

Uniwersytet Jagielloński
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

***Charakterystyka wpływu struktury
łańcuchów polimerowych
na właściwości cienkich warstw
oraz ich oddziaływania z białkami***

Natalia Janiszewska

Praca doktorska na kierunku **Biofizyka**
pod opieką

dr. hab. Kamila Awwsiuka, prof. UJ

w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej
Instytutu Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego

Kraków, 2024

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana Natalia Janiszewska (nr indeksu 1115357), doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. "Charakterystyka wpływu struktury łańcuchów polimerowych na właściwości cienkich warstw i ich oddziaływania z białkami" jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr. hab. Kamila Awsiuka, prof. UJ. Praca została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

.....
Kraków, dnia

.....
Podpis autora pracy

Podziękowania

Na początku chciałabym wyrazić moją głęboką wdzięczność dla mojego promotora dr. hab. Kamila Awsiuka, który podczas wspólnych lat pracy pokazał mi jak wygląda praca naukowa i pomógł rozwinąć się jako naukowiec. Dziękuję za anielską cierpliwość do moich niekończących się pytań oraz długie godziny spędzone nad dyskusjami o wynikach. Poniższa praca nie powstałaby bez jego wiary w moje możliwości i ogólnego wsparcia.

Chciałabym podziękować wszystkim, z którymi miałam przyjemność współpracować, w szczególności prof. Teresie Basińskiej, prof. Andrzejowi Budkowskiemu, prof. Jakubowi Ryszowi, dr hab. Joannie Raczkowskiej, dr hab. Ewelinie Lipiec, dr Katarzynie Gajos oraz dr. Pawłowi Dąbczyńskiemu. Bardzo dziękuję za udzieloną pomoc i otrzymane rady.

Serdeczne podziękowania kieruję również do wszystkich pracowników Zakładu Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej oraz Zakładu Inżynierii Nowych Materiałów za serdeczną atmosferę jak i dyskusje na tematy nie tylko naukowe. Ponadto chciałabym podziękować moim koleżankom z laboratorium: Julii Chudzik, Agnieszce Pawłowskiej, Yanie Shymborskiej i Svitlanie Tymetskiej. Spędzone wspólnie niezliczone godziny w laboratorium oraz towarzyszące im rozmowy pomogły mi przetrwać nieudane eksperymenty.

Szczególne podziękowania należą się moim wspaniałym przyjaciołom: Darii Cegiełce, Agacie Kubisiak i Michałowi Kańskiemu, za to że wierzą we mnie bardziej niż ja sama. Jestem im ogromnie wdzięczna za wszystkie słowa otuchy oraz motywację do dalszego działania. Nasze wspólnie wypite hektolitry kawy i herbaty przy słodkościach oraz cotygodniowe granie w planszówki pozwoliły mi na złapanie tak potrzebnego oddechu.

Największe wyrazy wdzięczności kieruję do mojej Mamy i Siostry. Od samego początku wspierały mnie w moich dążeniach naukowych i zawsze były gotowe wysłuchać moich narzekań jak i świętowały ze mną moje sukcesy. Ich niezachwiana wiara we mnie dodaje mi codziennie siły.

Dorobek naukowy autorki

Przedstawiona praca doktorska zawiera materiał trzech artykułów naukowych, które już są lub będą opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. **N. Janiszewska**, J. Raczkowska, K. Grzegorzczak, M. Brzychczy-Włoch, T. Gosiewski, M. M. Marzec, K. Gajos, K. Awiuk; *Effect of poly(tert-butyl methacrylate) stereoregularity on polymer film interactions with peptides, proteins and bacteria*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 210 (2022), 112248; DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.11478;
2. **N. Janiszewska**, T. Basińska, M. Gadzinowski, S. Słomkowski, T. Makowski, K. Awiuk; *Impact of polyglycidol block architecture in polystyrene-b-polyglycidol copolymers on the properties of thin films and protein adsorption*, Applied Surface Science 669 (2024), 160458; DOI: 10.1016/j.apsusc.2024.160458;
3. **N. Janiszewska**, K. Gajos, J. Raczkowska, K. Awiuk, *Protein orientation and polymer phase separation induced by poly(methyl methacrylate) tacticity*, w przygotowaniu.

Pozostałe artykuły naukowe niewchodzące w skład rozprawy:

1. K. Ślusarczyk, M. Flejszar, K. Spilarewicz, M. Wytrwal, K. Awiuk, K. Wolski, J. Raczkowska, **N. Janiszewska**, P. Chmielarz; *On the way to increase osseointegration potential: Sequential SI-ATRP as promising tool for PEEK-based implant nano-engineering*, European Polymer Journal 210 (2024), 112953, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2024.112953;
2. A. Ziolo, B. Mossety-Leszczak, M. Walczak, B. Strachota, A. Strachota, K. Awiuk, **N. Janiszewska**, J. Raczkowska; *Synthesis and morphology characteristics of new highly branched polycaprolactone PCL*, Molecules 2024, 29(5), 991, DOI: 10.3390/molecules29050991;
3. H. Khaksar, C. Ma, **N. Janiszewska**, K. Awiuk, A. Budkowski, E. Gnecco; *Nanoscale wear evolution on a polystyrene / poly (n-butyl methacrylate) blend*, Wear 2024, 536-537, 20516, DOI:10.1016/j.wear.2023.205160;
4. Y. Shymborska, Y. Stetsyshyn, K. Awiuk, J. Raczkowska, A. Bernasik, **N. Janiszewska**, P. Dąbczyński, A. Kostruba, A. Budkowski; *Temperature- and pH-responsive schizophrenic copolymer brush coatings with enhanced temperature-response in pure water*, ACS Applied Materials & Interfaces 2023, 15, 6, 8676–8690, DOI: 10.1021/acsami.2c20395;
5. **N. Janiszewska**, B. Orzechowska, K. Awiuk, J. Rysz, S. Tymetska, J. Raczkowska; *Cell-specific response of NSIP- and IPF-derived fibroblasts to the modification of the elasticity, biological properties, and 3D architecture of the substrate*, International Journal of Molecular Sciences 2022, 23, 14714, DOI: 10.3390/ijms2323314714;
6. **N. Janiszewska**, J. Raczkowska, A. Budkowski, K. Gajos, Y. Stetsyshyn, M. Michalik, K. Awiuk; *Dewetting of polymer film controlled by protein adsorption*, Langmuir 2020, 36, 11817–11828, DOI:10.1021/acs.langmuir.0c01718.

Wyniki przeprowadzonych badań były prezentowane na sześciu konferencjach naukowych:

1. **The European Biophysical Society's Association (EBSA) Congress 2023**, 31.07-04.08.2023 Sztokholm, Szwecja
Prezentacja wyników w formie posteru: *Impact of polymer thin film structure onto protein adsorption and orientation*
2. **XVIII Katowicko-Krakowskie Seminarium Fizyki Fazy Skondensowanej**, 03.07.2023 Kraków
Prezentacja wyników w formie referatu ustnego: *Kontrola immobilizacji białek do cienkich warstw kopolimerów diblokowych poprzez modyfikacje ekspozycji grup chemicznych*
3. **Symposium Młodych Naukowców 2022**, 20-22.09.2022 Warszawa
Prezentacja wyników w formie referatu ustnego: *Badanie adsorpcji, orientacji i konformacji białek do cienkich warstw polimerowych*
4. **Nanotech Poland 2022**, 01-03.06.2022 Poznań
Prezentacja wyników w formie referatu ustnego: *Protein orientation modified by poly(methyl methacrylate) tacticity*
5. **Young MULTIS - Multiscale Phenomena In Condensed Matter - Conference For Young Researchers**, 05-07.07.2021 Kraków
Prezentacja wyników w formie referatu ustnego: *Effect of tacticity of PtBMA thin films on interactions with proteins, peptides and bacteria*
6. **XXIII Międzynarodowa Studencka Sesja Naukowa „Materiały I Technologie XXI Wieku”**, 28.05.2021 Katowice
Prezentacja wyników w formie referatu ustnego: *Wpływ taktyczności cienkich warstw poli(metakrylanu tert-butyłu) na oddziaływanie z peptydami, białkami i bakteriami*

Prezentowane badania były prowadzone w ramach finansowania trzech projektów badawczych:

1. *Wpływ czynników zewnętrznych na modyfikacje struktury cienkich warstw kopolimerów*, RSM/53/JN, finansowany ze środków „Research Support Module” w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w Uniwersytecie Jagiellońskim, kierownik projektu: mgr Natalia Janiszewska;
2. *Wpływ taktyczności oraz mas polimerów na tworzenie wzorów polimerowych w zastosowaniu do mikromacierzy białkowych* RSM/13/JN, finansowany ze środków „Research Support Module” w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w Uniwersytecie Jagiellońskim, kierownik projektu: mgr Natalia Janiszewska;
3. *Wpływ taktyczności polimerów na adsorpcję, orientację i konformację białek na powierzchni cienkich warstw polimerowych*, UMO-2016/21/D/ST5/01633, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu SONATA, kierownik projektu: dr hab. Kamil Awiśuk prof. UJ

Streszczenie

Biomateriały na bazie polimerów są szeroko stosowane w biotechnologii, bioinżynierii i medycynie jako część biosensorów, implantów, czy też systemów dostarczania leków. Aby możliwe było jak najlepsze wykorzystanie potencjału biomateriałów polimerowych niezbędne jest szczegółowe poznanie złożonych interakcji między powierzchnią polimeru, a otaczającymi go biomolekułami. Dlatego też ważne jest określenie jak właściwości warstw polimerowych wpływają na ich oddziaływanie z białkami i jak poprzez ich modyfikację możliwe jest kontrolowanie ilości zaadsorbowanego białka, czy nawet jego orientacji i konformacji.

W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej podjęto się zbadania wpływu struktury łańcuchów polimerowych na właściwości uzyskanych cienkich warstw oraz ich oddziaływania z białkami. W pierwszych etapie badań zbadano wpływ taktyczności łańcuchów polimerowych na właściwości ich cienkich warstw. W tym celu wykorzystano dwa polimery: poli(metakrylan tert-butyłu) oraz poli(metakrylan metyłu), które posiadają trzy typy taktyczności. W trakcie badań wykazano, że występują różnice w chemii powierzchni cienkich warstw uzyskanych dla izotaktycznego, a ataktycznego i syndiotaktycznego wariantu polimeru. Ekspozycja łańcuchów bocznych polimerów do powierzchni warstwy indukuje zmiany jej właściwości, wpływając na interakcje pomiędzy polimerem, a zaadsorbowanym białkiem. Wyniki te wykorzystano w kolejnym kroku badań, w którym wytworzono wzory polimerowe używając mieszanin dwóch poprzednio badanych polimerów. Po dobraniu odpowiedniej modyfikacji podłoża możliwe było otrzymanie izotropowych jak i regularnych wzorów polimerowych, które posłużyły jako matryca do selektywnej immobilizacji białek. Opracowana procedura wytworzenia regularnych mieszanin polimerowych może zostać wykorzystana do wytwarzania mikromacierzy białkowych.

W ostatnim etapie badań skupiono się na wpływie architektury kopolimeru blokowego składającego się z polistyrenu i poliglicydolu na właściwości uzyskanych cienkich warstw i adsorpcję białek. Pokazano, że warstwy kopolimeru o strukturze grzebienia zmieniają swoje właściwości pod wpływem immersji w wodzie poprzez ekspozycję łańcucha hydrofilowego poliglicydolu do powierzchni. Powoduje to zmniejszenie adsorpcji molekuł białka do tych warstw. Innym zaobserwowanym efektem w trakcie tych badań było spowolnienie lub nawet zatrzymanie zmian konformacyjnych molekuł polimeru w warstwie poprzez adsorpcję białka do jej powierzchni. Zjawisko to ukazuje potencjał kontroli właściwości warstwy kopolimerowej poprzez zmiany konformacji łańcucha kopolimerowego.

Najważniejszym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych badań jest pokazanie, że struktura łańcuchów polimerowych wpływa na właściwości powierzchni ich cienkich warstw, a tym samym na oddziaływania tych warstw z biomolekułami. W ramach przeprowadzonych badań pokazano, że odpowiedni wybór polimeru, a w szczególności struktury jego łańcucha, znacząco zmienia istotę interakcji polimer – białko promując lub wręcz przeciwnie zapobiegając adsorpcji molekuł białka. Co więcej interakcje te mają też wpływ zarówno na orientację jak i konformację molekuł białek adsorbujących do cienkich warstw polimerowych

Abstract

Polymer-based biomaterials are widely used in biotechnology, bioengineering and medicine as part of biosensors, implants or drug delivery systems. To fully exploit the potential of polymer-based biomaterials, a detailed understanding of the complex interactions between the polymer surface and the surrounding biomolecules is required. It is therefore important to determine how the properties of polymer layers affect their interaction with proteins and how their modification can control the amount of protein adsorbed or even its orientation and conformation.

The aim of this thesis was to investigate the influence of the structure of the polymer chains on the properties of the obtained thin films and their interactions with proteins. In the first stage of the research, the influence of the tacticity of the polymer chains on the properties of their thin films was studied. For this purpose, two polymers were used: poly(*tert*-butyl methacrylate) and poly(methyl methacrylate), which have three types of tacticity. The study showed that there are differences in the surface chemistry of the thin films obtained for the isotactic versus the atactic and syndiotactic variants of the polymer. Exposure of the polymer side chains to the film surface induces changes in the surface that affect the interactions between the polymer and the adsorbed protein. These results were used in the next step of the study, in which polymer samples were prepared using blends of the two previously studied polymers. By selecting an appropriate substrate modification, it was possible to obtain both isotropic and regular polymer patterns, which served as a matrix for the selective immobilization of proteins. The method developed for the preparation of regular polymer blends can be used for the preparation of protein microarrays.

The final stage of the study focused on the effect of the architecture of the block copolymer of polystyrene and polyglycidol on the properties of the resulting thin films and protein adsorption. It was shown that the copolymer layers with a comb structure change their properties when immersed in water by the hydrophilic chain of the polyglycidol escaping to the surface. This leads to a reduction in the adsorption of protein molecules to these layers. Another effect observed during these studies was that the conformational changes of the polymer molecules in the layer were slowed or even stopped by the adsorption of the protein to its surface. This phenomenon demonstrates the potential to control the properties of the copolymer layer through conformational changes in the copolymer chain.

The main conclusion of the study is to show that the structure of polymer chains influences the surface properties of their thin films and thus the interactions of these films with biomolecules. The study showed that the appropriate choice of polymer, and in particular its chain structure, significantly alters the nature of the polymer-protein interactions, promoting or preventing the adsorption of protein molecules. Moreover, these interactions also affect both the orientation and conformation of protein molecules adsorbing into polymer thin films.

Lista skrótów

AFM	mikroskopia sił atomowych
APTES	3-aminopropylotrietoksylan
at-	ataktyczny polimer
ATRP	polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu
BSA	surowicza albumina wołowa
DP	stopień polimeryzacji
EPS	pozakomórkowe substancje polimerowe
FIB	fibrynogen
h-dip	horizontal dipping
HSA	surowicza albumina ludzka
IEP	punkt izoelektryczny
IgG	immunoglobulina typu G
iso-	izotaktyczny polimer
LCST	dolna temperatura krytyczna rozpuszczania
Lys	lizozym
OVA	owalbumina
PBS	bufor fosforanowy
PCA	analiza głównych składowych
PDMS	poli(dimemetylosilan)
PEO	poli(glikol etylenowy)
PGL	poliglicydol
PMMA	poli(metakrylan metylu)
PS	polistyren
PS-b-(PGL-g-PGL)	polistyren-poliglicydol o strukturze grzebienia
PS-b-PGL	polistyren-poliglicydol o strukturze liniowej
PtBMA	poli(metakrylan tert-butyłu)
RMS	miara chropowatości powierzchni
SC	stereokompleks
SFE	swobodna energia powierzchniowa
Str	streptawidyna
syn-	syndiotaktyczny polimer
TCA	true component analysis
T_g	temperatura zeszklenia
ToF-SIMS	spektrometria masowa jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu
UCST	górna temperatura krytyczna rozpuszczania
XPS	rentgenowska spektroskopia fotoelektronów

Spis treści

Podziękowania.....	IV
Dorobek naukowy autorki.....	V
Streszczenie.....	VII
Abstract	VIII
Lista skrótów	IX
1. Część teoretyczna.....	1
1.1. Wprowadzenie.....	1
1.2. Polimery.....	2
1.2.1. Czynniki wpływające na strukturę polimeru	2
1.2.2. Mieszaniny polimerów	5
1.2.3. Kopolimery	8
1.3. Białka	10
1.3.1. Struktura białek	10
1.3.2. Immobilizacja białek.....	14
1.3.3. Czynniki wpływające na immobilizację białek.....	15
2. Część eksperymentalna	18
2.1. Materiały.....	18
2.1.1. Polimery.....	18
2.1.1.1. Poli(metakrylan metylu).....	18
2.1.1.2. Poli(metakrylan tert-butyłu)	20
2.1.1.3. Polistyren-poliglicydol	21
2.1.2. Białka	24
2.1.2.1. Surowicza albumina wołowa	24
2.1.2.2. Immunoglobulina G.....	26
2.1.2.3. Lizozym.....	27
2.1.2.4. Owalbumina	28
2.1.2.5. Fibrynogen	28
2.1.2.6. Streptawidyna	29
2.2. Techniki badawcze.....	30
2.2.1. Wytwarzanie cienkich warstw polimerowych.....	30
2.2.1.1. Spin – coating	30
2.2.1.2. Horizontal dipping	31

2.2.1.3.	Druk mikrokontaktowy	32
2.2.2.	Mikroskopia sił atomowych	32
2.2.3.	Spektrometria masowa jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu	34
2.2.4.	Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna.....	36
2.2.5.	Pomiar kąta zwilżania.....	38
2.2.6.	Spektroskopia Ramana.....	39
2.2.7.	Profilometria	41
3.	Wpływ stereoregularności cienkich warstw poli(metakrylanu tert-butylu) na oddziaływania z peptydami, białkami i bakteriami	42
3.1.	Wprowadzenie	42
3.2.	Wykorzystane metody badawcze.....	43
3.2.1.	Przygotowanie podłoża	43
3.2.2.	Adsorpcja peptydów i białek	43
3.2.3.	Hodowla bakteryjna.....	43
3.2.4.	Charakterystyka powierzchni	44
3.3.	Wyniki	45
3.3.1.	Charakterystyka powierzchni cienkich warstw polimerowych.....	45
3.3.2.	Adsorpcja peptydów do warstw polimerów o różnej taktyczności	50
3.3.3.	Adsorpcja białek do warstw PtBMA o różnej taktyczności	51
3.3.3.1.	Ilość zaadsorbowanego białka do cienkich warstw PtBMA	51
3.3.3.2.	Wpływ taktyczności cienkich warstw polimerów na orientację i konformację zaadsorbowanych białek	53
3.3.4.	Adhezja bakterii do cienkich warstw PtBMA.....	58
3.4.	Podsumowanie	60
4.	Zmiany w orientacji białek wywołane taktycznością poli(metakrylanu metylu)	61
4.1.	Wprowadzenie	61
4.2.	Wykorzystane metody badawcze.....	61
4.2.1.	Przygotowanie podłoża	61
4.2.2.	Immobilizacja białek	62
4.2.3.	Charakterystyka powierzchni	62
4.3.	Wyniki	63
4.3.1.	Charakterystyka cienkich warstw PMMA.....	63

4.3.2.	Adsorpcja białek do warstw PMMA o różnej taktyczności	66
4.3.2.1.	Wpływ taktyczności PMMA na ilość zaadsorbowanego białka.....	66
4.3.2.2.	Analiza ToF-SIMS białek zaadsorbowanych na warstwach PMMA.	67
4.4.	Podsumowanie	72
5.	Wpływ taktyczności polimerów na separację fazową mieszaniny PMMA+PtBMA	74
5.1.	Wprowadzenie.....	74
5.2.	Wykorzystane metody badawcze	75
5.2.1.	Przygotowanie podłoży	75
5.2.2.	Adsorpcja białek	75
5.2.3.	Charakterystyka powierzchni.....	76
5.3.	Wyniki	76
5.3.1.	Charakterystyka separacji fazowej mieszanin PMMA+PtBMA	77
5.3.2.	Wytworzenie regularnych wzorów polimerowych	81
5.3.3.	Selektywna adsorpcja białek do wzorów polimerowych.....	82
5.4.	Podsumowanie	85
6.	Wpływ architektury poliglicydołu w kopolimerze polistyren-b-poliglicydol na właściwości cienkich warstw oraz na adsorpcję białek	86
6.1.	Wprowadzenie.....	86
6.2.	Wykorzystane metody badawcze	87
6.2.1.	Przygotowanie podłoży	87
6.2.2.	Adsorpcja białek	88
6.2.3.	Charakterystyka powierzchni.....	88
6.3.	Wyniki	89
6.3.1.	Stabilność warstw kopolimerowych w środowisku wodnym	89
6.3.2.	Różnice w chemii powierzchni spowodowane interakcją woda – kopolimer	90
6.3.3.	Adsorpcja białek do warstw kopolimerów	95
6.4.	Podsumowanie	98
7.	Podsumowanie	99
	Bibliografia	101
	Spis tabel	115
	Spis rysunków.....	116

ROZDZIAŁ 1

Część teoretyczna

Przedstawiona rozprawa doktorska skupia się na badaniach oddziaływań cienkich warstw polimerowych z molekułami zaadsorbowanych do nich białek dlatego też w poniższym rozdziale zostaną przybliżone teoretyczne zagadnienia związane zarówno z polimerami jak i z białkami.

1.1. Wprowadzenie

Jako początek badań nad polimerami można uznać rok 1831 kiedy Thomas Hancock opracował metodę wulkanizacji kauczuku. Do tej pory człowiek korzystał z polimerów naturalnych takich jak kauczuk, celuloza czy chityna bez znacznych ingerencji w ich postać czy strukturę samego polimeru. [1] Dopiero podczas rewolucji przemysłowej zaczęto się zastanawiać nad możliwościami ulepszenia dotychczasowych materiałów. Tak powstała syntetyczna guma oraz nitroceluloza, a także pierwsze tworzywa sztuczne takie jak ebonit oraz pierwsze całkowicie syntetyczne tworzywo polimerowe – bakelit, który powstał w 1909 roku z fenolu i formaldehydu. W kolejnych latach chemia polimerów była jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki – powstaje tworzywo akrylowe czy włókna poliamidowe i poliestrowe. [2] To, że polimery stały się integralną częścią przemysłu i nauki zostało potwierdzone w 1953 roku kiedy to H. Staudinger dostał nagrodę Nobla z chemii za odkrycie, że celuloza stanowi związek wielocząsteczkowy o budowie łańcuchowej. Od tego momentu powstają coraz to nowsze materiały, a w szczególności polimery całkowicie syntetyczne, których wielką zaletą jest możliwość łatwej modyfikacji ich właściwości.

Biologia i medycyna od wieków wykorzystuje polimery, zarówno te naturalnie występujące, jak i syntetyczne. Polimery stanowią obiecującą klasę biomateriałów o wszechstronnych zastosowaniach biomedycznych, dzięki ich dostępność, odtwarzalność i możliwość modyfikacji specyficznych dla danej funkcji. Naturalne polimery są pozyskiwane głównie ze źródeł biologicznych, a zatem są powszechnie dostępne i z natury biokompatybilne. Niektóre wady związane z naturalnymi polimerami obejmują ryzyko infekcji, antygenowość i zmienność między partiami, co może ograniczać ich zastosowanie w medycynie. [3] Polimery syntetyczne, z drugiej strony, wykazują większą spójność w swoich właściwościach z doskonałą odtwarzalnością, ale może im brakować cech biokompatybilności wymaganych do zastosowań biomedycznych. Dlatego też wraz ze obserwowanym wzrostem zastosowania polimerów syntetycznych w biologii i medycynie ważne jest określenie natury oddziaływań między polimerem a biomolekułami. Jednym z takich aspektów jest adsorpcja białek do powierzchni warstwy polimerowej oraz możliwość jej kontroli.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej jest pokazanie, że struktura łańcuchów polimerowych wpływa na właściwości cienkich warstw polimerowych a tym samym na oddziaływania z biomolekułami. W ramach przeprowadzonych badań wykazano, że odpowiedni wybór polimeru, a w szczególności taktyczności czy architektury jego

łańcucha, znacząco zmienia istotę interakcji polimer – białko co może wpływać na promowanie lub wręcz przeciwnie zapobiegać adsorpcji białka, a także indukować zmiany konformacji czy orientacji jego zaadsorbowanych molekuł.

1.2. Polimery

Według słownikowej definicji **polimer** jest substancją składającą się z cząsteczek, które mają długie sekwencje jednego lub więcej rodzajów atomów lub grup atomów połączonych ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi. [4] Największe powtarzające się ugrupowanie atomów w całym łańcuchu nazywane jest **merem**. Główną rolę w procesie syntezy polimerów, zwanym polimeryzacją, odgrywa odpowiedni dobór monomeru, który jest substratem podczas reakcji. [2] Efektem polimeryzacji jest otrzymanie długiego łańcucha składającego się z powtarzających się merów, których ilość opisywana jest przez stopień polimeryzacji. Właśnie ten długi łańcuch odróżnia polimery od innych materiałów i nadaje im charakterystyczne właściwości.

1.2.1. Czynniki wpływające na strukturę polimeru

To jakie właściwości będzie posiadał dany zależy w dużej mierze od jego struktury. Czynniki, które będą kształtować strukturę można podzielić ze względu na: [1]

- Rodzaje jednostek konstytucyjnych jak i sekwencję w jakich tworzą łańcuch polimerowy
- Rodzaje jednostek konfiguracyjnych i ich sekwencję tworzącą łańcuch polimerowy

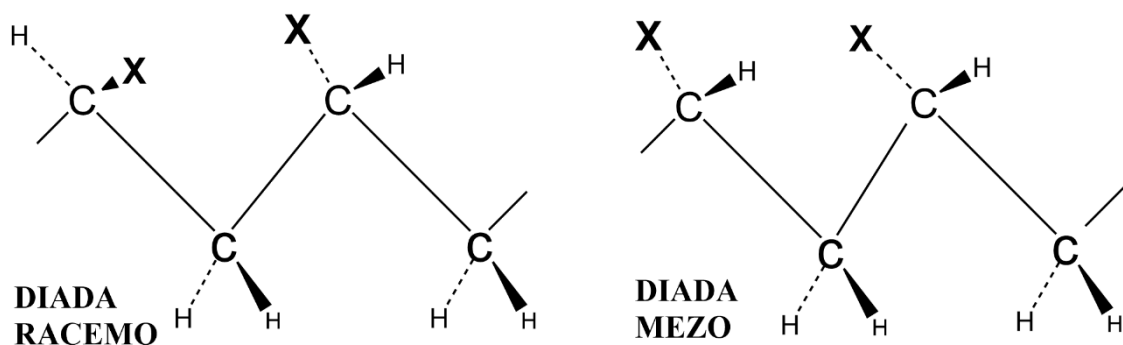
Jednostka konstytucyjna jest definiowana jako atomy lub zespoły atomów, które tworzą łańcuch makrocząsteczki. Szczególnym przypadkiem jednostki konstytucyjnej, która całkowicie wywodzi się z monomeru jest mer. Jeśli łańcuch polimeru składa się z wielokrotności pojedynczej jednostki konstytucyjnej, wtedy taki polimer jest nazywany polimerem regularnym. Natomiast obecność dwóch i więcej jednostek konstytucyjnych, których sekwencje są różne w jednym łańcuchu powoduje powstanie polimeru nieregularnego.

Kolejnym czynnikiem, który będzie wpływał na strukturę danego polimeru jest jego **architektura**. Architektura opisuje jak ułożone są jednostki konstytucyjne lecz nie niesie informacji o ich położeniu w przestrzeni. [1] Wyróżnia się trzy sposoby ułożenia jednostek: postać liniowa (wszystkie mery są ułożone w postaci długiego łańcucha), postać rozgałęziona (do głównego łańcucha doczepiane są następne mery) oraz postać usieciowana (łańcuchy merów łączą się ze sobą poprzez mostki złożone z takich samych merów). Właściwości polimerów są ściśle powiązane z ich architekturą.

Jednostka konfiguracyjna składa się z jednostki konstytucyjnej, która zawiera w sobie minimum jedno centrum chiralności. Centrem chiralności lub stereoizomerii nazywamy atom (najczęściej węgla), który jest związany z zespołem podstawników, które nie nakładają się na siebie w swoim odbiciu lustrzanym. Jednostka konfiguracyjna mówi o sposobie ułożenia strukturalnego danej cząsteczki. Różnice w ułożeniu strukturalnym w makrocząsteczce polimeru wpływają na właściwości danego polimeru. Dlatego też wyróżniane są **izomery** – są to związki, które pomimo takiej samej struktury

molekularnej posiadają różne ułożenie strukturalne co powoduje, że każdy z izomerów posiada różne właściwości. Wśród izomerów można spotkać stereoizomery, które różnią się między sobą rozmieszczeniem atomów w przestrzeni.

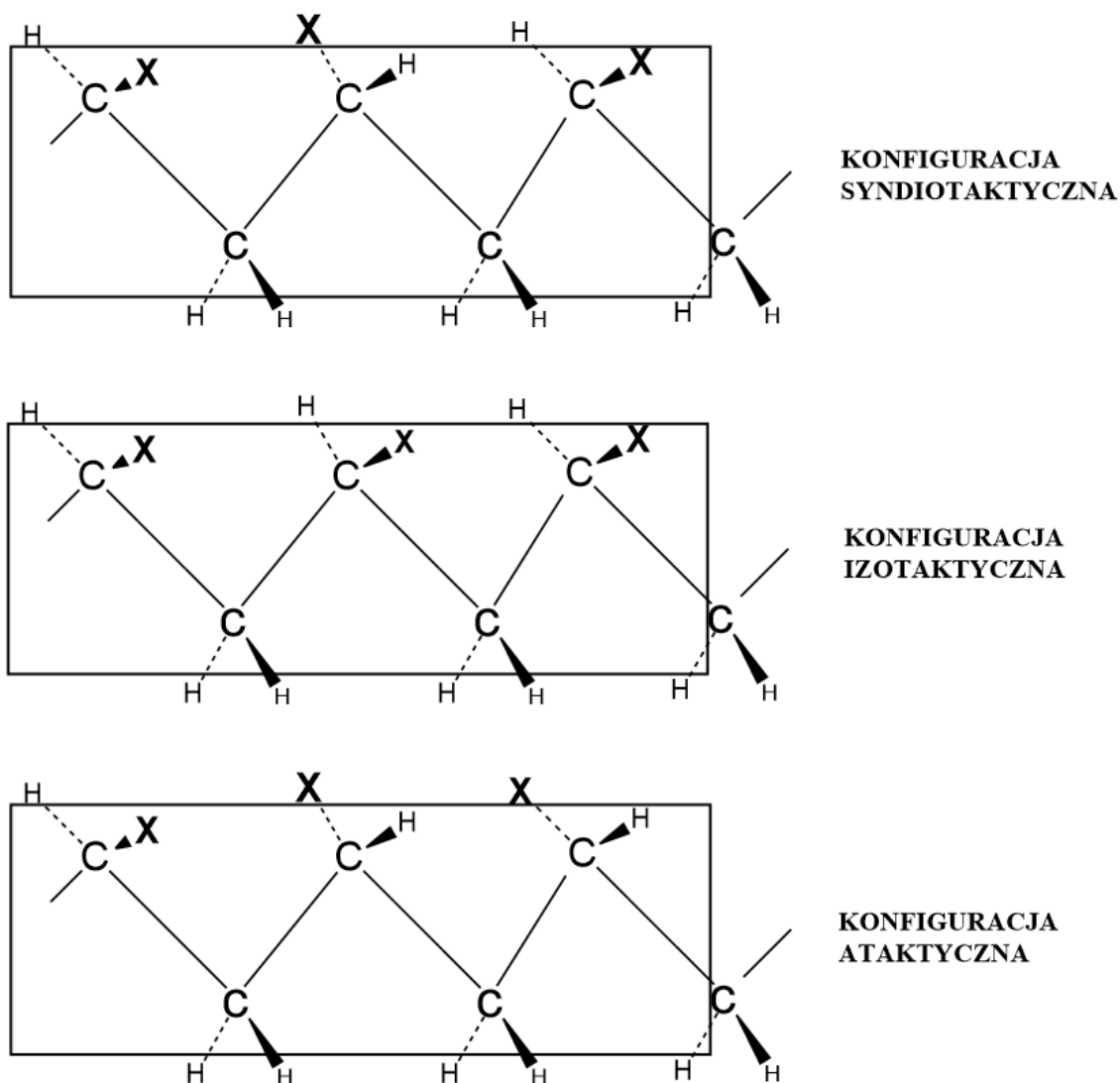
Jednym z przykładów rozróżnienia stereoizomerów jest **taktyczność**. Według oficjalnej definicji IUPAC (Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej) taktyczność określa „uporządkowanie kolejności powtarzalnych jednostek konfiguracyjnych w łańcuchu głównym regularnej makrocząsteczki, cząsteczki regularnego oligomeru, regularnego bloku lub regularnego łańcucha”. [2] O polimerze można powiedzieć, że jest taktyczny, jeśli każda z powtarzających się jednostek konfiguracyjnych jest taka sama. Kluczową rolę odrywa tu centrum chiralności, w którym znajduje się atom węgla w hybrydyzacji sp^3 z czterema różnymi podstawnikami. [5] Sposób ułożenia podstawników będzie wpływał na to jaką taktyczność przyjmie dany polimer. Wyróżnia się dwa sposoby ułożenia podstawników, które tworzą diady (Rysunek 1.1.). Jeśli podstawniki są ułożone na przemienne względem płaszczyzny całego łańcucha głównego wtedy taka diada nazywana jest diadą racemo. Natomiast, jeśli podstawniki znajdują się tylko z jednej strony płaszczyzny to otrzymywana jest diada mezo.



Rysunek 1.1. Dwa sposoby ułożenia podstawników. Jako X oznaczony jest grupa boczna polimeru.

W zależności jakie diady wchodzą w skład łańcucha to polimer może przyjąć jeden z trzech typów taktyczności (Rysunek 1.2.):

- Izotaktyczność (iso) – łańcuch zbudowany jest tylko z diad mezo;
- Syndiotaktyczność (syn) – łańcuch posiada tylko diady racemo;
- Ataktyczność (at) – w skład łańcucha wchodzi zarówno diady mezo jak i racemo.



Rysunek 1.2. Trzy typy taktyczności polimerów. Jako X oznaczona jest grupa boczna.

Z ogólnego punktu widzenia można było by się zastanawiać, dlaczego warto zwracać uwagę na to jaką taktyczność posiada dany polimer. Większość dostępnych komercyjnie polimerów jest ataktyczna, gdyż otrzymanie polimerów o zadanej taktyczności (iso- lub syn-) jest procesem bardziej skomplikowanym i czasochłonnym. Jednak jeśli popatrzeć na możliwe zastosowania polimerów o znanej, powtarzającej się strukturze to łatwo zauważyć, że krystaliczność wymaga regularnego układu strukturalnego. Dlatego też polimery o strukturze izotaktycznej lub syndiotaktycznej mogą się zestalić w sieć krystaliczną i jest to o wiele łatwiejsze niż w przypadku odmiany ataktycznej – polimery o regularnej strukturze będą tworzyć krystaliczne lub semikrystaliczne fazy, natomiast polimery o strukturze nieregularnej od razu przechodzą do amorficznej fazy. [6] Taktyczność danego polimeru będzie wpływać na szereg jego właściwości fizykochemicznych takich jak temperatura zeszklenia, różna rozpuszczalność w tym samym rozpuszczalniku czy też wytrzymałość mechaniczna oraz stabilność termiczna. Dlatego też ważne jest, aby przy wyborze polimeru pamiętać o odpowiednim doborze taktyczności i związanymi z nią właściwościami.

1.2.2. Mieszaniny polimerów

Mieszaniny polimerów (zwane również blendami polimerowymi) to materiały powstałe w wyniku zmieszania minimum dwóch polimerów w celu uzyskania nowego materiału o połączonych właściwościach każdego z komponentów. Tworzenie mieszanin polimerów jest jedną z najłatwiejszych opcji, kiedy już właściwości pojedynczego polimeru nie wystarczają do planowanych zastosowań. [7] Dodatkowo stosowane są jako metoda do opracowania nowych materiałów o konkretnym końcowym przeznaczeniu, gdyż nie potrzebuje aż takich nakładów finansowych jak synteza całkiem nowego polimeru oraz z jednej pary polimerów można otrzymać szereg materiałów o całkowicie odmiennych właściwościach od materiałów początkowych.

Jeśli spojrzeć na mieszanki z punktu fizyki to można je zdefiniować jako fizyczną mieszaninę dwóch lub więcej strukturalnie różnych polimerów bez wiązań kowalencyjnych między nimi. Do oczekiwanych interakcji między komponentami zalicza się siły van der Waalsa, oddziaływania dipolowe lub wiązania wodorowe, które są przydatne w tworzeniu produktu końcowego o różnych kombinacjach właściwości. [8] Wytworzone mieszanki można podzielić na dwa typy:

- mieszalne – otrzymana warstwa ma charakter homogeniczny, czyli nie można wyróżnić poszczególnych składników – taka mieszanina posiada jedną temperaturę zeszklenia (T_g), która znajduje się pośrodku zakresu temperatur zeszklenia poszczególnych składników (określana jest też jako mieszanina jednofazowa);
- niemieszalne – otrzymana warstwa ma charakter heterogeniczny, czyli możliwe jest wyróżnienie faz należących do każdego z polimeru – mieszanina ma dwie temperatury zeszklenia, które odpowiadają każdemu z komponentów (określana jest też jako mieszanina o morfologii dwufazowej).

Mieszalność, którą można zdefiniować jako zdolność do mieszania się na poziomie molekularnym dwóch składników w celu wytworzenia jednorodnej fazy, określa jak typ mieszaniny zostanie otrzymany. [9] Mieszalność blend polimerowych jak i stabilność układu jest określona poprzez zmiany entalpii swobodnej mieszania (energii swobodnej Gibbsa) ΔG_m :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (1.1)$$

gdzie, ΔH_m jest zmianą entalpii mieszania (która jest miarą zmiany energii), a ΔS_m zmianą entropii mieszania.

W 1941 Flory i Huggins zaproponowali model termodynamiki roztworów polimerów, który uwzględnia różnice w rozmiarach molekuł poprzez wprowadzanie modyfikacji wyrażenia na entropię mieszania (w porównaniu do stosowanego do tej pory równania 1.1 dla zwykłych roztworów). Wynikiem tego jest zmodyfikowane równanie na zmianę energii swobodnej Gibbsa:

$$\Delta G_m = RT \left[\frac{\phi_1}{r_1} \ln \phi_1 + \frac{\phi_2}{r_2} \ln \phi_2 + \chi \phi_1 \phi_2 \right] \quad (1.2)$$

gdzie, R jest stałą gazową, T stałą temperaturą, ϕ_1 i ϕ_2 przedstawia frakcję objętościową danego składnika, r_1 i r_2 przedstawiają liczbę segmentów danego polimeru, (która jest proporcjonalna do stopnia polimeryzacji), a χ jest tak zwanym

współczynnikiem Flory'ego – Hugginsa. W równaniu 1.2 pierwsze dwie składowe są związane ze zmianą entropii mieszania:

$$\Delta S_m = -R \left[\frac{\phi_1}{r_1} \ln \phi_1 + \frac{\phi_2}{r_2} \ln \phi_2 \right] \quad (1.3)$$

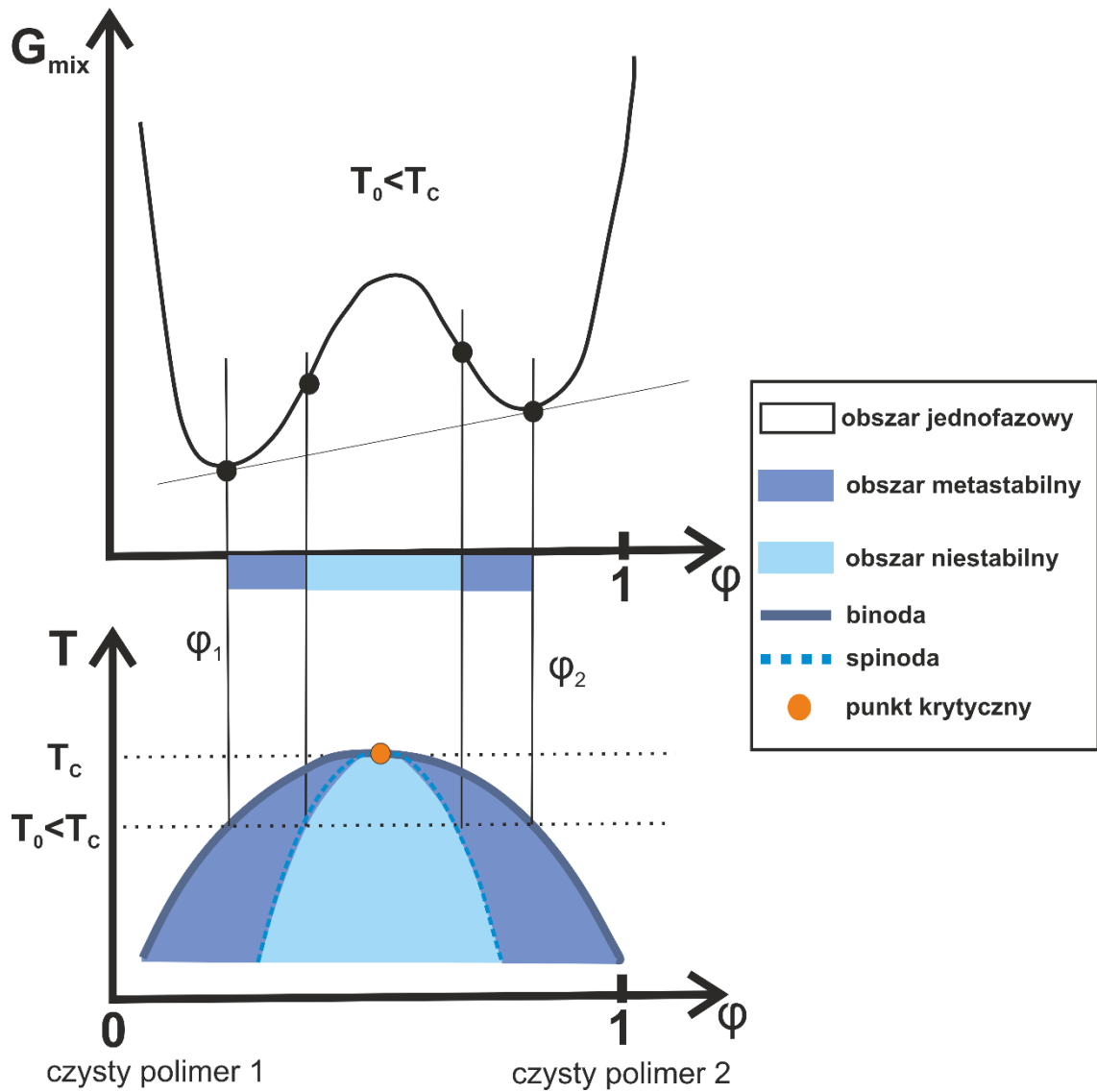
Natomiast trzecia składowa równania 1.2 reprezentuje zmianę entalpii mieszania:

$$\Delta H_m = RT\chi\phi_1\phi_2 \quad (1.4)$$

Wkład zmiany entropii jest niewielki dla składników o małych masach molowych, dlatego też mieszalność układu lub jego niemieszalność będzie głównie zależna od wartości zmiany entalpii mieszania. Jeśli parametr χ jest ujemny, układ będzie wykazywał mieszalność, która występuje przy spełnionym założeniu $\chi < \chi_{cr}$, gdzie χ_{cr} jest parametrem Flory'ego - Hugginsa w punkcie krytycznym (funkcja mas molowych) i może być wyrażona jako:

$$\chi_{cr} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\sqrt{r_1}} + \frac{1}{\sqrt{r_2}} \right)^2 \quad (1.5)$$

Mieszalność polimerów może zależeć do różnych czynników takich jak polarność polimerów, skład komponentów, masa polimerów czy warunki w jakich przeprowadzana jest cała procedura (temperatura czy ciśnienie). [9] Może być też wytłumaczona na podstawie diagramu fazowego przedstawionego na Rysunku 1.3. [8] Wyróżnia się trzy obszary o różnym stopniu mieszania się: obszar jednofazowy oraz dwa obszary dwufazowe – metastabilny oraz niestabilny.



Rysunek 1.3. Diagram fazowy dla mieszanin dwóch polimerów.

Granica fazy równowagi między fazą homogeniczną, a heterogeniczną reprezentowana jest przez krzywą współistnienia faz zwaną binodą. Położenie binody można wyrazić za pomocą wzoru:

$$\frac{\Delta G_m(\varphi_2) - \Delta G_m(\varphi_1)}{\varphi_2 - \varphi_1} = \left. \frac{\partial G_m}{\partial \varphi} \right|_{\varphi_1} = \left. \frac{\partial G_m}{\partial \varphi} \right|_{\varphi_2} \quad (1.6)$$

Mieszanina po przekroczeniu obszaru określanego przez binodę jest metastabilna (separacja fazowa zachodzi przez nukleację i wzrost). Po przekroczeniu granicy stabilności lokalnej (spinody) mieszanina wchodzi w obszar niestabilności (następuje spontaniczna separacja fazowa). Spinoda jest określana przez drugą pochodną energii swobodnej Gibbsa:

$$\left(\frac{\partial^2 \Delta G_m}{\partial \varphi^2} \right)_{p,T} = 0 \quad (1.7)$$

Dodatkowo możliwe jest wyznaczenie punktu krytycznego, który określa miejsce przecięcia się spinody i binody:

$$\left(\frac{\partial^3 \Delta G_m}{\partial \phi^3}\right)_{p,T} = 0 \quad (1.8)$$

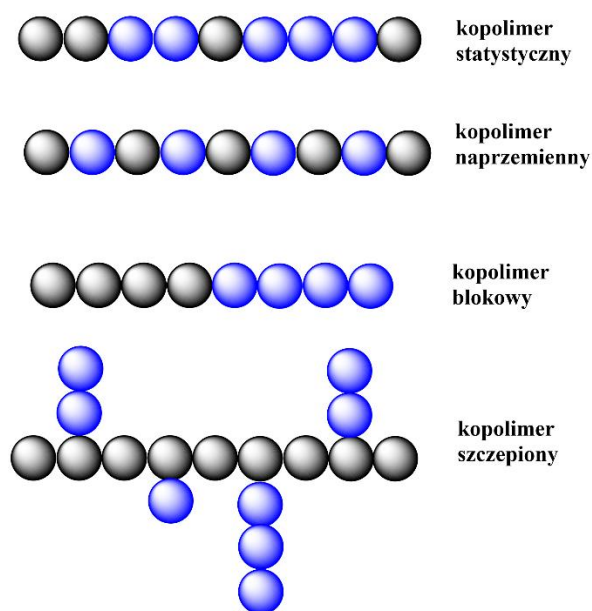
W zależności od masy cząsteczkowej składników mieszanina może wykazywać swój punkt krytyczny albo dla dolnej temperatury krytycznej (LCST z ang. *Low Critical Solution Temperature*) albo dla górnej temperatury krytycznej (USCT z ang. *Upper Critical Solution Temperature*).

Tak jak to było wspomniane wcześniej, właściwości jakie posiada mieszanina polimerów nie są wiernym odwzorowaniem połączonych właściwości poszczególnych składników polimerowych. [10] Ogólna charakterystyka jak i właściwości mieszanin zależą od kilku czynników, takich jak skład mieszaniny i cechy poszczególnych składników (które obejmują ich strukturę, stan i masę cząsteczkową), ale także metoda przygotowania, temperatura i czas przetwarzania, czy morfologia otrzymanej blendy (rozmiar, kształt, powierzchnia międzyfazowa, jednorodność i rozkład).

1.2.3. Kopolimery

Obok syntezy nowych polimerów czy tworzenia mieszanin polimerowych, kopolimery są kolejną opcją na otrzymanie materiałów o wybranych właściwościach. **Kopolimerem** nazywany jest polimer, który został zsyntezowany z wykorzystaniem minimum dwóch monomerów. [11] W rezultacie jeden materiał może łączyć właściwości wszystkich zaangażowanych jednostek monomerów. Tak jak w przypadku polimerów to jakie właściwości będzie miał kopolimer będzie zależało od jego struktury. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na strukturę jest architektura kopolimerów. [12] Wyróżnia się cztery typy architektury kopolimerów przedstawione na Rysunku 1.4:

- Kopolimery statystyczne (losowe) – jednostki monomerów ułożone są w sposób nieokreślony, często nierówny pod względem powtórzeń danego monomeru;
- Kopolimery naprzemienne – jednostki monomerów ułożone są naprzemiennie;
- Kopolimery blokowe – jednostki monomerów występują w blokach (dzielą się na diblokowe oraz multiblokowe);
- Kopolimery szczepione – do głównego łańcucha jednego polimeru są przyłączone dodatkowe monomery różne niż te które tworzą łańcuch.



Rysunek 1.4. Cztery główne typy architektury występujące w kopolimerach.

Najbardziej rozpowszechnioną i najbardziej wyróżniającą się architekturą kopolimerów są **kopolimery blokowe**. Ich charakterystyczną cechą, która odróżnia je od reszty rodzajów kopolimerów jest to, że dzięki niemieszalności segmentów polimerowych dochodzi do separacji mikrofaz, co daje możliwość wytworzenia materiałów nanostrukturalnych. [13] Stale rosnące zainteresowanie rozwojem kopolimerów blokowych wynika w szczególności z łatwej kontroli zarówno wielkości domen, jak i morfologii materiałów nanostrukturalnych. Takie materiały mogą być oparte na dwóch typach kopolimerów blokowych, które można wyróżnić ze względu na proces polimeryzacji: w roztworze lub w masie. Kopolimery tworzone przez polimeryzację w roztworze, w którym rozpuszczalnik jest selektywny dla jednego z monomerów, będą miały tendencję do tworzenia miceli (których morfologia będzie zależała od składu kopolimeru blokowego). [14] Wybór odpowiedniego kopolimeru blokowego, a także rozpuszczalnika, w którym zostanie przeprowadzona polimeryzacja, pozwala na bardzo precyzyjną kontrolę wielkości i kształtu cząstek, stopnia agregacji i funkcjonalności. Tak syntezowane kopolimery blokowe często służą jako baza dla nanomateriałów strukturalnych stosowanych jako część systemów dostarczania leków [15] lub jako rusztowania dla materiałów hybrydowych. [16] Kopolimery blokowe polimeryzowane w masie, dzięki zachodzącej separacji mikrofazowej, tworzą dobrze zdefiniowane, samoorganizujące się struktury o przewidywalnym rozmiarze. Charakter morfologii zależy od wielu czynników, w tym od architektury kopolimeru blokowego, stopnia polimeryzacji każdego bloku, interakcji między blokami jak i interakcji każdego bloku z otoczeniem, a także od sposobu przetwarzania próbki. [17] Właściwości materiałowe kopolimerów blokowych wynikają z cech fizycznych bloków monomerów tworzących kopolimer. Daje to możliwość stworzenia materiału o określonych właściwościach, które tak naprawdę są kombinacją wybranych właściwości polimerów zawartych w kopolimerze. Zakres możliwych zastosowań kopolimerów blokowych polimeryzowanych w masie stale się poszerza również o zastosowania interdyscyplinarne obejmujące dziedziny takie jak: chemia, fizyka i materiałoznawstwo. Takim przykładem są komponenty membranowe stosowane do filtracji, [18] czy jako składniki materiałów

kompozytowych lub blend kopolimerowych. Oba rodzaje mogą być precyzyjnie dostosowane poprzez odpowiednie dobranie parametrów molekularnych, takich jak masa molowa, frakcja objętościowa danych segmentów, ogólna architektura kopolimeru, a także sztywność segmentów (obejmuje to również obecność bloków krystalizacyjnych).

Ważnym obszarem badań nad kopolimerami blokowymi, który zyskuje coraz większe znaczenie, jest zagadnienie cienkich warstw kopolimerów blokowych. Cienkie warstwy kopolimerów blokowych, dzięki wprowadzeniu grubości warstwy porównywalnej z wielkością domen, często wykazują większe różnice w morfologii (w porównaniu do warstw kopolimerów otrzymywanych w standardowy sposób) i dają możliwość uzyskania bardziej zorientowanych domen. [19] Dodatkowo poprzez odpowiedni dobór składników kopolimeru blokowego (gdzie jeden z nich ma zdolność do krystalizacji) możliwe jest uzyskanie cienkich warstw kopolimeru o bardzo specyficznej morfologii. [20] Ze względu na możliwość uzyskania regularnych nanostruktur w zakresie do 50 nm, cienkie warstwy kopolimerów diblokowych mogą znaleźć zastosowanie jako membrany filtracyjne, maski do nanolitografii, a nawet jako prawdopodobne zastosowanie w przechowywaniu danych. [21]

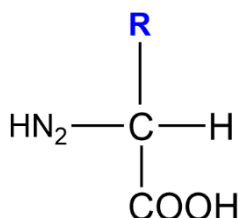
1.3. Białka

Białka to makrocząsteczki o ogromnym znaczeniu dla organizmów żywych - są one najbardziej rozpowszechnionymi związkami organicznymi u kręgowców, stanowiąc około 50% suchej masy ich tkanek. Praktycznie wszystkie procesy biologiczne zależą od funkcji białek. Dlatego też przy opracowywaniu nowych materiałów i ich potencjalnym wykorzystywaniu w biomedycynie ważna jest znajomość struktury białka jak i mechanizmów odpowiadających za immobilizację jego molekuł do powierzchni.

1.3.1. Struktura białek

Białka to makrocząsteczki, które w rzeczywistości są biologicznymi polimerami składającymi się z tysięcy powtarzających się jednostek monomerycznych zwanych aminokwasami. Każde białko składa się z setek aminokwasów połączonych ze sobą w długie łańcuchy.

Aminokwasy to związki organiczne zawierające zarówno grupę aminową ($-NH_2$), jak i grupę karboksylową ($-COOH$) lub inną grupę kwasową, taką jak grupa siarczanowa ($-SO_3$). W większości biologicznie istotnych aminokwasów grupa aminowa jest pierwszorzędowa ($-NH_2$), ale wstępują też aminy drugorzędowe ($-NH-$), czy również aminy trzeciorzędowe (jak w przypadku proliny), które są określane jako kwasy iminowe ($=N-$). Ogólna struktura aminokwasów przedstawiona jest na Rysunku 1.5.



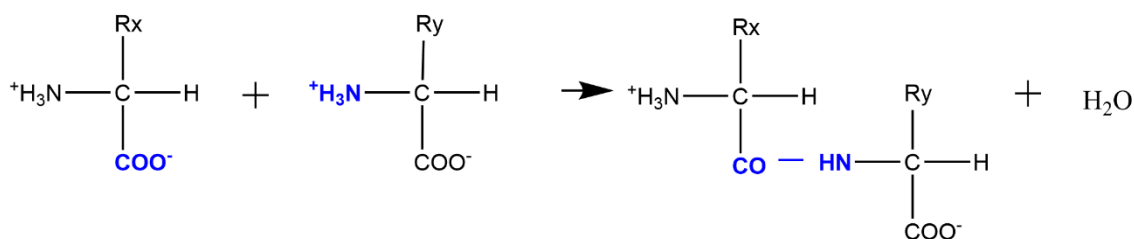
Rysunek 1.5. Schemat budowy aminokwasów. Jako R oznaczony jest łańcuch boczny, który jest charakterystyczny dla danego aminokwasu.

Każdy z 20 aminokwasów posiada unikalny dla niego łańcuch boczny, który odpowiedzialny jest za właściwości chemiczne danego aminokwasu. [22] Różnorodność strukturalna łańcuchów bocznych wpływa na rozmiar i hydrofobowość danego aminokwasu co pozwala na tworzenie białek o różnej strukturze i funkcji. Możliwe jest podzielenie aminokwasów ze względu na charakterystykę ich łańcuchów bocznych – podział ten przedstawiony jest w Tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Podział aminokwasów ze względu na charakter ich łańcuchów bocznych (na podstawie [22])

Grupa	Aminokwasy	Łańcuch boczny
Neutralne aminokwasy z niepolarnym łańcuchem alifatycznym	Glicyna (Gly)	tylko jeden wodór w łańcuchu bocznym
	Alanina (Ala)	grupa metylowa rozpuszczalna w wodzie
	Walina (Val)	niepolarne rozgałęzione łańcuchy boczne
	Leucyna (Leu)	niepolarne rozgałęzione łańcuchy boczne
	Izoleucyna (Ile)	niepolarne rozgałęzione łańcuchy boczne
Neutralne aminokwasy alifatyczne z niezjonizowanym łańcuchem polarnym	Seryna (Ser)	funkcyjna grupa hydroksylowa
	Treonina (Thr)	funkcyjna grupa hydroksylowa
Neutralne aromatyczne aminokwasy	Feniloalanina (Phe)	pierścień benzenowy
	Tryptofan (Trp)	indolowy heterocykliczny łańcuch boczny
	Tyrozyna (Tyr)	fenolowy hydroksyl
Aminokwasy z siarką	Cysteina (Cys)	grupa siarczanowa
	Metionina (Met)	niepolarny łańcuch boczny
Aminokwasy kwasowe	Kwas asparaginowy (Asp)	grupa karboksylowa
	Kwas glutaminowy (Glu)	grupa karboksylowa
	Asparagina (Asn)	grupa amidowa
	Glutamina (Gln)	grupa amidowa
Aminokwasy zasadowe	Lizyna (Lys)	grupa aminowa
	Arginina (Arg)	grupa karboksylowa
	Histydyna (His)	heterocykliczny imadazolowy łańcuch boczny
Prolina	Prolina (Pro)	węgiel zawarty w pierścieniu pirolidynowym

Aminokwasy tworzą wiązania kowalencyjne między grupą karboksylową jednego aminokwasu a grupą aminową innego. [23] To połączenie typu amidowego nazywane jest wiązaniem peptydowym i towarzyszy mu utrata wody (Rysunek 1.6.).



Rysunek 1.6. Schemat powstawania wiązania peptydowego.

Produkt powstały w wyniku połączenia dwóch aminokwasów nazywany jest **peptydem**. Późniejsze wiązanie dodatkowych jednostek aminokwasowych z tym dipeptydem poprzez wiązanie peptydowe generuje tripeptydy, tetrapeptydy, pentapeptydy itp. Łańcuchy utworzone z więcej niż 10 aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi nazywane są polipeptydami. Na jednym końcu każdego łańcucha polipeptydowego znajduje się aminokwas z wolną grupą aminową. Zgodnie z konwencją, ten koniec jest uważany za początek łańcucha i nazywany jest N-końcową częścią polipeptydu. [24] Drugi koniec łańcucha kończy się wolną grupą karboksylową i jest uważany za C-końcową część polipeptydu. Ogólnie rzecz biorąc, peptydy są łańcuchami aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Jednakże niektóre z nich mają szczególne cechy, takie jak nietypowe wiązania peptydowe, nietypowe aminokwasy lub pochodne aminokwasów czy nawet możliwość tworzenia struktur cyklicznych. Liczba i rodzaj aminokwasów, ich sekwencja, czy układ przestrzenny są ważnymi wyznacznikami funkcjonalnej roli peptydów. [22] Przyjęte zostało, że połączenie poniżej 100 aminokwasów lub o masie poniżej 10 kDa nazywane jest peptydem - powyżej tego limitu mówimy już o białkach.

Właściwości danego białka będą zależeć nie tylko od tego jakie aminokwasy je budują, ale przede wszystkim od jego struktury przestrzennej, czyli względnego ułożenia aminokwasów w przestrzeni dwu- i trójwymiarowej. Wyróżnia się cztery poziomy strukturalne w białkach:

- Struktura pierwszorzędowa odnosi się do liczby i sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Ma postać łańcucha, gdyż wiązania peptydowe mogą tworzyć wyłącznie struktury liniowe. Sekwencja aminokwasowa białka jest najważniejszym wyznacznikiem jego konformacji, właściwości i cech funkcjonalnych. Wymagania strukturalne, które muszą być spełnione aby białko spełniało swoją fizjologiczną rolę, są bardzo rygorystyczne. Zachowana musi być nie tylko liczba i rodzaj aminokwasów składowych, ale także dokładna pozycja każdego aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym. Zmiany w tej kolejności lub substytucje mogą wpłynąć na zdolność funkcjonalną cząsteczki i uczynić ją nieaktywną.
- Struktura drugorzędowa definiuje regularny, przestrzenny i powtarzalny układ łańcucha polipeptydowego, który jest utrzymywany przez wiązania wodorowe. Układ przestrzenny, jaki przyjmuje łańcuch polipeptydowy, zależy od orientacji wiązań między atomami szkieletu —C—N—C—. Charakter wiązania peptydowego plasuje je pomiędzy wiązaniem pojedynczym a podwójnym. Zapewnia to pewną sztywność połączenia C—N, zapobiegając swobodnej rotacji zaangażowanych atomów. Na podstawie długości wiązań oraz kątów jakie tworzą możliwe jest wyróżnienie dwóch regularnych struktur: α-helisy oraz β-kartki:

- α -helisa – łańcuch polipeptydowy jest ułożony spiralnie na osi centralnej (można sobie to wyobrazić jako łańcuch owinięty wokół cylindra). Pełny obrót helisy obejmuje odległość 0.54 nm wzdłuż osi białka i obejmuje 3.6 reszty aminokwasowej. Oznacza to, że każda reszta rozciąga się na odległość 0.15 nm, obejmując kąt 100° wokół osi białka. Obrót łańcucha odbywa się spiralnie w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara. Cała helisa utrzymywana jest dzięki wiązaniami wodorowym.
- β -kartka – w tej strukturze (zwanej również jako β -harmonijka) łańcuch polipeptydowy jest bardziej rozciągnięty – odległość między kolejnymi węglami chiralnymi wynosi 0.35 nm. Gdy minimum dwa wydłużone łańcuchy białkowe zostaną sparowane, mogą one utworzyć wiązania wodorowe między grupami $=NH$ jednego łańcucha i $=CO$ drugiego, tworząc struktury lamelarne posiadające zygzakowate złożenie (tzw. struktura pofałdowanej kartki). Wyróżnia się dwie formacje β -kartki, które zależą od kierunku sparowanych łańcuchów białkowych: jeśli mają ten sam kierunek to β -kartka jest równoległa, a jeśli występują w przeciwnych kierunkach to mówi się o β -kartce antyrównoległej.
- Struktura trzeciorzędowa opisuje kompletną trójwymiarową architekturę białka. Odnosi się do składania łańcucha polipeptydowego i elementów struktury drugorzędowej w zwarty trójwymiarowy kształt. Składanie jest złożonym procesem, który jest napędzany przez minimalizację energii oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych jak i cząsteczka – rozpuszczalnik. Grupy hydrofobowe mają tendencję do składania się do wnętrza z mniejszą ekspozycją na rozpuszczalnik, podczas gdy naładowane i polarne łańcuchy boczne mają tendencję do znajdowania się na powierzchni. Struktura 3D jest stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, siły van der Waalsa i oddziaływania hydrofobowe. Mostki siarczkowe, które występują między resztami cysteiny również stabilizują strukturę 3D. Struktura trzeciorzędowa może zostać zaburzona lub nawet zniszczona w procesie denaturacji. Proces ten zachodzi wraz ze zmianą temperatury lub w obecności rozpuszczalników organicznych, detergentów lub innych substancji, które powodują przerywanie wiązań wodorowych. Ograniczona denaturacja może być odwracalna, ale rozległe „rozłożenie” struktury białek często prowadzi do nieodwracalnej utraty aktywności biologicznej.
- Struktura czwartorzędowa dotyczy tylko białek, które utworzone są przez dwa lub więcej łańcuchów polipeptydowych i odnosi się do przestrzennego rozmieszczenia łańcuchów jak i połączeń między nimi. Białka, które składają się z minimum dwóch łańcuchów polipeptydowych nazywane są białkami oligomerycznymi. Tak jak w przypadku struktury trzeciorzędowej wiązania wodorowe, oddziaływanie elektrostatyczne, czy hydrofobowe i mostki dwusiarczkowe są odpowiedzialne za utrzymanie pozycji różnych podjednostek w białku oligomerycznym.

Zróznicowane cechy strukturalne białek skutkują unikalnymi właściwościami fizycznymi danego białka do których zaliczają się: rozpuszczalność, rozmiar, masa, ładunek czy różny sposób adsorpcji.

1.3.2. Immobilizacja białek

Immobilizację białka można zdefiniować jako przyłączenie jego molekuł do powierzchni, co skutkuje zmniejszeniem lub utratą mobilności. Jest to powszechne zjawisko, które często jest pierwszym krokiem w szeregu różnych procesach biologicznych, takich jak sygnalizacja transbłonowa lub kaskada krzepnięcia krwi. Jednak nie zawsze adsorpcja białek jest pożądana, gdyż może powodować adhezję cząstek, bakterii czy komórek, potencjalnie promując kaskady zapalne lub procesy zanieczyszczenia. Cały proces immobilizacji białek na powierzchni jest wykorzystywany w dziedzinach nauk analitycznych czy biomedycznych. W niektórych przypadkach immobilizacja może prowadzić do częściowej lub całkowitej utraty aktywności białka z powodu przypadkowej orientacji i deformacji strukturalnej. [25] Aby w pełni zachować aktywność biologiczną, białka powinny być przymocowane do powierzchni bez wpływu na konformację, a tym samym na jego funkcję. Ogólnie rzecz biorąc, wybór odpowiedniej strategii immobilizacji zależy od właściwości fizykochemicznych zarówno powierzchni, jak i białka. Z tego względu można wyróżnić trzy mechanizmy immobilizacji: adsorpcja fizyczna, wiązania kowalencyjne oraz wiązania specyficzne.

Adsorpcja fizyczna jest najprostszą metodą immobilizacji białek, dzięki temu, że cząsteczki białek mogą adsorbować się do prawie wszystkich rodzajów powierzchni. [25] Proces fizycznej adsorpcji białek na powierzchniach materiałów ma zasadnicze znaczenie zwłaszcza w początkowej fazie kontaktu powierzchni materiałów ze środowiskiem biologicznym. Chociaż jest to najprostsza metoda immobilizacji, jej złożoność jest opisywana przez wiele różnych mechanizmów i sił działających między białkiem, a powierzchnią, w tym przez siły hydrofobowe, elektrostatyczne oraz van der Waalsa. [26] To, które siły międzycząsteczkowe mają dominujący wkład, zależy od konkretnego białka jak i od własności powierzchni. Dodatkowo każda z molekuł białka może tworzyć wiele kontaktów w różnych orientacjach w celu zminimalizowania odpychających oddziaływań z podłożem i wcześniej zaadsorbowanymi molekułami. [27] Prowadzi to do przypadkowej orientacji i słabego wiązania z powierzchnią, co można zaliczyć do wad adsorpcji fizycznej.

W porównaniu z adsorpcją fizyczną, **wiązanie kowalencyjne** zapewnia silniejszą interakcję i wyższą selektywność. [28] Wykorzystywany jest fakt, że białka oferują wiele grup funkcyjnych, głównie w łańcuchach bocznych aminokwasów, które są odpowiednie do celów immobilizacji. Wiązania kowalencyjne tworzą się pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów, a odpowiednio zmodyfikowanymi nośnikami występującymi na podłożu. Powoduje to powstanie nieodwracalnego wiązania, co wiąże się z dużym pokryciem powierzchni. Do najpopularniejszych grup funkcyjnych wykorzystywanych do zmodyfikowania podłoża zaliczane są aldehydy, estry NHS oraz maleimidy. [29] Dzięki obecności tych grup na powierzchni warstwy możliwe jest stworzenie wiązania kowalencyjnego z molekułami białka. Niestety wiązania z wykorzystaniem łańcuchów bocznych aminokwasów są często przypadkowe, gdyż opierają się na resztach aminokwasowych obecnych na najbardziej zewnętrznej warstwie molekuły białka. Jednakże procedura wiązania kowalencyjnego może być przeprowadzona w ściśle określony sposób, tak aby uzyskać ukierunkowaną i powtarzalną immobilizację. Dzięki dobrze zdefiniowanym procedurom możliwe jest uniknięcie denaturacji białka, które może być spowodowane reakcją z grupami aminokwasowymi, które nie są

zaangażowane w proces immobilizacji. [29] Aby białka mogły zostać zaadsorbowane do powierzchni z wykorzystaniem wiązania kowalencyjnego wymagana jest funkcjonalizacja molekuł białka lub/i docelowej powierzchni. Odpowiednie przygotowanie molekuł oraz powierzchni może skutkować optymalną orientacją białka i ekspozycją domen funkcjonalnych do powierzchni. W ten sposób białka mogą być przyłączane do powierzchni w dobrze uporządkowany sposób, umożliwiając powtarzalność i stabilność konformacyjną.

Trzecią metodą immobilizacji białek do powierzchni jest wykorzystanie **wiązań specyficznych**. Specyficzne wiązanie białko-białko lub białko-ligand jest jedną z metod, która oferuje ukierunkowaną immobilizację białek. Białka posiadają na swojej powierzchni miejsca wiążące, które mogą oddziaływać z ligandem lub miejscami wiążącymi znajdującymi się na powierzchni białka komplementarnego. Dzięki znajomości wiązań specyficznych możliwa jest immobilizacja białka do przygotowanej wcześniej powierzchni. Specyficzne wiązanie zachodzi poprzez niekowalencyjne siły międzycząsteczkowe, takie jak siły van der Waalsa i wiązania jonowe lub wodorowe. Jednakże, aby wykorzystać specyficzne wiązanie do immobilizacji białka, jego ligand lub białko komplementarne musi być wcześniej osadzone na powierzchni. Cały proces immobilizacji białek z wykorzystaniem wiązań specyficznych przebiega w kilku etapach podczas których tworzy się biomolekularna warstwa. W pierwszym etapie na podłożu osadzony jest ligand lub białko komplementarne (poprzez wykorzystanie adsorpcji fizycznej lub wiązania kowalencyjne). Następnie blokowane są miejsca na powierzchni, które nie są obsadzone molekułami (najczęściej wykorzystywana do tego jest surowicza albumina wołowa). W ostatnim kroku immobilizowane jest białko, które wiąże się specyficznie do białka/ligandu osadzonego w pierwszym etapie. Jednym z najbardziej znanych wiązań specyficznych jest system streptawidyna-biotyna. Wiązanie ligand-receptor między streptawidyną, a biotyną jest jednym z najsilniejszych wiązań niekowalencyjnych występujących w przyrodzie. Specyfika tej interakcji pozwala na równomierną immobilizację białek, która jest wykorzystywana w testach biochemicznych. Dodatkową zaletą stosowania tego systemu jest możliwość wykorzystania biotynylacji białek, która polega na sprzężeniu molekuły białka lub jego fragmentu z biotyną (dzięki małej masie biotyny sprzężone białko nie zmienia swojej konformacji czy też właściwości). Wykorzystanie wiązań specyficznych jako metody adsorpcji białek posiada kilka unikalnych cech w porównaniu do pozostałych metod: [30] wiązanie jest bardzo silne, lecz może być odwracalne w pewnych warunkach; daje możliwość ponownego wykorzystania podłoża; pozwala na zorientowaną i stabilną immobilizację białek.

1.3.3. Czynniki wpływające na immobilizację białek

Cały proces immobilizacji białka zależy nie tylko od tego jaki mechanizm jest wykorzystywany, ale też kilku różnych czynników, które będą wpływać na cały przebieg procesu:

- Wpływ parametrów zewnętrznych na adsorpcję białek.
Warunki, w których przeprowadzane są eksperymenty adsorpcji białek, mają decydujący wpływ na jej efektywność. Do decydujących parametrów zewnętrznych możemy zaliczyć:

- Temperaturę – ma wpływ zarówno na stan równowagi, jak i kinetykę adsorpcji białek. Główną siłą napędową adsorpcji białek jest wzrost entropii wynikający z uwalniania zaadsorbowanych na powierzchni cząsteczek wody i jonów soli oraz z przegrupowań strukturalnych wewnątrz białka. Dlatego też ilość białek zaadsorbowanych na powierzchni wzrasta w podwyższonej temperaturze;
- pH – określa stan elektrostatyczny białek. Gdy pH jest równe punktowi izoelektrycznemu (IEP) białka, liczba ładunków ujemnych i dodatnich jest zrównoważona, co skutkuje neutralną molekułą. Z kolei przy pH niższym niż IEP białko jest naładowane dodatnio, a przy wyższym pH naładowane ujemnie. Elektrostatyczne odpychanie białko-białko jest zminimalizowane w punkcie izoelektrycznym, co pozwala na większą gęstość upakowania na powierzchni. Z drugiej strony szybkość adsorpcji jest wysoka, gdy białko i substrat mają przeciwne ładunki, ponieważ przyciąganie elektrostatyczne przyspiesza migrację w kierunku powierzchni;
- Stężenie rozpuszczonych jonów (siła jonowa) - siła jonowa zasadniczo określa odległość tłumienia potencjału elektrycznego stałego ładunku w elektrolicie. Oznacza to, że im wyższa siła jonowa, tym krótsze są oddziaływania elektrostatyczne między naładowanymi jednostkami. W konsekwencji adsorpcja naładowanych białek lub domen białkowych na przeciwnie naładowanych substratach jest utrudniona, podczas gdy adsorpcja na podłożach o podobnym ładunku jest wzmocniona;
- Wpływ właściwości białka na jego adsorpcję
Różnorodność łańcuchów bocznych w aminokwasach budujących dane białko skutkuje niezwykłą złożonością zarówno strukturalną jak i funkcjonalną, co sprawia że każde białko będzie się odrobinę inaczej zachowywać podczas procesu adsorpcji. [29] Jednak można przeprowadzić klasyfikację białek z uwzględnieniem ich zachowania międzyfazowego, biorąc pod uwagę takie właściwości fizyczne jak rozmiar, stabilność strukturalna i skład. W mieszaninach białek zachowanie adsorpcyjne jest często wynikiem nakładania się procesów transportu, adsorpcji i odpychania. Małe białka dyfundują szybciej niż duże i są dominującymi molekułami na wczesnym etapie adsorpcji. Większe białka jednak zazwyczaj silniej wiążą się z powierzchnią ze względu na większy obszar kontaktu i mogą nawet odpychać inne wstępnie zaadsorbowane białka podczas rozprzestrzeniania się na powierzchni. W konsekwencji całkowita masa zaadsorbowanych białek może przejść przez lokalne maksimum w trakcie adsorpcji (tzw. efekt Vromana [31]);
- Wpływ właściwości powierzchni na adsorpcję białka
Interakcje białko - powierzchnia są zależne z jednej strony od właściwości białka a z drugiej od właściwości powierzchni, do której adsorbuje białko. Ważne parametry, które należy wziąć pod uwagę, obejmują energię powierzchniową, polarność, ładunek czy morfologię. Białka mają tendencję do silniejszego przylegania do powierzchni niepolarnych niż polarnych, do powierzchni o wysokim napięciu powierzchniowym niż do powierzchni o niskim napięciu powierzchniowym oraz do podłoży naładowanych niż nienaładowanych. [25]

Można się spotkać w literaturze z doniesieniami, że niepolarne powierzchnie destabilizują białka, a tym samym ułatwiają reorientację konformacyjną prowadzącą do silnych oddziaływań między białkami i białko-powierzchnią. Wyjaśnia to dość ogólne eksperymentalne stwierdzenie, że w większości przypadków powinowactwo białek do powierzchni wzrasta na podłożach hydrofobowych i maleje na podłożach hydrofilowych.

Cały czas głównym założeniem badań nad immobilizacją białek jest chęć zrozumienia zachowania białka tuż przed lub już po adsorpcji na powierzchni – jako pojedynczych molekuł, ale też jako jednego całego układu. [25] Badanie zjawisk adsorpcji białek na powierzchniach ciał stałych jest złożonym i fascynującym przedsięwzięciem. Jego naukowe znaczenie przejawia się w różnych problemach napotykanym w obszarach badawczych, takich jak projektowanie materiałów biokompatybilnych, śledzenie zdarzeń biologicznych, które wyzwalają lub zapobiegają chorobom, ulepszanie urządzeń analitycznych lub kontrola procesów zanieczyszczania. Od lat 70-tych, kiedy Leo Vroman zaobserwował mechanizmy wymiany pomiędzy zaadsorbowanymi białkami osocza, badacze są świadomi ogromnej złożoności zdarzeń związanych z adsorpcją białek. [31] Chociaż szereg przeprowadzanych badań w ciągu ostatnich dekad w tej dziedzinie znacznie poprawiły nasze zrozumienie, nadal są aspekty, które nie są do końca zrozumiane i brakuje ich opisu do pełnego poglądu na to, jak białka zachowują się w kontakcie z stałą powierzchnią.

ROZDZIAŁ 2

Część eksperymentalna

Tematem przedstawionej rozprawy doktorskiej jest wpływ struktury łańcuchów polimerowych na właściwości ich cienkich warstw jak również na oddziaływania powierzchni tych warstw z białkami. W tym rozdziale pracy zostaną omówione polimery oraz kopolimery będące przedmiotem badań jak i białka, które zostały wykorzystane do badań adsorpcji. Następnie zostaną opisane zastosowane metody badawcze, które zostały wykorzystane do określenia struktury warstw polimerowych oraz ich oddziaływań z białkami.

2.1. Materiały

2.1.1. Polimery

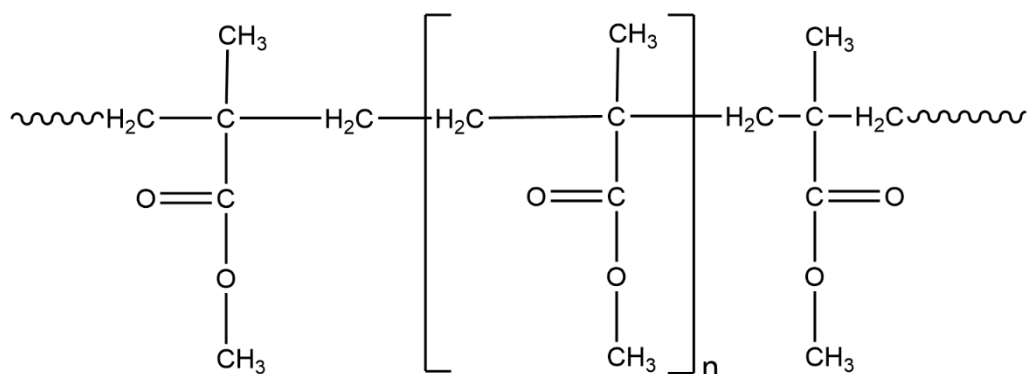
Planowanie badań, które stały się podstawą przedstawionej rozprawy doktorskiej zostało rozpoczęte od wyboru odpowiedniego głównego materiału badawczego – w tym przypadku od doboru typu polimerów, na których został oparty cały projekt badawczy.

Jako, że prowadzone badania były częścią projektu SONATA „*Wpływ taktyczności polimerów na adsorpcję, orientację i konformację białek na powierzchni cienkich warstw polimerowych*” zdecydowano się na wybranie dwóch polimerów z grupy metakrylanów: poli(metakrylan tert-butyłu) (PtBMA) oraz poli(metakrylan metylu) (PMMA). Kryterium doboru obu polimerów było to, że każdy z nich posiada trzy formy stereoregularności, co pozwoliło na przeprowadzenie szczegółowych badań nad wpływem stereoregularności na właściwości cienkich warstw polimerowych i ich oddziaływań z zaadsorbowanymi białkami.

W dalszej części badań do rozprawy doktorskiej w ramach współpracy z grupą profesor Teresy Basińskiej z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, zostały przeprowadzone badania skupiające się na wpływie architektury kopolimeru polistyren-poliglicydol na właściwości powierzchni jego cienkich warstw oraz na adsorpcję białek do jego powierzchni.

2.1.1.1. Poli(metakrylan metylu)

Poli(metakrylan metylu) (PMMA) jest jednym z najszerszej stosowanych polimerów w ogólnorozumianym przemyśle. Jest polimerem z rodziny akrylanów, który otrzymywany jest w procesie polimeryzacji metakrylanu metylu (MMA), z szczególnym uwzględnieniem procesu polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). Zaliczany jest do grupy amorficznych termoplastików, dzięki obecności w swojej strukturze (Rysunek 2.1.) łańcucha bocznego grupy metylowej (CH_3), która zapobiega ścisłemu upakowaniu oraz umożliwia swobodny obrót wokół wiązań C-C [32].



Rysunek 2.1. Schemat struktury poli(metakrylanu metylu).

PMMA został odkryty na początku lat 30. przez dwóch brytyjskich chemików Rowlanda Hilla i Johna Crawforda. Jedno z pierwszych zastosowań PMMA miało miejsce w 1934 roku przez niemieckiego chemika Otto Roehma, który podjął próbę wyprodukowania bezpiecznego szkła poprzez polimeryzację metakrylanu metylu pomiędzy dwiema warstwami szkła. Polymer oddzielił się od szkła w postaci przezroczystego plastikowego arkusza, któremu Roehm nadał nazwę handlową Plexiglas. Swoje pierwsze zastosowania nowy materiał znalazł już podczas II wojny światowej, gdzie zastąpiono nim szkło w peryskopach okrętów podwodnych czy też samolotów wojskowych [33].

Dzięki swoim właściwościom takim jak duża wytrzymałość uderzeniowa, lekkość, odporność na pęknięcia a przy tym łatwość w przetwarzaniu PMMA jest jednym z najbardziej wszechstronnie wykorzystywanych materiałów polimerowych [34,35]. Jest on powszechnie wykorzystywany w medycynie, gdzie zastosowanie polimeru można podzielić na cztery kluczowe obszary: stomatologię, ortopedię, okulistykę i produkcję urządzeń [36,37]. PMMA znalazło zastosowanie w stomatologii, ponieważ jego właściwości, takie jak łatwość przetwarzania i pigmentowania oraz dobre właściwości mechaniczne, a przede wszystkim niska toksyczność, sprawiają, że jest to najpopularniejsza baza protez na całym świecie [38–40]. Dzięki zastosowaniu różnych metod polimeryzacji, a także wykorzystaniu dodatkowych substancji, możliwe jest stworzenie żywicy dostosowanej do potrzeb pacjentów. Żywice PMMA są odporne na urazy, biokompatybilne i odporne na długotrwałe działanie środowiska wodnego. W oparciu o te same właściwości, PMMA jest również stosowany jako główny składnik sztucznych cementów kostnych stosowanych w ortopedii w celu zapewnienia mocowania między kością a implantami [36,41–45]. Jednym z interesujących zastosowań PMMA jest okulistyka, gdzie stosowany jest jako materiał na soczewki wewnątrzgałkowe przeszczepiane po operacji zaćmy [46]. Ponadto, dzięki dobrym właściwościom fizykochemicznym, takim jak hydrofilowość i łatwość przetwarzania, PMMA jest również wykorzystywany do produkcji zaawansowanych komórek mikroprzepływowych, a także urządzeń typu *lab-on-a-chip* [47–51]. Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie PMMA w medycynie, kluczowe jest zrozumienie mechanizmów interakcji między polimerem a biomolekułami, zwłaszcza z białkami.

W literaturze można się spotkać z szerokim zakresem badań nad PMMA (ponad 48 tysięcy publikacji według Web of Science). Jeden z bardziej interesujących obszarów badań skupia się na porównaniu właściwości różnych taktyczności PMMA. Czysty polimer może być zsyntezowany w izotaktyczną, ataktyczną czy też syndiotaktyczną formę dzięki

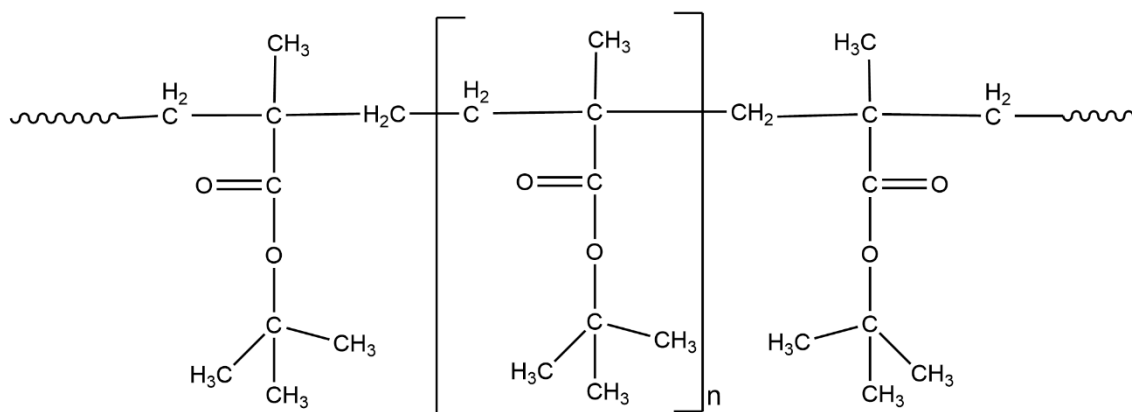
odpowiedniemu wyborowi metody polimeryzacji, inicjatorów czy rozpuszczalnika. Amorficzna natura PMMA jest regulowana przez jego taktyczność w następującej kolejności: syndiotaktyczny > ataktyczny > izotaktyczny [52].

Jeśli chodzi o oddziaływania polimer – białko to zaawansowane badania nad adsorpcją białek koncentrują się głównie na różnicach między stereokompleksem (SC) utworzonym między izotaktycznym PMMA (iso-PMMA) i syndiotaktycznym PMMA (syn-PMMA) poprzez porównanie do czystych stereoregularnych form jak i ataktycznego PMMA (at-PMMA). Badania przeprowadzone dla różnych rodzajów białek wykazały, że większe ilości białka zostały zaadsorbowane na SC niż na warstwach z pojedynczych stereoizomerów PMMA. Dodatkowo autorzy prac zaobserwowali zmiany w konformacji białek, które połączyli z różną konformacją PMMA na powierzchni. Dla stereokompleksu, który posiada uporządkowaną postać PMMA białka adsorbują przy stosunkowo małej powierzchni kontaktu, co skutkuje zmniejszoną denaturacją białek [26,53–56]. Ponadto w literaturze [51] można spotkać się z badaniami dotyczącymi właściwości i biokompatybilności izotaktycznych i syndiotaktycznych włókien z czystego PMMA oraz ich mieszanek w różnych proporcjach wagowych. Przeprowadzone testy proliferacji komórek wykazały, że zarówno czyste izotaktyczne i syndiotaktyczne włókna PMMA, jak i ich mieszanki użyte do testu hodowli są biokompatybilne z komórkami HeLa.

Pomimo szerokiego przekroju badań nad wpływem taktyczności PMMA na oddziaływania z białkami większość z prac skupia się na samym procesie adsorpcji białka do powierzchni. Jednak kluczowa jest nie tylko sama adsorpcja lecz również ważnym aspektem jest zmiana orientacji lub konformacji białka podczas samego procesu. Dlatego też przedstawione badania w rozdziale 4 pozwalają na uzupełnienie tej luki i skupiają się na wpływie stereoregularności polimetakrylanu metylu na orientację osadzonych białek.

2.1.1.2. Poli(metakrylan tert-butyłu)

Poli(metakrylan tert-butyłu) (PtBMA) należy do tej samej grupy polimerów co wyżej opisywany poli(metakrylan metylu). Jedyną różnicą w strukturze obu polimerów, jest obecność w grupie bocznej PtBMA (Rysunek 2.2.) dodatkowego węgla oraz dwóch grup metylowych.



Rysunek 2.2. Schemat struktury poli(metakrylanu tert-butyłu).

PtBMA również występuje w trzech formach stereoregularności: izotaktyczny, ataktyczny czy syndiotaktyczny, gdzie pożądana forma taktyczności jest syntezowana za pomocą odpowiedniej metody polimeryzacji oraz użytego inicjatora [57].

W przeciwieństwie do PMMA, PtBMA nie jest aż tak szeroko stosowanym polimerem. Jednak posiadając podobny zestaw właściwości co bardziej rozpowszechniony PMMA, poli(metakrylan tert-butyłu) znajduje coraz więcej zastosowań, a jego szczególnie wykorzystywaną cechą jest hydrofobowość. [58]

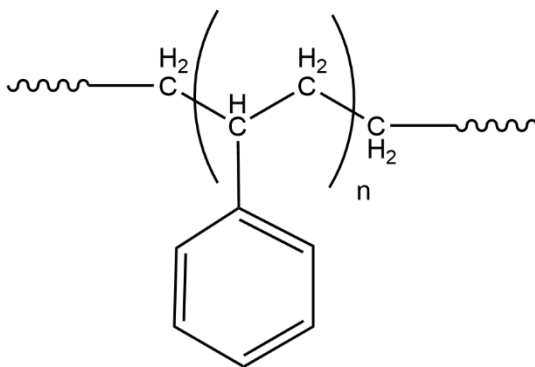
W ostatnich latach przedstawiono różne przykłady badań nad zastosowaniem PtBMA w biomedycynie. Dostępne są badania nad odpowiedzią komórek bakteryjnych na właściwości powierzchni PtBMA [59,60], jak i nad nanożelami typu rdzeń/otoczka składające się z rdzenia z poli (N-izopropylometakryloamidu) (PNIPMAAm) pokrytego otoczką z PtBMA jako nośników hydrofobowych chemioterapeutyków [61]. Dzięki stabilnej odpowiedzi temperaturowej i współczynnikowi podziału nanożel PNIPMAAm/PtBMA zapobiega przedwczesnemu uwalnianiu leku i pozwala na jego precyzyjną kontrolę. Ponadto, dzięki wysokiej hydrofobowości PtBMA, została opracowana metoda wytwarzania wzorów białkowych [62]. Poprzez wykorzystanie hydrofobowości PtBMA możliwe było przyłączenie białek do podłoża, dzięki czemu została zachowana lepsza bioaktywność kompleksu biotyna-awidyna. Dodatkowo kopolimery blokowe bazujące na PtBMA zyskały szerokie zastosowanie w koniugatach peptyd-polimer, które posiadają zdolność do samoorganizacji oraz mają dużą aktywność biologiczną [63] czy jako dobrze zdefiniowane amfifilowe kopolimery szczepione o dobrych właściwościach elektrochemicznych i magnetycznych. [64–66]

Jednakże, w przytoczonych pracach, nie zostały przeprowadzone badania w kierunku wpływu stereoregularności PtBMA na jego interakcje z biomolekułami. Z tego względu w ramach badań do przedłożonej pracy doktorskiej zostały przeprowadzone badania nad różnicami w taktyczności polimeru oraz ich wpływem na immobilizację peptydów, białek i adhezję bakterii, które są opisane w rozdziale 3.

2.1.1.3. Polistyren-poliglicydol

Polistyren-poliglicydol (PS-PGL) jest amfifilowym kopolimerem blokowym, który składa się z dwóch bloków: hydrofobowego polistyrenu oraz hydrofilowego poliglicydolu.

Polistyren (PS) jest jednym z najszerzej stosowanych syntetycznych polimerów na świecie. PS jest aromatycznym polimerem z dużą masą molekularną o formule $(C_8H_8)_n$ (Rysunek 2.3.), który jest efektem polimeryzacji monomeru styrenu. [67]



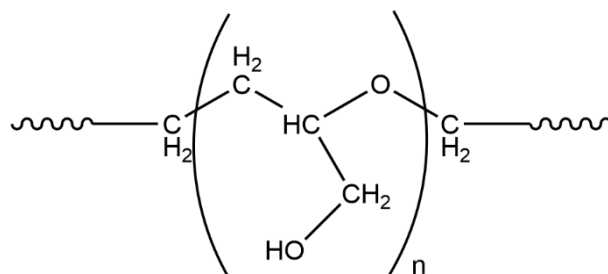
Rysunek 2.3. Schemat struktury polistyrenu.

Początek rozwoju polimerów syntetycznych przypada na lata 30. XIX wieku, kiedy to Bonastre odkrył styren, a Eduard Simon przeprowadził pierwsze udokumentowane obserwacje polimeryzacji otrzymując polistyren. [68] Główne postępy w rozwoju

polimerów zawierających styren nastąpiły wraz z pojawieniem się przetwórstwa tworzyw sztucznych na dużą skalę, do czego w dużej mierze przyczyniła się II wojna światowa. [69] Podobnie jak inne tworzywa sztuczne, polistyren jest szeroko stosowany ze względu na jego dobre właściwości mechaniczne i stosunkowo niski koszt. Jest szeroko stosowany w materiałach budowlanych (jako materiał izolacyjny), czy też w różnorodnych opakowaniach: pojemniki na żywność, jednorazowe naczynia. [67] Dzięki niskim kosztom, doskonałej przejrzystości, stabilności wymiarowej i możliwości dostosowania do sterylizacji radiacyjnej, PS posiada wiele zastosowań medycznych, na które w głównej mierze składa się produkcja sprzętu laboratoryjnego (zestawy do hodowli komórkowej, komponenty diagnostyczne). [69,70]

Poliglicydol (PGL) zwany również pod nazwą poliglicerol jest zaliczany do wysokofunkcyjnych hydrofilowych polimerów. Jest jednym z najbliższych analogów poli(glikolu etylenowego) (PEO), który uważany jest za złoty standard polimerowy w zastosowaniach biologicznych. PGL stał się ważnym polimerem, który łączy w sobie wszystkie wymagania takie jak: biokompatybilność, nietoksyczność, rozpuszczalność w wodzie czy stabilność chemiczna, które muszą spełniać polimery, mające być wykorzystywane w biomedycynie i przemyśle. PGL stanowi interesującą alternatywę dla PEO, zwłaszcza jako składnik materiałów wykorzystywanych w specjalistycznych, często niekonwencjonalnych zastosowaniach takich jak systemy dostarczania leków czy jako składnik kosmetyków przeciwsłonecznych. [71,72]

Struktura chemiczna PGL jest podobna do PEO, z wyjątkiem tego, że zawiera dodatkową grupę metylohydroksylową w każdej powtarzającej się jednostce. Boczne grupy hydroksylowe zapewniają wysoką hydrofilowość całej makrocząsteczki (Rysunek 2.4.). W konsekwencji, powierzchnie ze szczepionym poliglicydołem są superhydrofilowe. [73]

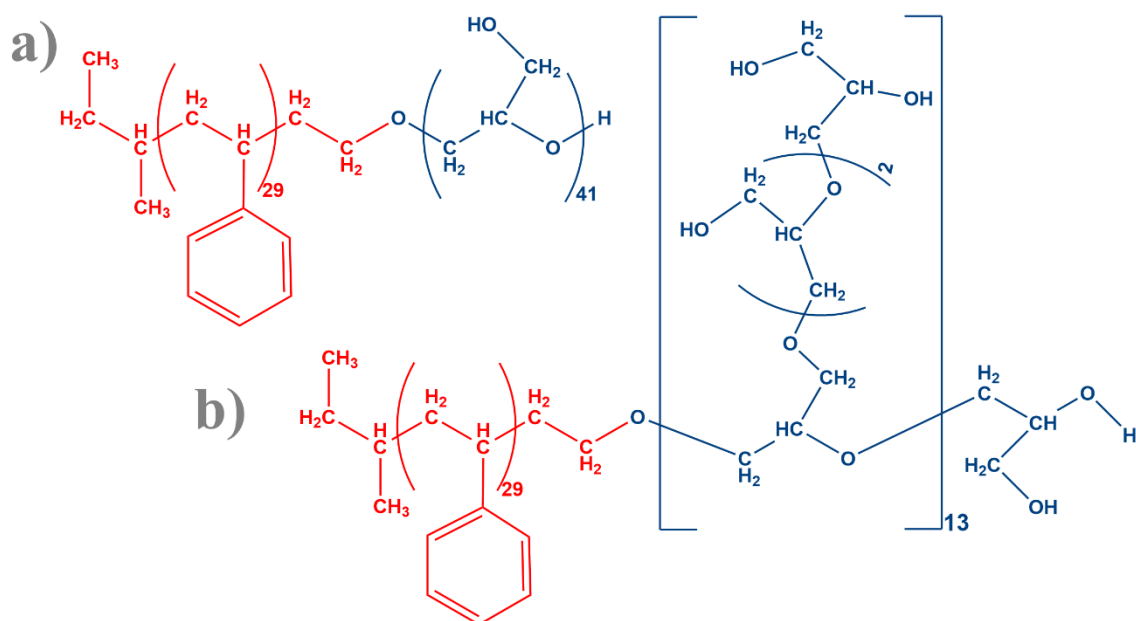


Rysunek 2.4. Struktura poliglicydolu.

Poliglicydol był intensywnie badany przez ostatnie dwie dekady. W literaturze można się spotkać, z określeniami, że poliglicydol jest wysoce mobilny, której to cechy nie traci nawet jeśli jest związany z innymi cząsteczkami. [74] W rezultacie powierzchnie z związanym PGL są odporne na adsorpcję biomolekuł (np. białek). [75] Jedną z zalet PGL jest możliwość syntezy makrocząsteczek o różnej architekturze, takich jak liniowe, dendrymeryczne, rozgałęzione czy inne formy. Liczne badania koncentrują się na wpływie architektury PGL na jego właściwości w wodzie, roztworach wodnych, krwi lub komórkach. [76,77] Uzyskane wyniki dla PGL są bardzo obiecujące, ponieważ zarówno ich formy liniowe, jak i rozgałęzione są biokompatybilne i pod względem biokompatybilności przewyższają PEO. Jednak badania powłok PGL i ich interakcji z biomolekułami są ograniczone, ponieważ PGL jest materiałem rozpuszczalnym w wodzie. Dlatego większość badań koncentruje się na szczepieniu łańcuchów PGL do

płaskich powierzchni. Innym podejściem jest synteza kopolimerów glicydotu, które umożliwiają tworzenie wodoodpornych cienkich warstw pochodnych poliglicydotu. [71,78]

PS-PGL łączący w sobie polistyren i poliglicydot jest jednym z najlepiej przebadanych kopolimerów amfifilowych. Sfunkcjonalizowane kopolimery blokowe mogą być stosowane do unieruchamiania bioaktywnych cząsteczek, czy stosowania struktur micelarnych do ukierunkowanego dostarczania leków. [79] Dzięki swoim unikalnym właściwościom fizycznym i biologicznym, a przez co możliwości kontrolowania ich struktury, wykorzystanie kopolimerów blokowych oferuje ekscytujące możliwości dla nowych biomateriałów o unikalnej funkcjonalności biologicznej. Dlatego też została wykorzystana jedna z zalet PGL, która pozwala na kontrolowanie architektury makrocząsteczek podczas procesów syntezy. [77,80] Umożliwia to na otrzymanie kopolimerów o dwóch różnych architekturach bloku poliglicydotu (Rysunek 2.5.).



Rysunek 2.5. Schemat kopolimerów PS-b-PGL o różnej architekturze: liniowej (a) oraz grzebienia (b). Na czerwono zaznaczony jest blok polistyrenu, a na niebiesko blok poliglicydotu.

Pomimo szeregu opublikowanych badań na temat różnego ułożenia bloków w kopolimerach amfifilowych, brak jest jednoznacznego określenia, jak kopolimery o różnym ułożeniu bloków będą się zachowywać w środowisku wodnym oraz ich struktura wpływa na właściwości cienkich warstw. [81]

Dlatego też badania przedstawione w rozdziale 6 skupiły się na dwóch diblokowych kopolimerach polistyren-b-poliglicydot (Rysunek 2.5.) w których masa cząsteczkowa bloku polistyrenowego i poliglicydotowego była podobna (stopień polimeryzacji (DP) równy 29), ale różniły się one strukturą molekularną segmentu poliglicydotowego: jednym z nich był liniowy PGL (DP dla PGL równe 41), natomiast drugi zawierał PGL o strukturze grzebienia (PS-b-(PGL-g-PGL)) (DP równe 39).

2.1.2. Białka

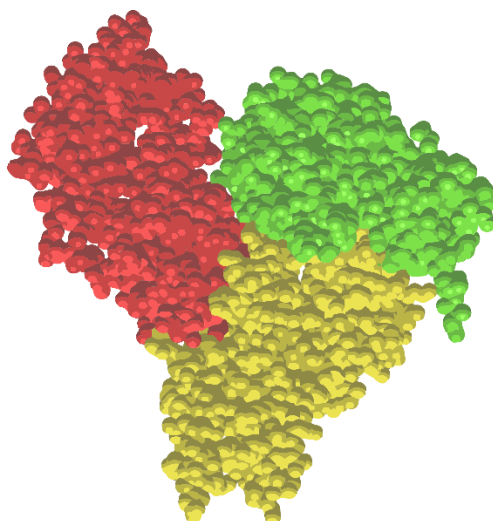
Po doborze odpowiednich polimerów oraz kopolimerów, drugą w kolejności najważniejszą rzeczą był dobór białek do sprawdzenia wpływu właściwości warstw na adsorpcję białek. Jako główne białko została wybrana surowicza albumina wołowa (BSA), która jest powszechnym standardem w badaniach z zakresu immobilizacji białek do powierzchni. Dodatkowo została wykorzystana immunoglobulina typu G (IgG), która pozwoliła na sprawdzenie aktywności zaadsorbowanych białek poprzez przeprowadzenie immunoreakcji. Przeprowadzanie badań z użyciem zarówno surowiczej albuminy wołowej jak i immunoglobuliny G pozwoliło na wstępne ocenienie, czy przygotowana powierzchnia mogłaby mieć zastosowanie przy wytwarzaniu modelowych mikromacierzy białkowych, gdzie IgG jest stosowane jako molekula detekcyjna pozwalająca na wiązanie antygenów, a BSA jako czynnik blokujący niespecyficzne oddziaływania z powierzchnią.

Ponadto został przebadany wpływ stereoregularności warstw polimerowych na adsorpcję zestawu modelowych białek o różnych rozmiarach, kształtach czy punktach izoelektrycznych, do których należały fibrynogen, owalbumina, lizozym czy też streptawidyna. Dzięki zastosowanemu zestawowi białek była możliwa ocena nie tylko adsorpcji białka do powierzchni, ale również możliwe było określenie, czy podczas procesu nie zaszły zmiany w orientacji bądź konformacji zaadsorbowanych białek.

2.1.2.1. Surowicza albumina wołowa

Surowicza albumina wołowa (BSA od ang. *bovine serum albumin*) jest białkiem zaliczającym się do grupy albumin surowiczych, będących jednym z pierwszych opisanych białek w historii (w 1840 roku została przeprowadzona pierwsza dializa albuminy). [82] Surowicza albumina jest jednym z najbardziej ewolucyjnie zmiennych białek, która podczas swojej ewolucji rozwinęła zdolność wiązania nowych grup ligandów, takich jak hormony, metabolity lub toksyny. Chociaż albumina surowicza jest szybko zmieniającym się białkiem, ma dwie cechy, które są niezmiennie nie tylko wśród jej domen, ale także między różnymi gatunkami: zachowana struktura trzeciorzędowa, która jest wysoce helikalna i nie zawiera żadnych fragmentów β -kartki jak i charakterystyczny wzór mostków dwusiarczkowych. [83]

Architektura albumin jest głównie spiralna i składa się z trzech domen o bardzo podobnych konformacjach, które tworzą ogólny kształt przypominający serce (Rysunek 2.6.). Granice domen znajdują się w środku najdłuższych helis (reszty 193 i 382). Każda domena posiada dwie subdomeny: subdomenę A, która zawiera sześć helis i subdomenę B z czterema helisami. [84]



Rysunek 2.6. Schemat struktury surowiczej albuminy wołowej z zaznaczonymi trzema domenami: domeną I (zielona), domeną II (żółta) oraz domeną III (czerwona). Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 4F5S.

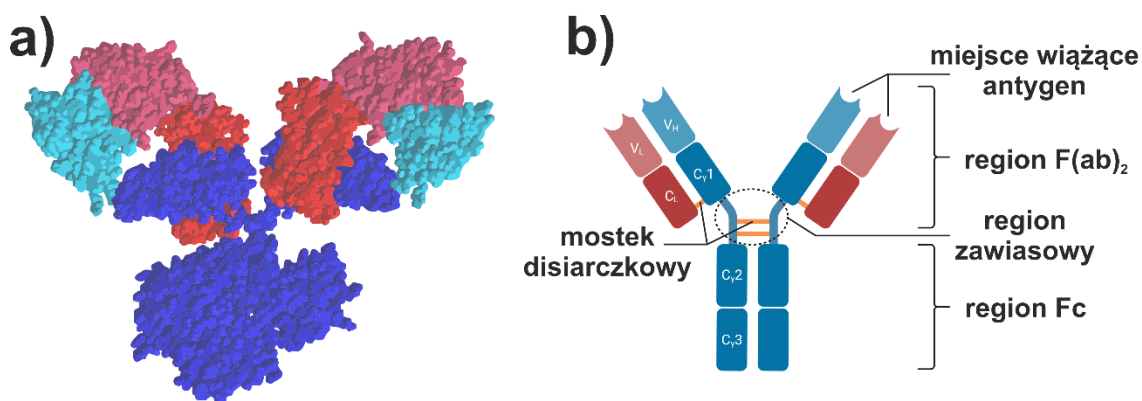
BSA jest jednym z lepiej zbadanych białek. Nosi przydomek „Fracja V” ze względu na numer frakcji, dla której proces oczyszczania albuminy został opracowany przez Edwina Cohna do odzyskiwania albuminy z osocza krwi bydłęcej. [85] Jest relatywnie dużym białkiem o masie molekularnej równej 66,3 kDa oraz wymiarach 9 nm x 5,5 nm x 5,5 nm. [86] Strukturalnie składa się z 583 aminokwasów, usieczonych 17 resztami cysteiny. Cechy strukturalne BSA sprawiają, że jest jednym z najlepszych modeli do zrozumienia podstaw fizykochemicznych oddziaływań polimerowo-białkowych. Molekuła jest stabilna i nie wchodzi w reakcję z wieloma związkami, lecz jednak posiada zdolność do wiązania się z innymi ligandami dzięki zestawowi reszt hydrofobowych na jej powierzchni.

Dzięki swoim zaletom takim jak: niski koszt, duża dostępność, stabilność, rozpuszczalność w wodzie, stosunkowo obojętny charakter czy też strukturalne podobieństwo do ludzkiej albuminy surowiczej (HSA) BSA jest stosowana w wielu biochemicznych reakcjach. [87] Używana jest jako standard w wielu procedurach takich jak przygotowywanie szczepionek czy też jako antygen testowy do sprawdzenia ważności testów. Najszersze zastosowanie znalazła jako modulator przy testach typu ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) jako referencyjny standard białka przy analizie białek Bradforda, gdzie służy do blokowania miejsc wiązań niespecyficznych jak i stabilizuje biomolekuły związane z albuminami. Z tego też powodu BSA jest jednym z najpopularniejszych materiałów stosowanych do blokowania wiązań niespecyficznych na powierzchni biosensorów. [88] Ponadto ze względu na swoją charakterystyczną budowę i posiadanie na swojej powierzchni wolnych łańcuchów bocznych od aminokwasów, które pozwalają na wiązanie leków lub związków bioaktywnych, molekuły BSA stosowane są jako matryca dla nanocząsteczek. Nanocząsteczki BSA mogą przenosić leki hydrofobowe lub peptydowe oraz związki bioaktywne. Wiązanie leków jest odwracalne, dzięki czemu nanocząsteczki BSA mogą być transportowane w organizmie i uwalniać leki w docelowej komórce. Ponadto BSA posiada czas półtrwania w krwi trwający ok. 19 dni, co może poprawić farmakokinetkę leku niesionego przez cząsteczkę. [89]

2.1.2.2. Immunoglobulina G

Immunoglobuliny należą do grupy przeciwciał, które wytwarzane są przez komórki plazmatyczne powstające z limfocytów B. Przeciwciała występują zwykle we krwi obwodowej i zewnętrznych płynach ustrojowych, takich jak ślina czy łzy. Do ich głównej funkcji zalicza się neutralizacja wirusów oraz oznaczanie antygenów lub drobnoustrojów do zniszczenia przez fagocytozę.

Przeciwciała mają charakterystyczną budowę (Rysunek 2.7.), na którą składają się pary łańcuchów lekkich i ciężkich. Mostki dwusiarczkowe łączą między sobą łańcuchy ciężkie jak i przyłączają lekkie łańcuchy do ciężkich. Każdy z łańcuchów zbudowane są z kilku różnych domen, które posiadają stałe (C) lub zmienne (V) sekwencje aminokwasów. Specyficzność aminokwasów określana jest przez połączenie obszarów zmiennych (V), które tworzą trójwymiarową kieszeń, będącą lustrzanym odbiciem antygeny. [90]



Rysunek 2.7. Schemat struktury budowy molekuly immunoglobuliny G z zaznaczonymi ciężkim łańcuchem (niebieskie obszary) oraz lekkim łańcuchem (czerwone obszary). Schemat (a) przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1IGY.

Przeciwciała można podzielić na pięć izotypów (IgM, IgG, IgA, IgD i IgE), które różnią się między sobą strukturą chemiczną ciężkich łańcuchów. Każdy z izotypów posiada różne struktury molekularne, stałe powinowactwa czy pojawiają się w różnym czasie w odpowiedzi immunologicznej, pełniąc inne funkcje. Początkowy kontakt z antygenem wywołuje odpowiedź pierwotną i produkcję przeciwciał klasy IgM. Dalsza stymulacja antygenem może prowadzić do odpowiedzi wtórnej charakteryzującej się produkcją przeciwciał klasy IgG, IgA, IgE lub IgD. [91]

Immunoglobulina G (IgG) jest najczęściej występującym typem przeciwciał – stanowi około 75% całości immunoglobulin w osoczu. Molekuła IgG składa się z dwóch identycznych ciężkich łańcuchów oraz dwóch łańcuchów lekkich połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Łańcuchy lekkie oraz połowa łańcuchów ciężkich tworzy fragment wiążący antygen – nazywany regionem F(ab)₂. Pozostałe łańcuchy ciężkie budują fragment zwany regionem Fc. Region F(ab)₂ odpowiada za wiązanie antygeny, a region Fc za funkcje efektorowe, których zadaniem jest połączenie się z receptorami obecnymi na powierzchniach komórek układu odpornościowego. [92,93]

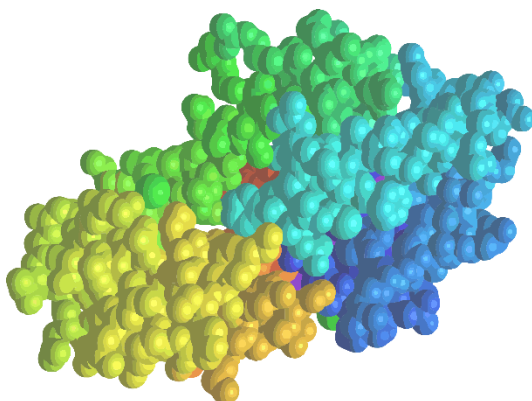
Można wyróżnić cztery podklasy IgG, które są różnicowane na podstawie wielkości fragmentów F(ab)₂ oraz masy cząsteczkowej. IgG1 oraz IgG3 są produkowane w odpowiedzi na białka i wiążą receptory Fc na komórkach fagocytowych jak i aktywują

monocyty. Natomiast produkcja IgG2 oraz IgG4 wywołwana jest przez antygeny węglowodanowe.

Dzięki swoim zdolnościom wiązania się z określonymi antygenami immunoglobulina G znalazła zastosowanie biomedyczne jako testy immunologiczne takie jak wcześniej już wspomniana ELISA lub jest wykorzystywana jako warstwa detekcyjna w biosensorach. Immunoglobulina G jest doskonałym markerem immunochemicznym, który można zastosować w diagnostyce różnych chorób takich jak przewlekłe infekcje, choroby zapalne czy różne nowotwory związane z układem odpornościowym. [94] Jednak testy diagnostyczne oparte na unieruchomionych IgG wymagają takiej orientacji zaadsorbowanych białek, w której miejsca wiążące antygen są dostępne dla antygenów w roztworze. Co więcej, zmiany konformacyjne powodujące utratę aktywności wiązania czy niespecyficzne wiązania antygenów do powierzchni muszą być ograniczone do minimum, aby przygotowany test był jak najbardziej miarodajny. [95]

2.1.2.3. Lizozym

Lizozym (Lys) jest białkiem z grupy hydrolaz glikozydowych, których główną rolą jest rozkładanie disacharydów poprzez hydrolizę wiązań w peptydoglikanach. Lys, zwany również jako muramidaza lub hydrolaza N-acetylmuraminowa, jest stosunkowo małym enzymem wydzielniczym, który katalizuje hydrolizę specyficznych polisacharydów zawartych w ścianach komórkowych bakterii. [96] Lizozym jest polipeptydem posiadającym 129 reszt aminokwasowych (Rysunek 2.8.) o masie cząsteczkowej 14,3 kDa, którego struktura stabilizowana jest poprzez obecność czterech mostków siarczkowych, co zapewnia dużą stabilność termiczną. [97]



Rysunek 2.8. Schemat struktury molekuly lizozymu. Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 253L.

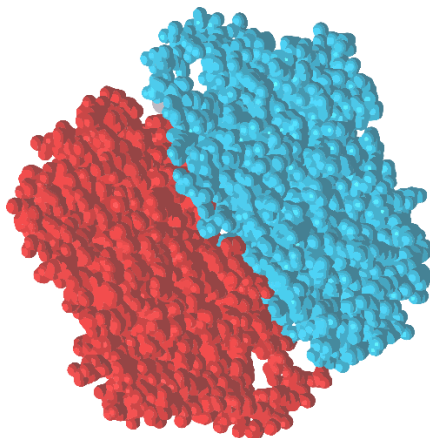
Lizozym jest enzymem wszechobecnym w przyrodzie, występuje w prawie wszystkich wydzielinach, płynach ustrojowych i tkankach organizmów ludzkich i zwierzęcych. Został również wyizolowany z niektórych roślin, bakterii czy też bakteriofagów. Lys wykazuje silny potencjał przeciwbakteryjny, głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, dzięki czemu odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu infekcjom bakteryjnym. Odbywa się to głównie poprzez hydrolizowanie kopolimerów polisacharydowych, które stanowią jednostki strukturalne wielu ścian komórkowych bakterii. [96]

Dzięki swoim właściwościom muramidaza znalazła swoje zastosowanie w przemyśle żywności i farmaceutycznym, ale również w medycynie. Podwyższony poziom lizozymu w moczu czy też w osoczu jest wskaźnikiem pojawienia się chorób takich jak nefropatia,

gruźlica lub białaczka monocytowa. Dlatego też można znaleźć prace, których celem jest stworzenie czujników wykrywających lizozym, co może się przełożyć na możliwość wcześniejszego ostrzegania przed nadchodzącymi infekcjami. [98–100]

2.1.2.4. Owalbumina

Owalbumina (OVA) jest białkiem z rodziny albumin, które stanowi około 75% wszystkich protein w białku jaja ptasich. Zalicza się do glikoprotein, posiadając 386 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 45 kDa. W strukturze OVA (Rysunek 2.9.) połowa reszt aminokwasowych jest hydrofobowa, a jedna trzecia jest naładowana, w większości o charakterze kwasowym, nadając cząsteczce punkt izoelektryczny równy 4,5. [101]

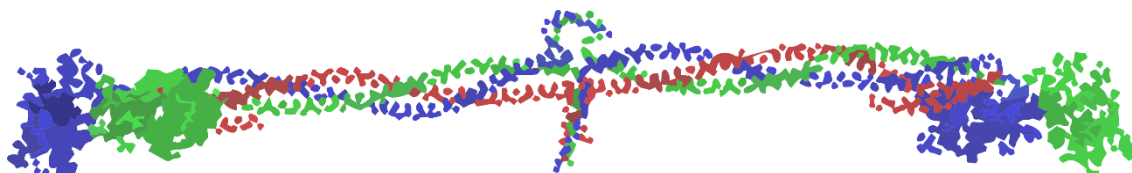


Rysunek 2.9. Schemat struktury molekuly owalbuminy. Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1OVA.

Owalbumina pełni głównie dynamiczną funkcję w rozwijających się komórkach organicznych, poprzez migrowanie do rozwijającego się zarodka zmieniając swoją formę na mniej uporządkowane struktury transportowe. Dodatkowo została sklasyfikowana jako jeden z głównych alergenów w białku jaj. [101] Łatwa dostępność w dużych ilościach doprowadziła do jego szerokiego zastosowania jako standardu w badaniach struktury i właściwości białek oraz w eksperymentalnych modelach alergii. [102] Owalbumina jest stosowana jako niereaktywne nośniki w testach ELISA (dzięki posiadaniu immunologicznie podobnych antygenów co BSA) [103] lub jako matryce do przedłużonego uwalniania leków. [104]

2.1.2.5. Fibrynogen

Fibrynogen (FIB) jest białkiem o masie 340 kDa, które jest syntezowane przez hepatocyty. Składa się z dwóch symetrycznych półmolekuł, z których każda składa się z jednego zestawu trzech różnych łańcuchów polipeptydowych określanych jako α , β i γ , które składają się odpowiednio z 610, 461 i 411 reszt aminokwasowych (Rysunek 2.10.). [105]

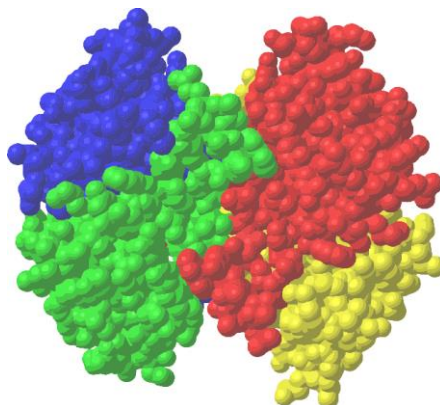


Rysunek 2.10. Schemat struktury molekuly fibrynogenu z zaznaczonymi łańcuchami polipeptydowymi: A (czerwony), B (niebieski) i Y (zielony). Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1EI3.

Fibrynogen odgrywa centralną rolę w wewnętrznych i zewnętrznych kaskadach krzepnięcia, gdyż jest głównym białkowym czynnikiem krzepnięcia osocza. Niskie stężenia fibrynogenu w osoczu są zatem związane ze zwiększonym ryzykiem krwawienia z powodu upośledzonej pierwotnej i wtórnej hemostazy. W związku z pełnioną funkcją białka wykonywane są testy określające poziom fibrynogenu, w celu określenia ryzyka pojawienia się stanów krwotocznych czy też oceny ryzyka chorób wieńcowych. [106,107]

2.1.2.6. Streptawidyna

Streptawidyna (STR) jest białkiem o homotetrametrycznej strukturze (Rysunek 2.11.) o masie 56 kDa, która pochodzi z bakterii *Streptomyces avidinii*. Posiada cztery miejsca wiązania o wysokim powinowactwie, które mogą wiązać wiele biotynylowanych ligandów i powodować agregację celu. Dlatego też streptawidyna i jej pochodne (łącznie określane jako awidyny) są szeroko stosowane w naukach molekularnych ze względu na ich wysoce selektywną i stabilną interakcję z biotyną.



Rysunek 2.11. Schemat struktury molekuly streptawidyny. Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1DF8.

Do popularności układu streptawidyna-biotyna przyczyniają się również inne czynniki, takie jak stabilność białek oraz różne chemiczne i enzymatyczne metody biotynylacji dostępne do stosowania w różnych projektach eksperymentalnych. [108] Chociaż chemiczna biotynylacja jest prosta i powszechnie stosowana, technice tej brakuje selektywności docelowej i stochastycznie modyfikuje szeroki zakres chemicznie podobnych grup. Z drugiej strony, kilka technik chemoenzymatycznych opracowanych w ostatnich latach może wprowadzić selektywną biotynylację białek w hodowanych komórkach i in vivo. Układ streptawidyna-biotyna jest podstawą do większości dostępnych komercyjnie biosensorów [109] czy też jako celowana terapia leków przeciwnowotworowych oraz przy terapii genowej, ponieważ oddziela środek celujący od rzeczywistego leku, aby poprawić indeks terapeutyczny leczenia. [110]

2.2. Techniki badawcze

W ramach przeprowadzonych badań wykorzystano osiem technik badawczych zaliczanych do metod mikroskopowych, spektroskopowych oraz optycznych. Tak dobrany zestaw technik pozwolił na scharakteryzowanie wytworzonych warstw polimerowych poprzez określenie ich topografii, składu chemicznego oraz grubości. Dodatkowo możliwe było określenie przebiegu immobilizacji białek jak i orientacji oraz konformacji molekuł białka już po adsorpcji.

2.2.1. Wytwarzanie cienkich warstw polimerowych

Jednym z kluczowych zagadnień, jeśli chodzi o badania nad cienkimi warstwami polimerowymi jest dobranie odpowiedniej metody ich wytwarzania. W zależności od zakładanych właściwości jakie tworzona warstwa ma posiadać możliwy jest dobór takiej techniki, aby spełniała wszystkie założone wymagania. W przedstawionej pracy zostały wykorzystane trzy metody tworzenia warstw polimerowych.

2.2.1.1. Spin – coating

Metoda spin-coatingu jest jedną z najszerzej stosowanych metod wytwarzania cienkich warstw polimerowych. Jest jednoetapową metodą pozwalającą na otrzymanie jednorodnych warstw, polegającą na nakładaniu roztworu polimeru na obracający się podkład. Cały proces spin-coatingu można podzielić na trzy etapy: [111,112]

- Osadzanie roztworu
Na przygotowane podłoże наносzona jest kropla roztworu w taki sposób, aby pokryła całą powierzchnię. Roztwór polimeru jest przygotowywany z rozpuszczalnika, w którym dobrze się rozpuszcza.
- Powlekanie
W kolejnym etapie podłoże wprowadzane jest w ruch obrotowy i przyspiesza do zadanej wcześniej prędkości kątowej, która mieści się w zakresie kilku tysięcy obrotów na minutę. W pierwszych sekundach roztwór rozprzestrzenia się pokrywając powierzchnię z jednoczesnym zrzuceniem 90% wyjściowego roztworu. Dla pozostałego roztworu opór ścinający równoważy przyspieszenie obrotowe, co pozwala na otrzymanie jednorodnej warstwy na podłożu. Gdy osiągnięta zostanie założona wcześniej prędkość wirowania utrzymuje się ona przez określony czas (najczęściej 30-60 sekund) podczas którego siły lepkości roztworu dominują, powodując zmniejszanie się grubości warstwy.
- Odparowanie
Kiedy grubość warstwy osiąga punkt, w którym efekty lepkości dają tylko niewielki przepływ roztworu, zaczyna się końcowy etap w którym dominuje odparowanie rozpuszczalnika. Gdy rozpuszczalnik zostanie usunięty, otrzymywana jest cienka warstwa polimeru na podłożu.

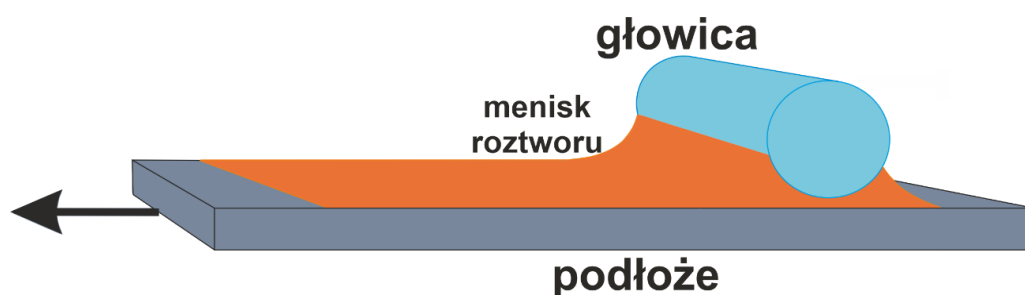
Technika spin-coatingu jest prostą, wydajną czasowo, wysoce powtarzalną i opłacalną metodą tworzenia cienkich warstw polimerowych. Niestety ze względu na swoją zasadę działania jest również metodą nieekonomiczną (większość roztworu jest tracona) jak

i posiada swoje ograniczenia, jeśli chodzi o możliwość zastosowania różnej wielkości podłoża czy też precyzyjną kontrolę grubości otrzymanej warstwy.

Podczas badań technika ta została zastosowana do wytworzenia cienkich warstw polimerów PMMA i PtBMA; mieszanin polimerowych; i kopolimerów PS-PGL.

2.2.1.2. Horizontal dipping

Technika horizontal dippingu (h-dip) jest metodą zaliczaną do technik tworzenia warstwy przy pomocy przesuwanego menisku (z ang. *meniscus-guided coating*). W tej technice roztwór polimeru jest umieszczany między podłożem a elementem prowadzącym (tak zwana głowica), pomiędzy którym wytwarza się menisk. [113] Menisk roztworu jest granicą rozdziału faz ciecz-powietrze, która łączy głowicę powlekającą z podłożem. Następnie elementy te przemieszczają się względem siebie, rozpraszając roztwór po podłożu, który odparowując tworzy tym samym warstwę polimeru. Schemat ilustrujący metodę działania przedstawiony jest na Rysunku 2.12.



Rysunek 2.12. Schemat powstawania warstw polimerowych z zastosowaniem metody horizontal dippingu.

Cały proces tworzenia warstw za pomocą metody h-dip można podzielić na cztery etapy: [114]

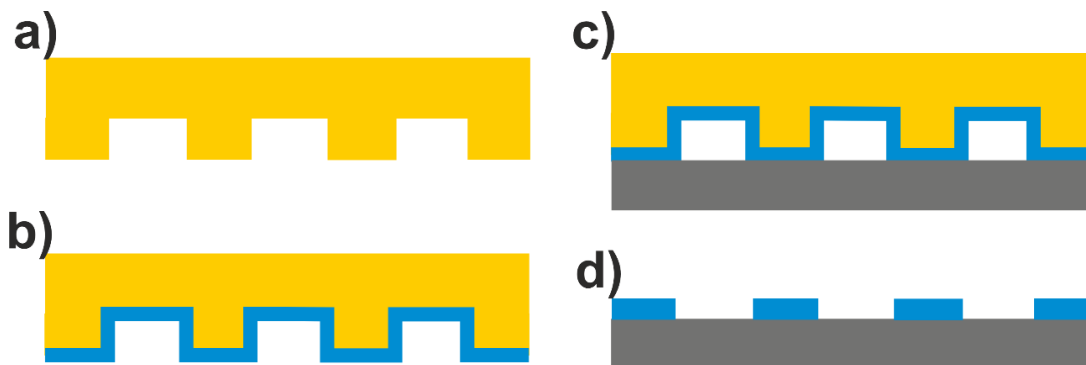
- Podłoże jest przymocowywane do ruchomej platformy, a głowica jest montowana nad podłożem w dobrze zdefiniowanej odległości.
- Roztwór jest wprowadzany do pustej przestrzeni między głowicą a podłożem poprzez działanie kapilarne, tak aby na podłożu utworzył się jednolity menisk roztworu z napięciem powierzchniowym, które przyciągają roztwór do głowicy;
- Podłoże jest transportowane poziomo z określoną prędkością przy jednoczesnym zachowaniu kształtu menisku. Cienka warstwa roztworu jest rozpraszana równomiernie na podłożu;
- Tak jak w przypadku spin-coatingu ostatnim etapem jest proces odparowywania rozpuszczalnika. W efekcie otrzymywane jest podłoże pokryte jednorodną warstwą polimerową o grubości, która jest kontrolowana przez prędkość przesuwu jak i odległość podłoże-głowica.

Zastosowanie techniki horizontal dippingu pozwala na kontrolę grubości warstw oraz daje możliwość wprowadzenia modyfikacji metody. Poprzez wykorzystanie przewodzącego podłoża oraz głowicy pokrytej warstwą złota możliwe jest zastosowanie zewnętrznego pola elektrycznego podczas tworzenia warstwy, co wpływa na zmiany w morfologii tworzonej warstwy. [115] Dodatkową przewagą h-dip są mniejsze straty w roztworze (rzędu 10%) czy też brak ograniczeń w wymiarze stosowanego podłoża. Podczas badań technika horizontal dippingu została wykorzystana do wytworzenia cienkich warstw mieszanin PMMA+PtBMA.

2.2.1.3. Druk mikrokontaktowy

Technika druku mikrokontaktowego jest techniką zaliczaną do technik miękkiej litografii, które opierają się na drukowaniu i formowaniu wzorów na podłożu za pomocą elastomerowych stempli z wcześniej zaprojektowanymi wzorami. Jako technika wytwarzania mikrostruktur do zastosowań biologicznych, miękka litografia przewyższa wiele niedociągnięć standardowej fotolitografii. W szczególności, oferuje możliwość kontrolowania struktury molekularnej powierzchni oraz wytwarzania struktur kanałów odpowiednich dla mikroprzepływów oraz modelowania i manipulowania osadzonymi komórkami. [116]

Druk mikrokontaktowy jest metodą nanoszenia materiałów w postaci wzorów na powierzchnię za pomocą stempla z poli(dimemetylosilanu) (PDMS). Cała procedura jest przedstawiona na Rysunku 2.13. i składa się z kilku etapów. Na przygotowany stempel (a) nanoszona jest warstwa roztworu substancji, która ma zostać wydrukowana. Po kilku sekundach, gdy rozpuszczalnik odparowuje, „tusze” zostaje na strukturze reliefowej (najwyższych partiach pieczętki) (b). Następnie stempel jest przenoszony do bezpośredniego kontaktu z podłożem na okres od 30 sekund do kilku minut (c). Po usunięciu stempla z powierzchni pozostaje wzór, który jest zdefiniowany przez wypukłą strukturę pieczętki (d). Metoda druku mikrokontaktowego jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych technik miękkiej litografii dzięki swojej wygodzie i łatwości użytkowania jak i możliwości drukowania na dużych powierzchniach. [117]



Rysunek 2.13. Schemat procesu druku mikrokontaktowego.

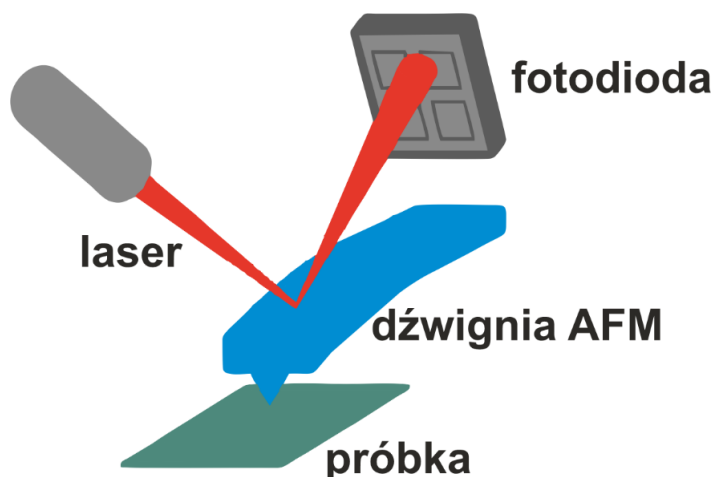
W pracy w rozdziale 5 technika druku mikrokontaktowego została wykorzystana do otrzymania regularnych wzorów polimerowych. Jako „tusze” został wykorzystany roztwór APTES, który pozwolił na lokalne zmodyfikowanie powierzchni podłoża krzemowego i otrzymanie regularnej separacji fazowej mieszaniny iso-PMMA + at-PtBMA.

2.2.2. Mikroskopia sił atomowych

Mikroskopia sił atomowych (AFM od ang. Atomic Force Microscopy) jest techniką zaliczaną do metod skaningowej mikroskopii, które opierają się na rejestrowaniu interakcji między badaną próbką a ostrzem przesuwającym się po jej powierzchni. AFM jest niedestruktywną techniką, wykorzystywaną do analizy powierzchni, która dostarcza informacji o topografii jak i właściwościach mechanicznych badanej próbki.

Schemat działania mikroskopii sił atomowych przedstawiony jest na Rysunku 2.14. Badana próbka jest montowana na stoliku piezoelektrycznym, a następnie jest do niej

zbliżana dźwignia z ostrzem na końcu, aby mogła zajść interakcja ostrze-próbka. Zbierane informacje na temat zmian położenia dźwigni odpowiadają zmianom sił między ostrzem, a próbką. Otrzymywane informacje są czytywane przez diodę kwadrantową, która wykrywa sygnał z wiązki lasera odbitego od dźwigni. [118] Zmiany w sile między atomami na ostrzu, a atomami na powierzchni próbki powodują uginanie się dźwigni, co pozwala na zebranie informacji o topografii badanej powierzchni.



Rysunek 2.14. Schemat działania mikroskopii sił atomowych.

AFM może pracować w różnych trybach, które różnią się między sobą odległością i naturą interakcji ostrze – powierzchnia. [119] Wybór jednego z trzech trybów zależy od informacji, którą chce się uzyskać oraz od badanego materiału czy oczekiwanego obrazu AFM:

- Tryb kontaktowy
Tak jak sama nazwa sugeruje w tym trybie ostrze jest w stałej interakcji z próbką. Działają wtedy głównie siły odpychające ostrze – próbka, gdyż ostrze podąża cały czas po nierównościach próbki. Zaletą tego trybu jest szybkość, prostota pomiaru czy możliwość jednoczesnego pomiaru innych parametrów (np. tarcia). Do wad należy zaliczyć możliwość zniszczenia powierzchni delikatnych próbek oraz stosunkowo szybkie zużycie powierzchni ostrza (zwłaszcza jego ostrej końcówki).
- Tryb bezkontaktowy
W tym trybie dźwignia oscyluje z swoją naturalną częstotliwością rezonansową oraz niską amplitudą w pewnej odległości od próbki. Kiedy dźwignia zbliża się do powierzchni siły przyciągające i odpychające modyfikują częstotliwość rezonansową dźwigni. Poprzez kontrolowanie częstotliwości możliwa jest manipulacja odległości ostrze – powierzchnia, co pozwala na mapowanie powierzchni. Główną zaletą trybu bezkontaktowego jest nie destruktywność próbki jak i ostrza, co jednocześnie obniża rozdzielczość przestrzenną otrzymywanego obrazu.
- Tryb przerywanego kontaktu
W ramach poprawy rozdzielczości trybu bezkontaktowego został opracowany trzeci tryb – przerywanego kontaktu. Działa na tej samej zasadzie co poprzedni tryb, jednak z większą amplitudą oscylacji, co powoduje, że w każdym cyklu

ostrze przekracza obszar przyciągania, uderzając w próbkę. Przy standardowych częstotliwościach tego trybu (zakres 100-300 kHz) ostrze ma kontakt z próbką w bardzo krótkich odstępach czasowych. Zaletą wyboru tego trybu jest małe zużycie ostrza oraz większa dowolność mierzonych próbek. Z drugiej strony wywierana na podłoże siła (mniejsza niż w trybie kontaktowym) jest trudniejsza do kontrolowania.

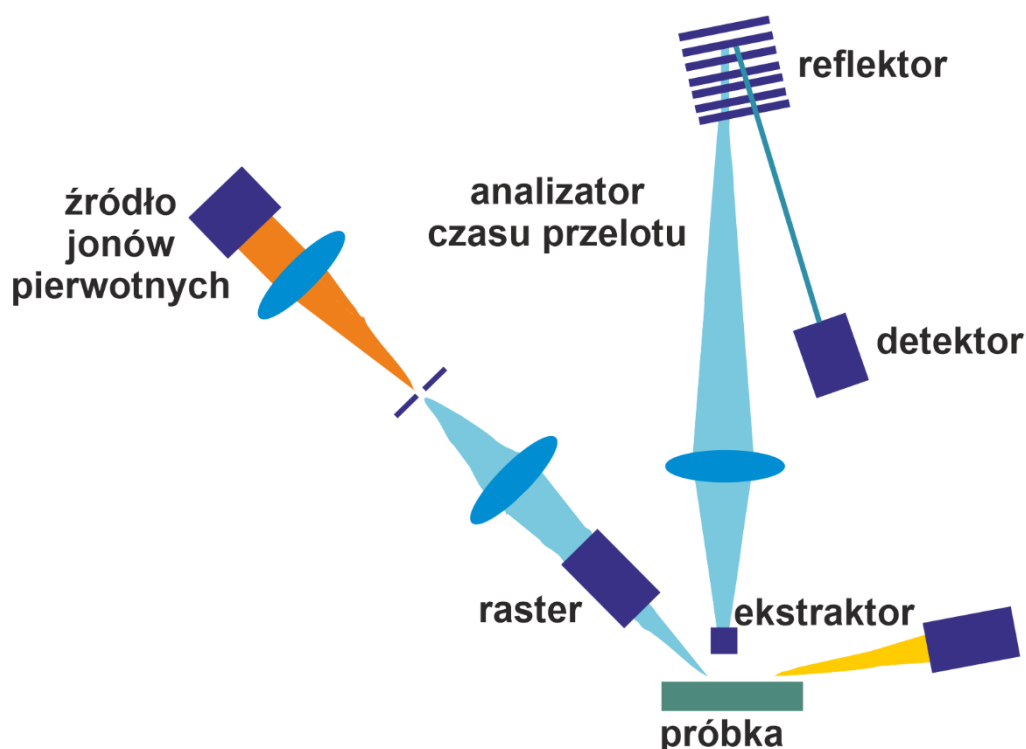
Mikroskopia sił atomowych jest szeroko stosowaną techniką zarówno w badaniach materiałowych do obrazowania struktur w nanoskali [119], jak również dzięki możliwości pomiarów w cieczy znalazła swoje zastosowanie w badaniach biologicznych. [120]

Podczas badań prowadzonych w czasie gromadzenia materiału do rozprawy, technika AFM została wykorzystana w celu scharakteryzowania topografii wytworzonych cienkich warstw polimerowych jak i oceny wpływu czynników zewnętrznych (takich jak adsorpcja białek czy immersja w wodzie) na zmiany w topografii podłoża.

2.2.3. Spektrometria masowa jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu

Spektrometria masowa jonów wtórnych SIMS (z ang. *Secondary Ion Mass Spectrometry*) jest spektroskopową techniką badania powierzchni, która umożliwia bardzo szczegółową analizę chemiczną powierzchni badanej próbki.

Technika SIMS opiera się na identyfikacji jonów wtórnych emitowanych z badanej powierzchni po procesie bombardowania przez energetyczne jony pierwotne. Jako jony pierwotne najczęściej stosowane są jony metali takich jak bizmut, cez czy gal jak również można się spotkać z wykorzystaniem klastrow. Schemat budowy aparatury przedstawiony jest na Rysunku 2.15. Podczas pomiaru krótkie impulsy silnie skupionej wiązki jonów pierwotnych uderzają w powierzchnię próbki indukując kaskadę zderzeń, w wyniku czego powierzchnia próbki jest rozpylana z niewielką frakcją emitowanych zjonizowanych cząstek, tj. jonów wtórnych. Jonami wtórnymi, które mogą być dodatnio lub ujemnie naładowane, nazywane są fragmenty cząsteczek lub w nielicznych przypadkach całe cząsteczki, tworzące próbkę bądź zaadsorbowane na jej powierzchni. Emitowane jony są następnie przyspieszane i trafiają do analizatora masowego. [121] Dzięki zastosowaniu **analizatora czasu przelotu (ToF z ang. *Time-of-Flight*)** możliwe jest rozdzielanie jonów wykorzystując fakt, że czas dotarcia do detektora zależy od stosunku masy do ładunku (m/z) – im większa masa jonów tym dłuższy czas przelotu.



Rysunek 2.15. Schematyczna ilustracja przedstawiająca aparaturę ToF-SIMS.

Pomiary ToF-SIMS mogą być realizowane w dwóch zasadniczo różnych trybach: [122]

- Tryb statyczny
Podczas pomiarów gęstość dawki jonów pierwotnych utrzymywana jest poniżej tak zwanego „statycznego limitu” ($<10^{12}$ jonów/cm²), dzięki czemu jony wtórne pochodzą wyłącznie z nienaruszonych obszarów badanej próbki. Powoduje to też, że statyczny SIMS jest wysoce czułą techniką, która zbiera informacje tylko z najbardziej zewnętrznej warstwy powierzchni (około 1-2 nm warstwy)
- Tryb dynamiczny
W ramach tego trybu próbka jest degradowana w wyniku wysokiej gęstości jonów pierwotnych. Pozwala to na otrzymanie informacji na temat rozkładu pierwiastków w głębszych rejonach próbki czy też możliwe jest przeprowadzenie profilowania głębokościowego warstw.

Otrzymywane dane podczas pomiarów składają się z zestawu widm masowych zebrane dla poszczególnych pikseli, których położenie jest określane przez wiązkę skanującą powierzchnię próbki. Zmierzone widma jonów dodatnich lub ujemnych (w zależności od napięcia na ekstraktorze) można podzielić na trzy obszary: w niskim zakresie mas (do 300 u) wykrywane są jony składające się z grup końcowych, jednostek powtarzalnych czy łańcuchów bocznych; w średnim zakresie mas (300 – 2000 u) wykrywane są zazwyczaj jony składające się z wielu powtarzających się jednostek z lub bez utraty grup funkcyjnych; w wysokim zakresie mas (do 10000 u) można zaobserwować nienaruszone jony oligomeryczne. [123]

Analiza widm ToF-SIMS może zostać przeprowadzona na dwa sposoby: bazując tylko na pojedynczych, charakterystycznych sygnałach (analiza pojedynczych pików) lub przeprowadzając statystyczną analizę całego widma lub zestawu wybranych pików.

W analizie pojedynczych pików otrzymane sygnały porównywane są do dostępnych baz referencyjnych, dzięki czemu możliwe jest określenie składu badanej próbki. Niestety analiza pików może być utrudniona i obarczona marginesem błędu ze względu na możliwe występowanie zanieczyszczeń na powierzchni czy też złożoną strukturę analizowanej warstwy. [124] Dlatego też częściej stosowaną metodą analizy ToF-SIMS jest analiza dla całego widma lub zestawu sygnałów wybranych z wielu widm. Do analizy przygotowanych zestawów danych używane są metody analizy wielowymiarowej, które znacznie ułatwiają pracę z ogromną ilością danych generowanych podczas pomiarów. Jedną z najczęściej stosowanych metod jest **analiza głównych składowych (PCA)** z ang. *Principal Component Analysis*). PCA jest wielowymiarową techniką pozwalającą na zmniejszenie macierzy danych do ich możliwie najmniejszego wymiaru poprzez znalezienie nowej bazy (nowych czynników). [125] Celem PCA jest wyodrębnienie kilku pierwszych czynników zwanych „głównymi składowymi”, które wychwytyują największą wariancję w wielowymiarowym zbiorze danych, a tym samym zredukowanie liczby zmiennych opisujących układ. Znalezione główne składowe tworzą nowy ortogonalny układ współrzędnych, gdzie kolejna główna składowa opisuje coraz niższy procent wariancji, a tym samym pozwala na zmniejszenie wymiaru danych bez strat w zawartych w nich informacjach. Wynikiem analizy PCA są wykres współrzędnych obserwacji (*scores*), który jest rezultatem opisu wyjściowych danych przez nowe współrzędne oraz wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów tak zwanych ładunków (*loadings*), który określa relacje pomiędzy nowymi osiami, a oryginalnymi zmiennymi (którymi są intensywności wybranych sygnałów). Dzięki zastosowaniu analizy PCA do widm ToF-SIMS możliwe jest określenie, które zmienne odpowiadają za różnice w punktach pomiarowych, co umożliwia znacznie lepsze zrozumienie uzyskanych wyników. [126]

Dzięki dużej czułości jak i specyficzności w połączeniu z wysoką rozdzielczością masową, przestrzenną oraz głębokościową metoda ToF-SIMS stała się jedną z najchętniej wykorzystywanych technik do analiz materiałowych w tym także biologicznych.

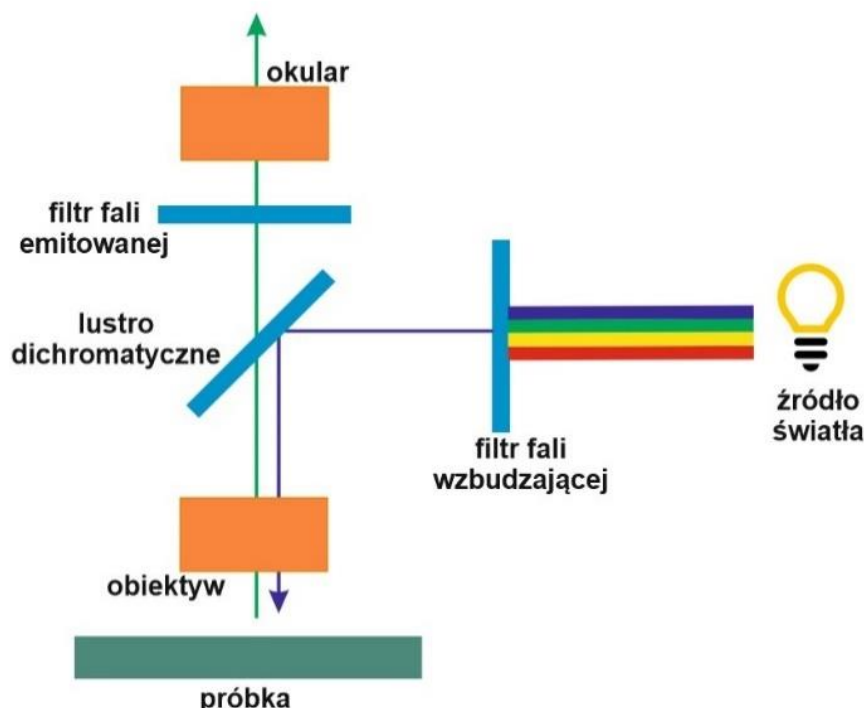
W ramach pracy doktorskiej metoda ToF-SIMS została wykorzystana do pomiarów cienkich warstw polimerowych oraz warstw z zaadsorbowanymi białkami lub peptydami. Dzięki pomiarom warstw polimerowych możliwe było ustalenie różnic w orientacji grup bocznych do powierzchni wynikających z taktyczności polimerów. Natomiast pomiary warstw z zaadsorbowanymi biomolekułami umożliwiły określenie, czy struktura warstwy polimerowej wpływa na zmiany w orientacji adsorbowanych białek jak i na zmiany konformacyjne spowodowane adsorpcją.

2.2.4. Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna

Mikroskopia optyczna, a zwłaszcza jej wariant fluorescencyjny jest jedną z podstawowych technik w badaniach z zakresu biologii czy biomedycyny.

Mikroskop fluorescencyjny jest typem mikroskopu optycznego, który został wyposażony w dodatkowe filtry pozwalające na obserwację światła fluorescencyjnego emitowanego przez badaną próbkę. [127] Podstawą tej metody jest napromieniowanie próbki określoną długością fali (wybraną przez zastosowanie odpowiedniego filtra dla określonej fali wzbudzającej), która zostaje zaabsorbowana przez próbkę, a następnie zbierane jest światło fluorescencyjne emitowane przez próbkę. Emitowane światło posiada niższą

energię niż światło wzbudzające, dlatego przez zastosowanie dodatkowego filtra (wycinającego długość fali światła wzbudzającego) możliwe jest rozdzielenie obu wiązek światła. Światło emitowane przechodzi przez filtry i trafia do okularu, dzięki czemu możliwe jest obserwowanie fluorescencji próbki. [128] Schemat całego procesu przedstawiony jest na Rysunku 2.16.



Rysunek 2.16. Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego.

Jedną z metod analizy otrzymanych obrazów fluorescencyjnych jak i optycznych jest użycie **podejścia geometrii całkowitej**. Wykorzystanie tego podejścia pozwala na opisanie struktur widocznych na obrazach fluorescencyjnych lub porównanie intensywności fluorescencji dla różnych obrazów, dzięki czemu możliwe jest ich porównanie ilościowe. Zebrane obrazy fluorescencyjne zostają konwertowane na obrazy w skali szarości, gdzie natężenie fluorescencji danego obszaru jest zapisane w postaci skali szarości. Dzięki wybraniu specyficznego poziomu odcięcia q obraz w skali szarości można przekształcić do postaci czarno-białej mapy, gdzie natężeniom niższym niż q odpowiada kolor czarny, a natężeniom większym niż q odpowiada kolor biały. [129] W rezultacie tworzony jest obraz binarny (czarno-biały), a cechy powierzchni można w pełni scharakteryzować za pomocą trzech miar morfologicznych (współczynników Minkowskiego), odzwierciedlających frakcję pokrycia przez obszary białe (**F**), długość granic między czarnymi, a białymi obszarami (**U**) oraz parametr Eulera (**χ_E**), który określa liczbę spójnych białych obszarów (liczba jednorodnych obszarów białych minus liczba jednorodnych obszarów czarnych). [130] Dzięki zastosowaniu miar Minkowskiego możliwa jest również ilościowa analiza porównawcza otrzymanych obrazów, a w szczególności określenie względnej adsorpcji białek ze znacznikami fluorescencyjnymi do warstw polimerowych.

W ramach badań, które wchodziły w skład rozprawy doktorskiej, mikroskopia fluorescencyjna została wykorzystana do określenia adsorpcji białek do przygotowanych warstw polimerowych. Dodatkowo została wykorzystana analiza miar Minkowskiego pozwalająca na ilościową analizę porównawczą ilości zaadsorbowanego białka czy w przypadku wzorów polimerowych, na porównanie struktur otrzymanych różnymi sposobami.

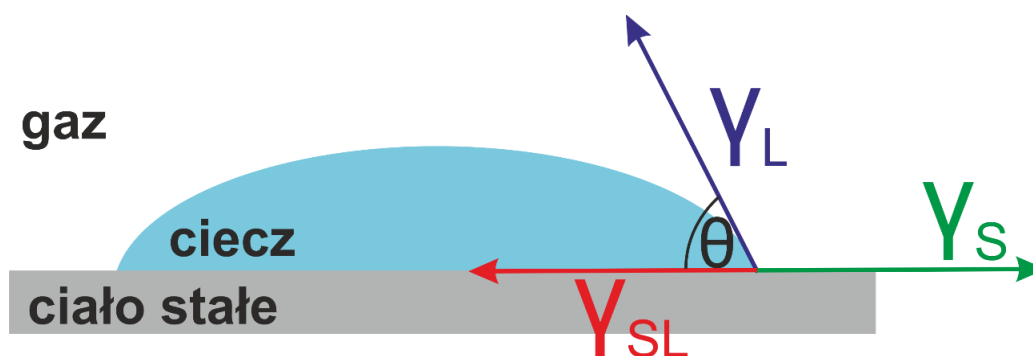
2.2.5. Pomiar kąta zwilżania

Pomiar kąta zwilżania jest jedną z metod charakteryzowania powierzchni, w szczególności jej zwilżalności. Kątem zwilżania (θ) nazywany jest kąt, który tworzy się na przecięciu powierzchni styku ciecz-ciało stałe oraz powierzchni przylegania ciecz-gaz (w tak zwanym punkcie potrójnym). Najpopularniejszym wariantem tej metody pomiarów jest statyczny pomiar kąta zwilżania mierzony dla kropli cieczy pomiarowej (najczęściej wody) osadzonej na badanej powierzchni.

Dzięki pomiarom kąta zwilżania możliwe jest określenie charakteru powierzchni (hydrofilowość lub hydrofobowość) oraz wyznaczenie wartości swobodnej energii powierzchniowej (SFE z ang. *Surface Free Energy*) badanej powierzchni. SFE opisuje stan równowagi atomów w warstwie powierzchniowej materiałów, a tak naprawdę odzwierciedla stan nierównowagi w oddziaływaniach międzycząsteczkowych obecnych na granicy faz dwóch ośrodków. [131] Jest miarą charakterystyczną dla każdej substancji dlatego też jest stosowana jako miara właściwości adhezyjnych danego podłoża. Aby móc wyliczyć swobodną energię powierzchniową ciała stałego z użyciem pomiarów kątów zwilżania wykorzystywane jest zmodyfikowane równanie Younga, opisujące bilans energii w punkcie potrójnym:

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cos(\theta) \quad (2.1)$$

gdzie, γ_s oznacza SFE dla ciała stałego, γ_{sl} energię międzyfazową na granicy podłoże/ciecz, γ_l SFE dla wykorzystywanej cieczy, a θ zmierzony kąt zwilżania. Rysunek 2.17. ukazuje rozłożenie napięć powierzchniowych dla mierzonej kropli.



Rysunek 2.17. Schematyczne rozłożenie swobodnej energii powierzchniowej dla formującej się kropli.

Aby wyliczyć swobodną energię powierzchniową dla badanego materiału, możliwe jest wykorzystanie różnych podejść analitycznych. Najpopularniejszym jest podejście zwane metodą Kaelble-Owens-Wendt, które polega na wyznaczeniu składowej dyspersyjnej i polarnej swobodnej energii powierzchniowej. [132] W tym podejściu zakładamy, że

całkowita SFE jest sumą części polarnej i dyspersyjnej, a równanie to opisujące wygląda następująco:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (2.2)$$

gdzie, γ_s^d jest częścią dyspersyjną SFE ciała stałego, a γ_s^p częścią polarną SFE ciała stałego. Aby móc wyliczyć obie części SFE mierzone są kąty zwilżania dla dwóch cieczy: jednej która jest polarna i druga która jest niepolarna bądź bipolarna, dla których obie części SFE są znane. [133] Dlatego też możliwe jest wyliczenie części dyspersyjnej i polarnej dla badanego materiału:

$$\gamma_s^d = \left[\frac{\gamma_A(\cos \theta_A + 1) - \sqrt{\left(\frac{\gamma_A^p}{\gamma_B^p}\right) \gamma_B(\cos \theta_B + 1)}}{2\sqrt{\gamma_A^d - (\gamma_A^p \gamma_B^p)}} \right]^2 \quad (2.3)$$

$$\gamma_s^p = \left[\frac{\gamma_B(\cos \theta_B + 1) - 2\sqrt{\gamma_A^d \gamma_A^p}}{2\sqrt{\gamma_B^p}} \right]^2 \quad (2.4)$$

gdzie γ_A jest SFE polarnej cieczy, a γ_A^d i γ_A^p jej dyspersyjną i polarną częścią; γ_B jest SFE niepolarnej cieczy, a γ_B^d i γ_B^p jej dyspersyjną i polarną częścią oraz θ_A i θ_B są zmierzonymi kątami zwilżania odpowiednio dla polarnej i niepolarnej cieczy.

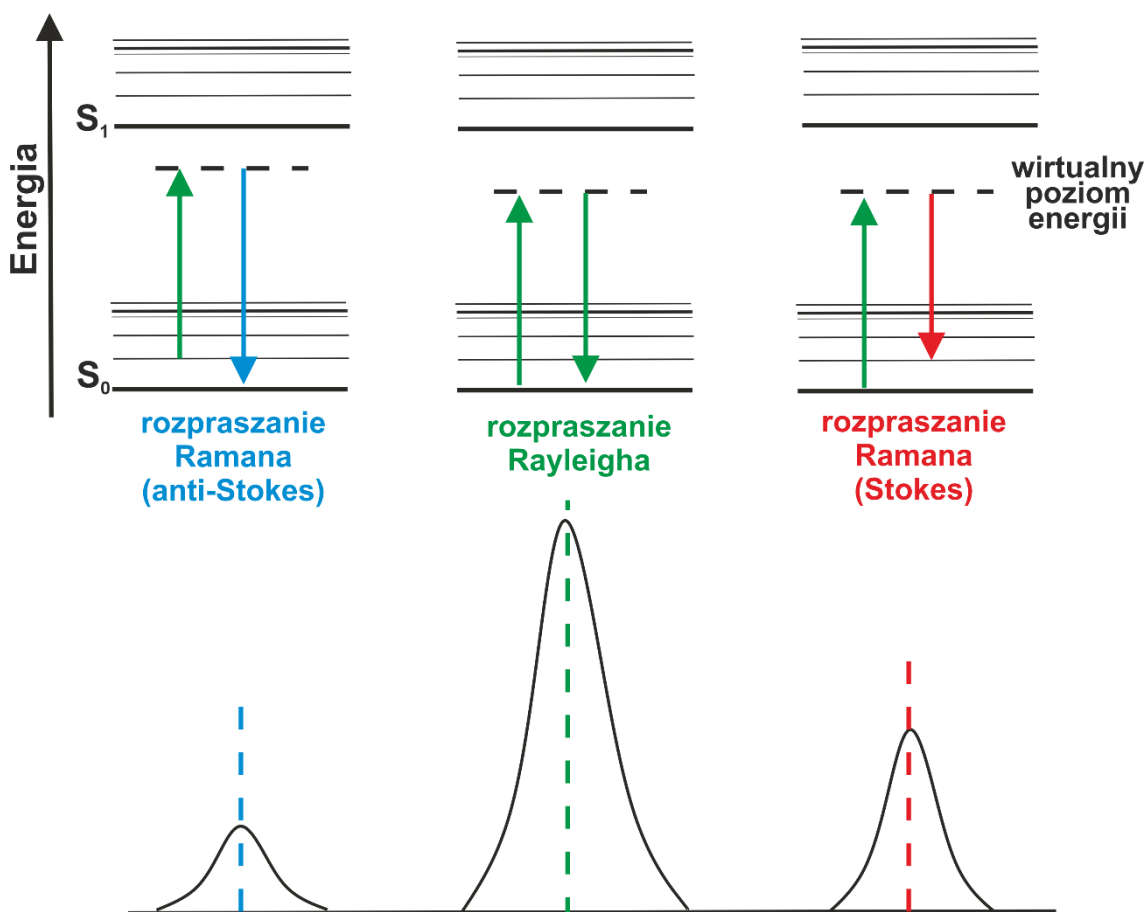
Podczas badań do rozprawy doktorskiej zostały zmierzone kąty zwilżania dla cienkich warstw polimerowych o różnej taktyczności w celu wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych. Dodatkowo dla warstw kopolimerów zostały zmierzone kąty zwilżania w ramach sprawdzenia zmian właściwości powierzchni po każdym etapie modyfikacji.

2.2.6. Spektroskopia Ramana

Spektroskopia Ramana jest techniką wykorzystywaną do analizy próbek ze szczególnym naciskiem na strukturę chemiczną czy też identyfikację substancji na podstawie ich charakterystycznych widm (tzw. fingerprints).

Technika ta opiera się na rozpraszaniu Ramana. Padające światło (najczęściej jego źródłem jest laser o znanej długości fali) oddziałuje z pojedynczymi molekułami zniekształcając chmurę elektronów wokół jądra, co powoduje tworzenie bardzo krótkotrwałego "kompleksu". Powstaje w ten sposób wysokoenergetyczna forma molekuly o innej geometrii elektronów, ale bez większych ruchów jąder atomowych. Powstały "kompleks" nazywany często "wirtualnym stanem cząsteczki" jest niestabilny, a światło jest natychmiast uwalniane w postaci promieniowania rozproszonego. Ponieważ "kompleks" ma inną geometrię elektronową niż podstawowa molekula, żaden ze stanów elektronowych cząsteczki nie będzie opisywał układu elektronów, a rzeczywisty kształt zniekształconego układu elektronów będzie zależał od tego, ile energii zostanie przekazane do molekuly, czyli będzie zależał od częstotliwości użytego lasera. Dlatego też wykorzystany laser będzie definiował energię stanu wirtualnego jak

i zakres jego zniekształcenia. [134] W spektroskopii wibracyjnej (do której należy spektroskopia Ramana) wykrywane są zmiany energii rozpraszanych fotonów. Jeśli fotony są rozpraszane w sposób elastyczny występuje wtedy rozpraszanie Rayleigha, które jest procesem dominującym w całym układzie. Jednak w nielicznych przypadkach (jeden na 10^6 - 10^8 fotonów) podczas procesu rozpraszania jest indukowany ruch jądra, co powoduje że energia zostaje przekazana albo z padającego fotonu do cząsteczki, albo z cząsteczki do rozproszonego fotonu. Ten proces nazywany jest promieniowaniem nieelastycznie rozproszonym lub rozpraszaniem Ramana. Na Rysunku 2.18. przedstawiony jest diagram rozpraszania Rayleigha oraz Ramana. [135]



Rysunek 2.18. Diagram Jabłońskiego przedstawiający rozpraszanie Ramana i Rayleigha w kategoriach przejść między stanami energetycznymi cząsteczki i opowiadającymi im widmami Ramana.

W temperaturze pokojowej większość cząsteczek, ale nie wszystkie, znajduje się na poziomie wibracyjnym o najniższej energii. Ponieważ stany wirtualne nie są rzeczywistymi stanami cząsteczki, lecz tworzą się podczas oddziaływania lasera z elektronami, co powoduje polaryzację, energię tych stanów można określić poprzez częstotliwość używanego źródła światła. Rozpraszanie Rayleigha jest procesem o największej intensywności, ponieważ większość fotonów rozprasza się w ten sposób. Nie wiąże się on z żadną zmianą energii i w konsekwencji światło ma tę samą długość fali (nie dochodzi do zmiany stanu energetycznego). Natomiast proces rozpraszania Ramana wiąże się z zmianami energetycznymi i w zależności od kierunku przepływu energii można wyróżnić dwa typy rozpraszania. Rozpraszanie Stokesa zachodzi, gdy proces rozpraszania z podstawowego stanu wibracyjnego prowadzi do absorpcji energii

przez cząsteczkę i jej promocji do wzbudzonego stanu wibracyjnego o wyższej energii. [135] Jednakże, ze względu na energię termiczną, niektóre cząsteczki mogą być obecne w stanie wzbudzonym i rozpraszanie z tych stanów do stanu podstawowego jest rozpraszaniem anty-Stokesa i obejmuje transfer energii do rozproszonego fotonu.

Otrzymywane dane podczas pomiarów składają się z zestawu widm, gdzie każde widmo niesie ze sobą szereg informacji o miejscu w którym zostało zarejestrowane. Z każdego zebranego widma możliwe jest wyodrębnienie interesujących informacji takich jak określenie faz z których składa się próbka lub zachodzących zmian w stanach wibracyjnych. [136] Dlatego tak ważną rolę odgrywa dobranie odpowiedniej metody analizy danych. Analogicznie tak jak przy ToF-SIMS (Podrozdział 2.2.3.) wykorzystywane są metody analizy wielowymiarowej. Jedną z najbardziej popularnych metod jest analiza głównych składowych jednak wykorzystywane są też inne metody: analiza klastrowa czy też analiza niezależnych komponentów.

W ramach pracy doktorskiej spektroskopia Ramana została wykorzystana w celu określenia składu blend polimerowych PMMA+PtBMA.

2.2.7. Profilometria

Profilometria jest jedną z metod wykorzystywanych do określania grubości warstwy i chropowatości powierzchni. Technika ta wykorzystuje sondę do skanowania powierzchni próbki i generowania jej obrazu. W trakcie pomiaru sonda styka się z powierzchnią, fizycznie przesuwając się wzdłuż powierzchni w celu uzyskania odczytu wysokości badanej próbki. Możliwe jest rejestrowanie dwuwymiarowych jak i trójwymiarowych obrazów badanych powierzchni. W przypadku pomiaru 2D sonda jest przesuwana tylko w kierunku pionowym, jednak w przypadku pomiaru 3D dochodzi jeszcze ruch w płaszczyźnie bocznej z ustalonym krokiem pomiarowym, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie trójwymiarowej mapy badanej powierzchni. [137] Niestety w przeciwieństwie do metod optycznych, takich jak elipsometria, profilometria wymaga siłowego sprzężenia zwrotnego i fizycznego dotykania powierzchni, co może być destrukcyjne dla niektórych powierzchni.

W niniejszej pracy doktorskiej technika profilometrii została wykorzystana do określenia grubości przygotowywanych cienkich warstw polimerowych.

ROZDZIAŁ 3

Wpływ stereoregularności cienkich warstw poli(metakrylanu tert-butyłu) na oddziaływania z peptydami, białkami i bakteriami

3.1. Wprowadzenie

Biomateriały na bazie polimerów znalazły szerokie zastosowanie w biologii, medycynie i biofizyce jako konstrukcje biosensorów, implantów, czy też jako część systemów dostarczania leków. Dla możliwie najlepszego wykorzystania potencjału biomateriałów niezbędna jest szczegółowa wiedza na temat złożonych interakcji między powierzchnią polimeru, a otaczającymi go biomolekułami. Proces adsorpcji do powierzchni często indukuje zmiany w konformacji białka [138] lub prowadzi do przyjęcia różnych orientacji jego molekuly. [139] Białka mogą się układać losowo lub orientować się preferencyjnie, co ma wpływ na zmniejszenie dostępności miejsc wiążących na powierzchni, a tym samym na obniżenie czułości i selektywności przygotowanej warstwy biomolekularnej. Dotychczasowo najszerzej badanymi parametrami, które mają wpływ na przebieg adsorpcji białek, są: temperatura, siła jonowa oraz pH buforu, interakcje białko-białko, a także właściwości samej warstwy polimerowej takie jak hydrofobowość czy chropowatość. [29] Jednakże, biorąc pod uwagę rosnącą liczbę syntetycznych polimerów stosowanych w biomedycynie, otwiera się całkiem nowe pole badań nad wpływem stereochemii polimerów na ich właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne. [140]

W tym rozdziale pracy zostały przedstawione systematyczne badania wpływu trzech stereoregularnych form PtBMA na adsorpcję peptydów i białek, a także interakcje warstw polimerowych ze szczepami bakterii. Cienkie warstwy PtBMA o różnej taktyczności zostały zbadane za pomocą szeregu technik takich jak: mikroskopia sił atomowych, pomiary kąta zwilżania, rentgenowska spektroskopia fotoelektronów i spektrometria mas jonów wtórnych. Celem badań było określenie topografii, energii powierzchniowej i składu chemicznego przygotowanych podłoży. Następnie został zbadany proces immobilizacji białek z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, dzięki której możliwe było określenie efektywności immobilizacji. Ponadto została wykorzystana technika ToF-SIMS w połączeniu z analizą PCA w celu weryfikacji orientacji i konformacji zaadsorbowanych białek. Dodatkowo zostały przeprowadzone pomiary XPS w celu zweryfikowania ilości zaadsorbowanych białek oraz zastosowana została metoda oznaczania fioletu krystalicznego do ilościowego oznaczenia adhezji bakterii.

3.2. Wykorzystane metody badawcze

3.2.1. Przygotowanie podłoża

W badaniach zostały wykorzystane trzy polimery: ataktyczny (at-, $M_n=523 \times 10^3$, PDI=1,13), izotaktyczny (iso-, 493×10^3 , PDI=1,27, Iso > 85%) i syndiotaktyczny (syn, $M_n=443 \times 10^3$, PDI=1,1) poli(metakrylan tert-butyłu) (PtBMA). Roztwory PtBMA były wylewane z toluenu (stężenie roztworu 15 mg/mL), na podłoża krzemowe, a następnie została utworzona warstwa za pomocą metody spin-coatingu (prędkość powlekania $\omega = 2200$ obr./min). Po wytworzeniu warstw podłoża były wygrzewane przez 1 godzinę w temperaturze 60°C.

3.2.2. Adsorpcja peptydów i białek

W celu zbadania adsorpcji peptydów do warstw PtBMA zostały zakupione dwie sekwencje peptydów RRKRRKRRKRRKRRKKHHKHHKHH (dodatnio naładowany peptyd, oznaczony jako peptyd I składający się z argininy (R), lizyny (K) i histydyny (H)) i DEEDDEEDDEEGGDDEEDDEEDDEE (ujemnie naładowany peptyd, oznaczony jako peptyd II składający się z kwasu asparaginowego (D) i glutaminowego (E)). Proces adsorpcji peptydów został przeprowadzony poprzez umieszczenie kropli roztworu na przygotowanej wcześniej cienkiej warstwie polimerowej, a następnie całość była inkubowana przez 30 minut w warunkach normalnych. Następnie podłoża zostały przemyte buforem PBS, wodą dejonizowaną oraz wysuszone pod strumieniem azotu.

Do zbadania adsorpcji białek do warstw PtBMA o różnej taktyczności zostały użyte albumina surowicy bydlęcej (BSA), kozia immunoglobulina G (IgG), fibrynogen (FIB), streptawidyna (Str) i owalbumina (OVA). Wszystkie te białka były znakowane znacznikiem Alexa Fluor 488, który absorbuje niebieskie światło ($\lambda_{abs} = 496$ nm) i emituje zieloną fluorescencję ($\lambda_{emit} = 520$ nm). Roztwory białek o stałym stężeniu równym 125 $\mu\text{g/ml}$ zostały przygotowane przy użyciu buforu fosforanowego (PBS, pH= 7,4). W celu zbadania adsorpcji białek, kropla roztworu białka została umieszczona na warstwie polimeru i utrzymywana w warunkach otoczenia przez okres inkubacji wynoszący 30 minut. Następnie wszystkie próbki zostały przemyte buforem oraz wodą destylowaną w celu usunięcia niezaadsorbowanych białek i wysuszone pod strumieniem azotu.

Aby zweryfikować wpływ taktyczności polimeru na orientację białek, kozie IgG zostało zaadsorbowane na podłożach krzemowych pokrytych cienkimi warstwami PtBMA poprzez zanurzenie w roztworze 1 mg/mL IgG w PBS, przez 30 minut. Po inkubacji próbki dokładnie przemyto buforem, wodą destylowaną i wysuszono pod strumieniem azotu. Dodatkowo, jako referencje zaadsorbowano do cienkich warstwach PtBMA fragmenty $F(ab)_2$ i Fc użytych cząsteczek IgG (o stężeniu 500 $\mu\text{g/mL}$ w PBS).

3.2.3. Hodowla bakteryjna

Podczas badań zostały wybrane dwa szczepy referencyjne: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ i *Escherichia coli* ATCC® 25922™. Szczepy były hodowane w 3 mL

buforze Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB) i inkubowane tlenowo przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie hodowle bakterii zostały rozcieńczone w świeżej pożywce TSB do gęstości optycznej OD600 wynoszącej 0,5, która odpowiada stężeniu komórek 3×10^8 CFU (jednostek tworzących kolonie) zgodnym ze standardami McFarlanda. Następnie hodowle bakterii ponownie zostały rozcieńczone w stosunku 1:100 w świeżej pożywce TSB.

Badania nad adhezją bakterii przeprowadzono według obowiązujących protokołów. Poszczególne dołki sterylnych, polistyrenowych, 24-dołkowych, płaskodennych płytek do hodowli tkankowych, w których umieszczono przygotowane wcześniej warstwy polimerowe, zostały wypełnione rozcieńczoną hodowlą bakterii (1000 µl na dołek). Płytki hodowlane zostały inkubowane przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Zawartość każdego dołku została delikatnie odessana, a następnie przepłukana trzykrotnie 0,2 mL buforu fosforanowanego w celu usunięcia nieprzylegających komórek bakteryjnych. Przylegające bakterie zostały wybarwione 0,5% fioletem krystalicznym (CV). Nadmiar barwnika został usunięty poprzez płukanie w wodzie dejonizowanej. Po wysuszeniu, powierzchnie próbek zostały zbadane z wykorzystaniem pomiaru absorbancji zabarwionych, przylegających warstw bakterii; pomiar ten został odczytany przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika płytek Tecan Infinite® 200 PRO.

Hodowla bakteryjna oraz adhezja bakterii do cienkich warstw PtBMA została przeprowadzona w ramach współpracy z prof. dr hab. Moniką Brzychczy-Włoch oraz prof. dr. hab. Tomaszem Gosiewskim z Katedry Mikrobiologii UJ CM.

3.2.4. Charakterystyka powierzchni

Pomiary energii powierzchniowej. Swobodna energia powierzchniowa warstw polimerowych została określona na podstawie pomiarów statycznych kątów zwilżania zmierzonych dla formamidu i diiodometanu. Pomiary zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej przy użyciu metody siedzącej kropli (ang. *sessile drop*) z wykorzystaniem urządzenia Kruss EasyDrop (DSA15). Kąty zwilżania zostały określone jako średnia z dziesięciu pomiarów wykonanych w różnych miejscach na powierzchni próbki. Następnie do obliczenia swobodnej energii powierzchniowej zostało zastosowane podejście analityczne według modelu Kaelble-Owens-Wendt.

Mikroskopia fluorescencyjna. Adsorpcja białek do powierzchni warstwach PtBMA została zbadana przy użyciu mikroskopu optycznego Olympus BX51, wyposażonego w lampę halogenową o mocy 100W, filtr U-MWIG2 i kamerę typu DP72. Wszystkie obrazy zostały zarejestrowane dla wysuszonych próbek przy użyciu programu Cell[^]F. W trakcie badań zostały przeprowadzone dwie serie eksperymentalne i dla każdej z nich wykonano co najmniej pięć zdjęć fluorescencyjnych dla każdej próbki.

Mikroskopia sił atomowych (AFM). Obrazy AFM warstw polimerowych przed i po adsorpcji BSA wykonano za pomocą mikroskopu Agilent 5500 pracującego w trybie bezkontaktowym, wyposażonego w próbniki krzemowe o stałej sprężystości około 2 N/m i częstotliwości rezonansowej około 70 kHz. Obrazy AFM zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania Gwyddion, dzięki któremu została

obliczona miara chropowatości powierzchni (*Root Mean Square* RMS, średnia obliczona dla wysokości wszystkich pikseli obrazu AFM).

Spektrometria masowa jonów wtórnych czasu przelotu (ToF-SIMS).

Powierzchnie PtBMA analizowano przed i po adsorpcji peptydów oraz białek za pomocą aparatu TOF.SIMS 5 wyposażonego w ciekło-metaliczne jonowe działło bizmutowe o energii 30 keV. Widma masowe zostały zarejestrowane z co najmniej czterech różnych nienakładających się miejsc o rozmiarze $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ o wysokiej rozdzielczości masowej $m/\Delta m > 7300$ zmierzonej dla sygnału C_4H_5^+ ($m/z = 53$). Aby zapewnić warunki trybu statycznego, gęstość dawki zdeponowanej na powierzchni była niższa niż 10^{12} jonów/ cm^2 dla wszystkich próbek. Analiza głównych składowych (PCA) została przeprowadzona w celu zbadania różnic w strukturze warstw PtBMA o różnej stereoregularności, jak również w celu wykrycia wszelkich różnic w orientacji i konformacji molekuł białka zaadsorbowanych na warstwach iso-, syn- i at- PtBMA. Przed przystąpieniem do analizy, intensywności wybranych pików z widm jonów naładowanych dodatnio bądź ujemnie zostały znormalizowane do sumy ich intensywności, a następnie wyśrodkowane.

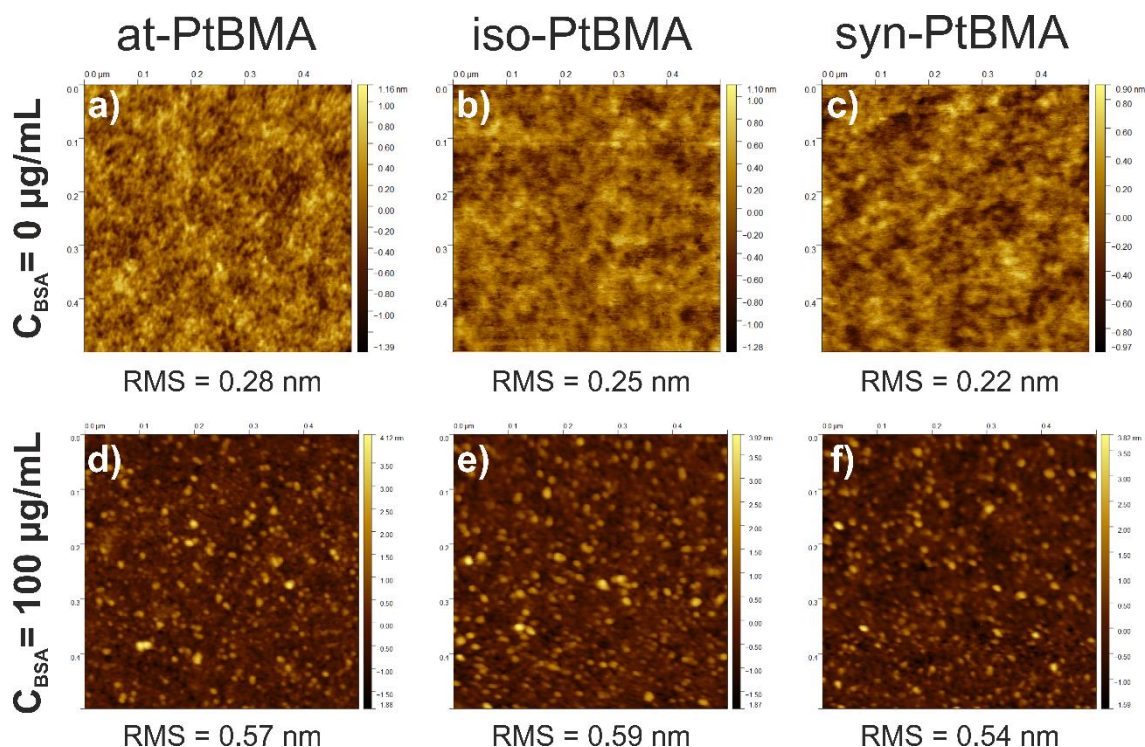
Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS). W celu identyfikacji pierwiastków wchodzących w skład próbki jak i oszacowania ich koncentracji została przeprowadzona analiza XPS za pomocą systemu PHI VersaProbeII Scanning XPS. Została wykorzystana lampa Al i promieniowanie z linii Ka o energii 1486.6 eV. Detektor został ustawiony pod kątem 45° , a energia przejścia w analizatorze została ustawiona na 46,95 eV w celu uzyskania widm o wysokiej rozdzielczości energetycznej dla regionów C 1s, N 1s, O 1s i Si 2p. Wszystkie widma XPS zostały wykalibrowane względem piku C1s o energii 2848,8 eV dla niesfunkcjonalizowanego, nasyconego węgla (C-C). Analiza widm została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania PHI MultiPeak. Pomiary XPS zostały wykonane w ramach badania zleconego przez dr. Mateusza M. Marca z Akademickiego Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH.

3.3. Wyniki

3.3.1. Charakterystyka powierzchni cienkich warstw polimerowych

Właściwości polimeru zależą nie tylko od rodzaju monomeru wchodzącego w jego skład, ale także od struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej. Dlatego też poprzez zmianę stereochemii wiązania można zmienić właściwości fizykochemiczne powierzchni cienkiej warstwy polimerowej, takie jak chropowatość, energia swobodna czy zwilżalność. Dlatego w pierwszej kolejności (przed badaniami oddziaływań z biomolekułami) cienkie warstwy PtBMA o różnej taktyczności zostały zbadane za pomocą technik: AFM, XPS, pomiarów kąta zwilżania i ToF-SIMS.

Obrazy AFM nie wykazały żadnych różnic chropowatości warstwy w zależności od taktyczności polimeru. Wartość RMS warstw polimerowych dla wszystkich taktyczności (Rysunek 3.1.) była porównywalna i wskazywała na bardzo gładkie powierzchnie ($\sim 0,2$ nm). Ponadto, badania XPS nie wykazały różnic w składzie pierwiastkowy, a skład C i O wynosi około $\sim 80\%$ i $\sim 20\%$ (Tabela 3.1.) dla wszystkich warstw, co jest zgodne z teoretycznie przewidywanym stosunkiem 8:2 w oparciu o strukturę PtBMA i literaturę. [141]



Rysunek 3.1. Obrazy topografii powierzchni warstw at-, iso- i syn-PtBMA przed (a-c) i po adsorpcji (d-f) białka wraz z wartością chropowatości warstw.

Tabela 3.1 Skład C, N i O dla powierzchni warstw at-, iso- i syn-PtBMA.

	Koncentracja [%]		
	C	N	O
at-PtBMA	80,5 (0,1)	0,0 (0,1)	19,5 (0,1)
iso-PtBMA	80,1 (0,1)	0,1 (0,1)	19,8 (0,1)
syn-PtBMA	80,7 (0,8)	0,2 (0,2)	19,1 (0,5)

W celu wykrycia subtelnych różnic w chemii powierzchni warstwy polimerowej związanych z ekspozycją grup chemicznych łańcucha polimerowego zastosowano metodę ToF-SIMS w połączeniu z PCA (Rysunek 3.2.). [142] Zbiór danych wykorzystany do wielowymiarowej analizy PCA został utworzony przez sygnały jonów dodatnich odpowiadające fragmentom łańcucha PtBMA, które zostały wyszczególnione w bibliotece

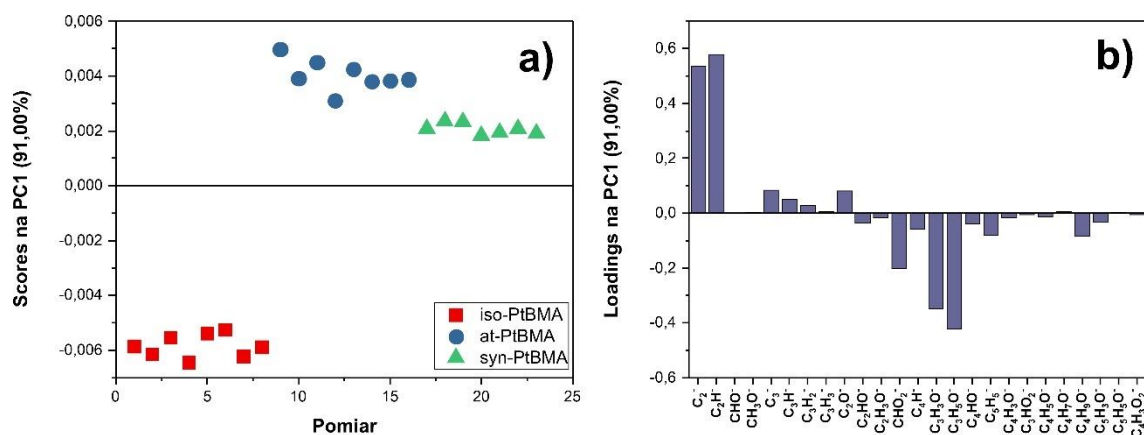
widm oprogramowania SurfaceLab (z wyłączeniem pików, których intensywność została wysycona w detektorze, np. $C_4H_9^+$) – wybrane sygnały zostały przedstawione w Tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Sygnały ToF-SIMS wraz z masami, które zostały wybrane do analizy głównych składowych na podstawie spektrum masowego cienkich warstw PtBMA.

sygnał	masa (u)	sygnał	masa (u)	sygnał	masa (u)
$C_2H_2^+$	26,0148	$C_4H_9O^+$	73,0693	$C_6H_8O_2^+$	112,0543
$C_2H_3^+$	27,0230	$C_5H_5O^+$	81,0335	$C_6H_9O_2^+$	113,0605
CHO^+	29,0018	$C_5H_6O^+$	82,0418	$C_6H_{10}O_2^+$	114,0686
$C_2H_5^+$	29,0393	$C_4H_3O_2^+$	83,0135	$C_7H_9O_2^+$	125,0604
CH_3O^+	31,0177	$C_5H_7O^+$	83,0494	$C_7H_{10}O_2^+$	126,0687
$C_3H_3^+$	39,0226	$C_5H_8O^+$	84,0557	$C_7H_{11}O_2^+$	127,0833
$C_3H_5^+$	41,0389	$C_4H_5O_2^+$	85,0276	$C_7H_{12}O_2^+$	128,0873
$C_2H_3O^+$	43,0187	$C_5H_9O^+$	85,0664	$C_9H_{11}O^+$	135,0827
$C_2H_5O^+$	45,0342	$C_4H_6O_2^+$	86,0389	$C_8H_{11}O_2^+$	139,0771
$C_4H_5^+$	53,0386	$C_4H_7O_2^+$	87,0430	$C_7H_8O_3^+$	140,0467
$C_4H_7^+$	55,0548	$C_4H_8O_2^+$	88,0527	$C_7H_9O_3^+$	141,0507
$C_3H_5O^+$	57,0401	$C_6H_7O^+$	95,0490	$C_8H_{13}O_2^+$	141,1026
$C_2H_3O_2^+$	59,0122	$C_6H_8O^+$	96,0561	$C_{10}H_{13}O^+$	149,1003
$C_3H_7O^+$	59,0505	$C_6H_9O^+$	97,0691	$C_9H_{11}O_2^+$	151,0776
$C_4H_3O^+$	67,0148	$C_6H_{10}O^+$	98,0723	$C_9H_{13}O_2^+$	153,0969
$C_5H_7^+$	67,0543	$C_5H_7O_2^+$	99,0475	$C_7H_{10}O_4^+$	158,0639
$C_4H_4O^+$	68,0260	$C_6H_{11}O^+$	99,0874	$C_9H_{11}O_3^+$	167,0781
$C_4H_5O^+$	69,0339	$C_5H_8O_2^+$	100,0547	$C_{10}H_{15}O_2^+$	167,1325
$C_4H_6O^+$	70,0406	$C_8H_{11}^+$	107,0868	$C_{12}H_{13}O^+$	173,0949
$C_4H_7O^+$	71,0496	$C_7H_9O^+$	109,0660	$C_{12}H_{15}O^+$	175,1137
$C_4H_8O^+$	72,0594	$C_6H_7O_2^+$	111,0424	$C_{11}H_{14}O_5^+$	226,0807

Przeprowadzona analiza PCA pokazuje, że główny kierunek nieskorelowanych zmian (PC1) wyraźnie rozdziela punkty pomiarowe dla warstwy iso-PtBMA od at-PtBMA i syn-PtBMA (Rysunek 3.2a). Na podstawie wykresu współczynników wkładu od poszczególnych składowych (*loadings*) (Rysunek 3.2b) można stwierdzić, że różnice między taktycznościami wynikają z obecności jonów wtórnych $C_2H_3O^+$, $C_4H_5O^+$, $C_4H_9O^+$ i $C_6H_7O_2^+$ stanowiących fragmenty PtBMA związane z grupami estrowymi oraz jonów $C_3H_3^+$, $C_3H_5^+$, $C_5H_7^+$, $C_4H_7O_2^+$, $C_8H_{11}^+$ będących głównie fragmentami grup alkilowych łańcucha polimerowego. Jony te i ich powiązanie ze strukturą łańcucha polimerowego zostały zaznaczone na Rysunku 3.3.

Dodatkowo, analiza PCA sygnałów wybranych dla widm ToF-SIMS jonów ujemnie naładowanych również wyraźnie rozdzieliła punkty pomiarowe zebrane dla warstwy iso-PtBMA od punktów pochodzących z pomiarów warstw at- i syn- PtBMA (Rysunek 3.4.). Odpowiadający wykres ładunków (*loadings*) (Rysunek 3.4b) pokazuje, że fragmenty grup alkilowych (C_2^- , C_2H^- i C_3^-) są charakterystyczne dla warstw at- i syn-PtBMA, podczas gdy fragmenty grup estrowych (CHO_2^- , $C_2H_3O^-$ i $C_2H_5O^-$) [143] są reprezentatywne dla iso-PtBMA.



Rysunek 3.4. Wykres współrzędnych obserwacji (scores) PC1 (a) i odpowiadający mu wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (loadings) (b) z analizy PCA dla negatywnych sygnałów ToF-SIMS zarejestrowanych dla warstw izotaktycznego (czerwone kwadraty), ataktycznego (niebieskie koła) oraz syndiotaktycznego (zielone trójkąty) PtBMA.

Ponieważ XPS nie ujawnił żadnych różnic w składzie pierwiastkowym i biorąc pod uwagę, że głębokość próbkowania ToF-SIMS jest ograniczona do najbardziej zewnętrznych obszarów podłoża ($\sim 1-1,5$ nm), różnice w składzie chemicznym powierzchni wykryte przez PCA są związane z ekspozycją grup chemicznych łańcucha polimerowego. Przeprowadzona analiza wykazała, że dla warstw iso-PtBMA grupy estrowe są eksponowane na powierzchni, w przeciwieństwie do warstw at-PtBMA i syn-PtBMA, gdzie grupy estrowe znajdują się głębiej w warstwie polimerowej i są „przykryte” łańcuchem głównym polimeru.

Orientacja różnych grup chemicznych w warstwie polimerowej może prowadzić do modyfikacji właściwości powierzchniowych. W związku z tym dla wszystkich warstw została wyznaczona swobodna energia powierzchniowa (SFE), jak również jej składowe polarne i dyspersyjne (bazując na pomiarach kątów zwilżania kropli dla formamidu i diiodometanu). Wartości otrzymanych kątów zwilżania zostały przeanalizowane metodą analityczną Kaelble-Owens-Wendt, której wyniki przedstawiono w Tabeli 3.3. [132]

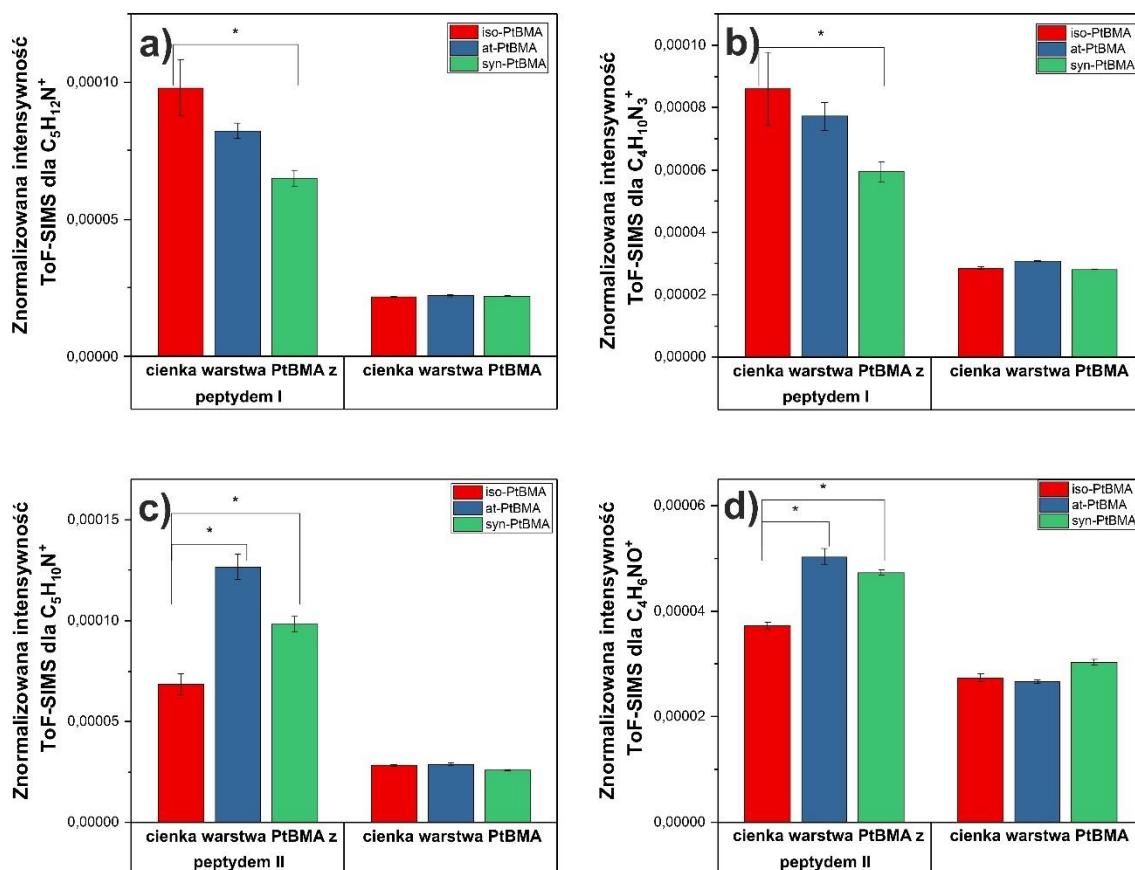
Tabela 3.3. Swobodna energia powierzchniowa oraz jej składowa dyspersyjna i polarna dla at-, iso- i syn-PtBMA.

	Składowa dyspersyjna [mN/m]	Składowa polarna [mN/m]	Swobodna energia powierzchniowa [mN/m]
iso-PtBMA	25,5 (0,8)	2,60 (0,01)	28,1 (0,8)
at-PtBMA	27,5 (1,7)	2,35 (0,06)	29,8 (1,7)
syn-PtBMA	27,4 (1,6)	2,24 (0,07)	29,6 (1,7)

Wyniki przedstawione w powyższej tabeli nie wykazują zauważalnej różnicy między obliczonymi SFE dla wszystkich analizowanych warstw polimerowych. Co więcej, składowe dyspersyjne są porównywalne dla wszystkich polimerów w ramach oszacowanych niepewności. Jednakże można zaobserwować niewielkie różnice dla składowej polarnej SFE. Dla iso-PtBMA wartość części polarnej jest większa w porównaniu do warstw at-PtBMA i syn-PtBMA, co koreluje z wynikami analizy PCA danych ToF-SIMS i potwierdza powierzchniową akumulację polarnych estrowych grup funkcyjnych. [144]

3.3.2. Adsorpcja peptydów do warstw polimerów o różnej taktyczności

W kolejnym etapie badań nad właściwościami warstw PtBMA o różnej taktyczności została zbadana adsorpcja dwóch rodzajów peptydów składających się wyłącznie z aminokwasów zasadowych (peptyd I) lub aminokwasów o charakterze kwasowym (peptyd II). Po inkubacji warstw polimerowych w roztworach peptydów, na widmach ToF-SIMS można zaobserwować serię sygnałów charakterystycznych dla peptydów. Rysunek 3.5. przedstawia znormalizowane natężenia reprezentatywnych jonów wtórnych $C_5H_{12}N^+$ i $C_4H_{10}N_3^+$ pochodzących odpowiednio od lizyny (Lys) i argininy (Arg) obecnych w peptydzie I oraz jonów $C_5H_{10}N^+$ i $C_4H_6NO^+$ charakterystycznych dla kwasu glutaminowego (Glu) wchodzącego w skład peptydu II. [145] Bezpośrednia analiza Rysunku 3.4 pokazuje, że ilość dodatnio naładowanego peptydu I zaadsorbowanego na powierzchni warstwy polimerowej jest największa dla iso-PtBMA, w porównaniu do at- i syn- PtBMA. Z kolei adsorpcja ujemnie naładowanego peptydu II na warstwie iso-PtBMA była znacznie mniejsza niż w przypadku warstw at- i syn- PtBMA. Obserwacje te wskazują, że ekspozycja polimerowych grup estrowych na powierzchni warstw iso-PtBMA sprzyja przyciąganiu aminokwasów z H-donorowymi łańcuchami bocznymi i odpychaniu ujemnie naładowanych Asp i Glu w wyniku oddziaływań elektrostatycznych z tlenem w polarnych grupach estrowych. Ponadto, przedstawione wyniki są zgodne z wynikami uzyskanym przez grupę profesora T. Serizawy, gdzie peptydy bogate w reszty zawierające argininę wykazywały większe powinowactwo do izotaktycznego PtBMA. [146]



Rysunek 3.5. Znormalizowane intensywności sygnałów ToF-SIMS reprezentacyjnych dla peptydu I (a-b) oraz dla peptydu II (c-d) zebrane dla warstw PtBMA z różną taktycznością przed i po adsorpcji peptydów (* istotnie statystycznie różnice między grupami, $p < 0,05$)

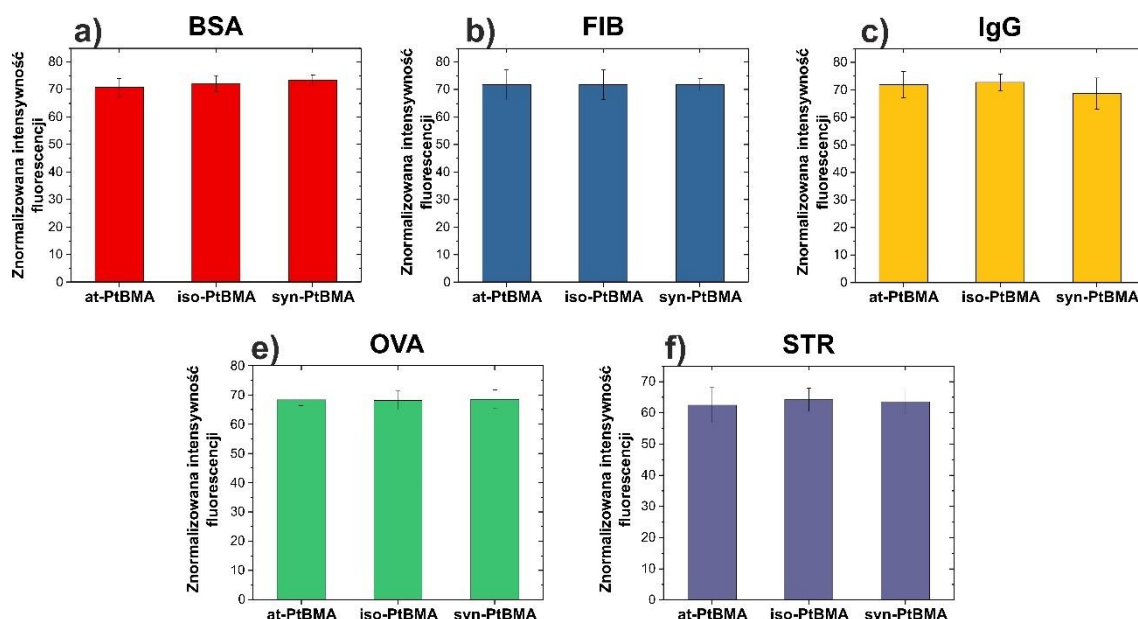
3.3.3. Adsorpcja białek do warstw PtBMA o różnej taktyczności

W kolejnym kroku został oceniony wpływ taktyczności polimeru na adsorpcję białek, które są bardziej złożonymi cząsteczkami niż peptydy. Liczne badania nad zjawiskiem adsorpcji białek wskazują na złożoność tego procesu i opisują wiele różnych mechanizmów i sił działających między białkiem a powierzchnią, w tym: siły elektrostatyczne i van der Waalsa, a także oddziaływania hydrofobowe. Adsorpcja białek zależy od wielu różnych oddziaływań białko-powierzchnia, a niektóre z nich mogą być tłumione lub wzmacniane poprzez zmianę stereochemii polimeru. W konsekwencji, ilość zaadsorbowanych białek, jak również ich orientacja i konformacja, może być kontrolowana.

3.3.3.1. Ilość zaadsorbowanego białka do cienkich warstw PtBMA

Aby określić wpływ stereoregularności polimeru na adsorpcję białek, wybrano pięć modelowych białek o różnych rozmiarach, kształtach i punktach izoelektrycznych, tj. albumina surowicy bydlęcej (BSA), kozie przeciwciało IgG, fibrynogen (Fib), streptawidyna (STR) i owalbumina (OVA), gdzie wszystkie były znakowane barwnikiem

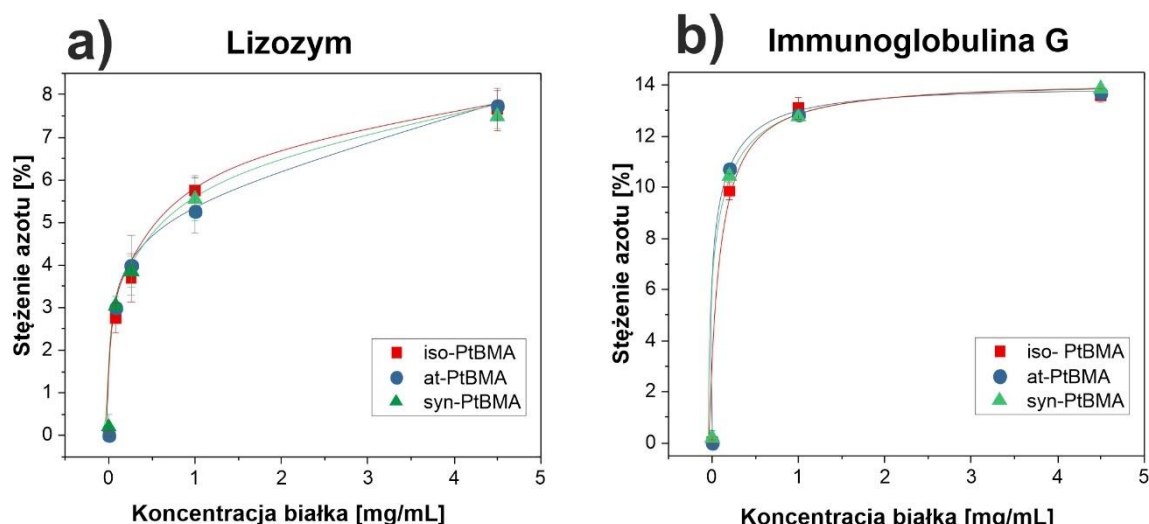
Alexa Fluor 488. Ilość białek zaadsorbowanych na powierzchni została oszacowana za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i analizy półilościowej z wykorzystaniem miar Minkowskiego. Otrzymane wyniki względnej ilości białek zaadsorbowanych do cienkich warstw PtBMA o różnej taktyczności zostały przedstawione na Rysunku 3.6.



Rysunek 3.6. Względna ilość zaadsorbowanych białek: surowiczej albuminy wołowej (a), fibrynogenu (b), IgG (c), owalbuminy (d) oraz streptawidyny (e) do cienkich warstw ataktycznego, izotaktycznego i syndiotaktycznego PtBMA.

Bezpośrednie badania obrazów fluorescencyjnych zarejestrowanych dla wszystkich analizowanych białek nie wykazały zmian intensywności fluorescencji, która jest proporcjonalna do ilości zaadsorbowanych białek na at-, iso- oraz syn- PtBMA, co wskazuje, że taktyczność tego polimeru nie wpływa na ilość zaadsorbowanych białek. Ponadto, badania AFM (Rysunek 3.1.d-f) wykazały, że dla wszystkich rodzajów warstw PtBMA cząsteczki BSA są rozmieszczone jednorodnie i nie są obserwowane różnice w strukturze warstw białkowych.

W kolejnym kroku został przeprowadzony dodatkowy eksperyment mający na celu ocenę czy stężenie białka w roztworze ma wpływ na jego adsorpcję do cienkiej warstwy PtBMA o różnej taktyczności. W tym celu względna ilość nieznakowanego lizozymu i IgG zaadsorbowanego z roztworu o różnym stężeniu białka (do 4,5 mg/ml) została oszacowana za pomocą XPS. Ponieważ sygnał N 1s XPS jest charakterystyczny dla białek i nie występuje w warstwie polimerowej (Tabela 3.1.), stężenie atomowe azotu można było przyjąć jako względną ilość zaadsorbowanego białka. Dane przedstawione na Rysunku 3.7 nie wykazują żadnych różnic w ilości molekuł białka zaadsorbowanych na warstwie polimerowej o różnej taktyczności dla wszystkich stężeń białka w roztworze i są zgodne z wynikami uzyskanymi przy użyciu półilościowej analizy obrazów fluorescencyjnych.



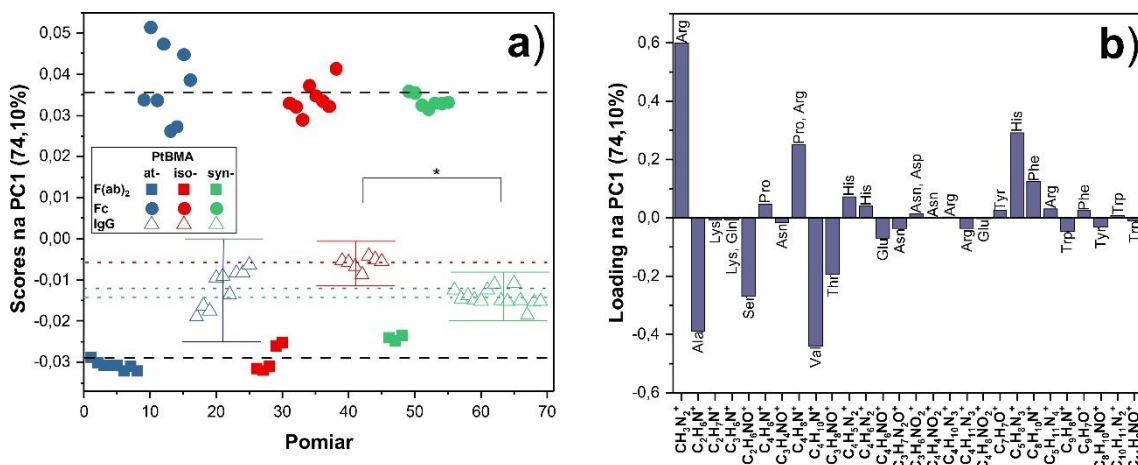
Rysunek 3.7. Procentowa koncentracja azotu na powierzchni iso- (czerwone kwadraty), at- (niebieskie kółka) oraz syn- (zielone trójkąty) PtBMA po adsorpcji lizozymu (a) oraz IgG (b) przedstawiona w funkcji stężenia białka w roztworze PBS.

3.3.3.2. Wpływ taktyczności cienkich warstw polimerów na orientację i konformację zaadsorbowanych białek

Innym ważnym aspektem interakcji białko - podłoże jest orientacja i konformacja zaadsorbowanych molekuł białka. Oddziaływania białko-podłoże mogą być modyfikowane przez różne właściwości powierzchni polimeru powiązane z orientacją różnych grup chemicznych. Białka są zazwyczaj molekułami asymetrycznymi i tylko w wyjątkowych przypadkach wykazują kształt kulisty. Modelowym przykładem może być BSA i IgG, która mają specyficzne kształty (Podrozdział 2.1.2.1. oraz 2.1.2.2.). W przypadku IgG orientacja zaadsorbowanego białka jest niezwykle istotna, ponieważ ma duży wpływ na aktywność immunoglobuliny. Aby zweryfikować wpływ ekspozycji różnych grup chemicznych na powierzchni warstw PtBMA (związanych z jego taktycznością) na dominującą orientację i konformację zaadsorbowanych białek, została przeprowadzona analiza ToF-SIMS warstw BSA, a także IgG i jej fragmentów (F(ab)₂ i Fc) zaadsorbowanych na iso-, syn- i at- PtBMA. Przy przeprowadzaniu tego typu badań, należy pamiętać, że technika ToF-SIMS działa w warunkach ultrawysokiej próżni, dlatego badane warstwy białek były odwodnione, a struktura białek mogła ulec zmianie. Jednakże porównanie orientacji białek lub stopnia denaturacji na różnych próbkach było nadal możliwe [126,139], ponieważ wszystkie badane powierzchnie to PtBMA, a zatem wszelkie zmiany w strukturze białka indukowane przez odwodnienie powinny być podobne dla tych powierzchni, które różnią się jedynie taktycznością. [147]

W pierwszej kolejności zostały wykonane pomiary 69 widm dla warstw at-, iso- i syn-PtBMA z zaadsorbowanymi molekułami IgG oraz domenami Fc i F(ab)₂, a następnie została przeprowadzona analiza PCA w oparciu o 28 fragmentów jonów dodatnich (wymienionych na Rysunku 3.8b) [145], pochodzących wyłącznie od aminokwasów. Jak pokazano na Rysunku 3.8.a, pierwsza główna składowa (PC1), która obejmuje 74,10% całkowitej wariancji, różnicuje widma zarejestrowane z warstw PtBMA z zaadsorbowanymi domenami Fc (charakteryzującymi się dodatnimi wartościami PC1) i F(ab)₂ (charakteryzującymi się ujemnymi wartościami). Analiza wykresów *loadings* pokazuje, że jony charakterystyczne dla dodatnich wartości PC1 pochodzą od

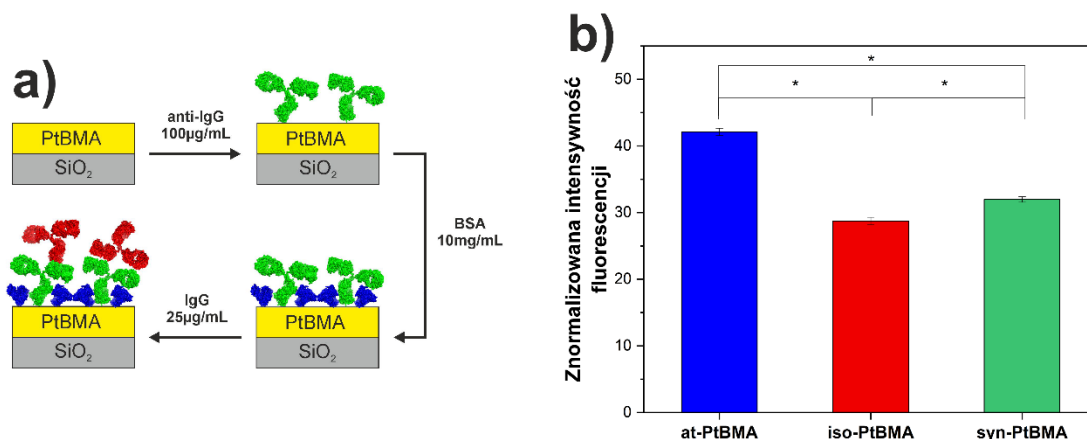
aminokwasów, takich jak arginina, prolina, histydyna i fenyloalanina, które są charakterystyczne dla domeny Fc koziego przeciwciała IgG. Z kolei jony pochodzące od aminokwasów takich jak alanina, seryna, walina, treonina i tryptofan ładują PC1 w kierunku ujemnym, wskazując, że są one bardziej charakterystyczne dla domeny F(ab)₂. [148] Pomimo faktu, że dokładna sekwencja aminokwasowa domeny F(ab)₂ zastosowanego przeciwciała nie została określona, uzyskany zestaw charakterystycznych aminokwasów jest zgodny z ostatnimi badaniami ToF-SIMS dla koziego przeciwciała IgG oraz z składem aminokwasowym innych cząsteczek IgG1. [149]



Rysunek 3.8. Analiza orientacji IgG za pomocą PCA danych ToF-SIMS. (a) Wykres współrzędnych obserwacji PC1 jonów dodatnich z widm ToF-SIMS zebranych dla fragmentów Fc (pełne kółka) i F(ab)₂ (pełne kwadraty) a także dla całej molekule IgG (otwarte trójkąty), zaadsorbowanych na warstwach at-PtBMA (niebieskie symbole), iso-PtBMA (czerwone symbole) i syn-PtBMA (zielone symbole). (b) Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC1 odpowiadający wykresowi średnich wartości składu pokazanemu w (a). (istotne różnice w średnich wartościach współrzędnych obserwacji na PC1 określono za pomocą testu ANOVA, $p < 0,05$, oznaczone symbolem gwiazdki *).

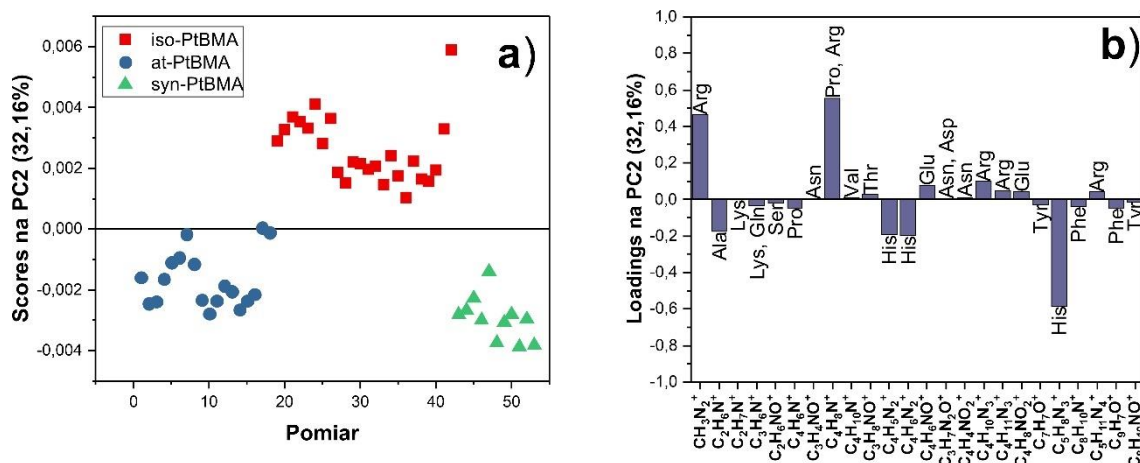
Aby określić dominującą orientację cząsteczek IgG zaadsorbowanych do warstw PtBMA o różnej stereoregularności, można rozważyć średnią wartość współrzędnych obserwacji na PC1. Jak pokazano na Rysunku 3.8.a, punkty danych reprezentujące pomiary warstw PtBMA z zaadsorbowanymi całymi molekułami IgG charakteryzują się ujemnymi wartościami średniej wartości współrzędnej obserwacji (*scores*) na PC1, co wskazuje na ekspozycję fragmentu F(ab)₂ i dominującą orientację end-on (domena F(ab)₂ wystawiony w górę) molekuł IgG. Dodatkowo, średnie wartości *scores* na PC1 dla próbek z IgG zaadsorbowanymi do warstw iso-PtBMA są wyższe niż dla tych zaadsorbowanych na at- lub syn- PtBMA. Istotna różnica występująca dla *scores* na PC1 pomiędzy grupą punktów danych odpowiadających IgG zaadsorbowanym na iso-PtBMA a grupą punktów danych odpowiadających temu samemu białku zaadsorbowanemu na syn-PtBMA została potwierdzona testem ANOVA przy poziomie współczynnika istotności równemu 0,05. Przeprowadzona do tej pory analiza nie jest rozstrzygająca jeśli chodzi o warstwy IgG na at-PtBMA ze względu na znacznie większe rozproszenie punktów danych. Uzyskane wyniki sugerują, że większa część molekuł IgG podczas procesu adsorpcji do iso-PtBMA przyjmuje nieaktywną orientację head-on (domena Fc zwrócona do góry) w porównaniu do warstw wykonanych z at- i syn-PtBMA. Obserwacja ta została potwierdzona przez badanie mikroskopii fluorescencyjnej skuteczności wiązania antygeny do

zaadsorbowanych molekuł IgG (Rysunek 3.9.). Uzyskane wyniki wykazały niższą aktywność biologiczną warstw IgG przygotowanych na warstwie iso-PtBMA w porównaniu do warstw at- i syn-PtBMA, co wiąże się z wyższym udziałem nieaktywnej orientacji head-on dla molekuł IgG zaadsorbowanych do warstwy iso-PtBMA.



Rysunek 3.9. (a) Schemat procedury weryfikacji orientacji IgG zaadsorbowanego na powierzchni PtBMA. Kolejne etapy polegały na adsorpcji IgG (króliczego IgG) z roztworu o stężeniu 100 µg/mL, blokowaniu roztworem BSA o stężeniu 10 mg/mL i ekspozycji na roztwór antygeny znakowanego fluorescencyjnie (kozy przeciwciała IgG) o stężeniu 25 µg/mL. Struktury cząsteczek białek zostały wykreślone przy użyciu narzędzi graficznych z Protein Data Bank (b) Wykres intensywności fluorescencji znakowanego fluorescencyjnie antygeny (kozy przeciwciała IgG) po związaniu ze wstępnie zaadsorbowanym anty-IgG (immunoreakcja) na warstwach PtBMA (* istotnie statystycznie różnice między grupami, $p < 0,05$).

W dalszej części badań zostały przeprowadzone pomiary ToF-SIMS wsparte analizą PCA w celu zbadania zachowania molekuł BSA zaadsorbowanych na cienkich warstwach polimeru PtBMA o różnej stereoregularności. Jak widać na Rysunku 3.10.a PC2 opisuje 32.16% wariancji i odróżnia BSA zaadsorbowane do iso-PtBMA (wartości dodatnie na PC2) od BSA zaadsorbowanego na at- i syn- PtBMA, które posiadają ujemne wartości na PC2. Analiza ładunków (współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów) dla PC2 (Rysunek 3.10b) pokazuje, że dodatnie współczynniki dla PC2 są związane z fragmentami argininy i kwasu glutaminowego, podczas gdy ujemne współczynniki na PC2 są spowodowane jonami pochodzących z histydyny, alaniny i fenyloalaniny.

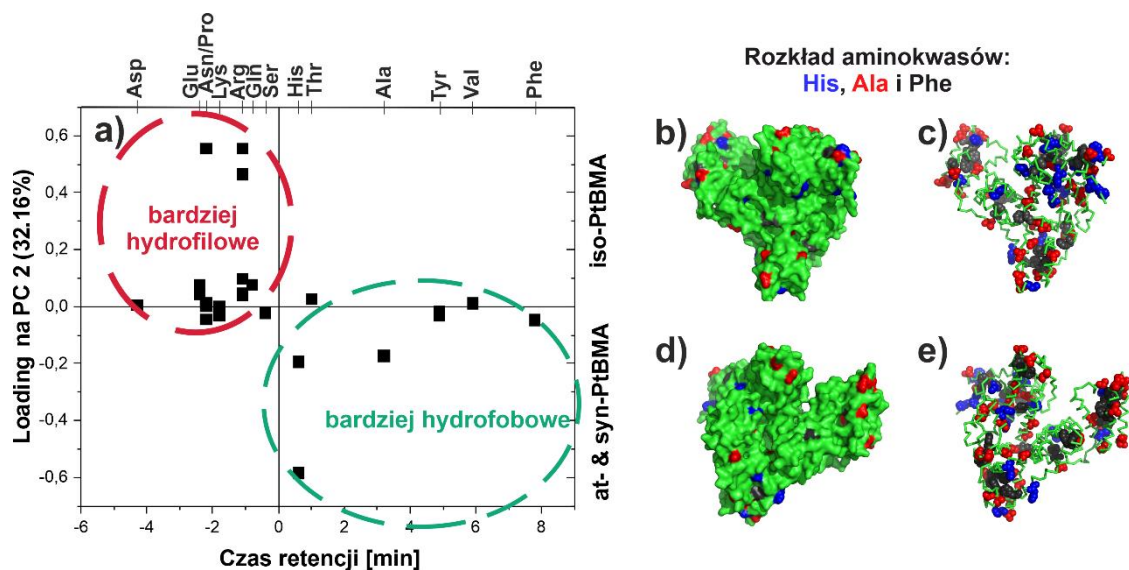


Rysunek 3.10. Zmiany konformacji BSA wykryte za pomocą PCA danych ToF-SIMS. (a) wykres współrzędnych obserwacji PC2 dla jonów dodatnich z widm ToF-SIMS BSA zaadsorbowanego na warstwach iso-PtBMA (czerwone kwadraty), at-PtBMA (niebieskie kółka) i syn-PtBMA (zielone trójkąty). (b) Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów dla PC2 odpowiadający wykresowi współrzędnych obserwacji pokazanemu w (a).

BSA jest białkiem w kształcie serca i składa się z trzech domen (albumina I, albumina II, albumina III) gdzie każda z nich ma różny skład aminokwasowy. Aby można było określić, czy obserwowane różnice są związane ze zmianami orientacji BSA indukowanymi przez podłoże, została przeprowadzona analiza struktury cząsteczki BSA (4F5S z Protein Data Bank) oraz składu aminokwasowego dla wszystkich trzech domen. Wyniki tej analizy wykazały, że albumina I, w porównaniu do albuminy II i albuminy III, jest bogata w histydynę (8 w porównaniu 6 i 3) i fenyloalaninę (11 w porównaniu 7 i 9). Z kolei alanina częściej występuje w albuminie II (21) niż w przypadku albuminy I czy III (odpowiednio 13 i 11). Tak więc analiza aminokwasów zlokalizowanych w zewnętrznych, eksponowanych rejonach warstwy białka zaadsorbowanego do warstw at- i syn- PtBMA nie sugeruje żadnej preferencyjnej orientacji BSA. Co więcej, ilość argininy (6, 9, 8) i kwasu glutaminowego (21, 19, 19), charakterystycznych dla zewnętrznych regionów BSA osadzonej na powierzchni iso-PtBMA, jest porównywalna dla wszystkich domen. Pokazuje to, że różnice w strukturze warstwy BSA wykryte przez analizę PCA nie są związane z różną orientacją molekuł BSA zaadsorbowanych na powierzchni polimerów o różnej stereoregularności.

Innym ważnym zjawiskiem zachodzącym podczas adsorpcji białek są zmiany konformacji. W wyniku oddziaływań między molekułami białka a powierzchnią, molekuły mogą denaturować i odsłaniać hydrofobowe aminokwasy, które są zwykle ukryte głębiej w strukturze białka. [150] Aby sprawdzić, czy różnice w strukturze zaadsorbowanego białka wskazane przez PCA są związane z denaturacją BSA, została zastosowana metoda analizy, w której względna miara hydrofobowości łańcuchów bocznych aminokwasów została zdefiniowana jako różnica w czasie retencji Δt_R , względem peptydu glicyny [151] i została wykreślona względem ładunków na PC2 (Rysunek 3.11.a). Uzyskany wykres wyraźnie pokazuje korelację między współczynnikami wkładu od poszczególnych sygnałów na PC2 a względną miarą hydrofobowości łańcuchów bocznych aminokwasów. Aminokwasy, zidentyfikowane jako występujące w zewnętrznych regionach warstwy BSA na iso-PtBMA (dodatnie współczynniki na PC2), jak również na cienkich warstwach at-

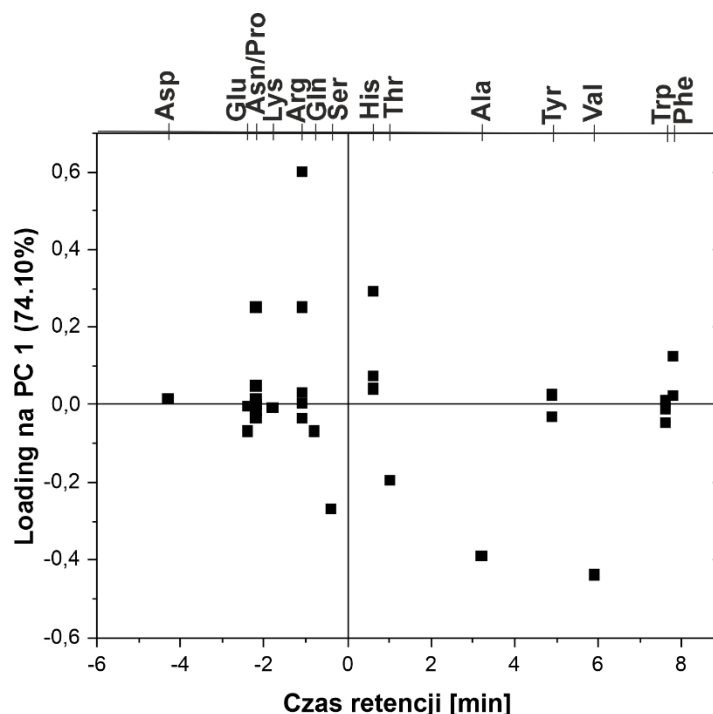
i syn- PtBMA (ujemne współczynniki PC2), są odpowiednio bardziej hydrofilowe ($\Delta t_R < 0$) lub bardziej hydrofobowe niż w przypadku glicyny ($\Delta t_R > 0$).



Rysunek 3.11. a) Hydrofobowość łańcuchów bocznych aminokwasów zdefiniowana jako różnica w czasie retencji (Δt_R) w odniesieniu do peptydu glicyny wykreślona względem wartości współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów na PC2 dla BSA zaadsorbowanego na cienkich warstwach PtBMA. (b) Rozkłady alaniny (czerwony), histydyny (niebieski) i fenyloalaniny (czarny) (b, d) na powierzchni i (c, e) w strukturze cząsteczki BSA.

Aby potwierdzić tę obserwację, zobrazowano położenie hydrofobowej alaniny, histydyny i fenyloalaniny w strukturze molekuly BSA. Na Rysunku 3.11.b-e przedstawiona jest struktura BSA z zaznaczoną pozycją alaniny (czerwone kulki), histydyny (niebieskie kulki) i fenyloalaniny (ciemnoszare kulki). Porównanie rozkładu tych aminokwasów na powierzchni z wnętrzem molekuly BSA wyraźnie pokazuje, że większość z nich jest ukryta głębiej w strukturze białka, więc nie są one łatwo dostępne dla jonów pierwotnych ToF-SIMS. Wskazuje to na, wywołane oddziaływaniem z podłożem, modyfikacje konformacji BSA i ekspozycję hydrofobowych aminokwasów, które zwykle znajdują się we "wnętrzu" struktury cząsteczki białka, dla BSA zaadsorbowanego na at- i syn- PtBMA.

Analogiczna analiza została przeprowadzona również dla molekuł IgG. W tym celu względna miara hydrofobowości łańcuchów bocznych aminokwasów została wykreślona względem współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów na PC1 uzyskanych podczas analizy zestawu danych IgG (Rysunek 3.12.). Przedstawiony wykres wyraźnie pokazuje, że nie można wskazać żadnej korelacji związanej ze zmianami konformacji zaadsorbowanych cząsteczek IgG. Zatem różnice w składzie najbardziej zewnętrznego obszaru zaadsorbowanej warstwy IgG ujawnione przez PCA (Rysunek 3.8.) są związane z różną orientacją przeciwna wywołaną taktycznością warstwy polimerowej.



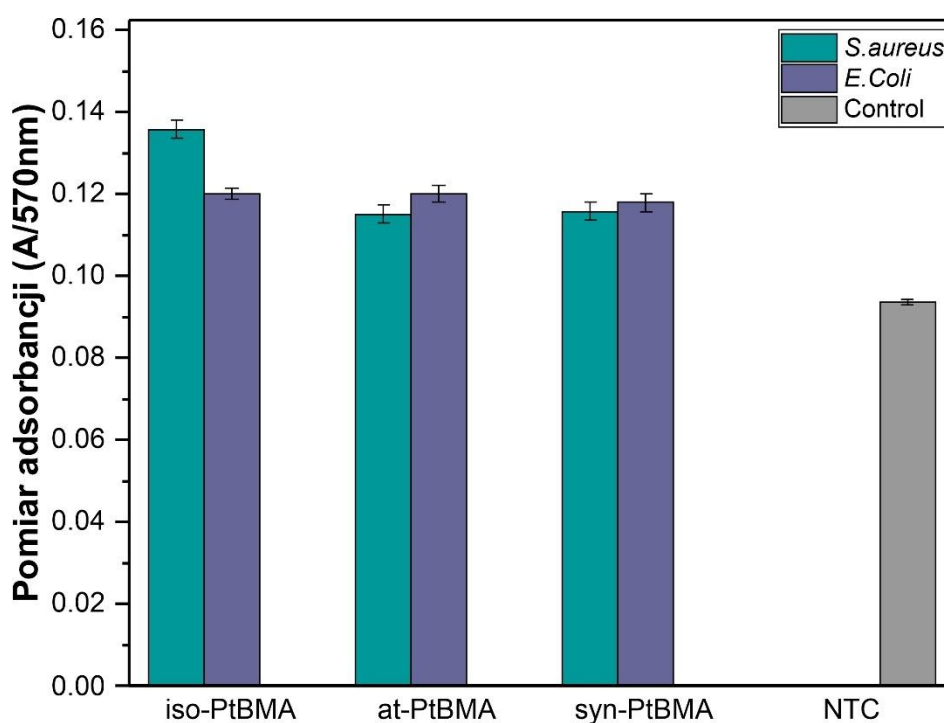
Rysunek 3.12. Hydrofobowość łańcuchów bocznych aminokwasów zdefiniowana jako różnica w czasie retencji (Δt_R) w odniesieniu do peptydu glicyny wykreślona względem wartości współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC1 dla IgG adsorbowanych na cienkich warstwach PtBMA.

IgG i BSA różnią się pod względem składu aminokwasowego, masy i ładunku (w warunkach pH zbliżonego do fizjologicznego), dlatego różne zachowanie tych białek na powierzchniach iso-, at- i syn- PtBMA wskazuje, że przy opisie adsorpcji białek do powierzchni tych polimerów należy wziąć pod uwagę różne rodzaje interakcji. Zmiany w orientacji IgG można wyjaśnić oddziaływaniem elektrostatycznym między cząsteczkami białka a grupą estrową polimeru. Fragmenty Fc i F(ab)₂ mają różne wartości IEP i są odpowiednio naładowane ujemnie i dodatnio, mimo że całkowity ładunek IgG jest bliski zeru (przy pH zbliżonym do fizjologicznego). Zatem cała cząsteczka IgG ma moment dipolowy skierowany od ujemnie naładowanego fragmentu Fc do dodatnio naładowanego fragmentu F(ab)₂. Podobnie jak w przypadku peptydów, grupa estrowa iso-PtBMA wystawiona do powierzchni warstwy przyciąga dodatnio naładowane części cząsteczki. W rezultacie, część molekuł IgG zmienia swoją orientację z end-on na head-on podczas adsorpcji do iso-PtBMA w porównaniu do at- i syn- PtBMA. Z kolei zmianę konformacji cząsteczek BSA można wyjaśnić oddziaływaniami hydrofobowymi pomiędzy niepolarnymi fragmentami BSA, a niepolarnymi fragmentami alkilowymi PtBMA (np. grupami alfa-metylowymi czy łańcuchem głównym PtBMA) eksponowanymi na powierzchni at- i syn-PtBMA.

3.3.4. Adhezja bakterii do cienkich warstw PtBMA

Aby sprawdzić, czy orientacja grup chemicznych w warstwie polimerowej wykonanej z polimeru o różnej taktyczności ma jakikolwiek wpływ na interakcję z bardziej złożonymi systemami biologicznymi, oceniono adhezję bakterii do tych warstw. Do badań zostały wybrane dwa reprezentatywne typy bakterii: gram-ujemna *Escherichia coli* (ATCC 25922) i gram-dodatni *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Wyniki przedstawione na

Rysunku 3.13 pokazują, że oba typy bakterii przyczepiają się do wszystkich powierzchni PtBMA lepiej niż do powierzchni samego krzemu, który stanowił próbkę kontrolną (NTC). Istnieją jednak pewne różnice między bakteriami Gram-ujemnymi *E. coli* i Gram-dodatnimi *S. aureus*. W przypadku *E. coli* nie został zaobserwowany wpływ taktyczności polimeru i nie odnotowano znaczącej różnicy między ilością bakterii dla wszystkich rodzajów PtBMA. Z kolei więcej komórek *S. aureus* było w stanie przyczepić się do iso-PtBMA w porównaniu do dwóch innych stereoregularności, gdzie nie zaobserwowano różnic pomiędzy syn- i at- PtBMA.



Rysunek 3.13. Ocena adhezji bakterii do warstw PtBMA o różnej taktyczności.

W swojej publikacji profesor E.P. Ivanova wnioskuje, że pomimo ujemnego ładunku powierzchniowego netto niektóre rodzaje bakterii są w stanie przyczepić się do cienkich warstw PtBMA. [152] Wnioski z tej pracy wskazują, że pozakomórkowe substancje polimerowe (EPS) działają jako główny czynnik odpowiedzialny za przyczepianie się bakterii. Interakcja między powierzchnią warstwy polimerowej, a bakteriami może wpływać na ich aktywność metaboliczną, w wyniku czego komórki są w stanie zainicjować produkcję określonych EPS, które promują przyczepianie się bakterii. [152] Jednak skład zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych może różnić się dla bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W literaturze wykazano, że u niektórych bakterii Gram-dodatnich skład chemiczny ich EPS może być nieco inny ze względu na ich głównie kationowy charakter. Fakt ten może wyjaśniać większą liczbę komórek *S. aureus* przyłączonych do powierzchni iso-PtBMA, dla których grupy estrowe łańcucha polimerowego są eksponowane do środowiska zewnętrznego, promując interakcję z dodatnio naładowanymi cząsteczkami, jak przedstawiono w przypadku dodatnio naładowanych peptydów.

3.4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania ujawniły, że orientacja grup chemicznych polimeru w cienkich warstwach polimerowych indukuje zmiany na powierzchni; co ma ogromny wpływ na interakcję między warstwą polimeru a materiałami biologicznymi. Orientacja grup estrowych PtBMA do powierzchni zaobserwowana dla formy izotaktycznej silnie zmodyfikowała ich oddziaływanie z peptydami, białkami i bakteriami w porównaniu z formą syndiotaktyczną i ataktyczną. Ekspozycja polarnych grup estrowych iso-PtBMA sprzyja oddziaływaniom elektrostatycznym i wiązaniom wodorowym z dodatnio naładowanymi peptydami. Jednak w przypadku bardziej złożonych molekuł, takich jak białka, należy wziąć pod uwagę również inne rodzaje interakcji. Oddziaływania elektrostatyczne są odpowiedzialne za orientację molekuł IgG, podczas gdy oddziaływania hydrofobowe wpływają na konformację BSA. Co więcej, bakterie Gram-dodatnie *S. aureus* są również wrażliwe na ekspozycję grup chemicznych na powierzchni warstwy polimerowej i w rezultacie więcej komórek bakterii było w stanie przyczepić się do warstw iso-PtBMA w porównaniu do dwóch innych stereoregularności.

Materiał przedstawiony w tym rozdziale wchodzi w skład publikacji: **N. Janiszewska**, J. Raczkowska, K. Grzegorzczak, M. Brzychczy-Włoch, T. Gosiewski, M. M. Marzec, K. Gajos, K. Awsiuk; *Effect of poly(tert-butyl methacrylate) stereoregularity on polymer film interactions with peptides, proteins and bacteria*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** **210** (2022), 112248; DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.11478.

ROZDZIAŁ 4

Zmiany w orientacji białek wywołane taktycznością poli(metakrylanu metylu)

4.1. Wprowadzenie

Poli(metakrylan metylu) (PMMA) jest jednym z najczęściej wykorzystywanych polimerów syntetycznych w szeroko rozumianym przemyśle z szczególnym naciskiem na zastosowania biomedyczne. Biorąc pod uwagę możliwości jakie daje PMMA, kluczowe jest zrozumienie mechanizmów interakcji między polimerem a biomolekułami, zwłaszcza z białkami. Temat ten był prezentowany przez Takeshi Serizawę, którego badania koncentrowały się na określeniu wpływu stereoregularności PMMA na ilość białka zaadsorbowanego do powierzchni warstwy polimerowej. W swojej pracy wykazał, że właściwość adsorpcji białek do warstw PMMA jest silnie zależna od warstwy, a powinowactwo do izotaktycznego PMMA było znacznie niższe niż ich powinowactwo do ataktycznego lub syndiotaktycznego PMMA. [153–155] Dodatkowo przeprowadził badania uwzględniające zdolność peptydów do rozpoznawania subtelnych różnic pomiędzy strukturą stereoregularnych cienkich warstw polimerowych. [56,154] Pomimo licznych prac nad wpływem stereoregularności PMMA na ilość zaadsorbowanego białka, aspekt zmian orientacji białka podczas procesu adsorpcji został pominięty.

Dlatego też ze względu na brak tego typu badań dla PMMA, w tym rozdziale zostały przedstawione badania mające na celu określenie wpływu taktyczności PMMA na proces adsorpcji białek (w szczególności orientacji i konformacji molekuł białka). Tak jak w przypadku PtBMA (Rozdział 3) zostały wykorzystane trzy formy stereoregularności PMMA: izotaktyczna, ataktyczna i syndiotaktyczna, dla których została przeprowadzona adsorpcja białka. Cienkie warstwy PMMA zostały zbadane za pomocą spektrometrii masowej jonów wtórnych, mikroskopii sił atomowych i pomiarów kąta zwilżania w celu określenia topografii jak i składu chemicznego powierzchni. Następnie dzięki wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej została określona ilość zaadsorbowanych molekuł białka. Dodatkowo dzięki pomiarom ToF-SIMS połączonym z analizą PCA możliwe było określenie zmian w orientacji i konformacji zaadsorbowanych białek.

4.2. Wykorzystane metody badawcze

4.2.1. Przygotowanie podłoży

W badaniach zostały wykorzystane trzy polimery: ataktyczny (at-, $M_n=50 \times 10^3$, $PDI=1,09$), izotaktyczny (iso-, $M_n=52,5 \times 10^3$, $PDI=1,16$, iso > 98%) i syndiotaktyczny (syn, $M_n=46 \times 10^3$, $PDI=1,8$) poli(metakrylan metylu) (PMMA). Roztwory PMMA były

wylewane z chlorobenzenu (stężenie roztworu 10 mg/mL), na krzem, a następnie została utworzona warstwa za pomocą metody spin-coatingu (prędkość powlekania $\omega = 2200$ obr./min). Po wytworzeniu warstw podłoża były wygrzewane przez 1 godzinę w temperaturze 60 °C.

4.2.2. Immobilizacja białek

Do zbadania adsorpcji do warstw PtBMA o różnej taktyczności zostały użyte albumina surowicy bydlęcej (BSA), kozia immunoglobulina G (IgG) i fibrynogen (FIB), wszystkie ze znacznikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 488. Roztwory białek o stężeniu równym: 80 $\mu\text{g/ml}$ (BSA), 125 $\mu\text{g/ml}$ (IgG) i 30 $\mu\text{g/ml}$ (FIB), zostały przygotowane przy użyciu buforu fosforanowego (PBS). W celu zbadania adsorpcji białek, kropla roztworu białka została umieszczona na warstwie polimeru przez 30 minut. Następnie wszystkie próbki zostały przemyte buforem oraz wodą destylowaną w celu usunięcia niezaadsorbowanych białek i wysuszone pod strumieniem azotu.

Wpływ taktyczności polimeru na orientację białek potwierdzono poprzez adsorpcję koziego IgG na podłożach krzemowych z cienkimi warstwami PMMA poprzez zanurzenie w roztworze 1mg/ml IgG w buforze PBS przez 30 minut. Po inkubacji próbki dokładnie przemyto buforem, wodą destylowaną i wysuszono pod strumieniem azotu. Ponadto, fragmenty F(ab)_2 i Fc użytych cząsteczek IgG (w stężeniu 500 $\mu\text{g/mL}$ w PBS) zostały zaadsorbowane na cienkich warstwach PMMA w celach referencyjnych.

4.2.3. Charakterystyka powierzchni

Mikroskopia fluorescencyjna. Adsorpcja białek do powierzchni warstw PMMA została zbadana przy użyciu mikroskopu optycznego Olympus BX51, który jest wyposażony w lampę halogenową o mocy 100W, filtr U-MWIG2 i kamerę typu DP72. Wszystkie obrazy zostały zarejestrowane dla wysuszonych próbek przy użyciu programu Cell[^]F. W trakcie badań zostały przeprowadzone dwie serie eksperymentów i dla każdej z nich wykonano co najmniej pięć zdjęć fluorescencyjnych dla każdej próbki.

Pomiary energii powierzchniowej. Swobodna energia powierzchniowa warstw polimerowych została określona na podstawie pomiarów statycznych kątów zwilżania zmierzonych dla formamidu i diiodometanu. Pomiary zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej przy użyciu metody kropli siedzącej z wykorzystaniem urządzenia Kruss EasyDrop (DSA15). Kąty zwilżania zostały określone jako średnia z dziesięciu pomiarów wykonanych w różnych miejscach na powierzchni próbki. Następnie do obliczenia swobodnej energii powierzchniowej zostało zastosowane podejście analityczne według Kaelble-Owens-Wendt.

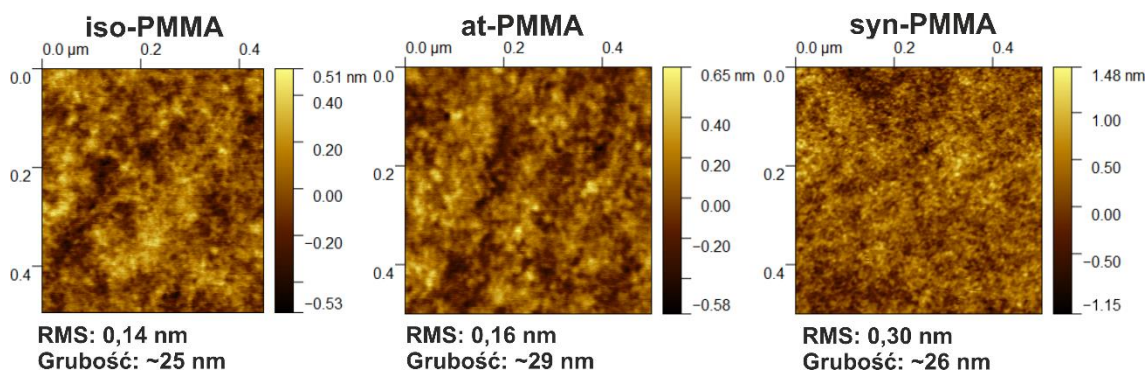
Mikroskopia sił atomowych (AFM). Obrazy AFM warstw polimerowych wykonano za pomocą mikroskopu Agilent 5500 pracującego w trybie bezkontaktowym, wyposażonego w próbniki krzemowe o stałej sprężystości około 2 N/m i częstotliwości rezonansowej około 70 kHz. Obrazy AFM przeanalizowano przy użyciu oprogramowania Gwyddion, dzięki któremu została obliczona miara chropowatości powierzchni (RMS).

Spektrometria masowa jonów wtórnych (ToF-SIMS). Powierzchnie PMMA analizowano przed i po adsorpcji białek za pomocą aparatu TOF.SIMS 5 (ION-TOF GmbH) wyposażonego w ciekło-metaliczne jonowe działko bizmutowe o energii 30 keV. Zostały zarejestrowane widma masowe, posiadające wysoką rozdzielczość masową $m/\Delta m > 8000$ przy $C_4H_5^+$ ($m/z = 53$). Aby zbadać różnice w strukturze cienkich warstw PMMA o różnej taktyczności jak i wykryć możliwe różnice w orientacji i konformacji białek zaadsorbowanych na warstwach iso-, syn- i at-PMMA przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA). Przed przystąpieniem do analizy, intensywności wybranych pików z widm jonów dodatnich zostały znormalizowane do sumy ich intensywności, a następnie wyśrodkowane (podzielone przez średnią).

4.3. Wyniki

4.3.1. Charakterystyka cienkich warstw PMMA

Oddziaływania pomiędzy polimerem a białkiem są silnie zależne od właściwości warstwy polimerowej, dlatego też w pierwszym etapie tych badań przeprowadzono charakterystykę struktury cienkich warstw PMMA o różnej taktyczności. Po wytworzeniu cienkich warstw PMMA ich topografia i grubość została zmierzona za pomocą AFM oraz profilometrii (Rysunek 4.1.). Grubość badanych próbek była taka sama dla wszystkich taktyczności i wynosiła około 27 nm. Ponadto otrzymane obrazy AFM pokazują płaskie powierzchnie, bez żadnych różnic w ich topografii czy chropowatości (RMS poniżej 0,5 nm) dla wszystkich taktyczności.



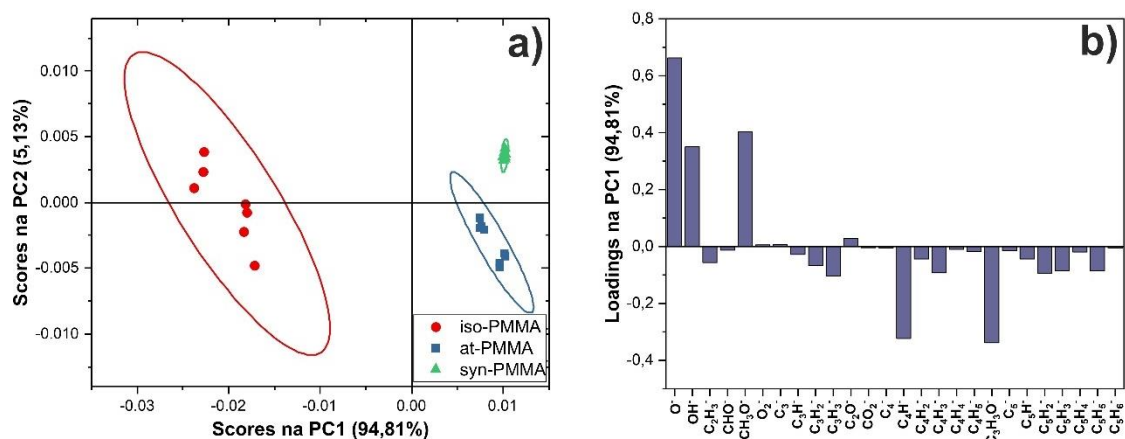
Rysunek 4.1. Obrazy topografii cienkich warstw PMMA o różnej taktyczności wraz ze zmierzonymi wartościami grubości danej warstwy.

Jako, że topografia warstw nie wykazała różnic między taktycznościami w następnym kroku przeanalizowano chemię powierzchni warstw polimerowych, co było możliwe dzięki wykorzystaniu metody ToF-SIMS w połączeniu z wielowymiarową analizą danych. ToF-SIMS dostarcza informacji na temat najbardziej zewnętrznego obszaru warstwy polimerowej (1 – 1,5 nm), dzięki czemu można go wykorzystać do oceny, które fragmenty łańcucha polimerowego są wystawione na działanie środowiska zewnętrznego – podobnie jak to zrobiono w Rozdziale 3. [150] Zbiór danych wykorzystany do PCA został utworzony z intensywności 26 pików (wyszczególnionych w Tabeli 4.1.), które odpowiadają jonom ujemnym będących fragmentami łańcuchów PMMA.

Tabela 4.1. Sygnały ToF-SIMS wraz z masami, które zostały wykorzystane do przeprowadzenia PCA dla warstw PMMA o różnej taktyczności.

Sygnał	Masa (u)	Sygnał	Masa (u)
O ⁻	15,9955	C ₄ H ⁻	49,0095
OH ⁻	17,0033	C ₄ H ₂ ⁻	50,0156
C ₂ H ₃ ⁻	27,0253	C ₄ H ₃ ⁻	51,0254
CHO ⁻	29,004	C ₄ H ₄ ⁻	52,0313
CH ₃ O ⁻	31,0231	C ₄ H ₅ ⁻	53,042
O ₂ ⁻	31,9894	C ₃ H ₃ O ⁻	55,0233
C ₃ ⁻	36,0009	C ₅ ⁻	60,0022
C ₃ H ⁻	37,0088	C ₅ H ⁻	61,013
C ₃ H ₂ ⁻	38,0167	C ₅ H ₂ ⁻	62,017
C ₃ H ₃ ⁻	39,0254	C ₅ H ₃ ⁻	63,0248
C ₂ O ⁻	39,9956	C ₅ H ₄ ⁻	64,0318
CO ₂ ⁻	43,9915	C ₅ H ₅ ⁻	65,0416
C ₄ ⁻	48,0006	C ₅ H ₆ ⁻	66,0454

Pierwsza główna składowa (PC1) opisująca kierunek nieskorelowanych głównych zmian odpowiada za 94,81% całkowitej wariancji w całym zestawie danych (Rysunek 4.2.a). Wykres współrzędnych korelacji (*scores*) PC1 vs PC2 wyraźnie pokazuje, że PC1 rozdziela punkty pomiarowe warstwy iso-PMMA, mające ujemne wartości, od warstw at- i syn-PMMA, które wykazują dodatnie wyniki (Rysunek 4.2.a). Jak widać na wykresie współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (*loadings*) (Rysunek 4.2.b), ujemne wyniki są związane z jonami wtórnymi C_xH_y⁻, które są alkilowymi fragmentami głównego łańcucha i ujemnie ładującymi PC1 (Rysunek 4.2.b). Natomiast dodatnie wyniki PC1 wynikają z dodatnich wartości *loadings* na PC1 jonów posiadających w swojej strukturze tlen (O⁻, OH⁻, CH₃O⁻ i C₂O⁻), które są fragmentami estrowych grup metylowych łańcuchów bocznych. Otrzymane wyniki PCA pokazują, że powierzchnia iso-PMMA zawiera mniej grup akrylanowych eksponowanych do środowiska zewnętrznego niż warstwy syn- lub at-PMMA.



Rysunek 4.2. Wykres współrzędnych obserwacji PC1 (a) i odpowiadający mu wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) z analizy PCA widm masowych ToF-SIMS zarejestrowanych dla warstw izotaktycznego (czerwone koła), ataktycznego (niebieskie kwadraty) oraz syndiotaktycznego (zielone trójkąty) PMMA. Elipsy pokazują 95% poziom ufności dla każdego rodzaju próbek.

W ramach potwierdzenia i zweryfikowania orientacji łańcuchów bocznych polimeru, ujawnionej za pomocą ToF-SIMS, zostały dodatkowo przeprowadzone pomiary kątów zwilżania dla formamidu i diiodometanu. Dzięki tym pomiarom jak i podejściu analitycznemu Kaelble-Owens-Wendt, [132,133] możliwe jest określenie swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowych: polarnej i dyspersyjnej. Otrzymane wartości zostały przedstawione w Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Swobodna energia powierzchniowa i jej składowe wyliczone dla iso-, at- i syn-PMMA.

	Składowa dyspersyjna [mN/m]	Składowa polarna [mN/m]	Swobodna energia powierzchniowa [mN/m]
iso-PMMA	39,3 (1,4)	4,3 (0,1)	43,6 (1,5)
at-PMMA	39,7 (0,5)	5,3 (0,1)	45,0 (0,6)
syn-PMMA	38,5 (2,6)	6,6 (0,1)	45,1 (2,7)

Wyniki przedstawione w Tabeli 4.2. pokazują, że obliczone wartości SFE, jak również ich składowe dyspersyjne są porównywalne dla wszystkich polimerów w ramach oszacowanych niepewności. Z kolei różnice obserwuje się dla polarnej składowej SFE, która jest niższa dla warstw iso-PMMA w porównaniu do warstw at- i syn-PMMA. Wyniki te korespondują z wynikami PCA i potwierdzają powierzchniową akumulację polarnych estrowych grup funkcyjnych dla warstw at- i syn-PMMA, podczas gdy grupy te są ukryte głębiej dla iso-PMMA. Co więcej, rezultat ten potwierdza wyniki uzyskane przez X. Vanden Eynde, który w swojej pracy wykazał, że izotaktyczność prowadzi do zmniejszenia na powierzchni stężenia grup związanych z łańcuchami bocznymi PMMA [5] (stosunek grupy bocznej do łańcucha głównego wyliczone na podstawie wyników ToF-SIMS pokazano w Tabeli 4.3.).

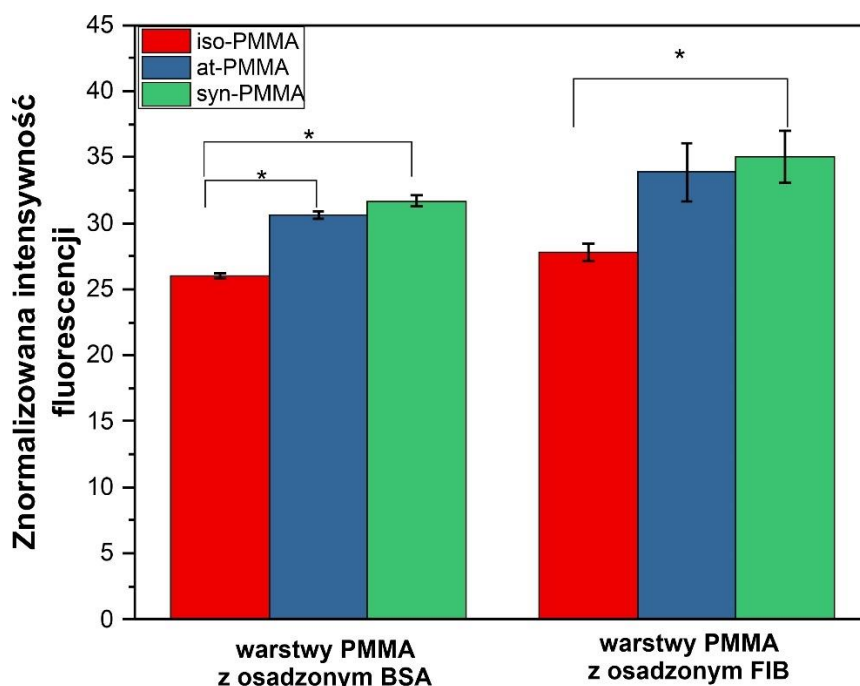
Tabela 4.3. Wyliczone parametry intensywności znormalizowanych sygnałów od łańcucha głównego i grupy estrowej dla widm jonów ujemnych PMMA ToF-SIMS i ich proporcje.

	iso-PMMA	at-PMMA	syn-PMMA
łańcuch	0,495(0,009)	0,454(0,009)	0,451(0,009)
Grupa boczna	0,505(0,039)	0,546(0,041)	0,549(0,042)
Stosunek grupa boczna/łańcuch	1,021	1,201	1,218

4.3.2. Adsorpcja białek do warstw PMMA o różnej taktyczności

4.3.2.1. Wpływ taktyczności PMMA na ilość zaadsorbowanego białka

Po określeniu właściwości cienkich warstw PMMA został rozpoczęty drugi etap badań mający na celu porównanie efektywności adsorpcji białek do warstw PMMA o różnej taktyczności. W tym celu na przygotowane podłoża zostały osadzone białka znakowane fluorescencyjnie: BSA oraz fibrynogen. Warstwy polimerowe z zaadsorbowanymi białkami zostały zobrazowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, a następnie otrzymane obrazy zostały przeanalizowane według podejścia geometrii całkowitej w szczególności za pomocą miar Minkowskiego.



Rysunek 4.3. Adsorpcja surowiczej albuminy wołowej (BSA) i fibrynogenu (FIB) do cienkich warstw izotaktycznego, ataktycznego i syndiotaktycznego PMMA. (* istotnie statystycznie różnice między grupami, $p < 0.05$)

Przeprowadzona analiza porównawcza zdjęć fluorescencyjnych, które zostały zebrane dla obu rodzajów białek ukazuje, że większa ilość białka (a przez to mocniejsza

fluorescencja) widoczna jest na warstwach at- i syn-PMMA niż dla warstw iso-PMMA (Rysunek 4.3.). Zależność ta jest dowodem na to, że taktyczność tego polimeru wpływa na ilość zaadsorbowanych białek. Co więcej zaprezentowane wyniki, są zgodne z wynikami przedstawionymi przez prof. Serizawę. [54,156,157]

4.3.2.2. Analiza ToF-SIMS białek zaadsorbowanych na warstwach PMMA

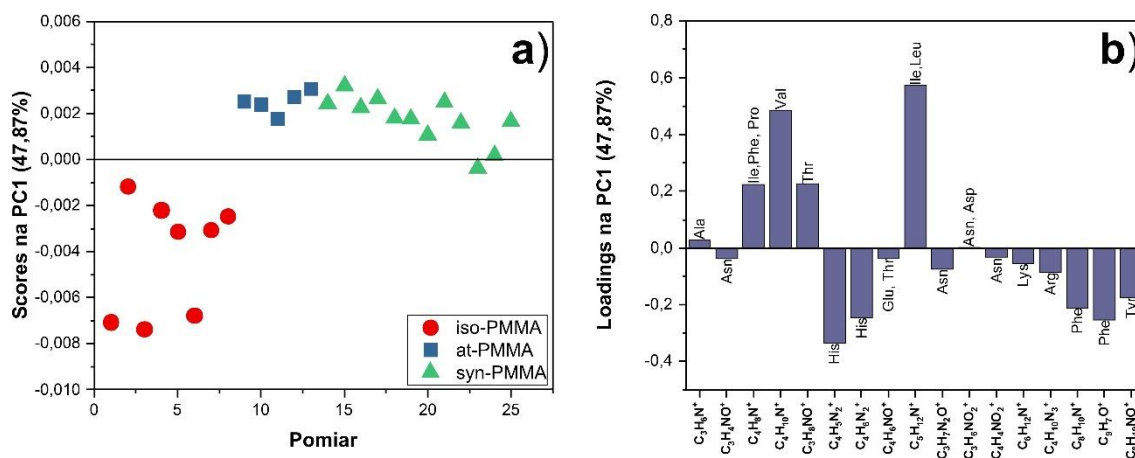
Badania nad ilością zaadsorbowanego białka na powierzchni PMMA o różnej taktyczności są już szeroko znane. Jednak na próżno szukać prac, które by traktowały nie tylko o samej adsorpcji, ale o tym jakie zmiany w orientacji czy też konformacji zachodzą podczas adsorpcji na warstwach PMMA i wpływu taktyczności danego podłoża na ten proces. Dlatego też aby przeanalizować, w jaki sposób taktyczność polimeru i różnice w składzie chemicznym powierzchni warstwy wpływają na oddziaływanie z molekułami białek, zostały przeprowadzone dalsze badania z użyciem ToF-SIMS i PCA dla BSA zaadsorbowanego na cienkich warstwach PMMA o różnej taktyczności.

Wynik analizy głównych składowych przeprowadzonej na zbiorze danych zawierającym intensywności pików pochodzących wyłącznie od aminokwasów pokazano na Rysunku 4.4. Każdy punkt w przestrzeni zdefiniowanej przez wyniki PC1 odpowiada widmu jonów dodatnich, z którego wybrano piki wymienione w Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Sygnały ToF-SIMS, ich masy i pochodzenie od aminokwasów wybrane do analizy głównych składowych z widm masowych BSA adsorbowanego na warstwach PMMA.

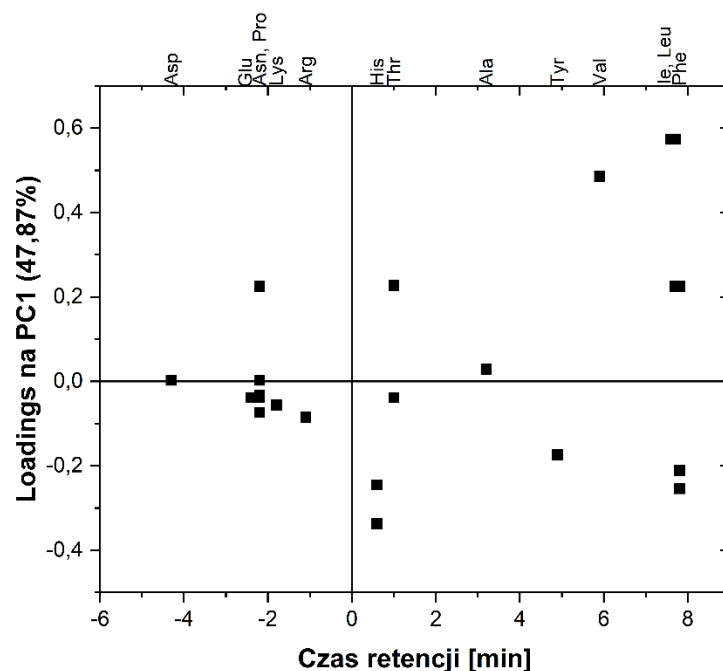
Sygnał	masa (u)	aminokwas
$C_3H_6N^+$	56,0488	Ala
$C_3H_4NO^+$	70,0264	Asn
$C_4H_8N^+$	70,069	Ile, Phe, Pro
$C_4H_{10}N^+$	72,0849	Val
$C_3H_8NO^+$	74,0592	Thr
$C_4H_5N_2^+$	81,046	His
$C_4H_6N_2^+$	82,052	His
$C_4H_6NO^+$	84,0416	Glu, Thr
$C_5H_{12}N^+$	86,1021	Ile, Leu
$C_3H_7N_2O^+$	87,0589	Asn
$C_3H_6NO_2^+$	88,0379	Asn, Asp
$C_4H_4NO_2^+$	98,0228	Asn
$C_6H_{12}N^+$	98,1002	Lys
$C_4H_{10}N_3^+$	100,089	Arg
$C_8H_{10}N^+$	120,0767	Phe
$C_9H_7O^+$	131,0496	Phe
$C_8H_{10}NO^+$	136,0721	Tyr

PC1, która opisuje największą zmienność (47,87% wariancji) w zestawie danych, ujawnia różnice w strukturze warstwy BSA zaadsorbowanej do PMMA o różnej taktyczności. Widoczne jest, że zmierzone widma dzielą się na dwie grupy (Rysunek 4.4.a). Próbki z BSA zaadsorbowanym do at- i syn-PMMA mają dodatnie wartości na PC1, podczas gdy punkty pomiarowe dla warstw iso-PMMA mają wartości ujemne na PC1. Udział poszczególnych sygnałów ToF-SIMS w PC1, pokazany na Rysunku 4.4.b (zwany wykresem współczynników wkładu od poszczególnych składników - *loadings*), wskazuje, że separacja pochodzi z sygnałów związanych z fragmentami różnych aminokwasów. Ujemne wartości na PC1 są powiązane z fragmentami histydyny, fenyloalaniny i tyrozyny. Z kolei dodatnie wartości na PC1 wynikają z wyższej intensywności jonów pochodzących od waliny, treoniny, izoleucyny i leucyny. Oznacza to, że regiony BSA bogate w te aminokwasy są wyeksponowane na warstwach PMMA i różnią się w zależności od taktyczności.



Rysunek 4.4. Analiza orientacji BSA za pomocą PCA danych ToF-SIMS. (a) Wykres współrzędnych obserwacji PC1 jonów dodatnich z widm ToF-SIMS zebranych dla BSA zaadsorbowanego na warstwach iso-PMMA (czerwone koła), at-PMMA (niebieskie kwadraty) oraz syn-PMMA (zielone trójkąty). (b) Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC1 odpowiadający wykresowi średnich wartości składu pokazanemu w (a).

Jedną z przyczyn różnic powodujących rozdzielanie punktów przez PCA może być denaturacja molekuł BSA. W takiej sytuacji obecność hydrofobowych aminokwasów zwykle ukrytych głębiej w strukturze białka powinna być obserwowana na jego powierzchni warstwy białka. Aby zweryfikować, czy zaobserwowane zmiany w najwyższej warstwie BSA zaadsorbowanej na różnych warstwach PMMA są związane z denaturacją BSA, została przeprowadzona analiza względnej miary hydrofobowości łańcuchów bocznych aminokwasów, która została również wykorzystana w rozdziale 3.3.3.2., a następnie została wykreślona względem ładunków na PC1 (Rysunek 4.5.). [126]

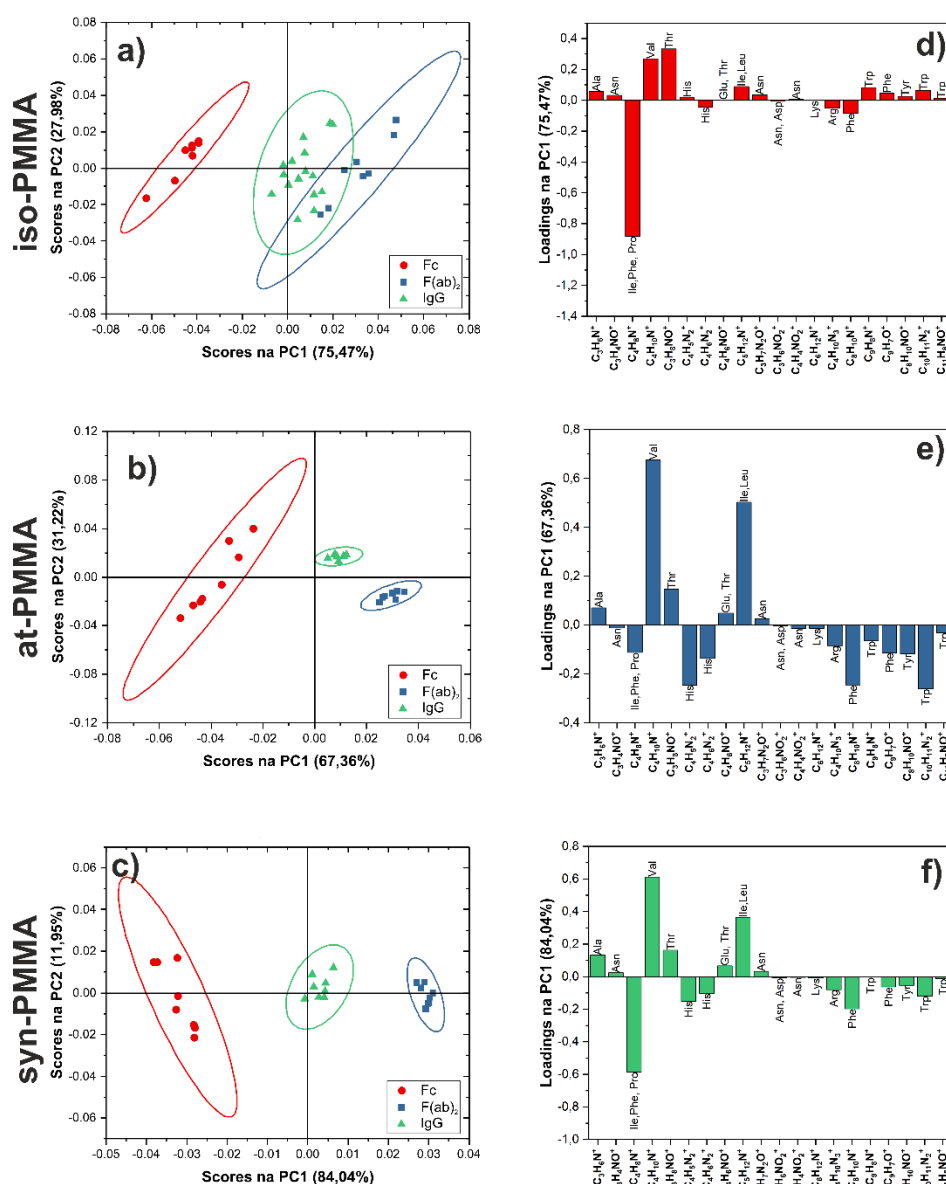


Rysunek 4.5. Hydrofobowość łańcuchów bocznych aminokwasów zdefiniowana jako różnica w czasie retencji (Δt_R) w odniesieniu do peptydu glicyny wykreślona względem wartości współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC 1 dla BSA zaadsorbowanego na cienkich warstwach PMMA.

Celem takiej analizy jest pomoc w określeniu, czy istnieje korelacja między hydrofobowością aminokwasów a ich ekspozycją przez molekuły białka zaadsorbowane na określonym typie powierzchni (iso-PMMA vs. syn- i at- PMMA). Uzyskany wykres wyraźnie pokazuje, że nie można wskazać korelacji między PC1 a zmianami konformacji cząsteczek BSA zaadsorbowanych na PMMA o różnej taktyczności. Świadczy to o tym, że rozdzielanie punktów przez PC1 nie jest wynikiem denaturacji BSA, lecz może być związane ze zmianą orientacji molekuł wywołaną oddziaływaniami z różnymi grupami chemicznymi eksponowanymi na powierzchni PMMA o różnej taktyczności.

Tak jak zostało to opisane to w Podrozdziale 2.1.2.1. cząsteczki BSA składają się z trzech domen (albumina I, albumina II i albumina III) o porównywalnej liczbie aminokwasów (albumina I - 191, albumina II - 193 i albumina III - 198), ale o różnym składzie. [84] Wykorzystując fakt, że głębokość próbkowania ToF-SIMS jest mniejsza niż rozmiar białka, możliwa jest analiza aminokwasów obecnych na powierzchni białka, która dostarcza informacji o orientacji całej molekuły białka. [150] Dlatego też kolejnym krokiem była analiza struktury przestrzennej surowiczej albuminy wołowej i skorelowanie jej z wynikami PCA (tak jak to zrobiono w Podrozdziale 3.3.3.2.). Na podstawie tej analizy można zauważyć, że histydyna, fenyloalanina i tyrozyna, które są eksponowane na powierzchni molekuły BSA zaadsorbowane do warstw iso-PMMA, występują w większej ilości w albuminie I niż w albuminie II i albuminie III (His: 8 vs 6 i 3, Phe: 11 vs 7 i 9, Tyr: 9 vs 7 i 4). Z kolei występowanie treoniny (7 i 7 vs 17) i waliny (6 i 11 vs 19) jest najwyższe dla albuminy III. Dlatego połączenie danych PCA z analizą struktury BSA sugeruje, że molekuły BSA zaadsorbowane do warstw iso-PMMA eksponują albuminę I, podczas gdy albumina III jest eksponowana przez cząsteczki białka zaadsorbowane do cienkich warstwach at- i syn-PMMA.

Jako że badania przeprowadzone dla BSA sugerują modyfikację orientacji cząsteczek białka, która jest indukowana przez grupy chemiczne eksponowane przez łańcuchy polimerowe, zostały przeprowadzone dodatkowe badania z wykorzystaniem innego białka. IgG jest molekułą w kształcie litery Y, dla której orientacja zaadsorbowanego białka jest niezwykle ważna i ma duży wpływ na jej aktywność. Ponieważ IgG posiada większą i bardziej złożoną molekułę niż BSA, aby zweryfikować wpływ taktyczności na dominującą orientację zaadsorbowanej IgG, została przeprowadzona analiza ToF-SIMS nie tylko całej cząsteczki, ale również jej fragmentów ($F(ab)_2$ i Fc), które zostały zaadsorbowane do cienkich warstwach iso-, at- i syn-PMMA. Analiza PCA została przeprowadzona oddzielnie dla trzech różnych taktyczności PMMA, a jej wyniki zostały pokazane na Rysunku 4.6.



Rysunek 4.6. Analiza składowych głównych całych przeciwciał oraz ich fragmentów $F(ab)_2$ i Fc zaadsorbowanych na a) iso-PMMA, b) at-PMMA i c) syn-PMMA cienkich warstwach. Odpowiadające wykresy współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów zostały przedstawione na wykresach (d-f). Elipsy pokazują 95% poziom ufności dla każdego rodzaju próbek.

Widoczne jest, że dla każdej z warstw punkty pomiarowe (Rysunek 4.6.a-c) zostały pogrupowane w trzy dobrze oddzielone klastry związane z całą molekułą IgG (zielony) oraz jej fragmentami F(ab)₂ (niebieski) i Fc (czerwony). Dla wszystkich analiz PC1 wyraźnie rozróżniło fragmenty F(ab)₂ i Fc ze względu na ich różny skład aminokwasowy, [93] a punkty dla całych molekuł znajdują się pomiędzy tymi dwoma grupami. Jednakże dla warstw iso-PMMA widoczne jest nakładanie się punktów pomiarowych pochodzących od powierzchni z zaadsorbowanymi całymi molekuł IgG i fragmentami F(ab)₂ (Rysunek 4.6a). Wskazuje to, że zewnętrzne regiony warstw IgG zaadsorbowanej na iso-PMMA są zdominowane przez fragmenty F(ab)₂ (czyli cała molekuła przyjmuje dominującą orientację end-on), podczas gdy IgG zaadsorbowane na at- i syn-PMMA wykazują mieszaną orientację – część molekuł w orientacji head-on, a część w end-on.

Występujące różnice w orientacji molekuł białek są wynikiem ekspozycji różnych grup chemicznych łańcuchów polimerowych na powierzchni, która jest zależna od rodzaju taktyczności PMMA. Zgodnie z literaturą, dwie główne siły napędowe determinujące adsorpcję białek i ich orientację to oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Dlatego, aby lepiej zrozumieć zjawisko modyfikujące orientację zaadsorbowanych białek, został wzięty pod uwagę ładunek i indeks alifatyczny różnych domen cząsteczek BSA i IgG.

Ładunek całej cząsteczki białka zależy od jej punktu izoelektrycznego (IEP). Jednak rozkład ładunku w cząsteczce nie jest jednorodny ze względu na różny skład aminokwasów, dlatego też różne domeny białkowe będą miały różny ładunek netto. BSA (IEP około 4.7 - 5) przy pH 7 jest naładowane ujemnie, a ładunki netto różnych domen są różne i równe -7.8, -9.0 i -1.3 odpowiednio dla albumin I, II i III. [158] Z drugiej strony IgG (IEP ~ 7) przy pH 7 jest neutralne, ale punkt izoelektryczny fragmentów F(ab)₂ i Fc wynosi odpowiednio 8.5 i 6.1. W rezultacie fragment Fc jest naładowany ujemnie, a F(ab)₂ jest naładowany dodatnio, natomiast cała cząsteczka IgG ma moment dipolowy skierowany od fragmentu Fc do fragmentu F(ab)₂. Z kolei indeks alifatyczny określa względną objętość reszt alifatycznych w domenie białkowej. [159] Wartości indeksu dla poszczególnych białek zostały wyliczone w oparciu o narzędzie *ProtParam* dostępne na stronie internetowej *Expasy* (<http://www.expasy.org>). Narzędzie to pozwala na obliczenie różnych parametrów fizycznych i chemicznych dla danej sekwencji aminokwasowej. Indeks alifatyczny dla BSA został obliczony dla każdej z domen korzystając z sekwencji 4F5S dostępnej w *Protein Data Bank*. Z kolei dla IgG, gdzie dokładna sekwencja nie jest znana, zostały wykonane obliczenia dla kilku sekwencji opisujących różne fragmenty króliczego IgG dostępnych również w *Protein Data Bank* (Fab: 7RA7, 7D9Z, 7MFR, 4HBC; Fc: 2VUO). Wszystkie wyniki zostały przedstawione w Tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Wartość wyliczonego indeksu alifatycznego dla BSA i jej domen oraz dla fragmentów IgG.

Białko	domena	Indeks alifatyczny
BSA	Albumina I	64.4
	Albumina II	80.0
	Albumina III	82.6
IgG	Fc	70.4
	F(ab) ₂	69.9

Analiza struktury BSA pokazuje, że wszystkie domeny BSA są naładowane ujemnie, ale istnieje duża różnica w indeksie alifatycznym. Sugeruje to, że to właśnie interakcje hydrofobowe są odpowiedzialne za zmiany orientacji BSA. Patrząc na wyniki PCA dla BSA, można zauważyć, że albumina III o najwyższej wartości indeksu alifatycznego jest zorientowana w kierunku powierzchni iso-PMMA, gdzie eksponowane są niepolarne fragmenty alkilowe (np. grupy α -metylowe) i grupy łańcucha głównego PMMA. Z kolei albumina I, która posiada najniższą wartość indeksu alifatycznego jest zorientowana w stronę warstw syn- i at-PMMA, dla których polarna część energii powierzchniowej jest najwyższa. Z drugiej strony, oddziaływania elektrostatyczne muszą być bardziej dominujące w orientacji cząsteczek IgG, ponieważ wartości indeksu alifatycznego dla Fc i F(ab)₂ są porównywalne i równe ~ 70 . Dlatego grupa estrowa odsłonięta na powierzchni at- i syn-PMMA przyciąga dodatnio naładowany fragment F(ab)₂ cząsteczek IgG, w wyniku czego część molekuł zmienia swoją orientację. Podobne zachowanie zostało zaobserwowane w przypadku PtBMA (Rozdział 3.), gdzie również zostało wykazane, że ekspozycja grupy estrowej modyfikuje orientację zaadsorbowanej IgG poprzez oddziaływania elektrostatyczne z fragmentami F(ab)₂.

4.4. Podsumowanie

W tym rozdziale zostały przedstawione wyniki przeprowadzonych badań nad wpływem taktyczności PMMA na właściwości cienkich warstw jak i ich oddziaływanie z białkami.

Dzięki zastosowaniu metody ToF-SIMS połączonej z analizą PCA zostały wykazane różnice w chemii powierzchni warstw o różnej taktyczności. Warstwy at- i syn-PMMA wykazują powierzchniowe nagromadzenie polarnych estrowych grup funkcyjnych podczas gdy grupy te są ukryte głębiej dla iso-PMMA. Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone przez obliczenia swobodnej energii powierzchniowej, które wykazały różnice dla polarnej części składowej SFE, która jest niższa dla iso-PMMA w porównaniu do pozostałych dwóch warstw.

Znając różnice w właściwościach warstw został zbadany wpływ taktyczności PMMA na adsorpcję białek (z wykorzystaniem BSA, IgG i FIB). Obrazowanie fluorescencyjne ukazało, że większa ilość molekuł białka adsorbowana jest do warstw syn- i at-PMMA niż do warstw iso-PMMA. Z kolei analiza PCA danych ToF-SIMS w połączeniu z analizą struktury molekuł BSA jak i IgG pozwoliła na opis orientacji białek i wykazała różne mechanizmy oddziaływań polimer-białko, które są spowodowane różną kompozycją

chemiczną powierzchni warstwy polimerowej. Przeprowadzone badania ujawniły, że oddziaływania hydrofobowe są odpowiedzialne za zmiany orientacji BSA, podczas gdy oddziaływania elektrostatyczne są bardziej dominujące przy zmianie orientacji molekuł IgG podobnie jak we wcześniejszych badaniach dla warstw PtBMA (Rozdział 3).

Materiał przedstawiony w tym rozdziale zawiera część wyników przygotowywanej publikacji: **N. Janiszewska**, K. Gajos, J. Raczkowska, K. Awsiuk, *Protein orientation and polymer phase separation induced by poly(methyl methacrylate) tacticity*.

ROZDZIAŁ 5

Wpływ taktyczności polimerów na separację fazową mieszaniny PMMA+PtBMA

5.1. Wprowadzenie

W ostatnich latach mikromacierze stały się obiektem szeroko zakrojonych badań ze względu na szereg potencjalnych zastosowań w zakresie diagnostyki, medycyny, inżynierii tkankowej czy też biosensorów. Mikromacierze są to uporządkowane wzory molekuł, mające rozmiary rzędu kilku mikrometrów. [160] W swojej pierwotnej formie były wykorzystywane do analizy opartej na DNA, jednak obecnie mikromacierze oparte na białkach są również powszechnie stosowane w badaniach naukowych i klinicznych, głównie w diagnostyce i opracowywaniu leków ze względu na ich wysoką skuteczność w wykrywaniu biomarkerów i przeciwciał. [161] Swoje szerokie zastosowanie mikromacierze zawdzięczają specyficznemu i przestrzennemu rozmieszczeniu białek. Dzięki temu możliwa jest precyzyjna i równoczesna charakterystyka złożonych procesów biologicznych. Szereg kryteriów, które muszą spełnić mikromacierze białkowe powoduje, że cały czas dąży się do znalezienia perfekcyjnej metody ich wytwarzania. Obecnie głównym trendem w tworzeniu mikromacierzy jest wykorzystanie wstępnie ukształtowanych powierzchni polimerowych [162,163], gdzie największym zainteresowaniem cieszą się mikromacierze białkowe oparte na wzorach polimerowych. Tworzone są one przy użyciu miękkiej litografii. [129,160], jednak optymalizacja kształtu przygotowanej powierzchni nadal wymaga szeroko zakrojonych badań, głównie ze względu na bardzo złożoną interakcję białek z powierzchniami. [163] Przy chęci zastosowania materiałów na bazie polimerów, kluczowe jest określenie, w jaki sposób oddziałują one z biomolekułami, gdyż interakcje polimer – białko znacząco wpływają na cały proces immobilizacji molekuł. Za wykorzystaniem materiałów polimerowych przemawia również fakt, że dotychczasowe procesy wytwarzania macierzy składają się z wielu etapów i posiadają niewielkie możliwości modyfikacji. Dlatego też ważne jest opracowanie prostszych metod wytwarzania wzorów białkowych bez tracenia na ich efektywności i wydajności.

W tym rozdziale zostały przedstawione badania nad wpływem taktyczności polimerów PMMA i PtBMA na ich separację faz w cienkich warstwach polimerowych oraz nad wpływem właściwości podłoża na kontrolę tego procesu. Warstwy te zostały wytworzone dwiema różnymi technikami – spin-coating i horizontal dipping. Wykorzystanie metody h-dip umożliwiło wytworzenie znacznie większych domen o mikrometrowych rozmiarach. Następnie zostały wytworzone uporządkowane wzory polimerowe dzięki wykorzystaniu techniki druku mikrokontaktowego. Wykorzystując różną adsorpcję białek, zarówno ze względu na rodzaj polimeru jak i jego taktyczność, przygotowane wzory iso-PMMA+at-PtBMA zostały użyte jako podłoża do modelowych mikromacierzy białek.

5.2. Wykorzystane metody badawcze

5.2.1. Przygotowanie podłoży

Podczas badań zostało wykorzystane sześć polimerów: izotaktyczny, ataktyczny i syndiotaktyczny PtBMA (Podrozdział 3.2.1.) oraz izotaktyczny, ataktyczny i syndiotaktyczny PMMA (Podrozdział 4.2.1.). Każdy z polimerów został rozpuszczony w chlorobenzenie tworząc roztwory o stężeniu 20 mg/ml. Następnie roztwory zostały zmieszane ze sobą w stosunku objętościowym 1:1, tworząc dziewięć mieszanin PMMA+PtBMA.

Cienkie warstwy mieszanin polimerów. Cienkie warstwy mieszanin zostały przygotowane z wykorzystaniem dwóch technik: spin-coatingu o prędkości powlekania $\omega = 2200$ obr./min lub horizontal-dippingu o prędkości poruszania się głowicy 5 mm/s. W pierwszej iteracji jako podłoża zostały wykorzystane wafle krzemowe, a w drugim podejściu na podłoża krzemowe najpierw został nałożony roztwór APTES. Po przygotowaniu, wszystkie warstwy były wygrzane przez 1 godzinę w temperaturze 60°C.

Uporządkowane wzory polimerowe. Do stworzenia regularnych wzorów została wykorzystana technika druku mikrokontaktowego. Roztwór APTES został nałożony na wcześniej przygotowany stempel PDMS o zadanym wzorze, a następnie pieczętka została odcisnięta na podłożu krzemowym. Na tak przygotowanych podłożach krzemowych zostały wytworzone warstwy mieszanin polimerowych techniką h-dip przy takich samych ustawieniach jak w przypadku izotropowych mieszanin.

5.2.2. Adsorpcja białek

W celu określenia adsorpcji białek na różnych składnikach mieszanin polimerowych, a także weryfikacji ich aktywności biologicznej zostały wykorzystane dwa podejścia.

W pierwszym aby sprawdzić preferencyjną adsorpcję do jednego z składnika mieszaniny królicze IgG znakowane Alexa Fluor 488 zostało zaadsorbowane na przygotowanych wzorach polimerowych. Kropla roztworu białka o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ została nałożona na podłoże na okres 30 minut, a następnie próbka została przepłukana buforem PBS i wodą oraz wysuszona strumieniem azotu.

W celu sprawdzenia potencjalnego zastosowania regularnych wzorów polimerowych jako mikromacierz białkowych została przeprowadzona procedura immunoreakcji. Warstwy mieszanin zostały inkubowane z roztworem 100 $\mu\text{g/ml}$ króliczego IgG (anty-IgG, specyficznemu przeciwko kozim przeciwciałom) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po przemyciu buforem PBS, próbki zostały zanurzone w buforze blokującym (10 mg/ml roztwór BSA) na 30 minut. Na koniec, po przemyciu PBS i wodą destylowaną, próbki zostały zanurzone w 25 $\mu\text{g/ml}$ roztworu koziego IgG znakowanego Alexa Fluor 488, w buforze blokującym na 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym etapie warstwy zostały jeszcze raz przemycie PBS jak i wodą destylowaną oraz wysuszone pod strumieniem azotu.

5.2.3. Charakterystyka powierzchni

Mikroskopia fluorescencyjna. Adsorpcja białek do warstw mieszanin została zbadana przy użyciu mikroskopu optycznego Olympus BX51, który jest wyposażony w lampę halogenową o mocy 100W, filtr U-MWIG2 i kamerę typu DP72. Wszystkie obrazy zarejestrowano dla wysuszonych próbek przy użyciu programu Cell[^]F. Zostały przeprowadzone dwie serie eksperymentów i dla każdej z nich wykonano co najmniej pięć zdjęć fluorescencyjnych dla każdej próbki.

Mikroskopia sił atomowych (AFM). Obrazy AFM mieszanin polimerowych zostały wykonane za pomocą mikroskopu WITec Alpha 300R pracującego w trybie kontaktowym, wyposażonego w próbki krzemowe o stałej sprężystości 0,2 N/m i częstotliwości rezonansowej około 14 kHz.

Spektroskopia Ramana. Pomiary spektroskopii Ramana zostały przeprowadzone przy użyciu systemu WITec Alpha 300R, wyposażonego w spektrometr UHTS300 i detektor CCD DR316B_LD z siatką 600 g/mm oraz laser 532 nm (moc lasera 10 mW). Obrazy spektralne zostały uzyskane przy użyciu obiektywu 50× w zakresie 140-3400 cm⁻¹ z czasem integracji 1 sekunda i rozdzielczością 100×100 punktów na 20×20 μm. Wszystkie uzyskane mapy ramanowskie były dalej przetwarzane przy użyciu oprogramowania WITec ProjectSIX 6.1. Obrazy zostały poddane usunięciu promieniowania kosmicznego i zastosowaniu procedury odejmowania tła przy użyciu funkcji "shape". Następnie obrazy widm zostały przeanalizowane przy użyciu analizy TCA (z ang. *True Component Analysis*), która pozwala na identyfikację poszczególnych składników próbki poprzez zdefiniowanie podobnych widm jako tego samego składnika i zidentyfikowanie wszystkich pikseli na obrazie, które miały te same cechy widmowe. Następnie zostały wyodrębnione średnie widma komponentów, aby umożliwić identyfikację informacji molekularnych każdego składnika.

5.3. Wyniki

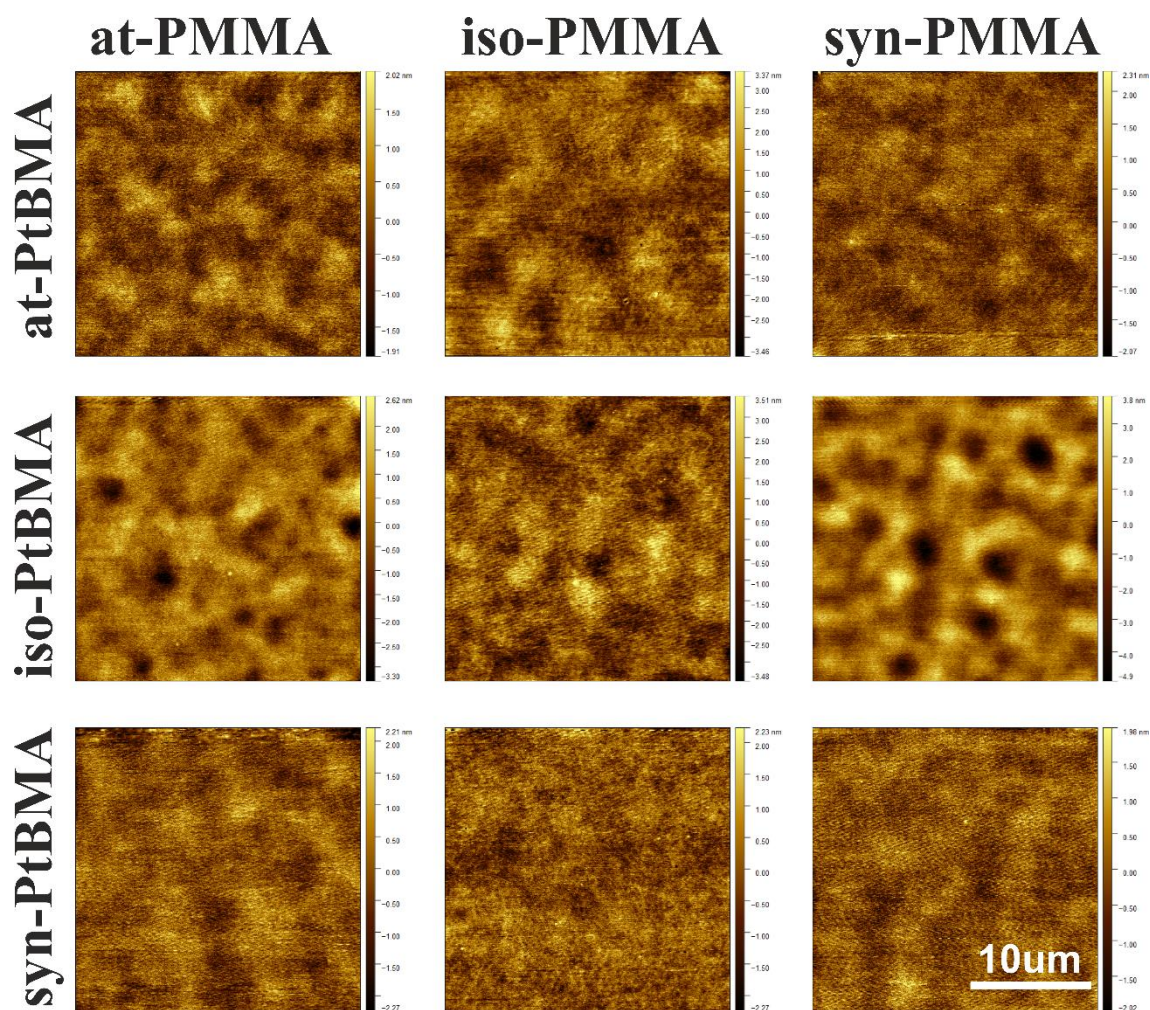
Głównym celem badań było stworzenie mikromacierzy białkowych opartych na mieszaninach polimerowych PMMA+PtBMA oraz ocena, w jaki sposób taktyczność polimerów wchodzących w skład mieszaniny będzie wpływała na przebieg separacji fazowej. Wyniki badań przedstawionych w Rozdziale 3 wskazują na silny wpływ taktyczności PtBMA na interakcje z peptydami, białkami i bakteriami, które były znacząco zmodyfikowane dla izotaktycznego PtBMA w porównaniu z formą syndiotaktyczną i ataktyczną. Co więcej, eksperymenty adsorpcji białek na PMMA, przedstawione w rozdziale 4, pokazują większą ilość molekuł białek zaadsorbowanych na syn- i at-PMMA niż na warstwach iso-PMMA. Dodatkowo wyniki przedstawione przez dr J. Zemę wskazują na większą adsorpcję białek na PtBMA niż na warstwach PMMA. [130]

Biorąc pod uwagę otrzymane we wcześniejszych rozdziałach wyniki, została podjęta próba połączenia właściwości obu polimerów w celu wykorzystania mieszanin PMMA+PtBMA do zastosowań biomedycznych, w szczególności jako platform dla mikromacierzy białkowych poprzez kontrolowanie wzorów powierzchniowych

utworzonych w procesie separacji faz. Głównym założeniem badań było określenie możliwości tworzenia domen faz polimerowych (ze szczególnym uwzględnieniem taktyczności polimerów) wykazujących różne powinowactwo do białek, co w konsekwencji prowadzi do preferencyjnej adsorpcji białek wyłącznie do wybranego składnika mieszaniny.

5.3.1. Charakterystyka separacji fazowej mieszanin PMMA+PtBMA

Tak jak w poprzednich rozdziałach badania zostały rozpoczęte od zbadania topografii i morfologii cienkich warstw polimerowych – w tym przypadku mieszanin składających się z PMMA oraz PtBMA, każdy występujący w trzech różnych taktycznościach. Mieszaniny zostały przygotowane za pomocą techniki spin-coatingu na podłożach SiO_x.



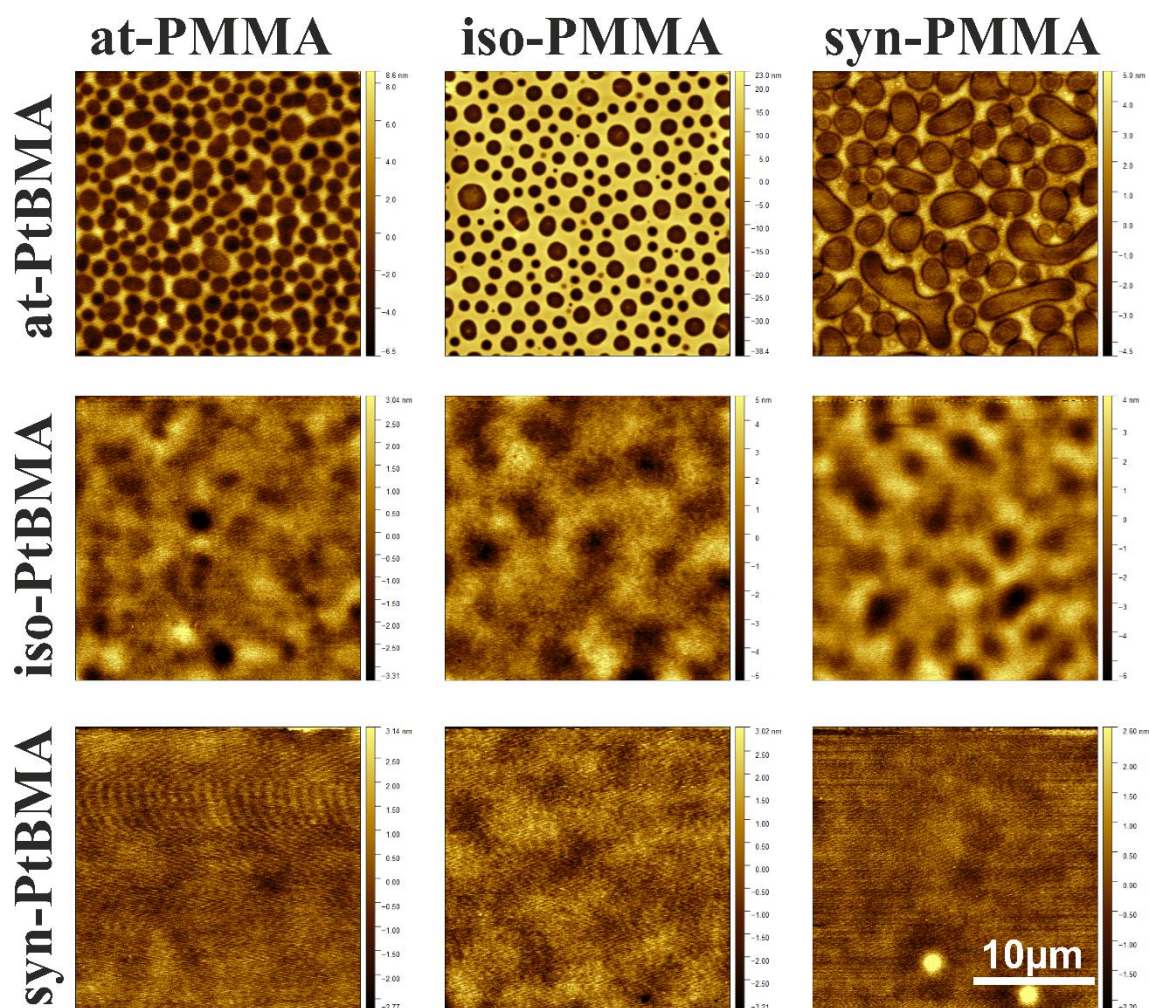
Rysunek 5.1. Topografia warstw mieszanin PMMA+PtBMA na podłożu krzemowym.

Topografia przygotowanych warstw (Rysunek 5.1.) została zmierzona za pomocą AFM i ujawniła płaskie powierzchnie bez widocznych domen dla wszystkich form PMMA zmieszanych z różnymi PtBMA, co wskazuje na proces tworzenia się dwuwarstwy. Biorąc pod uwagę energie powierzchniowe obu polimerów (29,61 mN/m dla syn-PtBMA; 43,6 – 45,1 mN/m dla PMMA) i polarnego podłoża SiO_x (49,4 mN/m), można

wywnioskować, że aby zminimalizować energię międzyfazową, dolna warstwa powinna składać się z PMMA, gdyż posiada energię powierzchniową zbliżoną do energii podłoża, a górna warstwa powinna zawierać w większości PtBMA, który posiada znacznie niższą swobodną energię powierzchniową.

Dla wszystkich mieszanin składających się z at- i iso-PtBMA pofałdowania powierzchni są wyraźnie widoczne. Takie pofałdowania mogą być związane z dwoma efektami, niestabilnością interfejsu polimer-polimer, spowodowaną oddziaływaniami van der Waalsa między podłożem a górną warstwą PtBMA lub niestabilnością swobodnej powierzchni, wynikającą z efektu hydrodynamicznego lub niestabilności konwekcji podczas szybkiego odparowywania rozpuszczalnika. [164] Zaobserwowane pofalowania sugerują, że struktura oddzielonych domen fazowych warstw może być modyfikowana przez destabilizację interfejsu PMMA+PtBMA, spowodowaną oddziaływaniami między podłożem a górną warstwą PtBMA, których siła zależy od wzajemnego oddziaływania energii powierzchniowych PMMA, PtBMA i podłoża.

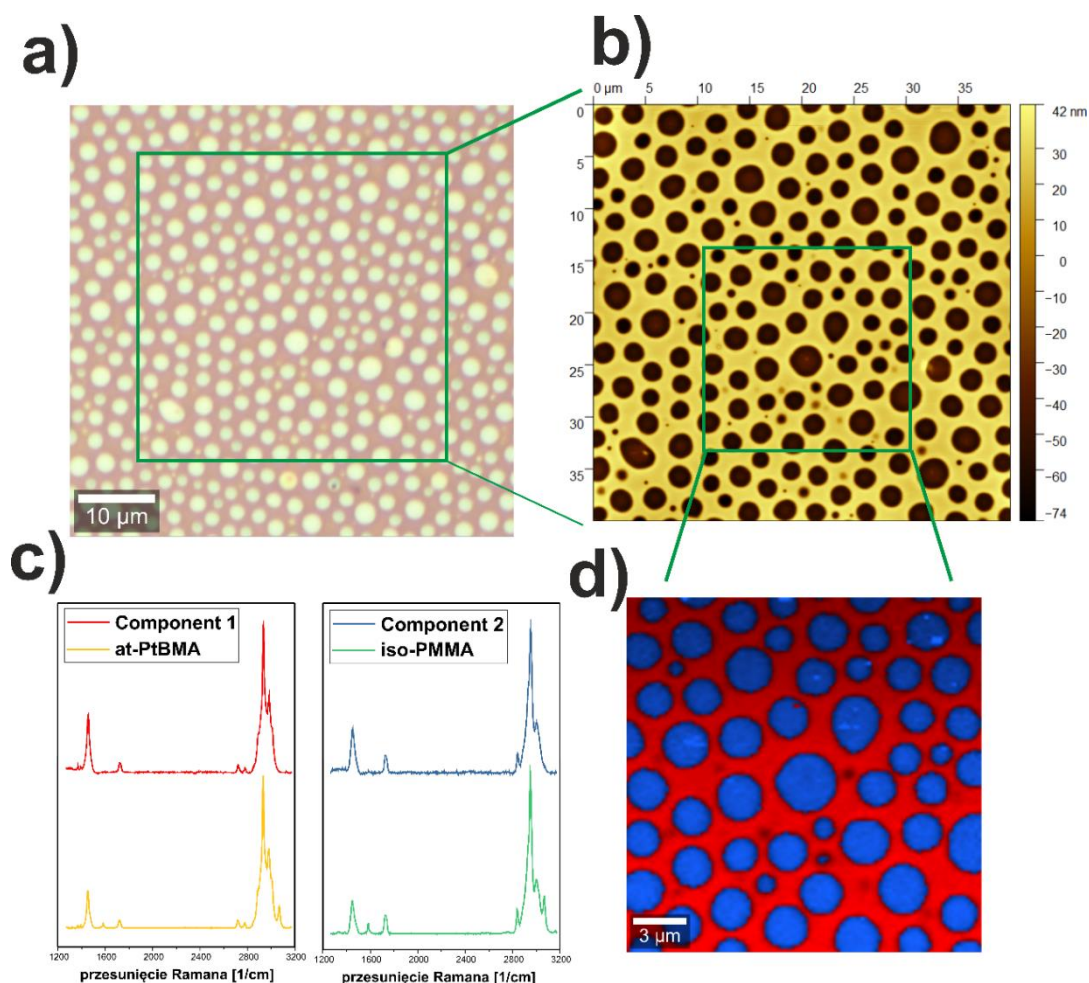
W związku z tym, powierzchnie SiO_x zostały zmodyfikowane za pomocą APTES, charakteryzującego się niższą energią powierzchniową (45,08 mN/m) i zostały wykorzystane jako podłoża do wytworzenia cienkich warstw mieszanin PMMA+PtBMA (proces tworzenia warstw był analogiczny do tworzenia warstw na samym krzemie). Obrazy AFM, które zostały zmierzone dla wytworzonych warstw potwierdziły znacznie bardziej rozwinięty proces separacji faz i powstanie wzorów dwuwymiarowych (Rysunek 5.2.).



Rysunek 5.2. Topografia warstw mieszanin PMMA+PtBMA na podłożu pokrytym APTESem.

Dla mieszanin z syndiotaktycznym PtBMA, które były całkowicie płaskie na SiO_x , widoczne stały się ślady pofałdowań. Z kolei dla warstw mieszanin, które w swoim składzie posiadają iso-PtBMA obserwowane pofałdowania powierzchni są znacznie lepiej rozwinięte w porównaniu do tych na SiO_x . Dodatkowo, w przypadku ataktycznego PtBMA zmieszanego z PMMA, można zauważyć widoczne domeny fazowe.

Ze względu na dobrze rozwiniętą separację faz, preferencyjną orientację przeciwnała zaadsorbowanych na powierzchni at-PtBMA (w porównaniu do iso-PtBMA) oraz niższą adsorpcję białek na iso-PMMA (w porównaniu do at- i syn-PMMA), do dalszych badań została wybrana warstwa złożoną z iso-PMMA i at-PtBMA na podłożu SiO_x modyfikowanym APTESem. Ponadto, w celu szczegółowej weryfikacji składu domenowego, cienkie warstwy składające się z izotaktycznego PMMA i ataktycznego PtBMA zostały zbadane za pomocą spektroskopii Ramana. W tym celu cienkie warstwy zostały przygotowane z wykorzystaniem techniki horizontal dippingu, co umożliwiło otrzymane znacznie większych domen niż w przypadku struktur otrzymanych metodą spin-castingu. Można to stwierdzić poprzez porównanie obrazów topograficznych mieszaniny iso-PMMA+at-PtBMA wytworzonej za pomocą spin-coatingu (Rysunek 5.2.) z warstwą wytworzoną za pomocą horizontal dippingu (Rysunek 5.3.b).



Rysunek 5.3. Przedstawienie domenowej kompozycji mieszaniny iso-PMMA+at-PtBMA, która została potwierdzona przez pomiary AFM-Ramana w tym samym miejscu.

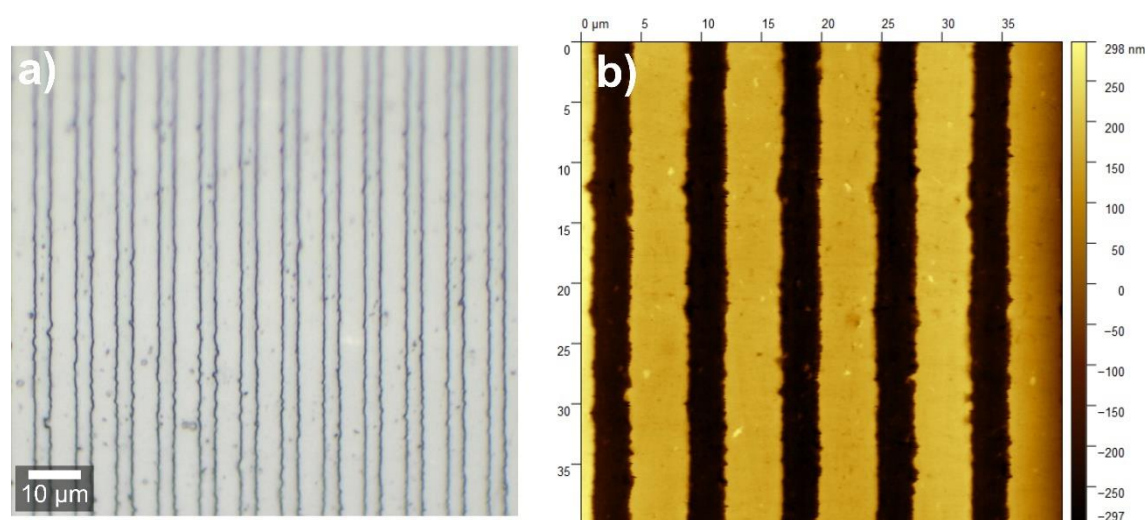
Uzyskane wyniki wskazują na obecność dwóch komponentów, które są przestrzennie oddzielone na powierzchni próbki, co jest doskonale widoczne na obrazie analizy TCA mapy Ramana (Rysunek 5.3.c). Każdy z komponentów charakteryzuje się różnymi widmami nazwanymi komponentem 1 i komponentem 2 (Rysunek 5.3.c), które odpowiadają odpowiednio czerwonym i niebieskim obszarom na mapie Ramana (Rysunek 5.3.d). Aby możliwe było zweryfikowanie, które komponenty odpowiadają obszarom bogatym w iso-PMMA, a które at-PtBMA, ich widma w zakresie $2600 - 3180 \text{ cm}^{-1}$ (który odpowiada najbardziej intensywnym sygnałom) zostały porównane z widmami referencyjnymi zmierzonymi dla czystych polimerów. Korelacja Pearsona składnika 1 z referencyjnymi widmami at-PtBMA i iso-PMMA wyniosła odpowiednio 0,99 i 0,85, podczas gdy dla składnika 2 korelacja z widmami at-PtBMA i iso-PMMA wyniosła odpowiednio 0,84 i 0,99. To pokazuje, że czerwone obszary na mapie są obszarami bogatymi w at-PtBMA, natomiast niebieskie obszary są złożone z iso-PMMA. Dodatkowo porównanie obrazów AFM zarejestrowanych w tym samym miejscu z mapami składu Ramana wyraźnie pokazuje, że podwyższone i obniżone obszary próbki są utworzone przez różne składniki (Rysunek 5.3.b i 5.3.d). Aby je zidentyfikować, mapy AFM zostały porównane z mapami składu określonymi za pomocą spektroskopii Ramana i wykazały

tworzenie się wgłębień o wysokiej zawartości PMMA w podwyższonej matrycy stworzonej przez PtBMA.

5.3.2. Wytworzenie regularnych wzorów polimerowych

W celu potencjalnego zastosowania badanych warstw polimerowych jako szablonów mikromacierzy białkowych, domeny polimerowe powinny być uporządkowane przestrzennie i dobrze zdefiniowane. W przeciwieństwie do izotropowych, nieuporządkowanych struktur powstających zwykle podczas separacji faz cienkich warstw mieszanin polimerów na jednorodnych podłożach, obecność wstępnie ukształtowanego podłoża prowadzi do powstawania domen fazowych o dalekim zasięgu uporządkowania. Jednak jest to możliwe tylko jeśli zostaną odpowiednio dobrane parametry, takie jak grubość warstwy, energia powierzchniowa i międzyfazowa, a także współmierność między miarą powtarzalności wzoru, a skalą domeny. [165,166]

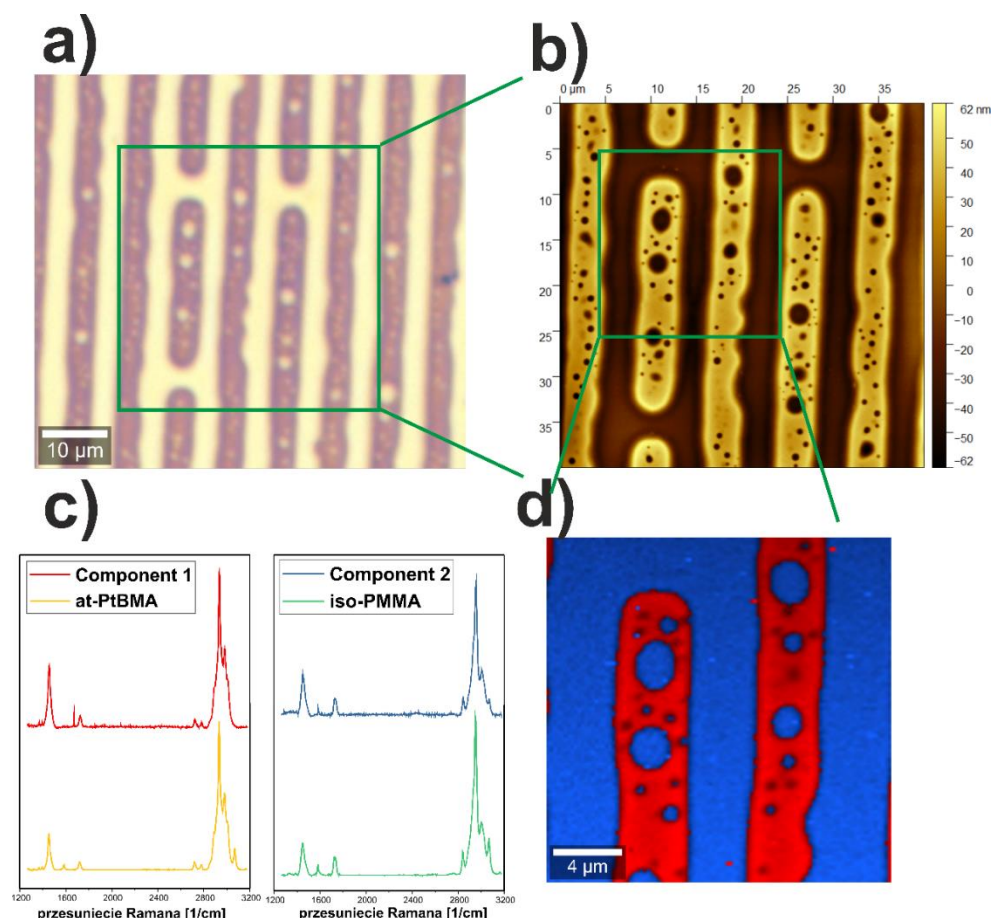
Aby wytworzyć regularne wzory mieszaniny iso-PMMA+at-PtBMA, została zastosowana technika druku mikrokontaktowego w celu modyfikacji podłoża. Aby uzyskać uporządkowany wzór, została zastosowana asymetryczna pieczętka z poli(dimetylosilanu) (PDMS) z wytłoczonym wzorem pasków (Rysunek 5.4.). Wykorzystanie pieczętki o takiej strukturze pozwoliło na otrzymanie wzoru składającego się z naprzemiennych pasków SiO_x i APTES ($3\text{ }\mu\text{m}$ / $5\text{ }\mu\text{m}$) na podłożu.



Rysunek 5.4. Zdjęcie z mikroskopu optycznego (a) oraz mapa AFM topografii (b) asymetrycznej pieczętki o wzorze naprzemiennych pasków.

Analiza topografii warstw wykazała, że dla mieszaniny składającej się z iso-PMMA i at-PtBMA wytworzonej za pomocą techniki spin-coatingu, proces samoorganizacji będzie inaczej przebiegał i będzie zależał od wykorzystanego podłoża: dla podłoża z APTES będą się tworzyły pionowe domeny fazowe (Rysunek 5.4.); natomiast dla samego SiO_x będzie zauważalna dwuwarstwowa struktura (Rysunek 5.1.). Dlatego też, jeśli podłoże będzie wstępnie zmodyfikowane w naprzemienne paski SiO_x i APTES, to paski SiO_x powinny preferencyjnie przyciągać iso-PMMA, a obszary pokryte APTES powinny być pokryte at-PtBMA, który jest wypychany z obszarów SiO_x . Możliwości replikacji wzoru, która jest napędzana preferencyjnymi oddziaływaniami tylko jednego składnika mieszaniny z paskami jednego rodzaju okazała się skuteczna dla układu PS:PVP. [165,166] Efekt ten

został również zaobserwowany w przypadku badanej mieszanki, a domeny polimerowe utworzone w warstwach przygotowanych techniką horizontal dippingu niemal idealnie odzwierciedlają wzór narzucony przez stempel PDMS, co zostało potwierdzone za pomocą mikroskopii optycznej (Rysunek 5.5.a) i AFM (Rysunek 5.5.b).



Rysunek 5.5. Regularne wzory na warstwach iso-PMMA+at-PtBMA wytworzone na podłożu krzemowym z odbitą pieczętką APTESu. Powodzenie procesu replikacji zostało potwierdzenie przez połączenie mikroskopii optycznej (a), AFM (b) oraz spektroskopii Ramana (c-d).

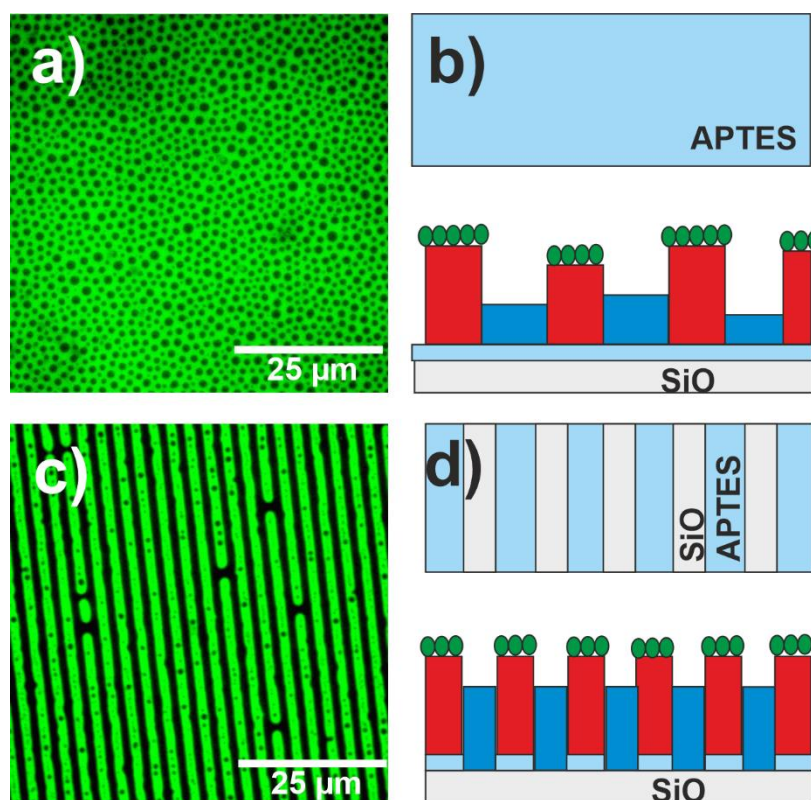
Tak jak w przypadku izotropowych mieszanin, jej uporządkowana wersja tworzy naprzemienne obszary o różnej wysokości. Ponownie wykorzystano spektroskopię Ramana w połączeniu z analizą TCA do określenia, że podwyższone obszary próbki (oznaczone na czerwono na Rysunku 5.5.d) składają się w większości z at-PtBMA.

5.3.3. Selektywna adsorpcja białek do wzorów polimerowych

W ostatnim etapie badań została zweryfikowana możliwość tworzenia wzorów białkowych poprzez selektywną adsorpcję białek do jednego ze składników mieszanki jak również sprawdzono ich aktywność biologiczną i możliwość immunoreakcji z antygenem. W Rozdziale 3 zostało ukazane, że adsorpcja białek do warstw PtBMA jest słabo zależna od jej stereoregularności. Co więcej, adsorpcja białek do warstw PtBMA jest większa niż do warstw PMMA, [130] które zostały opisane w Rozdziale 4.

Dlatego też mieszanina słabo adsorbującego iso-PMMA i at-PtBMA, który posiada zdolność do wysokiej adsorpcji białek powinna umożliwić tworzenie wzorów białkowych.

Hipoteza opisująca możliwość tworzenia wzorów białkowych została zweryfikowana dla obu rodzajów wzorów polimerowych, tj. izotropowych i regularnych z wykorzystaniem dwóch podejść do adsorpcji białek (schemat przedstawiony na Rysunku 5.6.).

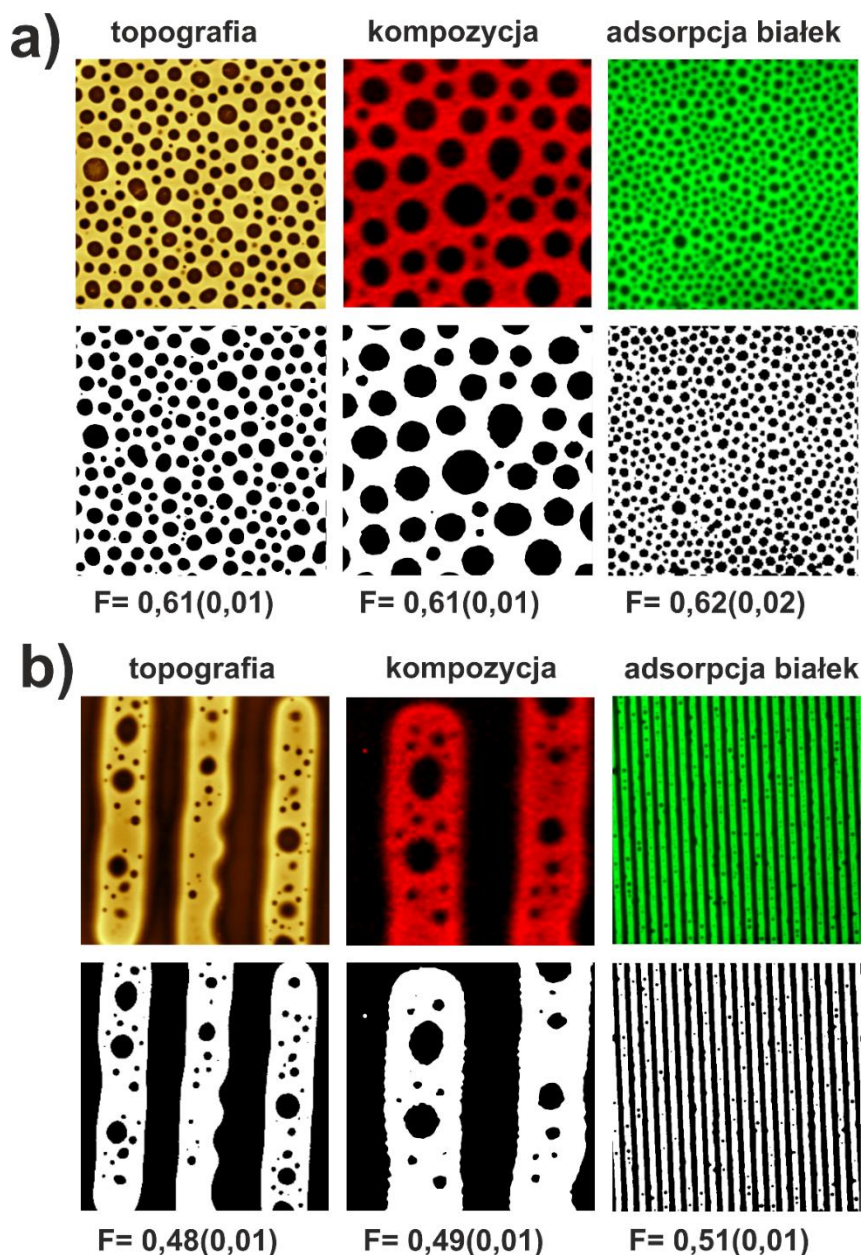


Rysunek 5.6. Adsorpcja białek do izotropowej (a-b) oraz regularnej (c-d) mieszaniny iso-PMMA + at-PtBMA wytworzonej odpowiednio na ciągłej warstwie APTES (a-b) oraz na ukształtowanej warstwie naprzemiennych pasków APTES/SiO_x (c-d). Warstwy mieszanin obrazowane z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (a, c) razem z schematem ilustrującym topografię podłoża i proces adsorpcji białka do domen z at-PtBMA (b, d)

W przypadku regularnych wzorów (pasków) selektywna adsorpcja białka została zweryfikowana przez zanurzenie warstwy polimerowej w roztworze znakowanej fluorescencyjnie króliczej IgG. Następnie próbka została przemyta w buforze i wodzie destylowanej, a później została wysuszona i zebrano obrazy fluorescencyjne. Z kolei w przypadku izotropowych domen fazowych zweryfikowano nie tylko selektywną adsorpcję, ale także aktywność biologiczną wstępnie zaadsorbowanej IgG. Jest to jedna z kluczowych kwestii dla potencjalnych zastosowań biomedycznych wzorów białkowych, ponieważ podczas adsorpcji molekuly białka mogą zmieniać swoją orientację i w rezultacie blokować dostęp do określonej części białka. W celu zbadania, czy selektywna adsorpcja na powierzchniach polimerów z naniesionym wzorem zmniejsza aktywność białek, został przeprowadzony następujący eksperyment. Najpierw nieregularne wzory powierzchniowe iso-PMMA+at-PtBMA zostały pokryte króliczym IgG zdolnym do wychwytu kozich przeciwciał. W kolejnym kroku podłoża inkubowano

w buforze blokującym (roztwór BSA o koncentracji 10 mg/ml w PBS) powszechnie stosowanym do blokowania wszelkich niespecyficznych interakcji. Na koniec próbki zostały inkubowane w roztworze koziego IgG (znakowanym Alexa Fluor 488) rozpuszczonym w buforze blokującym. W tak przeprowadzonej procedurze fluorescencyjnie znakowane molekuly koziej IgG wiążą się tylko specyficznie ze wstępnie zaadsorbowanym króliczym IgG (specyficznym przeciw koziem IgG); dlatego obrazy fluorescencji odpowiadają pozycji wstępnie zaadsorbowanych króliczych IgG i potwierdzają ich aktywność biologiczną.

Otrzymane zdjęcia fluorescencyjne (Rysunek 5.7.) pokazują wzory odzwierciedlające domeny fazowe obserwowane na powierzchni i przedstawione schematycznie na Rysunkach 5.6.b oraz 5.6.d, co jest potwierdzeniem preferencyjnej adsorpcji cząsteczek IgG do domen PtBMA jak i również potwierdzeniem zachowanej aktywności biologicznej.



Rysunek 5.7. Ocena odwzorowania izotropowych (a) jak i regularnych (b) wzorów polimerowych przez zaadsorbowane IgG z wykorzystaniem analizy parametru pokrycia powierzchni. Czarno-białe obrazy powstały z obrazów AFM, Raman i fluorescencyjnych dla ustalonego poziomu odcięcia wyznaczonego przy użyciu analizy geometrii całkowitej. [167]

Obserwacja ta została dodatkowo oceniona jakościowo poprzez wykorzystanie jednej z funkcji Minkowskiego, a mianowicie pokrycia powierzchni **F**. W tym celu oryginalne obrazy topografii AFM, mapy składu Ramana i obrazy fluorescencji (Rysunek 5.7) zostały przekształcone w czarno-białe obrazy przy użyciu analizy geometrii całkowitej i procedury dokładnie opisanej w literaturze, [167] a następnie została obliczona frakcja białego obszaru, która odpowiada wyższym obszarom na obrazach AFM, domenom PtBMA na mapach składu Ramana oraz obszarom z zaadsorbowanym białkiem na obrazach fluorescencyjnych. Zarówno dla izotropowego, jak i regularnego wzoru (Rysunek 5.7) parametr **F** wykazał te same wartości dla wszystkich trzech typów obrazów, potwierdzając idealne dopasowanie topografii i składu obserwowanych domen oraz wskazując na idealne odwzorowanie wzorów polimerowych przez zaadsorbowane białka, a tym samym wytworzone matryce białkowe. Badania te ukazały preferencyjną adsorpcję białek do domen fazy bogatej w PtBMA, a także na zachowanie aktywności biologicznej przez zaadsorbowane molekuly IgG, co jest kluczowym krokiem w produkcji polimerowych mikromacierzy białkowych.

5.4. Podsumowanie

W ramach badań w tym rozdziale została pokazana możliwość wytwarzania mikromacierzy białkowych na bazie mieszanin polimerowych składających się z PMMA i PtBMA. Przeprowadzone badania wykazały, że na podłożach SiO_x proces separacji faz prowadzi do utworzenia struktury dwuwarstwowej dla wszystkich mieszanin PtBMA+PMMA, z dolną warstwą PMMA pokrytą PtBMA. Dwuwymiarowe domeny zaobserwowano tylko dla at-PtBMA zmieszanego z PMMA o różnej taktyczności, gdy SiO_x był zmodyfikowany APTESem. Fakt ten został wykorzystany w kolejnym etapie, w którym mieszaniny polimerów zostały wylane na wstępnie zmodyfikowanym podłożu o naprzemiennych paskach SiO_x i APTES. W tym przypadku proces separacji faz, który jest napędzany preferencyjnymi oddziaływaniami między PMMA i podłożem krzemowym doprowadził do powstania regularnych wzorów polimerowych. Wyższe domeny widoczne na topograficznych obrazach AFM składały się z PtBMA, podczas gdy niższe obszary składały się z PMMA, co potwierdziła spektroskopia Ramana. Następnie została zweryfikowana możliwość tworzenia wzorów białkowych poprzez ich selektywną adsorpcję do jednego ze składników mieszaniny, wykazując idealne odzwierciedlenie zarówno izotropowych, jak i regularnych wzorów polimerowych przez białka zaadsorbowane na domenach PtBMA. Na końcu została potwierdzona aktywność biologiczna zaadsorbowanego białka, co wskazuje na wysoki potencjał prezentowanych wyników do zastosowania jako platformy dla mikromacierzy białkowych.

Materiał przedstawiony w tym rozdziale zawiera część wyników przygotowywanej publikacji: **N. Janiszewska**, K. Gajos, J. Raczkowska, K. Awsiuk, *Protein orientation and polymer phase separation induced by poly(methyl methacrylate) tacticity*.

ROZDZIAŁ 6

Wpływ architektury poliglicydolu w kopolimerze polistyren-b-poliglicydol na właściwości cienkich warstw oraz na adsorpcję białek

6.1. Wprowadzenie

W ostatnim czasie kopolimery blokowe znalazły zastosowanie w różnych gałęziach inżynierii chemicznej i nauk biologicznych. W szczególności kopolimery blokowe okazały się przydatne w projektowaniu surfaktantów do konkretnych zastosowań, takich jak magnetyczne nośniki danych [168] lub porowate membrany. [169] Stosowane są też jako powłoki odporne na adsorpcję białka, które zapewniają właściwości biobójcze i przeciwporostowe. [170,171] Jednak w tych zastosowaniach niezwykle istotne jest kontrolowanie morfologii i struktury warstw kopolimerowych, gdyż posiadają one znaczący wpływ na właściwości chemiczne i fizyczne takiej powierzchni. Szczególnie interesujące jest to, w jaki sposób zmiany w makromolekularnej architekturze kopolimerów amfifilowych wpływają na skład chemiczny powierzchni warstw polimerowych. Na przykład, tak jak pokazano w poprzednich rozdziałach pracy, polimery o różnej taktyczności eksponują różne grupy chemiczne na powierzchni, modyfikując ich interakcje z peptydami, białkami czy bakteriami. Ponadto, regioregularność łańcuchów polimerowych nie tylko modyfikuje transport nośników ładunku w cienkiej warstwie polimerowej, ale także wpływa na orientację i konformację zaadsorbowanych białek. [150] Efekty te są jeszcze silniejsze w przypadku kopolimerów blokowych, ponieważ różnica w strukturze chemicznej bloków powoduje niekompatybilność blokową prowadzącą do ich separacji. W warstwie kopolimeru amfifilowego bloki polimerowe ulegają samoorganizacji tworząc nano- lub mikro-domeny. W zależności od zewnętrznego bodźca, łańcuchy w domenach mogą być reorganizowane, co wpływa na właściwości zewnętrznej warstwy. [17,172] Ekspozycja różnych grup chemicznych modyfikuje właściwości powierzchni, co ma kluczowe znaczenie dla interakcji białko-polimer. Dlatego badania zależności między bodźcami zewnętrznymi a właściwościami segmentów kopolimeru w warstwie międzyfazowej są szczególnie ważne dla zastosowań materiałów biomedycznych.

Pomimo kilku publikacji na temat zależności ułożenia kopolimerów blokowych w środowisku hydrofilowym lub hydrofobowym, wiedza na ten temat jest wciąż niewystarczająca. Dlatego celem badań przedstawionych w tym rozdziale jest określenie wpływu architektury makrocząsteczki kopolimeru na właściwości powierzchni warstwy. W szczególności interesujące jest znalezienie zależności pomiędzy właściwościami powierzchni cienkich warstw determinowanymi przez architekturę kopolimeru,

a adsorpcją modelowego białka którym była albumina surowicy bydlęcej (BSA). W tym celu badania skupiły się na dwóch diblokowych kopolimerach polistyren-b-poliglicydol, w których masa cząsteczkowa bloku polistyrenowego i poliglicydolowego była podobna, ale różniły się one strukturą molekularną segmentu poliglicydolowego: jednym z nich był liniowy wariant (kłębek – kłębek), natomiast drugi zawierał PGL o strukturze grzebienia (kłębek – szczotka).

Badania opisane w tym rozdziale ukazują zależność między składem chemicznym i strukturą powierzchni warstw kopolimerowych, a także ich modyfikacje po inkubacji w wodzie w funkcji architektury kopolimeru. Ponadto, zostały zaobserwowane różnice w adsorpcji białek do warstw polimerowych w zależności od architektury łańcucha kopolimeru.

6.2. Wykorzystane metody badawcze

6.2.1. Przygotowanie podłoży

Przedmiotem badań były dwa kopolimery o różnej architekturze: liniowy polistyren-b-poliglicydol (PS-b-PGL) oraz grzebieniowy polistyren-b-(poliglicydol-g-poliglicydol) (PS-b-(PGL-g-PGL) (struktury kopolimerów zostały przedstawione na Rysunku 2.5.). Kopolimery zostały zsyntezowane oraz scharakteryzowane przez doktora Mariusza Gadinowskiego i profesor Teresę Basińską z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Do przygotowania warstw zostały wybrane podłoża krzemowe, które zostały pocięte na kawałki o wymiarach 11 x 11 mm, umyte w izopropanolu przez 10 minut, a następnie wysuszone pod strumieniem azotu. Aby zapewnić najlepszą czystość podłoży została przeprowadzona procedura RCA, która składa się z dwóch etapów: z czyszczenia organicznego (roztwór $\text{NH}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$ w stosunku wagowym 1:1:5) oraz z czyszczenia jonowego (roztwór $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$ w stosunku 1:1:5). Każdy etap został przeprowadzony w temperaturze 75°C przez 15 minut, a następnie podłoża zostały obficie przemyte wodą destylowaną oraz wysuszone w strumieniu azotu.

Roztwory PS-b-PGL oraz PS-b-(PGL-g-PGL) zostały wylane z dimetyloformamidu (stężenie roztworu 20 mg/mL), na wcześniej umyty krzem, a następnie została utworzona warstwa za pomocą metody spin-coatingu (prędkość powlekania $\omega = 3000$ obr./min). Następnie próbki były przygotowywane zgodnie z ich oznaczeniami:

- „po przygotowaniu” – próbki bezpośrednio po przygotowaniu warstwy;
- „woda 0 min” – po wytworzeniu warstw podłoża były wygrzewane przez godzinę w temperaturze 60°C;
- „woda 5 min” i „woda 10 min” – podłoża zostały wygrzane przez godzinę w temperaturze 60°C, a następnie zanurzone w wodzie dejonizowanej przez 5 lub 10 minut. Po tym upływie czasu zostały wysuszone pod strumieniem azotu;
- „PBS 5 min” – podłoża zostały wygrzane przez godzinę w temperaturze 60°C oraz zanurzone w roztworze buforu (PBS) przez 5 minut. Następnie zostały przepłukane w wodzie dejonizowanej i wysuszone pod strumieniem azotu.

6.2.2. Adsorpcja białek

Do zbadania adsorpcji białek użyto BSA znakowanego Alexa Fluor 488. Roztwory białka o stężeniu 100 µg/mL zostały przygotowane przy użyciu buforu fosforanowego (PBS), a następnie ich koncentracja została zweryfikowana za pomocą spektrofotometru UV-Vis NanoDrop One. W celu zbadania adsorpcji białek, warstwy kopolimeru zostały zanurzone w roztworze białka i inkubowane przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wszystkie próbki zostały przepłukane PBS oraz wodą dejonizowaną w celu usunięcia niezaadsorbowanych białek, a na sam koniec wysuszone pod strumieniem azotu.

6.2.3. Charakterystyka powierzchni

Profilometria. W celu zbadania zmiany grubości przygotowanych warstw przed i po zanurzeniu w wodzie, ich profile głębokościowe zostały zarejestrowane przy użyciu profilometru Dektak XT, wyposażonego w igłę pomiarową o promieniu 12.5 µm. Dla każdej próbki została wykonana rysa na powierzchni, która pozwoliła na odsłonięcie znajdującą się poniżej warstwy krzemu, a następnie zostało zebrane 8 profili w standardowym module w poprzek rysy, co umożliwiło określenie grubości warstwy.

Mikroskopia sił atomowych (AFM). Obrazy AFM powierzchni warstw kopolimerowych zostały wykonane przy użyciu Nanosurf Flex Axiom z kontrolerem C3000. Pomiar został wykonany w trybie przerywanego kontaktu wykorzystując próbki o promieniu mniejszym niż 7 nm (o geometrii symetrycznej), stałej sprężystości 42 N/m i częstotliwości rezonansowej 320 kHz. Obrazy zostały zarejestrowane z rozdzielczością 512 x 512 punktów. Analizy obrazów zostały wykonane przy użyciu oprogramowania SPIP Image Metrology. Pomiarzy AFM zostały przeprowadzone przez doktora habilitowanego Tomasza Makowskiego z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Spektrometria masowa jonów wtórnych czasu przelotu (ToF-SIMS). Powierzchnie kopolimerów, dla których zastosowano różne procedury przygotowania (bezpośrednio po wytworzeniu warstwy, po wygrzaniu oraz po inkubacji w wodzie), zostały zbadane za pomocą aparatury TOF.SIMS 5, wyposażonej w ciekło-metaliczne jonowe działło bizmutowe o energii 30 keV jak i klastry Bi₃⁺. Widma masowe o wysokiej rozdzielczości masowej $m/\Delta m > 8000$ dla pików C4⁺ ($m/z = 48$) zostały zebrane w pięciu różnych obszarach (każdy o powierzchni 200 µm x 200 µm). Analiza składowych głównych (PCA) została przeprowadzona w celu zbadania różnic w strukturze warstw kopolimerowych składających się z kopolimerów PS-b-PGL lub PS-b-(PGL-g-PGL), a także w celu wykrycia wszelkich różnic między warstwami kopolimerowymi w zależności od sposobu przygotowania. Przed przystąpieniem do analizy PCA, intensywności wybranych pików z widm zostały znormalizowane do sumy ich intensywności, a następnie wyśrodkowane.

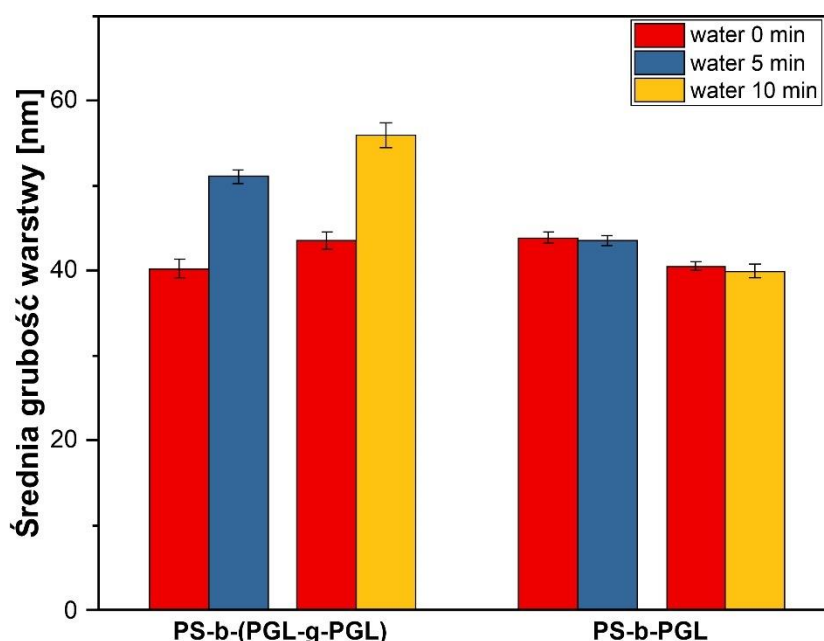
Mikroskopia fluorescencyjna. Adsorpcja białek do powierzchni warstw PS-b-PGL i PS-b-(PGL-g-PGL) została zbadana przy użyciu mikroskopu optycznego Olympus BX51, wyposażonego w lampę halogenową o mocy 100, filtr U-MWIG2 i kamerę typu DP72. Wszystkie obrazy zarejestrowano dla wysuszonych próbek przy użyciu programu Cell[^]F. Dla każdej próbki zostało zarejestrowane co najmniej pięć obrazów fluorescencyjnych.

Pomiary kąta zwilżania. Zwilżalność warstw kopolimerowych została określona na podstawie wartości kąta zwilżania wody. Pomiary zostały wykonane przy użyciu metody kropli siedzącej przy użyciu przyrządu Kruss EasyDrop (DSA15). Kąty zwilżania zostały określone jako średnia z 6 pomiarów dla każdego rodzaju próbki.

6.3. Wyniki

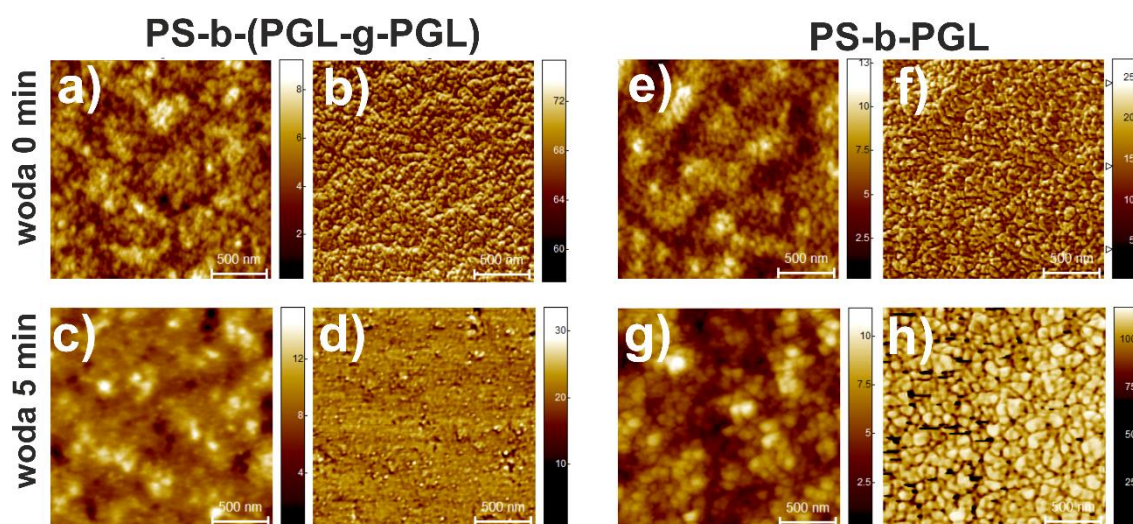
6.3.1. Stabilność warstw kopolimerowych w środowisku wodnym

Pierwszym krokiem była analiza stabilności warstwy kopolimerowej w wodzie. W tym celu za pomocą profilometru została zmierzona grubość warstw po przygotowaniu i wygrzaniu (oznaczone jako „woda 0 min”). Najpierw każda próbka została zmierzona przed zanurzeniem, a następnie po inkubacji w wodzie przez 5 lub 10 minut (grubość warstw została za każdym razem zmierzona w kilku punktach) (Rysunek 6.1.). Grubość warstw przed zanurzeniem była porównywalna dla obu kopolimerów i wynosiła około 41 nm. Można jednak zaobserwować duże różnice między PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL po inkubacji w wodzie. W przypadku PS-b-(PGL-g-PGL) zostało zaobserwowane pęcznienie warstwy objawiające się wzrostem jej grubości odpowiednio o ~27% i ~29% dla warstwy inkubowanej w wodzie przez 5 lub 10 minut. Z kolei dla PS-b-PGL po działaniu wody grubość warstwy pozostała niezmienną. Dane te sugerują, że architektura makrocząsteczek kopolimeru odgrywa znaczącą rolę w ich zachowaniu w cienkich warstwach. Częsteczki wody mogą łatwiej penetrować i oddziaływać z hydrofilowymi łańcuchami PGL o strukturze grzebienia PS-b-(PGL-g-PGL) niż w kopolimerze o strukturze liniowej PS-b-PGL.



Rysunek 6.1. Porównanie grubości warstw kopolimerów przed (czerwone słupki) oraz po inkubacji w wodzie przez 5 (niebieskie słupki) i 10 (żółte słupki) minut.

Cienkie warstwy kopolimerów zostały również zbadane za pomocą AFM przed i po inkubacji w wodzie. Topograficzne i fazowe obrazy AFM zarejestrowane dla powierzchni PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL zostały przedstawione na Rysunku 6.2. Uzyskane obrazy pokazują porównywalną strukturę warstwy dla obu kopolimerów po wygrzaniu („woda 0 min”). Jednak obrazy fazowe AFM powierzchni warstw zmieniają się po inkubacji w wodzie (Rysunek 6.2d,h). W przypadku PS-b-PGL można zaobserwować niewielki wzrost rozmiarów struktur obserwowanych w warstwie, podczas gdy warstwa PS-b-(PGL-g-PGL) zmieniła całkowicie swoją morfologię, a obrazy fazowe nie wykazują żadnych struktur.



Rysunek 6.2. Porównanie struktury warstw kopolimerów uwidocznionej przez topograficzne (a,c,e,g) oraz fazowe (b,d,f,h) obrazy AFM przed (a-b, e-f) i po (c-d, g-h) inkubacji w wodzie przez 5 minut.

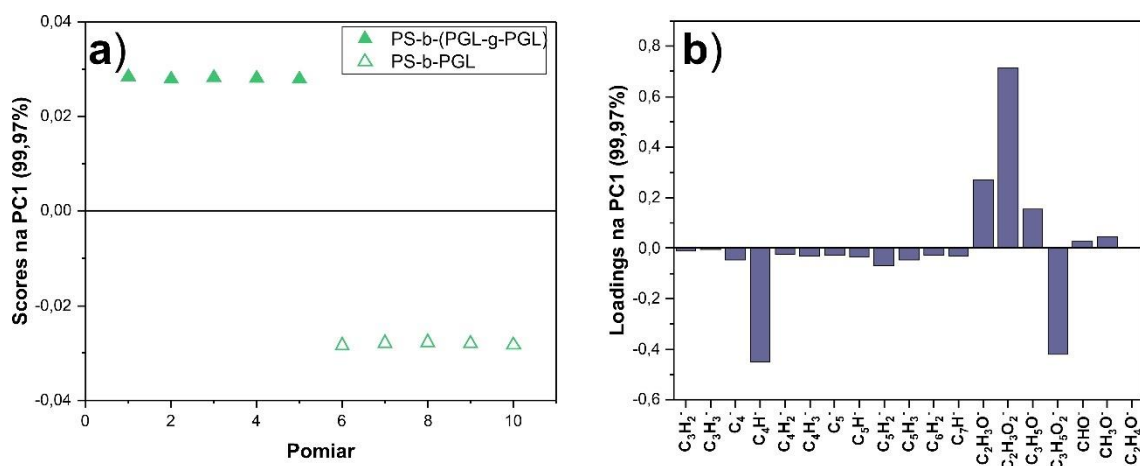
6.3.2. Różnice w chemii powierzchni spowodowane interakcją woda – kopolimer

W pierwszym etapie, powierzchnia warstw kopolimerowych (bezpośrednio po przygotowaniu) została przeanalizowana za pomocą ToF-SIMS w celu wykrycia różnic w składzie chemicznym ich powierzchni. Analiza PCA została przeprowadzona na zbiorze danych składającym się z fragmentów alkilowych charakterystycznych dla PS oraz fragmentów zawierających tlen charakterystycznych dla PGL (Tabela 6.1.)

Tabela 6.1. Sygnały ToF-SIMS i ich masy wybrane do analizy głównych składowych dla widm masowych warstw kopolimerowych.

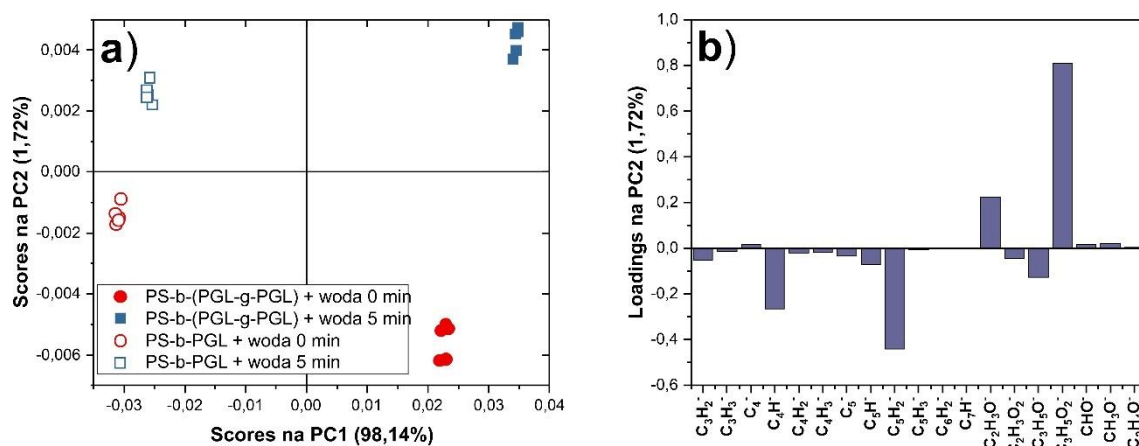
Sygnał	Masa [u]
CHO ⁻	29,0039
CH ₃ O ⁻	31,0198
C ₃ H ₂ ⁻	38,0166
C ₃ H ₃ ⁻	39,0274
C ₂ H ₃ O ⁻	43,0215
C ₂ H ₄ O ⁻	44,0255
C ₄ ⁻	48,0004
C ₄ H ⁻	49,0106
C ₄ H ₂ ⁻	50,0134
C ₄ H ₃ ⁻	51,0249
C ₃ H ₅ O ⁻	57,0366
C ₂ H ₃ O ₂ ⁻	59,0161
C ₅ ⁻	60,0007
C ₅ H ⁻	61,0088
C ₅ H ₂ ⁻	62,017
C ₅ H ₃ ⁻	63,0246
C ₃ H ₅ O ₂ ⁻	73,0309
C ₆ H ₂ ⁻	74,0137
C ₇ H ⁻	85,0082

Pierwsza główna składowa (PC1) oddziela punkty danych pochodzące z PS-b-(PGL-g-PGL), które posiadają dodatnie wyniki PC1, od PS-b-PGL posiadającymi ujemne wartości (Rysunek 6.3.a). Dodatnie ładunki (*loadings*) na PC1 (Rysunek 6.3.b) są zdominowane przez sygnały pochodzące od C₂H₃O⁻, C₂H₃O₂⁻ i C₃H₅O⁻. Z kolei ujemne ładunki PC1 pochodzą głównie od C₃H₅O₂⁻ i C₄H⁻. Wynika z tego, że fragmenty PGL są odpowiedzialne za różnicowanie między grzebieniowym PS-b-(PGL-g-PGL) i liniowym PS-b-PGL. Powodem takiego różnicowania jest fakt, że jednostki glicydotu w kopolimerze typu kłębek - szczotka PS-b-(PGL-g-PGL) mają zmodyfikowane grupy hydroksylowe wewnątrz łańcuchów. Dlatego sygnał C₃H₅O₂⁻ pochodzący od niemodyfikowanej jednostki glicydotu jest bardziej charakterystyczny dla liniowego PS-b-PGL, podczas gdy krótsze fragmenty z mniejszą liczbą atomów wodoru (np. C₂H₃O⁻ i C₂H₃O₂⁻) są bardziej intensywne w widmie masowym PS-b-(PGL-g-PGL).



Rysunek 6.3. Wykres współrzędnych obserwacji (a) z odpowiadającym mu wykresem współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) dla pierwszej głównej składowej (PC1) z przeprowadzonej analizy PCA dla ujemnych sygnałów ToF-SIMS pochodzących od PS-b-(PGL-g-PGL) (pełne trójkąty) oraz PS-b-PGL (puste trójkąty).

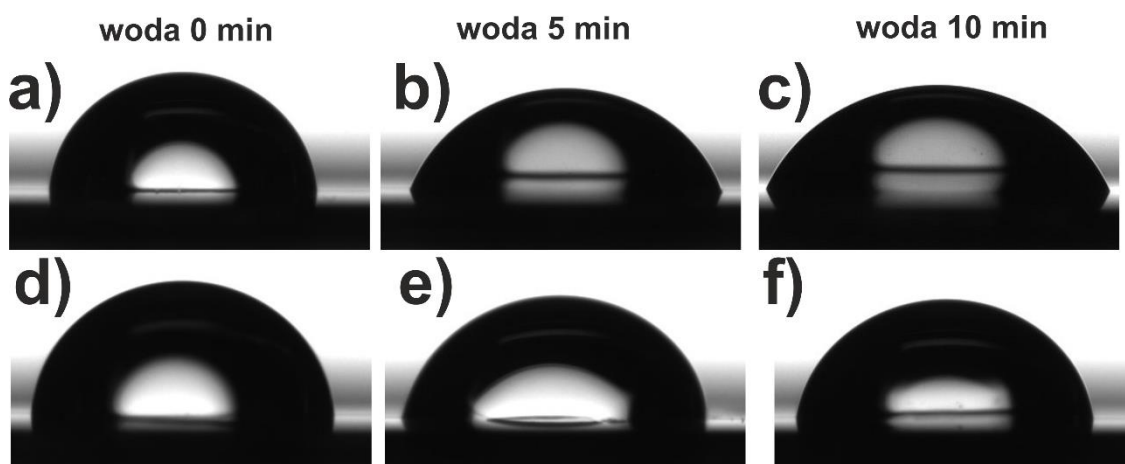
W kolejnym kroku skupiono się na wykryciu zmian na powierzchni warstwy kopolimerowej po zanurzeniu cienkich warstw w wodzie. W tym celu warstwy PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL po wygrzaniu inkubowano w wodzie przez 5 minut, a następnie wysuszone i zebrano widma ToF-SIMS. Jak widać na Rysunku 6.4., PC1 pokazuje, że największa zmienność (98,14%) w zbiorze danych występuje między PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL, tak jak w przypadku warstw świeżo po wykonaniu. Ale co ważne, PC2 wychwytyje różnicę (1,72%) wynikającą ze zmian spowodowanych interakcją cienkiej warstwy polimerowej ze środowiskiem wodnym. Próbkę, która jest tylko wygrzana (oznaczona jako „woda 0 min”), mają ujemne wyniki dla PC2, podczas gdy próbki inkubowane w wodzie mają dodatnią wartość dla PC2. Ponadto punkty pomiarowe dla próbek PS-b-(PGL-g-PGL) są bardziej rozciągnięte wokół zerowej wartości PC2, co sugeruje większą modyfikację ich chemii powierzchni po zanurzeniu w wodzie. Na podstawie wykresu współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów dla PC2 (Rysunek 6.4.b) można zauważyć, że ujemne wartości dla PC2 są związane z fragmentami PS. Z kolei dodatnie wyniki dla PC2 wynikają z dodatnich ładunków *loadings* jonów pochodzących z PGL, w szczególności $C_3H_5O_2^-$. Oznacza to, że po zanurzeniu w wodzie makrocząsteczki kopolimeru w cienkiej warstwie zmieniły swoją orientację i konformację, wystawiając segmenty PGL do powierzchni. Co więcej, efekt ten jest bardziej wyraźny w przypadku kopolimeru o strukturze grzebienia PS-b-(PGL-g-PGL) niż w przypadku kopolimeru liniowego PS-b-PGL.



Rysunek 6.4. Wykres współrzędnych obserwacji (a) z analizy PCA dla ujemnych sygnałów ToF-SIMS pochodzących od warstw PS-b-(PGL-g-PGL) (pełne symbole) oraz PS-b-PGL (puste symbole) z różnym czasem interakcji z wodą. Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) odnoszący się do wykresu współrzędnych obserwacji (a).

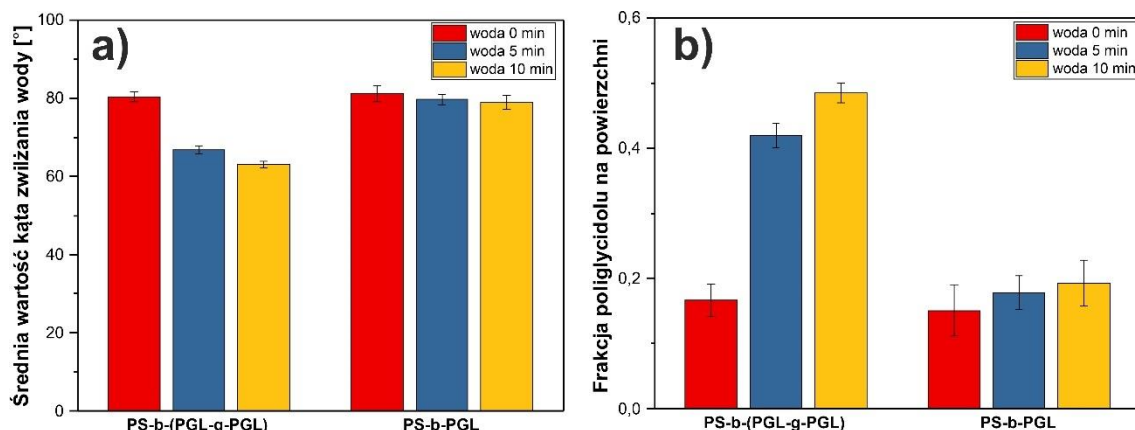
Przeprowadzona analiza PCA danych ToF-SIMS pokazuje, że najbardziej znaczącym jonem emitowanym z powierzchni jest $C_3H_5O_2^-$. Poprzednia analiza przeprowadzona dla warstw polimerowych bezpośrednio po wytworzeniu pokazuje, że jon ten jest związany z niemodyfikowaną jednostką monomeru PGL, dla której grupa hydroksylowa łańcucha bocznego PGL nie została zmieniona. Ponadto, splątanie makrocząsteczek polimerowych w cienkich warstwach polimerowych ogranicza zmiany orientacji całych makrocząsteczek (zwłaszcza dla liniowego łańcucha PS-b-PGL), ale łańcuchy boczne PGL w kopolimerach PS-b-(PGL-g-PGL) powinny mieć większą mobilność. Ponadto kopolimer blokowy PS-b-PGL wykazywał dwie temperatury zeszklenia (T_g) -11°C i $+72^\circ\text{C}$, co odpowiada temperaturom zeszklenia dla poszczególnych polimerów (PGL -20°C i PS $\sim 100^\circ\text{C}$). [80] Zatem czas relaksacji zgodnie z zależnością Vogela-Fulchera-Tammanna [173] powyżej temperatury zeszklenia polimeru T_g powinien regulować ruchliwość łańcucha PGL. Co więcej, ruchliwość łańcuchów bocznych PGL w grzebieniowym PS-b-(PGL-g-PGL) zwiększa się po zanurzeniu w wodzie z powodu pęcznienia warstwy polimerowej, co wykazano na podstawie pomiarów grubości (Rysunek 6.1.). Zgodnie z doniesieniami literaturowymi wiadome jest, że temperatura zeszklenia dla PGL jest wrażliwa na ilość zaabsorbowanych cząsteczek wody w bloku PGL, w wyniku czego spada ona do zakresu około -30°C - -40°C . [174] Sugeruje to, że po zanurzeniu w wodzie łańcuchy boczne PGL w kopolimerze o strukturze grzebienia PS-b-(PGL-g-PGL) oddziałują z cząsteczkami wody, zmieniając konformację i są eksponowane do powierzchni, podczas gdy efekt ten jest ograniczony w przypadku liniowego kopolimeru PS-b-PGL.

W celu zbadania wpływu immersji w wodzie na efektywną zwilżalność warstw PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL, zostały zmierzone kąty zwilżania wody dla warstw polimerowych po wygrzewaniu i inkubacji w wodzie przez 0, 5 i 10 minut.



Rysunek 6.5. Zdjęcia kątów zwilżania dla warstw PS-b-(PGL-g-PGL) (a-c) oraz dla PS-b-PGL (d-f) z różnym czasem immersji w wodzie.

Wyniki przedstawione na Rysunku 6.5 wraz z Rysunkiem 6.6 pokazują całkowicie odmienne zachowanie obu badanych kopolimerów. Wartości kąta zwilżania zmierzone dla warstw PS-b-PGL nieznacznie zmniejszyły się po inkubacji próbki w wodzie i wahały się od 81,1(2,1) stopnia dla próbek po wygrzaniu (0 min) do 78,9(1,8) stopnia dla warstw inkubowanych przez 10 minut. Natomiast w przypadku warstwy PS-b-(PGL-g-PGL) został zaobserwowany silny wpływ wody, co znalazło odzwierciedlenie w zwiększeniu hydrofilowości powierzchni warstwy kopolimerowej, przy zmniejszeniu kąta zwilżania z 80,3(1,3) stopnia do 63,1(0,9) stopnia.



Rysunek 6.6. (a) Średnie kąty zwilżania zmierzone dla PS-b-(PGL-g-PGL) oraz PS-b-PGL po różnym czasie inkubacji warstw w wodzie. (b) Frakcja poliglicydolu na powierzchni wyliczona dla warstw kopolimerowych zanurzonych w wodzie, na podstawie danych zwilżalności analizowanych na podstawie równania Cassie (6.1).

Zwiększona hydrofilowość warstw PS-b-(PGL-g-PGL) jest powiązana z ekspozycją łańcuchów PGL na powierzchni warstwy. Zgodnie z równaniem Cassie (6.1) [175] efektywny kąt zwilżania θ_{comp} powierzchni złożonej z segmentów polistyrenu i poliglicydolu zależy od frakcji powierzchniowej PGL (F) i PS (1-F):

$$\cos(\theta_{comp}) = F \cos(\theta_{PGL}) + (1 - F) \cos(\theta_{PS}) \quad (6.1)$$

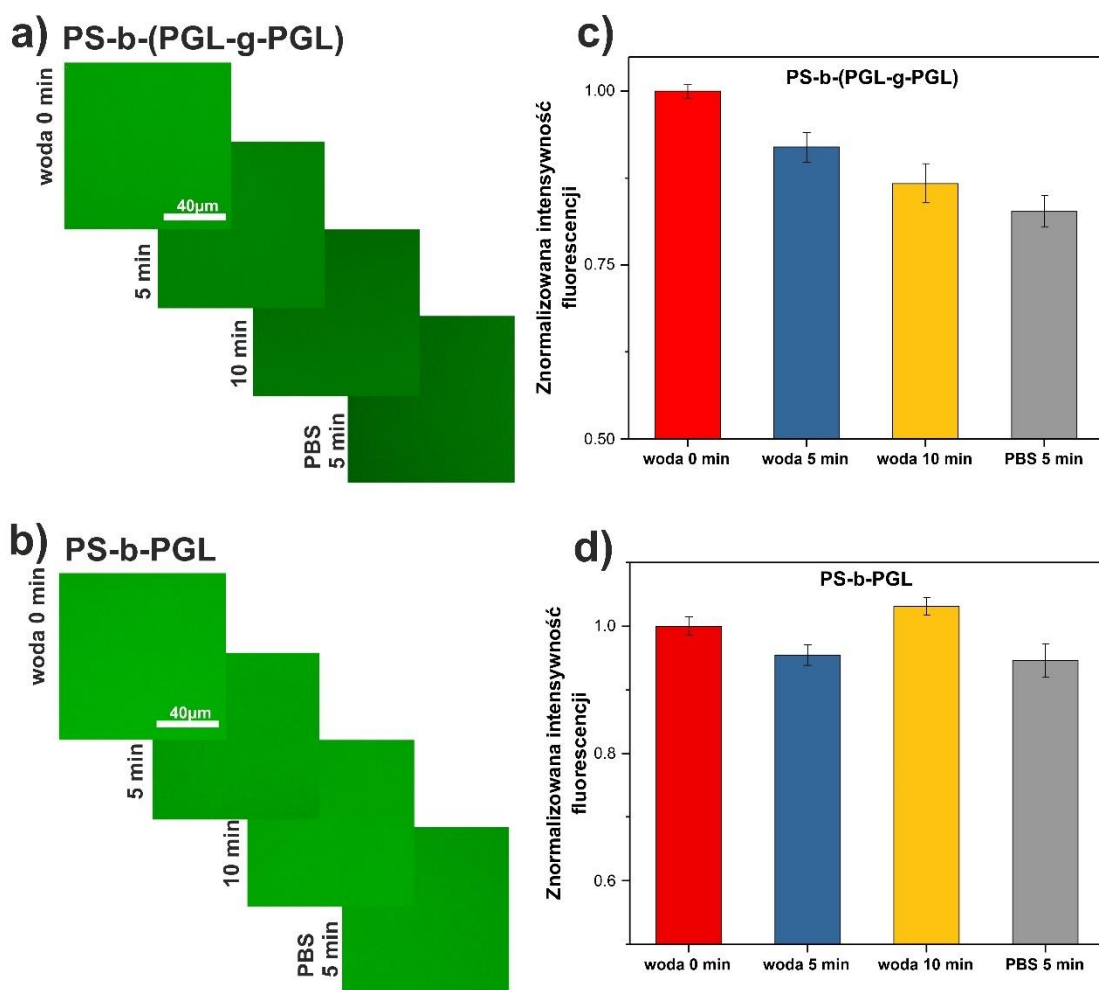
Gdzie θ_{PGL} and θ_{PS} to kąty zwilżania zmierzone dla kropli wody umieszczonej na powierzchni złożonej tylko z poliglicydolu lub tylko z polistyrenu, wynoszące odpowiednio 24 i 89 stopni. [176]

Dla warstw PS-b-PGL θ_{comp} wykazuje niewielkie zmiany, a szacowana frakcja molowa poliglicydolu na powierzchni jest równa 0,151(0,039), 0,179(0,026) i 0,193(0,035), odpowiednio dla warstw inkubowanych w wodzie przez 0, 5 i 10 minut. Z kolei dla PS-b-(PGL-g-PGL) frakcja molowa poliglicydolu na powierzchni wzrosła znacząco z 0,167(0,025) dla próbki po inkubacji do 0,484(0,015) dla warstwy kopolimeru trzymanej w wodzie przez 10 minut. Wyniki te są zgodne z analizą PCA danych ToF-SIMS (Rysunek 6.4.) i pokazują, że po wygrzewaniu powierzchni obu kopolimerów są hydrofobowe z frakcją molową PGL poniżej 20%. Jednakże inkubacja w wodzie indukuje zmiany konformacji PGL w warstwie kopolimeru mającego strukturę grzebienia PS-b-(PGL-g-PGL) i zwiększa hydrofilowość powierzchni, podczas gdy dla liniowego PS-b-PGL frakcja molowa PGL pozostaje nadal poniżej 20%. Obserwacja ta potwierdza, że architektura kopolimeru tworzącego warstwę odgrywa znaczącą rolę w kontrolowaniu właściwości powierzchni tej warstwy.

6.3.3. Adsorpcja białek do warstw kopolimerów

Zwiększona hydrofilowość powierzchni PS-b-(PGL-g-PGL) po inkubacji w wodzie powinna wpływać na modyfikację oddziaływań białek z powierzchnią kopolimeru. Aby zbadać ten efekt, została zbadana adsorpcja BSA do powierzchni warstw PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL. W tym celu znakowana fluorescencyjnie BSA została zaadsorbowana do powierzchni kopolimeru, który przed adsorpcją był inkubowany w wodzie przez 0, 5 i 10 minut, a zebrane obrazy fluorescencji zostały przeanalizowane za pomocą metody geometrii całkowitej w celu oszacowania względnej ilości związanego białka.

Dla każdej z próbek zostały zebrane obrazy fluorescencyjne w serii pięciu na próbkę, a reprezentatywne obrazy, które przedstawiają adsorpcję BSA na powierzchni warstw PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL o różnym czasie inkubacji w wodzie (5 i 10 minut) zostały zaprezentowane na Rysunku 6.7.a-b. Intensywność fluorescencji obserwowana na obrazach jest proporcjonalna do ilości molekuł BSA związanych z powierzchnią i jest silnie zależna od indywidualnych właściwości powierzchni warstwy. Porównanie obrazów fluorescencyjnych ujawniło, że ilość molekuł BSA maleje wraz ze wzrostem czasu inkubacji warstw PS-b-(PGL-g-PGL) w wodzie, podczas gdy dla PS-b-PGL nie ma zmian w intensywności fluorescencji.



Rysunek 6.7. Zdjęcia fluorescencyjne dla zaadsorbowanego BSA do cienkich warstw PS-b-(PGL-g-PGL) (a) oraz PS-b-PGL (b), które zostały wygrzane oraz zanurzone w wodzie przez 0, 5 czy 10 minut lub w roztworze PBS przez 5 minut. Zdjęcia zostały przeanalizowane z zastosowaniem podejścia geometrii całkowitej dla otrzymania ilościowych wartości zaadsorbowanego BSA do warstw kopolimerów (c-d).

W celu ilościowego zbadania adsorpcji BSA na kopolimerach inkubowanych w wodzie, zdjęcia fluorescencyjne zostały przeanalizowane metodą geometrii całkowitej, która została opisana w Podrozdziale 2.2.4. Dla każdej z próbek został wyliczony rozkład intensywności pikseli na obrazach fluorescencyjnych w celu uzyskania średniej wartości zaadsorbowanych białek, która następnie została znormalizowana do wartości uzyskanej dla próbek po wygrzewaniu (0 min). Otrzymane wyniki względnej adsorpcji białek zostały przedstawione w postaci histogramów (Rysunek 6.7.c-d), które wyraźnie pokazują malejącą ilość BSA dla PS-b-(PGL-g-PGL) i stałą wartość dla PS-b-PGL wraz ze wzrostem długości czasu inkubacji w wodzie.

Obserwacje te są zgodne z wynikami przedstawiającymi różnice w składzie chemicznym powierzchni warstw kopolimerowych indukowanymi w trakcie inkubacji w wodzie. Warstwy PS-b-(PGL-g-PGL) w wyniku oddziaływania z cząsteczkami wody eksponowały hydrofilowe łańcuchy PGL do powierzchni. Im dłuższy czas inkubacji, tym więcej bocznych łańcuchów PGL może zmienić swoją konformację, a hydrofobowość powierzchni maleje, co potwierdzają przeprowadzone pomiary kąta zwilżania.

W rezultacie mniej molekuł białka adsorbuje do powierzchni. Z kolei chemia powierzchni PS-b-PGL nie zmienia się znacząco po inkubacji w wodzie, co wykazały pomiary ToF-SIMS jak i kąta zwilżania. Dlatego też ilość białek osadzonych na powierzchni warstw PS-b-PGL jest porównywalna.

Jednak bardziej interesujący jest fakt, że adsorpcja białek do cienkiej warstwy kopolimeru PS-b-(PGL-g-PGL) jest porównywalna z ilością białka zaadsorbowanego na powierzchni warstwy PS-b-PGL. Podczas badań adsorpcji białek do powierzchni różnych kopolimerów, przygotowane warstwy były inkubowane przez 5 minut w wodnym roztworze BSA w PBS. Okres ten był wystarczający dla warstwy PS-b-(PGL-g-PGL) inkubowanej w wodzie do zwiększenia frakcji powierzchniowej PGL z $\sim 0,17$ do $\sim 0,48$ i zwiększonej hydrofilowości powierzchni. Wydaje się jednak, że makrocząsteczki PS-b-(PGL-g-PGL) nie zmieniają swojej konformacji podczas inkubacji w wodnym roztworze BSA w PBS. Efekt ten może mieć dwa możliwe wyjaśnienia. Po pierwsze, interakcje jon-grupa hydroksylowa mogą być wystarczająco silne, aby zmniejszyć ruchliwość grup bocznych w łańcuchu PGL. Po drugie, białka zaadsorbowane na powierzchni kopolimeru mogą opóźniać lub nawet blokować zmiany konformacji makrocząsteczek kopolimeru.

Oddziaływanie grupy hydroksylowej łańcucha bocznego PGL z jonami jest podobne do tego obserwowanego dla jonów treoniny i potasu w strukturze białek. [177] Energia oddziaływania jon-dipol (~ 86 kJ/mol) jest większa niż wiązań wodorowych (~ 21 kJ/mol), a co więcej, kilka grup hydroksylowych z różnych łańcuchów bocznych PGL może oddziaływać z tym samym jonem. [178] Może to sugerować, że włączenie jonów do grzebieniowych łańcuchów PGL zmniejszyło ich mobilność i uniemożliwiło reorientację hydrofilowych łańcuchów PGL do powierzchni.

Aby zweryfikować tę hipotezę, warstwy PS-b-(PGL-g-PGL) i PS-b-PGL zostały inkubowane w buforze PBS przez 5 minut, a następnie została przeprowadzona adsorpcja BSA do ich powierzchni. Zdjęcia fluorescencyjne (Rysunek 6.7.), jak również wyniki analizy tych wykresów metodą geometrii całkowitej pokazują, że ilość BSA zaadsorbowanego na powierzchni warstw PS-b-PGL jest porównywalna z wartościami uzyskanymi dla powierzchni inkubowanych w wodzie. Z kolei ilość białka zaadsorbowanego na powierzchni PS-b-(PGL-g-PGL) typu kłębek – szczotka jest nawet niższa niż dla próbek inkubowanych w wodzie. Co więcej, kąt zwilżania warstw inkubowanych w PBS pozostaje niezmienny dla warstw PS-b-PGL ($\sim 78,2^\circ$) i maleje dla PS-b-(PGL-g-PGL) do $55,8^\circ$, co skutkuje jeszcze większą frakcją molową poliglicydolu na powierzchni ($\sim 0,61$). Wyniki te pokazują, że obecność jonów w roztworze wodnym nie wpływa na ruchliwość łańcuchów polimerowych, a zatem zjawiskiem odpowiedzialnym za zmniejszenie ruchliwości łańcuchów PGL jest fakt adsorpcji białek.

Co więcej, hydrofobowa powierzchnia warstw kopolimerowych bogatych we frakcję PS sprzyja adsorpcji białek. Podczas adsorpcji do warstwy polimerowej molekuly białka ulegają zmianom konformacyjnym. Powierzchnia kontaktu białka z powierzchnią powoduje wzrost energii swobodnej, a zatem białka mają tendencję do maksymalizacji swojej powierzchni oddziałującej z warstwą polimerową poprzez zmiany konformacyjne. [179] W rezultacie interakcja między łańcuchami PS eksponowanymi na powierzchni, a cząsteczkami BSA zmniejsza ruchliwość łańcuchów polimerowych. Podobny efekt został

zaobserwowany we wcześniejszych pracach autorki w przypadku izotaktycznego poli(metakrylanu n-butyłu), gdzie molekuly białka adsorbując do warstwy polimeru, zwiększają jej stabilność i opóźniają efekt „odwilżania” warstwy (z ang. *dewetting*). [180]

6.4. Podsumowanie

Na przestrzeni całego rozdziału zostały przedstawione wyniki wskazujące, że architektura kopolimeru tworzącego cienką warstwę silnie wpływa na właściwości powierzchni tej warstwy. Warstwa kopolimeru PS-b-(PGL-g-PGL) pęcznieje i wystawia łańcuchy PGL do powierzchni po zanurzeniu w wodzie, co powoduje, że zmieniają się jej właściwości z hydrofobowej na hydrofilową. W przeciwieństwie do tego, powierzchnia warstw dla kopolimeru o strukturze liniowej PS-b-PGL nie zmienia swoich właściwości i jest porównywalna dla powierzchni po wygrzewaniu jak i inkubowanych w wodzie. Zaobserwowana różnica w składzie chemicznym powierzchni po inkubacji w wodzie ma silny wpływ na interakcje białko-kopolimer. Podczas przeprowadzonych badań zostało pokazane, że inkubacja w wodzie modyfikuje właściwości powierzchni warstw PS-b-(PGL-g-PGL) i zmniejsza adsorpcję białek, podczas gdy efekt ten nie jest obserwowany dla powierzchni warstwy złożonych z liniowego PS-b-PGL.

Inną ciekawą obserwacją jest fakt, że powierzchnia warstwy kopolimeru blokowego o strukturze grzebienia PS-b-(PGL-g-PGL) nie zmienia swoich właściwości powierzchniowych po zanurzeniu w roztworze BSA. Wyjaśnieniem tej obserwacji jest to, że adsorpcja molekuł BSA spowalnia lub nawet blokuje zmiany konformacyjne cząsteczek kopolimeru. W rezultacie łańcuchy PGL nie mogą zmienić swojej konformacji i osłabić oddziaływania między cząsteczkami białka a powierzchnią kopolimeru. Wyniki tych badań sugerują zatem nową strategię poprawy właściwości warstw kopolimerów poprzez umożliwienie łańcuchom polimerowym zmiany ich konformacji lub zmniejszenie tego efektu poprzez utworzenie ochronnej warstwy białkowej.

Materiał przedstawiony w tym rozdziale wchodzi w skład publikacji: **N. Janiszewska**, T. Basińska, M. Gadzinowski, S. Słomkowski, T. Makowski, K. Awsiuk; *Impact of polyglycidol block architecture in polystyrene-b-polyglycidol copolymers on the properties of thin films and protein adsorption*, Applied Surface Science 669 (2024), 160458, DOI: 10.1016/j.apsusc.2024.160458

ROZDZIAŁ 7

Podsumowanie

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu struktury łańcuchów polimerowych na właściwości cienkich warstw polimerowych jak i ich oddziaływania z biomolekułami (w szczególności z białkami). Badania zostały przeprowadzone dla dwóch polimerów o różnej taktyczności (Rozdziały 3-5) oraz dla kopolimeru blokowego o różnej architekturze jednego z bloków (Rozdział 6).

Podczas realizowania badań został wykorzystany szereg technik spektro- i mikroskopowych oraz metod analizy danych. W celu wytworzenia cienkich warstw zostały użyte trzy metody: spin-coating, horizontal dipping i druk mikrokontaktowy, dzięki temu możliwe było uzyskanie warstw o dobrze zdefiniowanych właściwościach. Następnie wykorzystując zestaw metod takich jak: AFM, ToF-SIMS, spektroskopia Ramana czy profilometria możliwe było scharakteryzowanie wytworzonych warstw polimerowych i określenie wpływu struktury łańcucha polimerowego na właściwości takiej warstwy. Dodatkowo zostały ocenione oddziaływania warstw z białkami (jak i również z peptydami i bakteriami) dzięki wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej oraz ToF-SIMS.

W pierwszym etapie badań został oceniony wpływ taktyczności danego polimeru na oddziaływania z biomolekułami. Głównym wnioskiem z tej części badań jest stwierdzenie, że orientacja grup chemicznych łańcucha polimerowego wpływa na ich ułożenie w cienkich warstwach, a tym samym indukuje zmiany na powierzchni warstwy, co wpływa na interakcję polimer – biomolekuły. Dzięki zastosowaniu metody ToF-SIMS połączonej z analizą PCA zostały ukazane różnice w chemii powierzchni warstw o różnej stereoregularności. Dla PtBMA opisanego w Rozdziale 3, orientacja grup estrowych w formie izotaktycznej modyfikuje oddziaływania z peptydami, białkami i bakteriami. Poprzez ekspozycję tych grup warstwy iso-PtBMA wpływają na lepszą adsorpcję dodatnio naładowanych peptydów oraz zmiany w orientacji molekuł IgG i konformacji BSA. Dodatkowo bakterie gram-dodatnie są również wrażliwe na ekspozycję grup estrowych, co skutkuje lepszą adhezją do warstw iso-PtBMA (w porównaniu do PtBMA w formie ataktycznej i syndiotaktycznej). Natomiast dla PMMA, opisanego w Rozdziale 4 obserwowana jest inna sytuacja jeśli chodzi o ekspozycję grup estrowych na powierzchni – jest ona obecna w warstwach at- i syn-PMMA. Powoduje to bardziej efektywną adsorpcję molekuł białka do powierzchni ataktycznej i syndiotaktycznej w porównaniu do warstw izotaktycznych. Jednakże w przypadku obu polimerów PtBMA i PMMA obserwowane są te same mechanizmy oddziaływania – oddziaływania hydrofobowe są odpowiedzialne za adsorpcję molekuł BSA i zmiany w jej orientacji bądź konformacji, podczas gdy oddziaływania elektrostatyczne są kluczowe dla zmian w orientacji molekuł IgG.

Uwzględniając wyniki otrzymane dla polimerów o różnej taktyczności, badania w kolejnym etapie skupiły się na możliwości wytworzenia mikromacierzy na bazie mieszanin polimerowych. W Rozdziale 5 został opisany proces otrzymywania dwuwymiarowych domen dla mieszanin PMMA + PtBMA, które w swoim składzie miały at-PtBMA oraz były przygotowane na podłożu SiO_x modyfikowanym APTES. Jako

mieszaninę, która tworzy najlepszą separację fazową wybrano iso-PMMA + at-PtBMA, dla której to została podjęta próba otrzymania regularnych wzorów polimerów, dzięki wykorzystaniu wstępnie zmodyfikowanego podłoża składającego się z naprzemiennych pasków SiO_x i APTES. Wykorzystując preferencyjne oddziaływania między PMMA i SiO_x, otrzymane zostały warstwy, które składały się z wyższych obszarów PtBMA i niższych obszarów PMMA, co zostało potwierdzone dzięki zastosowaniu AFM i spektroskopii Ramana połączonej z analizą TCA. Dodatkowo biorąc pod uwagę selektywną adsorpcję białek do jednego z dwóch składników mieszaniny została sprawdzona możliwość tworzenia wzorów białkowych. Jako wynik tego badania otrzymano idealnie odwzajemnienie wzorów regularnych jak i izotropowych poprzez immobilizację białka do domen złożonych z PtBMA. Ponadto zachowanie aktywności biologicznej zaadsorbowanego białka wskazuje na możliwe zastosowanie przygotowanych warstw jako podstawy do wytwarzania mikromacierzy białkowych.

W ostatnim etapie badań został sprawdzony wpływ architektury kopolimeru na właściwości utworzonych z niego cienkich warstw oraz na adsorpcję białek. Wyniki przedstawione w Rozdziale 6 wskazują, że architektura jednego z bloków w kopolimerze blokowym ma znaczący wpływ na właściwości samej warstwy, zwłaszcza jeśli jest ona wystawiona na działanie czynników zewnętrznych takich jak woda. Kopolimer o strukturze kłębek – szczotka PS-b-(PGL-g-PGL) pod wpływem immersji w wodzie zaczyna zwiększać swoją grubość wystawiając łańcuchy PGL do powierzchni zmieniając tym samym właściwość warstwy z hydrofobowej na hydrofilową. Jednak dla kopolimeru o strukturze liniowej PS-b-PGL efekt ten nie jest obserwowany i jej właściwości są porównywalne przed i po immersji w wodzie. Widoczne zmiany w chemii powierzchni podobnie jak w Rozdziałach 3 i 4 znacząco zmieniają interakcje kopolimer – białko. Poprzez wystąpienie zmian pod wpływem oddziaływań łańcuchów PGL z molekułami wody dla warstw PS-b-(PGL-g-PGL) wcześniej inkubowanych w wodzie zmniejsza się adsorpcja molekuł białka do powierzchni. Innym bardzo ciekawym zaobserwowanym efektem jest blokowanie zmian orientacji łańcuchów PGL przez białka adsorbujące do cienkich warstw PS-b-(PGL-g-PGL). Zjawisko to może zostać wykorzystane jako koncepcja pozwalająca na poprawę właściwości amfifilowych kopolimerów blokowych poprzez kontrolowanie zmian konformacji łańcucha polimerowego wchodzącego w skład kopolimeru.

Na przestrzeni całej rozprawy doktorskiej został ukazany i opisany rzeczywisty wpływ struktury łańcucha polimerowego na właściwości cienkich warstw oraz ich oddziaływania z białkami. Jednym z głównych wyników całej pracy jest wykazanie, że istniejące różnice w chemii powierzchni występujące między różnymi taktycznościami tego samego polimeru bądź będące wynikiem różnic w architekturze bloków w kopolimerach blokowych mają istotny wpływ na interakcje warstwa – białko co może wpływać na promowanie lub wręcz przeciwnie zapobieganie adsorpcji molekuł białka jak również wpływa na orientację i konformację zaadsorbowanych molekuł białka. Dlatego też niezwykle istotne jest dobranie odpowiedniej struktury łańcucha polimerowego do planowanych przyszłych zastosowań cienkich warstw polimerowych.

Bibliografia

- [1] E. Bortel, Wprowadzenie do chemii polimerów, Wydawnictwo UJ, Kraków, 1994.
- [2] S. Połowiński, Chemia fizyczna polimerów, Łódź: Wydaw. Politechniki Łódzkiej, 2001.
- [3] N. Nazeer, M. Ahmed, Polymers in medicine, in: Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications, Elsevier, 2020: pp. 281–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00013-3>.
- [4] R.J. Young, P.A. Lovell, Introduction to polymers, Third Edition, 2011.
- [5] X. Vanden Eynde, L.T. Weng, P. Bertrand, Influence of Tacticity on Polymer Surfaces Studied by ToF-SIMS, SURFACE AND INTERFACE ANALYSIS 25 (1997) 41–45.
- [6] R.P. Quirk, Stereochemistry and Macromolecules Principles and Applications, J Chem Educ 58 (1981) 540–543. <https://doi.org/10.1021/ed058p540>.
- [7] W.J. Macknight, F.E. Karasz, 4 Polymer Blends, in: Comprehensive Polymer Science and Supplements, 1989: pp. 111–130.
- [8] A.R. Ajitha, S. Thomas, Introduction: Polymer blends, thermodynamics, miscibility, phase separation, and compatibilization, in: Compatibilization of Polymer Blends: Micro and Nano Scale Phase Morphologies, Interphase Characterization, and Properties, Elsevier, 2019: pp. 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816006-0.00001-3>.
- [9] D.J. Walsh, 5 Polymer Blends, in: Comprehensive Polymer Science and Supplements, 1989: pp. 135–154.
- [10] J. Rodríguez-Hernández, Nano/Micro and Hierarchical Structured Surfaces in Polymer Blends, in: Nanostructured Polymer Blends, Elsevier Inc., 2013: pp. 357–421. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3159-6.00011-0>.
- [11] C. Hagiopol, Copolymers, in: Encyclopedia of Condensed Matter Physics, 2005: pp. 235–240.
- [12] F.A. Bovey, The Microstructure of Polymers Chains, in: NMR of Polymers, 2011: pp. 117–154.
- [13] F.H. Schacher, P.A. Rugar, I. Manners, Functional block copolymers: Nanostructured materials with emerging applications, Angewandte Chemie - International Edition 51 (2012) 7898–7921. <https://doi.org/10.1002/anie.201200310>.
- [14] O. Grimm, F. Wendler, F.H. Schacher, Micellization of photo-responsive block copolymers, Polymers (Basel) 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/polym9090396>.
- [15] P. Grossen, D. Witzigmann, S. Sieber, J. Huwyler, PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application, Journal of Controlled Release 260 (2017) 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>.

- [16] J.S. Park, D.G. Woo, B.K. Sun, H.M. Chung, S.J. Im, Y.M. Choi, K. Park, K.M. Huh, K.H. Park, In vitro and in vivo test of PEG/PCL-based hydrogel scaffold for cell delivery application, *Journal of Controlled Release* 124 (2007) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.030>.
- [17] T. P. Lodge, Block Copolymers: Past Successes and Future Challenges, *Macromol Chem Phys* 204 (2003) 265–273. <https://doi.org/10.1002/macp.200290073>.
- [18] C. Zhang, Y. Bai, Y. Sun, J. Gu, Y. Xu, Preparation of hydrophilic HDPE porous membranes via thermally induced phase separation by blending of amphiphilic PE-b-PEG copolymer, *J Memb Sci* 365 (2010) 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.09.007>.
- [19] M.J. Fasolka, A.M. Mayers, Block copolymer thin films: Physics and applications, *Annu Rev Mater Res* 31 (2001) 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.323>.
- [20] I.W. Hamley, Ordering in thin films of block copolymers: Fundamentals to potential applications, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 34 (2009) 1161–1210. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.06.003>.
- [21] A.A. Leniart, P. Pula, A. Sitkiewicz, P.W. Majewski, Macroscopic Alignment of Block Copolymers on Silicon Substrates by Laser Annealing, *ACS Nano* 14 (2020) 4805–4815. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00696>.
- [22] A. Blanco, G. Blanco, Chapter 3 - Proteins, in: *Med Biochem*, 2017: pp. 21–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4/00003-3>.
- [23] Bonomi F, PROTEINS | Foods, in: *Encyclopedia of Analytical Science*, Second, 2005: pp. 375–383.
- [24] D.J. Dietzen, Amino Acids, Peptides, and Proteins, Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816061-9.00013-8>.
- [25] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv Colloid Interface Sci* 162 (2011) 87–106. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>.
- [26] T. Serizawa, K. Yamashita, M. Akashi, Unique physical adsorption of proteins onto double stranded stereocomplex films composed of stereoregular poly (methyl methacrylate)s, *Polym J* 38 (2006) 503–506. <https://doi.org/10.1295/polymj.38.503>.
- [27] M. Rabe, D. Verdes, M. Rankl, G.R.J. Artus, S. Seeger, A comprehensive study of concepts and phenomena of the nonspecific adsorption of β -lactoglobulin, *ChemPhysChem* 8 (2007) 862–872. <https://doi.org/10.1002/cphc.200600710>.
- [28] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C.M. Niemeyer, H. Waldmann, Chemical strategies for generating protein biochips, *Angewandte Chemie - International Edition* 47 (2008) 9618–9647. <https://doi.org/10.1002/anie.200801711>.
- [29] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, Protein immobilization strategies for protein biochips, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1775–1789. <https://doi.org/10.1021/bm061197b>.

- [30] M. Saleemuddin, Bioaffinity Based Immobilization of Enzymes, in: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 1999: pp. 204–226.
- [31] L. Vroman, A.L. Adams, Identification of Adsorbed Protein Films by Exposure to Antisera and Water Vapor, 1969.
- [32] U. Ali, K.J.B.A. Karim, N.A. Buang, A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA), *Polymer Reviews* 55 (2015) 678–705. <https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1031377>.
- [33] Polymethyl methacrylate (PMMA) | Britannica, (n.d.). <https://www.britannica.com/science/polymethyl-methacrylate> (accessed April 11, 2024).
- [34] J.D. Muzzy, Thermoplastics - Properties, in: *Comprehensive Composite Materials*, 200AD: pp. 57–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-08-042993-9/00127-3>.
- [35] R.M. Ottenbrite, R. Javan, Biological Structures, in: *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, Elsevier, 2005: pp. 99–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369401-9/00698-7>.
- [36] T.G. Tihan, M.D. Ionita, R.G. Popescu, D. Iordachescu, Effect of hydrophilic-hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)-hydroxyapatite (HA) composites, *Mater Chem Phys* 118 (2009) 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.03.019>.
- [37] R.Q. Frazer, R.T. Byron, P.B. Osborne, K.P. West, PMMA: An essential material in medicine and dentistry, *J Long Term Eff Med Implants* 15 (2005) 629–639. <https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.v15.i6.60>.
- [38] M. Hassan, M. Asghar, S.U. Din, M.S. Zafar, Thermoset polymethacrylate-based materials for dental applications, in: *Materials for Biomedical Engineering: Thermoset and Thermoplastic Polymers*, Elsevier, 2019: pp. 273–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816874-5.00008-6>.
- [39] M. Unemori, Y. Matsuya, S. Matsuya, A. Akashi, A. Akamine, Water absorption of poly(methyl methacrylate) containing 4-methacryloxyethyl trimellitic anhydride, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00521-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00521-5).
- [40] T. Kanie, H. Arikawa, K. Fujii, K. Inoue, Physical and mechanical properties of PMMA resins containing γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane, *J Oral Rehabil* 31 (2004) 166–171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01043.x>.
- [41] F. Pahlevanzadeh, H.R. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, In-vitro biocompatibility, bioactivity, and mechanical strength of PMMA-PCL polymer containing fluorapatite and graphene oxide bone cements, *J Mech Behav Biomed Mater* 82 (2018) 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.03.016>.
- [42] M. Tavakoli, S.S.E. Bakhtiari, S. Karbasi, Incorporation of chitosan/graphene oxide nanocomposite in to the PMMA bone cement: Physical, mechanical and biological evaluation, *Int J Biol Macromol* 149 (2020) 783–793. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.300>.

- [43] S.M. Kenny, M. Buggy, Bone cements and fillers: A review, *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 14 (2023) 923–938.
- [44] D.F. Farrar, J. Rose, Rheological properties of PMMA bone cements during curing, *Biomaterials* 22 (2001) 3005–3013.
- [45] S. V. Gohil, S. Suhail, J. Rose, T. Vella, L.S. Nair, *Polymers and Composites for Orthopedic Applications*, in: *Materials and Devices for Bone Disorders*, Elsevier Inc., 2017: pp. 349–403. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802792-9.00008-2>.
- [46] R.R. Trivedi, L. Werner, D.J. Apple, S.K. Pandey, Post cataract-and AM Izak 1 intraocular lens (IOL) surgery opacification, *Eye* 16 (2002) 217–241. <https://doi.org/10.1038/sj/eye/6700066>.
- [47] P.M. Van Midwoud, A. Janse, M.T. Merema, G.M.M. Groothuis, E. Verpoorte, Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models, *Anal Chem* 84 (2012) 3938–3944. <https://doi.org/10.1021/ac300771z>.
- [48] K. Tsougeni, P.S. Petrou, D.P. Papageorgiou, S.E. Kakabakos, A. Tserepi, E. Gogolides, Controlled protein adsorption on microfluidic channels with engineered roughness and wettability, *Sens Actuators B Chem* 161 (2012) 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.10.022>.
- [49] Z.K. Wang, H.Y. Zheng, H.M. Xia, Femtosecond laser-induced modification of surface wettability of PMMA for fluid separation in microchannels, *Microfluid Nanofluidics* 10 (2011) 225–229. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0662-8>.
- [50] M. Sivakumar, K. Panduranga Rao, In vitro release of ibuprofen and gentamicin from PMMA functional microspheres, *J Biomater Sci Polym Ed* 13 (2002) 111–126. <https://doi.org/10.1163/156856202317414311>.
- [51] J. Sharma, X. Zhang, T. Sarker, X. Yan, L. Washburn, H. Qu, Z. Guo, A. Kucknoor, S. Wei, Biocompatible electrospun tactic poly(methyl methacrylate) blend fibers, *Polymer (Guildf)* 55 (2014) 3261–3269. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.05.028>.
- [52] L. Chang, E.M. Woo, Tacticity effects on glass transition and phase behavior in binary blends of poly(methyl methacrylate)s of three different configurations, *Polym Chem* 1 (2010) 198–202. <https://doi.org/10.1039/b9py00237e>.
- [53] K.I. Hamada, K. Yamashita, T. Serizawa, T. Kitayama, M. Akashi, Adsorption of bovine serum albumin onto poly(methyl methacrylate) stereocomplex films with a molecularly regulated nanostructure, *J Polym Sci A Polym Chem* 41 (2003) 1807–1812. <https://doi.org/10.1002/pola.10699>.
- [54] T. Serizawa, Y. Nagasaka, H. Matsuno, M. Shimoyama, K. Kurita, A stereocomplex platform efficiently detecting antigen-antibody interactions, *Bioconjug Chem* 18 (2007) 355–362. <https://doi.org/10.1021/bc060225k>.
- [55] H. Matsuno, Y. Nagasaka, K. Kurita, T. Serizawa, Superior activities of enzymes physically immobilized on structurally regular poly(methyl methacrylate) surfaces, *Chemistry of Materials* 19 (2007) 2174–2179. <https://doi.org/10.1021/cm0628956>.

- [56] T. Serizawa, T. Sawada, H. Matsuno, T. Matsubara, T. Sato, A peptide motif recognizing a polymer stereoregularity, *J Am Chem Soc* 127 (2005) 13780–13781. <https://doi.org/10.1021/ja054402o>.
- [57] H. Reuter, S. Hbring, J. Ulbricht, On the anionic block copolymerization of ethylene oxide with alkyl methacrylates. Influence of the block length of poly(ethylene oxide) on the tacticity of the poly(alkyl methacrylate) block, *Makromol. Chem. Suppl* 15 (1989) 79–84. <https://doi.org/10.1002/macp.1989.020151989109>.
- [58] F.Z.F. Herrera, R.P. Vieira, Numerical Simulation of Atom-Transfer Radical Polymerization of tert-butyl Methacrylate, *Materials Research* 22 (2019). <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2019-0333>.
- [59] E.P. Ivanova, D.K. Pham, J.P. Wright, D. V Nicolau, Detection of coccoid forms of *Sulfitobacter mediterraneus* using atomic force microscopy, *FEMS Microbiol Lett* 214 (2002) 177–181. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11343.x>.
- [60] E.P. Ivanova, N. Mitik-Dineva, J. Wang, D.K. Pham, J.P. Wright, D. V. Nicolau, R.C. Mocanasu, R.J. Crawford, *Staleyella guttiformis* attachment on poly(tert-butylmethacrylate) polymeric surfaces, *Micron* 39 (2008) 1197–1204. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.04.009>.
- [61] J.T. Peters, S.S. Hutchinson, N. Lizana, I. Verma, N.A. Peppas, Synthesis and characterization of poly(N-isopropyl methacrylamide) core/shell nanogels for controlled release of chemotherapeutics, *Chemical Engineering Journal* 340 (2018) 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.009>.
- [62] D. V Nicolau, R. Cross, Protein profiled features patterned via confocal microscopy, *Biosens Bioelectron* 15 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00072-X).
- [63] A. Saha, S. Jana, T.K. Mandal, Peptide-poly(tert-butyl methacrylate) conjugate into composite micelles in organic solvents versus peptide-poly(methacrylic acid) conjugate into spherical and worm-like micelles in water: Synthesis and self-assembly, *J Polym Sci A Polym Chem* 54 (2016) 3019–3031. <https://doi.org/10.1002/pola.28188>.
- [64] I. Eryazici, M.C.D. Carter, W. Sattler, J. Yang, S. Wills, F.J. Huby, I. Peshenko, P. Ansems-Bancroft, Gas-Generating Polymer Particles: Reducing the Decomposition Temperature of Poly(tert-Butyl Methacrylate) Side Chains Using an Encapsulated Acid Catalyst Approach, *ACS Appl Polym Mater* 2 (2020) 5179–5187. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00929>.
- [65] M.Á. Fernández-Rodríguez, S. Rahmani, C.K.J. Yu, M.Á. Rodríguez-Valverde, M.Á. Cabrerizo-Vílchez, C.A. Michel, J. Lahann, R. Hidalgo-Álvarez, Synthesis and interfacial activity of PMMA/PtBMA Janus and homogeneous nanoparticles at water/oil interfaces, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 536 (2018) 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.043>.
- [66] T. Šmigovec Ljubič, D. Pahovnik, M. Žigon, E. Žagar, Separation of poly(styrene-block-t-butyl methacrylate) copolymers by various liquid chromatography techniques, *The Scientific World Journal* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1100/2012/932609>.

- [67] B.T. Ho, T.K. Roberts, S. Lucas, An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, *Crit Rev Biotechnol* 38 (2018) 308–320. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355293>.
- [68] D. Gregor-Svetec, Polymers in printing filaments, *Polymers for 3D Printing: Methods, Properties, and Characteristics* (2022) 155–269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818311-3.00002-1>.
- [69] M.J. Lerman, J. Lembong, S. Muramoto, G. Gillen, J.P. Fisher, The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material, *Tissue Eng Part B Rev* 24 (2018) 359–372. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0056>.
- [70] S.A. Ashter, Low performance demand plastics and elastomers for medical devices, *Applications of Polymers and Plastics in Medical Devices* (2022) 79–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820980-6.00004-7>.
- [71] M. Bochenek, N. Oleszko-Torbus, W. Wałach, D. Lipowska-Kur, A. Dworak, A. Utrata-Wesołek, Polyglycidol of Linear or Branched Architecture Immobilized on a Solid Support for Biomedical Applications, *Polymer Reviews* 60 (2020) 717–767. <https://doi.org/10.1080/15583724.2020.1720233>.
- [72] F. Ozdemir, H. Keul, A. Mourran, M. Moeller, Polyglycidol based amphiphilic double-comb copolymers and their self-association in aqueous solution, *Macromol Rapid Commun* 32 (2011) 1007–1013. <https://doi.org/10.1002/marc.201100175>.
- [73] S. Gam-Derouich, M. Gosecka, S. Lepinay, M. Turmine, B. Carbonnier, T. Basinska, S. Slomkowski, M.C. Millot, A. Othmane, D. Ben Hassen-Chehimi, M.M. Chehimi, Highly hydrophilic surfaces from polyglycidol grafts with dual antifouling and specific protein recognition properties, *Langmuir* 27 (2011) 9285–9294. <https://doi.org/10.1021/la200290k>.
- [74] T. Basinska, S. Slomkowski, S. Kazmierski, A. Dworak, M.M. Chehimi, Studies of the Surface Layer Structure and Properties of Poly(styrene/ α -t-butoxy- ω -polyglycidol) Microspheres by Carbon Nuclear Magnetic Resonance, X-Ray Photoelectron Spectroscopy, and the Adsorption of Human Serum Albumin and γ -Globulins, in: *J Polym Sci A Polym Chem*, 2004: pp. 615–623. <https://doi.org/10.1002/pola.10863>.
- [75] Q. Wei, T. Becherer, P.L.M. Noeske, I. Grunwald, R. Haag, A universal approach to crosslinked hierarchical polymer multilayers as stable and highly effective antifouling coatings, *Advanced Materials* 26 (2014) 2688–2693. <https://doi.org/10.1002/adma.201304737>.
- [76] R.K. Kainthan, J. Janzen, E. Levin, D. V. Devine, D.E. Brooks, Biocompatibility testing of branched and linear polyglycidol, *Biomacromolecules* 7 (2006) 703–709. <https://doi.org/10.1021/bm0504882>.
- [77] M. Imran Ul-Haq, B.F.L. Lai, R. Chapanian, J.N. Kizhakkedathu, Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution, *Biomaterials* 33 (2012) 9135–9147. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.007>.
- [78] A. Utrata-Wesołek, W. Wałach, J. Anioł, A.L. Sieroń, A. Dworak, Multiple and terminal grafting of linear polyglycidol for surfaces of reduced protein adsorption,

- Polymer (Guildf) 97 (2016) 44–54.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.05.016>.
- [79] A. Alli, B. Hazer, Y. Menciloğlu, Ş. Süzer, Synthesis, characterization and surface properties of amphiphilic polystyrene-*b*-polypropylene glycol block copolymers, *Eur Polym J* 42 (2006) 740–750.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.09.032>.
- [80] M. Siebert, H. Keul, M. Möller, Synthesis of well-defined polystyrene-Block-polyglycidol (PS-*b*-PG) block Co-polymers by anionic polymerization, *Des Monomers Polym* 13 (2010) 547–563.
<https://doi.org/10.1163/138577210X530657>.
- [81] M. Gadzinowski, M. Kasprów, T. Basinska, S. Slomkowski, Ł. Otulakowski, B. Trzebicka, T. Makowski, Synthesis, Hydrophilicity and Micellization of Coil-Brush Polystyrene-*b*-(polyglycidol-*g*-polyglycidol) Copolymer—Comparison with Linear Polystyrene-*b*-polyglycidol, *Polymers (Basel)* 14 (2022).
<https://doi.org/10.3390/polym14020253>.
- [82] A. Bujacz, Structures of bovine, equine and leporine serum, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 6 (2012) 1278–1289.
<https://doi.org/10.1107/S0907444912027047>.
- [83] R.F. Doolittle, Reconstructing history with amino acid sequences, in: *Protein Science*, 1992: pp. 191–200. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010201>.
- [84] E.L. Gelamo, C.H.T.P. Silva, H. Imasato, M. Tabak, Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling, *Biochimica et Biophysica Acta* 1594 (2002) 84–99.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00287-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00287-4).
- [85] A.M.M.T. Mehmood, A.B. Iyer, S. Arif, M. Junaid, R.S. Khan, W. Nazir, N. Khalid, Whey protein-based functional energy drinks formulation and characterization, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00005-X>.
- [86] Y.L. Jeyachandran, J.A. Mielczarski, E. Mielczarski, B. Rai, Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces, *J Colloid Interface Sci* 341 (2010) 136–142.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.007>.
- [87] S.R. Hsieh, P.M. Reddy, C.J. Chang, A. Kumar, W.C. Wu, H.Y. Lin, Exploring the behavior of bovine serum albumin in response to changes in the chemical composition of responsive polymers: Experimental and simulation studies, *Polymers (Basel)* 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/polym8060238>.
- [88] Y. Xiao, S.N. Isaacs, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)-not all BSAs are alike, *J Immunol Methods* 384 (2012) 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.06.009>.
- [89] E. Assadpour, S.M. Jafari, An overview of biopolymer nanostructures for encapsulation of food ingredients, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815663-6.00001-x>.

- [90] J.R.Y. Ahmmed Ally, Vera C. Campbell, Deborah A. DeLuca, Kristen Lehman Helms, Paul Juang, Brian J. Knoll, Donna Larson, Puja Patel, Chapter 9 - Antibodies, Immunology for Pharmacy (2012) 70–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10009-4>.
- [91] R. Jefferis, Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics, Arch Biochem Biophys 526 (2012) 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.03.021>.
- [92] N.P.L. Le, T.A. Bowden, W.B. Struwe, M. Crispin, Immune recruitment or suppression by glycan engineering of endogenous and therapeutic antibodies, Biochim Biophys Acta Gen Subj 1860 (2016) 1655–1668. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.04.016>.
- [93] K. Kozłowska, M. Rydlewska, M. Ząbczyńska, E. Pocheć, IgG glycosylation in autoimmune diseases, Postepy Hig Med Dosw 72 (2018) 975–990. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7351>.
- [94] M. Pohanka, Piezoelectric immunosensor for the determination of immunoglobulin G, Int J Electrochem Sci 13 (2018) 8784–8791. <https://doi.org/10.20964/2018.09.01>.
- [95] J. Buijs, J.W.Th. Lichtenbelt, W. Norde, J. Lyklema, Adsorption of monoclonal IgGs and their F(ab')₂ fragments onto polymeric surfaces, Colloids Surf B Biointerfaces 5 (1995) 11–23. https://doi.org/10.1007/1-4020-7764-5_15.
- [96] G. Lesnierowski, J. Kijowski, Chapter 6 Lysozyme, in: Bioactive Egg Compounds, 2007: pp. 33–42.
- [97] M. Ćwięka, Adsorpcja Lizozymu–Charakterystyka Struktur Białkowych Z Zastosowaniem Metody Mikrowagi Kvarcowej Z Monitorowaniem, Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ 9 (2014) 35–54.
- [98] R.S. Singh, T. Singh, A.K. Singh, Enzymes as diagnostic tools, Elsevier B.V., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00009-1>.
- [99] A. Hasmann, E. Wehrsuetz-Sigl, G. Kanzler, U. Gewessler, E. Hulla, K.P. Schneider, B. Binder, M. Schintler, G.M. Guebitz, Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection, Diagn Microbiol Infect Dis 71 (2011) 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.009>.
- [100] D. Santoriello, L.M. Andal, R. Cox, V.D. D'Agati, G.S. Markowitz, Lysozyme-Induced Nephropathy, Kidney Int Rep 2 (2017) 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2016.09.002>.
- [101] V. Lechevalier, T. Croguennec, F. Nau, C. Guérin-Dubiard, Chapter 8 Ovalbumin and Gene-Related Proteins, in: Bioactive Egg Compounds, 2007: pp. 51–60.
- [102] J.A. Huntington, P.E. Stein, Structure and properties of ovalbumin, Journal of Chromatography B 756 (2001) 189–198.
- [103] G.T. Hermanson, Vaccines and Immunogen Conjugates, in: Bioconjugate Techniques, Elsevier, 2013: pp. 839–865. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00019-4>.

- [104] M. Zemser, M. Friedman, J. Katzhendler, L.L. Greene, A. Minsky, S. Gorinstein, Relationship Between Functional Properties and Structure of Ovalbumin, *J Protein Chem* 13 (1994). <https://doi.org/10.1007/bf01891984>.
- [105] C. Fuss, J.C. Palmaz, E.A. Sprague, Fibrinogen: Structure, Function, and Surface Interactions, *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 12 (2001) 677–682.
- [106] G. Do Lowe, A. Rumley, I.J. Mackie, Plasma fibrinogen, *Ann Clin Biochem* 41 (2004) 430–440.
- [107] S. Herrick, O. Blanc-Brude, A. Gray, G. Laurent, Molecules in focus Fibrinogen, *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999) 741–746.
- [108] C.M. Dundas, D. Demonte, S. Park, Streptavidin-biotin technology: Improvements and innovations in chemical and biological applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 97 (2013) 9343–9353. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
- [109] Q. Le, V. Nguyen, S. Park, Recent advances in the engineering and application of streptavidin-like molecules, *Appl Microbiol Biotechnol* 103 (2019) 7355–7365. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10036-5>.
- [110] S.I. Park, J. Shenoi, S.M. Frayo, D.K. Hamlin, Y. Lin, D.S. Wilbur, P.S. Stayton, N. Orgun, M. Hylarides, F. Buchegger, A.L. Kenoyer, A. Axtman, A.K. Gopal, D.J. Green, J.M. Pagel, O.W. Press, Pretargeted radioimmunotherapy using genetically engineered antibody-streptavidin fusion proteins for treatment of non-Hodgkin lymphoma, *Clinical Cancer Research* 17 (2011) 7373–7382. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1204>.
- [111] J. Moreira, A.C. Vale, N.M. Alves, Spin-coated freestanding films for biomedical applications, *J Mater Chem B* 9 (2021) 3778–3799. <https://doi.org/10.1039/d1tb00233c>.
- [112] L.E. Scriven, PHYSICS AND APPLICATIONS OF DIP COATING AND SPIN COATING, *Materials Research Society Symposium Proceedings* 121 (1988) 717–729.
- [113] J. Rysz, M. Josiek, M.M. Marzec, E. Moons, Pattern replication in blends of semiconducting and insulating polymers casted by horizontal dipping, *J Polym Sci B Polym Phys* 51 (2013) 1419–1426. <https://doi.org/10.1002/polb.23354>.
- [114] B. Park, M. Han, Photovoltaic characteristics of polymer solar cells fabricated by pre-metered coating process, *Opt Express* 17 (2009) 13830–13840.
- [115] K. Awsiuk, J. Rysz, A. Budkowski, M.M. Marzec, A device and a method for preparation of polymer films having a predefined spatial structure, *PL* 230245, *EP* 3519153 and *US* 10,814,531, 2001.
- [116] G.M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, D.E. Ingber, Soft Litography in Biology and Biochemistry, *Annual Review of Biomedical Engineering* 3 (2001) 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.3.1.335>.
- [117] Y. Xia, G.M. Whitesides, Soft Litography, *Angewandte Chemie International Edition* 37 (1998) 550–575.
- [118] F. Krok, B. Such, J.J. Kolodziej, M. Szymonski, Atomic force microscopy for surface imaging and characterization of supported nanostructures, *Springer Series in*

- Surface Sciences 51 (2013) 621–653. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34243-1_21.
- [119] P. Nguyen-Tri, P. Ghassemi, P. Carriere, S. Nanda, A.A. Assadi, D.D. Nguyen, Recent applications of advanced atomic force microscopy in polymer science: A review, *Polymers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/POLYM12051142>.
- [120] P. Parot, Y.F. Dufrêne, P. Hinterdorfer, C. Le Grimmellec, D. Navajas, J.L. Pellequer, S. Scheuring, Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine, in: *Journal of Molecular Recognition*, 2007: pp. 418–431. <https://doi.org/10.1002/jmr.857>.
- [121] J.C. Vickerman, N. Winograd, SIMS-A precursor and partner to contemporary mass spectrometry, *Int J Mass Spectrom* 377 (2015) 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.06.021>.
- [122] R.N.S. Sodhi, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS): - Versatility in chemical and imaging surface analysis, *Analyst* 129 (2004) 483–487. <https://doi.org/10.1039/b402607c>.
- [123] J. Kovac, Surface Characterization of Polymers by XPS and SIMS Techniques, *Materials and Technology* 45 (2011) 191–197.
- [124] J.C. Vickerman, Chapter 4. Molecular Surface Mass Spectrometry by SIMS, in: *Surface Analysis - The Principal Techniques*, 2nd Edition, Wiley, 2009: pp. 113–205.
- [125] J.L.S. Lee, I.S. Gilmore, Chapter 10. The Application of Multivariate Data Analysis Techniques in Surface Analysis, in: *Surface Analysis - The Principal Techniques*, 2nd Edition, Wiley, 2009: pp. 563–612.
- [126] K. Gajos, K. Awsiuk, A. Budkowski, Controlling orientation, conformation, and biorecognition of proteins on silane monolayers, conjugate polymers, and thermo-responsive polymer brushes: investigations using TOF-SIMS and principal component analysis, *Colloid Polym Sci* 299 (2021) 385–405. <https://doi.org/10.1007/s00396-020-04711-7>.
- [127] J.W. Lichtman, J.A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nat Methods* 2 (2005) 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>.
- [128] B. Herman, Fluorescence Microscopy, in: *Curr Protoc Cell Biol*, 1998.
- [129] J. Raczowska, A. Bernasik, A. Budkowski, J. Rysz, K. Kowalski, M. Lekka, P. Czuba, J. Lekki, Pattern replication examined with integral geometry approach: Application to ion milling of polymer blend films, *Thin Solid Films* 476 (2005) 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2004.10.005>.
- [130] J. Zemła, M. Lekka, J. Wiltowska-Zuber, A. Budkowski, J. Rysz, J. Raczowska, Integral geometry analysis of fluorescence micrographs for quantitative relative comparison of protein adsorption onto polymer surfaces, *Langmuir* 24 (2008) 10253–10258. <https://doi.org/10.1021/la801313u>.
- [131] Y. Yuan, T.R. Lee, Contact angle and wetting properties, *Springer Series in Surface Sciences* 51 (2013) 3–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34243-1_1.

- [132] D.K. Owens, R.C. Wendt, Estimation of the Surface Free Energy of Polymers, *J Appl Polym Sci* 13 (1969) 1741–1747. <https://doi.org/10.1002/app.1969.070130815>.
- [133] A. Rudawska, E. Jacniacka, Analysis for determining surface free energy uncertainty by the Owen-Wendt method, *Int J Adhes Adhes* 29 (2009) 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2008.09.008>.
- [134] A. Kudelski, Analytical applications of Raman spectroscopy, *Talanta* 76 (2008) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.042>.
- [135] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, Wiley, 2005.
- [136] T. Dieing, O. Hollricher, J. Toporski, *Confocal Raman Microscopy*, 2011.
- [137] D.H. Lee, N.G. Cho, Assessment of surface profile data acquired by a stylus profilometer, *Meas Sci Technol* 23 (2012). <https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/10/105601>.
- [138] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes, *J Am Chem Soc* 127 (2005) 8168–8173. <https://doi.org/10.1021/ja042898o>.
- [139] H. Wang, D.G. Castner, B.D. Ratner, S. Jiang, Probing the orientation of surface-immobilized immunoglobulin G by time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *Langmuir* 20 (2004) 1877–1887. <https://doi.org/10.1021/la035376f>.
- [140] J.C. Worch, H. Prydderch, S. Jimaja, P. Bexis, M.L. Becker, A.P. Dove, Stereochemical enhancement of polymer properties, *Nat Rev Chem* 3 (2019) 514–535. <https://doi.org/10.1038/s41570-019-0117-z>.
- [141] D.G. Castner, B.D. Ratner, *Surface Characterization of Butyl Methacrylate Polymers by XPS and Static SIMS*, 1990.
- [142] K. Awsiuk, A. Budkowski, P. Petrou, M.M. Marzec, M. Biernat, T. Jaworska-Gołąb, J. Rysz, Orientation and biorecognition of immunoglobulin adsorbed on spin-cast poly(3-alkylthiophenes): Impact of polymer film crystallinity, *Colloids Surf B Biointerfaces* 148 (2016) 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.028>.
- [143] J. Lub, H. van der We, Static Secondary Ion Mass Spectrometry of Poly(butylmethacrylates) Fragmentation Reactions of Four Isomeric Butanolate Anions, *Organic Mass Spectrometry* 25 (1990) 588–591.
- [144] O.N. Tretinnikov, Selective Accumulation of Functional Groups at the Film Surfaces of Stereoregular Poly(methyl methacrylate)s, *Langmuir* 13 (1997) 2988–2992.
- [145] M. Kawecki, L. Bernard, Database of proteinogenic amino acid reference spectra for Bismuth-cluster ToF-SIMS. II. Positive polarity, *Surface Science Spectra* 25 (2018). <https://doi.org/10.1116/1.5024988>.
- [146] T. Serizawa, T. Sawada, T. Kitayama, Peptide motifs that recognize differences in polymer-film surfaces, *Angewandte Chemie - International Edition* 46 (2007) 723–726. <https://doi.org/10.1002/anie.200603212>.

- [147] N. Xia, D.G. Castner, Preserving the structure of adsorbed protein films for time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis, *J Biomed Mater Res A* 67A (2003) 179–190. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10063>.
- [148] K. Gajos, K. Szafraniec, P. Petrou, A. Budkowski, Surface density dependent orientation and immunological recognition of antibody on silicon: TOF-SIMS and surface analysis of two covalent immobilization methods, *Appl Surf Sci* 518 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146269>.
- [149] F. Liu, M. Dubey, H. Takahashi, D.G. Castner, D.W. Grainger, Immobilized antibody orientation analysis using secondary ion mass spectrometry and fluorescence imaging of affinity-generated patterns, *Anal Chem* 82 (2010) 2947–2958. <https://doi.org/10.1021/ac902964q>.
- [150] K. Awskiuk, A. Budkowski, P. Petrou, M.M. Marzec, M. Biernat, T. Jaworska-Gołąb, J. Rysz, Orientation and biorecognition of immunoglobulin adsorbed on spin-cast poly(3-alkylthiophenes): Impact of polymer film crystallinity, *Colloids Surf B Biointerfaces* 148 (2016) 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.028>.
- [151] O.D. Monera, T.J. Sereda, N.E. Zhou, C.M. Kay'i, R.S. Hodges, Relationship of Sidechain Hydrophobicity and α -Helical Propensity on the Stability of the Single-stranded Amphipathic α -Helix, 1995.
- [152] E.P. Ivanova, N. Mitik-Dineva, J. Wang, D.K. Pham, J.P. Wright, D. V. Nicolau, R.C. Mocanasu, R.J. Crawford, *Staleyia guttiformis* attachment on poly(tert-butylmethacrylate) polymeric surfaces, *Micron* 39 (2008) 1197–1204. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.04.009>.
- [153] H. Matsuno, Y. Nagasaka, K. Kurita, T. Serizawa, Superior activities of enzymes physically immobilized on structurally regular poly(methyl methacrylate) surfaces, *Chemistry of Materials* 19 (2007) 2174–2179. <https://doi.org/10.1021/cm0628956>.
- [154] T. Date, S. Yoshino, H. Matsuno, T. Serizawa, Surface modification of stereoregular and stereocomplex poly(methyl methacrylate) films with biologically identified peptides, *Polym J* 44 (2012) 366–369. <https://doi.org/10.1038/pj.2011.147>.
- [155] T. Date, M. Ishikawa, K. Hori, K. Tanaka, T. Nagamura, M. Iwahashi, T. Serizawa, Water droplets for the symmetric adhesion of two poly(methyl methacrylate) films, *Chem Lett* 38 (2009) 660–661. <https://doi.org/10.1246/cl.2009.660>.
- [156] H. Matsuno, Y. Nagasaka, K. Kurita, T. Serizawa, Superior activities of enzymes physically immobilized on structurally regular poly(methyl methacrylate) surfaces, *Chemistry of Materials* 19 (2007) 2174–2179. <https://doi.org/10.1021/cm0628956>.
- [157] K.I. Hamada, K. Yamashita, T. Serizawa, T. Kitayama, M. Akashi, Adsorption of bovine serum albumin onto poly(methyl methacrylate) stereocomplex films with a molecularly regulated nanostructure, *J Polym Sci A Polym Chem* 41 (2003) 1807–1812. <https://doi.org/10.1002/pola.10699>.

- [158] K. Rezwan, L.P. Meier, M. Rezwan, J. Vörös, M. Textor, L.J. Gauckler, Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al₂O₃ particles: A new model based on zeta potential and UV-Vis measurements, *Langmuir* 20 (2004) 10055–10061. <https://doi.org/10.1021/la048459k>.
- [159] S. Enany, Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*, *J Infect Public Health* 7 (2014) 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.02.002>.
- [160] J. Zemła, M. Lekka, J. Raczowska, A. Bernasik, J. Rysz, A. Budkowski, Selective protein adsorption on polymer patterns formed by self-organization and soft lithography, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2101–2109. <https://doi.org/10.1021/bm900598s>.
- [161] E. Chiodi, A.M. Marn, M.T. Geib, M. Selim Ünlü, The role of surface chemistry in the efficacy of protein and dna microarrays for label-free detection: An overview, *Polymers (Basel)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13071026>.
- [162] L. Filipponi, P. Livingston, O. Kašpar, V. Tokárová, D. V. Nicolau, Protein patterning by microcontact printing using pyramidal PDMS stamps, *Biomed Microdevices* 18 (2016) 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0036-4>.
- [163] K.F.A. Clancy, S. Dery, V. Laforte, P. Shetty, D. Juncker, D. V. Nicolau, Protein microarray spots are modulated by patterning method, surface chemistry and processing conditions, *Biosens Bioelectron* 130 (2019) 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.027>.
- [164] M. Sprenger, S. Walheim, A. Budkowski, U. Steiner, Hierarchic Structure Formation in Binary and Ternary Polymer Blends, 2003.
- [165] P. Cyganik, A. Budkowski, U. Steiner, J. Rysz, A. Bernasik, S. Walheim, Z. Postawa, J. Raczowska, Substructure formation during pattern transposition from substrate into polymer blend film, 2003.
- [166] J. Raczowska, P. Cyganik, A. Budkowski, A. Bernasik, J. Rysz, I. Raptis, P. Czuba, K. Kowalski, Composition effects in polymer blends spin-cast on patterned substrates, *Macromolecules* 38 (2005) 8486–8493. <https://doi.org/10.1021/ma051242s>.
- [167] J. Raczowska, J. Rysz, A. Budkowski, J. Lekki, M. Lekka, A. Bernasik, K. Kowalski, P. Czuba, Surface patterns in solvent-cast polymer blend films analyzed with an integral-geometry approach, *Macromolecules* 36 (2003) 2419–2427. <https://doi.org/10.1021/ma020870w>.
- [168] R. Ca, PATTERNED MAGNETIC RECORDING MEDIA, *Annual Reviews Materials* 31 (2001) 203–235.
- [169] A. Angelini, A. Car, I.A. Dinu, L. Leva, W. Yave, Amphiphilic Poly(vinyl alcohol) Membranes Leaving Out Chemical Cross-Linkers: Design, Synthesis, and Function of Tailor-Made Poly(vinyl alcohol)-b-poly(styrene) Copolymers, *Macromol Rapid Commun* 44 (2023). <https://doi.org/10.1002/marc.202200875>.

- [170] M.D. Dimitriou, Z. Zhou, H.S. Yoo, K.L. Killops, J.A. Finlay, G. Cone, H.S. Sundaram, N.A. Lynd, K.P. Barteau, L.M. Campos, D.A. Fischer, M.E. Callow, J.A. Callow, C.K. Ober, C.J. Hawker, E.J. Kramer, A general approach to controlling the surface composition of poly(ethylene oxide)-based block copolymers for antifouling coatings, *Langmuir* 27 (2011) 13762–13772. <https://doi.org/10.1021/la202509m>.
- [171] B.K.D. Ngo, M.A. Grunlan, Protein Resistant Polymeric Biomaterials, *ACS Macro Lett* 6 (2017) 992–1000. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00448>.
- [172] C.P. Glagola, L.M. Miceli, M.A. Milchak, E.H. Halle, J.L. Logan, Polystyrene-poly(ethylene oxide) diblock copolymer: The effect of polystyrene and spreading concentration at the air/water interface, *Langmuir* 28 (2012) 5048–5058. <https://doi.org/10.1021/la204100d>.
- [173] N.A. Nikonorova, R. Diaz-Calleja, A. V. Yakimansky, Molecular mobility in comb-like copolymethacrylates with chalcone-containing side-chains, *Polym Int* 60 (2011) 1215–1221. <https://doi.org/10.1002/pi.3065>.
- [174] E.J. Vandenberg, Polymerization of Glycidol and Its Derivatives: A New Rearrangement Polymerization, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* 23 (1985) 915–948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pol.1985.170230401>.
- [175] A.J.B. Milne, A. Amirfazli, The Cassie equation: How it is meant to be used, *Adv Colloid Interface Sci* 170 (2012) 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.12.001>.
- [176] M. Gosecka, J. Pietrasik, P. Decorse, B. Glebocki, M.M. Chehimi, S. Slomkowski, T. Basinska, Gradient poly(styrene-co-polyglycidol) grafts via silicon surface-initiated AGET ATRP, *Langmuir* 31 (2015) 4853–4861. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00010>.
- [177] K.H. Sippel, F.A. Quiocho, Ion-dipole interactions and their functions in proteins, *Protein Science* 24 (2015) 1040–1046. <https://doi.org/10.1002/pro.2685>.
- [178] J.N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, Third Edition, Academic Press, 2011. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-21560-1>.
- [179] M.M. Santore, C.F. Wertz, Protein spreading kinetics at liquid-solid interfaces via an adsorption probe method, *Langmuir* 21 (2005) 10172–10178. <https://doi.org/10.1021/la051059s>.
- [180] N. Janiszewska, J. Raczowska, A. Budkowski, K. Gajos, Y. Stetsyshyn, M. Michalik, K. Awsiuk, Dewetting of Polymer Films Controlled by Protein Adsorption, *Langmuir* 36 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01718>.

Spis tabel

Tabela 1.1. Podział aminokwasów ze względu na charakter ich łańcuchów bocznych (na podstawie [22])	11
Tabela 3.1 Skład C, N i O dla powierzchni warstw at-, iso- i syn-PtBMA.	46
Tabela 3.2. Sygnały ToF-SIMS wraz z masami, które zostały wybrane do analizy głównych składowych na podstawie spektrum masowego cienkich warstw PtBMA.	47
Tabela 3.3. Swobodna energia powierzchniowa oraz jej składowa dyspersyjna i polarna dla at-, iso- i syn- PtBMA.	50
Tabela 4.1. Sygnały ToF-SIMS wraz z masami, które zostały wykorzystane do przeprowadzenia PCA dla warstw PMMA o różnej taktyczności.	64
Tabela 4.2. Swobodna energia powierzchniowa i jej składowe wyliczone dla iso-, at- i syn-PMMA.	65
Tabela 4.3. Wyliczone parametry intensywności znormalizowanych sygnałów od łańcucha głównego i grupy estrowej dla widm jonów ujemnych PMMA ToF-SIMS i ich proporcje.	66
Tabela 4.4. Sygnały ToF-SIMS, ich masy i pochodzenie od aminokwasów wybrane do analizy głównych składowych z widm masowych BSA adsorbowanego na warstwach PMMA.	67
Tabela 4.5. Wartość wyliczonego indeksu alifatycznego dla BSA i jej domen oraz dla fragmentów IgG.	72
Tabela 6.1. Sygnały ToF-SIMS i ich masy wybrane do analizy głównych składowych dla widm masowych warstw kopolimerowych.	91

Spis rysunków

Rysunek 1.1. Dwa sposoby ułożenia podstawników. Jako X oznaczony jest grupa boczna polimeru.....	3
Rysunek 1.2. Trzy typy taktyczności polimerów. Jako X oznaczona jest grupa boczna..	4
Rysunek 1.3. Diagram fazowy dla mieszanin dwóch polimerów.....	7
Rysunek 1.4. Cztery główne typy architektury występujące w kopolimerach.	9
Rysunek 1.5. Schemat budowy aminokwasów. Jako R oznaczony jest łańcuch boczny, który jest charakterystyczny dla danego aminokwasu.	10
Rysunek 1.6. Schemat powstawania wiązania peptydowego.....	12
Rysunek 2.1. Schemat struktury poli(metakrylanu metylu).	19
Rysunek 2.2. Schemat struktury poli(metakrylanu tert-butylu).....	20
Rysunek 2.3. Schemat struktury polistyrenu.	21
Rysunek 2.4. Struktura poliglicydolu.....	22
Rysunek 2.5. Schemat kopolimerów PS-b-PGL o różnej architekturze: liniowej (a) oraz grzebienia (b). Na czerwono zaznaczony jest blok polistyrenu, a na niebiesko blok poliglicydolu.....	23
Rysunek 2.6. Schemat struktury surowiczej albuminy wołowej z zaznaczonymi trzema domenami: domeną I (zielona), domeną II (żółta) oraz domeną III (czerwona). Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 4F5S.	25
Rysunek 2.7. Schemat struktury budowy molekuly immunoglobuliny G z zaznaczonymi ciężkim łańcuchem (niebieskie obszary) oraz lekkim łańcuchem (czerwone obszary). Schemat (a) przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1IGY.....	26
Rysunek 2.8. Schemat struktury molekuly lizozymu. Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 253L.	27
Rysunek 2.9. Schemat struktury molekuly owalbuminy. Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1OVA.....	28
Rysunek 2.10. Schemat struktury molekuly fibrynogenu z zaznaczonymi łańcuchami polipeptydowymi: A (czerwony), B (niebieski) i γ (zielony). Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1EI3.	29
Rysunek 2.11. Schemat struktury molekuly streptawidyny. Schemat przygotowany za pomocą narzędzi graficznych Protein Data Bank na podstawie struktury 1DF8.	29
Rysunek 2.12. Schemat powstawania warstw polimerowych z zastosowaniem metody horizontal dippingu.....	31
Rysunek 2.13. Schemat procesu druku mikrokontaktowego.	32
Rysunek 2.14. Schemat działania mikroskopii sił atomowych.....	33

Rysunek 2.15. Schematyczna ilustracja przedstawiająca aparaturę ToF-SIMS.....	35
Rysunek 2.16. Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego.	37
Rysunek 2.17. Schematyczne rozłożenie swobodnej energii powierzchniowej dla formującej się kropli.....	38
Rysunek 2.18. Diagram Jabłońskiego przedstawiający rozpraszanie Ramana i Rayleigha w kategoriach przejść między stanami energetycznymi cząsteczki i opowiadającymi im widmami Ramana.	40
Rysunek 3.1. Obrazy topografii powierzchni warstw at-, iso- i syn-PtBMA przed (a-c) i po adsorpcji (d-f) białka wraz z wartością chropowatości warstw.	46
Rysunek 3.2. Wykres współrzędnych obserwacji PC1 (a) i odpowiadający mu wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) z analizy PCA widm masowych ToF-SIMS zarejestrowanych dla warstw ataktycznego (niebieskie koła), izotaktycznego (czerwone kwadraty) oraz syndiotaktycznego (zielone trójkąty) PtBMA.	48
Rysunek 3.3. Schematyczne przedstawienie fragmentacji łańcucha PtBMA.	48
Rysunek 3.4. Wykres współrzędnych obserwacji (scores) PC1 (a) i odpowiadający mu wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (loadings) (b) z analizy PCA dla negatywnych sygnałów ToF-SIMS zarejestrowanych dla warstw izotaktycznego (czerwone kwadraty), ataktycznego (niebieskie koła) oraz syndiotaktycznego (zielone trójkąty) PtBMA.	49
Rysunek 3.5. Znormalizowane intensywności sygnałów ToF-SIMS reprezentacyjnych dla peptydu I (a-b) oraz dla peptydu II (c-d) zebrane dla warstw PtBMA z różną taktycznością przed i po adsorpcji peptydów (* istotnie statystycznie różnice między grupami, $p < 0,05$)	51
Rysunek 3.6. Względna ilość zaadsorbowanych białek: surowiczej albuminy wołowej (a), fibrynogenu (b), IgG (c), owalbuminy (d) oraz streptawidyny (e) do cienkich warstw ataktycznego, izotaktycznego i syndiotaktycznego PtBMA.	52
Rysunek 3.7. Procentowa koncentracja azotu na powierzchni iso- (czerwone kwadraty), at- (niebieskie koła) oraz syn- (zielone trójkąty) PtBMA po adsorpcji lizozymu (a) oraz IgG (b) przedstawiona w funkcji stężenia białka w roztworze PBS.	53
Rysunek 3.8. Analiza orientacji IgG za pomocą PCA danych ToF-SIMS. (a) Wykres współrzędnych obserwacji PC1 jonów dodatnich z widm ToF-SIMS zebranych dla fragmentów Fc (pełne koła) i F(ab)2 (pełne kwadraty) a także dla całej molekuly IgG (otwarte trójkąty), zaadsorbowanych na warstwach at-PtBMA (niebieskie symbole), iso-PtBMA (czerwone symbole) i syn-PtBMA (zielone symbole). (b) Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC1 odpowiadający wykresowi średnich wartości składu pokazanemu w (a). (istotne różnice w średnich wartościach współrzędnych obserwacji na PC1 określono za pomocą testu ANOVA, $p < 0,05$, oznaczone symbolem gwiazdki *).....	54
Rysunek 3.9. (a) Schemat procedury weryfikacji orientacji IgG zaadsorbowanego na powierzchni PtBMA. Kolejne etapy polegały na adsorpcji IgG (króliczego IgG) z roztworu o stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$, blokowaniu roztworem BSA o stężeniu 10 mg/mL i ekspozycji na	

roztwór antygeny znakowanego fluorescencyjnie (kozie przeciwciała IgG) o stężeniu 25 $\mu\text{g/mL}$. Struktury cząsteczek białek zostały wykreślone przy użyciu narzędzi graficznych z Protein Data Bank (b) Wykres intensywności fluorescencji znakowanego fluorescencyjnie antygeny (kozie przeciwciała IgG) po związaniu ze wstępnie zaadsorbowanym anty-IgG (immunoreakcja) na warstwach PtBMA (* istotnie statystycznie różnice między grupami, $p < 0,05$).....	55
Rysunek 3.10. Zmiany konformacji BSA wykryte za pomocą PCA danych ToF-SIMS. (a) wykres współrzędnych obserwacji PC2 dla jonów dodatnich z widm ToF-SIMS BSA zaadsorbowanego na warstwach iso-PtBMA (czerwone kwadraty), at-PtBMA (niebieskie kółka) i syn-PtBMA (zielone trójkąty). (b) Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów dla PC2 odpowiadający wykresowi współrzędnych obserwacji pokazanemu w (a).	56
Rysunek 3.11. a) Hydrofobowość łańcuchów bocznych aminokwasów zdefiniowana jako różnica w czasie retencji (Δt_R) w odniesieniu do peptydu glicyny wykreślona względem wartości współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów na PC2 dla BSA zaadsorbowanego na cienkich warstwach PtBMA. (b) Rozkłady alaniny (czerwony), histydyny (niebieski) i fenyloalaniny (czarny) (b, d) na powierzchni i (c, e) w strukturze cząsteczki BSA.	57
Rysunek 3.12. Hydrofobowość łańcuchów bocznych aminokwasów zdefiniowana jako różnica w czasie retencji (Δt_R) w odniesieniu do peptydu glicyny wykreślona względem wartości współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC1 dla IgG adsorbowanych na cienkich warstwach PtBMA.	58
Rysunek 3.13. Ocena adhezji bakterii do warstw PtBMA o różnej taktyczności.	59
Rysunek 4.1. Obrazy topografii cienkich warstw PMMA o różnej taktyczności wraz ze zmierzonymi wartościami grubości danej warstwy.	63
Rysunek 4.2. Wykres współrzędnych obserwacji PC1 (a) i odpowiadający mu wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) z analizy PCA widm masowych ToF-SIMS zarejestrowanych dla warstw izotaktycznego (czerwone koła), ataktycznego (niebieskie kwadraty) oraz syndiotaktycznego (zielone trójkąty) PMMA. Elipsy pokazują 95% poziom ufności dla każdego rodzaju próbek.	65
Rysunek 4.3. Adsorpcja surowiczej albuminy wołowej (BSA) i fibrynogenu (FIB) do cienkich warstw izotaktycznego, ataktycznego i syndiotaktycznego PMMA. (* istotnie statystycznie różnice między grupami, $p < 0,05$).....	66
Rysunek 4.4. Analiza orientacji BSA za pomocą PCA danych ToF-SIMS. (a) Wykres współrzędnych obserwacji PC1 jonów dodatnich z widm ToF-SIMS zebranych dla BSA zaadsorbowanego na warstwach iso-PMMA (czerwone koła), at-PMMA (niebieskie kwadraty) oraz syn-PMMA (zielone trójkąty). (b) Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC1 odpowiadający wykresowi średnich wartości składu pokazanemu w (a).	68
Rysunek 4.5. Hydrofobowość łańcuchów bocznych aminokwasów zdefiniowana jako różnica w czasie retencji (Δt_R) w odniesieniu do peptydu glicyny wykreślona względem wartości współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów PC 1 dla BSA zaadsorbowanego na cienkich warstwach PMMA.	69

Rysunek 4.6. Analiza składowych głównych całych przeciwciał oraz ich fragmentów F(ab) ₂ i Fc zaadsorbowanych na a) iso-PMMA, b) at-PMMA i c) syn-PMMA cienkich warstwach. Odpowiadające wykresy współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów zostały przedstawione na wykresach (d-f). Elipsy pokazują 95% poziom ufności dla każdego rodzaju próbek.	70
Rysunek 5.1. Topografia warstw mieszanin PMMA+PtBMA na podłożu krzemowym. ..	77
Rysunek 5.2. Topografia warstw mieszanin PMMA+PtBMA na podłożu pokrytym APTESem.	79
Rysunek 5.3. Przedstawienie domenowej kompozycji mieszaniny iso-PMMA+at-PtBMA, która została potwierdzona przez pomiary AFM-Raman w tym samym miejscu.	80
Rysunek 5.4. Zdjęcie z mikroskopu optycznego (a) oraz mapa AFM topografii (b) asymetrycznej pieczętki o wzorze naprzemiennych pasków.....	81
Rysunek 5.5. Regularne wzory na warstwach iso-PMMA+at-PtBMA wytworzone na podłożu krzemowym z odbitą pieczętką APTESu. Powodzenie procesu replikacji zostało potwierdzenie przez połączenie mikroskopii optycznej (a), AFM (b) oraz spektroskopii Ramana (c-d).	82
Rysunek 5.6. Adsorpcja białek do izotropowej (a-b) oraz regularnej (c-d) mieszaniny iso-PMMA + at-PtBMA wytworzonej odpowiednio na ciągłej warstwie APTES (a-b) oraz na ukształtowanej warstwie naprzemiennych pasków APTES/SiO _x (c-d). Warstwy mieszanin obrazowane z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (a, c) razem z schematem ilustrującym topografię podłoża i proces adsorpcji białka do domen z at-PtBMA (b, d)83	
Rysunek 5.7. Ocena odwzorowania izotropowych (a) jak i regularnych (b) wzorów polimerowych przez zaadsorbowane IgG z wykorzystaniem analizy parametru pokrycia powierzchni. Czarno-białe obrazy powstały z obrazów AFM, Raman i fluorescencyjnych dla ustalonego poziomu odcięcia wyznaczonego przy użyciu analizy geometrii całkowitej. [167]	85
Rysunek 6.1 .Porównanie grubości warstw kopolimerów przed (czerwone słupki) oraz po inkubacji w wodzie przez 5 (niebieskie słupki) i 10 (żółte słupki) minut.....	89
Rysunek 6.2. Porównanie struktury warstw kopolimerów uwidocznionej przez topograficzne (a,c,e,g) oraz fazowe (b,d,f,h) obrazy AFM przed (a-b, e-f) i po (c-d, g-h) inkubacji w wodzie przez 5 minut.	90
Rysunek 6.3. Wykres współrzędnych obserwacji (a) z odpowiadającym mu wykresem współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) dla pierwszej głównej składowej (PC1) z przeprowadzonej analizy PCA dla ujemnych sygnałów ToF-SIMS pochodzących od PS-b-(PGL-g-PGL) (pełne trójkąty) oraz PS-b-PGL (puste trójkąty)..	92
Rysunek 6.4. Wykres współrzędnych obserwacji (a) z analizy PCA dla ujemnych sygnałów ToF-SIMS pochodzących od warstw PS-b-(PGL-g-PGL) (pełne symbole) oraz PS-b-PGL (puste symbole) z różnym czasem interakcji z wodą. Wykres współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów (b) odnoszący się do wykresu współrzędnych obserwacji (a).	93

Rysunek 6.5. Zdjęcia kątów zwilżania dla warstw PS-b-(PGL-g-PGL) (a-c) oraz dla PS-b-PGL (d-f) z różnym czasem immersji w wodzie.....	94
Rysunek 6.6. (a) Średnie kąty zwilżania zmierzone dla PS-b-(PGL-g-PGL) oraz PS-b-PGL po różnym czasie inkubacji warstw w wodzie. (b) Frakcja polyglicydotu na powierzchni wyliczona dla warstw kopolimerowych zanurzonych w wodzie, na podstawie danych zwilżalności analizowanych na podstawie równania Cassie (6.1).	94
Rysunek 6.7. Zdjęcia fluorescencyjne dla zaadsorbowanego BSA do cienkich warstw PS-b-(PGL-g-PGL) (a) oraz PS-b-PGL (b), które zostały wygrzane oraz zanurzone w wodzie przez 0, 5 czy 10minut lub w roztworze PBS przez 5 minut. Zdjęcia zostały przeanalizowane z zastosowaniem podejścia geometrii całkowej dla otrzymania ilościowych wartości zaadsorbowanego BSA do warstw kopolimerów (c-d).	96