

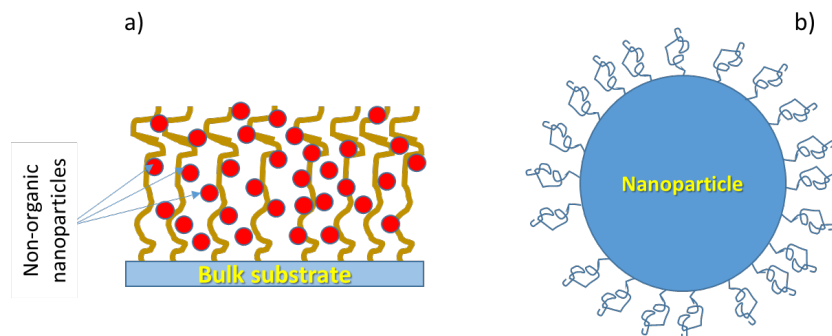
## STRESZCZENIE PRACY

**Tytuł pracy doktoranckiej:** Inteligentne szczotki polimerowe do zastosowań biomedycznych

**Autor :** Svyatoslav Nastyshyn

Biofizyka wykorzystuje metody fizyczne do badania zjawisk biologicznych a jednym z jej celów jest badanie materiałów bioaktywnych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w naukach medycznych, głównie w inżynierii tkankowej, dostarczaniu leków, bioseparacji i tworzeniu materiałów bakteriobójczych. Powierzchnie bioaktywne są idealnym kandydatem dla takich zastosowań, ponieważ są zdolne do wzmacniania lub redukcji interakcji z obiektami biologicznymi (komórkami, białkami lub innymi biocząstkami) w zależności od specyficznych wymagań. Bardzo często jako powierzchnie bioaktywne wykorzystuje się powłoki szczepionych szczotek polimerowych, tzn. łańcuchów polimerowych, które są zaczepione jednym końcem do powierzchni. W szczególności duże zainteresowanie wzbudzają inteligentne szczotki polimerowe (smart polymer brushes SPB), które są zdolne do odwracalnej zmiany swoich właściwości fizykochemicznych w odpowiedzi na temperaturę. Celem pracy było wytworzenie nowatorskich szczotek polimerowych o precyzyjnie określonych właściwościach, scharakteryzowanie ich właściwości fizycznych i chemicznych oraz określenie ich aktywności biologicznej, co ma kluczowe znaczenie dla zastosowań w biomedycynie. Główne osiągnięcia i wyzwania w tych dziedzinach zostały przedstawione w części I rozprawy.

Do wytwarzania powłok SPB zastosowano kontrolowaną polimeryzację szczepioną i niekontrolowaną polimeryzację szczepioną. Polimeryzację niekontrolowaną przeprowadzono zgodnie z procedurą polimeryzacji inicjowanej oligonadtlenkiem, natomiast polimeryzację kontrolowaną za pomocą metody ATRP. Ponadto opracowano różne rodzaje nanokompozytów: szczotki polimerowe szczepione do powierzchni płaskich z wbudowanymi nanocząstkami nieorganicznymi (rys. 1a) oraz dyspersyjny nanokompozyt ze szczotki polimerowej szczepionej na powierzchni nanocząstek SiO<sub>2</sub> (rys. 1b). Szczegółowy opis wytwarzania SPB i opartych na nich nanokompozytów został opisany w rozdziale II.1. pracy.



**Rysunek 1.** Szczotki polimerowe zawierające nanocząstki nieorganiczne szczepione na podłożach płaskich (a) oraz szczotki polimerowe szczepione na powierzchni nanocząstek nieorganicznych (b).

Po przygotowaniu SPB przeprowadzono szczegółowe badania ich właściwości fizykochemicznych. Szczegółowa analiza wytworzonej warstwy wymagała zastosowania zaawansowanych technik doświadczalnych. Do scharakteryzowania składu chemicznego próbek zostały wykorzystane dwie techniki: spektrometria masowa jonów wtórnych (ToF-SIMS) i rentgenowska spektrometria fotoelektronów (XPS). Z kolei grubość i współczynnik załamania SPB wyznaczono metodą elipsometrii, a ich topografia została zbadana metodą mikroskopii sił atomowych (AFM). Gęstość szczepienia szczotek określono na podstawie współczynnika załamania światła szczotki polimerowej, wyznaczonego za pomocą elipsometrii. W celu potwierdzenia termoczułości powłok, badano ich zwilżalność za pomocą pomiarów kąta zwilżania wody w funkcji temperatury. Dodatkowo do określenia wielkości, kształtu i rozmieszczenia nanocząstek nieorganicznych wbudowanych w szczotki polimerowe szczepione do powierzchni płaskich skaningową mikroskopię elektronową (SEM). Aby określić rozmiar, kształt i strukturę nanokompozytów zbudowanych z szczotek polimerowych szczepionych na powierzchni nanocząstek  $\text{SiO}_2$  zastosowano transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM). W celu określenia ich udziału wagowego zastosowano analizę termogravimetryczną (TGA), na podstawie której obliczono grubość powłoki szczotki. Promień hydrodynamiczny i  $\xi$ -potencjał szczotek polimerowych szczepionych na powierzchni nanocząstek  $\text{SiO}_2$  określono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Aby zbadać aktywność biologiczną wytworzonych SPB, niezbędne było zastosowanie odpowiednich metod i technik badawczych. Do oceny wzrostu komórek na wytworzonych szczotkach polimerowych zastosowano mikroskopię optyczną i fluorescencyjną. Aby umożliwić obserwację komórek za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej zostały one wybarwione za pomocą barwników fluorescencyjnych, umożliwiając wizualizację ich jąder i włókien aktynowych. Aktywność metaboliczna zdrowych komórek skutkuje poborem tlenu, który scharakteryzowano za pomocą polarografii. Z kolei właściwości antybakteryjne wytworzonych SPB oceniano metodą seryjnych rozcieńczeń i barwień fluorescencyjnych. Oddziaływanie między białkami i nanocząstkami  $\text{SiO}_2$  z powłoką polimerową zbadano za pomocą

kalorymetrii izotermicznej (ITC). Szczegółowy opis metod eksperymentalnych zastosowanych w przedstawionej pracy przedstawiono w części II rozprawy.

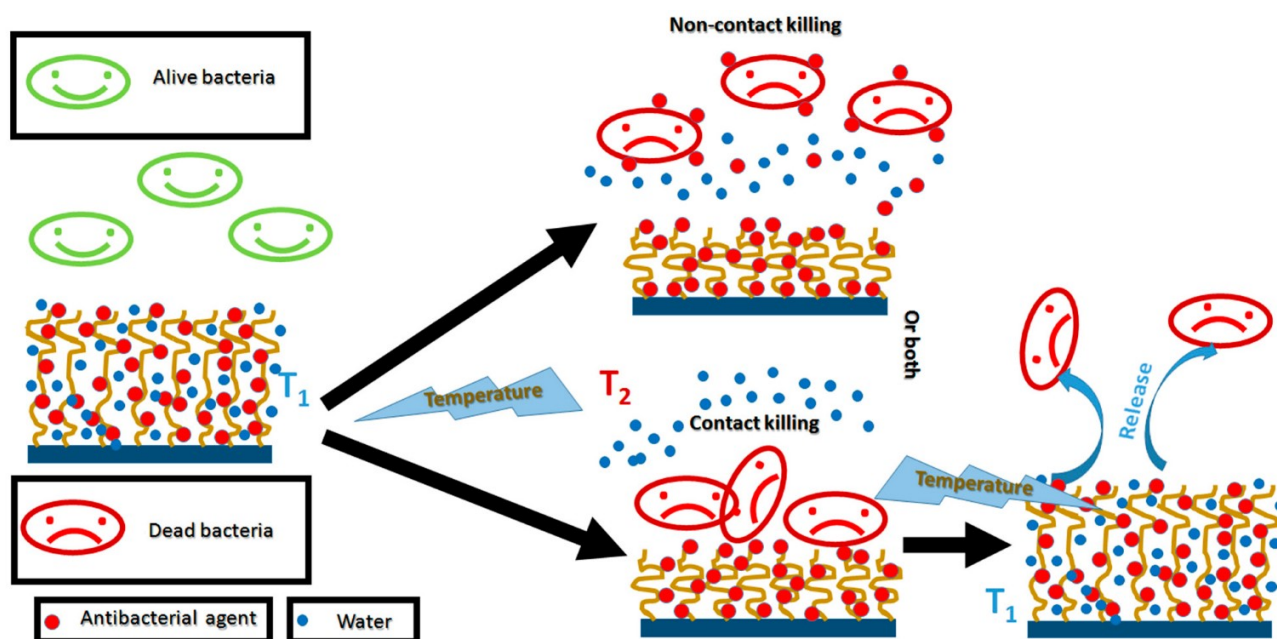
Podłoża do hodowli krowich komórek ziarnistych oraz kompleksów oocyt-cumulus cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem, ponieważ odgrywają one kluczową rolę w rozwoju pęcherzyków jajowych. Ze względu na właściwości szczotek polimerowych tworzonych z poli(oligo(glikolu etylenowego)metakrylanu eteru etylowego) (pOEGMA), poli(4-winylopirydyny) (pVP) i p(OEGMA-co-VP) zostały one wybrane jako potencjalne nowe podłoża dla hodowli krowich komórek ziarnistych oraz kompleksów oocyt-cumulus. Szczotki pOEGMA, pVP i p(OEGMA-co-VP) zostały z wytworzone na szklanych płytkach w procesie polimeryzacji inicjowanej oligonadtlenkiem. Morfologia wytworzonych powłok została zbadana za pomocą AFM, wykazując, że powierzchnie pOEGMA i pVP są stosunkowo gładkie, natomiast morfologia p(OEGMA-co-VP) jest szorstka. Hodowlę komórkową przeprowadzono w środowisku wodnym, co może wpływać na topografię SPB, ponieważ szczotka może pęcznieć. Dlatego też zbadano stopień pęcznienia powłok za pomocą elipsometrii w środowisku wodnym i wykazano, że jedynie warstwa pOEGMA pęcznieje w sposób znaczący. Zbadano także rozwój krowich komórek ziarnistych oraz kompleksów oocyt-cumulus na wytworzonych powłokach. Uzyskane wyniki wskazują, że najlepsze warunki do hodowli tych komórek zapewniały szczotki p(OEGMA-co-VP). Ponadto analizowano metaboliczny pobór tlenu przez komórki warstwy ziarnistej w oraz bez obecności 4 inhibitorów: NaF, kwasu amyta-5-etylo-5-izoamilo-barbiturowego (amytal),  $\text{NaN}_3$  i disodowego kwasu etylenodiaminotetraoctowego ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ). W obecności NaF pobór tlenu przez komórki hodowane na p(OEGMA-co-VP) wzrósł, co wskazuje na prawidłowe dojrzewanie komórek. Szczegółowy opis właściwości fizykochemicznych pOEGMA, pVP i p(OEGMA-co-VP) oraz rozwoju na nich komórek ziarnistych krów oraz kompleksów oocyt-cumulus przedstawiono w części III rozprawy.

Materiały na bazie  $\text{CaCO}_3$  są powszechnie stosowane w biomedycynie do dostarczania leków. W literaturze spotykane są doniesienia, że szczotka pOEGMA nie jest cytotoksyczna i zapewnia słabe warunki adhezji komórek. W części IV pracy został eksperymentalnie zbadany wpływ nanocząstek  $\text{CaCO}_3$  osadzonych w nieadhezyjnej, niecytotoksycznej szczotce pOEGMA, na komórki ludzkie. Szczotka pOEGMA została wytworzona na płaskim podłożu szklanym za pomocą polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu inicjowanej powierzchniowo (ATRP). Nanocząstki  $\text{CaCO}_3$  zostały wbudowane w szczotkę przy użyciu biomineralnego strącania z roztworów  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Skład chemiczny pOEGMA z wbudowanymi nanocząstkami  $\text{CaCO}_3$  zbadano metodą ToF-SIMS i XPS, morfologię powierzchni określono za pomocą metody AFM, nanocząstki  $\text{CaCO}_3$  zobrazowano metodą SEM. Ponadto zbadano odpowiedź termiczną powłok dzięki pomiarom kąta zwilżania wody w różnych temperaturach. Został również zbadany wpływ nanocząstek  $\text{CaCO}_3$  na trzy różne ludzkie linie

komórkowe: keratynocyty ( HaCaT ), komórki czerniaka (WM35) i osteoblasty (MC3T3-e1). Komórki hodowano na kontrolnym podłożu szklanym, szczepionej szczotce pOEGMA i szczepionej szczotce pOEGMA z wbudowanymi nanocząstkami CaCO<sub>3</sub>. Do przeprowadzenia analizy ilościowej komórki zostały wybarwione oraz zobrazowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Wpływ nanocząstek CaCO<sub>3</sub> osadzonych w szczotkach pOEGMA został zbadany pod kątem adhezji komórek, wskaźnika proliferacji i żywotności komórek. Początkowa ilość komórek, zarejestrowana na powierzchni po 24 godzinach inkubacji, może być związana głównie ze zdolnością powierzchni do adhezji komórek. Dalsza inkubacja przez 72 i 144 godziny charakteryzuje aktywność proliferacyjną komórek. Wskaźnik proliferacji definiowany jest jako stosunek liczby komórek na powierzchni po danym okresie inkubacji do liczby komórek, które do niej pierwotnie przylgnęły. Żywotność komórek definiowana jest jako stosunek liczby komórek na powierzchni do liczby komórek na próbce kontrolnej po danym okresie inkubacji. Badania wykazały, że wytworzony nanokompozyt nie stwarza odpowiednich warunków do hodowli osteoblastów (MC3T3-e1) natomiast nie jest cytotoksyczny dla linii komórkowych zdrowej skóry (HaCaT) i czerniaka (WM35). Wbudowane nanocząstki CaCO<sub>3</sub> wykazały, że oddziaływanie a komórkami silnie zależy od rodzaju badanych komórek.

Dużą wagę przywiązuje się do inteligentnych powłok antybakteryjnych, które aktywują swoje właściwości antybakteryjne pod wpływem bodźców temperaturowych i są zdolne do samooczyszczania (strategia „kill-release”), którego podstawę stanowi zdolność powłok do zmiany właściwości fizykochemicznych pod wpływem zmiany temperatury za którą odpowiada niższa krytyczna temperatura roztworu (LCST). Schemat strategii „kill-release” jest przedstawiony na rys. 2. Poniżej LCST, SPB są otoczone warstwą hydratacyjną i bakterie nie przylegają do powierzchni SPB. Gdy temperatura wzrośnie powyżej LCST, możliwe są trzy sposoby działania antybakteryjnego. Po pierwsze, bakterie przylegają do SPB i są zabijane przez wbudowany środek antybakteryjny. W drugim sposobie, SPB zaczynają uwalniać środek antybakteryjny i zabijają bakterie nieprzylegające do warstwy. Trzeci sposób łączy oba opisane powyżej mechanizmy. Martwe bakterie przylegające do szczotki są uwalniane, gdy temperatura szczotki spada poniżej LCST. Inteligentne powłoki antybakteryjne, które aktywują swoje właściwości za pomocą bodźców temperaturowych, mogą znaleźć wiele zastosowań w zapobieganiu tworzeniu się warstw bakteryjnych na codziennie używanych, często dotykanych powierzchniach, takich jak smartfony, bankomaty, czy też okna. W części V rozprawy przedstawiono nowatorskie powłoki termoczułe oparte na powłokach pOEGMA i pVP z wbudowanymi nanocząstkami srebra, wykazujące niezwykle silny efekt bakteriobójczy, aktywujący się samoczynnie w podwyższonej temperaturze. Skład wytworzonych powłok zbadano za pomocą ToF-SIMS i XPS. Reakcję termiczną powłok SPB zbadano poprzez pomiary kąty zwilżania wody w różnych temperaturach. Morfologię wytworzonych nanokompozytów określono za pomocą

AFM i SEM. Przeprowadzono badania termoprzełączalnej aktywności antybakteryjnej wytworzonych nanokompozytów dla modelowych bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*).



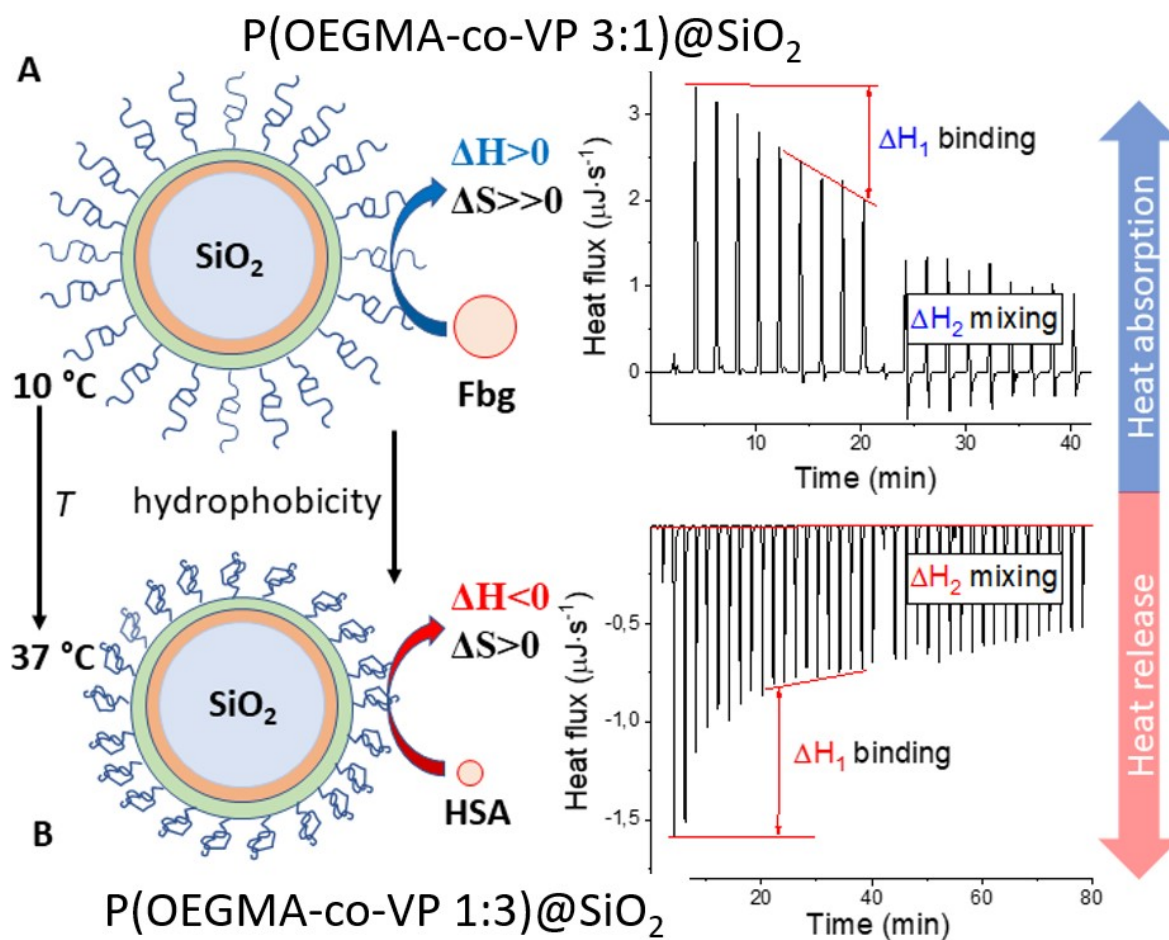
Rysunek 2. Strategia „kill-release” zabijania i usuwania bakterii dla warstw SPB

Możliwość zastosowania powierzchni zawierających nanocząstki metaliczne jest ograniczone ze względu na potencjalne skutki uboczne stwarzane przez nanocząstki. Metaliczne nanocząstki mogą być uwalniane z powierzchni i kumulować się w ludzkich narządach, takich jak wątroba, śledziona, płuca czy nerki. Ponadto nanocząstki srebra uwalniane z powierzchni wykazują potencjalną genotoksyczność aktywowaną różnymi mechanizmami, w szczególności wytwarzaniem nadmiaru reaktywnych form tlenu, co skutkuje stresem oksydacyjnym, obniżonym poziomem glutationu, podwyższoną peroksydacją lipidów, stanem zapalnym, uszkodzeniem DNA, zmianami cyklu komórkowego i proliferacji oraz apoptozą i nekrozą. Nanocząstki srebra wbudowane w matrycę szczotki polimerowej są z nią związane i nie powinny mieć możliwości uwolnienia się z niej. Aby potwierdzić tę hipotezę, zbadano za pomocą XPS uwalnianie nanocząstek srebra w środowisku wodnym. Aby zbadać potencjalną cytotoxyczość wytworzonych nanokompozytów, wykorzystano je jako podłoża do hodowli dwóch linii komórkowych: komórek HaCaT ludzkiej skóry i komórek czerniaka WM35. Badania uwalniania nanocząstek srebra z warstw pOEGMA w środowisku wodnym wykazały, że uwalnianie nanocząstek ma charakter wydłużony, a ilość srebra w powłoce nie spada poniżej 35% stężenia początkowego po 55 dniach inkubacji. Wydłużony charakter zmniejszania

zawartości srebra w powłoce sugeruje, że nanocząsteczki srebra nie uwalniają się z szczotki pOEGMA a spadek ilości srebra wynika raczej z uwalniania jonów srebra w środowisku wodnym. Wykazano także, że nanocząstki srebra wbudowane w warstwie pOEGMA nie wykazują cytotoksycznego wpływu na komórki HaCaT ludzkiej skóry dla krótkich czasów ekspozycji (<72 godziny) i mogą mieć niewielki, ale wykrywalny wpływ na komórki czerniaka WM35. Brak toksyczności wobec ludzkich komórek skóry daje możliwość zastosowania wytworzonych powłok jako warstw umożliwiających zapobieganie proliferacji bakterii na codziennie używanych, często dotykanych powierzchniach, takich jak smartfony, okna i inne szkła. Odpowiedź termiczna pOEGMA z wbudowanymi nanocząstkami srebra może zostać zablokowana, gdy stężenie srebra jest zbyt wysokie. Doświadczalnie zostały określone najbardziej optymalne warunki do wytwarzania warstw pOEGMA z wbudowanymi nanocząstkami srebra. W rozdziale VI rozprawy zostały przedstawione badania uwalniania srebra z pOEGMA w środowisku wodnym, badania wpływu nanocząstek srebra wbudowanych w warstwę pOEGMA na keratynocyty ludzkie i komórki czerniaka oraz optymalne warunki wytwarzania warstw pOEGMA z wbudowanymi nanocząstkami srebra.

Gdy nanocząsteczka zostanie wstrzyknięta do krwi, natychmiast zaczyna oddziaływać z białkami i tworzy się na niej korona białkowa. Strukturę korony białkowej można podzielić na dwie warstwy: miękką koronę białkową i twardą koronę białkową. Warstwa twardej korony białkowej jest w silnym kontakcie z nanocząstką i nie jest możliwe ich oderwanie. Z kolei białka miękkiej korony białkowej słabiej oddziałują z nanocząstką i mogą być zastąpione innymi białkami. Reprezentatywną miarą „twardości” korony białkowej jest energia swobodna adsorpcji. ITC (ang. isothermal titration calorimetry) jest unikalną techniką, która umożliwia określenie powinowactwa wiązania, entalpii i ilości miejsc wiążących w oddziaływaniach białko-nanocząstka. Na podstawie entalpii i powinowactwa wiązania wyznaczana jest energia Gibbsa i entropia oddziaływania. Struktura korony białkowej silnie zależy od właściwości fizykochemicznych nanocząstek i białek, takich jak zwilżalność, ładunek powierzchniowy, wielkość czy też kształt. W części VII rozprawy za pomocą techniki ATRP na nanocząstkach SiO<sub>2</sub> wytworzono warstwy pOEGMA, pVP i trzech kopolimerów p(OEGMA-co-VP) o różnym udziale wagowym VP i OEGMA. Za pomocą TGA i XPS został określony udział wagowy szczotek polimerowych i skład chemiczny wytworzonych szczotek polimerowych. Na podstawie zdjęć TEM określono wielkość, kształt i strukturę przygotowanych szczotek a dzięki wykorzystaniu DLS zarejestrowano zmianę potencjału  $\xi$  w funkcji temperatury. Oddziaływania między wytworzonymi szczotkami polimerowymi, a białkami ludzkiej krwi (ludzka albumina surowicy (HSA), immunoglobulina (IgG) i fibrynogen (Fbr)), mieszaniną białek odpowiadającą 5-krotnie rozcieńczonemu ludzkiemu osoczowi oraz ludzkim osoczem zostały zbadane za pomocą ITC poniżej i powyżej LCST wytworzonych szczotek polimerowych. Zgodnie z wynikami opisanymi w rozdziałach

IV i V przyjęto, że zmiana właściwości wytwarzanych polimerów zachodzi w zakresie 15-25 °C. Skuteczna synteza szczotek pOEGMA , pVP i p(OEGMA-co-VP) została potwierdzona za pomocą XPS. Zarówno SPB szczepione do nanocząstek SiO<sub>2</sub>, jak i białka wykazały ujemny potencjał  $\xi$ , a zatem oddziaływały wbrew siłom kulombowskim poprzez oddziaływania hydrofobowe lub polarne. Rodzaj oddziaływania można rozróżnić za pomocą ITC na podstawie znaku zmiany entalpii: odpowiednio  $\Delta H < 0$  dla asocjacji hydrofobowej i  $\Delta H > 0$  dla asocjacji hydrofilowej. Dla poszczególnych białek HSA, IgG i Fbg obecność fragmentów VP w szczotkach polimerowych sprzyjała adsorpcji poniżej i powyżej LCST. Z kolei fragmenty OEGMA redukowały (HSA) lub całkowicie blokowały (IgG i Fbg) adsorpcję. Polimery zawierające OEGMA wykazały zależne od LCST powinowactwo do białek, a szczepione szczotki p(OEGMA-co-VP) posiadają przełączalne właściwości do dużej lub małej adsorpcji badanych białek modelowych. Wykazano, że białka z osocza krwi adsorbują do szczotek polimerowych, do których nie adsorbują żadne z trzech pojedynczych białek. Reprezentatywne wykresy ITC uzyskane dla warstw p(OEGMA-co-VP) poniżej i powyżej LCST przedstawiono na rys. 3.



**Rysunek 3.** Reprezentatywne krzywe ITC dla oddziaływania białek i szczotek termoczulych szczepionych na powierzchni nanocząstek SiO<sub>2</sub> w różnych temperaturach: (A) adsorpcja Fbg do p(OEGMA-co-VP 3:1)@SiO<sub>2</sub> w 10°C i (B) adsorpcja HSA do p(OEGMA-co-VP 1:3)@SiO<sub>2</sub> w 37°C.