartość $\langle \chi_E \rangle$.

Różnica w stopniu hydrofobowości między PEO i PS jest znacznie większa niż między PMMA i PS. Zatem efekty związane z obecnością rozpuszczalnika (chloroformu) w przygotowanych techniką spin-castingu warstwach nie mogą wpływać na preferencyjną adsorpcję białek do domen fazy PS. Wiadomo z badań opisanych w rozdziale 3.1.1, że domieszki PETA, umożliwiającego sieciowanie, powodują zwiększoną adsorpcję lektyn do fazy PS.⁵⁹

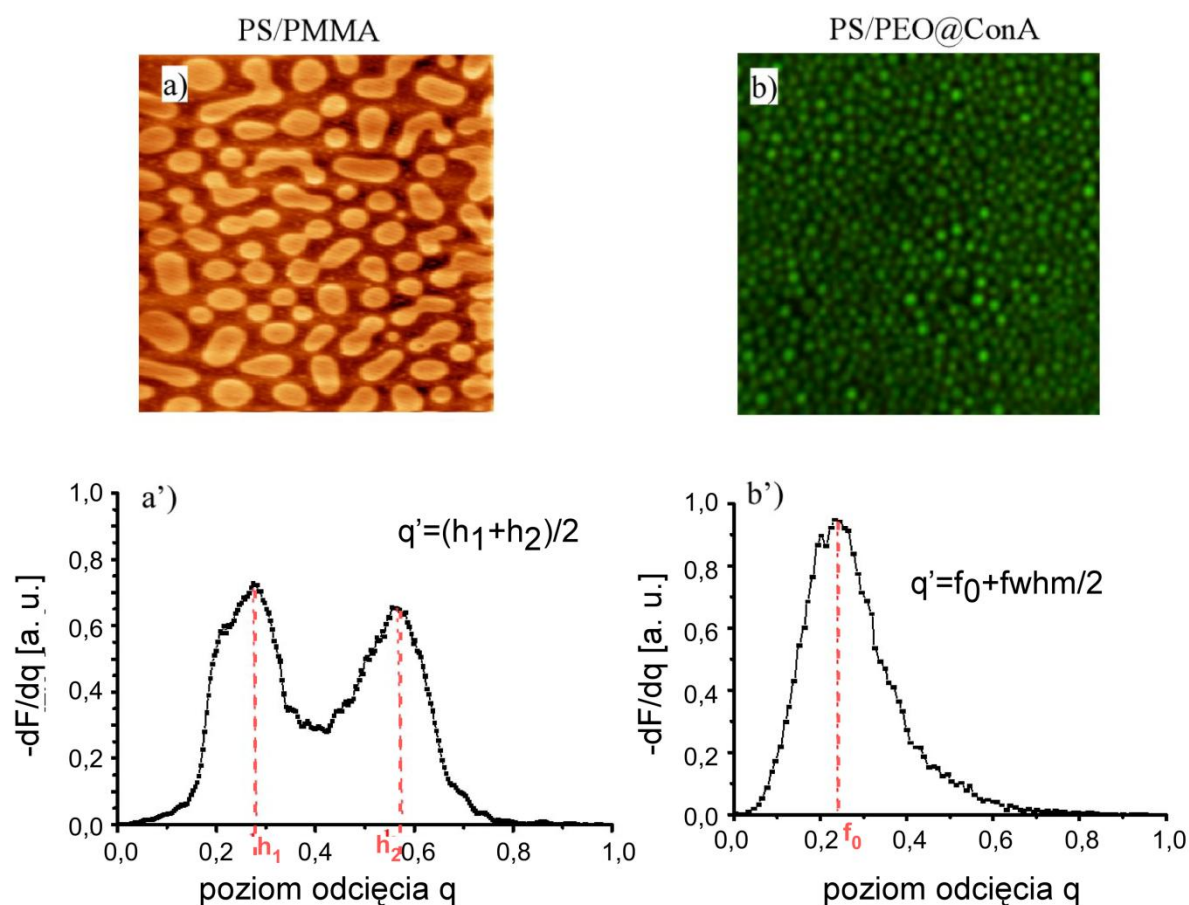
Adsorpcja białek do jakiegokolwiek powierzchni wiąże się z losową orientacją molekuł białkowych. Aby możliwe było zastosowanie takich powierzchni w biosensorach, potrzebne jest potwierdzenie że miejsca wiążące są skierowane na zewnątrz, a białka są w stanie oddziaływać specyficznie tj. zachować ich biologiczną aktywność. Przeprowadzone wcześniej badania potwierdzają, że przedstawiona nowa metoda tworzenia uporządkowanych wzorów białkowych, oparta na adsorpcji białek do powierzchniowych wzorów mieszanin polimerów może być użyta w zastosowaniach biomedycznych.⁵⁹ Reszty cukrowe zaadsorbowanych molekuł Ca Y związały się specyficznie ze znakowanymi fluorescencyjnie lektynami. Powinowactwo takiego wiązania jest porównywalne z powinowactwem oddziaływania antygen- przeciwciała.⁷⁰

3.2.1.5. Podsumowanie i wnioski

W tym rozdziale opisano selektywną adsorpcję białek (Con A i LcH) do wzorów polimerów wytworzonych przez samo-organizację (mieszaniny PS/ PMMA i PEO/ PS). Domeny białek powstałe na skutek preferencyjnej adsorpcji do powierzchniowych wzorów polimerów, są porównywane w sposób ilościowy z oryginalnymi wzorami podłoża (wzory izotropowe) aby sprawdzić jakość odtworzenia. Wyniki nielokalnej analizy geometrii całkowitej, wykonanej dla serii kilku obrazów (fluorescencyjnych i AFM), są wyrażone przez średnie wartości miar Minkowskiego opisujące pokrycie powierzchni F , długość granic U oraz topologiczną łączność χ_E domen białek oraz wzorów polimerów. Dwa rodzaje odtworzenia wzoru podłoża są scharakteryzowane przez różne relacje między dwoma zestawami miar morfologicznych (Tabele 3.1 i 3.2). Zwiększona adsorpcja białek do granicy między fazami polimer/ polimer (PS/ PMMA) oraz preferencyjna adsorpcja białek do domen PMMA, widoczna jest na obrazach czarno- białych w postaci ciemnych 'dziur' słabo odwzorowanych domen z wydłużonymi granicami. To zachowanie jest odzwierciedlone przez drastyczne obniżenie wartości parametru χ_E aż do wartości ujemnych, któremu towarzyszy wzrost wartości parametrów F i U (Tabela 3.1). Z kolei wysoce selektywna adsorpcja do domen fazy PS jest zaobserwowana dla wzorów PEO/ PS. Otrzymane wyniki nie dają żadnych podstaw do stwierdzenia zwiększonej adsorpcji lektyn w obszarze granicy faz dla układu PEO/ PS a potwierdzają prawie idealne odtworzenie wzoru podłoża. Wartości parametrów U i χ_E są porównywalne, natomiast F jest minimalnie obniżone (Tabela 3.2).

Analiza geometrii całkowitej, pokazana w tym rozdziale, może być stosowana w badaniach adsorpcji białek ponieważ opisuje ilościowo i w relatywnie łatwy sposób morfologiczne uporządkowanie białek o niejednorodnej dystrybucji, obserwowane wielokrotnie wcześniej.^{4, 8, 11, 17, 20, 25, 29-31, 36, 38-42, 46, 71-74} W tej pracy metodą analizy Minkowskiego (zastosowaną do fluorescencyjnych obrazów zaadsorbowanych do różnych faz polimerowych białek) wyselekcjonowano najbardziej kontrastującą parę polimerów PEO/ PS. Pary tej użyto do wytworzenia regularnych matryc polimerowych (patrz rozdział 3.3.2) służących do uporządkowanego grupowania białek (mikromacierzy białek).

3.2.1.6. Supplement



Rysunek 3. 26 Bimodalny rozkład pikseli obrazu AFM (a, a'), gdzie poziom odcięcia definiują wysokości h_1 oraz h_2 , $q' = (h_1 + h_2)/2$ oraz monodalny rozkład pikseli w obrazie fluorescencyjnym (b, b'), gdzie $q' = f_0 + fwhm/2$ i jest zależne od średniej wartości dystrybucji oraz szerokości połówkowej rozkładu pikseli.

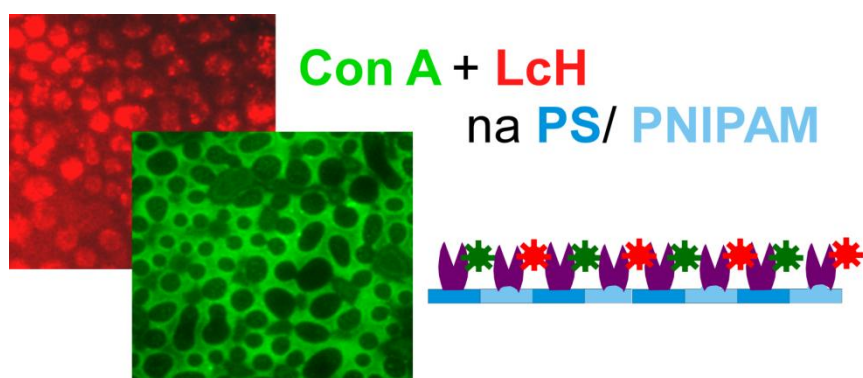
3.2.1.7. Literatura

- (1) Angedent, P. *DDT* **2005**, 10, 503–511.
- (2) Schwarz, U. *Soft Matter* **2007**, 3, 263–266.
- (3) Khetani, S. R.; Bhatia, S. N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17, 524–531.
- (4) Zhang, Y.; Wang, C. *Adv. Mater.* **2007**, 19, 913–916.
- (5) C. J.; Lee, C. J.; Blumenkranz, M. S.; Fishman, H. A.; Bent, S. F. *Langmuir* **2004**, 20, 4155–4161.
- (6) Lin, C. C.; Co, C. C.; Ho, C. C. *Biomaterials* **2005**, 3655–3662.
- (7) Veisheh, M.; Zareie, M. H.; Zhang, M. *Langmuir* **2002**, 18, 6671–6678.
- (8) Yang, Z.; Belu, A. M.; Liebermann-Vinson, A.; Sugg, H.; Chilkoti, A. *Langmuir* **2000**, 16, 7482–7492.
- (9) García, A. J. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 203, 171–190.
- (10) Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Surf. Sci.* **2002**, 500, 28–60.

- (11) Chiu, D. T.; Jeon, N. L.; Huang, S.; Kane, R. S.; Wargo, C. J.; Choi, I. S.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 2408–2413.
- (12) Chen, C. S.; Jiang, X.; Whitesides, G. M. *MRS Bull.* **2005**, *30*, 194–201.
- (13) Patrito, N.; McCague, C.; Norton, P. R.; Petersen, N. O. *Langmuir* **2007**, *23*, 715–719.
- (14) Welle, A.; Chiumiento, A.; Barbucci, R. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 87–91.
- (15) Christman, K. L.; Maynard, H. D. *Langmuir* **2005**, *21*, 8389–8393.
- (16) Kumar, G.; Ho, C. C.; Co, C. C. *Adv. Mater.* **2007**, 1084–1090.
- (17) Christman, K. L.; Enriquez-Rios, V. D.; Maynard, H. D. *Soft Matter* **2006**, *2*, 928–939.
- (18) Sapsford, K. E.; Bradburne; Delehanty, J. B.; Medintz, I. L. *Mater. Today* **2008**, *11*, 38–49.
- (19) Liu, W. F.; Chen, C. S. *Mater. Today* **2005**, *8*, 28–35.
- (20) Douvas, A. M.; Petrou, P. S.; Kakabakos, S. E.; Misiakos, K.; Argitis, P.; Sarantopoulou, E.; Kollia, Z.; Cefalas, A. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1027–1032.
- (21) Bernard, A.; Delamarche, E.; Schmidt, H.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H. A. *Langmuir* **1998**, *14*, 2225–2229.
- (22) James, C. D.; Davis, R. C.; Kam, L.; Craighead, H. G.; Isaacson, M.; Turner, J. N.; Shain, W. *Langmuir* **1998**, *14*, 741–744.
- (23) Martin, B. D.; Gaber, B. P.; Patterson, C. H.; Turner, D. C. *Langmuir* **1998**, *14*, 3971–3975.
- (24) Bernard, A.; Renault, J. P.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1067–1070.
- (25) Tan, J. L.; Tien, J.; Chen, C. S. *Langmuir* **2002**, *18*, 519–523.
- (26) Bernard, A.; Fitzli, D.; Sonderegger, P.; Delamarche, E.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Biebuyck, H. A. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 866–869.
- (27) Renault, J. P.; Bernard, A.; Juncker, D.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2320–2323.
- (28) Quinn, A.; Mantz, H.; Jacobs, K.; Bellon, A.; Anten, L. *Europhys. Lett.* **2008**, *81*, Art. No 56003 (6pp).
- (29) Senaratne, W.; Andruzzi, L.; Ober, C. K. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2427–2448.
- (30) Delamarche, E.; Bernard, A.; Schmid, H.; Bietsch, A.; Michel, B.; Biebuyck, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 500–508.
- (31) Suh, K. Y.; Seong, J.; Khademhosseini, A.; Laibinis, P. E.; Langer, R. *Biomaterials* **2004**, *25*, 557–563.
- (32) Kane, R. S.; Takayama, S.; Ostuni, E.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2363–2376.
- (33) Nicolau, D. V.; Taguchi, T.; Taniguchi, H.; Yoshikawa, S. *Langmuir* **1999**, *15*, 3845–3851.
- (34) Schwarz, A.; Rossier, J. S.; Roulet, E.; Mermoud, N.; Roberts, M. A.; Girault, H. H. *Langmuir* **1998**, *14*, 5526–5531.
- (35) Wang, C.; Zhang, Y. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 150–153.
- (36) Brétagnol, F.; Valsesia, A.; Sasaki, T.; Ceccone, G.; Colpo, P.; Rossi, F. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1947–1950.
- (37) Ionov, I.; Synytska, A.; Diez, S. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1501–1508.
- (38) Petrou, P. S.; Chatzichristidi, M.; Douvas, A. M.; Argitis, P.; Misiakos, K.; Kakabakos, S. E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1994–2002.
- (39) Morin, C.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L.; Urquhart, S. G.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2004**, *137–140*, 785–794.
- (40) Sousa, A.; Sengonul, M.; Latour, R.; Kohn, J.; Libera, M. *Langmuir* **2006**, *22*, 6286–6292.
- (41) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Robar, N.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16763–16773.
- (42) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2150–2158.
- (43) Whitesides, G. M. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1161–1165.
- (44) Dalby, M. J.; Riehle, M. O.; Johnstone, H. J. H.; Affrossman, S.; Curtis, A. S. G. *Tissue Eng.* **2008**, *8*, 1099–1108.
- (45) Gadegaard, N.; Dalby, M. J.; Riehle, M. O.; Curtis, A. S. G.; Affrossman, S. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1857–1860.
- (46) Minelli, C.; Kikuta, A.; Tsud, N.; Ball, M. D.; Yamamoto, A. J. *Nanobiotechnol.* **2008**, *6*, art no 3 (11pp).
- (47) Mecke, K. R. *Phys. Rev. E* **1996**, *53*, 4794–4800.
- (48) Mecke, K. R.; Sofonea, V. *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, R3761–R3764.
- (49) Mecke, K. R. *Int. J. Modern Phys. B* **1998**, *9*, 861–899.
- (50) Mecke, K. R. In *Statistical Physics and Spatial Statistics*; Mecke, K. R., Stoyan, D., Eds.; Springer-Verlag: Heidelberg, **2000**; Vol. 554, p 111.
- (51) Michielsen, K.; de Raedt, H. *Phys. Rep.* **2001**, *347*, 461–538.
- (52) Sofonea, V.; Mecke, K. R. *Eur. Phys. J. B* **1999**, *8*, 99–112.
- (53) Raczowska, J.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Lekki, J.; Lekka, M.; Bernasik, A.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* **2003**, *36*, 2419–2427.
- (54) Raczowska, J.; Bernasik, A.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Kowalski, K.; Lekka, M.; Czuba, P.; Lekki, J. *Thin Solid Films* **2005**, *476*, 358–365.
- (55) Gutmann, J. S.; Müller-Buschbaum, P.; Stamm, M. *Faraday Discuss.* **1999**, *112*, 285–297.
- (56) Becker, J.; Grün, G.; Seemann, R.; Mantz, H.; Jacobs, K.; Mecke, K. R.; Blossey, R. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 59–63.
- (57) Rehse, S.; Mecke, K. R.; Magerle, R. *Phys. Rev. B* **2008**, *77*, 051805.
- (58) Zemła, J.; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczowska, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 10253–10258.
- (59) Zemła, J. *Adsorpcja białek do powierzchni i wzorów polimerowych*, praca magisterska, Uniwersytet Jagielloński: Kraków, **2007**.
- (60) Doytcheva, M.; Stamenova, R.; Zvetkov, V.; Tsvetanov, C. *Polymer* **1998**, *39*, 6715–6721.
- (61) Doytcheva, M.; Dotcheva, D.; Stamenova, R.; Tsvetanov, C. *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, *286*, 30–33.
- (62) Doytcheva, M.; Petrova, E.; Stamenova, R.; Tsvetanov, C.; Riess, G. *Macromol. Mater. Eng.* **2004**, *289*, 676–680.

- (63) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Raptis, I.; Raczkowska, J.; Goustouridis, D.; Rysz, J.; Sanopoulou, M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *105*, 67–79.
- (64) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Moons, E.; Rysz, J. *Macromolecules* **2008**, *41*, 4802–4810.
- (65) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Raptis, I.; Moons, E.; Goustouridis, D.; Haberko, J.; Rysz, J. *Soft Matter* **2009**, *5*, 234–241.
- (66) Walheim, S.; Böltau, M.; Mlynek, J.; Krausch, G.; Steiner, U. *Macromolecules* **1997**, *30*, 4995–5003.
- (67) Raczkowska, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Czuba, P.; Lekka, M.; Bernasik, A. *J. Nanostruct. Polym. Nanocomp.* **2005**, *1*, 23–35.
- (68) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. *Soft Matter* **2009**, *5*, 1039–1047.
- (69) Mielczarski, J. A.; Dong, J.; Mielczarski, E. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 5228–5237.
- (70) Dong, J.; Mielczarski, J. A.; Mielczarski, E.; Xu, Z. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 972–980.
- (74) Sharon, N.; Lis, H. *Science* **1989**, *246*, 227–234.
- (71) Lee, S. W.; Oh, B. K.; Sanedrin, R. G.; Salaita, K.; Fujigaya, T.; Mirkin, C. A. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1133–1136.
- (72) Mack, N. H.; Dong, R.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7871–7881.
- (73) Renault, J. P.; Bernard, A.; Bietsch, A.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E.; Kreiter, M.; Hecht, B.; Wild, U. P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 703–711.
- (74) Michel, R.; Reviakine, I.; Sutherland, D.; Fokas, C.; Csucs, G.; Danuser, G.; Spencer, N. D.; Textor, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 8580–8586.

3.2.2. Sukcesywna adsorpcja białek do domen powierzchniowych mieszanin polimerów hydrofobowych i termo- czułych.



3.2.2.1. Abstrakt

Mikro-metrowe płytki testowe zawierające różne białka są tworzone za pomocą druku mikro-kontaktowego różnych białek. Zamiast tej strategii zaproponowano tworzenie powierzchniowych mikro- wzorów dwu różnych białek przez zastosowanie ich sukcesywnej i kontrolowanej temperaturą adsorpcji do powierzchniowych domen fazowych hydrofobowego PS i termo- czułego poli(N-izopropylakrylamidu) PNIPAM. Osadzone cienkie warstwy z mieszaniny PS/ PNIPAM domieszkowanej triakrylanem pentaerytrytolu, z domenami fazowymi powstałymi w trakcie depozycji, zostały usieciowane za mocą ultrafioletu. Takie warstwy polimerowe posłużyły jako podłoże do dwu-stopniowej adsorpcji białka: Con A (znakowanego izotiocyjanianem fluoresceiny, fluorescencja zielona) przeprowadzonej w 24 °C, czyli w temperaturze niższej od dolnej krytycznej temperatury rozpuszczania LCST PNIPAM-u wynoszącej 32 °C, oraz LcH (znakowanego izotiocyjanianem tetrametylorodaminy, fluorescencja czerwona) przeprowadzonej w 38 °C. Zauważono wysoką korelację między domenami polimerowymi bogatymi w PS i PNIPAM, obserwowanymi za pomocą mikroskopu AFM, oraz domenami białek Con A i LcH, odpowiednio, uwidocznionymi przez mikroskopię fluoroscencyjną.

3.2.2.2. Wprowadzenie

Pozycjonowanie wielu białek na tym samym podłożu jest ważnym zagadnieniem z punktu widzenia bioinżynierii materiałowej jak i analizy biomedycznej. Jak dotąd w tym celu stosowano

różne metody, w tym mikro- przepływowe i drukowanie strumieniowe (inkjet printing).¹ Techniki te jednak nie pozwalają na wytwarzanie mikro- macierzy wielu białek na dużych obszarach, dlatego też zaczęto stosować techniki miękkiej litografii, czyli sukcesywne nadrukowywanie kolejnych rodzajów biomolekuł, co wymaga dużej precyzji.¹⁻⁴

Wyniki publikowane przez wiele grup badawczych pokazują, że jako podłoża do selektywnej adsorpcji białek można wykorzystać mikro- wzory polimerowe, które można wytwarzać na dużych obszarach. Jak dotąd prezentowano wyniki adsorpcji m. in. fibrynogenu i albuminy do wzorów powierzchniowych polimerów kontrastujących adsorpcję białek.⁵⁻¹⁰

Jednocześnie trwają intensywne badania polimerów „inteligentnych”, czyli takich które zmieniają swoje własności fizykochemiczne pod wpływem działania bodźców zewnętrznych np. temperatury, pH, światła, pola magnetycznego.¹¹ Jednym z polimerów inteligentnych cieszącym się szczególnym zainteresowaniem jest termo- czuły poli(N- izopropylakrylamid) PNIPAM, który ulega przemianie fazowej w fizjologicznie istotnym zakresie temperatur, co może umożliwić kontrolowaną adsorpcję/ desorpcję białek lub komórek. Niższa temperatura krytyczna rozpuszczania (LCST) PNIPAM- u wynosi $\sim 32^{\circ}\text{C}$. Powyżej LCST, PNIPAM wykazuje własności hydrofobowe, natomiast poniżej tej temperatury ma własności hydrofilowe.¹² Adsorpcja białek w dużym stopniu zależy od hydrofobowości podłoża,^{5, 7-9, 13} więc dla PNIPAM- u obserwuje się adsorpcję białek powyżej 32°C .

W tym rozdziale pokazana jest dwustopniowa adsorpcja lektyn do wzorów powierzchniowych polimerów hydrofobowego PS i termo- czułego PNIPAM. Morfologia powierzchni została zobrazowana mikroskopem sił atomowych AFM, a obrazy zaadsorbowanych znakowanych fluorescencyjnie białek obserwowano mikroskopem fluorescencyjnym.

3.2.2.3. Część eksperymentalna

3.2.2.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych

Polimery użyte do omawianego eksperymentu to polistyren PS (średnia masa cząsteczkowa $M_w = 64\,000$, polidispersyjność $M_w / M_n = 1,06$, temperatura zeszklenia $T_g = 100^{\circ}\text{C}$) i poli(N- izopropylakrylamid) PNIPAM ($M_w = 19\,000 - 26\,000$, temperatura mięknienia $T_m = 96^{\circ}\text{C}$).

Mieszaninę PS/ PNIPAM (wagowo 1:1) rozpuszczono w chloroformie, całkowita koncentracja polimerów wynosiła $c_{\text{polimer}} = 40\text{ mg/ mL}$. Sporządzono także roztwór PNIPAM- u w chloroformie o koncentracji 20 mg/ mL . Roztwory wzbogacono czynnikiem sieciującym triakrylanem pentaerytrytolu (PETA, $c_{\text{PETA}} = 4\text{ mg/ mL}$). Warstwy polimerowe przygotowano techniką spin- castingu, czyli przez wylanie roztworów na wirujące podłoża SiO_x , przy użyciu spin- coatera KW- 4A (Chemat Technology). Prędkość obrotowa w wynosiła 1 k rpm (PS/ PNIPAM) i 2 k rpm (PNIPAM). Wzory powierzchniowe PS/ PNIPAM oraz jednoskładnikowe warstwy PNIPAM zostały dodatkowo usieciowane według procedury opisanej w referencji [14] polegającej na oświetleniu próbek promieniowaniem ultrafioletowym (wysokociśnieniowa lampa Hg, 400 W), aby uniknąć rozpuszczenia PNIPAM- u w czasie depozycji roztworów białek w temperaturach niższych niż 32°C .

3.2.2.3.2. Adsorpcja białek

Do grupowania białek na powierzchniach jednorodnych PNIPAM oraz wzorach polimerowych PS/ PNIPAM użyto dwóch lektyn (Biokom, Polska): konkanawaliny A (Con A) i lektyny soczewicy (LcH). Con A i LcH oddziałują specyficznie z α - D- glukozą i α - D- mannozą, ale energia swobodna tych

oddziaływań jest różna.^{15, 16} Białka te różnią się także strukturą trzeciorzędową. Obie lektyny były znakowane fluorescencyjnie, Con A izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) adsorbującym światło niebieskie ($\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$) i emitującym światło zielone ($\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$), natomiast LcH było znakowane izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC) adsorbującym światło zielone ($\lambda_{\text{abs}} = 557 \text{ nm}$), a emitującym światło czerwone ($\lambda_{\text{em}} = 576 \text{ nm}$).

Roztwory białek sporządzono z soli fizjologicznej buforowanej fosforanami PBS (pH 7,4; Sigma) o koncentracji $c_{1 \text{ Con A (LcH)}} = 41,5 \text{ } \mu\text{g/ mL}$, które deponowano na podłożach PS/ PNIPAM. Dla podłoży PS/ PNIPAM pozycjonowanie białek zostało przeprowadzone dwu- etapowo. W pierwszym kroku podłoża PS/ PNIPAM eksponowano na roztwór Con A przez 15 min w temperaturze poniżej niższej krytycznej temperatury rozpuszczalności PNIPAM- u. Następnie próbki spłukano ostrożnie roztworem PBS w celu usunięcia wolnych biomolekuł. W kolejnym kroku próbki te umieszczono w komorze, w której temperatura wynosiła 38°C , czyli wyższej od temperatury przejścia PNIPAM- u do stanu hydrofobowego, ale nadal mieszczącej się w przedziale temperatur fizjologicznych. W tych warunkach przez czas 20 min deponowano roztwór LcH. Po tym etapie próbki ponownie ostrożnie spłukano i umieszczono je w buforze PBS. Wszystkie pomiary fluorescencyjne wykonano dla próbek zanurzonych w buforze. Na jednorodnych podłożach PNIPAM- u deponowano w temperaturach 24 i 38°C roztwory białka o koncentracji $c_{2 \text{ Con A (LcH)}} = 125 \text{ } \mu\text{g/ mL}$.

3.2.2.3.3. Charakterystyka powierzchni

Dla jednorodnych warstw PNIPAM- u metodą kropli leżącej wykonano pomiary kąta zwilżenia aparatem Krüss EasyDrop (DSA15) wyposażonym w komorę temperaturową na bazie modułów Peltiera. Pomiary przeprowadzono w zakresie temperatur od $20- 40^{\circ}\text{C}$, wykonując 10 pomiarów dla każdej temperatury, którą kontrolowano za pomocą termopary będącej w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią próbek.

Morfologia powierzchni oraz lateralne uporządkowanie domen warstw wylanych z roztworu PS/ PNIPAM zostały scharakteryzowane na podstawie obrazów tarcia (LFM) zarejestrowanych w temperaturze pokojowej mikroskopem sił atomowych (Agilent 5500) pracującym w modzie kontaktowym.

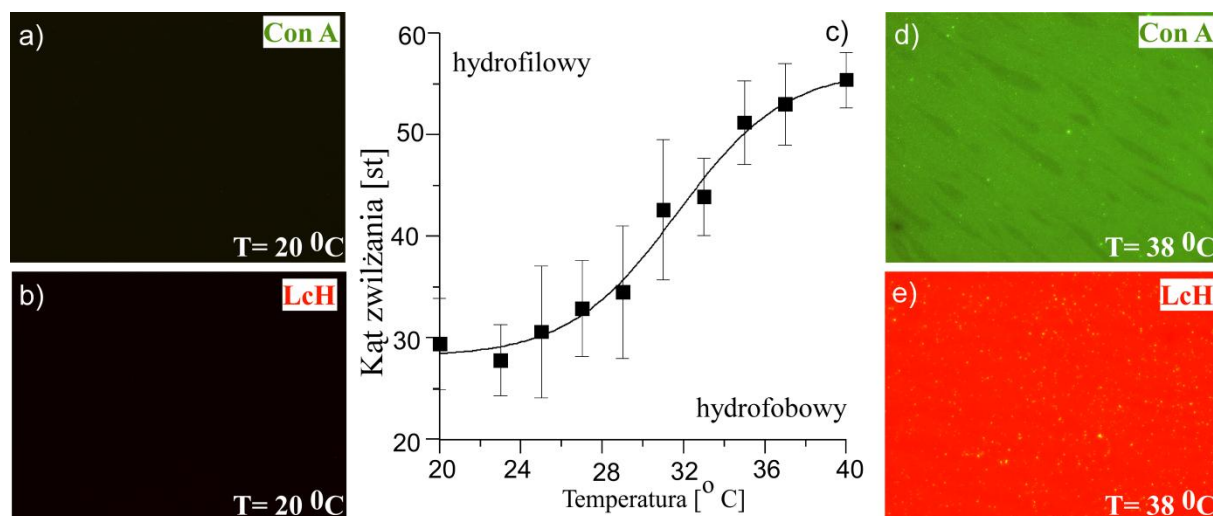
Zdjęcia fluorescencyjne lektyn jednorodnie pokrywających powierzchnie PNIPAM oraz mikro- wzorów zaadsorbowanych białek zarejestrowano w temperaturze pokojowej, bezpośrednio po depozycji roztworów białek dla próbek zanurzonych w roztworze PBS mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX51 wyposażonym w lampę halogenkową o mocy 100 W, filtry U- MNB2 i U- MNG2 oraz kamerę cyfrową typu DP72. Zdjęcia fluorescencyjne wykonano przy pomocy programu Cell[^]F.

3.2.2.4. Wyniki

3.2.2.4.1. Kontrolowana adsorpcja białek do jednorodnych podłoży PNIPAM- u.

Aby sprawdzić czy zmiana temperatury osadzonych, usieciowanych warstw PNIPAM- u wpływa na ich zwilżalność wykonano pomiary kąta zwilżenia naniesionej na powierzchnię kropli wody. Wyniki tych pomiarów (rysunek 3.27 c) pokazują, że kąt zwilżania zmienia się o więcej niż 10 stopni, zatem jednoznacznie można stwierdzić, że zaobserwowano przejście fazowe PNIPAM- u ze stanu hydrofilowego do stanu hydrofobowego.¹⁵ Niższa krytyczna temperatura rozpuszczania,

wyznaczona dla tych warstw, wynosi $\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ i jest zgodna z wartościami T_c (PNIPAM) podawanymi w literaturze.^{12, 17, 18}



Rysunek 3. 27 Zmiana kąta zwilżania podłoża PNIPAM- u w funkcji temperatury (c). Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego warstw PNIPAM- u zarejestrowane po adsorpcji białek (a, b, d, c). Adsorpcja Con A- FITC do PNIPAM- u w temperaturze $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) i $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (d). Adsorpcja LcH- TRITC do PNIPAM- u w temperaturze $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) i $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (e). Zdjęcia zarejestrowane w tych samych warunkach (czas zbierania 4s, próbki zanurzone w PBS). Rozmiar zdjęć (a, b, d, e) $1,75 \times 1,32\text{ mm}$.

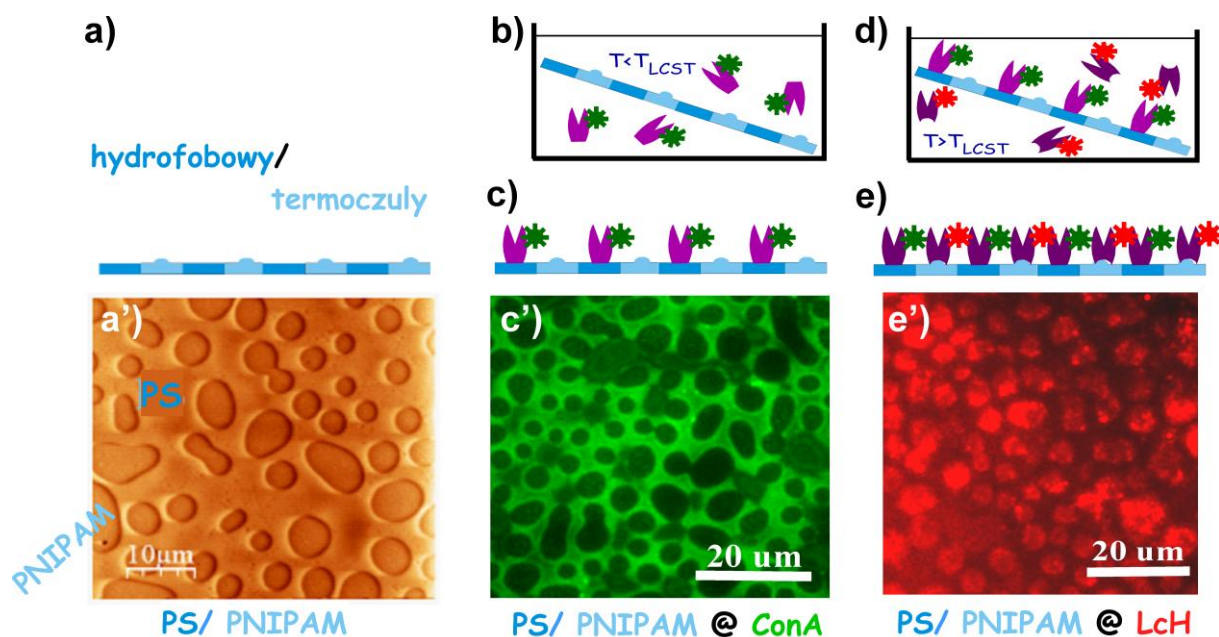
Wiedząc, że za adsorpcję białek odpowiadają głównie oddziaływania hydrofobowe^{5, 7-9,14} wyniki pomiarów kąta zwilżenia skonfrontowano z adsorpcją znakowanych fluorescencyjnie lektyn Con A i LcH do tych podłoży. Na rysunku 3.27 a, b przedstawiono obrazy obserwowane mikroskopem fluorescencyjnym po ekspozycji podłoża PNIPAM do roztworów białek w temperaturze $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C} < T_c$ (PNIPAM). Czarne zdjęcia świadczą o braku zaadsorbowanych do powierzchni molekuł Con A i LcH, a więc potwierdzają hydrofilowy stan podłoża. Zupełnie inny obraz widzimy na zdjęciach fluorescencyjnych zarejestrowanych dla podłoża PNIPAM eksponowanych na roztwory białek w temperaturze $38\text{ }^{\circ}\text{C}$, czyli temperaturze wyższej od T_c (PNIPAM) (rysunek 3.27 d, e). Na rysunku 3.27 d widoczna jest intensywna fluorescencja zielona Con A znakowanej FITC, a na rysunku 3.27 e widoczna jest, również intensywna, fluorescencja czerwona LcH znakowanego TRITC. Fakt, że lektyny zaadsorbowały do powierzchni PNIPAM- u w temperaturze powyżej $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ potwierdza hydrofobowy charakter podłoża.

3.2.2.4.2. Mikro- wzory białek na PS/ PNIPAM.

Wyniki pomiarów kąta zwilżania i jednordnej adsorpcji białek do warstw PNIPAM- u oraz wyniki adsorpcji lektyn do jednordnych powierzchni PS opisane w rozdziale 3.1.1, zachęciły do wytworzenia powierzchniowych wzorów PS/ PNIPAM, w celu zastosowania ich do wytworzenia mikro- macierzy białek.

Wzory powierzchniowe PS/ PNIPAM powstały w procesie samo- organizacji w czasie spin-castingu. Separacja fazowa indukowana odparowywaniem rozpuszczalnika spowodowała powstanie izotropowego wzoru powierzchniowego domen różnych faz polimerowych. Warstwy PS/ PNIPAM zostały usieciowane promieniowaniem UV, aby zapobiec rozpuszczeniu się PNIPAM- u w procesie deponowania wodnych roztworów białek.

Na rysunku 3.28 (lewy panel) pokazano obraz LFM, na którym widoczne są zmiany w tarcu powierzchniowym wynikające z domenowej budowy powierzchni czyli obecności faz PS i PNIPAM.



Rysunek 3. 28 Mikro- macierz wielu białek: Con A- FITC i LcH- TRITC, widocznych na obrazach fluorescencyjnych odpowiednio (c') i (e'), wytworzone metodą sukcesywnej selektywnej adsorpcji białek (b, d) do wzorów powierzchniowych hydrofobowego polistyrenu 9tworzącego matrycę) i termo- czułego poli(N- izopropylakrylamidu) (tworzącego wypsy) o morfologii widocznej na obrazie LFM (a).

Usieciowane wzory powierzchniowe PS/ PNIPAM posłużyły jako szablony do wytworzenia mikro- macierzy wielu białek, przez zastosowanie dwu- etapowej selektywnej adsorpcji lektyn: Con A- FITC oraz LcH- TRITC. Reprezentatywne obrazy zaadsorbowanych, znakowanych fluorescencyjnie lektyn oraz schemat postępowania pokazane są na rysunku 3.28 b-e'. W pierwszym etapie przeprowadzono adsorpcję Con A- FITC w temperaturze pokojowej (rysunek 3.28 b). Odtworzenie jednej z faz polimerowych przez zaadsorbowane białka umożliwia identyfikację składników wzoru polimerowego, ponieważ zgodnie z oczekiwaniami wynikającymi z wcześniejszych badań (patrz sekcja 3.1.1 i 3.2.1) w tych warunkach Con A wiąże się do fazy PS. Porównując obraz fluorescencyjny zaadsorbowanej Con A (rysunek 3.28 c') z obrazem LFM wzoru polimerowego (rysunek 3.28 a'), jednoznacznie można stwierdzić, że szablon polimerowy składa się z domen termo- czułego PNIPAM-u w matrycy hydrofobowego PS. W kolejnym kroku podłoże PS/ PNIPAM z zaadsorbowaną Con A umieszczono w komorze w temperaturze 38 °C, gdzie przeprowadzono ekspozycję na roztwór drugiego białka (LcH- TRITC). Jak pokazano w sekcji 3.1.2 w temperaturze powyżej 32 °C PNIPAM zmienia własności na bardziej hydrofobowe, co zostało potwierdzone adsorpcją LcH- TRITC do wyspo- podobnych struktur wzoru polimerowego. Użyte tu podejście polegające na identyfikacji faz polimerów przez testowanie odtwarzania wzoru podłoża przez zaadsorbowane białka, zostało zaproponowane przez Bonduelle i in.^{19, 20}

3.2.2.5. Podsumowanie

W tej części pracy zaproponowano nową, stosunkowo łatwą i niedrogą metodę wytwarzania mikro- macierzy wielu białek opartą na sukcesywnej selektywnej adsorpcji lektyn do wzorów powierzchniowych cienkich warstw mieszanin polimerów hydrofobowych i termo- czułych.

Metodą spin- castingu przygotowano izotropowe wzory powierzchniowe hydrofobowego PS i termo- czułego PNIPAM- u. Przez sukcesywne pozycjonowanie Con A ($T = 20^{\circ}\text{C}$), a następnie LcH ($T = 38^{\circ}\text{C}$) uzyskano mikro- wzory dwóch znakowanych fluorescencyjnie białek na dużych obszarach. Takie mikro- wzory wielu białek można wykorzystać jako podłoża do hodowli komórek.²¹

Zademonstrowano sposób tworzenia pokryć PNIPAM nie przez tworzenie ich szczotek kowalencyjnie przytwierdzonych do powierzchni lecz przez odlewanie i usieciowienie cienkich warstw tego polimeru. Utworzone w ten sposób warstwy PNIPAM wykazują kontrolowane temperaturowo właściwości, takie jak zwilżalność i adsorpcja białka, porównywane do tych obserwowanych dla szczotek PNIPAM.

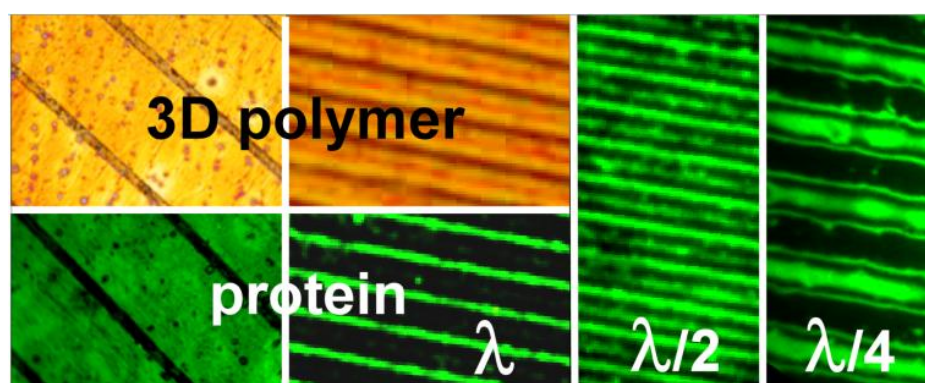
3.2.2.6. Literatura

- (1) Bernard, A.; Renault, J. P.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E. *Adv. Mater.* **2000**, 12, 1067.
- (2) Inerowicz, H. D.; Howell, S.; Regnier, F. E.; Reifenger, R. *Langmuir* **2002**, 18, 5263.
- (3) Chalmeau, J.; Thibault, C.; Carcenac, F.; Vieu, C. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 133901.
- (4) Eichinger, C. D.; Hsiao, T. W.; Hlady, V. *Langmuir* **2012**, 28, 2238–2243.
- (5) Morin, C.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L.; Urquhart, S. G.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2004**, 137–140, 785–794.
- (6) Sousa, A.; Sengonul, M.; Latour, R.; Kohn, J.; Libera, M. *Langmuir* **2006**, 22, 6286–6292.
- (7) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Robar, N.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 16763–16773.
- (8) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2150–2158.
- (9) Zemła, J.; Lekka, M.; Raczkowska, J.; Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2101–2109.
- (10) Budkowski, A.; Zemła, J.; Moons, E.; Awsuik, K.; Rysz, J.; Bernasik, A.; Björström-Svanström, C. M.; Lekka, M.; Jaczewska, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**
- (11) Gil, E. S.; Hudson, S. A. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 1173–1222.
- (12) Cooperstain, M. A.; Canavan, H. E. *Langmuir* **2010**, 26, 7695–7707.
- (13) Andrade, J. D.; Hlady, V. *Adv. Polym. Sci.* **1986**, 79, 1–63.
- (14) Zemła, J.; Lekka, M.; Wiltowska- Zuber, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J. *Langmuir* **2008**, 24, 10253–10258.
- (15) Schwarz, F. P.; Puri, K. D.; Bhat, R. G.; Surolia, A. *JBC* **1992**, 256, 7668–7677.
- (16) Schwarz, F. P.; Misquith, S.; Surolia, A. *Biochem. J.* **1996**, 316, 123–129.
- (17) Schild, H. G. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, 17, 163–249.
- (18) Cole, M. A.; Voelcker, N. H.; Thissen, H.; Griesser, H. *J Biomaterials* **2009**, 30, 1827–1850.
- (19) Bonduelle, C. V.; Gillies, E. R. *Macromolecules* **2010**, 43, 9230–9233.
- (20) Bonduelle, C. V.; Karamdoust, S.; Gillies, E. R. *Macromolecules* **2011**, 44, 6405–6415.
- (21) Persen, D.; Haviland, D. B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, 3, 543–548.

Rozdział 3.3

Mikro-macierze białka jako wynik jego grupowania przez regularne wzory domen na powierzchniach polimerów

3.3.1. Adsorpcja białka do powierzchni polimeru o regularnym kontraście adsorpcji wprowadzonym przez miękką litografię



3.3.1.1. Abstrakt

Zaprezentowano nowatorskie podejście, pozwalające na wytwarzanie mikro-wzorów białkowych o wielu różnych skalach przestrzennych na dużych obszarach, oparte na selektywnej adsorpcji białek do powierzchni warstwy polistyrenu zakończonego grupą aminową PS-NH₂ o strukturze topograficznej - wytworzonej za pomocą form elastomerowych (litografia sił kapilarnych) i o kontraście adsorpcji białek - wprowadzonym przez silany zawierające poli(tlenek etylenu) PEO i nadrukowane za pomocą płaskich pieczętek elastomerowych (odwrócony druk mikro-kontaktowy). Obrazy powierzchni zarejestrowane mikroskopem sił atomowych potwierdzają jednolitość składu warstw PS-NH₂ z pasami rowków i wzniesień występujących naprzemiennie z periodycznością $4 < \lambda < 200 \mu\text{m}$. Morfologia warstw, przed i po selektywnej adsorpcji modelowego białka (lektyny LcH znakowanej izotiocyanianem fluoresceiny), zobrażowana została, odpowiednio, mikroskopem optycznym i fluorescencyjnym. Analiza obrazów mikroskopowych (przeprowadzona także za pomocą

analizy Fouriera) pokazuje, że wysokie obszary periodycznego wzoru powierzchni PS-NH₂ są „odtworzone” jako ciemne lub jasne pasy na obrazach fluorescencyjnych dla wzniesień tworzących, odpowiednio, periodycznie powtarzające się płaskowyzę (szersze niż 3 μm) lub wąskie grzbiety. Ten odwrócony kontrast mikro-wzorów białkowych wynika ze zmiany geometrii struktury topograficznej PS-NH₂, co wpływa na powierzchniowy przepływ silanów PEO z płaskiej pieczętki do powierzchni polimeru zarówno w, jak i poza obszarami kontaktu w czasie stosowania druku mikro-kontaktowego. Substruktury białek o okresie równym frakcji λ/n periodyczności struktury topograficznej są obserwowane dla powierzchni polimeru z powtarzającymi się grzbiętami ($n=2$) i płaskowyzami ($n=2$ i 4). Wynika to z lokalnej modyfikacji adsorpcji białek przez różną koncentrację silanów oraz cechy topografii powierzchni.

3.3.1.2. Wstęp

W ostatnich latach mikro- wzory białkowe stały się przedmiotem wielu badań, głównie ze względu na szeroki i różnorodny zakres zastosowań w biomedycynie.¹⁻¹⁴ Specyficzne przestrzenne uporządkowanie białek, pogrupowanych w gęsto upakowane plamki na powierzchniach biosensorów, umożliwia równoczesną charakterystykę skomplikowanych procesów i materiałów biologicznych, stając się standardowym narzędziem dla analizy i diagnozy biomedycznej.^{1-3, 12-14} Mikro- wzory białkowe mogą także służyć jako podłoża dla niejednorodnej hodowli komórkowej, która umożliwia poznanie i kontrolowanie oddziaływań komórka- komórka oraz komórka- macierz zewnątrzkomórkowa¹⁵ oraz daje wgląd w procesy wzrostu, podziału i adhezji komórek.¹⁶

Ponieważ unikalne własności mikro- macierzy białkowych wynikają z kontrolowanego pozycjonowania białek, zaproponowano wiele metod przeznaczonych do precyzyjnego deponowania protein na obszarach o szerokim zakresie skali przestrzennych. Jedną z najbardziej rozwiniętych strategii jest selektywna adsorpcja białek do powierzchniowych wzorów polimerowych przygotowanych przy pomocy wielu technik, takich jak litografia, techniki mikro- przepływowe lub separacja fazowa mieszanek polimerowych.¹⁻¹⁹

Pośród licznych technik miękkiej litografii takich jak druk mikro-kontaktowy (μCP) czy mikro- formowanie warstw wspomagane rozpuszczalnikami (SAMIM)^{11, 20} stosowanych powszechnie w aplikacjach biologicznych, także mniej znane metody takie jak litografia sił kapilarnych (CFL)¹⁹ lub technika odwróconego druku mikro- kontaktowego (i- μCP)²¹⁻²³, są używane w dziedzinie biomedycyny.^{24, 25}

W tej części pracy prezentuję nowe podejście umożliwiające wytwarzanie wzorów białkowych, w wielu różnych skalach przestrzennych na rozległych obszarach warstw polimerowych. To podejście oparte jest na selektywnej adsorpcji białek do trójwymiarowych powierzchni warstwy polistyrenu zakończonego grupą aminową (PS- NH₂). Wytworzone techniką spin- castingu jednorodne cienkie warstwy PS- NH₂ zmodyfikowano w procesie dwustopniowym. W pierwszym kroku, warstwy PS- NH₂ ustrukturyzowano topograficznie w podwyższonej temperaturze stosując pieczętki elastomerowe o zadanym wzorze (litografia sił kapilarnych CFL).¹⁹ W kroku drugim ustrukturyzowane warstwy PS-NH₂ były dekorowane silanami poli(tlenku etylenu) za pomocą płaskich pieczętek PDMS (odwrócony druk mikro- kontaktowy i- μCP)²¹⁻²³ w celu lokalnego zablokowania adsorpcji białek. Metoda modyfikacji podłoża oparta o dwustopniowe (CFL, i- μCP)

międko litograficzne podejście jest zademonstrowana przy użyciu modelowego białka – znakowanej fluorescencyjnie lektyny soczewicy (LcH).

Biokompatybilna natura PEO, nietoksycznego i nie immunogennego polimeru jest dobrze udokumentowana. Dlatego też silany- PEO (szczepione łańcuchy PEO) są powszechnie używane w celu zminimalizowania czy szablonowania według wzorów^{4, 8, 30, 31} procesów adsorpcji²⁶⁻²⁹ i kowalencyjnego wiązania białek⁸ czy adhezji białek⁴. Stosowano również grupowanie szczotek PEO przez nadrukowywanie ich na powierzchnię polistyrenu bogatą w PS- NH₂.⁸

Ponieważ drukowanie cząstek za pomocą pieczętek elastomerowych jest powszechnie używane, dlatego cechy które mogą ograniczać lub rozszerzyć tę metodę są ogromnie ważne.³²⁻³⁶ Na przykład kontrast chemiczny, który jest wyjątkowo czuły na geometrię kontaktu pieczętka-powierzchnia wpływa na mało- i wielko- obszarowe wzory drukowane jednocześnie za pomocą tioli na złocie.³² W tym rozdziale przedstawiony jest podobny efekt występujący dla silanów PEO nadrukowanych na PS- NH₂ gdzie kontrast chemiczny może zostać odwrócony. W konsekwencji podczas adsorpcji białek tworzone są mikro- wzory ‘odtworzące’ odpowiednio rowki lub wzniesienia oryginalnego wzoru topografii polimeru o charakterystycznych płaskowyzach (szersze niż 3 μm) lub wąskich grzbietach. Pokazane jest także, że oprócz odwróconego kontrastu takie mikro- wzory białkowe odpowiadające substrukturom o periodyczności równej ułamkowi periodyczności topografii mogą być wytworzone za pomocą prezentowanej tu dwu- stopniowej metody międko litograficznej.

Jak dotąd, ani zjawisko odwróconego kontrastu, ani wytworzenie regularnych substruktur nie były obserwowane podczas wytwarzania mikro- wzorów białkowych na strukturyzowanej powierzchni polimerowej.

Selektywna adsorpcja białek do powierzchniowych domen polimerów silnie zależy od eksperymentalnych szczegółów zarówno tworzenia kontrastu chemicznego jak i adsorpcji białek. Modyfikowane warunki spin- castingu i późniejszej obróbki mogą prowadzić do drastycznego osłabienia (porównaj referencje [40], [11]) lub nawet do odwrócenia selektywnej adsorpcji (porównaj referencje [41], [11]). Natomiast selektywna adsorpcja protein może być zatrzymana jeśli koncentracja białek lub czas inkubacji wzrośnie o rząd wielkości.¹⁰ Ten rozdział jest poświęcony analizie mechanizmów modyfikujących powierzchnię polimeru, prowadzących do tworzenia wzorów przez zaadsorbowane białka.

3.3.1.3. Materiały i metody

3.3.1.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych.

Cienkie warstwy polistyrenu zakończonego grupą aminową (PS- NH₂, M_w= 17 000, PI = 1,3, zakupione w Polymer Standard Service, Mainz) zostały przygotowane metodą spin- castingu (prędkość wirowania ω= 1k rpm, czas t= 30 s) czyli wylania roztworu PS- NH₂ i toluenu (koncentracja polimeru c_p= 20 mg/ mL) na podłoża SiO_x.

Następnie w warstwach PS- NH₂ wytworzono struktury topograficzne przez użycie litografii sił kapilarnych (dokładny opis procedury w referencji [19]). Pieczętkę elastomerową z wzorem,

wykonaną z poli(dimetylosiloksanu) PDMS, umieszczono na powierzchni polimerowej przez czas $t = 30$ min w temperaturze $T = 120^{\circ}\text{C}$, co skutkowało wytworzeniem trójwymiarowego wzoru w formie naprzemiennych pasów rowków i wzniesień o periodyczności λ zmieniającej się od 4 do 200 μm . Trójwymiarowe wzory polimerowe ze strukturami wysokimi w formie płaskowyżów (szerokość $w > 3$ μm) lub wąskich grzbietów ($w \leq 3$ μm) zostały wyprodukowane przy użyciu różnych pieczętek PDMS.

Aby otrzymać chemiczny kontrast na trójwymiarowe powierzchnie PS- NH_2 nadrukowano silany- PEO⁸ używając techniki odwróconego druku mikro- kontaktowego (szczegóły procedury w referencjach [21], [22]). Płaska pieczętka PDMS po pokryciu jej warstwą 2 % (frakcja objętościowa) roztworu etanolu i silanu $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Si}$ (ABSR GmbH&Co.KG, Karlsruhe) została przyłożona do powierzchni trójwymiarowego wzoru polimerowego na czas $t = 30$ min. Najpierw powierzchnia płaskiej pieczętki PDMS (o wymiarach 1,5 x 2,0 cm i wadze 1,5 g) była zwilżana roztworem silanów- PEO za pomocą bawełnianego patyczka (nasączonego $\sim 0,1$ mL roztworu) przez 5 s. Koncentracja roztworu (wielokrotnego użytku) mogła się zmienić maksymalnie o 10 % jego nominalnej wartości (przez parowanie). Stopień zwilżania pieczętki został określony przez pomiar kąta zwilżania etanolem, którego wartość wyniosła $22,9^{\circ}$. Następnie zwilżona pieczętka PDMS została ręcznie umieszczona na powierzchni trójwymiarowego wzoru polimerowego i zostawiona w kontakcie z powierzchnią próbki przez 20 min (wywierając ciśnienie ~ 50 Pa). Aby zapewnić dobry kontakt między polimerowym podłożem a płaską pieczętką PDMS, ta ostatnia została dodatkowo dociśnięta (zaraz po nałożeniu) pincetą przez 10 s (dodatkowe ciśnienie ~ 6 kPa). Przed adsorpcją białek, podłoża zostały przepłukane wodą dejonizowaną DI i wysuszone słabym strumieniem azotu.

3.3.1.3.2. Adsorpcja białek.

Lektyna soczewicy z *Lens culinaris* (LcH, Biokom, Polska) znakowana fluorescencyjnie izotiocyanianem fluoresceiny (FITC), została użyta jako białko modelowe. Trójwymiarowe powierzchnie polimerowe (topograficznie ustrukturyzowane PS- NH_2 częściowo pokryte silanami- PEO) pokryto roztworem białka i soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS; pH= 7,4; Sigma) o koncentracji $c_{\text{LcH}} = 41,5$ mg/ mL przez czas inkubacji wynoszący $t = 10$ min, a następnie ostrożnie spłukane wodą dejonizowaną.¹ Próbkę przed badaniem mikroskopem fluorescencyjnym zostały osuszone w desykatorze.

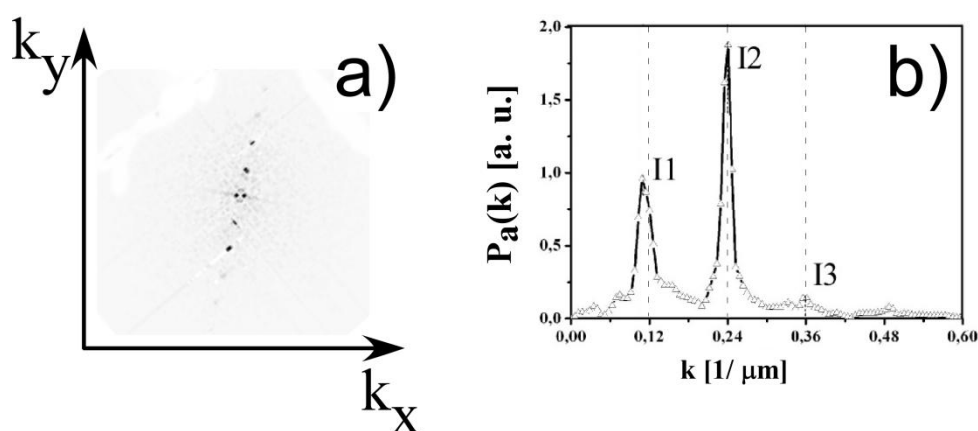
3.3.1.3.3. Charakterystyka próbek.

Zarówno topografia jak i skład podłoży polimerowych był obrazowany zarówno mikroskopem optycznym jak i mikroskopem sił atomowych. Obrazy topograficzne i fazowe zarejestrowano w powietrzu w temperaturze pokojowej mikroskopami AFM pracującymi w trybie bezkontaktowym (MultiView 1000 firmy Nanonics Imaging Ltd., Agilent 5500).

Adsorpcja białek do podłoży polimerowych została zbadana przy użyciu mikroskopu optycznego Olympus BX51, wyposażonego w 100 W lampę halogenkową oraz filtry U- MNB2 ($\lambda_{\text{ex}} = 470\text{--}490$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 510$ nm) i U- MNG2 ($\lambda_{\text{ex}} = 530\text{--}550$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 580$ nm) oraz obiektyw (UplanApo) o powiększeniu 40x. Wszystkie obrazy zarejestrowano dla suchych próbek. Obrazy te zarejestrowano kamerą cyfrową XC50 oraz używając programu CELL[^]F.

3.3.1.3.4. Analiza obrazów.

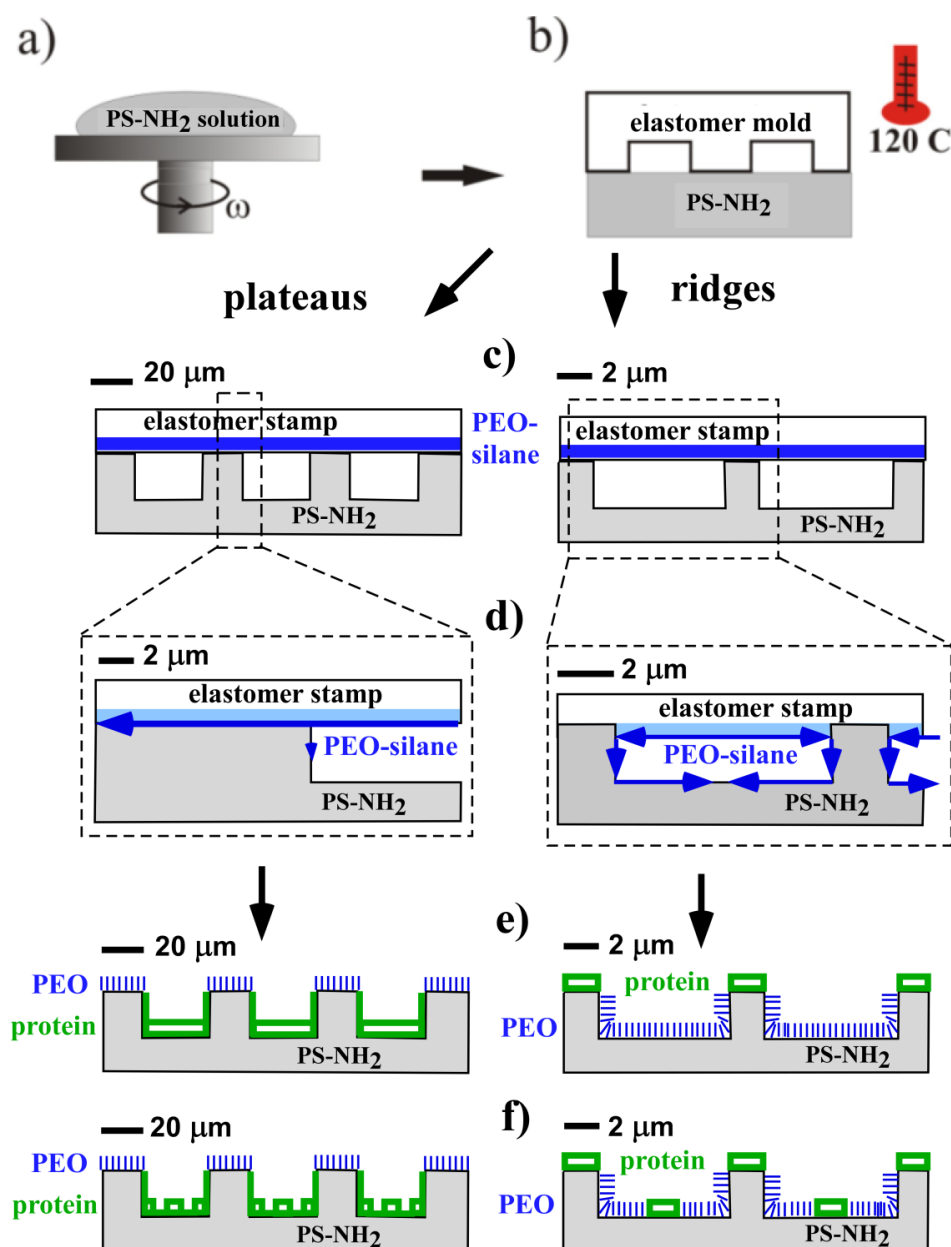
Obrazy fluorescencyjne zaadsorbowanych białek były analizowane numerycznie przez zastosowanie analizy Fouriera FFT. Do analizy użyto oprogramowania przygotowanego w naszym laboratorium.³⁷⁻³⁹ Dla każdego obrazka została wygenerowana jego 2- dim transformata Fouriera (rysunek 3.29). Każde spektrum FFT składa się z, leżących w jednej linii, mocnych maksimów dyfrakcyjnych o położeniu $k = nk_\lambda$ (n - liczba całkowita, $|k_\lambda| = 1/\lambda$). Kwadrat amplitud FFT obszaru k , tworzący wąski pasek leżący wzdłuż maksimów nk_λ , został uśredniony aby otrzymać całkowite spektrum potęgowe $P(k)$. Składowa izotropowa tego spektrum, zdefiniowana przez dane uśrednione radialnie dla płaszczyzny k bez pasa nk_λ , została odjęta od $P(k)$ aby otrzymać widmo składowej anizotropowej $P_a(k)$. Widmo $P_a(k)$ (rysunek 3.29 b) składa się z kilku maksimów leżących w pozycji nk_λ , których absolutna i relatywna intensywność wynoszą odpowiednio $J_n = J(nk_\lambda)$ i $I_n = J_n / \sum_m J_m$.



Rysunek 3. 29 Analiza za pomocą szybkiej transformacji Fouriera (FFT) (a) obrazu fluorescencyjnego (pokazanego na rysunku 3.34 a) i odpowiadająca mu składowa anizotropowa $P_a(k)$ całkowitego spektrum potęgowego. I_n oznacza względne natężenie maksimów w pozycjach nk_λ i odzwierciedla wkład modu strukturalnego o częstotliwości λ/n do morfologii wzoru białek.

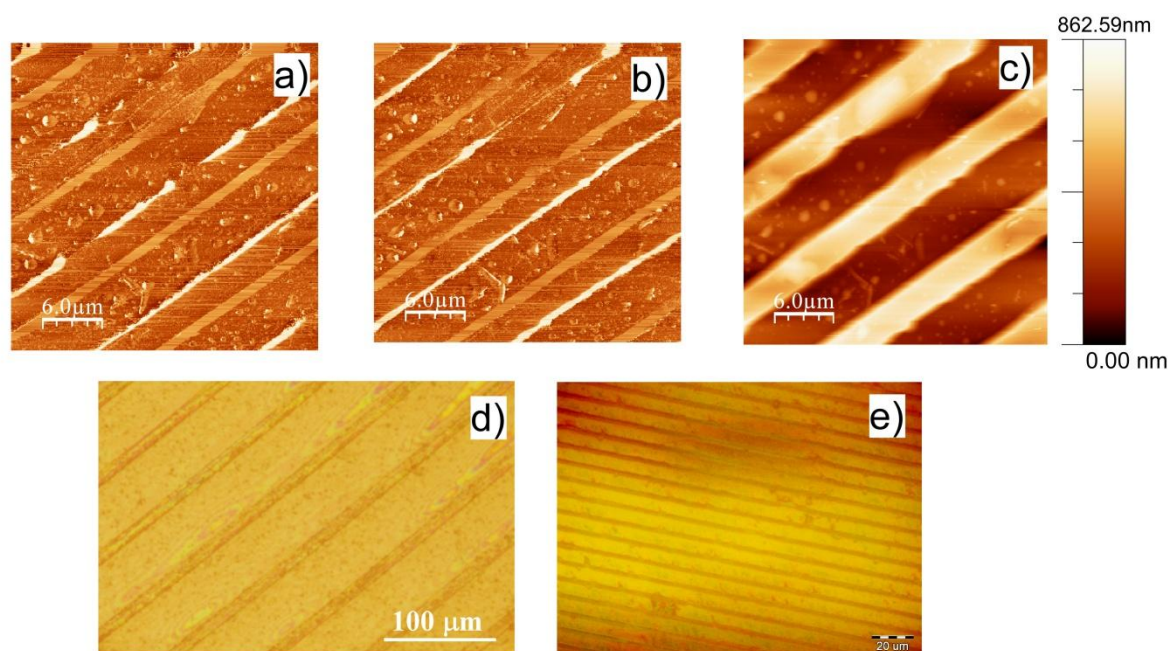
3.3.1.4. Wyniki

Dwustopniowe zastosowanie technik miękkiej litografii zostało wykorzystane do wytworzenia 3-dim wzorów polimerowych. Najpierw w uzyskanych techniką spin-castingu warstwach polistyrenu z grupami aminowymi (rysunek 3.30 a) wytworzono strukturę topograficzną za pomocą pieczętek elastomerowych używając litografii sił kapilarnych (rysunek 3.30 b).¹⁹ Następnie, tak przygotowane powierzchnie polimerowe udekorowano, za pomocą płaskiej pieczętki PDMS, silanami- PEO (technika odwróconego druku mikro- kontaktowego), tak aby zablokować lokalnie niespecyficzną adsorpcję białek (rysunek 3.30 c).²¹⁻²³



Rysunek 3. 30 Schematyczne przedstawienie zjawiska odwróconego kontrastu (e) i wytwarzania substruktur (f), opartych na selektywnej adsorpcji białek do 3- dim powierzchni polimerowej polistyrenu z grupami aminowymi wytworzonej metodą spin-castingu (a) o topografii uformowanej techniką litografii sił kapilarnych (CFL) (b) i lokalnie zmodyfikowanego, w celu zablokowania adsorpcji białek, warstwą silanów- PEO nałożoną techniką odwróconego druku mikro- kontaktowego i-μCP (c, d).

Podczas pierwszego kroku CFL, pieczętka PDMS o zadanym wzorze topografii została przyłożona do warstwy PS- NH₂ w temperaturze 120 °C, na skutek czego powstały trójwymiarowe wzory polimerowe zobrazowane mikroskopem AFM (rysunek 3.30 a-c) i optycznym (rysunek 3.30 d, e). Obrazy powierzchni AFM (rysunek 3.30 c) pokazują naprzemienne wysokie i niskie struktury w formie pasków. Natomiast zarejestrowane równocześnie z obrazami topograficznymi obrazy kontrastu fazowego (rysunek 3.31 a- trace i b- retrace obszaru pokazanego na rysunku 3.31 c) pokazują jednorodny skład podłoża (na obrazy wpływa jedynie topografia podłoża).



Rysunek 3. 31 Skład powierzchni (a, b – kontrast fazowy trace i retrace), topografia (c, AFM, trace, ten sam obszar co na a, b) oraz morfologia dużych obszarów próbek (d, e – obrazy z mikroskopu optycznego), o topografii wytworzonej (naprzemienne paski wysokie i niskie) techniką litografii sił kapilarnych warstw polimerowych PS- NH₂. Struktury wysokie mogą tworzyć grzbiety (o szerokości wś 3 μm; a-c, e) lub płaskowyrze (w> 3 μm, d). Obrazy (a-c) odpowiadają temu samemu topograficznemu wzorowi polimerowemu co (e). Ciemne obszary obrazów optycznych odpowiadają strukturom wysokim (porównaj c, e).

Porównanie obrazów tego samego wzoru polimerowego zarejestrowanych mikroskopem sił atomowych (rysunek 3.31 c) oraz optycznym (rysunek 3.31 e) pokazuje, że strukturom wysokim (tutaj węższym) na obrazach z mikroskopu optycznego odpowiadają ciemniejsze paski. Ponadto obrazy optyczne ukazują dwa typy wytworzonych metodą CFL, przy użyciu różnych pieczętek PDMS, 3-dim powierzchni (rysunek 3.31 d, e). Zawsze wzór polimerowy składa się z naprzemiennie występujących rowków i wzniesień, ale struktury wysokie tworzą szersze niż 3 μm płaskowyrze (rysunek 3.31 d i rysunek 3.30- lewy panel) lub wąskie grzbiety o szerokości w $\leq 3 \mu\text{m}$ (rysunek 3.31 i rysunek 3.30- prawy panel). Powyższe rozróżnienie geometrii wzorów powierzchniowych będzie istotne dla późniejszego modyfikowania powierzchni silanami- PEO techniką i-μCP (dystrybucja silanów), oraz tworzenia wzorów białkowych przez selektywną adsorpcję. Oba efekty geometrii trójwymiarowego wzoru topograficznego są dyskutowane w kolejnej części.

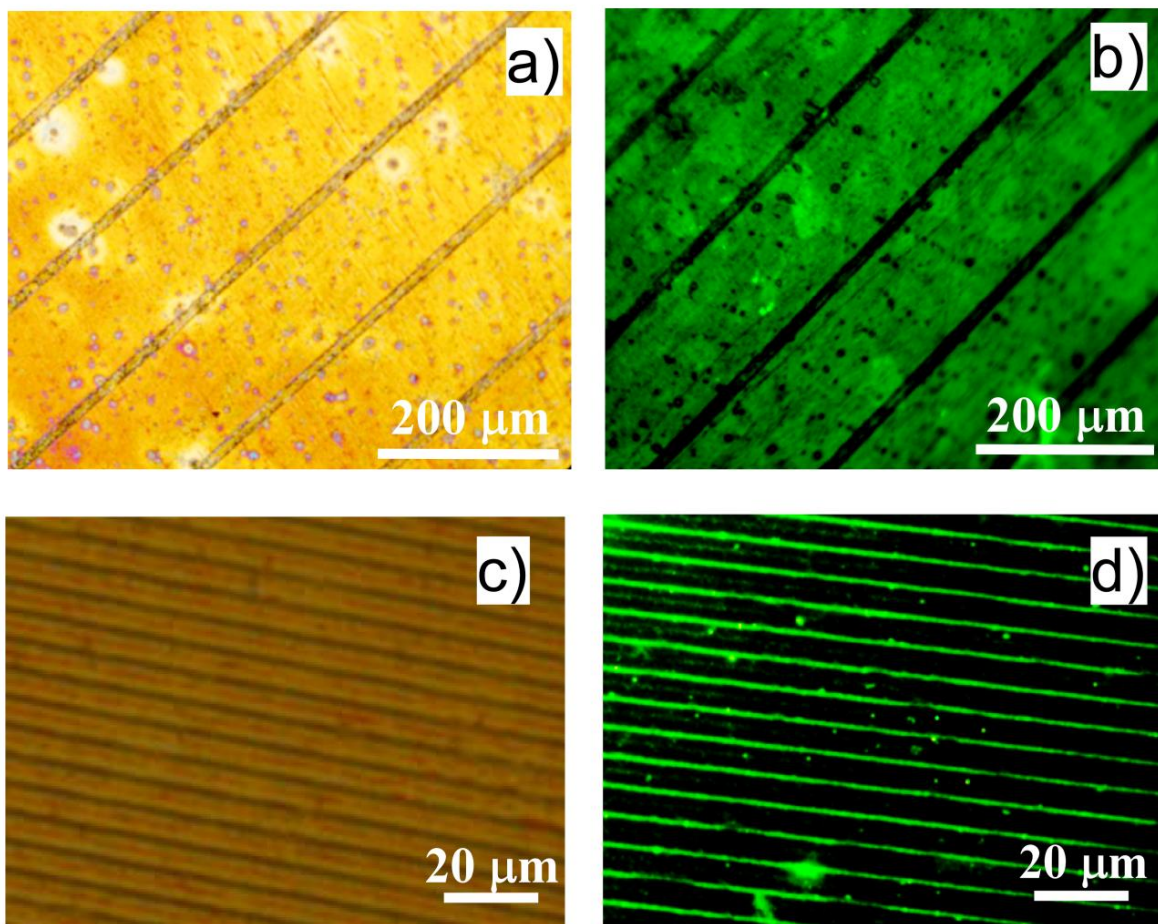
3.3.1.4.1. Mikro-wzory białkowe o odwróconym kontraście

Efekt selektywnej adsorpcji znakowanej fluorescencyjnie lektyny soczewicy *lentil lectin* (LcH) do 3-dim wzorów polimerowych było wytworzenie regularnych mikro-wzorów białkowych. Jakość otrzymanych wzorów, uzyskanych dla powierzchni polimerów o różnej rzeźbie topograficznej, jest potwierdzona obrazami fluorescencyjnymi (rysunek 3.32 b, d). Zaskakującą cechą można zaobserwować porównując morfologię wzorów fluorescencyjnych białek z morfologią 3-dim wzorów polimerowych widoczną na obrazach z mikroskopu optycznego (rysunek 3.32 a, c). Dla wzoru polimerowego ze wzniesieniami wysokimi tworzącymi płaskowyrze (ciemne paski – rysunek 3.32 a) białka adsorbują selektywnie w rowkach (jaśniejsze paski- rysunek 3.32 b). Natomiast dla wzniesień w formie wąskich grzbiętów tj. o szerokości w $\leq 3 \mu\text{m}$ (ciemniejsze paski- rysunek 3.32 c), znakowane fluorescencyjnie molekuly lektyn gromadzą się na powierzchni struktur wysokich, a nie niskich

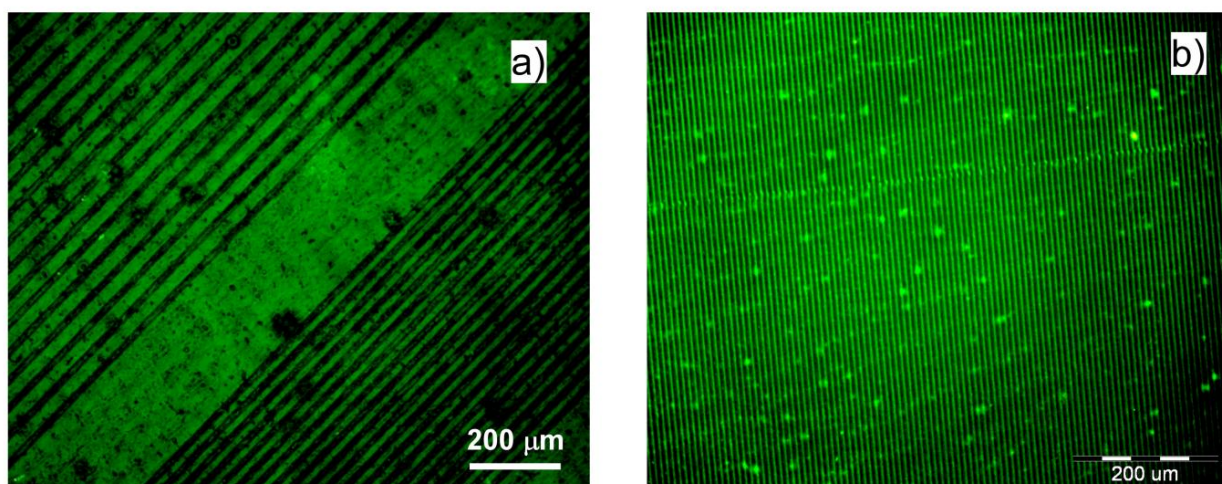
(jaśniejsze paski- rysunek 3.32 d). Zaobserwowany tutaj odwrócony kontrast mikro-wzorów białkowych obejmuje swoim zasięgiem duże obszary (sięgające do 0,9 mm), gdzie lektyny adsorbują selektywnie do rowków (rysunek 3.33 a) lub wzniesień (rysunek 3.33 b) w zależności od geometrii wzoru polimerowego. Zaproponowane podejście, z wielokrotnym zastosowaniem technik miękkiej litografii, pozwala na wytwarzanie mikro-wzorów białkowych o różnej periodyczności λ (patrz rysunek 3.33 gdzie λ wynosi odpowiednio 8, 45 i 75 μm), w dodatku do odwróconego kontrastu co czyni go obiecującą techniką w aspekcie zastosowań biomedycznych.

Dla dalszej analizy odwrócenia kontrastu przez mikro-wzory białkowe warto przypomnieć, że powierzchnie pokryte PEO są odporne na adsorpcję białek, co wynika z efektów sterycznych i mobilności łańcuchów PEO.⁴² Zatem podczas gdy szczepione łańcuchy PEO (silany- PEO) mogą zablokować adsorpcję protein^{4, 27, 29, 31} te same łańcuchy PEO, ale o niższej gęstości powierzchniowej (np. tworzące odseparowane grzybki) nie mogą zapobiec adsorpcji, co ostatnio zostało opisane w [30]. Z tego powodu odwrócony kontrast mikro-wzorów białkowych, wytworzonych przez selektywną adsorpcję, musi być związany z inwersją obszarów reliefu polimerowego z dużą gęstością silanów PEO.

Obszary o wysokim stopniu pokrycia PEO powstają na wzniesieniach i w rowkach topograficznego wzoru polimerowego o charakterystycznych płaskowyżach (porównaj rysunki lewy panel 3.30 e, 3.32 a, b) oraz grzbietach (rysunek 3.30 e- prawy panel, 3.32 c, d). Odpowiednio w obu przypadkach silany- PEO zostały nadrukowane tą samą techniką i- μCP . Zatem odwrócenie kontrastu chemicznego musi być spowodowane zmianą geometrii kontaktu między płaską pieczętką PDMS (pieczętka i- μCP) a 3-dim powierzchnią polimerową, o szerokich (płaskowyże, lewy panel na rysunku 3.30 c, d) lub wąskich (grzbiety, prawy panel na rysunku 3.30 c, d) wzniesieniach. Geometria w strefie kontaktu pieczątek może wpływać na sposób rozprzodzenia roztworu silanów z pieczątki do podłoża, jak zaobserwowano wcześniej dla nadrukowanych na złoto alkanotiolei.³² To wskazuje, że transport roztworu silanów-PEO wzdłuż powierzchni pieczątki i podłoża jest najważniejszym mechanizmem rozprzodzenia, ważniejszym niż transport silanów z ich pary czy dyfuzja z wnętrza pieczątki PDMS.³² Można sądzić, że praktycznie cała objętość roztworu silanów- PEO naniesionego na pieczętkę jest zatrzymywana przez obszary płaskowyżów ($w > 3 \mu\text{m}$) nie zostawiając nic dla obszarów obniżonych (rysunek 3.30 d- lewy panel). Odwrotną sytuację zaobserwowano dla wzorów polimerowych o wąskich grzbietach. Tutaj molekuly silanów- PEO transportowane są do obszarów niskich, także w rejony odległe od stref kontaktu (Rysunek 3.30 d- prawy panel). W dodatku przepływ roztworu silanów- PEO jest tu tylko w niewielkim stopniu modyfikowany przez szczyty grzbietów z powodu lepszego kontaktu (wyższe ciśnienie kontaktowe). Dlatego też wąskie grzbiety po zastosowaniu techniki i- μCP pozostają ubogie w molekuly SAM. Zaproponowany model opisujący odwrócony kontrast wydrukowanych silanów i zgrupowanych biomolekuł lektyn jest potwierdzony przez substrukтуры o połowie periodyczności reliefu, dyskutowane dalej.



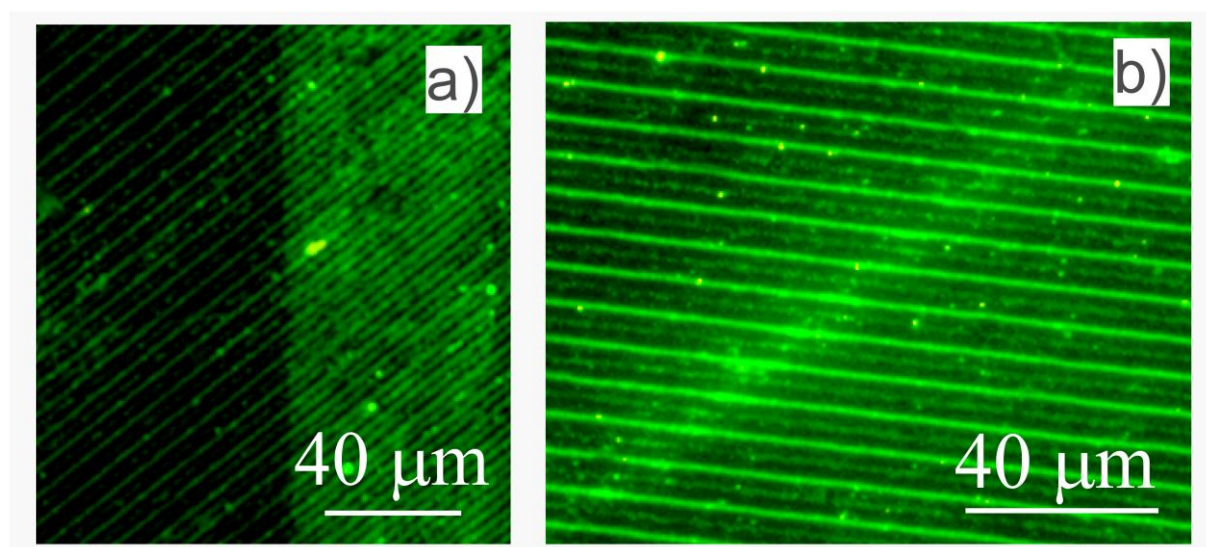
Rysunek 3. 32 Mikro-wzory białkowe o odwróconym kontraście. Obrazy fluorescencyjne (b, d) lektynach zaadsorbowanych do rowków (a, b) lub do wzniesień (c, d) topograficznych wzorów polimerowych wytworzonych z wzniesionymi płaskowyzami (a) lub wąskimi grzbietami (c). Struktury wysokie na obrazach z mikroskopu optycznego (a, c) są ciemniejsze (prównaj rysunek 3.31). Periodyczność wzorów polimerowych wynosi 180 μm (a, b) i 8 μm (c, d).



Rysunek 3. 33 Wzory lektyn LcH znakowanych fluorescencyjnie wytworzone na dużych obszarach (sięgających > 0,9 mm) 3- dim wzoru polimerowego przez selektywną adsorpcję do rowków (a) lub grzbietów (b). Periodyczność pieczętki λ wynosi 45 μm (a, dolny prawy róg), 75 μm (a, górny lewy róg) i 8 μm (b).

3.3.1.4.2. Substruktury w mikro-wzorach białkowych.

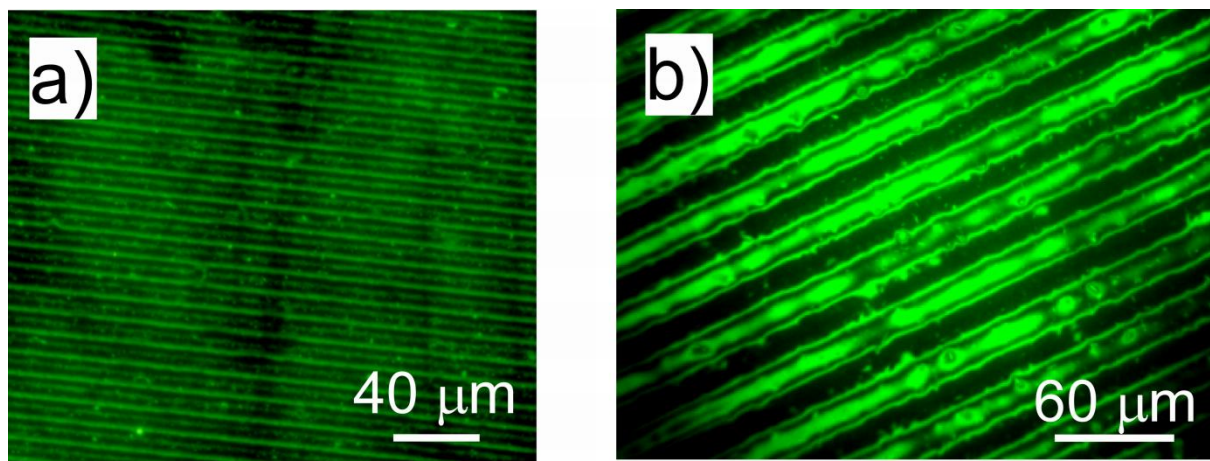
Dla polimerowego reliefu z wąskimi grzbietami, który jest udekorowany silanami- PEO przez selektywną adsorpcję zaobserwowano nowe zjawisko. Oprócz odtworzenia wzoru polimerowego o periodyczności λ zaadsorbowane białka dodatkowo utworzyły substruktury o periodyczności $\lambda/2$. Reprezentatywne obrazy fluorescencyjne zaadsorbowanych lektyn LcH (rysunek 3.34), pokazują że substruktury $\lambda/2$ mogą współistnieć ze strukturami pierwszorzędowymi jako odrębne obszary (rysunek 3.35 a) lub jako domeny białkowe o różnym wkładzie do morfologii wzorów białkowych (rysunek 3.34 a- po prawej, b). Pierwszorzędowa struktura wzorów białkowych powstaje przez adsorpcję lektyn do grzbietów wzoru polimerowego, które były w bezpośrednim kontakcie z, zwilżoną roztworem silanów- PEO, płaską powierzchnią pieczętki elastomerowej, skutkiem czego nie zostały pokryte warstwą SAM (rysunek 3.30 d, e- prawy panel). Efektywnie molekuly silanów- PEO dyfundowały po powierzchni z obszarów kontaktu do obszarów niskich poza kontaktem, blokując możliwość adsorpcji białek w tych obszarach. Wynika z tego, że substruktury $\lambda/2$ powstały w pasach o niewielkiej koncentracji molekuł SAM, położonych w równym odstępnie od sąsiednich stref kontaktu (rysunek 3.30 f- prawy panel). Pojawienie się tych pasów i ich kontrast w koncentracji silanów- PEO zależy od powierzchniowego strumienia silanów. Są więc bardzo czułe na sposób zwilżenia pieczętki PDMS roztworem silanów oraz na ciśnienie wywierane na pieczętkę. Różny wkład substruktur $\lambda/2$ do morfologii mikro-wzorów białkowych (rysunek 3.34 a, b) może wynikać z różnic w powierzchniowym strumieniu roztworu silanów modyfikowanym przez ilość użytego roztworu silanów, niejednorodności zwilżenia pieczętki tym roztworem lub z niejednorodnego kontaktu podczas i- μ CP (np. kiedy pieczętka jest krótko naciskana pincetą).³²



Rysunek 3. 34 Mikro-wzory białek z substrukturami $\lambda/2$ utworzonymi w dodatkach pasów odtwarzających polimerowe grzbiety o okresie $\lambda = 8 \mu\text{m}$. Obrazy fluorescencyjne zaadsorbowanych biomolekuł LcH- FITC pokazują współistnienie substruktur $\lambda/2$ i struktur pierwszego rzędu λ w osobnych obszarach (a) lub w postaci domen dających różny wkład do morfologii poprzecznie wydłużonych wzorów białkowych (b, prawa strona a).

Substruktury białkowe λ/n (n - liczba całkowita) odtwarzające topograficzne wzory polimerowe zaobserwowano nie tylko dla powierzchni o strukturach wysokich w formie wąskich grzbietów (rysunek 3.35 a) ale także dla tych z wysokimi strukturami w formie płaskowyzów (rysunek 3.35 b). Szerokość poprzecznie wydłużonych domen białkowych jest mniejsza w porównaniu z rozmiarem poprzecznym struktur wzoru polimerowego, zatem obserwuje się wzrost rozdzielczości

mikro-wzorów białkowych w porównaniu do matrycy litograficznej zastosowanej w technice CFL. Podczas gdy zaobserwowane struktury $\lambda/2$ są wyraźne dla obu typów wzorów polimerowych (rysunek 3.35 a, b) to dodatkowo w przypadku 3- dim powierzchni o wysokich płaskowyżach zaobserwowano substrukтуры o periodyczności $\lambda/4$ (rysunek 3.35 b).



Rysunek 3. 35 Fluorescencyjne obrazy mikro-wzorów białkowych LcH-FITC z wyraźnymi substrukturami $\lambda/2$ (a, b) oraz $\lambda/4$ (b). Ich rozmiar poprzeczny jest mniejszy niż rozmiar wąskich grzbietów (a) i płaskowyżów (b) topograficznych wzorów polimerowych.

Bardziej zasadnicza różnica pomiędzy substrukturami mikro-wzorów białkowych na obu typach reliefu polimerowego jest bardziej widoczna po dokładniejszej analizie obrazów fluorescencyjnych (rysunek 3.35 a, b) przedstawionych w formie cięć pokazujących profile średnich wartości natężenia fluorescencji (rysunek 3.36 e, h). W przypadku wzorów polimerowych o wąskich grzbietach ilość zaadsorbowanych biomolekuł (odzwierciedlona w intensywności fluorescencji) ma wyraźne minimum równe dla wszystkich obszarów pomiędzy strukturami pierwszego rzędu λ a substrukturami (rysunek 3.36 e). Natomiast dla struktur wysokich w formie płaskowyżów natężenie fluorescencji ma dwa lokalne minima: minimum o wyższej wartości intensywności odpowiada obszarom pomiędzy strukturami λ a substrukturami, podczas gdy drugie niskie minimum odpowiada obszarom pomiędzy równoodległymi grupami takich domen (rysunek 3.36 h). Ta różnica wynika z odmiennych mechanizmów tworzenia się substruktur białkowych. Dla reliefu o strukturach wysokich w formie grzbietów mikro-wzory białkowe o strukturach λ/n odtwarzają wzór chemiczny wytworzony przez wysokie pokrycie powierzchni przez silany- PEO jak jest to opisane powyżej. Natomiast substrukтуры białkowe zaobserwowane dla wzoru topograficznego z płaskowyżami powstały przez adsorpcję, modyfikowaną wewnątrz obszarów niskich wolnych od silanów (wyższe minima lokalne na rysunku 3.36 h) i zablokowaną silanami-PEO w obszarach płaskowyżów (niższe minima lokalne na rysunku 3.36 h). Na adsorpcję białek może wpływać topografia powierzchni.⁴³⁻⁴⁶ Może ona być nawet wzmocniona wzdłuż rowków.⁴⁷ Obserwowane tutaj zjawisko może mieć następujące wyjaśnienie: po początkowej adsorpcji do obszarów niskich poprzeczna mobilność białek⁸ prowadzi do zwiększenia końcowej obecności w rogach rowków (gdzie lokalne pole powierzchni jest większe), kosztem zaniku obecności białka na sąsiednich obszarach, oddzielających boczne rejony (rogi) rowków od ich pasów centralnych (rysunek 3.35 b i 3.35 h). Ten mechanizm podobny jest do efektu oczkowego (doughnut effect) zaobserwowanego w mikro-macierzach

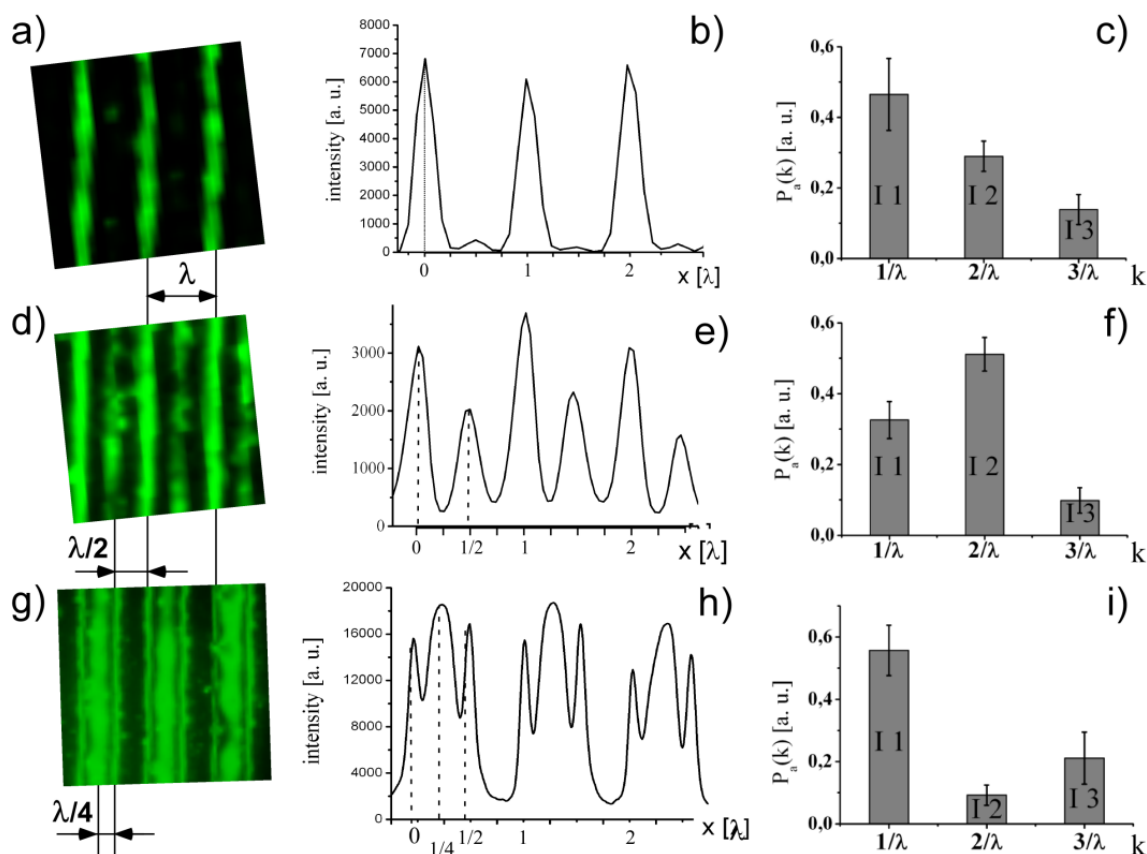
białkowych wytwarzanych techniką punktowania na płaskich podłożach, który polega na powstawaniu domen białkowych w formie pierścieni (bez centralnego maksimum).⁴⁹

3.3.1.4.3. Analiza Fouriera mikro-wzorów białkowych

Aby zbadać daleko- zasięgowe uporządkowanie domen białkowych tworzących mikro-wzory fluorescencyjne ich morfologie zbadano za pomocą analizy Fouriera (rysunek 3.29).³⁷⁻³⁹ Relatywne intensywności I_n opisujące piki widoczne w spektrum potęgowym $P_s(k)$ (rysunek 3.29 b) są użyte do określenia wkładu różnych modów strukturalnych (λ/n , n - liczba całkowita) do morfologii mikro-wzorów białek.

Aby porównać grupowanie protein na topograficznych wzorach polimerowych (o oryginalnej periodyczności λ) wyniki analizy Fouriera są pokazane (w formie histogramów relatywnych intensywności I_n) na rysunku 3.36 dla trzech typów mikro-macierzy białkowych: o strukturach pierwszego rzędu λ , (rysunek 3.36 a-c), substrukturach o periodyczności $\lambda/2$ (rysunek 3.36 d-f), i współlistniejących substrukturach $\lambda/2$ i $\lambda/4$ (rysunek 3.36 g-i). Uporządkowanie dalekiego zasięgu w przypadku wszystkich trzech typów mikro-wzorów białkowych jest odzwierciedlone przez niezerowe wartości intensywności fluorescencji I_n (rysunek 3.36 c, f, i). Jest ono również widoczne na profilach średniej wartości intensywności fluorescencji $\langle i(x, y) \rangle_y$ wyznaczonej prostopadle do kierunku pasków reliefu polimerowego (rysunek 3.36 b, e, h).

Dla mikro-wzorów białkowych o strukturze pierwszego rzędu λ (rysunek 3.36 a-c), profil $\langle i(x, y) \rangle_y$ składa się z 'komórek elementarnych' (przez analogię do krystalografii⁵⁰) o stałej λ i zawierającej jeden obszar pokryty białkami, z czego wynikają malejące wartości intensywności $I_1 > I_2 > I_3$ ze względu na przestrzenną rozpiętość pasów białkowych.^{50, 51} Natomiast mikro-wzory z widocznymi substrukturami $\lambda/2$ (rysunek 3.36 d-f) dają profil intensywności $\langle i(x, y) \rangle_y$ składający się z 'komórki elementarnej- λ' ' zawierającej dwa obszary: bogaty w zaadsorbowane białka i przesunięty o $\lambda/2$ rejon o mniejszej ilości białka. Skutkiem tego jest zredukowanie wartości intensywności I_1 struktury podstawowej poniżej wartości intensywności I_2 odzwierciedlającej mod strukturalny $\lambda/2$. W końcu, dla białek zgrupowanych we współlistniejące substruktury $\lambda/2$ i $\lambda/4$ (rysunek 3.36 g-i) profil intensywności $\langle i(x, y) \rangle_y$ składa się 'komórki' λ zawierającej trzy obszary bogate w LcH- FITC: dwie 'domeny' oddzielone o $\lambda/2$ zawierające mniejszą ilość biomolekuł i trzecią, bardziej wyraźną (prawie dwukrotnie), przesuniętą o $\lambda/4$. To specyficzne ułożenie pasów białka powoduje, że zaobserwowano bardzo słaby (bliski zeru) pik dyfrakcyjny $n= 2$, a co za tym idzie bardzo dużą intensywność piku I_1 podstawowego modu strukturalnego.



Rysunek 3.36 Wytworzone obszary (a, d, g) i uśrednione wzdłuż osi y wartości natężenia fluorescencji $\langle i(x, y) \rangle_y$ (b, e, h) obrazów fluorescencyjnych (rysunki 3.32 d, 3.35 a, 3.35 b) oraz wyniki analizy Fouriera (c, f, i) (histogramy względnych wartości natężeń fourierowskich I_n , zdefiniowane na rysunku 3.29, wraz z zaznaczonymi niepewnościami pomiarowymi, obliczone dla kilku obrazów ($n \geq 3$), odpowiadają mikro-wzorom białkowym o strukturze pierwszego rzędu λ (a-c), wyraźnych domenach substrukturach $\lambda/2$ (d-f) oraz widocznych substrukturach $\lambda/2$ i $\lambda/4$ (g-i). Niepewności pomiarowe (c, f, i) obliczono z odchylenia standardowego.

3.3.1.5. Wnioski

3-dim powierzchnie polimerowe o naprzemiennych pasiastych rowkach i wzniesieniach wytworzone techniką litografii sił kapilarnych (CFL)¹⁹ (o periodyczności $4 < \lambda < 200 \mu\text{m}$) i zmodyfikowane chemicznie przez nadrukowanie silanów- PEO techniką odwróconego druku mikro-kontaktowego (i- μCP)²¹⁻²³ zostały użyte jako podłoża do selektywnej adsorpcji modelowego białka- znakowanej fluorescencyjnie lektyny soczewicy (LcH). W ten sposób wytworzono mikro-wzory białkowe o *odwróconym kontraście* z zaadsorbowanymi lektynami odwzorowującymi powierzchnie wgłębień lub wzniesień wzoru polimerowego w zależności od geometrii obszarów wysokich tj. odpowiednio dla płaskowyzów lub wąskich grzbietów. Wynika to z chemicznego kontrastu powstającego w trakcie i- μCP , w czasie którego następuje transfer molekuł silanów-PEO, silnie zależny od geometrii wzoru polimerowego i kontaktu pomiędzy zwilżoną pieczętką a substratem. Ten ważny dla technik druku molekularnego efekt jest zgodny z wcześniejszymi badaniami.³²

Substruktury białkowe o frakcji λ/n periodyczności wzoru polimerowego powstają również według zaprezentowanego modelu. Dominujące substruktury $\lambda/2$ oraz współistniejące substruktury $\lambda/2$ i $\lambda/4$ wytworzono dla struktur wysokich odpowiednio w postaci grzbietów i płaskowyzów. Rozpoznano dwa mechanizmy wytwarzania substruktur, które związane są z różną adsorpcją białek

wynikającą z modyfikacji chemicznego kontrastu podłoża ³² lub topografii powierzchni. ⁴⁷ Domeny lektyn wytworzone w formie substruktur są mniejsze od elementów reliefu polimerowego. Zatem rozdzielczość mikro-wzorów białkowych jest lepsza od rozdzielczości pieczętki litograficznej (pieczętka CFL).

Analiza Fouriera potwierdziła uporządkowanie dalekiego zasięgu domen białkowych we wszystkich wytworzonych typach mikro-wzorów białkowych: o strukturze pierwszego rzędu λ , o substrukturach $\lambda/2$ i o współistniejących substrukturach $\lambda/2$ i $\lambda/4$. Ponadto specyficzny sposób regularnego uporządkowania domen białkowych na 3- dim powierzchniach polimerów jest widoczny na profilach średniej intensywności fluorescencji.

Wszystkie cechy (uporządkowanie dalekiego zasięgu, szeroki zakres skali przestrzennej, odwrócony kontrast, regularne substrukтуры) wytworzonych mikro-wzorów białkowych za pomocą pokazanego podejścia, stosującego techniki miękkiej litografii, sprawiają że tą metodę można potencjalnie wykorzystać do produkcji powierzchni nadających się dla zastosowań biomedycznych (np. do niejednorodnej hodowli komórek).

3.3.1.6. Literatura

- (1) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1775.
- (2) L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4025.
- (3) B. Kannan, K. Castelino, F.F. Chen, A. Majumdar, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1960.
- (4) Z.R. Taylor, K. Patel, T.G. Spain, J.C. Keay, J.D. Jernigen, E.S. Sanchez, B.P. Grady, M.B. Johnson, D.W. Schmidtke, *Langmuir* 25 (2009) 10932.
- (5) H. Nandivada, H.Y. Chen, Y. Elkasabi, J. Lahann, *Polym. Biomed. Appl.* 977 (2007) 283.
- (6) Senaratne, W.; Andruzzi, L.; Ober, C. K. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2427–2448.
- (7) R.S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D.E. Ingber, G.M. Whitesides, *Biomaterials* 20 (1999) 2363.
- (8) Y. Zhang, C. Wang, *Adv. Mater.* 19 (2007) 913.
- (9) Morin, C.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L.; Urquhart, S. G.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2004**, 137-140, 785–794.
- (10) Li, L.; Hitchcock, A. P.; Robar, N.; Cornelius, R.; Brash, J. L.; Scholl, A.; Doran, A. J. *Phys. Chem. B* **2006**, 110, 16763–16773.
- (11) J. Zemła, M. Lekka, J. Raczowska, A. Bernasik, J. Rysz, A. Budkowski, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2101.
- (12) P. Angedent, *DDT* 10 (2005) 503.
- (13) K.L. Christman, H.D. Maynard, *Langmuir* 21 (2005) 8389.
- (14) A.I. Hook, D.G. Anderson, R. Langer, P. Williams, M.C. Davies, M.R. Alexander, *Biomaterials* 31 (2010) 187.
- (15) W.F. Liu, C.S. Chen, *Mater. Today* 8 (2005) 28.
- (16) G. Kumar, C.C. Ho, C.C. Co, *Adv. Mater.* 19 (2007) 1084.
- (17) F. Brétagne, A. Valsesia, T. Sasaki, G. Ceccone, P. Colpo, F. Rossi, *Adv. Mater.* 19 (2007) 1947.
- (18) I. Ionov, A. Synytska, S. Diez, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 1501.
- (19) K.Y. Suh, Y.S. Kim, H.H. Lee, *Adv. Mater.* 13 (2001) 1386.
- (20) D.B. Weibel, W.R. DiLuzio, G.M. Whitesides, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 209.
- (21) M.R. Dusseiller, D. Schlaepfer, M. Koch, R. Kroschewski, M. Textor, *Biomaterials* 26 (2005) 5917.
- (22) A. Embrechts, C.L. Feng, C.A. Mills, M. Lee, I. Bredebusch, J. Schneckeburger, W. Domschke, G.J. Vancso, H. Schönherr, *Langmuir* 24 (2008) 8841.
- (23) Y. Harada, G.S. Girolami, R.G. Nuzco, *Langmuir* 20 (2004) 10878.
- (24) K.Y. Suh, M.C. Park, P. Kim, *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 2699.
- (25) P.J. Yoo, *Methods Mol. Biol.* 671 (2011) 147.
- (26) S. Park, H.C. Kim, T.D. Chung, *Biochip J.* 1 (2007) 98.
- (27) D.J. Bell, J.P. Brody, P. Yager, *SPIE Proc.* 3258 (1998) 134.
- (28) V. Sharma, M. Dhayal, Govind, S.M. Shivaprasad, S.C. Jain, *Vacuum* 81 (2007) 1094.
- (29) K.C. Popat, S. Sharma, R.W. Johnson, T.A. Desai, *Surf. Interface Anal.* 35 (2003) 205.

- (30) K. Vasilev, A. Mierczynska, A.L. Hook, J. Chan, N.V. Voelcker, R.D. Short, *Biomaterials* 31 (2010) 392.
- (31) A.L. Hook, H. Thissen, N.H. Voelcker, *Biomacromolecules* 10 (2009) 573.
- (32) E. Delamarche, H. Schmidt, A. Bietsch, N.B. Larsen, H. Rothuizen, B. Michel, H. Biebuyck, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 3324.
- (33) Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37 (1998) 550.
- (34) S.A. Ruiz, C.S. Chen, *Soft Matter* 3 (2007) 1.
- (35) Q. Guo, X. Teng, H. Yang, *Nano Lett.* 4 (2004) 1657.
- (36) D. Trimbach, K. Feldman, N.D. Spencer, D.J. Broer, C.W.M. Bastiaansen, *Langmuir* 19 (2003) 10957.
- (37) P. Cyganik, A. Budkowski, U. Steiner, J. Rysz, A. Bernasik, S. Walheim, Z. Postawa, J. Raczowska, *Europhys. Lett.* 62 (2003) 855.
- (38) J. Raczowska, J. Rysz, A. Budkowski, J. Lekki, M. Lekka, A. Bernasik, K. Kowalski, P. Czuba, *Macromolecules* 36 (2003) 2419.
- (39) J. Raczowska, A. Bernasik, A. Budkowski, J. Rysz, B. Gao, M. Lieberman, *Macromolecules* 40 (2007) 2210.
- (40) B.O. Leung, A.P. Hitchcock, J.L. Brash, A. Scholl, A. Doran, *Langmuir* 26 (2010) 14759.
- (41) J. Zemła, M. Lekka, J. Wiltowska-Zuber, A. Budkowski, J. Rysz, J. Raczowska, *Langmuir* 24 (2008) 10253.
- (42) J.H. Lee, H.B. Lee, J.D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.* 20 (1995) 1043.
- (43) P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3939.
- (44) W. Song, H. Chen, *Chin. Sci. Bull.* 52 (2007) 3169.
- (45) K. Tsougeni, A. Tserepi, V. Constantoudis, E. Gogolides, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, *Langmuir* 26 (2010) 13883.
- (46) S.Y. Kim, J. Yu, S.J. Son, J. Min, *Ultramicroscopy* 110 (2010) 659.
- (47) C. Galli, M. Collaud Coen, R. Hauert, V.L. Katanaev, P. Groening, L. Schlapbach, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 26 (2002) 255.
- (48) M. Mrksich, G.M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25 (1996) 55.
- (49) A. Gokarna, S.K. Lee, J.S. Hwang, Y.H. Cho, Y.T. Lim, B.H. Chung, M. Lee, *J. Korean Phys. Soc.* 53 (2008) 3047.
- (50) B.K. Vainstein, *Modern Crystallography I*, Springer-Verlag, New York, 1981.
- (51) R.H. Silsbee, J. Draeger, *Simulations for Solid State Physics*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1997.

3.3.2. Adsorpcja białka do regularnych struktur domenowych dwu polimerów wytworzonych przy pomocy miękkiej litografii



3.3.2.1. Abstrakt

Badania przeprowadzone uprzednio wykazały wysoce- selektywną adsorpcję białek (lektyn LcH i ConA) do izotropowych domen polimerowych utworzonych przez samo- organizację w warstwie osadzonej z mieszaniny poli(tlenku etylenu) PEO i polistyrenu PS. Dlatego ta para polimerów, PEO i PS, ten ostatni bromowany częściowo (PBrS) dla zapewnienia kontrastu w spektroskopii masowej jonów wtórnych SIMS, została wybrana do stworzenia regularnych powierzchniowych struktur domenowych dla adsorpcji białka. Zaproponowana strategia tworzenia periodycznych wzorów PEO/ PBrS polega na osadzeniu i usieciowaniu (za pomocą ultrafioletu) warstwy PEO (domieszkowanej triakrylanem pentaerytrytolu), osadzeniu wierzchniej warstwy PBrS, a następnie na mikro- formowaniu wspomaganym rozpuszczalnikiem i usuwającym periodyczne obszary górnej z dwu- warstw polimerów. Obrazy powierzchniowe uzyskane za pomocą AFM oraz SIMS pokazują uzyskane periodycznie regularne wzory niskich obszarów zawierających PEO oddzielone wysokimi pasami PBrS. Z kolei, obrazy fluorescencyjne po adsorpcji białka (lektyn LcH bądź ConA) pokazują regularne mikro- wzory białka. Ponadto wyniki fluorescencyjne sugerują wyższą selektywność adsorpcji dla tych wzorów PEO i PBrS niż dla struktur mieszanin PEO i PS.

3.3.2.2. Wprowadzenie

Wysoce selektywna adsorpcja lektyn do izotropowych wzorów PEO/ PS zachęciła do stworzenia regularnych wzorów białek. W tym celu przygotowano regularne wzory powierzchniowe PEO/ PS w różnych skalach przestrzennych i na dużych obszarach. Aby ułatwić identyfikację faz polimerowych na powierzchni użyto polistyrenu bromowanego PBrS. Zastosowano technikę mikro-formowania wspomaganą rozpuszczalnikiem SAMIM i wytworzono powierzchniowe wzory PEO/ PBrS do których adsorbowały znakowane fluorescencyjnie lektyny LcH oraz Con A.

3.3.2.3. Część eksperymentalna

3.3.2.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych.

Do tych badań użyto politlenku etylenu PEO (średnia masa cząsteczkowa $M_w = 42\ 700$, polidispersyjność $M_w/M_n = 1,25$, temperatura zeszklenia $T_g = -63\ ^\circ\text{C}$) oraz częściowo bromowanego polistyrenu PBrS ($M_w = 185\ 000$, $M_w/M_n = 1,04$, zawierający 10,7 % segmentów bromowanych). Częściowo bromowanego polistyrenu, którego fizykochemiczne własności nie różnią się od PS,⁶⁰ użyto aby umożliwić identyfikację domen.

Uporządkowane wzory polimerowe. Uporządkowane wzory polimerowe wytworzono stosując technikę mikro- formowania warstw wspomaganą rozpuszczalnikiem (SAMIM).⁴⁷ Przygotowano roztwory PBrS w toluenie i PEO (z domieszką PETA, $c_{\text{PETA}} = 4\ \text{mg/mL}$) w chloroformie o stężeniu $c_p = 20\ \text{mg/mL}$. Następnie wylano cienkie warstwy PEO na wafle krzemowe przy użyciu spin- coatera KW- 4A i usieciowano je według standardowej procedury.⁶¹⁻⁶³ Kolejnym krokiem było wylanie warstwy PBrS na wcześniej przygotowaną warstwę PEO. Później pieczętki elastomerowe o różnych mikro- wzorach (liniowe symetryczne i niesymetryczne żłobienia o periodyczności 10- 35 μm) zostały zwilżone toluenem (selektywny rozpuszczalnik dla PBrS), a następnie przyłożone do zewnętrznej powierzchni dwu-warstwy (PBrS) na czas 5 min, na skutek czego powstały naprzemienne wysokie paski fazy PBrS i niskie obszary PEO (rysunek 3.36).

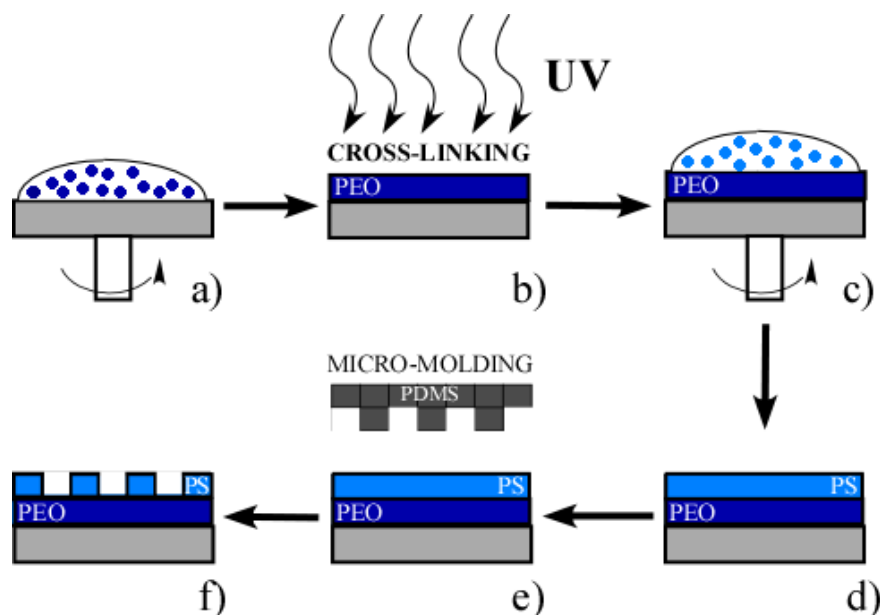
3.3.2.3.2. Charakterystyka powierzchni.

Morfologię powierzchni scharakteryzowano na podstawie obrazów topograficznych (AFM) i obrazów tarcia (LFM) zarejestrowanych mikroskopem sił atomowych (The Academia System, Nanonics Imaging Ltd., Izrael) pracującym w modzie kontaktowym.^{64- 66} Powierzchniowe uporządkowanie domen zostało potwierdzone przez uzyskanie map kompozycyjnych o rozdzielczości sub- mikro- metrowej, w oparciu o wyniki dynamicznej spektroskopii masowej jonów wtórnych d- SIMS (aparat VSW wyposażony w wysokiej rozdzielczości działło jonowe i źródło ciepło- metaliczne, Fei): węgla (jony C_2^+ , $m/z = 24$), bromu (jony Br^+ , $m/z = 79$) i tlenu (jony O^+ , $m/z = 16$).^{60, 67, 68}

3.3.2.3.3. Adsorpcja białek.

Aby przetestować adsorpcję białek do regularnych wzorów powierzchniowych polimerów kontrastujących użyto lektyn: konkanawaliny A (Con A znakowana izotocyjanianem fluoresceiny FITC, fluorescencja zielona) oraz lektyny soczewicy (LcH znakowane izotocyjanianem tetrametylorodaminy TRITC, fluorescencja czerwona) (Biokom, Polska). Roztwory białek sporządzono z PBS (pH 7,4; Sigma) o koncentracji $c_{\text{LcH (Con A)}} = 125\ \mu\text{g/mL}$. Krople każdego z roztworów deponowano na powierzchni regularnych wzorów PEO/ PS przez 15 minut. Następnie próbki po ostrożnym przepłukaniu buforem umieszczono w PBS. Wszystkie pomiary fluorescencyjne wykonano dla próbek

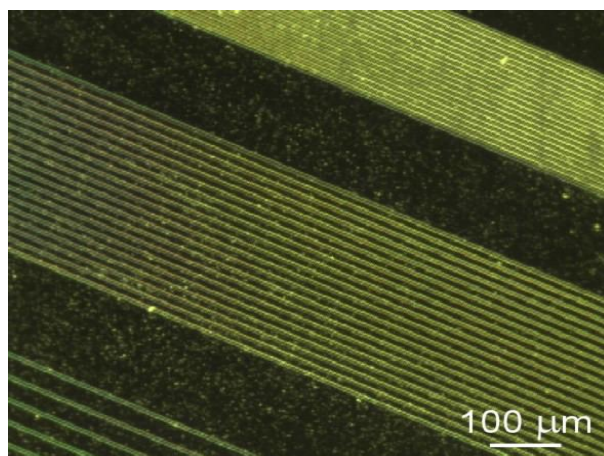
zanurzonych w buforze, używając mikroskopu Olympus BX51 wyposażonego w 100 W lampę rtęciową.



Rysunek 3. 37 Wzór polimerowy PEO/ PBrS wytworzony technikami miękkiej litografii. Dwu-warstwa PEO/ PBrS (d) przygotowana przez sukcesywne wylewanie roztworów polimerów i ich selektywnych rozpuszczalników na wirujące podłoże (a, c) połączone z usieciowaniem PEO (z domieszką PETA, b) wzór topograficzny wytworzono stosując technikę mikro-formowania warstw SAMIM (e, f).

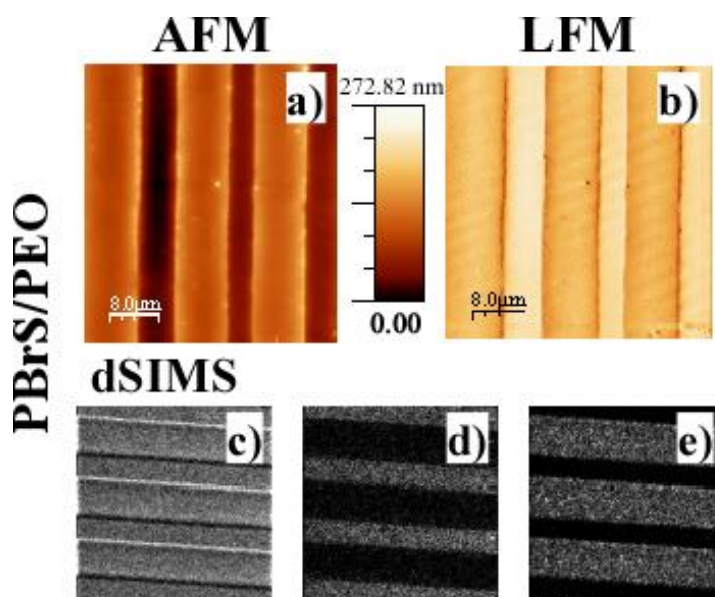
3.3.2.3.4. Wzory wytworzone techniką mikro- formowania warstw SAMIM.

Wzory polimerowe. Badania adsorpcji białek do izotropowych wzorów polimerowych pokazały wysoce specyficzną adsorpcję do podłoża PEO/ PS, więc ta para została wybrana do wytworzenia regularnych wzorów polimerowych, a w kolejnym kroku mikro- macierzy białek. Aby zapewnić kontrast konieczny do stworzenia map kompozycji na podstawie pomiarów dynamicznej spektroskopii masowej jonów wtórnych dSIMS PS zastąpiono jego bromowanym odpowiednikiem PBrS^{60,67,68} (o identycznych właściwościach fizykochemicznych).⁶⁰ Uporządkowane wzory polimerowe przygotowano stosując dwuetapową procedurę, schematycznie zilustrowaną na rysunku 3.37. W pierwszym kroku wytworzono dwu- warstwę polimerów PEO/ PBrS przez sukcesywny spin- casting roztworów polimerów (rysunek 3.37 a-d). Etapem pośrednim było usieciowanie dolnej warstwy układu PEO (z domieszką PETA, rysunek 3.37 e). Warstwa (bromowanego) PS była przygotowana z jego roztworu w toluenie, który jest selektywnym rozpuszczalnikiem dla PS ale nie dla PEO. To w dodatku do wcześniejszego usieciowania warstwy PEO zapewnia dobrą strukturę dwuwymiarową. W drugim kroku wytworzono wzór polimerowy stosując technikę mikro- formowania warstw SAMIM⁴⁷ (rysunek 3.37 e) przy użyciu selektywnego rozpuszczalnika dla warstwy górnej. W efekcie otrzymano uporządkowany wzór naprzemiennych pasków niskich fazy PEO oraz pasków wysokich fazy PBrS (rysunek 3.37 f). Stosując tę metodę można wytworzyć regularne mikro- wzory polimerowe o różnych skalach przestrzennych i kształcie (symetryczne i asymetryczne o szerszych strukturach PBrS) na rozległych obszarach próbki (rysunek 3.38).



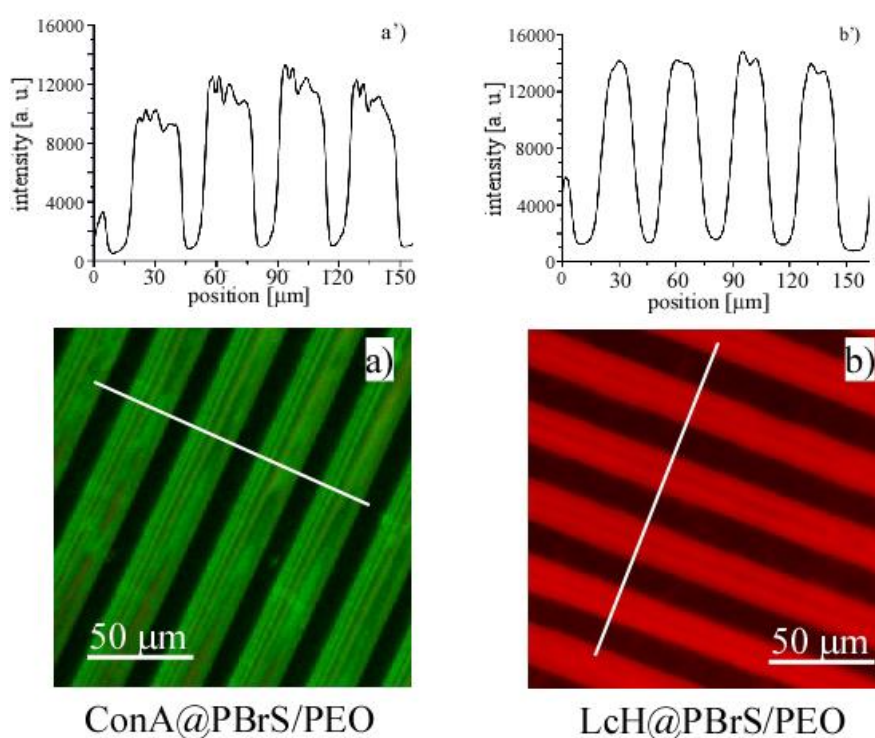
Rysunek 3. 38 Obraz z mikroskopu optycznego regularnych wzorów polimerowych PEO/ PBrS (periodyczność 10- 35 μm) wytworzonych w dwu-warstwie polimerów techniką mikro-formowania warstw.

Aby zweryfikować czy regularne wzory powierzchniowe składają się z pojedynczych domen polimerowych (PEO lub PBrS), uformowaną dwu- warstwę zbadano przy użyciu mikroskopii AFM i LFM (rysunek 3.39 a, b) oraz wykonano mapy kompozycji na podstawie pomiarów dSIMS (rysunek 3.39 c-e). Porównanie obrazów AFM i LFM pozwala stwierdzić jednoznacznie, że obszary niskie i struktury wysokie są zbudowane z dwóch różnych materiałów (widoczny kontrast na obrazie LFM). Natomiast jednorodność mapy koncentracji węgla w analizie dSIMS, otrzymana z rozdzielczością masową jonów C_2^+ (rysunek 3.39 c), nie pozostawia wątpliwości że cała powierzchnia jest pokryta materiałem polimerowym, PBrS lub PEO. Zatem usieciowana warstwa PEO (przylegająca do powierzchni podkładu SiO_x) nie jest przerywana przez zastosowaną procedurę mikro- formowania warstw, a więc wytworzono naprzemienne paski faz PBrS i PEO. W przypadku niesymetrycznych pasków skład wysokich (szerokich) struktur jest dodatkowo potwierdzony przez mapy dSIMS rozkładu PBrS otrzymanych z rejestracji jonów Br^- (rysunek 3.39 e).



Rysunek 3. 39 Obrazy AFM (a) i LFM (b) powierzchni oraz mapy dystrybucji dSIMS (50×50 μm) węgla (jony C_2^+ , c), tlenu (jony O^+ , d), bromu (jony Br^- , e) zarejestrowane dla ustrukturyzowanej dwu- warstwy, tworzącej wzory powierzchniowe (tutaj asymetryczne) złożone z wysokich (szerszych) obszarów PBrS i niskich (węższych) obszarów PEO. Obszary jaśniejsze na obrazach i mapach odpowiadają wyższym wartościom sygnału.

Adsorpcja białek do wzorów polimerowych wytworzonych technikami miękkiej litografii. Reprezentatywne obrazy fluorescencyjne (rysunek 3.40) pokazują adsorpcję białek do wzorów topograficznych wytworzonych techniką mikro- formowania warstw zaimplementowaną do dwu- warstwy różnych polimerów. Uporządkowane grupowanie białek jest obserwowane dla obu lektyn, Con A (rysunek 3.40 a) i LcH (rysunek 3.40 b), które odtwarzają regularny wzór powierzchniowy PEO/ PBrS. Na podstawie poprzednich eksperymentów adsorpcji białek do izotropowych wzorów PEO/ PS można stwierdzić, że białka zaadsorbowały selektywnie do fazy PBrS (szerokie paski) a nie do obszarów PEO. Ta hipoteza jest potwierdzona przez rysunek 3.40 a, gdzie białka pokrywają szerokie paski polimerowe, które dla użytych pieczętek elastomerowych zawsze odpowiadają domenom PBrS. Dodatkowo analiza profili intensywności fluorescencji (rysunek 3.40 a', b') sugeruje, że selektywność oddziaływania polimer- białko jest wyższa dla wzorów PEO/ PBrS niż dla struktur wzorów izotropowych PEO/ PS (rysunek 3.25 b', c').



Rysunek 3. 40 Obrazy fluorescencyjne lektyn Con A (a) i LcH (b) zaadsorbowane selektywnie do wzoru polimerowego PEO/ PBrS wytworzonego technikami miękkiej litografii. Profile intensywności fluorescencji (a', b') odpowiadają liniom zaznaczonym na (a, b).

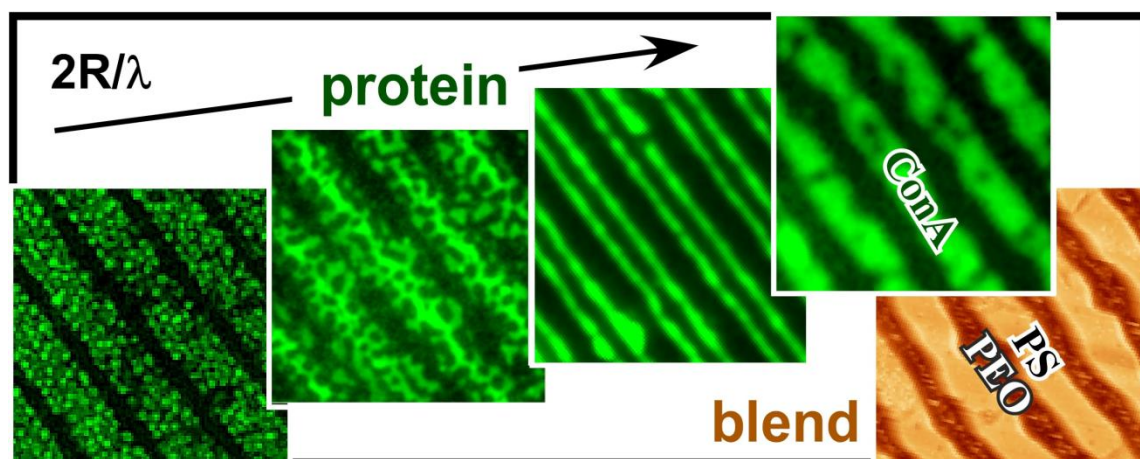
3.3.2.4. Podsumowanie i wnioski

Ta nowa metoda została zaproponowana do wytwarzania matryc polimerowych o różnych kształtach i rozmiarach na dużych obszarach, przez zastosowanie techniki mikro- formowania warstw SAMIM do dwu- warstwy PEO i PBrS. Wykorzystując wysoką selektywność wiązania lektyn do domen PS, co pokazano we wcześniejszych badaniach, wykorzystano je do przygotowania regularnych mikro-wzorów białek (Con A i LcH). Regularne mikro- wzory białek można wykorzystać jako podłoża do adhezji komórek. Głównym wyzwaniem pozostaje wytworzenie regularnych wzorów wielu białek.

3.3.2.5. Literatura

- (1) Raczkowska, J.; Bernasik, A.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Gao, B.; Lieberman, M. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2120–2125, wraz z referencjami.
- (2) Mecke, K. R. *Phys. Rev. E* **1996**, *53*, 4794–4800.
- (3) Doytcheva, M.; Stamenova, R.; Zvetkov, V.; Tsvetanow, C. *Polymer* **1998**, *39*, 6715–6721.
- (4) Doytcheva, M.; Dotcheva, D.; Stamenova, R.; Tsvetanow, C. *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, *286*, 30–33.
- (5) Doytcheva, M.; Petrova, E.; Stamenova, R.; Tsvetanow, C.; Riess, G. *Macromol. Mater. Eng.* **2004**, *289*, 676–680.
- (6) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Raptis, I.; Raczkowska, J.; Goustouridis, D.; Rysz, J.; Sanopoulou, M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *105*, 67–79.
- (7) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Moons, E.; Rysz, J. *Macromolecules* **2008**, *41*, 4802–4810.
- (8) Jaczewska, J.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Raptis, I.; Moons, E.; Goustouridis, D.; Haberko, J.; Rysz, J. *Soft Matter* **2009**, *5*, 234–241.
- (9) Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Kowalski, K.; Camra, J.; Jedliński, J. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 829–834.
- (10) Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Brenn, R.; Kowalski, K.; Camra, J.; Jedlinski, J. *Eur. Phys. J. E* **2003**, *12*, 211–214.

3.3.3. Adsorpcja białka do samo-organizujących się domen miesznin dwu polimerów o regularności narzuconej przez miękką litografię



3.3.3.1. Abstrakt

Osadzanie cienkich warstw mieszanin polimerów na wirujące podłoże (spin-casting) umożliwia jednoczesną depozycję i samo-organizację domen o kontrastujących właściwościach powierzchniowych. Uzyskiwane nieregularne wzory powierzchniowe są używane jako szablony dla adsorbowanych białek i wysiewanych komórek. Jednakże bardziej regularne pozycjonowanie materiału biologicznego jest wymagane przez bardziej zaawansowane zastosowania biomedyczne. W tym projekcie mieszaniny politlenku etylenu (PEO) i polistyrenu (PS) (wagowo 1:1 i 1:2), domieszkowane triakrylanem pentaerytrytolu, i osadzone jako warstwy (z charakterystyczną skalą $2R$ polimerowej struktury domenowej $1,6 < 2R < 4,0 \mu\text{m}$) na złocie Au z nadrukowanymi mikro-kontaktowo paskami heksadekanotolu SAM (o periodyczności $\lambda = 4$ i $8 \mu\text{m}$), zostały usieczkowane za pomocą ultrafioletu. Tak sporządzone cienkie warstwy polimerów zostały użyte jako szablony do grupowania (fluorescencyjnie znakowanego) białka ConA w periodyczne mikro-wzory o różnych morfologiach zależnych od stosunku $2R/\lambda$, takich jak: łańcuchy wysp ($2R/\lambda \sim 0,2$); rozgałęzione pasy ($2R/\lambda \sim 0,33$), pary pasków ($2R/\lambda \sim 0,5$) i pasy ($2R/\lambda \sim 1$). Hierarchicznie (dla $2R/\lambda < 1$) regularne mikro-wzory białka odzwierciedlają fazę bogatą w PS. Dla obszarów Au podłoża jest ona

uporządkowana podczas osadzania warstwy w domeny wyższe od otaczającej ją fazy bogatej w PEO. Natomiast dla okresowo powtarzających się obszarów SAM podłoża, faza PS jest pokryta przez lamelle bogatą w PEO o pośredniej wysokości. Relacja pomiędzy daleko-zasięgowym uporządkowaniem warstw mieszanin (szablonów adsorpcji, zobrazonych przy pomocy mikroskopu AFM) oraz regularnością mikro-wzorów białek (zgrupowanych domen białek, widocznych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego) jest badana za pomocą analizy Fouriera.

3.3.3.2. Wstęp

Wieloskładnikowe warstwy polimerów sporządzone techniką spin- castingu mają duże znaczenie technologiczne ze względu na prostotę obróbki rozpuszczalnikowej i różnorodność uzyskiwanych morfologii domen bogatych w różne polimery.¹⁻¹⁰ Osadzanie mieszanin polimerów z roztworu przez spin- casting jest tanim jedno- krokowym procesem prowadzącym do jednorodnej depozycji na dużych obszarach samo- zorganizowanych domen fazowych tworzących różne elementy urządzeń polimerowych. To czyni je użyteczną metodą produkcji urządzeń dla szerokiej gamy zastosowań, szczególnie w obszarze „plastikowej” elektroniki.¹¹⁻¹⁵

W dodatku struktura i własności (tj. hydrofobowość) osadzonych cienkich warstw mieszanin polimerów¹⁶⁻²⁵ zmieniają się w zakresie rozmiarów charakterystycznych dla biologii, tj. od rozmiarów zgrupowań biomolekuł (dziesiątki nanometrów) do rozmiarów całych komórek (dziesiątki mikrometrów).²⁶ Dlatego też powierzchniowe wzory polimerów są powszechnie używane jako matryce do grupowania białek^{16-19, 23-25, 27, 28} oraz do niejednorodnej hodowli komórek.^{20-22, 29} W tych zastosowaniach wykorzystuje się selektywną adsorpcję białek i zróżnicowaną (chemicznie lub topograficznie) adhezję komórek do nieregularnych struktur czyli do losowo rozmieszczonych domen wzorów powierzchniowych polimerów powstałych przez samo- organizację. Jednakże bardziej regularne pozycjonowanie materiału biologicznego jest wymagane przez bardziej zaawansowane zastosowania biomedyczne,³⁰⁻³² takie jak mikro- macierze białek tj. macierze gęsto upakowanych domen białek o rozmiarach mniejszych niż 250 μm .³¹

Mikro- macierze białek umożliwiają równoczesną analizę mającą na celu identyfikację białek obecnych w badanym materiale (macierze analityczne) lub sprawdzające aktywność biologiczną białek (macierze funkcjonalne), co jest niezwykle użyteczne w diagnostyce biomedycznej.³¹ Takie układy mogą być również użyte jako podkłady do niejednorodnego wysiewania komórek³³, które umożliwia kontrolę oddziaływań między komórkami oraz oddziaływań komórek z macierzą zewnątrzkomórkową i pozwala na prowadzenie badań podstawowych nad adhezją, wzrastaniem i zróżnicowaniem się komórek.²² Oczekuje się biologicznej reakcji komórek wywołanej przez regularne mikro- wzory lektyny, białka (użytego w moich badaniach) wiążącego się specyficznie z węglowodanami obecnymi w błonie komórkowej.^{34, 35}

Opracowano różnorodne metody umożliwiające kontrolowane pozycjonowanie materiału biologicznego na dużych obszarach powierzchni różnych materiałów. Poza nadrukowywaniem oraz osadzaniem białek i komórek metodami stosującymi mikro- przepływy.³⁶⁻³⁹ Wiele innych innowacyjnych metod proponuje ich selektywną depozycję do powierzchni o regularnych wzorach^{23, 40-45} przygotowanych za pomocą miękkiej litografii. Jednakże uzyskanie chemicznego kontrastu, wymaganego do selektywnej adsorpcji białek i zróżnicowanej adhezji komórek, jest związane w tych metodach z wieloetapową ekspozycją lub depozycją różnych składników na podłoża.

W tym rozdziale pokazuję, że osadzanie cienkich warstw mieszanin polimerów na wirujące podłoże z nadrukowanymi mikro- kontaktowo paskami heksanodekanotiolu SAM pozwala wytworzyć w jednoetapowym procesie regularne wzory powierzchniowe o różnej morfologii składające się z faz polimerów adsorbujących i nieadsorbujących białka, odpowiednio domen bogatych w polistyren i politlenek etylenu, których użyto jako szablonów do grupowania białka- znakowanej fluorescencyjnie lektyny konkanawaliny A. W dodatku, morfologie grupowanego modelowego białka, odzwierciedlające powierzchniową strukturę domen mieszanin PEO/ PS, są kontrolowane przez warunki spin- castingu (prędkość obrotową ω , stechiometrię mieszaniny) determinujące charakterystyczną skalę struktur domenowych $2R$, a zatem także stopień $(2R/\lambda)$ ich współmierności ze stałym okresem λ wzoru SAM na podłożu.

Jako pierwszy proces samo- organizacji kontrolowany przez nadrukowany regularny wzór monowarstw SAM zaobserwował Böltau.⁴⁶ Później proces ten stał się obiektem wielu badań.⁴⁷⁻⁵⁹ W dodatku do lateralnie zorganizowanych domen (kwasi- dwuwymiarowych, 2)^{46, 48, 49, 53, 60, 61} także pionowe układy lamelli (L)⁶²⁻⁶⁴ były porządkowane na dużych obszarach za pomocą wzorów SAM, a strukturyzowane warstwy uznano za obiecujące dla „plastikowej” elektroniki.^{51, 55, 57, 60, 62-68}

W tym projekcie zastosowano to podejście do mieszaniny politlenku etylenu (PEO) i polistyrenu (PS) (wagowo 1:1 i 1:2), domieszkowane triakrylanem pentaerytrytolu. Mieszaniny te osadzono jako warstwy (z charakterystyczną skalą $2R$ polimerowej struktury domenowej $1,6 < 2R < 4,0 \mu\text{m}$) na złocie Au z nadrukowanymi mikro-kontaktowo paskami heksadekanotiolu SAM (o periodyczności $\lambda = 4$ i $8 \mu\text{m}$) i zostały usieciowane za pomocą ultrafioletu. Ponadto pokazano, że nadrukowane regularne wzory SAM mogą wymusić: formowanie powierzchniowych wzorów polimerowych na obszarach makroskopowych ($> 2 \text{ mm}$) i wytworzenie jednocześnie domen o strukturze zarówno lateralnej (2) jak i lamellarnej (L). Tak przygotowane podłoża wykorzystano do stworzenia hierarchicznych mikro- wzorów białek.

Wysoka biokompatybilność PEO oraz własności przeciw osadowe (antifouling) sprawiły, że PEO oraz jego kopolimery wykorzystano do wytwarzania nośników leków oraz struktur⁶⁹ lub powierzchni o kontrolowanej adsorpcji białek.^{25, 30} Pokazano już, że nieregularne wzory powierzchniowe mieszanek PEO/ PS, mogą służyć jako szablony do grupowania białek selektywnie adsorbujących do domen PS.²³ Ponadto zademonstrowano już, że morfologiczne miary uzyskane z analizy geometrii całkowitej pozwalają porównać powierzchniową organizację zgrupowanego białka i domen mieszaniny polimerowej.²³ W tym projekcie użyto mieszanek PEO/ PS do wytworzenia szablonów o regularnym wzorze do grupowania białka w periodyczne mikro- wzory. Aby potwierdzić metodologicznie dalekozasięgowy charakter szablonów polimerowych i wzorów zgrupowanego białka zastosowano analizę Fouriera.

3.3.3.3. Część eksperymentalna

3.3.3.3.1. Przygotowanie podłoży polimerowych

Jednorodną warstwę złota o grubości 50 nm wytworzono na płytkach krzemowych w procesie termicznego naparowania próżniowego. Warstwy Au zanurzone przez 5 min w 10 mM roztworze heksadekanotiolu $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}]$ rozpuszczonego w etanolu, następnie powierzchnie te spłukano etanolem i wysuszono strumieniem azotu. Tak przygotowane podłoża Au i złota pokrytego monowarstwą SAM użyto jako podłoża referencyjnych do regularnych wzorów chemicznych Au/ SAM

przygotowanych techniką druku mikro- kontaktowego (μ CP).^{52, 70} Symetryczne, naprzemienne paski Au i SAM- CH_3 wytworzono nadrukowując heksanodekanotiol pieczętką elastomerową (wykonaną z poli(dimetylosiloksanu)) o periodyczności $\lambda = 4$ i $8 \mu\text{m}$. Kontakt pieczętki z powierzchnią pokrytą warstwą Au trwał 30 s, po czym każda próbka została kilka razy spłukana etanolem i wysuszona strumieniem azotu.

3.3.3.3.2. Osadzanie mieszanin polimerów

W tym projekcie użyto polimerów: polistyrenu (PS, masa cząsteczkowa $M_w = 58,9 \text{ kD}$, indeks polidispersyjności $M_w/M_n = 1,09$) oraz politlenku etylenu (PEO, $M_w = 42,7 \text{ kD}$, $M_w/M_n = 1,26$), zakupionych w Polymer Standard Service (Moguncja). Z tych polimerów przygotowano mieszaniny o stosunku wagowym PEO:PS wynoszącym 1:1 i 1:2 rozpuszczone w chloroformie, stężenie polimerów w roztworze wynosiło 20 mg/mL . Do mieszanin polimerów dodano 4 mg czynnika sieciującego triakrylanu pentaerytrytolu (PETA) na 1 mL roztworu. Mieszaniny polimerów deponowano na wirujące z prędkością obrotową $\omega = 2\text{ k}$ i 5 k rpm podłoża, zarówno te jednorodne chemicznie i te z nadrukowanymi wzorami, używając powleacza obrotowego KW- 4A (Chemat Technology). Następnie cienkie warstwy polimerów zostały usieciowane ultrafioletem przez zastosowanie standardowej procedury, 2 h ekspozycji na światło 400 W lampy rtęciowej.⁷¹⁻⁷³

3.3.3.3.3. Adsorpcja białka

Lektyna Konkanawalina A (Con A) znakowana fluorescencyjnie izotiocyanianem fluoresceiny (FITC, fluorescencja zielona) została użyta jako modelowe białko do tworzenia różnych mikro-wzorów białka przez selektywną adsorpcję do fazy bogatej w PS wzorów PEO/ PS.²³ Krople roztworu Con A w roztworze soli fizjologicznej buforowanym fosforanami (PBS; $\text{pH} = 7,4$) o koncentracji białka $41,5 \text{ mg/mL}$ były deponowane na warstwach PEO/ PS przez czas 10 min . Niezaadsorbowane biomolekuły zostały spłukane buforem, po czym próbki zanurzono w 10 mL PBS.

3.3.3.3.4. Charakterystyka powierzchni

Morfologię powierzchni cienkich warstw PEO/ PS zobrazowano mikroskopem sił atomowych. Obrazy topograficzne i amplitudy zarejestrowano w powietrzu w temperaturze pokojowej mikroskopem Agilent 5500 pracującym w trybie bezkontaktowym, używając super ostrych krzemowych próbników AFM (Nanomeasures). Dodatkowo, aby sprawdzić wertykalny zasięg fazy PS, wykonano pomiary AFM wzorów PEO/ PS po zastosowaniu wytrawiania selektywnym rozpuszczalnikiem- cykloheksanem (selektywnie rozpuszcza PS).

Mikro-wzory zaadsorbowanego białka zarejestrowano w temperaturze pokojowej bezpośrednio po depozycji roztworu białka dla próbek zanurzonych w roztworze PBS mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX51 wyposażonym w lampę halogenkową o mocy 100 W , filtr U-MVNF2 oraz kamerę cyfrową typu DP72. Zdjęcia fluorescencyjne zapisano programem Cell[^]F.

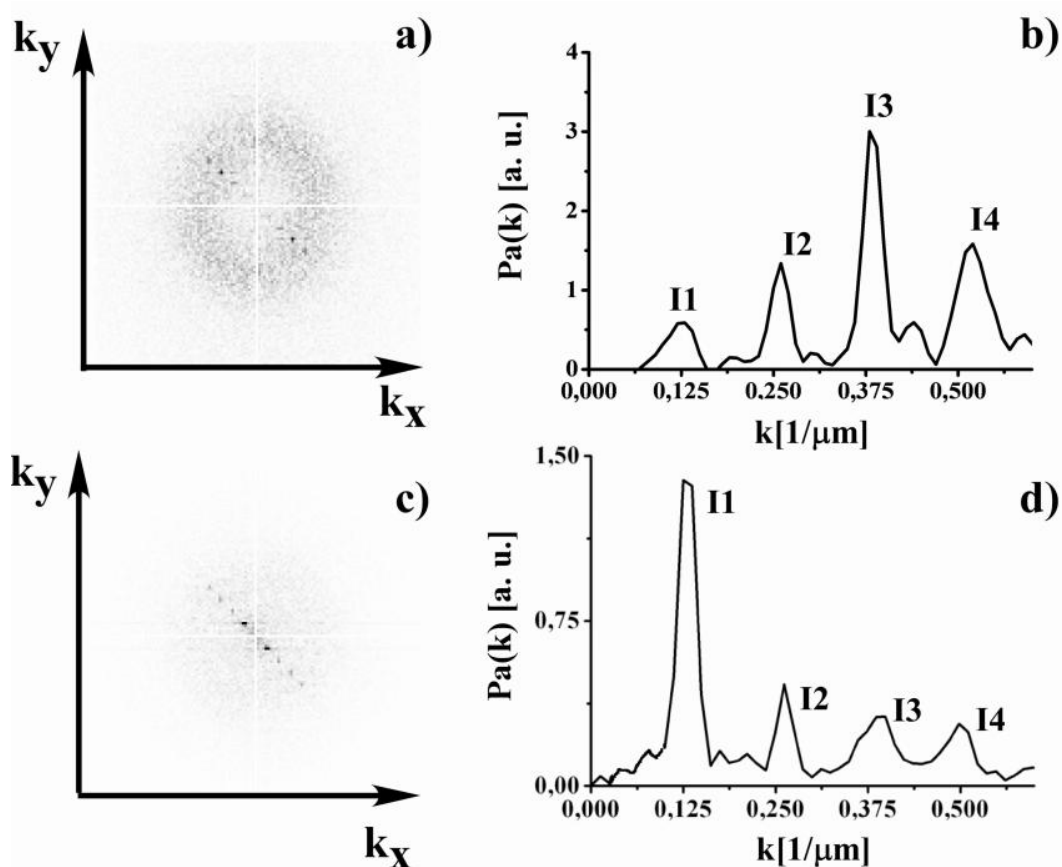
Dla filmów o dwuwarstwowej strukturze wykonano dodatkowo profilowanie głębokościowe wykorzystując spektrometr masowy jonów wtórnych czasu przelotu (TOF-SIMS). Pomiary wykonano aparatem TOF.SIMS5 (ION-TOF GmbH) pracującym w trybie dwóch wiązek, w obu przypadkach kąt padania wiązki wynosił 45° względem normalnej do powierzchni. Działo analizujące to wiązka jonów Bi_3^+ o energii 30 keV , natomiast wiązka rozpylająca to działo Cs^+ o energii 250 eV .

Rozmiar obszaru rozpylanego jonami Cs^+ wynosił $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ podczas gdy centralny obszar krateru o rozmiarze $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ był analizowany jonami Bi_3^+ . Zanim przystąpiono do analizy wykalibrowano widma masowe jonów ujemnych według sygnałów pochodzących od H^- , C^- , C_2^- , C_3^- , C_4^- i C_5^- . Aby sprawdzić skład próbek w głąb wykonano profilowanie głębokościowe jonów wtórnych C_2OH^- ($m/z = 73$) oraz C_6H^- ($m/z = 41$), które pochodzą odpowiednio od PEO i PS. Zmianę koncentracji danego polimeru z głębokością widać na zarejestrowanych wykresach natężenia jonów wtórnych w funkcji czasu rozpylania t (odzwierciedlającemu wzrost odległości od powierzchni warstwy), od momentu uzyskania warunków statycznego rozpylania tj. po upływie pierwszych 20-100 s pomiaru. Charakterystyczne piki pozwalające na jednoznaczną identyfikację badanych polimerów wybrano na podstawie widm masowych zarejestrowanych dla jednorodnych warstw badanych polimerów, używając tej samej aparatury (patrz rysunek 3.50).

3.3.3.5. Analiza obrazów.

Analizy cech morfologicznych obrazów topograficznych AFM oraz obrazów fluorescencyjnych zaadsorbowanych białek oparta jest na ich dwuwymiarowych transformatach Fouriera. Dla izotropowych wzorów powierzchniowych taka transformata daje rozmyty pierścień o promieniu $|\mathbf{k}|$ w jego maksimum, wyznaczony z uśrednionego radialnie spektrum potęgowego $P_i(k)$ (tj. zależności kwadratów amplitud fourierowskich od $|\mathbf{k}|$). Promień $|\mathbf{k}|$ określa charakterystyczną skalę struktury domenowej, jaką jest średnia odległość między centrami sąsiadujących domen $2R$ ($2R = 1/|\mathbf{k}|$).

Transformata fourierowska morfologii o charakterze anizotropowym wykazuje dodatkową (oprócz rozmytego pierścienia) składową w kształcie linii silnych maksimum dyfrakcyjnych położonych w pozycjach $\mathbf{k} = n'\mathbf{k}_\lambda$, gdzie n' – jest liczbą całkowitą, natomiast kierunek i długość wektora $|\mathbf{k}_\lambda| = 1/\lambda$ jest określona przez orientację i period anizotropowego wzoru powierzchni. Spektrum potęgowe $P(k)$ uśrednione dla wąskiego pasa wzdłuż linii $\mathbf{k} = n'\mathbf{k}_\lambda$, staje się po odjęciu składowej izotropowej $P_i(k)$ (uśrednionej radialnie dla płaszczyzny $\mathbf{k}$ bez pasa $\mathbf{k} = n'\mathbf{k}_\lambda$) spektrum potęgowym anizotropowej składowej $P_a(k)$ wzoru powierzchni. To spektrum $P_a(k)$ – określające daleko-zasięgowy charakter uporządkowania wzoru powierzchni - składa się z szeregu maksimum dla wektora falowego $n|\mathbf{k}_\lambda|$ ($\mathbf{k}_\lambda = 1/\lambda$, $n = 1, 2, 3$) scharakteryzowanych przez absolutne $J_n = J(n|\mathbf{k}_\lambda|)$ oraz znormalizowane wartości natężeń $I_n = J_n / \sum J_m$ (rysunek 3.41 b. d). Te intensywności określają wkład różnych modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazach powierzchni.



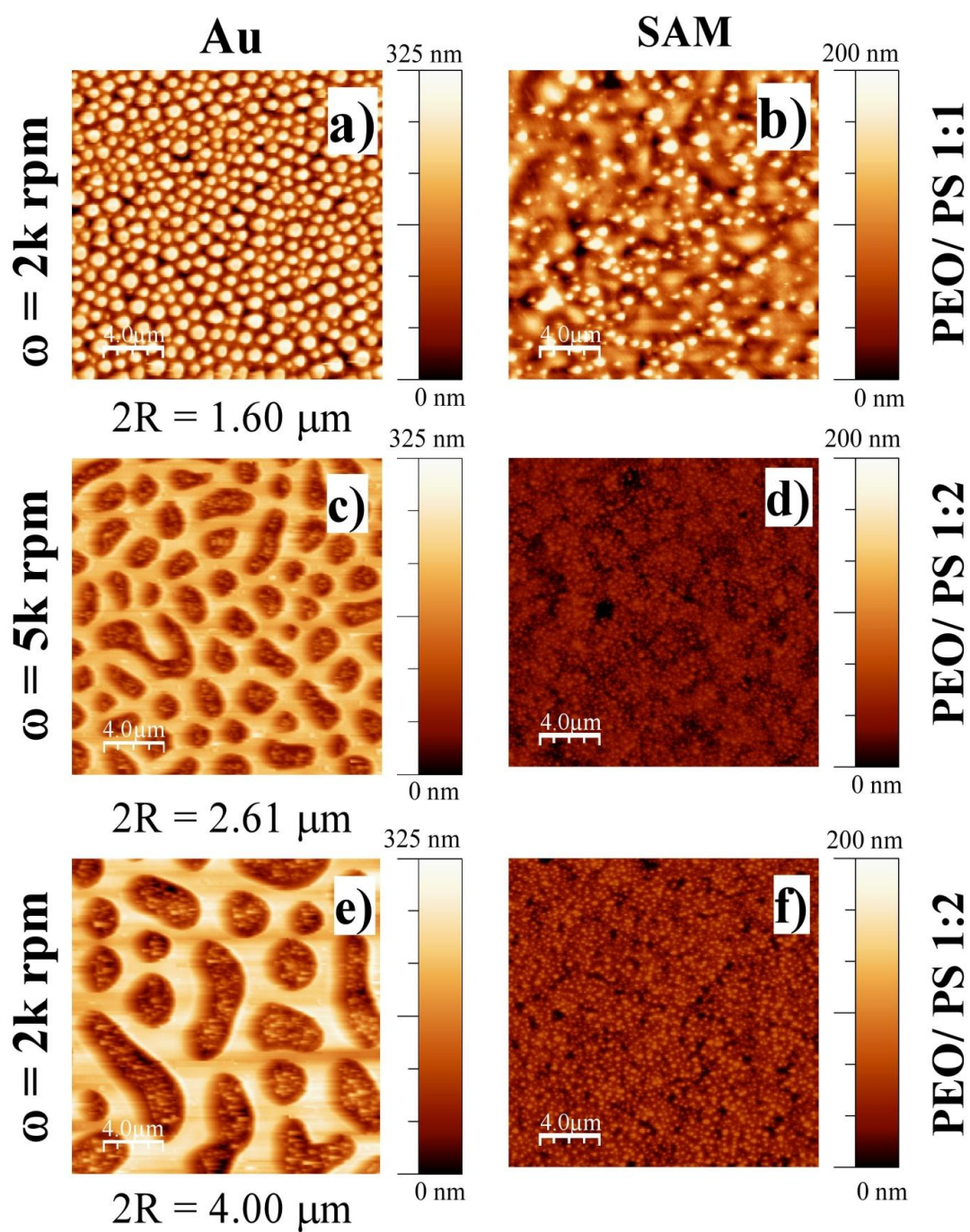
Rysunek 3. 41 (a) 2- dim transformata Fouriera obrazu topograficznego AFM (pokazanego na rysunku 3.48 a) oraz (c) obrazu fluorescencyjnego (pokazanego na rysunku 3.48 c) i uzyskane na ich podstawie anizotropowe składowe spektr potęgowe $P_a(k)$ (odpowiednio b, d). I_n odpowiada znormalizowanym natężeniom maksimów dla wartości wektora falowego nk_λ i odzwierciedla wkład modów strukturalnych o częstości λ/n ($n=1, 2, 3, 4$) do topografii wzoru polimerowego (c) i morfologii wzoru zaadsorbowanego białka (d).

3.3.3.4. Dyskusja wyników

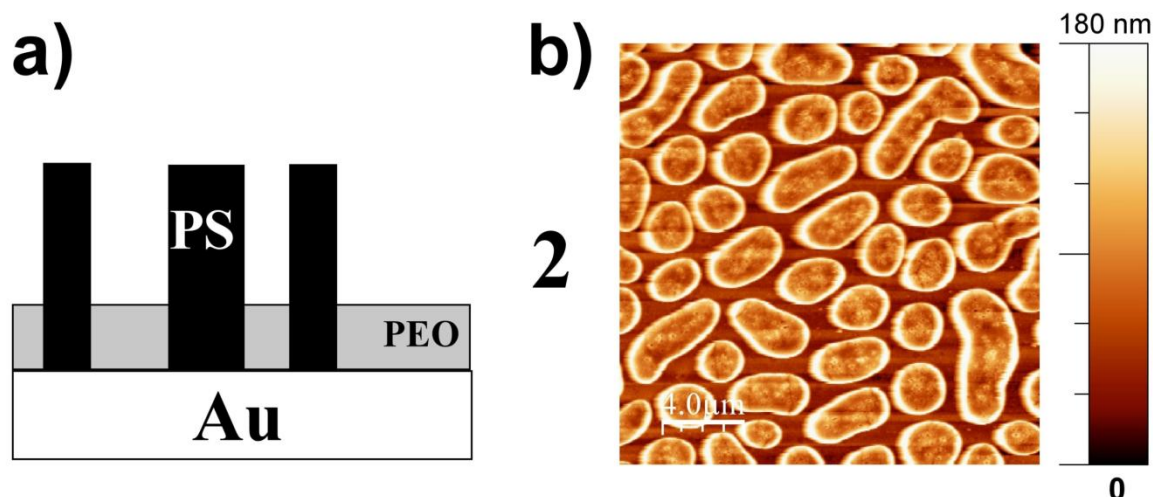
3.3.3.4.1. Powierzchniowe wzory polimerowe na jednorodnych substratach.

Aby wyjaśnić mechanizm samo- organizacji mieszanin polimerów PEO/ PS, domieszkowanych PETA, na podłożach z nadrukowanymi paskami molekuł samoorganizujących się (heksadekanotiolu, SAM- CH_3) konieczne jest sprawdzenie jakie struktury powstają po osadzeniu tych roztworów na wirujące jednorodne podłoża Au lub SAM.

Wzory polimerowe powstałe dla podłoża Au, których morfologia pokazana jest na rysunku 3.42- lewy panel, tworzą strukturę lateralną i składają się z wysokich domen PS otoczonych niską fazą PEO. Stwierdzenie to wynika z porównania morfologii wzorów PEO/ PS odlanych z roztworów o różnych stosunkach wagowych PEO/ PS (rysunek 3.42, lewa kolumna). Z obrazów topograficznych widać, że ze wzrostem ilości PS zwiększa się udział domen wysokich we wzorze polimerowym. Teza ta została potwierdzona przez dodatkowe pomiary AFM morfologii próbek po wcześniejszym rozpuszczeniu fazy PS przez zanurzanie próbki w cykloheksanie, selektywnym rozpuszczalniku (rysunek 3.43 b), który rozpuścił domeny wysokie. Ponadto z otrzymanych obrazów wynika, że wzory PEO/ PS tworzą kwasi- dwuwymiarową (2) lateralną strukturę domen w całej grubości filmu polimerowego tj. od powierzchni do podłoża Au co pokazane jest schematycznie na rysunku 3.43 a.



Rysunek 3. 42 Obrazy AFM wzorów powierzchniowych mieszaniny PEO/ PS o stosunku wagowym 1:1 (a, b) i 1:2 (c- f) wylanych z chloroformu z prędkością obrotową $\omega = 2k \text{ rpm}$ (a, b, e, f) i $\omega = 5k \text{ rpm}$ (c, d) na jednorodne podłoża Au (a, c, e) i SAM (b, d, f). Kolejność obrazów wynika ze wzrostu wartości charakterystycznej skali domenowej ($2R = 1,60 \mu\text{m}$ (a); $2,61 \mu\text{m}$ (c); $4,00 \mu\text{m}$ (e)).



Rysunek 3. 43 (a) Schematyczny przekrój struktury lateralnej 2 (kwasi- dwuwymiarowej), składającej się z wysokich domen fazy PS i niskich domen fazy PEO, otrzymanej dla mieszaniny PEO/ PS 1:2 wylanej z chloroformu na substrat Au (prędkość wirowania $\omega = 5\text{ k rpm}$), powstał w oparciu o obrazy AFM zarejestrowane przed (rysunek 2c) i po selektywnym wytrawieniu fazy PS przez zanurzenie próbki w cykloheksanie (b).

Struktura domen widocznych na rysunku (3.43 a) jest wynikiem skomplikowanych procesów zachodzących w czasie samo- organizacji podczas spin- castingu.^{1-9, 74-76} Jest ona skutkiem separacji fazowej, procesu opisywanego przez parametr oddziaływania χ , który dla PEO- PS wynosi 0,11-0,28⁷⁷ i jest o wiele wyższy od wartości parametru oddziaływania w punkcie krytycznym χ_{cr} wynoszącej 0,0026. Separacja fazowa prowadzi zazwyczaj do powstania dwu- warstwy, dla której obserwuje się wywołane gradientem stężenia rozpuszczalnika (odparowywanie i wysychanie warstwy polimerowej^{7, 9, 74}) niestabilności fazowe typu Marangoniego. W efekcie przzerwania ciągłości warstwy powstają lateralne struktury domenowe polimerów, które zaczynają ewoluować poprzecznie. Temu procesowi towarzyszy radialny przepływ materiału i zmniejszanie się grubości warstwy h , kontrolowanej przez prędkość rozkręcania ω i koncentrację polimerów w roztworze c_p ($h \sim c_p / \omega^{1/2}$).^{48, 53, 76} Procesy ewolucji struktury domenowej i zmniejszania się ich grubości kończą się, gdy molekuly polimeru o wyższej temperaturze zeszklenia stają się niemobilne ($T_g(\text{PS}) = 373\text{ K}$, $T_g(\text{PEO}) = 219\text{ K}$). Tak więc również średnia odległość między centrami sąsiadujących domen $2R$ jest kontrolowana za pomocą ω oraz c_p .²³ Zestalenie roztworów, powodowane parowaniem rozpuszczalnika, oraz frakcje resztkowe rozpuszczalnika są różne dla obu faz, a więc zamrożenie danej fazy następuje niejednocześnie i jest to odzwierciedlone w topografii warstwy. To zachowanie jest raczej wynikiem różnych wartości temperatur zeszklenia a nie parametrów rozpuszczania δ , które wynoszą: 17,5-18,6 $\text{Mpa}^{1/2}$ dla PS; 19,6- 20,2 $\text{Mpa}^{1/2}$ dla PEO i 19 $\text{Mpa}^{1/2}$ dla chloroformu.⁷⁹ W rezultacie powstają wysokie domeny bogate w PS w matrycy niskiej fazy bogatej w PEO. Ponieważ faza PEO pozostaje dłużej napęczniona chloroformem i dalej od równowagi może tu dojść do wtórnej separacji w czasie której uformują się drobne kroplo- kształtne struktury.⁷⁵ Jednak bardziej prawdopodobne jest to, że widoczne małe ($< 200\text{ nm}$) struktury w niskich obszarach bogatych w PEO (rysunek 3.42 c, e) to kryształity PEO. Podobny efekt zaobserwowano w badaniach wylanych jednoskładnikowych warstw PEO.⁸⁰ Również nitkowate struktury, podobne do tych widocznych na rysunku 3.46 d, zaobserwowano uprzednio dla zaawansowanego procesu krystalizacji PEO.⁸⁰

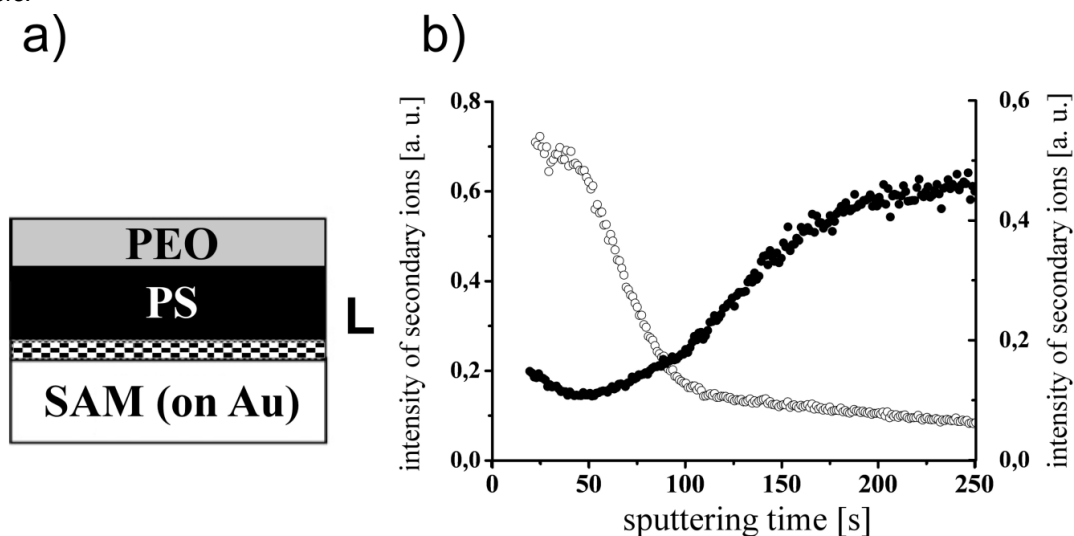
Podobnie jak w przypadku separacji fazowej wynikającej z hartowania temperaturowego⁷⁵ morfologia struktur lateralnych uformowanych w czasie spin-castingu roztworu mieszaniny polimerów zależy od składu tej mieszaniny.^{2, 6} Gdy można zaniedbać wertykalne przegrupowywanie faz, to oczekuje się dla mieszanin o krytycznej zawartości składników powstania dwu-ciągłych wzorów, podczas gdy dla składu dalekiego od krytycznego spodziewana jest struktura kroplo-podobna. Tę tezę potwierdzają obserwacje zmiany ciągłych struktur fazy bogatej w PS (rysunek 3.42 e) dla układu o frakcji wagowej polistyrenu w_{PS} wynoszącej 0,67 w wyspo-podobne domeny PS dla $w_{PS}= 0,50$ wywołane obniżeniem ilości PS poniżej masowej krytycznej ilości (gdzie objętość i frakcja wagowa PS wynoszą odpowiednio 0,58 i $\sim 0,56$).

Inny skład mieszaniny niż ten o krytycznym składzie powoduje również zmniejszenie charakterystycznej skali struktury domenowej $2R$ ^{2, 6}, która jest zdefiniowana jako odwrotność promienia pierścienia wyznaczonego za pomocą analizy Fouriera. Dla mieszanin PEO/ PS kontrolując prędkość rozkręcania ω oraz zmieniając stechiometrię mieszaniny otrzymano wzory powierzchniowe o skali struktur domenowych z przedziału 1,6 i 4,0 μm .

W przeciwieństwie do struktur powierzchniowych w formie mikrometrowych domen o dobrze zdefiniowanych krawędziach w przypadku lateralnej separacji fazowej otrzymanych na podłożach Au (rysunek 3.42, lewa kolumna) dla tych samych mieszanin wylanych na jednorodne podłoża SAM otrzymano bardziej jednorodną powierzchnię o ledwie zauważalnych (rysunek 3.42 d, f) lub słabo uformowanych (rysunek 3.42 b) strukturach. Bardziej wnikliwa obserwacja pokazuje, że powstały mniejsze (rysunek 3.42 d, f) lub bardziej wyraźne (rysunek 3.42 b) pofalowania. Ponadto pofalowana powierzchnia mieszaniny PEO/ PS 1:2 jest równomiernie pokryta niewielkimi (200 nm) okrągłymi domenami przypominającymi struktury powstałe w wyniku wtórnej separacji fazowej w obrębie niskiej fazy PEO mieszaniny PEO/ PS deponowanej na Au. Ta obserwacja sugeruje że warstwa powierzchniowa (pofalowana) jest bogata w PEO, czyli że otrzymano film polimerowy o lamellarnym ułożeniu faz polimerowych. Warstwowe ułożenie faz polimerowych zostało potwierdzone profilowaniem głębokościowym wykonanym przy użyciu TOF-SIMS (rysunek 3.44 b, c). Profile głębokościowe jonów wtórnych C_2OH^+ i C_6H^+ , odpowiednio charakterystyczne dla PEO i PS, odzwierciedlają zmianę składu w głąb filmu polimerowego od warstwy powierzchniowej bogatej w PEO aż do warstwy dolnej, bogatej w PS (rysunek 3.44 b). Takie pomiary wykonano również dla mieszaniny PEO/ PS o stechiometrii 1:1. Pomimo widocznych na obrazach AFM pofałdowań, tutaj również otrzymano dwu-warstwowe ułożenie faz PEO i PS.

Samoistne uwarstwienie mieszaniny polimerów (morfologia lamellarna) pokazane schematycznie na rysunku 3.44 a spowodowane jest gromadzeniem się molekuł PS na warstwie SAM, co wynika z wartości napięcia powierzchniowego dla tego polimeru ($\gamma_{PS}= 40,7 \text{ mJ/ m}^2$ a $\gamma_{PEO}= 42,9 \text{ mJ/ m}^2$), która jest bardziej kompatybilna z niską energią powierzchniową SAM wynoszącą $20,0 \text{ mJ/ m}^2$. Obliczona energia międzyfazowa na granicy czysty polimer i podłoże SAM⁸² wynosi $\gamma_{PS/ SAM}= 3,6 \text{ mJ/ m}^2$ i $\gamma_{PEO/ SAM}= 4,3 \text{ mJ/ m}^2$. Z analogicznych obliczeń wykonanych dla podłoża Au ($\gamma_{Au}= 45,1 \text{ mJ/ m}^2$) otrzymano następujące wartości energii międzyfazowej $\gamma_{PS/ Au}= 0,1 \text{ mJ/ m}^2$ i $\gamma_{PEO/ Au}= 0,0 \text{ mJ/ m}^2$. Ponieważ dla podłoża Au nie zaobserwowano warstwowego ułożenia faz inne efekty powodujące rozwarstwienie, które nie zależą od chemii podłoża, takie jak segregacja molekuł do powietrza powodowana niższym napięciem powierzchniowym czy też segregacja polimeru do podłoża

spowodowana zestalaniem się i wcześniejszym usuwaniem z roztworu,⁶⁰ muszą się wzajemnie znosić.



Rysunek 3. 44 (a) Schematyczny przekrój struktury lamellarnej L (faza PS graniczy z podłożem, a faza PEO z powietrzem), wykonany na podstawie wyników analizy danych AFM (rysunek 2d) i pomiarów SIMS (b) mieszaniny PEO/ PS 1:2 wylanej z chloroformu na podłoże SAM wirujące z prędkością $\omega = 5\text{ k rpm}$. Profile głębokościowe SIMS (b), wykonane poprzez granicę lamelli PEO i PS, odzwierciedlają rozkład fazy PEO (C_2OH^+ , $m/z = 41$, $\circ$, prawa oś) i rozkład fazy PS (C_6H^+ , $m/z = 73$, $\bullet$, lewa oś) w warstwie polimerowej. Czas rozpylania odzwierciedla odległość od pierwotnej powierzchni (rozpylanie polimerów zawierających atomy tlenu (PEO) następuje szybciej niż w przypadku PS)⁸¹.

Głównym procesem kierującym separacją fazową w mieszaninie PEO/ PS deponowanej na podłoże SAM wywołanej przez parowanie rozpuszczalnika jest preferencyjna segregacja molekuł PS na podłożu SAM. Dążenie do osiągnięcia minimum energii, kierujące samo- wypiętrzaniem (rozwarstwieniem), daje także stabilność utworzonej dwuwarstwy podczas późniejszych i końcowych etapów samo- organizacji. Aczkolwiek na powierzchni układu widoczne są ślady niestabilności Marangoniego powierzchni międzyfazowej polimer-polimer, w postaci mocnych (rysunek 3.42 b) i słabszych (rysunek 3.42 d, f) pofałdowań odpowiednio dla mieszanin PEO/ PS 1:1 i 1:2, będące wynikiem dążenia do przerwania ciągłości lamellarnego ułożenia faz. Takie dowody niestabilności są mniej widoczne dla stechiometrii 1:2 najprawdopodobniej ze względu na większą zawartość zestalającego się wcześniej PS.

3.3.3.4.2. Grupowanie białka do wzorów powierzchniowych wytworzonych przez samo-organizację o regularności narzuconej przez miękką litografię

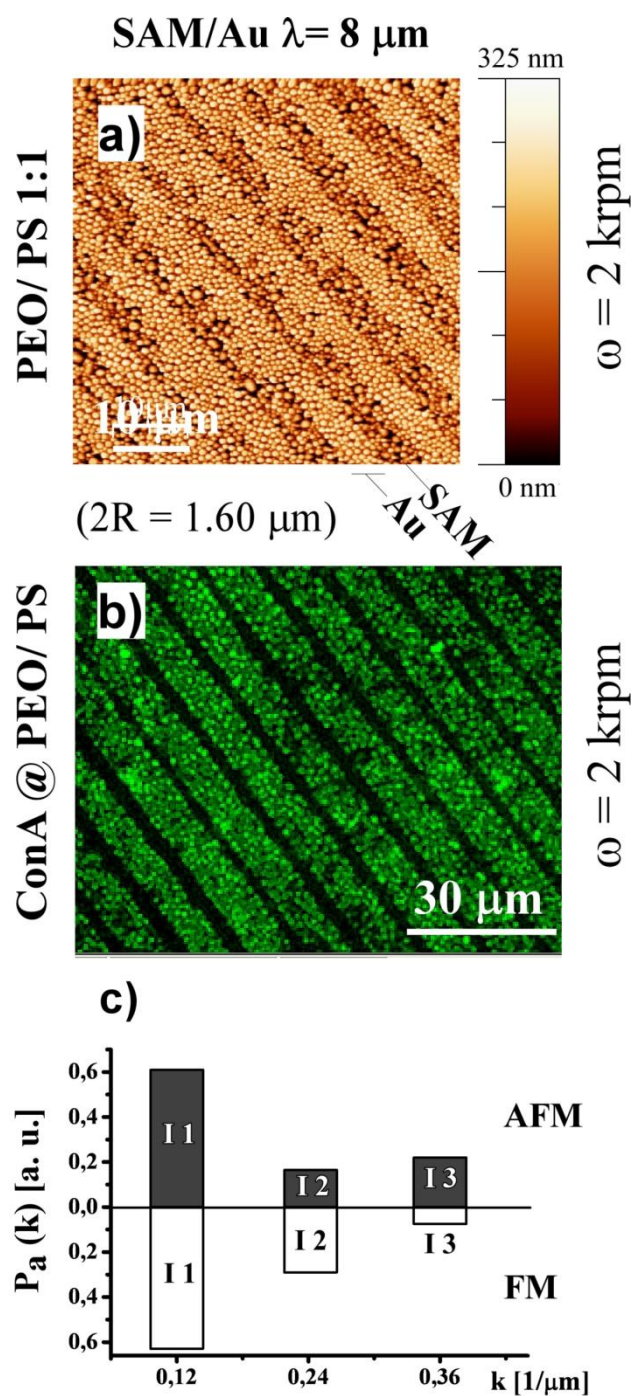
Ponieważ oddziaływanie roztworu mieszaniny polimerów z podłożem wpływa na samo-organizację molekuł (molekuły PS gromadzą się na SAM) to można sądzić że naprzemienne paski Au i SAM powinny wymusić regularne uporządkowanie faz mieszaniny polimerów. Periodyczne paski heksadekanotolu powstają przez nadrukowanie ich mikro- kontaktowo za pomocą pieczętek elastomerowych o różnej geometrii wzorów (o periodyczności $\lambda = 4$ i $8\text{ }\mu\text{m}$) i są wykorzystywane do testowania ułożenia domen mieszanin PEO/ PS (z domieszką PETA) o frakcji wagowej 1:1 i 1:2 i o charakterystycznej skali struktury domen $1,6 < 2R < 4,0\text{ }\mu\text{m}$. Zanalizowano rolę składu mieszaniny oraz współmierność wymiarów ($2R/\lambda$) między wzorem podłoża a uporządkowanymi dalekozasięgowo domenami polimerów zobrazowanymi mikroskopem AFM. Tak przygotowane (usieczowane promieniowaniem UV) powierzchniowe wzory polimerów są użyte jako szablony do grupowania

znakowanej fluorescencyjnie lektyny Con A, czyli do wytwarzania mikro- macierzy białka, obserwowanych mikroskopem fluorescencyjnym. Związek między regularnymi, dalekozasięgowo uporządkowanymi wzorami podłoża a wzorami zgrupowanych białek sprawdzono za pomocą analizy Fouriera.

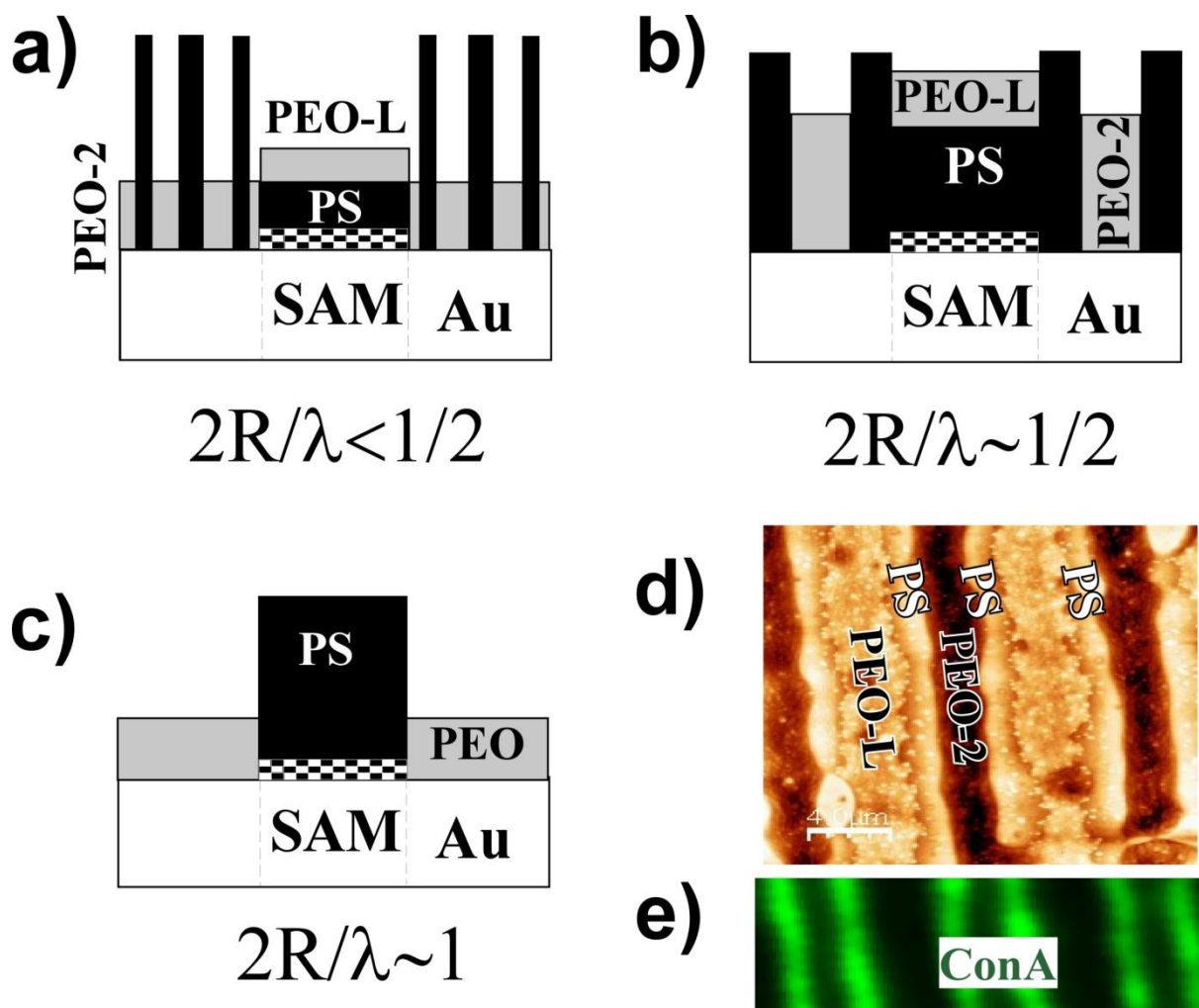
Periodyczne łańcuchy wysp ($2R/\lambda \sim 0,2$)

Deponując roztwór PEO/ PS o stechiometrii 1:1 na wirujące z prędkością obrotową w wynoszącą 2 k rpm podłoże z periodycznymi naprzemiennymi paskami Au i SAM otrzymano wzór powierzchniowy o charakterystycznej morfologii pokazanej na rysunku 3.44 a. Widoczne są tu dwa typy obszarów o wyso- podobnej strukturze. Jeden z tych obszarów składa się z gęsto ułożonych okrągłych domen o wyraźnych krawędziach, struktura tych obszarów przypomina morfologię mieszaniny wylanej na Au (rysunek 3.42 a). Natomiast drugi typ obszarów składa się z rzadko rozproszonych mniej rozwiniętych domen i przypomina wzór powierzchniowy, który zaobserwowano dla tej mieszaniny po jej wylaniu na powierzchnię SAM (rysunek 3.42 b).

W dalszej dyskusji dotyczącej identyfikacji i uporządkowania domen polimerów PEO i PS zostanie wykorzystane obrazowanie powierzchni za pomocą zaadsorbowanych białek, podejście zaproponowane przez Bonduelle i in.^{27, 28} Wcześniejsze badania, które wykonałam, pokazują że Con A adsorbuje do cienkich warstw PS oraz do izotropowo ułożonych domen bogatych w PS w przypadku wzorów powierzchniowych PEO/ PS podczas gdy warstwy PEO oraz obszary wzorów powierzchniowych bogate w PEO nie wykazują własności adsorpcyjnych.^{23, 83} Uwzględnienie powyższych faktów umożliwia analizę obrazu fluorescencyjnego pokazanego na rysunku 3.45 b, przedstawiającego domeny białka zaadsorbowanego do wzoru powierzchniowego mieszaniny PEO/ PS wylanej na podłoże o regularnym wzorze (rysunek 3.45 a). Porównanie obrazu wzoru powierzchniowego mieszaniny z obrazem fluorescencyjnym zaadsorbowanego białka potwierdza, że gęsto rozłożone fluorescencyjne, okrągłe elementy odpowiadają obszarom bogatym w PS, tworzącym obszary o lateralnej kwasi- dwuwymiarowej morfologii (2), które muszą znajdować się nad centralną częścią pasków Au (patrz rysunek 3.42 a). Natomiast rzadkie struktury wysokie sąsiednich obszarów o nieobserwowanej fluorescencji (ułożone centralnie nad paskami SAM) są mniej rozwinięte a warstwa powierzchniowa jest bogata w PEO. Lokalna zawartość PEO w warstwie powierzchniowej musi być wysoka ponieważ niska gęstość powierzchniowa PEO nie hamuje adsorpcji białka.⁸⁴ Najwyraźniej w omawianym tu przypadku ciągłość struktury lamellarnej (L) i warstwa górna bogata w PEO nie została naruszona przez niestabilności Marangoniego. Schematyczne przedstawienie ogólnej morfologii filmu pokazano na rysunku 3.46 a. Jednakże szkic ten, który generalizuje typowe elementy struktur mieszaniny PEO/ PS dla $2R/\lambda < 0,5$, nie uwzględnia dwóch specyficznych własności. Po pierwsze, obszary lamellarne są pod lekkim wpływem niestabilności międzyfazowych. Po drugie, pomimo symetrycznego wzoru podłoża pasków Au/ SAM obszary struktur lateralnych tworzących łańcuchy wysp są szersze niż obszary o budowie lamellarnej o warstwie bogatej w PEO. Ten efekt można wyjaśnić tym, że lateralnie porządkujące się fazy polimerów na podłożu Au destabilizują lamellarną morfologię faz polimerów w obszarach sąsiednich na SAM (gdzie występują niestabilności Marangoniego).



Rysunek 3. 45 (a) Obraz AFM usieciowanych wzorów powierzchniowych mieszaniny PEO/ PS 1:1 (w:w) osadzonej z chloroformu na wirującym z prędkością $\omega = 2 \text{ k rpm}$ podłożu Au z uprzednio utworzonym wzorem tioli o periodyczności $\lambda = 8 \mu\text{m}$. (b) Obraz fluorescencyjny białka (lektyny Con A) zaadsorbowanego do domen fazy PS. (c) Histogramy znormalizowanych natężeń maksimów dyfrakcyjnych transformaty Fouriera I_n , określających wkład modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazie topograficznym (a) (wypełnione kolumny) i fluorescencyjnym (b) (niewypełnione kolumny).

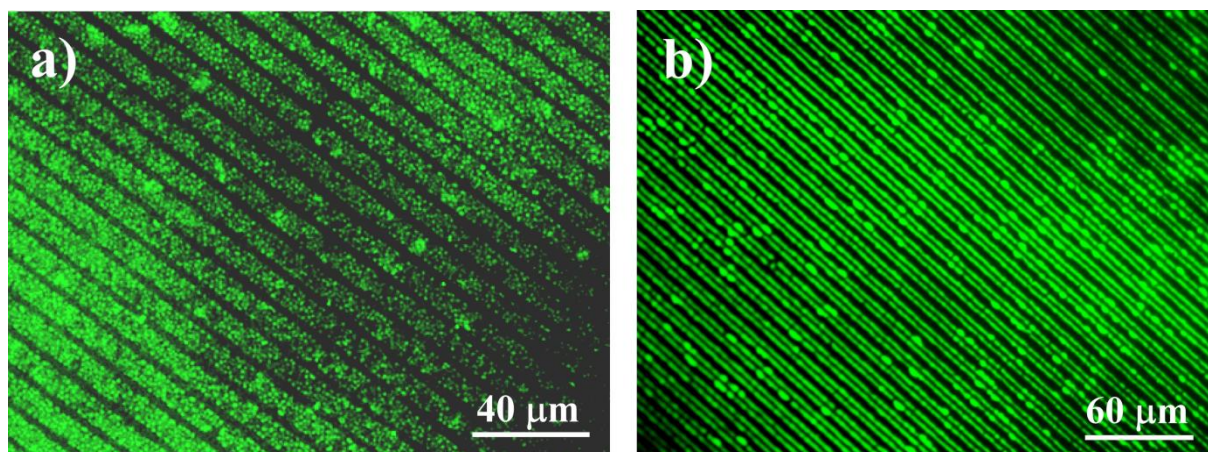


Rysunek 3. 46 Schematyczne przekroje wzorów polimerowych PEO/ PS (scharakteryzowanych skalą domenową $2R$) uformowanych na paskach Au/ SAM (o periodyczności λ) o różnych typach morfologii zależnych od relacji $2R/\lambda$: (a) mniejsza od $1/2$, (b) porównywalnej z $1/2$, (c) bliskiej 1. Na (a, b) widoczne są typy domen PEO: niskie (PEO- 2) i średnie (PEO-L), które odpowiadają strukturom lateralnym 2 i lamellarnym L charakterystycznym odpowiednio dla obszarów Au i SAM. (d) Obraz AFM dla $2R/\lambda \sim 1/2$. Białka adsorbują do fazy bogatej w PS, tworząc wysokie domeny nad periodycznymi obszarami Au, ale pokryte są warstwą PEO- L nad obszarami SAM. Takie ułożenie prowadzi do mikro- wzorów o hierarchicznej morfologii pokazanej na (e), jest to fragment obrazu fluorescencyjnego przedstawionego na rysunku 3.49 c.

Omawiany rysunek 3.45 przedstawia biomolekuły Con A zgrupowane w periodyczne struktury łańcuchów wysp. Jest to hierarchiczny mikro-wzór białka o dwóch charakterystycznych skalach: periodyczności $\lambda = 8 \mu\text{m}$ narzuconej przez paski PEO odpornego na adsorpcję białka, wywodzące się z lokalnej lamellarnej morfologii, oraz skali $2R$ polimerowej struktury domenowej wynoszącej $1,60 \mu\text{m}$ dla obszarów alternatywnych o lateralnej morfologii, gdzie PS tworzy wysopodobne domeny, do których chętnie adsorbują białka. Takie zhierarchizowane mikro- wzory są wytwarzane na dużych obszarach tj. $> 2 \text{ mm}$ co pokazano na rysunku 3.47.

Analiza porównawcza dalekozasięgowego uporządkowania regularnych struktur z zgrupowanymi białkami i ich polimerowych szablonów jest wykonana za pomocą analizy Fouriera. Za pomocą relatywnych intensywności I_n opisujących piki anizotropowej składowej spektrum potęgowego $P_a(k)$ (rysunek 3.41 b, d) oszacowano wkład różnych modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazach fluorescencyjnych białek i na obrazach AFM powierzchni szablonów polimerowych. Wyniki analizy Fouriera otrzymane dla omawianego szablonu w postaci

łańcuchów wysp (tj. dla $2R/\lambda \sim 0,2$) pokazano na rysunku 3.45 c jako histogramy relatywnych intensywności I_n dla powierzchniowych wzorów polimerów (kolumny wypełnione) i wzorów zaadsorbowanych białek (kolumny niewypełnione). Zarówno dla struktur powierzchniowych wzorów polimerów jak i mikro- wzorów białek otrzymano silny pik intensywności modu podstawowego $I_1 > 0,6$ i o wiele słabsze intensywności wyższych modów I_n ($n > 1$). Stosując analogię do krystalografii można stwierdzić, że zastosowana analiza Fouriera pokazuje periodyczność szerokich pasków („komórki elementarnej”) o licznych przypadkowo rozmieszczonych domenach wysokiego PS/ białek („atomach”).



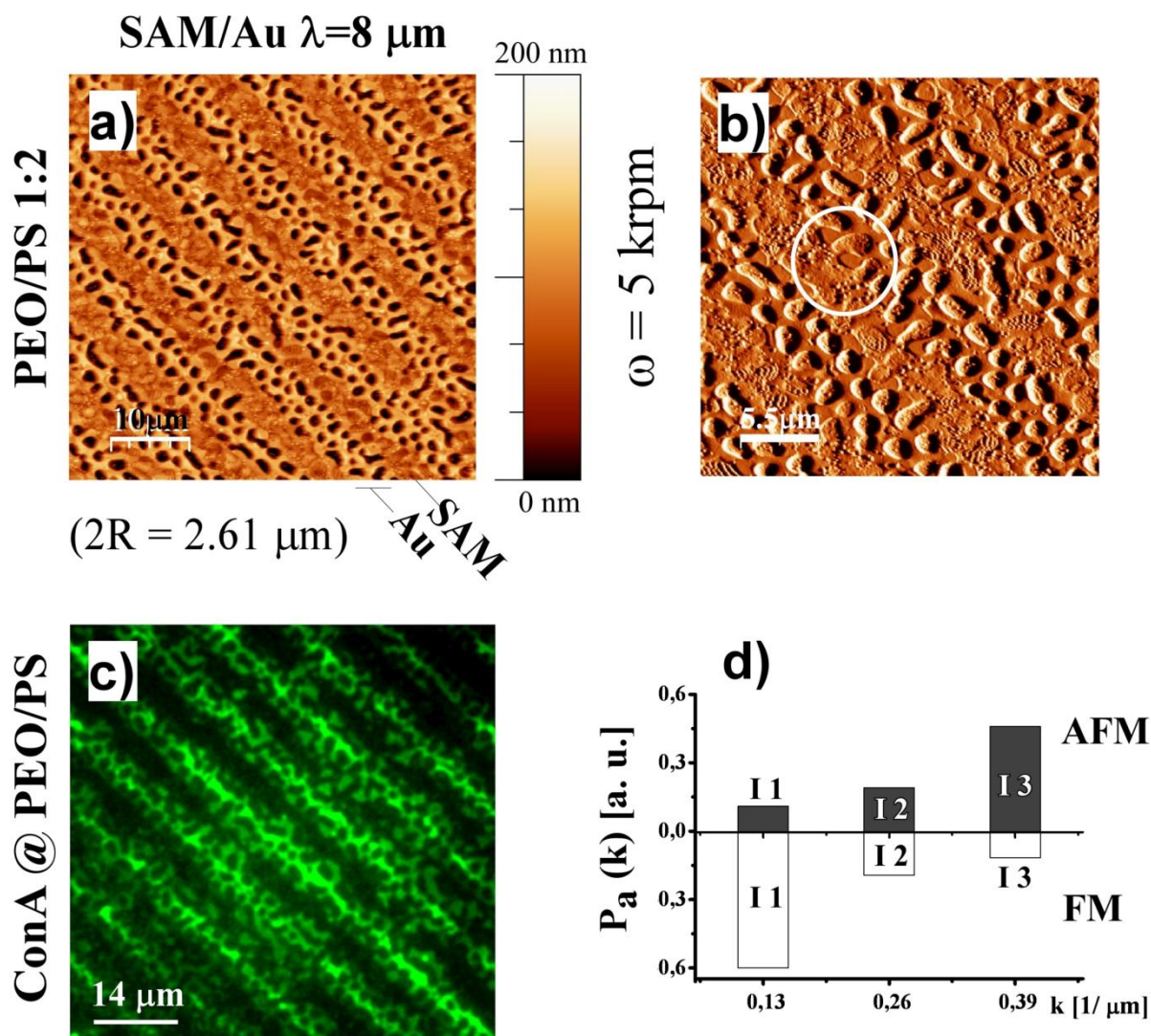
Rysunek 3. 47 Hierarchiczne mikro- wzory wytworzone na obszarach makroskopowych ($> 2\text{mm}$). Fluorescencyjnie znakowane białko (lektyna Con A) zaadsorbowało selektywnie do fazy bogatej w PS wzorów powierzchniowych PEO/ PS 1:1 (a) i 1:2 (b) uformowanych na wzorach Au/ SAM- CH_3 $4\text{ }\mu\text{m}/4\text{ }\mu\text{m}$ w czasie spin- castingu ($\omega = 2\text{ k rpm}$).

Regularne rozgałęzione pasy ($R/\lambda \sim 0,33$)

Aby zweryfikować kontrolę nad morfologią wzorów powierzchniowych PEO/ PS zmieniono stechiometrię mieszaniny z 1:1 na 1:2. Aby częściowo zrekompensować zmniejszenie skali $2R$ zwiększono prędkość wirowania ω do 5 k rpm. W wyniku tego charakterystyczna skala struktury domenowej odpowiada jednej trzeciej periodyczności wzoru SAM $\lambda = 8\text{ }\mu\text{m}$. Topografia powierzchniowych wzorów polimerów powstałych przy tak wybranych parametrach została zobrazowana mikroskopem AFM i pokazana jest na rysunku 3.48 a, na którym widać dwa typy naprzemiennych obszarów o odmiennej strukturze. Pierwszy typ to obszar o ciągłych strukturach wysokich izolowanych dolinami przypominający strukturę lateralną (2) zaobserwowaną dla tej mieszaniny wylanej w tych samych warunkach na jednorodne podłoże Au (rysunek 3.42 c). Dlatego też można wnioskować, że te pasma uformowały się na paskach Au. Z kolei drugi typ obszaru czyli płaskowyzę o średniej wysokości, które są jednorodne na powierzchni, przypomina swoją budowę lamellarne uporządkowanie faz (L) polimerów na podłożach jednorodnych SAM (rysunek 3.42 d), a więc powstał na paskach SAM.

Aby zidentyfikować trzy typy domen powierzchniowych (uciążone wzniesienia, płaskowyzę średniej wysokości, odizolowane doliny) składające się z różnych faz polimerów można zastosować dwa rodzaje obrazowania powierzchni. Obraz zarejestrowany pierwszą metodą, jaką jest mapowanie zaadsorbowanych białek fluorescencyjnych, jest pokazany na rysunku 3.48 c. Z porównania go z obrazem topograficznym (rysunek 3.48 a) wynika, że rozgałęzione domeny białka (które adsorbują do PS) odpowiadają uciążonym strukturom wysokim. Natomiast pozostałe dwa rodzaje domen gdzie

adsorpcja białka nie została zaobserwowana muszą być bogate w molekuly PEO. Podobny wniosek wynika z analizy przeprowadzonej w oparciu o amplitudowy obraz AFM odzwierciedlający nachylenie powierzchni. Na obrazie amplitudy o wiele wyraźniej niż na obrazie topograficznym widoczne są detale struktur powierzchniowych, które znajdują się w obszarach PEO i są wynikiem krystalizacji. Obraz amplitudy AFM pokazany na rysunku 3.48 b wyraźnie przedstawia rozgałęzione wysokie struktury fazy PS o niskim sygnale amplitudy skontrastowane z obszarami PEO o silnych oscylacjach sygnału, które to obszary odpowiadają płaskowyżom i dolinom widocznym na obrazie topograficznym. Schemat wnioskowanej struktury jest pokazany na rysunku 3.46 a.



Rysunek 3. 48 Obrazy AFM (a- topografia, b- amplituda) wzorów powierzchniowych PEO/ PS (1:2) uformowanych w czasie spin- castingu ($\omega= 5\text{ k rpm}$) na podłożu o periodycznym wzorze Au/ SAM- CH_3 $4 \mu\text{m}/ 4 \mu\text{m}$. (c) Obraz fluorescencyjny białka (lektyny Con A) zaadsorbowanego do domen fazy PS. (d) Histogramy znormalizowanych natężeń maksimów dyfrakcyjnych transformaty Fouriera I_n , określających wkład modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazie topograficznym (a) (wypełnione kolumny) i fluorescencyjnym (c) (niewypełnione kolumny). Okrąg w (b) pokazuje tożsamość fazy PEO tworzącej paski nad obszarami SAM (o średniej wysokości, a) i fazy PEO tworzącej doliny uformowane nad Au (niskie, a).

Aby przetestować dalekozasięgowe uporządkowanie wzorów powierzchniowych mieszaniny PEO/ PS i morfologii zgrupowanych białek sprawdzono intensywności fourierowskie I_n , co pokazano na rysunku 3.48 d (wypełnione kolumny- AFM, niewypełnione kolumny- FM). Wyraźnie największy

wkład do morfologii obrazu topograficznego ma mod strukturalny o częstotliwości $\lambda/3$. Jego intensywność ($I_3 \sim 0,46$) jest o wiele wyższa niż wkład modu strukturalnego $\lambda/2$ i modu podstawowego. Odpowiadają za to izolowane doliny PEO, które dominują w obrazie topograficznym i tworzą silną substrukturę $\lambda/3$, co wynika z dwóch efektów. Pierwszym z nich jest charakterystyczna odległość między dolinami $2R = 2,61 \mu\text{m}$ co odpowiada $1/3$ periodyczności wzoru substratu λ . Po drugie, odizolowane doliny są ułożone w równoległe łańcuchy, co zostało wymuszone przez sąsiednie obszary o lamellarnej morfologii. Natomiast w przypadku struktur składających się z zgrupowanych białek, główny wkład do morfologii wnosi mod podstawowy o intensywności $I_1 \sim 0,60$, który jest o wiele silniejszy od intensywności I_n odpowiadającym wyższym modom λ/n ($n > 1$). To odzwierciedla periodyczność rozgałęzionych pasów zaadsorbowanych białek fluorescencyjnych o strukturze wewnętrznej niewystarczająco regularnej, aby zmodyfikować wartości natężeń Fouriera.

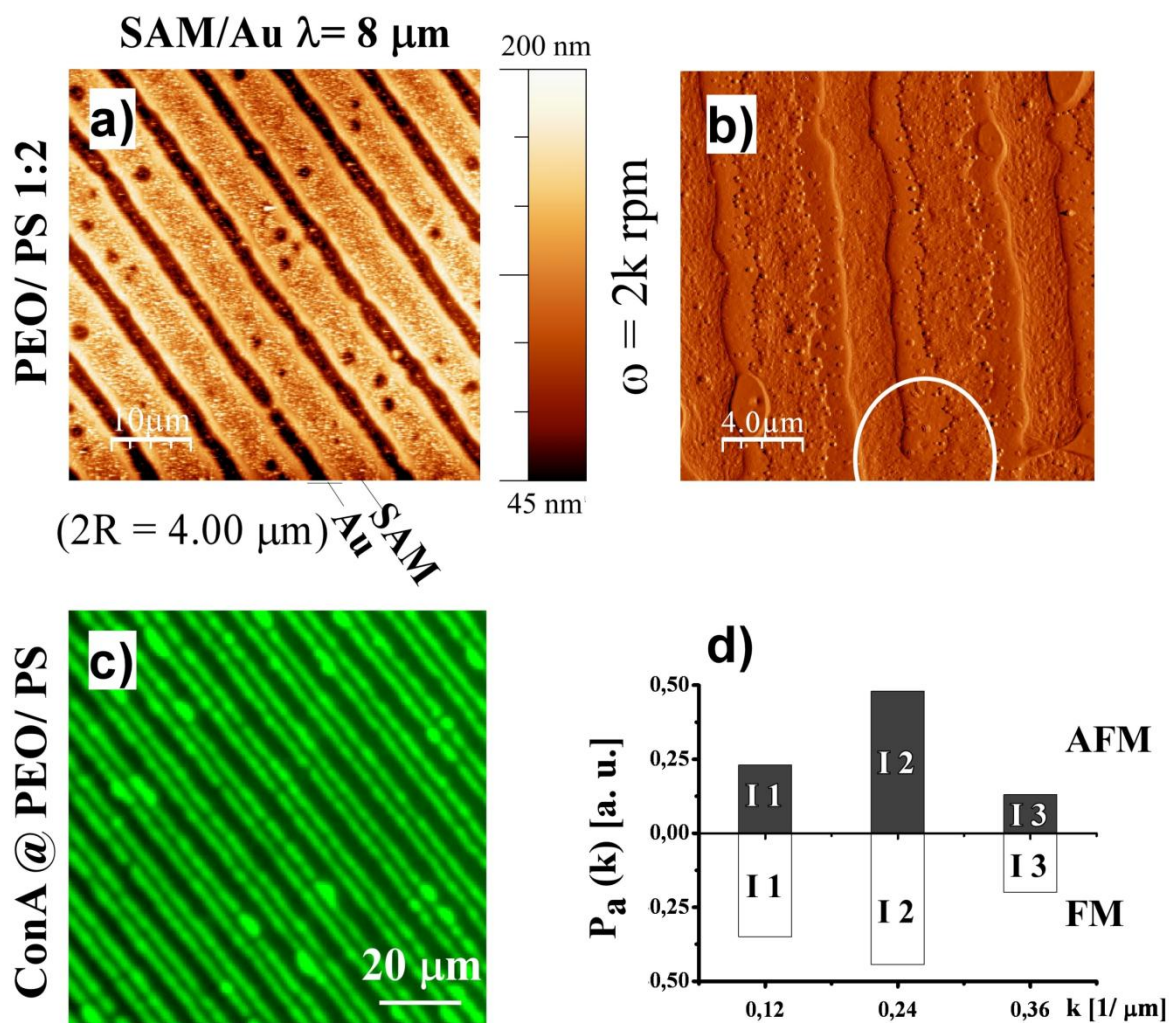
Periodyczne pary pasków ($R/\lambda \sim 0,50$)

W kolejnym kroku prędkość wirowania została zredukowana, aby zmniejszyć charakterystyczną skalę struktury domenowej do wartości równej połowie periodyczności wzoru substratu $\lambda = 8 \mu\text{m}$, czyli $2R = 4 \mu\text{m}$. Było to motywowane wcześniejszymi doniesieniami o wywołanym przez wzór podłoża idealnym uporządkowaniu domen mieszanin o skali⁵³ a nawet periodyczności równej $\lambda/2$.⁶¹ Otrzymana morfologia osadzonych warstw PEO/PS jest pokazana na obrazie topograficznym AFM (rysunek 3.49 a). Widoczne są naprzemienne asymetryczne, wysokie i szerokie oraz niskie i wąskie, paski o periodyczności zgodnej z periodycznością wzoru substratu $\lambda = 8 \mu\text{m}$. Jednak bardziej wnikliwa analiza lokalnej struktury (rysunek 3.46 d) pokazała, że w obszarze szerokich pasów można wyróżnić dwa typy domen, są to wysokie krawędzie odseparowane płaskim regionem o średniej wysokości. Odległość między tymi krawędziami różni się od $\lambda/2$ zatem morfologia, inna od zaobserwowanej wcześniej dla $2R/\lambda \sim 0,5$ ^{53,61}, może być opisana jako periodyczne pary pasków.

Jak w przypadku rozgałęzionych pasów, tutaj również obserwuje się trzy typy domen o różnych wysokościach (porównaj rysunek 3.48 a, 3.49 a) z tą różnicą, że wzniesienia i depresje nie są już połączone i odizolowane, odpowiednio, ale są liniowe odzwierciedlające strukturę lateralną (2), co wynika z dłuższego czasu separacji fazowej (po zredukowaniu ω). Wniosek ten jest dodatkowo potwierdzony przez obraz morfologii otrzymanej dla pośredniej wartości $2R/\lambda \sim 0,38$ (rysunek 3.53). Lamellarna struktura (L) morfologii jest zachowana w formie płaskowyżów, czyli domen o średniej wysokości. Dokładna analiza lokalnej topografii (rysunek 3.46 d) pokazuje nitkowate struktury charakterystyczne dla skryształizowanego PEO.⁸⁰ Są one wyraźnie widoczne w obszarach dolin i płaskowyżów powiązanych odpowiednio z domenami PEO-2 i PEO-L (rysunek 3.46 b). Podobieństwo obu typów domen bogatych w PEO potwierdzono obrazem amplitudy AFM (rysunek 3.49 b). Natomiast pary wysokich pasków (tworzące krawędzie pasków szerokich) są jednoznacznie zidentyfikowane jako faza PS na podstawie zdjęć fluorescencyjnych zaadsorbowanych lektyn (porównaj rysunki 3.48 a, c oraz 3.46 d, e).

Periodyczne pary pasków białek zaadsorbowanych selektywnie do domen PS wzorów powierzchniowych polimerów PEO/PS są zgrupowane na obszarach makroskopowych ($> 2 \text{ mm}$) co pokazano na rysunku 3.47 b. Te regularne mikro-wzory białek odwzorowują nowy typ morfologii mieszaniny polimerów powstały przez działanie kilku czynników. Po pierwsze podłoże o wzorze Au/SAM wymusza równoczesne wytworzenie się obszarów o morfologii lateralnej (2) i lamellarnej (L)

domen. Po drugie lamelle o szerokości $\lambda/2$ formują się nad paskami SAM, podczas gdy ostateczna skala lateralnie uporządkowanych domen jest trochę niższa od charakterystycznej skali domenowej $2R \sim \lambda/2$, aby dopasować się do szerokości pasków Au. Po trzecie ułożenie domen, odpowiadające stechiometrii mieszaniny PEO/PS 1:2, jest zoptymalizowane gdy długość granic międzyfazowych jest zredukowana. To odpowiada za połączenie się lamellarnych domen PS (na obszarach SAM) z lateralnymi domenami PS (na obszarach Au), co schematycznie pokazano na rysunku 3.46 b. Podobne U-kształtne struktury, ograniczone przez wzór podłoża (paski)^{52, 59} zostały ostatnio zaobserwowane dla innej mieszaniny. W tamtym przypadku efekt ten związany jest z procesem dewettingu.⁸⁵



Rysunek 3. 49 Obrazy AFM (a- topografia, b- amplituda) wzorów powierzchniowych PEO/ PS (1:2) uformowanych w czasie spin- castingu ($\omega = 2\text{ k rpm}$) na podłożu o periodycznym wzorze Au/ SAM- CH_3 4 μm / 4 μm . (c) Obraz fluorescencyjny białka (lektyny Con A) zaadsorbowanego do domen fazy PS. (d) Histogramy znormalizowanych natężeń maksimów dyfrakcyjnych transformaty Fouriera I_n , określających wkład modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazie topograficznym (a) (wypełnione kolumny) i fluorescencyjnym (c) (niewypełnione kolumny). Okrąg w (b) pokazuje obszary tożsamości fazy PEO, tworzącej szerokie pasy nad obszarami SAM (o średniej wysokości, a) i bardziej regularne wstęgi nad obszarami Au (doliną, a).

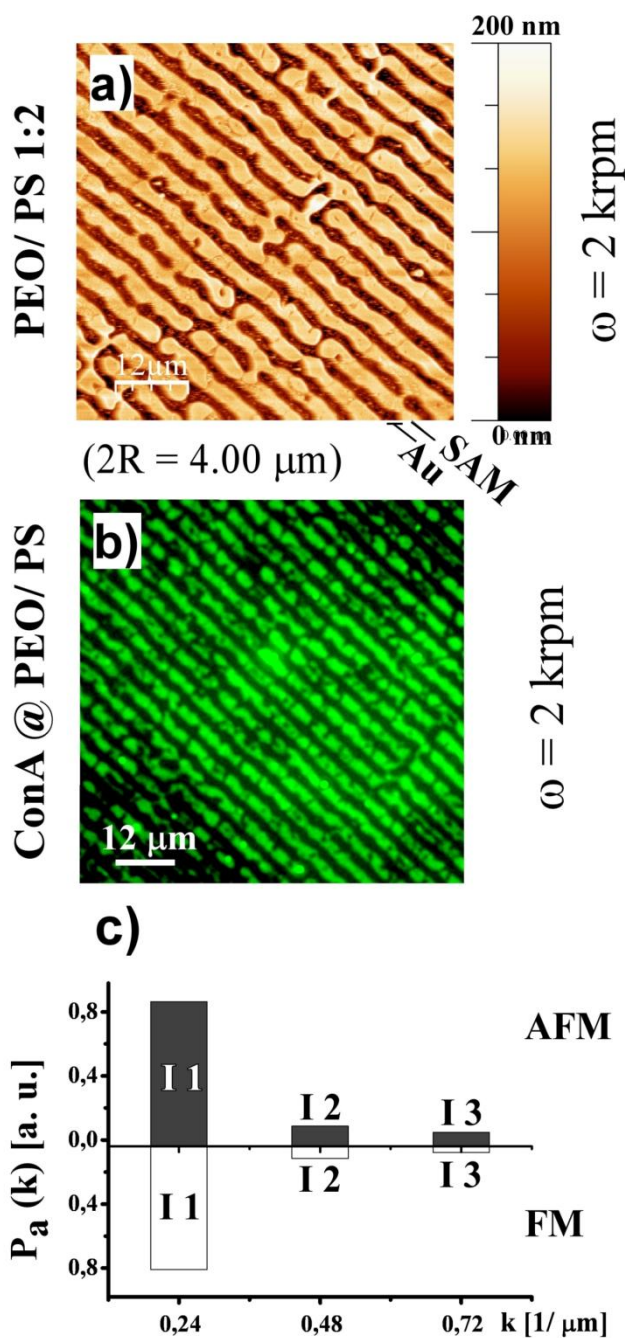
Analiza Fouriera pokazana na rysunku 3.49 d potwierdza dalekozasięgowy charakter uporządkowania powierzchniowych wzorów topograficznych (wypełnione kolumny) i mikro- wzorów białka (niewypełnione kolumny). Wzór topograficzny ewidentnie jest zdominowany przez wysokie struktury PS oddalone od siebie o mniej niż $\lambda/2$. Należą one do szerszych stref, które są wyższe od

sąsiednich wąskich dolin o periodyczności λ . Przez analogię do krystalografii to odpowiada „komórce elementarnej” złożonej z dwóch pasków („atomów”) oddalonych od siebie prawie o $\lambda/2$. Takie uporządkowanie jest odzwierciedlone przez intensywność drugiej harmonicznej $I_2 > 0,48$, której wartość jest wyższa od wartości intensywności strukturalnego modu podstawowego I_1 i wyższych I_n ($n > 2$). Regularne pary pasków uformowane z fazy PS są odwzorowane przez zaadsorbowane białka (rysunek 3.46 d, e). analiza Fouriera pokazuje, że otrzymano mikro- wzory białka wiernie odtwarzające morfologię wzorów powierzchniowych polimerów (rysunek 3.49 d).

Regularne paski ($2R/\lambda \sim 1$)

Aby pokazać, że współmierność ($2R/\lambda$) między mieszaniną a wzorem substratu może być kontrolowana przez periodyczność wzoru λ , zmniejszono λ do $4\ \mu\text{m}$, ale nie zmieniono warunków spin- castingu i charakterystycznej skali domenowej $2R = 4\ \mu\text{m}$. We wszystkich pracach, gdzie skala domenowa była dopasowana do periodyczności wzoru chemicznego podłoża ($2R \sim \lambda$), obserwowano idealne odtworzenie tego wzoru chemicznego przez morfologię mieszanin różnych polimerów.^{46, 47, 53, 60, 61, 86, 87} Takie zachowanie zaobserwowano również dla mieszaniny PEO/ PS, co widać na obrazie topograficznym AFM (rysunek 3.50 a). Przedstawiona topografia wzoru powierzchniowego PEO/ PS różni się od morfologii pokazanych wcześniej, otrzymanych dla $2R/\lambda < 1$. Nie uformowały się współlistniejące, hierarchiczne lamellarne (L) i lateralne (2) struktury domenowe. Widoczne są natomiast naprzemienne podłużne wyspy i doliny podobne do struktur obserwowanych wcześniej.^{46, 47, 53, 60, 61} Analogicznie postuluje się, że ten typ wzoru powierzchniowego składa się z kwasi-dwuwymiarowych domen, których ułożenie kontrolowane jest chemicznymi właściwościami substratu. To oznacza, że liniowe domeny PS uformowane wzdłuż pasków SAM, są wyższe od liniowych domen fazy PEO utworzonych na obszarach Au (rysunek 3.46 c). Taka identyfikacja dwóch typów (nie jak poprzednio trzech) domen jest potwierdzona przez porównanie obrazu topograficznego z obrazem fluorescencyjnym zaadsorbowanej Con A, która selektywnie adsorbuje do fazy bogatej w PS (rysunek 3.50 b).

Wyniki analizy Fouriera są przedstawione na rysunku 3.50 c. Zarówno wzór powierzchniowy obrazu topograficznego (wypełnione kolumny) jak i morfologia mikro- wzoru białek (niewypełnione kolumny) charakteryzuje się wyraźnymi periodycznymi paskami. Dlatego, też w obu tych przypadkach natężenie Fouriera struktury podstawowej jest największe ($I_1 > 0,8$), a wkład strukturalny pozostałych modów I_n ($n > 1$) można zaniedbać. Porównanie wzorów powierzchniowych polimerów i zgrupowanych białek dokonane za pomocą analizy Fouriera potwierdza dalekozasięgowe uporządkowanie tych wzorów i prawie idealną reprodukcję wzoru polimerów przez zaadsorbowane lektyny.



Rysunek 3. 50 (a) Obraz AFM usieciowanych wzorów powierzchniowych mieszaniny PEO/ PS 1:2 (w:w) osadzonej z chloroformu na wirującym z prędkością $\omega = 2k$ rpm podłożu Au z uprzednio utworzonym wzorem tioli o periodyczności $\lambda = 4 \mu m$. (b) Obraz fluorescencyjny białka (lektyny Con A) zaadsorbowanego do domen fazy PS. (c) Histogramy znormalizowanych natężeń maksimów dyfrakcyjnych transformaty Fouriera I_n , określających wkład modów strukturalnych λ/n do morfologii obserwowanej na obrazie topograficznym (a) (wypełnione kolumny) i fluorescencyjnym (b) (niewypełnione kolumny).

3.3.3.5. Wnioski

W tej części rozszerzono badania samo-organizacji w mieszaninach polimerów deponowanych na podłożu z nadrukowanym wzorem chemicznym z systemów modelowych^{46-50, 52-54, 56, 58, 61}, czy systemów używanych dla „plastikowej” elektroniki^{51, 55, 57, 60, 62-68} na układy polimerów dla zastosowań biomedycznych. Wzory powierzchniowe polimerów, o morfologii kontrolowanej przez wzór chemiczny podłoża, są użyte jako szablony do grupowania lektyny Con A i wytwarzania różnych,

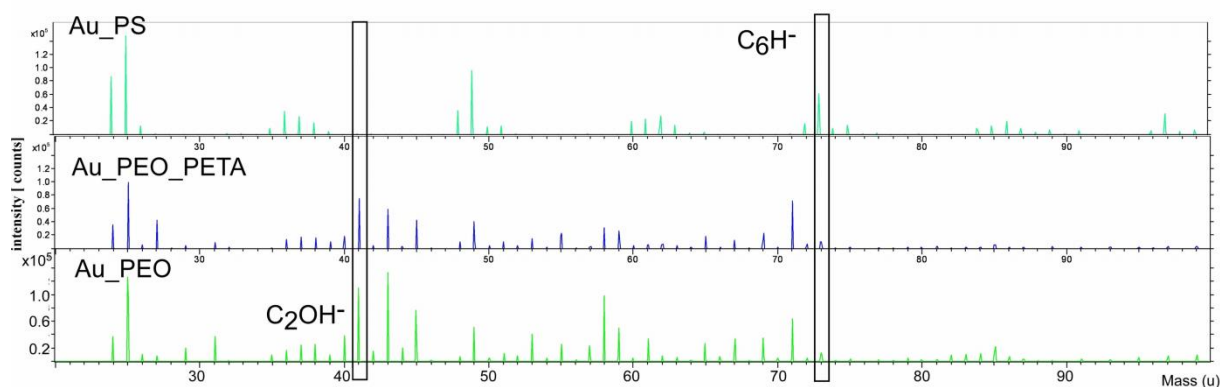
regularnych mikro- wzorów. Domenowe struktury polimerów odpornego na adsorpcję białka PEO i chętnie adsorbującego białka PS powstają w czasie jednoetapowego procesu wylewania ich mieszaniny na wirujące podłoże. Modelowe białko- lektyna Con A adsorbuje wysoce selektywnie do domen PS wzorów powierzchniowych w zoptymalizowanych warunkach (skład mieszaniny, warunki wylewania, warunki adsorpcji białka).²³ Ostatnio publikowane wyniki badań mieszaniny PS/ PEO pokazują, że duży wpływ na stopień selektywności adsorpcji białka wywierają użyte materiały i warunki przygotowania filmów polimerowych.²⁵ W tym rozdziale pokazano regularne domeny białkowe uporządkowane na obszarach makroskopowych. Pokazane podejście może być zastosowane dla innych mieszanin polimerów i innych białek. Stosując samo- organizację według wzoru podłoża można uzyskać regularne wzory powierzchniowe mieszaniny PS/ PMMA.²¹ Dla nieregularnych odpowiedników tych wzorów zaobserwowano niejednorodną adsorpcję lektyn, albuminy i fibrynogenu, której stopień zależał od warunków adsorpcji dla różnych typów domen (lub nawet powierzchni międzyfazowych).^{16, 18, 19, 23}

Wzory powierzchniowe PEO/ PS zostały użyte jako szablony do grupowania lektyn w regularne mikro- wzory o różnej morfologii zależnej od $2R/\lambda$, kontrolowanej przez periodyczność wzoru chemicznego podłoża λ , przez stechiometrię mieszaniny oraz warunki spin- castingu (te ostatnie umożliwiają kontrolę skali domen $2R$). Z wyjątkiem periodycznych pasków uzyskiwanych dla $\lambda \sim 2R$, otrzymano nowe hierarchiczne rodzaje wzorów dla $2R/\lambda < 1$. Periodyczne łańcuchy wysp, rozgałęzione paski i pary pasków powstały przez wymuszone wzorem podłoża jednoczesne tworzenie się lokalnych lamellarnych (L) i lateralnych (2, kwasi- dwuwymiarowych) struktur domenowych. Naprzemienne lokalne struktury domenowe dwóch typów narzucają większe rozmiary (periodyczność λ) hierarchicznej morfologii, podczas gdy mniejsze rozmiary struktur lateralnych wynikają z charakterystycznej skali domenowej $2R$.

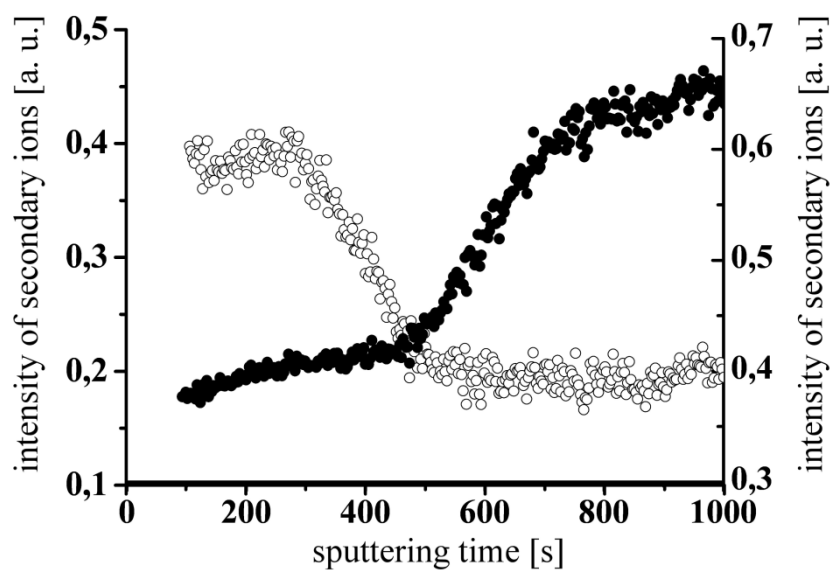
Analiza Fouriera potwierdza dalekozasięgowe uporządkowanie regularnych struktur, a przede wszystkim potwierdza (z wyjątkiem $2R/\lambda \sim 1/3$) zgodność powierzchniowych wzorów polimerów i mikro- wzorów zgrupowanych molekuł białka. Pokazano również, że ograniczenie struktur lateralnych (2) przez sąsiadujące paski o strukturze lamellarnej (L) prowadzi do liniowego, regularnego ułożenia domen lateralnych co jest uwidocznione przez znaczne wzmocnienie wyższych modów strukturalnych λ/n ($n > 1$). Natężenia wyższych harmonicznych Fouriera I_n ($n > 1$) stają się dominujące ($I_3 \sim 0,46$) dla topografii mieszaniny dla $2R/\lambda \sim 1/3$ a przeważają w topografii i grupowaniu białek dla $2R/\lambda \sim 1/2$.

Zademonstrowane regularne mikro- wzory białka charakteryzują się dalekozasięgowym uporządkowaniem, bogactwem typów morfologii, różnymi rozmiarami, możliwością uzyskania substruktur, użytecznością do badania reakcji komórkowych (dla zastosowanej tu Con A^{34, 35}). Zaprezentowana tu strategia tworzenia mikro- wzorów białek jest wyjątkowa ze względu na zastosowanie selektywnej adsorpcji białka do szablonów polimerowych o kontrolowanej morfologii wytworzonych w jedno- etapowym procesie przez samo- organizację (kontrolowaną wzorem podłoża) polimerów o kontrastujących własnościach adsorpcji białka. Wszystkie własności tej metody sprawiają, że wytworzone w ten sposób mikro- wzory białka mogą być zastosowane w aplikacjach biomedycznych.

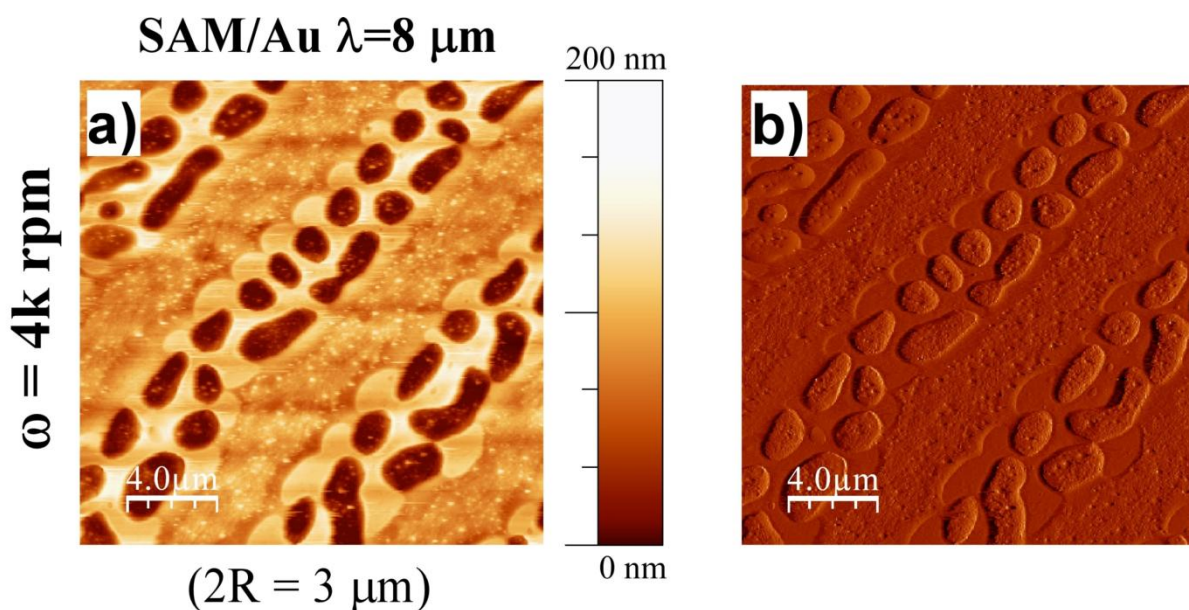
3.3.3.6. Informacje uzupełniające



Rysunek 3. 51 Widma masowe SIMS różnych polimerów (PS, PEO, PEO z domieszką PETA), na podstawie których wybrano charakterystyczne jony wtórne, umożliwiające identyfikację składników mieszanin: C_2OH^- , $m/z = 41$ (PEO), C_6H^- , $m/z = 73$ (PS).



Rysunek 3. 52 Profile głębokościowe SIMS, wykonane prostopadle do płaszczyzny lamellarnie ułożonych faz mieszaniny PEO/ PS 1:1 wylanej z chloroformu na podłoże SAM wirujące z prędkością $\omega = 2k$ rpm, odzwierciedlają rozkład fazy PEO (C_2OH^- , $m/z = 41$, $\circ$, prawa oś) i rozkład fazy PS (C_6H^- , $m/z = 73$, $\bullet$, lewa oś) w warstwie polimerowej. Czas rozpylania odpowiada głębokości próbkowania (rozpylanie polimerów zawierających atomy tlenu (PEO) następuje szybciej niż w przypadku PS)⁸¹.



Rysunek 3. 53 Obrazy AFM (a- topografia, b- amplituda) wzorów powierzchniowych PEO/ PS (1:2) uformowanych w czasie spin- castingu ($\omega=4\text{ k rpm}$) na podłożu o periodycznym wzorze Au/ SAM- CH₃ 4 μm / 4 μm .

3.3.3.7. Literatura

- (1) S. Affrossman, G. Henn, S. A. O'Neill, R. A. Pethrick, M. Stamm, *Macromolecules* 1996, **29**, 5010.
- (2) K. Dalnoki – Veress, J. A. Forrest, R. Stevens, R. Dutcher, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 1996, **34**, 3017.
- (3) S. Walheim, M. Böltau, J. Mlynek, G. Krausch, U. Steiner, *Macromolecules*, 1997, **30**, 4995.
- (4) S. Walheim, M. Ramstein, U. Steiner, *Langmuir*, 1999, **15**, 4828.
- (5) C. Ton-That, A. G. Shard, R. H. Bradley, *Polymer*, 2002, **43**, 4973.
- (6) J. Raczowska, J. Rysz, A. Budkowski, J. Lekki, M. Lekka, A. Bernasik, K. Kowalski, P. Czuba, *Macromolecules*, 2003, **36**, 2419.
- (7) M. Sprenger, S. Walheim, A. Budkowski, U. Steiner, *Interface Science*, 2003, **11**, 225.
- (8) A. Budkowski, A. Bernasik, P. Cyganik, J. Raczowska, B. Penc, B. K. Bergues, K. Kowalski, J. Rysz, J. Janik, *Macromolecules*, 2003, **36**, 4060.
- (9) S. Y. Herriot, R. A. L. Jones, *Nat. Mater.*, 2005, **4**, 782.
- (10) L. Cui, Y. Ding, X. Li, Zh. Wang, Y. Ch. Han, *Thin Solid Films*, 2006, **515**, 2038.
- (11) M. Berggren, O. Inganäs, G. Gustafsson, J. Rasmusson, M. R. Andersson, T. Hjertberg, O. Wennerström, *Nature*, 1994, **372**, 444.
- (12) J. M. Halls, C. A. Walsh, N. C. Greenham, E. A. Marsegila, R. H. Friend, S. C. Moratti, A. B. Holmes, *Nature*, 1995, **376**, 498.
- (13) E. Moons, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2002, **14**, 12235.
- (14) L. L. Chua, P. K. H. Ho, H. Sirringhaus, R. H. Friend *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 1609.
- (15) A. Anselmo, L. Lindgren, J. Rysz, A. Bernasik, A. Budkowski, M. Andersson, K. Svensson, J. Van Stam, E. Moons, *Chem. Mater.*, 2011, **23**, 2295.
- (16) C. Morin, A. P. Hitchcock, R. M. Cornelius, J. L. Brash, S. G. Urquhart, A. Scholl, A. Doran, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, 2004, **137-140**, 785.
- (17) A. Sousa, M. Sengonul, R. J. Latour, J. Kohn, M. Libera, *Langmuir*, 2006, **22**, 6286.
- (18) L. Li, A. P. Hitchcock, R. Cornelius, J. L. Brash, A. Scholl, A. Doran, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2150.
- (19) L. Li, A. P. Hitchcock, N. Robar, R. Cornelius, J. L. Brash, A. Scholl, A. Doran, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 16763.
- (20) N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, A. S. G. Curtis, S. Affrossman, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 1857.
- (21) C. Minelli, A. Kikuta, N. Tsud, M. D. Ball, A. Yamamoto, *J. Nanobiotech.*, 2008, **6**, 3.
- (22) W. F. Liu, C. S. Chen, *Materials Today*, 2005, **8**, 28 and references therein.
- (23) J. Zemła, M. Lekka, J. Raczowska, A. Bernasik, J. Rysz, A. Budkowski, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 2101.
- (24) B. O. Leung, A. P. Hitchcock, R. Cornelius, J. L. Brash, A. Scholl, A. Doran, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 1838.
- (25) B. O. Leung, A. P. Hitchcock, J. L. Brash, A. Scholl, A. Doran, *Langmuir*, 2010, **26**, 14759.
- (26) G. M. Whitesides, *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 1161.

- (27) C. V. Bonduelle, E. R. Gillies, *Macromolecules*, 2010, **43**, 9230.
- (28) C. V. Bonduelle, S. Karamdoust, E. R. Gillies, *Macromolecules*, 2011, **44**, 6405.
- (29) G. Kumar, C. C. Ho, C. C. Co, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1084.
- (30) L. S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4025.
- (31) P. Angedent, *Drug Discov. Today*, 2005, **10**, 503.
- (32) A. I. Hook, D. G. Anderson, R. Langer, P. Williams, M. C. Davies, M. R. Alexander, *Biomaterials*, 2010, **31**, 187.
- (33) D. Pesen, D. B. Haviland, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, **1**, 543.
- (34) R. Loris, L. Wyns, *Glycoconj. J.*, 1994, **11**, 507.
- (35) J. G. Salisbury, J. P. Banga, *Thymus*, 1985, **7**, 335.
- (36) S. A. Ruiz, C. S. Chen, *Soft Matter*, 2007, **3**, 1 and references therein.
- (37) M. Lekka, A. J. Kulik, S. Jeney, J. Raczowska, J. Lekki, A. Budkowski, L. Forró, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 014702.
- (38) D. T. Chiu, N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *PNAS*, 2000, **97**, 2408.
- (39) J. L. Tan, J. Tien, C. S. Chen, *Langmuir*, 2002, **18**, 519.
- (40) C. S. Chen, X. Jiang, G. M. Whitesides, *MRS Bulletin*, 2005, **30**, 194.
- (41) A. M. Douvas, P. S. Petrou, S. E. Kakabakos, K. Misiakos, P. Argitis, E. Sarantopoulou, Z. Kolli, A. C. Cefalas, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**, 1027.
- (42) W. Senaratne, L. Andruzzi, C. K. Ober, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2427.
- (43) K. Y. Suh, J. Seong, A. Khademhosseini, P. E. Laibinis, R. Langer, *Biomaterials*, 2004, **25**, 557.
- (44) R. S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Biomaterials*, 1999, **20**, 2363.
- (45) P. S. Petrou, M. Chatzichristidi, A. M. Douvas, P. Argitis, K. Misiakos, S. E. Kakabakos, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1994.
- (46) M. Böltau, S. Walheim, J. Mlynek, G. Krausch, U. Steiner, *Nature*, 1998, **391**, 877.
- (47) P. Cyganik, A. Bernasik, A. Budkowski, B. Bergues, K. Kowalski, J. Rysz, J. Lekki, M. Lekka, Z. Postawa, *Vacuum*, 2001, **63**, 307.
- (48) P. Cyganik, A. Budkowski, U. Steiner, J. Rysz, A. Bernasik, S. Walheim, Z. Postawa, J. Raczowska, *Europhys. Lett.*, 2003, **62**, 855.
- (49) S. Walheim, C. Schäffer, U. Steiner, *Surf. Interf. Anal.*, 2004, **36**, 195.
- (50) C. Minelli, I. Geissbuehler, R. Eckert, H. Vogel, H. Heinzelmann, M. Liley, *Colloid Polym. Sci.*, 2004, **282**, 1274.
- (51) N. Fichet, N. Corcoran, P. K. H. Ho, A. C. Arias, J. D. MacKenzie, W. T. S. Huck, R. F. Friend, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 1908.
- (52) X. Li, R. Xing, Y. Zhang, Y. Han, L. An, L. Polymer, 2004, **45**, 1637.
- (53) J. Raczowska, P. Cyganik, A. Budkowski, A. Bernasik, J. Rysz, I. Raptis, P. Czuba, K. Kowalski, *Macromolecules*, 2005, **38**, 8486.
- (54) P. Andrew, W. T. S. Huck, *Soft Matter*, 2007, **3**, 230.
- (55) L. Y. Park, A. M. Munro, D. S. Ginger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15916.
- (56) J. Chiota, J. Shearer, M. Wei, C. Barry, J. Mead, *Small*, 2008, **5**, 2788.
- (57) L. Fang, M. Wei, C. Barry, J. Mead, *Macromolecules*, 2010, **43**, 9147.
- (58) Y. Karade, F. Madani-Grasset, R. Berger, V. Csiba, M. Rommel, A. Dietzel, *Microelectronics Engineering*, 2010, **87**, 1569.
- (59) T. Geldhauser, S. Walheim, Th. Schimmel, P. Leiderer, J. Boneberg, *Macromolecules*, 2010, **43**, 1124.
- (60) J. Jaczewska, A. Budkowski, A. Bernasik, I. Raptis, E. Moons, D. Goustouridis, J. Haberko, J. Rysz, *Soft Matter*, 2009, **5**, 234.
- (61) J. Raczowska, A. Bernasik, A. Budkowski, J. Rysz, B. Gao, M. Lieberman, *Macromolecules*, 2007, **40**, 2210.
- (62) A. Salleo, A. C. Arias, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 3540.
- (63) J. H. Wei, D. C. Coffey, D. S. Ginger, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 24324.
- (64) D. C. Coffey, D. S. Ginger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4564.
- (65) J. Haberko, J. Raczowska, A. Bernasik, J. Rysz, A. Budkowski, W. Łużny, *Synthetic Metals*, 2007, **157**, 935.
- (66) F. C. Chen, C. H. Liao, *Appl. Phys. Lett.*, 2008, **93**, 103310.
- (67) K. H. Yim, Z. Zheng, R. H. Friend, W. T. S. Huck, J. S. Kim, *Adv. Funct. Mater.*, 2008, **18**, 2897.
- (68) M. Wei, L. Fang, J. Lee, S. Somu, X. Xiong, C. Barry, A. Busnaina, J. Mead, *J. Adv. Mater.*, 2008, **20**, 1.
- (69) J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, G. L. Bowling, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 232.
- (70) Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 550.
- (71) M. Doytcheva, R. Stamenova, V. Zvetkov, C. Tsvetanow, *Polymer*, 1998, **39**, 6715.
- (72) M. Doytcheva, D. Dotcheva, R. Stamenova, C. Tsvetanow, *Macromol. Mater. Eng.*, 2001, **286**, 30.
- (73) M. Doytcheva, E. Petrova, R. Stamenova, C. Tsvetanow, G. Riess, *Macromol. Mater. Eng.*, 2004, **289**, 676.

- (74) A. D. F. Dunbar, P. Mokarian-Tabari, A. J. Parnell, S. J. Martin, M. W. A. Skoda, R. A. L. Jones, *Eur. Phys. J. E*, 2010, **31**, 369.
- (75) H. Tanaka, *Phys. Rev. E*, 1995, **51**, 1313.
- (76) C. J. Lawrence, *Phys. Fluids*, 1988, **31**, 2786.
- (77) E. Yilmaz, O. Yilmaz, H. Caner, *Eur. Pol. J.*, 1996, **32**, 927.
- (78) K. Binder, *Adv. Pol. Sci.*, 1999, **138**, 1.
- (79) J. Brandrup, E. H. Immergut, E. A. Grulke, *Polymer Handbook*, 4th ed.; J. Wiley & Sons: New York, 1999.
- (80) X. Gu, G. Wang, *Appl. Surf. Sci.*, 2011, **257**, 1952.
- (81) J. Zekonyte, V. Zaporotchenko, F. Faupel, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, 2005, **236**, 241.
- (82) L. A. Girifalco, R. J. Good, *J. Phys. Chem.*, 1957, **61**, 904.
- (83) J. Zemła, M. Lekka, J. Wiltowska-Zuber, A. Budkowski, J. Rysz, J. Raczowska, *Langmuir*, 2008, **24**, 10253.
- (84) K. Vasilev, A. Mierczynska, A. L. Hook, J. Chan, N. V. Voelcker, R. D. Short, *Biomaterials*, **2010**, 31, 392.
- (85) K. Kargupta, A. Sharma, *J. Chem. Phys.*, 2002, **116**, 3042.
- (86) B. D. Ermi, G. Nisato, J. F. Douglas, J. A. Rogers, A. Karim, *Phys. Rev. Lett.*, 1998, **81**, 3900.
- (87) A. Karim, J. F. Douglas, B. P. Lee, S. C. Glotzer, J. A. Rogers, R. J. Jackman, E. J. Amis, G. M. Whitesides, *Phys. Rev. E*, 1998, **57**, R6273.

Rozdział 4

Podsumowanie

Celem tej pracy było rozwinięcie strategii tworzenia mikro- macierzy białek (lektyn) przez ich selektywną adsorpcję do regularnych wzorów powierzchniowych cienkich warstw polimerów. Do badań wytypowano materiały polimerowe o różnych właściwościach powierzchni (hydrofobowość), wrażliwe na bodźce (tzw. polimery „inteligentne”) oraz polimery podatne na techniki miękkiej litografii.

W trakcie realizowania kolejnych etapów pracy tego projektu doktorskiego zastosowano wiele technik badawczych i metod analizy. Lateralną strukturę oraz domenowe uporządkowanie faz polimerów obrazowano za pomocą mikroskopii sił atomowych (topografia, AFM), sił bocznych (tarcie, LFM), kontrastu fazowego (PDM) oraz mikroskopu optycznego. Osadzone na powierzchniach cienkich warstw polimerowych białka obrazowano mikroskopem fluorescencyjnym. Pomiar kąta zwilżania wody w funkcji temperatury i pH wykonano dla pokryw PNIPAM. Warstwową strukturę zsyntetyzowanych pokryw PNIPAM sprawdzono za pomocą spektroskopii masowej jonów wtórnych (Rozdział 3.1.2). Tę technikę zastosowano również do ilościowej analizy warstw polimerów pokrytych białkami (Rozdział 3.1.2 i 3.3.3). Wzory powierzchniowe białek analizowano metodami Fouriera oraz geometrii całkowitej.

Po raz pierwszy zastosowano metodę analizy geometrii całkowitej do obrazów fluorescencyjnych białek zaadsorbowanych do jednorodnych powierzchni różnych polimerów. Umożliwia ona (względnie) ilościowe porównanie stopnia adsorpcji. Wyniki nielokalnej analizy geometrii całkowitej obrazów potwierdziły, że białka adsorbują do powierzchni hydrofobowych, ponadto umożliwiły wyselekcjonowanie par kontrastujących polimerów do badań powierzchniowego grupowania białek (Rozdział 3.1.1; [A1]). Zoptymalizowano metodę sieciowania (Rozdział 2.1.4) PEO ([A1]) oraz opracowano sposób sieciowania termo- czułego PNIPAM ([A5]).

Wyniki analizy geometrii całkowitej obrazów fluorescencyjnych LcH zaadsorbowanej do pokryć polimerów „inteligentnych” w warunkach różnego pH porównano z wynikami analizy danych spektrometrii masowej jonów wtórnych czasu przelotu (Rozdział 3.1.2; [A3]). Jednoznacznie została potwierdzona słuszność metody zaproponowanej do ilościowej analizy obrazów fluorescencyjnych.

Stosując selektywną adsorpcję białek do powierzchniowych wzorów mieszanin polimerów o kontrastujących własnościach hydrofobowych/ hydrofilowych PS/ PEO oraz PS/ PMMA wytworzono nieregularne mikro- wzory Con A i LcH. Jakość odtworzenia wzoru podłoża przez zgrupowane białka testowano stosując analizę geometrii całkowitej. Potwierdzono, że na podłożu PS/ PMMA białka nie grupują się w wysoce selektywny sposób. Otrzymano pokrycia PEO/ PS, do których białka adsorbują w wysoce selektywny sposób co jest potwierdzone wyznaczonymi miarami Minkowskiego oraz lokalną analizą natężenia fluorescencji (Rozdział 3.2.1; [A4], [A7]).

Po raz pierwszy przygotowano mikro- wzory wielu białek na powierzchniowych wzorach PS/ PNIPAM. Zastosowano sukcesywną selektywną adsorpcję różnych lektyn kontrolowaną zmianą temperatury (Rozdział 3.2.2; [A5]). Zastosowanie zaproponowanego tu podejścia do regularnych wzorów PS/ PNIPAM może stanowić konkurencję dla strategii tworzenia mikro- macierzy wielu białek opartej na wielokrotnym stosowaniu druku mikro- kontaktowego.

W rozdziale 3.3 zaproponowano wiele metod wytwarzania regularnych mikro- metrowych płytek testowych białek ([A2, A4, A6, A7]) . Zaprezentowane w rozdziałach 3.3.1 oraz 3.3.2 strategie wytwarzania płytek oparte są na różnych technikach miękkiej litografii: sił kapilarnych, odwróconego druku mikro- kontaktowego oraz mikro- formowania warstw wspomaganego rozpuszczalnikiem. Stosując te techniki wytworzono mikro- wzory białek o różnej periodyczności (kilka do kilkaset μm) na obszarach makroskopowych ($> 0,9 \text{ mm}$) (Rozdział 3.3.1; [A6]). Przez samo- organizację PEO/ PS według szablonu podłoża, kontrolowaną warunkami spin- castingu, wytworzono wiele typów regularnych wzorów polimerów kontrastujących, których następnie użyto do pozycjonowania lektyny Con A. Wytworzono mikro- metrowe płytki testowe o różnorodnych wzorach powierzchniowych (Rozdział 3.3.3; [A2]).

Przygotowane w ramach tego projektu mikro- wzory lektyn mogą być wykorzystane do monitorowania ilości glikoprotein (specyficzne oddziaływanie lektyna- glikoproteina) jak również jako podłoża do testowania adhezji oraz hodowli komórek.

Rozdział 5

Aneks

PUBLIKACJE W CZASOPISMACH BĄDŹ WYŚŁANE DO REDAKCJI

- A.1 **Zemła, J.**; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J. 2008 *Integral geometry analysis of fluorescence micrographs for quantitative relative comparison of protein adsorption onto polymer surfaces*. **Langmuir** 24, 10253–10258.
- A.2 **Zemła, J.**; Rysz, J.; Budkowski, A.; Awsiuk, K.; *Proteins grouped into a variety of regular micro-patterns by substrate-guided domains of self-assembling poly(ethylene oxide)/ polystyrene blends* – przyjęto do druku w Soft Matter
- A.3 Stetsyshyn, Y.; **Zemła, J.**; Żolobko, O.; Fornal, K.; Budkowski, A.; Kostruba, A.; Donchak, V.; Harhay, K.; Awsiuk, K.; Rysz, J.; Bernasik, A.; Voronov, S. *Temperature and pH dual-responsive coatings of oligoperoxide-graft- Poly(N-isopropylacrylamide) attached to glass for controlled protein adsorption* – wysłano do redakcji
- A.4 **Zemła, J.**; Lekka, M.; Raczkowska, J.; Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A. 2009 *Selective protein adsorption on polymer patterns formed by self-organization and soft lithography*. **Biomacromolecules** 10, 2101-2109.
- A.5 Budkowski, A.; Moons, E.; **Zemła, J.**; Awsiuk, K.; Bernasik, A.; Björström-Svanström, C. M.; Lekka, M.; Rysz, J.; Jaczewska, J. 2012 *Polymer blends spin-cast into films with complementary elements for electronics and biotechnology*. **J. Appl. Polym. Sci.** 2012 – w druku
- A.6 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J.; Lekka, M. 2012 *Reversed contrast and substructures in protein micro-patterns on 3D surfaces*. **Colloids Surf. B Biointefaces** 90, 144-151.

- A.7 Budkowski, A.; Bernasik, A.; Moons, E.; Lekka, M.; **Zemła, J.**; Jaczewska, J.; Haberkow, J.; Raczkowska, J.; Rysz, J.; Awsiuk, K. 2009 *Structures in multicomponent polymer films: Their formation, observation, applications in electronics and biotechnology*. **Acta Phys. Pol. A** 115, 435-440.

DONIESIENIA KONFERENCYJNE

- B.1 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J.; Lekka, M. *Adsorpcja białek do powierzchni i wzorów polimerowych* XXXIX Zjazd Fizyków Polskich, Szczecin 200
- B.2 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J.; Lekka, M. *Adsorpcja białek do powierzchni i wzorów polimerowych* XL II Krajowa Konferencja Nanotechnologii, Kraków 2008
- B.3 Budkowski, A.; **Zemła, J.**; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Rysz, J.; Raczkowska, J. *Integral geometry analysis of fluorescence micrographs to compare quantitatively protein adsorption onto polymer surfaces* IX Katowicko- Krakowskie Seminarium pt. „Fizyka Fazy Skondensowanej”, Kraków 2009
- B.4 Budkowski, A.; **Zemła, J.**; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Rysz, J.; Raczkowska, J. *Integral geometry analysis of fluorescence micrographs to compare quantitatively protein adsorption onto polymer surfaces* XL Zjazd Fizyków Polskich, Kraków 2009
- B.5 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczkowska, J.; Lekka, M. *Adsorpcja białek do powierzchni i wzorów polimerowych* XL Zjazd Fizyków Polskich, Kraków 2009
- B.6 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Lekka, M.; Raczkowska, J.; Rysz, J. *Polymer patterns replicated by adsorbing proteins: comparison of AFM and fluorescence images with integral geometry approach* Nanomeasure 2010, Kraków 2010
- B.7 **Zemła, J.** *Selektywna adsorpcja białek do mikrowzorów polimerów* IX Katowicko- Krakowskie Seminarium pt. „Fizyka Fazy Skondensowanej”, Rychwałd 2010
- B.8 **Zemła, J.**; Lekka, M.; Raczkowska, J.; Bernasik, A.; Rysz, J.; Budkowski, A. *Integral geometry analysis of AFM images of polymer patterns formed by self-organization and fluorescence micrographs of protein replicated patterns* Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, Rytro 2010
- B.9 Zolobko, O.; **Zemła, J.**; Fornal, K.; Kostruba, A.; Donchak, V.; Harhay, H.; Stetsyshyn, Y.; Budkowski, A.; Voronov, A. *The structure and properties of oligoester thermoresponsible nanolayers grafted to the glass surface* Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, Beregove, Ukraine 2010
- B.10 **Zemła, J.** *Reverse contrast and substructures of protein micro-patterns on 3D polymer surface* X Katowicko- Krakowskie Seminarium pt. „Fizyka Fazy Skondensowanej”, Kraków 2011
- B.11 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Raczkowska, J.; Rysz, J.; Lekka, M. *Micrometer patterns and arrays of single and multiple proteins adsorbed on spin-cast film blends of hydrophilic or thermo- responsive polymers* Polymers for Advanced Technologies, Łódź 2011
- B.12 **Zemła, J.**; Budkowski, A.; Raczkowska, J.; Rysz, J.; Lekka, M. *Reverse contrast and substructures in protein micro- patterns on 3D polymer surfaces*, Polymers for Advanced Technologies, Łódź 2011

Podziękowania

W czasie przygotowywania tej rozprawy otrzymałam wsparcie i pomoc od wielu ludzi. Dzielili się ze mną swoją wiedzą, doświadczeniem, entuzjazmem oraz radą, co było cenne i pomogło mi zrealizować te badania. Chcę gorąco podziękować:

- **Prof. Andrzejowi Budkowskiemu**, mojemu promotorowi, który zainspirował i nadzorował pracę, której wyniki przedstawiam w tej rozprawie, za liczne pomysły i owocne dyskusje.
- **Mgr Kamilowi Awsiukowi** za wykonanie pomiarów i analizę wyników SIMS.
- **Doc. Jurijowi Stetsyschyn** z Politechniki Lwowskiej za przygotowanie pokryw oligoperoksyd-graft-PNIPAM.
- **Katarzynie Fornal** za wykonanie pomiarów kąta zwilżania.
- **Dr Jakubowi Ryszowi** za pomoc i dyskusje.
- Wszystkim koleżankom, kolegom i współpracownikom Grupy Badań Nanowarstw Makromolekuł za pomoc, wsparcie oraz za stworzenie miłej atmosfery podczas współpracy.