

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej



Praca Doktorska

**Hybrydowe układy polimerowo-nieorganiczne
zawierające nanocząstki magnetyczne do zastosowań
biomedycznych**

mgr Weronika Górka-Kumik

Promotor: prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny

Promotor pomocniczy: dr Michał Szuwarzyński

Kraków 2021

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana *Weronika Górka-Kumik* (nr indeksu:1077701) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „Hybrydowe układy polimerowo-nieorganiczne zawierające nanocząstki magnetyczne do zastosowań biomedycznych” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem *Prof. dr. hab. Szczepana Zapotocznego* oraz *Dr. Michała Szuwarzyńskiego*. Pracę napisałam 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.

.....

miejsowość, data

.....

podpis doktorantki

"Nie można bowiem mieć nadziei na skierowanie świata ku lepszym drogom, o ile się jednostek nie skieruje ku lepszemu. W tym celu każdy z nas powinien pracować nad udoskonaleniem się własnym, jednocześnie zdając sobie sprawę ze swej, osobistej odpowiedzialności za całokształt tego, co się dzieje w świecie, i z tego, że obowiązkiem bezpośrednim każdego z nas jest dopomagać tym, którym możemy się stać najbardziej użyteczni."

— Maria Skłodowska-Curie

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Panu Prof. dr. hab. Szczepanowi Zapotocznemu za przyjęcie mnie do zespołu, umożliwienie realizacji interesującej pracy badawczej, inspirację, opiekę merytoryczną oraz za ogromną życzliwość przez wszystkie lata współpracy;

Panu Dr. Michałowi Szuwarzyńskiemu za owocną współpracę, poświęcony czas, niesłabnący optymizm i wszelką pomoc podczas realizacji badań oraz powstawania niniejszej pracy;

Kochanym Rodzicom za możliwość edukacji i cały trud, jaki włożyli w moje wychowanie oraz **Rodzeństwu** za niesłabnącą wiarę w moje możliwości;

Mojemu **Mężowi Michałowi** za wyrozumiałość, wieczny optymizm i ogromne wsparcie, które zawsze pomaga mi przezwyciężać przeciwności;

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zespołu Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Wydziału Chemii UJ, Akademickiego Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH oraz z Zakładu Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ, których nie sposób wymienić z imienia i nazwiska, za cenną współpracę, trafne uwagi dotyczące badań, miłą atmosferę pracy oraz okazaną życzliwość, bez których ta praca w obecnym kształcie nie mogłaby powstać.



Praca zrealizowana w ramach programu TEAM organizowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020 (PO IR), Oś IV: Zwiększenie potencjału naukowo-badawczego, Działanie 4.4: Zwiększanie potencjału kadrowego sektora B+R. Tytuł projektu: „Macromolecular Engineering of Surface-Grafted Polymer Brushes”. TEAM/2016-1/9. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny.



**AKADEMICKIE CENTRUM
MATERIAŁÓW
i NANOTECHNOLOGII AGH**

Praca powstała dzięki wsparciu infrastrukturą badawczą Akademickiego Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH.

Spis treści

STRESZCZENIE	11
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	13
WYKAZ OZNACZEŃ I SKRÓTÓW	15
1. WPROWADZENIE I CEL PRACY	17
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	18
2.1. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPION).....	18
2.1.1. Metody otrzymywania SPION	20
2.1.2. Zastosowania SPION.....	26
2.1.3. SPION w hipertermii magnetycznej.....	30
2.2. Cienkie warstwy polimerowe na powierzchni	33
2.2.1. Filmy polimerowe uzyskiwane metodą „warstwa po warstwie” (LbL)	34
2.2.1.1. Polielektrolity stosowane w metodzie LbL	36
2.2.1.2. Zastosowania filmów polimerowych otrzymywanych metodą LbL	38
2.2.2. Szczotki polimerowe	41
2.2.2.1. Metody otrzymywania szczotek polimerowych	44
2.2.2.2. Zastosowania szczotek polimerowych	53
2.2.2.3. Inteligentne podłoża polimerowe na bazie szczotek polimerowych	57
2.3. Układy hybrydowe polimerowo-nieorganiczne zawierające nanocząstki	61
2.3.1. Nanocząstki pokryte polimerami.....	62
2.3.2. Nanocząstki w warstwach polimerowych	68
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	71
3.1. SPION domieszkowane cynkiem i pokryte kationową pochodną chitozanu do zastosowań w hipertermii magnetycznej.....	71
3.1.1. Materiały.....	71
3.1.2. Procedury eksperymentalne.....	71
3.1.2.1. Synteza nanocząstek metodą współstrącania.....	71
3.1.2.2. Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek	73
Oznaczanie zawartości żelaza.....	73
Pomiary rozmiarów nanocząstek	74
Określenie stabilności zawiesin nanocząstek	75
Badanie składu pierwiastkowego nanocząstek	76
3.1.2.3. Badanie właściwości magnetycznych nanocząstek	76
3.1.2.4. Badanie struktury SPION-Zn ²⁺ -CCh(+).....	78
3.1.2.5. Testy cytotoksyczności SPION-Zn ²⁺ -CCh(+) na liniach komórkowych <i>neuroblastoma</i>	78
3.1.2.6. Eksperymenty hipertermii magnetycznej i badania <i>in vitro</i> na liniach komórkowych <i>neuroblastoma</i>	79

3.1.3. Wyniki oraz ich opracowanie	80
3.1.3.1. Analiza fizykochemiczna nanocząstek.....	81
3.1.3.2. Potwierdzenie właściwości magnetycznych nanocząstek.....	89
3.1.3.3. Określenie struktury nanocząstek.....	91
3.1.3.4. Eksperymenty hipertermii magnetycznej.....	94
3.1.3.5. Badania biologiczne <i>in vitro</i> na liniach komórkowych.....	100
3.1.4. Wnioski	102
3.2. Układy hybrydowe łączące szczotki polimerowe i nanocząstki magnetyczne.....	104
3.2.1. Materiały	104
3.2.2. Procedury eksperymentalne	104
3.2.2.1. Synteza szczotek polimerowych za pomocą powierzchniowo-inicjowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (SI-ATRP)	104
3.2.2.2. Synteza układów hybrydowych łączących szczotki polimerowe i nanocząstki magnetyczne	106
3.2.2.3. Analiza fizykochemiczna nanocząstek wykorzystywanych do utworzenia układu hybrydowego ze szczotkami polimerowymi	107
3.2.2.4. Badanie właściwości układów hybrydowych	108
3.2.2.5. Badania biologiczne <i>in vitro</i> na liniach komórkowych.....	109
3.2.3. Wyniki oraz ich opracowanie	111
3.2.3.1. Charakterystyka nanocząstek wykorzystywanych do utworzenia układu hybrydowego ze szczotkami polimerowymi	111
3.2.3.2. Charakterystyka powierzchni układów hybrydowych i szczotek polimerowych	114
3.2.3.3. Pomiary sztywności warstw	120
3.2.3.4. Analiza zawartości oraz rozmieszczenia pierwiastków w układach hybrydowych i szczotkach polimerowych.....	122
3.2.3.5. Badanie <i>in vitro</i> wpływu bodźca magnetycznego na zachowanie komórek <i>neuroblastoma</i>	125
3.2.4. Wnioski	130
4. PODSUMOWANIE ROZPRAWY	132
5. BIBLIOGRAFIA.....	134
DOROBEK NAUKOWY	156

STRESZCZENIE

Układy hybrydowe łączące polimery i nieorganiczne nanocząstki przyciągają w ostatnich latach coraz większą uwagę naukowców ze względu na mnogość ich zastosowań (m.in. w inżynierii materiałowej, elektronice czy też biomedycynie), wynikającą z połączenia unikalnych właściwości obu materiałów w jednym kompozycie. W przypadku zastosowań biomedycznych zarówno polimery jak i nieorganiczne nanocząstki stanowią bardzo ważny element m.in. nowych leków, środków terapeutycznych oraz teranostycznych, a także materiałów do zastosowań w inżynierii tkankowej. Niniejsza praca doktorska koncentruje się na otrzymaniu i scharakteryzowaniu polimerowo-nieorganicznych układów hybrydowych zawierających nanocząstki magnetyczne, a także na ich zastosowaniu w biomedycynie. Badania zaprezentowane w niniejszej pracy zostały podzielone na dwie zasadnicze części, które różnią się podejściem do tworzenia układów hybrydowych. Pierwsza część prezentuje nanocząstki magnetyczne domieszkowane cynkiem i pokryte warstwą polimeru, otrzymane w celu zastosowania w hipertermii magnetycznej, natomiast druga część pracy przedstawia warstwy szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami magnetycznymi, które mogą znaleźć zastosowanie jako czułe na bodźce podłoża do hodowli komórkowych. Nieorganiczne nanocząstki magnetyczne stanowią ogniwo łączące obie części badań.

W pierwszej części zsyntezowano metodą współstrącania magnetyczne nanocząstki, złożone z domieszkowanego tlenku żelaza, opłaszczone kationową pochodną chitozanu. Otrzymane zawiesiny scharakteryzowano fizykochemicznie poprzez pomiary techniką spektroskopii absorpcyjnej UV–Vis, pomiar dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz potencjału dzeta, obrazowanie za pomocą wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego (HRTEM), małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS), a także za pomocą spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS). Następnie przeprowadzono eksperymenty mające na celu potwierdzenie właściwości magnetycznych otrzymanych układów za pomocą magnetometru wibracyjnego (VSM) oraz ich struktury poprzez technikę spektrometrii mössbauerowskiej oraz wysokorozdzielczej spektroskopii absorpcji promieni X w pobliżu progu absorpcji (HERFD XANES). W ostatniej fazie badań wykonano testy cytotoksyczności otrzymanych układów, eksperymenty hipertermii magnetycznej oraz *in vitro* na liniach komórkowych *neuroblastoma*. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że otrzymano superparamagnetyczne nanocząstki opłaszczone warstwą polimeru o pożądanych właściwościach magnetycznych i biokompatybilnych, które nadają się do zastosowań w hipertermii magnetycznej,

umożliwiając osiągnięcie przez zawiesinę w obecności komórek temperatury terapeutycznej (41–46°C).

W drugiej części pracy otrzymano hybrydowe kompozyty oparte na szczotkach polimeru kationowego oraz nanocząstkach magnetycznych, stosując stosunkowo łatwą i wydajną metodę tworzenia poprzez inicjowaną powierzchniowo kontrolowaną polimeryzację rodnikową typu ATRP (ang. atom transfer radical polymerization) wspomaganą ultradźwiękami. Przed przeprowadzeniem syntezy układów hybrydowych scharakteryzowano nanocząstki magnetyczne poprzez określenie zawartości żelaza za pomocą spektroskopii UV–Vis, mikroskopii HRTEM, pomiarów DLS i potencjału dzeta, a także zbadano ich właściwości magnetyczne poprzez pomiary mikroskopii sił magnetycznych (MFM). Otrzymane nanokompozyty łączące szczotki polimerowe i nanocząstki magnetyczne scharakteryzowano stosując mikroskopię sił atomowych (AFM) oraz MFM, pomiary ilościowego mapowania nanomechanicznego (QNM), analizę XPS, a także spektrometrię mas jonów wtórnych (SIMS). W kolejnym etapie badań przeprowadzono eksperymenty biologiczne *in vitro* na liniach komórkowych *nauroblastoma*, mające na celu sprawdzenie przydatności otrzymanych nanokompozytów jako czułych na bodźce podłoża do hodowli komórkowych. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że podłoża te mogą być z powodzeniem stosowane do hodowli komórek, a także do ich odrywania pod wpływem nieinwazyjnego bodźca jakim jest pole magnetyczne.

Podsumowując, badania przedstawione w niniejszej pracy poszerzają grupę hybrydowych układów polimerowo-nieorganicznych o właściwościach magnetycznych, które mogą znaleźć zastosowanie w hipertermii magnetycznej oraz w inżynierii tkankowej, a uzyskana wiedza może stanowić bazę do dalszych modyfikacji i funkcjonalizacji tego typu układów.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Recently, hybrid systems combining polymers and inorganic nanoparticles have attracted more and more attention of scientists due to the multitude of their applications (e.g., in materials science, electronics or biomedicine), resulting from the combination of the unique properties of both materials in one composite. Considering biomedical applications, both polymers and inorganic nanoparticles are very important elements of i.a. new drugs, therapeutics and theranostics agents, as well as materials for applications in tissue engineering. This doctoral thesis focuses on the development and characterization of polymer-inorganic hybrid systems containing magnetic nanoparticles, as well as the application of such composites in biomedicine. The research presented in this thesis has been divided into two main parts, which differ in the approach to creating hybrid systems. The first part presents zinc doped magnetic nanoparticles coated with polymer, obtained for application in magnetic hyperthermia, while the second part presents polymer brush layers with embedded magnetic nanoparticles that may be used as stimuli responsive substrates for cell culture. Inorganic magnetic nanoparticles are the connecting link between these two parts of the research.

In the first part of the thesis, magnetic nanoparticles doped with zinc and coated with a cationic derivative of chitosan were synthesized by co-precipitation method. The obtained suspensions were characterized physicochemically by UV–Vis absorption spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements, high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), small-angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Subsequently, vibration magnetometer experiments (VSM) were carried out to confirm the magnetic properties of the obtained systems, whereas Mössbauer spectrometry and high-resolution X-ray absorption spectroscopy near the absorption threshold (HERFD XANES) were conducted to examine their structure. In the last phase of the research, cytotoxicity tests of the obtained composites were performed, as well as magnetic hyperthermia and in vitro experiments on *neuroblastoma* cell lines. Based on the conducted experiments, it was found that obtained inorganic-polymer systems with good magnetic and biocompatible properties may be suitable for use in magnetic hyperthermia, allowing the suspension to reach the therapeutic temperature (41–46 °C) in the presence of cells.

In the second part of the work, hybrid composites based on cationic polymer brushes and magnetic nanoparticles were obtained, using a relatively easy and efficient method of synthesis through atom transfer radical polymerization (ATRP) assisted by ultrasounds. Prior to the synthesis of hybrid systems, magnetic nanoparticles were characterized by determination

of iron content via UV–Vis spectroscopy, HRTEM microscopy, DLS and dzeta potential measurements, and their magnetic properties were examined by magnetic force microscopy (MFM) measurements. The obtained nanocomposites combining polymer brushes and magnetic nanoparticles were characterized using atomic force microscopy (AFM) and MFM spectroscopy, quantitative nanomechanical mapping (QNM) measurements, XPS analysis, and secondary-ion mass spectroscopy (SIMS). In the next stage of the study, *in vitro* biological experiments were carried out on *neuroblastoma* cell lines to test their suitability as stimuli-responsive substrates for cell culture. The obtained results show that these hybrid substrates can be successfully used for cell culture, as well as for their detachment under the influence of a non-invasive stimulus, such as the magnetic field.

Summarizing, the research presented in this paper extends the group of hybrid polymer-inorganic systems with magnetic properties that can be used in magnetic hyperthermia and tissue engineering. Moreover, the knowledge obtained may be a basis for further modification and functionalisation of such systems.

WYKAZ OZNACZEŃ I SKRÓTÓW

AFM—mikroskopia sił atomowych (ang. Atomic Force Microscopy)
ALG—alginian
APTAC—chlorek (3-akrylamidopropylo) trimetyloamoniowy
ATRP—polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ang. Atom Transfer Radical Polymerization)
BIB—bromek bromoizobutyrylu
BLI—obrazowanie bioluminescencji (ang. Bioluminescence Imaging)
BMP-2—białko morfogenetyczne kości (ang. Bone Morphogenetic Protein)
BSA—surowicza albumina bydlęca (ang. Bovine Serum Albumin)
Ch—chitozan
CCh(+)—kationowa pochodna chitozanu
CRP—kontrolowana polimeryzacja rodnikowa (ang. Controlled Radical Polymerization)
CTA—czynniki przenoszący łańcuch (ang. Chain Transfer Agent)
CVD—chemiczne osadzanie z fazy gazowej (ang. Chemical Vapour Deposition)
DMAPAAm—N,N-dimetyloaminopropylakrylamid
DMEM—pożywka do hodowli komórek (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DLS—dynamiczne rozpraszanie światła (ang. Dynamic Light Scattering)
PDMAA—poli(N,N-dimetyloakrylamid)
ECM—macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix)
FBS—surowica bydlęca (ang. Fetal Bovine Serum)
FLI—obrazowanie fluorescencji (ang. Fluorescence Imaging)
FRP—konwencjonalna polimeryzacja wolnorodnikowa (ang. Free Radical Polymerization)
HA—kwas hialuronowy
HERFD XANES—wysoko rozdzielcza spektroskopia absorpcji promieni X w pobliżu progu absorpcji (ang. High-Energy Resolution Fluorescence Detected X-ray Absorption Near Edge Structure)
HRTEM—wysoko-rozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. High-Resolution Transmission Electron Microscopy)
IL—interferencyjna litografia laserowa
ILP—parametr w hipertermii magnetycznej, uwzględniający natężenie i częstotliwość pola magnetycznego (ang. Intrinsic Loss Power)
IMP—polimeryzacja z wykorzystaniem inifetera (ang. Iniferter-Mediated Polymerization)
ITO—tlenek indu domieszkowany tlenkiem cyny (ang. Indium Tin Oxide)
LbL—metoda uzyskiwania cienkich filmów „warstwa po warstwie” (ang. Layer-by-Layer)
LCST—dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności (ang. Lower Critical Solution Temperature)
MACS—magnetyczne sortowanie komórek (ang. Magnetic Assisted Cell Sorting)
MFM—mikroskopia sił magnetycznych (ang. Magnetic Force Microscopy)
MH—hipertermia magnetyczna (ang. Magnetic Hyperthermia)
MMUS—ultrasonografia z bodźcem magnetycznym (ang. Magneto-Motive UltraSound)
MRI—obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. Magnetic Resonance Imaging)
MTT—bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloetrazoliowy
NMP—polimeryzacja rodnikowa modyfikowana trwałymi rodnikami nitroksylowymi (ang. Nitroxide-Mediated Polymerization)
PAA—kwas poliakrylowy
PAH—poli(chlorowodorek alliloaminy)
PBAE—poli(β-amino ester)
PBS—buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. Phosphate Buffered Saline)
PCBMAA—poli(metakrylamid karboksybetainy)
PCL—polikaprolakton
PDADMAC—poli(chlorek diallilodimetyloamoniowy)
PDAEMA—poli(metakrylan N,N-dimetyloaminoetylu)
PDI—współczynnik dyspersyjności (ang. Polydispersity Index)
PDMAEMA—poli(metakrylan 2-(dimetyloamino)etylu)
PEG—poli(tlenek etylenu)
PEGMEMA—metakrylan eteru metylowego poli(glikolu etylenowego)
PEI—polietylenoamina
PEO—tlenek polietylenu
PF-MFM—mikroskopia MFM w trybie PeakForce
PGMA—poli(metakrylanu glicydyłu)
PHEAA—poli(N-hydroksyetyloakrylamid)

PHEMA—poli(metakrylanu 2-hydroksyetylu)
PHMAA—poli[N-(2-hydroksypropylo)metakrylamid]
PIMP—polimeryzacja z wykorzystaniem fotoinifertera (ang. PhotoIniferter-Mediated Polymerization)
PLA—polilaktyd
PLL—poli-L-lizyna
PMAA—kwas polimetakrylowy
PMDETA—N,N,N',N'',N''-pentametylodietylenotriamina
PMETAC—chlorek poli[(2-metakryloksy)etylotrimetyloamoniowy]
PNAAPBA—poli(kwas N-akrylo-m-fenylboronowy)
PNIPAM—poli(N-izopropylakrylamid)
PDEGMA—poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu dietylenowego)
POEGMA—poli(metakrylan glikolu oligoetylenowego)
PPEGMA—polimetakrylan poli(glikolu etylenowego)
PPy—polipirol
PRE—efekt trwałego rodnika (ang. Persistent Radical Effect)
PSBMA—poli(metakrylan sulfobetainy)
PSS—polistyrenosulfonian sodu
P4VP—poli-4-winylopirydyna
PVD—fizyczne osadzanie z fazy gazowej (ang. Physical Vapour Deposition)
PVP—poli(winylopirolidon)
QNM—ilościowe mapowanie nanomechaniczne (ang. Quantitative Nanomechanical Mapping)
RAFT—polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (ang. Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization)
RGD—sekwencja peptydowa składająca się z aminokwasów argininy, glicyny i kwasu asparaginowego (Arg-Gly-Asp)
RMS—średnia kwadratowa (ang. Root Mean Square)
ROP—polimeryzacja z otwarciem pierścienia (ang. Ring-Opening Polymerization)
SAM—warstwy samoorganizujące się (ang. Self-Assembled Monolayer)
SAR—współczynnik absorpcji swoistej (ang. Specific Absorption Rate)
SAXS—rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małym kątem (ang. Small Angle X-ray Scattering)
SI-ATRP—powierzchniowo-inicjowana polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu
SIMS—spektrometria mas jonów wtórnych (ang. Secondary Ion Mass Spectrometry)
SI-NMP—powierzchniowo-inicjowana polimeryzacja rodnikowa modyfikowana trwałymi rodnikami nitroksylowymi
SI-PIMP—powierzchniowo-inicjowana polimeryzacja z wykorzystaniem fotoinifertera
SI-RAFT—powierzchniowo-inicjowana polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha
SPECT—tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (ang. Single-Photon Emission Computed Tomography)
SPION—superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (ang. SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles)
SPION-CCh(+)—superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza zmodyfikowane wyłącznie chitozanem kationowym
SPION-Zn-CCh(+)—superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza zmodyfikowane chitozanem kationowym oraz domieszkowane jonami cynku
TEA—trietyloamina
USG—obrazowanie ultradźwiękami (ang. UltraSonoGraphy)
VSM—magnetometr wibracyjny (ang. Vibrating Sample Magnetometer)
XPS—spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (ang. X-ray Photoelectron Spectroscopy)

1. WPROWADZENIE I CEL PRACY

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono polimerowo-nieorganicznym układom kompozytowym, które, w wielu zastosowaniach, stanowią alternatywę w stosunku do materiałów składających się wyłącznie z jednego rodzaju substancji. Wykorzystanie metod nanotechnologii podczas tworzenia takich hybrydowych układów daje nowe, bardzo szerokie możliwości zastosowania w inżynierii materiałowej [1], elektronice [2] czy też biomedycynie [3]. Nanomateriały niejednokrotnie wykazują nowe, niewystępujące w skali makro właściwości, co spowodowało duże zainteresowanie oraz intensywny rozwój nanotechnologii jako interdyscyplinarnej dziedziny badań. Połączenie polimerów i nanocząstek nieorganicznych (cząstek, których żaden z wymiarów nie przekracza 100 nm [4]) powoduje nadanie obu materiałom nowych właściwości łączących cechy obu składowych, takich jak większa wytrzymałość mechaniczna polimerów i lepsza stabilność nanocząstek. Dzięki temu hybrydowe układy znajdują zastosowanie m.in. w teranostyce, hodowli komórek, wytwarzaniu sensorów i urządzeń fotowoltaicznych oraz w atramentach magnetycznych.

Nanocząstki są od kilku dekad intensywnie badane pod kątem zastosowań biomedycznych [5]. Do najczęściej używanych w biomedycynie nanocząstek można zaliczyć superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (*SPION*, ang. *SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), które dzięki unikalnym właściwościom znalazły zastosowanie jako środki kontrastowe w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (*MRI*, ang. *Magnetic Resonance Imaging*), nośniki dostarczania leków, a także jako ogniwo łączące aplikacje diagnostyczne i terapeutyczne [6,7]. Ich szczególna przydatność dotyczy zarówno teranostyki, np. podawania leków przy kontroli obrazu, sterowanie barierą krew-mózg za pomocą obrazu, jak również inżynierii tkankowej. Interesującym kierunkiem badań, który nie został jeszcze dogłębnie przebadany, są szczotki polimerowe sterowane magnetycznie. Mogą one znaleźć zastosowanie jako podłoża w kontrolowanej adhezji i odrywaniu komórek [8]. W dziedzinie hodowli komórkowych warto zaznaczyć, że większość żywych organizmów nie jest bardzo wrażliwa na pole magnetyczne, czyniąc ten rodzaj kontroli powierzchni potencjalnie nieinwazyjnym, szczególnie w przypadku odrywania komórek. Niemniej jednak polimery samoistnie reagujące na pole magnetyczne są rzadkie i ogólnie wykazują słabą skuteczność. Dlatego stworzenie podłoża czułego na pole magnetyczne wymaga osadzenia w warstwie szczotek polimerowych magnetycznych cząstek i utworzenia nanokompozytu. Różnorodne kierunki badań nanocząstek SPION podkreślają ich wszechstronność i dają nadzieję

na włączenie do przyszłej praktyki medycznej wielu materiałów na bazie nanocząstek tlenku żelaza.

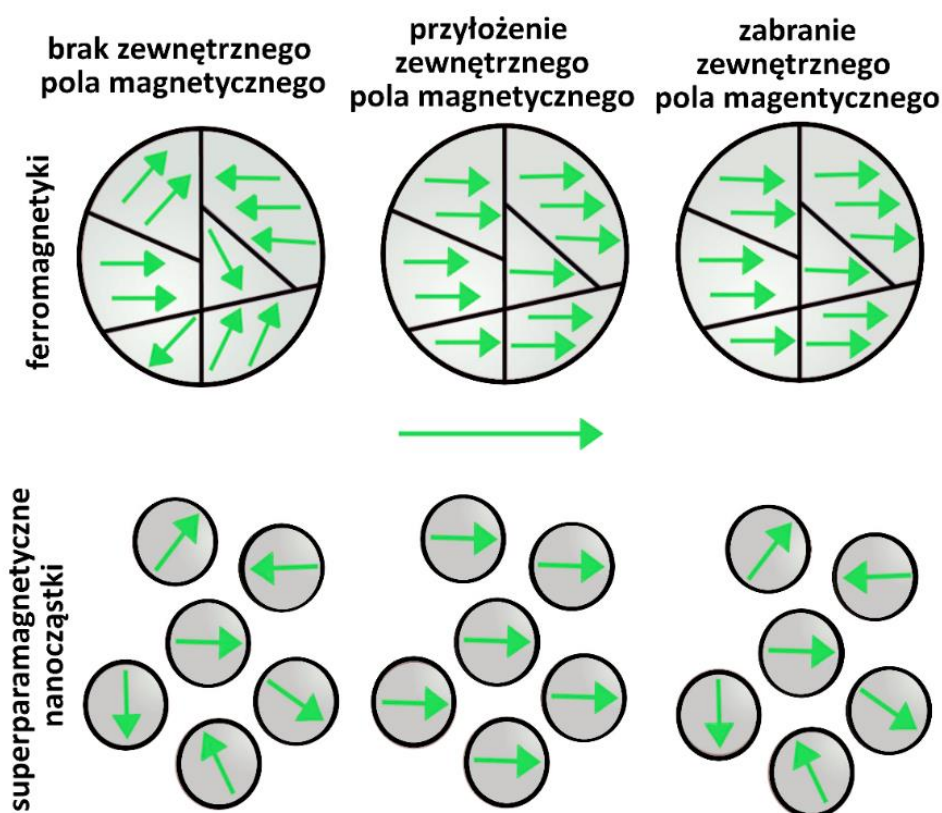
Celem badań prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej było otrzymanie i scharakteryzowanie hybrydowych polimerowo-nieorganicznych układów bazujących na nanocząstkach magnetycznych. Moje badania podzieliłam na dwie zasadnicze części, różniące się podejściem do tworzenia polimerowo-nieorganicznego układu: pierwsza z nich prezentuje nanocząstki domieszkowane cynkiem i pokryte polimerem do zastosowań w hipertermii magnetycznej, natomiast druga przedstawia warstwy szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami, które mogą zostać wykorzystane jako czułe na bodźce podłoża do hodowli komórkowych. Ogniwem łączące obie części badań stanowią zastosowane nieorganiczne nanocząstki magnetyczne.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPION)

Większość magnetycznych nanocząstek stosowanych w biomedycynie i przemyśle posiada rdzenie składające się z magnetytu (Fe_3O_4) i maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Oba te tlenki są w temperaturze pokojowej ferrimagnetykami [9]. Oznacza to, że elementarne momenty magnetyczne są antyrównoległe, jednak ze względu na występujące pomiędzy nimi nierówności, dochodzi do indukowania spontanicznego namagnesowania materiału [10]. Magnetyt wykazuje największe namagnesowanie wśród tlenków żelaza. Jego temperatura Néela (odpowiednik temperatury Curie), czyli temperatura, powyżej której tlenek traci swoje właściwości ferrimagnetyczne i staje się paramagnetykiem, wynosi 850 K. Magnetyt powstaje w wyniku spalania żelaza w tlenie i jest tlenkiem charakteryzującym się dużą odpornością na działanie kwasów i utleniaczy. W jego strukturze spinelowej luki oktaedryczne są zajmowane przez jony Fe^{2+} oraz Fe^{3+} rozmieszczone przypadkowo, natomiast luki tetraedryczne są zajmowane wyłącznie przez jony Fe^{3+} . Maghemit natomiast charakteryzuje się temperaturą Néela w zakresie 820–986 K. Występuje w naturze jako produkt wietrzenia magnetytu, z którym tworzy stałe ciągle roztwory lub jako produkt ogrzewania innych tlenków żelaza. Struktura krystalograficzna maghemitu przypomina strukturę odwróconego spinelu magnetytu, jednak jedną trzecią luk zajmowanych przez jony Fe^{2+} zajmują wakancje kationowe, a pozostałe luki są wypełnione jonami Fe^{3+} . Po zmniejszeniu rozmiaru struktur zarówno magnetytu jak i maghemitu do rozmiarów rzędu od kilku do kilkudziesięciu nanometrów, cząstki tych tlenków wykazują unikalne właściwości superparamagnetyczne [11]. Zjawisko superparamagnetyzmu występuje, gdy energia termiczna staje się porównywalna lub

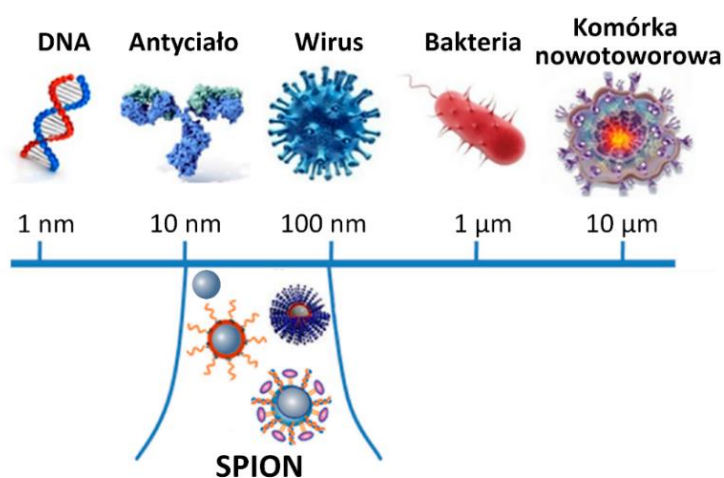
większa od energii związanej z anizotropią magnetyczną. To z kolei umożliwia pokonanie bariery energetycznej anizotropii i prowadzi do istnienia stabilnej magnetyzacji [12]. Przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego do nanocząstek SPION powoduje sprzężanie atomowych momentów magnetycznych i wytworzenie nadzwyczaj dużego wypadkowego momentu magnetycznego, co umożliwia m.in. magnetyczne sterowanie nanocząstkami SPION. Wypadkowy moment magnetyczny w obecności zewnętrznego pola magnetycznego ulega uporządkowaniu zgodnie z przyłożonym polem magnetycznym, a jego usunięcie może spowodować utratę uporządkowania i relaksację magnetyzacji w przypadkowych kierunkach (Rys. 1) [13].



Rys. 1. Zachowanie domen magnetycznych w ferromagnetykach i momentów magnetycznych w superparamagnetycznych nanocząstkach tlenku żelaza względem zewnętrznego pola magnetycznego (adaptacja na podstawie Belyanina, 2017).

Nanocząstki SPION, oprócz wysokiej wartości magnetyzacji, mają szereg cennych właściwości umożliwiających ich biomedyczne zastosowanie. Rozmiar mieszczący się w zakresie od 1 do 100 nm, który jest porównywalny z rozmiarem perforacji komórkowych, wirusów, białek, lipidów czy grubości łańcuchów DNA sprawia, że nanocząstki są w stanie oddziaływać z obiektami biologicznymi (Rys. 2) [13]. Mogą także bez większych przeszkód przechodzić przez najmniejsze naczynia krwionośne, choć zależy to od perforacji śródbłónka

wyścielającego naczynia krwionośne. Wielkość przestrzeni międzykomórkowych jest różna w zależności od narządu: komórki śródbłónka w układzie nerwowym przylegają ściśle do siebie, natomiast w mięśniach, płucach czy skórze perforacje w warstwie komórek wynoszą ok. 6 nm. Odstępy między komórkami śródbłónka w nerkach, jelitach oraz niektórych gruczołach mieszczą się w zakresie 50–60 nm, a największe perforacje (100–1000 nm) charakteryzują szpik kostny, wątrobę i śledzionę [14]. To właśnie do wątroby i śledziony, czyli organów o największych przestrzeniach międzykomórkowych oraz bogatych w makrofagi i liposomy, powinna trafiać większość nanocząstek po spełnieniu swojej roli w organizmie. Są one tam gromadzone oraz dalej rozkładane na wolne żelazo i wydalone z organizmu, co świadczy o ich biodegradowalności [15].

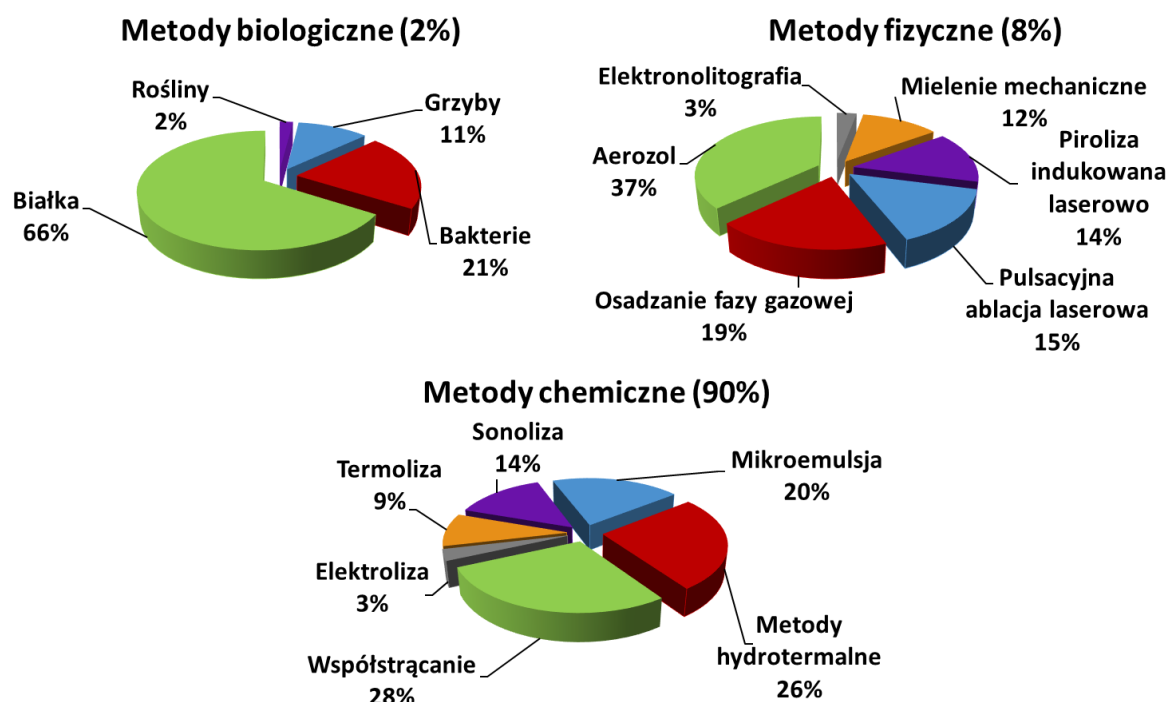


Rys. 2. Skala wielkości nanocząstek SPION w porównaniu do różnych biomolekuł (adaptacja na podstawie Belyanina, 2017).

W kwestii rozmiaru istotny jest także wąski rozkład wielkości nanocząstek, który zapewnia jednolite właściwości fizyczne i chemiczne [16]. Nanocząstki SPION charakteryzują się ponadto niską toksycznością oraz wysokim stosunkiem powierzchni do objętości, wystarczającym do wydajnej funkcjonalizacji powierzchniowej [17,18]. Właściwości nanocząstek magnetycznych są w znacznym stopniu związane z metodą syntezy, jednak dzięki funkcjonalizacji powierzchni można je modyfikować w zależności od potrzeb.

2.1.1. Metody otrzymywania SPION

Metody syntetyczne prowadzące do otrzymania SPION obejmują strategie biologiczne, fizyczne i chemiczne, które w różnym stopniu są wykorzystywane w badaniach naukowych (Rys. 3).



Rys. 3. Porównanie ilości opublikowanych prac na temat otrzymywania SPION trzema różnymi strategiami (adaptacja na podstawie Ali, 2016).

Dobór metody otrzymywania nanocząstek magnetycznych zależy od oczekiwanego kształtu, rozmiaru, pożądanych właściwości oraz dalszego przeznaczenia nanocząstek.

Różne organizmy (np. bakterie, ptaki, ryby) potrafią wytwarzać nanocząstki, które wspomagają ich nawigację działając jak czujniki pola magnetycznego. Z kolei rośliny, wytwarzają naturalne zmineralizowane nanocząstki magnetyczne niezbędne do ich wzrostu. Innym przykładem organizmów żywych produkujących magnetyczne nanocząstki są grzyby, które broniąc się przed wysokim stężeniem jonów metali, wydzielają enzymy zdolne do redukcji jonów metali, co może powodować powstawanie nanocząstek SPION [19,20]. Biologiczne metody otrzymywania nanocząstek SPION bazują głównie na dwóch pokrewnych metodach: wytwarzaniu przez bakterie magnetotaktyczne oraz przez zastosowanie *in vitro* białek wyizolowanych z tych bakterii. Bakterie magnetotaktyczne wykształciły zdolność syntezy drobnych (20–45 nm), wewnątrzkomórkowych i związanych z membraną nanocząstek magnetytu. Pozyskuje się je poprzez rozerwanie ściany komórkowej i separację magnetyczną. Uzyskane nanocząstki mają otoczkę fosfolipidową, co zapewnia im biokompatybilność, wysoką stabilność i łatwość modyfikowania. Niektóre z białek, wyizolowanych z błon magnetosomowych bakterii magnetotaktycznych również pozwalają na syntezę nanocząstek SPION, którą przeprowadza się w żelu polimerowym. W wyniku tej syntezy uzyskuje się nanocząstki o strukturze i właściwościach charakterystycznych dla danych bakterii

magnetotaktycznych [21]. Ograniczenia metod biologicznych wiążą się głównie z pracochłonnością oraz długim czasem syntezy. Ponadto namnażanie tego typu beztlenowych bakterii jest trudne, gdyż jakikolwiek kontakt z powietrzem powoduje ich obumarcie. Co za tym idzie, metody te nie są zbyt wydajne i stosunkowo trudne w otrzymywaniu na większą skalę [22].

Metody fizyczne otrzymywania nanocząstek SPION dotyczą głównie podejścia określanego w nanotechnologii jako „z góry na dół” (*ang. top-down*), czyli osiągania nanometrycznych obiektów poprzez zmniejszanie rozmiaru lub fragmentację np. mechaniczne mielenie tych już istniejących, pirolizę indukowaną laserowo, litografię wiązką elektronową, poprzez kondensację prekursorów z fazy ciekłej lub gazowej [23]. Głównymi wadami fizycznych technik jest brak kontroli nad uzyskiwanym rozmiarem i kształtem nanocząstek oraz silna agregacja nanocząstek [16,24–26]. Pomimo tych trudności, skuteczna w uzyskiwaniu drobnych proszków magnetycznych o średniej wielkości nanocząstek w zakresie 20–50 nm i stosunkowo wąskim rozkładzie rozmiarów okazała się metoda ablacji laserowej w roztworze (*LASIS, ang. Laser Ablation Synthesis in Solution*). Polega ona na działaniu na ciekły roztwór umieszczony w naczyniu wiązką laserową o dużej mocy. Jest to wszechstronna technika syntezy różnych materiałów w różnych rozpuszczalnikach. Uzyskano nią również nanocząstki magnetytu i maghemitu o średniej wielkości cząstek ok. 30 nm [26]. Uwzględniając ten postęp, mimo wszystko, metody fizyczne otrzymywania nanocząstek SPION są mało konkurencyjne ze względu na konieczność wysokich nakładów energetycznych, koniecznych do uzyskania nanocząstek o odpowiednim rozmiarze.

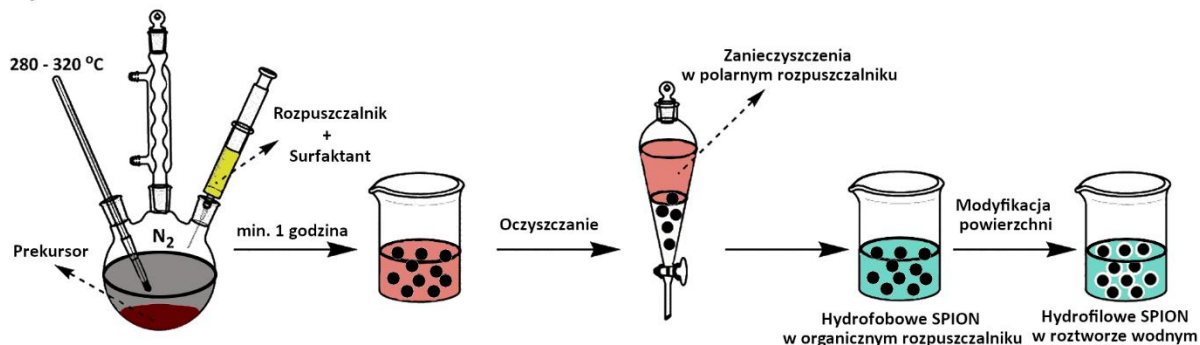
Najpopularniejszym sposobem otrzymywania nanocząstek SPION są metody chemiczne. Są one prostsze i bardziej wydajne, przy jednoczesnej dużej kontroli wielkości, składu, a czasem nawet kształtu nanocząstek [16]. Metody chemiczne wykorzystują podejście „z dołu do góry” (*ang. bottom-up*), polegające na łączeniu ze sobą poszczególnych składowych (np. molekuł), co prowadzi do tworzenia większych obiektów o nanometrycznych wymiarach. Wśród dużej liczby metod chemicznych można wymienić m.in.: metody elektrochemiczne [27], metody hydrotermalne i solwotermalne [28], termolizę [29], sonolizę [30], metody dwufazowe (mikroemulsje woda-w-oleju (w/o) i olej-w-wodzie (o/w)) [31], metody zol-żel [6] oraz współstrącanie [6,32,33]. Synteza elektrochemiczna nanocząstek, jak każda elektrochemiczna technika, polega zasadniczo na przepuszczaniu prądu elektrycznego pomiędzy dwiema lub więcej elektrodami (anodą i katodą) umieszczonymi w elektrolicie. Produkcja jonów żelaza i tlenu oraz kompleksowanie zachodzą na anodzie lub blisko niej, natomiast katoda redukuje jony żelaza z pomocą odpowiednich stabilizatorów [33]. Wśród

zalet tej metody można wymienić możliwość kontroli wielkości cząstek poprzez dostosowanie gęstości prądu lub potencjału do układu, brak konieczności stosowania wysokiej temperatury czy prowadzenie syntezy w obecności środków powierzchniowo czynnych i uniknięcie agregacji nanocząstek [27]. Technika ta jest jednak dość złożona i wymaga specjalistycznej aparatury, a uzyskane materiały zwykle wykazują amorficzne zanieczyszczenia [33,34]. Metody hydrotermalne można zdefiniować jako reakcje chemiczne w rozpuszczalnikach zamkniętych szczelnie w naczyniach, w których temperaturę rozpuszczalnika można poprzez ogrzewanie doprowadzić do punktów krytycznych (punkt współistnienia temperatury krytycznej i ciśnienia krytycznego). Gdy rozpuszczalnikiem jest woda, proces ten nosi nazwę syntezy hydrotermalnej, a gdy stosuje się rozpuszczalniki organiczne to jest to synteza solwotermalna [35]. W metodach tych wielkość i kształt nanocząstek SPION można zoptymalizować poprzez czas reakcji, temperaturę, stężenie i stosunek reagentów, rodzaj rozpuszczalnika, siłę kompleksowania oraz stosowanie prekursorów. Główną trudnością tych metod jest konieczność zastosowania specjalistycznego sprzętu oraz ich skalowalność [33].

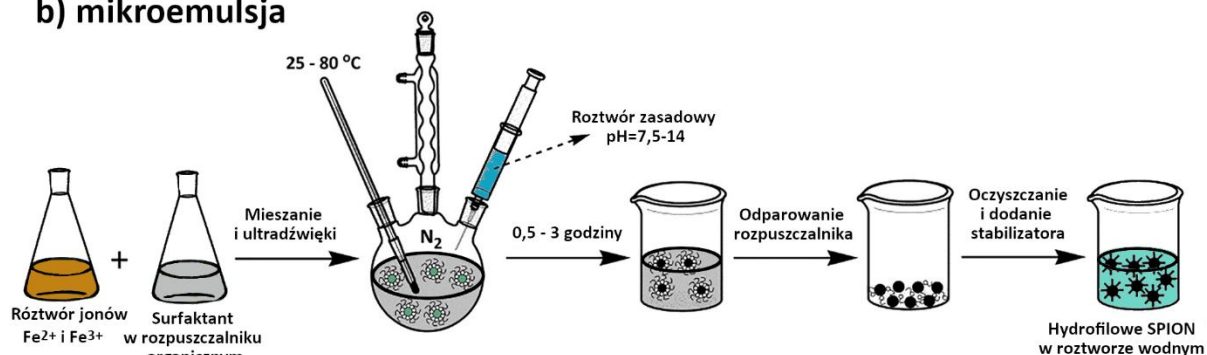
Nanocząstki tlenku żelaza można syntezować również przez dekompozycję metaloorganicznych prekursorów (termoliza lub sonoliza) [6]. Termoliza wykorzystuje ciepło, a sonoliza energię ultradźwięków w celu spowodowania kawitacji mikropęcherzyków w ośrodkach wodnych, w których zachodzą reakcje przekształcenia soli żelaza w magnetyczne nanocząstki (Rys. 4a). Właściwości fizykochemiczne wytworzonych nanocząstek można kontrolować, zmieniając moc i czas wystawienia na działanie temperatury lub ultradźwięków. W przypadku termolizy można uzyskać nanocząstki krystaliczne, natomiast stosując sonolizę otrzymuje się zazwyczaj amorficzne nanocząstki [30]. Jak dotąd metoda rozkładu termicznego jest najczęściej stosowana do przygotowania nanocząstek tlenku żelaza o różnych kształtach, takich jak nanokryształy, nanosześciany i nanosfery [29,35]. W przypadku tych metod trudnością są związane z pozostałością surfaktantów, które wpływają na możliwość osiągnięcia dobrze zmodyfikowanej powierzchni w dalszych modyfikacjach. Podobne ograniczenia wiążą się z syntezą dwufazową (mikroemulsyjną). Cząsteczki środka powierzchniowo czynnego mogą spontanicznie tworzyć nanokrople o różnych rozmiarach, micelle (1–10 nm) lub emulsje typu w/o lub o/w (10–100 nm). W syntezie mikroemulsyjnej wodne roztwory soli żelaza są zamykane w nanokapsułach przez powłokę środka powierzchniowo czynnego, która oddziela je od otaczającego roztworu organicznego (Rys. 4b). Taki nanoreaktor stabilizowany surfaktantem zapewnia zamkniętą przestrzeń, która ogranicza zarodkowanie nanocząstek SPION i ich wzrost. W metodzie tej, podobnie jak w termolizie i sonolizie, oczyszczenie

SPION z pozostałości surfaktantów oraz powiększenie skali produkcji może być problematyczne.

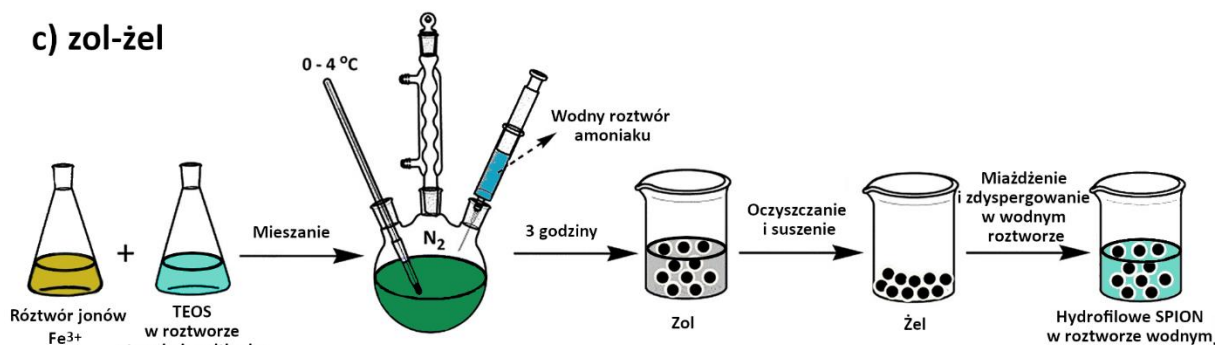
a) termoliza



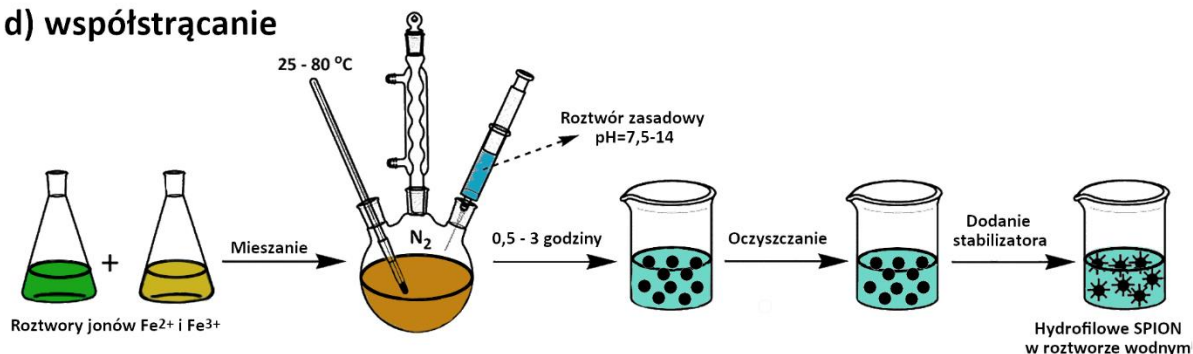
b) mikroemulsja



c) zol-żel



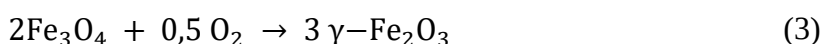
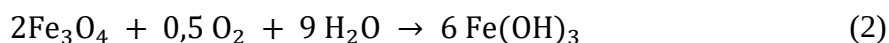
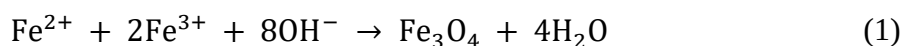
d) współstrącanie



Rys. 4. Schematy wybranych chemicznych metod otrzymywania SPION (adaptacja na podstawie Dadfar, 2019).

Przedostatnią grupą metod, opisaną w tym rozdziale są metody zol-żel. Opierają się one na hydroksylowaniu i kondensacji prekursorów molekularnych (najczęściej alkoholowych) w roztworze, z których powstaje zol cząstek o rozmiarach nanometrycznych (Rys. 4c). Dalsza kondensacja i polimeryzacja nieorganiczna prowadzą do powstania trójwymiarowego mokrego żelu. W kolejnych etapach konieczna jest obróbka cieplna w celu uzyskania krystalicznej struktury. Właściwości żelu są ściśle zależne od struktury utworzonej podczas powstawania zolu w procesie zol-żel. Na kinetykę, wzrost, hydrolizę i kondensację, a w konsekwencji strukturę i właściwości żelu ma wpływ rozpuszczalnik, temperatura, stężenie prekursorów, pH oraz mieszanie [6]. Uzyskany żel można wykorzystać do wytwarzania różnego rodzaju nanostruktur i nanomateriałów, takich jak kserożele, aerożele i proszki. Wśród zalet syntezy zol-żel można wymienić krótki czas przetwarzania, dobrą kontrolę stechiometrii i wytwarzanie nanocząstek o wąskim rozkładzie rozmiaru w niskiej temperaturze [36]. Jednak potrzeba późniejszej obróbki cieplnej otrzymanych produktów oraz zanieczyszczenie otrzymanych materiałów ubocznymi produktami reakcji stanowią istotne ograniczenie tej metody.

Najprostszą, a przy tym skuteczną i bardzo wydajną drogą chemiczną do syntezy nanocząstek SPION wydaje się być metoda współstrącania. Nanocząstki SPION uzyskuje się w niej poprzez reakcję współstrącania soli żelaza, np. FeCl_2 i FeCl_3 z zasadą (amoniak, wodorotlenek sodu), prowadzoną zwykle w temperaturze pokojowej (Rys. 4d), opisaną równaniem (1):



Całkowite strącenie tlenku Fe_3O_4 powinno nastąpić w mieszaninie jonów żelaza o stosunku molowym $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ równym 1:2, przy pH mieszczącym się w zakresie od 7,5 do 14 i w atmosferze inertnego gazu. Nieutleniająca atmosfera ogranicza zachodzenie reakcji opisanych równaniami (2) i (3), które mogą limitować proces powstawania nanocząstek magnetytu oraz wpłynąć negatywnie na ich chemiczne i fizyczne właściwości [33]. W metodzie tej istnieje kilka parametrów determinujących wielkość i monodispersję otrzymywanych nanocząstek SPION. Im wyższa wartość pH roztworu (dodanie zasady) i siły jonowej tym mniejsze otrzymuje się nanocząstki. Również niska temperatura, wysoki stopień mieszania oraz pęcherzyki obojętnego gazu mieszające roztwór soli redukują rozmiar nanocząstek [32]. Istotną zaletą tej techniki jest środowisko wodne syntezy, dzięki czemu nie trzeba stosować

toksycznych prekursorów, rozpuszczalników organicznych czy surfaktantów. Ponadto możliwe jest wprowadzanie modyfikacji (np. pokrycie powierzchni polimerem) zarówno w trakcie syntezy jak i po otrzymaniu nanocząstek. Metoda współstrącania, mimo iż czasem prowadzi do agregacji nanocząstek, jest często stosowaną i opisywaną w literaturze techniką otrzymywania nanocząstek SPION do zastosowań biomedycznych [6].

Podsumowując, opracowano wiele metod otrzymywania nanocząstek SPION, dzięki czemu można wybrać odpowiednią zgodnie z wymaganiami eksperymentalnymi i pożądanymi właściwościami nanocząstek. Na ten moment metody fizyczne ze względu na brak dobrej kontroli nad rozmiarem i kształtem nanocząstek oraz ich silną agregację nie są zbyt szeroko stosowane. Podobnie metody biologiczne, przez wzgląd na ograniczenia w efektywności oraz trudności w hodowaniu bakterii magnetotaktycznych, stanowią niewielką część wszystkich metod otrzymywania nanocząstek SPION. Metody chemiczne ze względu na swoją prostotę, dostępność i efektywność, zarówno pod względem rozmiaru jak i kształtu nanocząstek, stanowią największą część wszystkich stosowanych technik. Wśród nich zaś najwięcej zalet, w kontekście planowanych zastosowań, ma technika współstrącania i dlatego w niniejszej pracy wykorzystano tę technikę do otrzymania nanocząstek SPION.

2.1.2. Zastosowania SPION

Nanocząstki SPION znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in. w: ochronie środowiska (usuwanie zanieczyszczeń, rekultywacja i uzdatnianie wody) [25], katalizie (odzyskiwanie katalizatorów po reakcji) [24] czy magnetycznych urządzeniach do przechowywania danych [33], jednak z perspektywy badań prowadzonych w ramach tej pracy najistotniejsze jest zapoznanie się z ich biomedycznymi zastosowaniami. Nanocząstki tlenków żelaza mogą być wykorzystywane zarówno w aplikacjach diagnostycznych jak i terapeutycznych, a dzięki różnym modyfikacjom, stanowią one także doskonałe nanoukłady do zastosowań teranostycznych, będących połączeniem diagnostyki i leczenia [37–39].

Jedną z technik diagnostycznych, w której stosuje się nanocząstki SPION jest obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (*MRI, ang. Magnetic Resonance Imaging*). Jest to bardzo skuteczna i nieinwazyjna metoda obrazowania, opierająca się na relaksacji protonów w tkankach. Nanocząstki SPION akumulując się w określonych tkankach skracają czas relaksacji protonów w porównaniu do otaczających tkanek i służą jako środek kontrastujący. Ich przydatność jako środków cieniujących była testowana *in vitro* oraz *in vivo* we wczesnym wykrywaniu nowotworów, znakowaniu komórek i obrazowaniu molekularnym [40,41]. Ponadto znalazły zastosowanie w wizualizacji guzów i przerzutów w wątrobie,

śledzienie i węzłach chłonnych, w angiografii jako środka gromadzącego krew oraz w wizualizacji zmian zapalnych, takich jak blaszki miażdżycowe [38]. Badania prowadzone na myszach pokazują, że filtracja przez nerki i usuwanie wraz z moczem, stanowią główną drogą wydalania nanocząstek SPION z organizmu [42]. Nanocząstki te stały się obiecującą alternatywą względem stosowanych aktualnie środków kontrastujących, zawierających substancje paramagnetyczne o zbyt słabych właściwościach magnetycznych czy też opartych na związkach toksycznego gadolinu, które mogą być stosowane tylko u ograniczonej grupy pacjentów ze względu na powodowanie nefrogennego włóknienia układowego [43]. Aktualnie duża część badań naukowych dotyczących SPION jako środków kontrastujących do MRI skupia się na projektowaniu odpowiednich pokryć w celu poprawy biokompatybilności lub celowanego dostarczania kontrastów. Celem jest zmodyfikowanie powierzchni nanocząstek m.in. peptydami, białkami, przeciwciałami, grupami funkcyjnymi, węglowodanami, aptamerami, RNA, DNA oraz polimerami, aby zwiększyć specyficzne ukierunkowanie np. na guzy nowotworowe [30].

Nanocząstki SPION są w diagnostyce wykorzystywane nie tylko do obrazowania. Ze względu na ich zachowanie magnetyczne można je również stosować do magnetycznego sortowania komórek (*MACS, ang. Magnetic Assisted Cell Sorting*), standardowej metody separacji niektórych populacji komórek z zawiesin biologicznych. W MACS nanocząstki magnetyczne są sprzężone z odpowiednimi przeciwciałami, które wiążą się ze specyficznymi antygenami wyeksponowanymi na błonach komórek docelowych. Stosując pole magnetyczne można oddzielić populację komórek związanych z nanocząstkami od niezwiązanej frakcji [16]. Metoda MACS jest szeroko stosowana w przedklinicznych i klinicznych badaniach nad nowotworami, do sortowania białych krwinek oraz komórek macierzystych. Istotne znaczenie SPION w magnetycznym sortowaniu komórek podkreśla fakt, że można je ukierunkować na wyłapywanie krążących komórek nowotworowych, które pojawiają się w krwi obwodowej już we wczesnym stadium złośliwości. Konwencjonalne techniki izolacji, oparte jedynie na właściwościach fizycznych takich jak rozmiar komórki, nie są w stanie wykryć tych komórek nowotworowych na tak wczesnym etapie. MACS zapewnia także o wiele wyższą czułość, dzięki czemu jest skutecznym i niezawodnym narzędziem diagnostycznym [38].

Kolejnym diagnostycznym podejściem są biosensory oparte na magnetycznych nanocząstkach. Nanocząstki SPION są w takich czujnikach sprzężone z ligandami, takimi jak przeciwciała lub oligonukleotydy, które po związaniu się ze stroną docelową zaczynają się grupować. Indukuje to spadek czasu relaksacji otaczających cząsteczek wody, który można wykryć za pomocą NMR lub MRI [33]. Opracowano takie diagnostyczne systemy rezonansu

magnetycznego do wykrywania kwasów nukleinowych, białek oraz patogenów w nieoczyszczonych próbkach biologicznych. Przetestowano je także w wykrywaniu biomarkerów nowotworowych, chorób sercowo-naczyniowych, procesów zapalnych oraz do identyfikacji pacjentów zagrożonych pęknięciem blaszki miażdżycowej. Biosensory oparte na nanocząstkach SPION zapewniają wysoką czułość przy niskich kosztach produkcji i łatwej skalowalności, co stanowi o ich dużej przydatności w diagnostyce [38].

Nanocząstki SPION, dzięki stosunkowo łatwej funkcjonalizacji stanowią także ogniwo łączące różne techniki badawcze. Pozwalają na zastosowanie więcej niż jednej metody diagnostycznej po jednorazowym podaniu środka kontrastującego na bazie SPION, co zmniejsza dawkę konieczną do diagnozy. Ponadto odpowiedni dobór dwóch technik diagnostycznych łączonych przez nanocząstki SPION zwiększa dokładność badania przez zrekomensowanie niedoskonałości danej techniki zaletami innej. Przykład może stanowić połączenie metody MRI, która charakteryzuje się niską czułością i wysoką rozdzielczością przestrzenną z technikami o lepszej czułości i słabszej rozdzielczości, takimi jak pozytonowa tomografia emisyjna (*PET, ang. Positron Emission Tomography*), obrazowaniem fluorescencji (*FLI, ang. Fluorescence Imaging*), obrazowaniem bioluminescencji (*BLI, ang. Bioluminescence Imaging*) czy pozytonową tomografią emisyjną (*PET, ang. Positron Emission Tomography*) lub tomografią emisyjną pojedynczych fotonów (*SPECT, ang. Single-Photon Emission Computed Tomography*). W przypadku połączenia MRI-FLI/BLI do nanocząstek stanowiących środek kontrastujący przyłączane są chemicznie lub adsorbowane sondy fluorescencyjne. Powszechnie stosowane są kropki kwantowe (CdSe/ZnS), barwniki (Cy5.5) oraz domieszkowane nanoluminofory [44]. Jednoczesne wykorzystanie MRI-PET/SPECT wymaga z kolei chemicznego przyłączenia radioizotopów do nanocząstek SPION. Najczęściej stosuje się ^{18}F , ^{64}Cu , ^{123}I dla PET oraz $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga dla SPECT [45]. Innym ciekawym połączeniem, w którym nie ma potrzeby modyfikowania powierzchni nanocząstek, jest skojarzenie techniki MRI i obrazowania ultradźwiękami (*USG, ang. UltraSonoGraphy*). Zastosowanie nanocząstek tlenku żelaza w USG przyczyniło się do powstania nowej techniki jaką jest ultrasonografia z bodźcem magnetycznym (*MMUS, ang. Magneto-Motive. UltraSound*). W MMUS skoncentrowane impulsowe pole magnetyczne o dużej intensywności przykładane do nanocząstek SPION indukuje ich ruch, który jest obserwowany za pomocą USG. Połączenie MMUS-USG lub MMUS-MRI pozwala zwizualizować SPION w badanej strukturze anatomicznej i ma potencjał w obrazowaniu na poziomie komórkowym czy molekularnym, śledzeniu komórek macierzystych, a także w monitorowaniu dostarczania leków [46].

Oprócz celów diagnostycznych nanocząstki SPION znalazły także zastosowanie jako środki terapeutyczne i teranostyczne. Podawanie farmaceutyków klasycznymi drogami wiąże się z wieloma ograniczeniami, takimi jak występowanie efektów ubocznych czy brak efektywności związany ze zbyt niskim stężeniem w leczonym miejscu. Powodem tego jest ograniczona dyfuzja przez bariery biologiczne oraz stosunkowo słaba specyficzność leków względem miejsca działania. Alternatywą jest koncepcja kontrolowanego dostarczania leków. Polega ona na umieszczeniu farmaceutyku poprzez przyłączenie, zaadsorbowanie lub zsolubizowanie wewnątrz nośnika, który dzięki swoim właściwościom doprowadza i uwalnia substancję czynną w określonym miejscu w organizmie [47]. Właśnie takim nośnikiem mogą być nanocząstki SPION. Ich powierzchnia jest modyfikowana za pomocą substancji leczniczych i określonych ugrupowań (przeciwciała, aptamery, peptydy itp.), które zwiększają selektywność i zdolność przenikania przez bariery biologiczne. Jedną z głównych zalet takiej terapii jest kierowanie nośnika i wzrost lokalnej koncentracji leku, co znacznie wzmacnia jej skuteczność.

Należy zauważyć, że różne metody dostarczania terapeutycznych nanocząstek magnetycznych można stosować równocześnie, co poszerza możliwości substancji leczniczych [13,38]. Powierzchnia może być także modyfikowana za pomocą nieorganicznych powłok takich, jak: złoto, krzemionka lub gadolin. Przykładowo pokrycie nanocząstek warstwą złota (Au) zapewnia możliwość osadzania monowarstw tioli zakończonych kwasem karboksylowym, co dodatkowo daje możliwość funkcjonalizacji powierzchni za pomocą interesujących ligandów i zastosowanie w kontrolowanym dostarczaniu leków antynowotworowych [25,48]. Złota otoczka chroni rdzeń magnetyczny nanocząstek SPION przed utlenianiem, korozją, agregacją i poprawia jego biokompatybilność, a także antybakteryjność [49]. Ponadto na powłoce ze złota zachodzą unikalne zjawiska zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) oraz wzmocnionego powierzchniowo rozpraszania Ramana, które dodają nanocząstkom SPION unikatowe właściwości optyczne [13]. Z kolei otoczka krzemionkowa na powierzchni SPION redukuje toksyczność nanocząstek, zapobiega ich agregacji w cieczy i poprawia stabilność chemiczną, co jest istotne w stosowaniu ich jako środków terapeutycznych [50].

W ostatnim czasie wykazano także, że nanocząstki SPION mają zdolność zmieniania polaryzacji makrofagów, w których się akumulują. Makrofagi jako część wrodzonego układu odpornościowego, odgrywają ważną rolę w progresji nowotworu złośliwego. Wykazano, że komórki nowotworowe są w stanie przesunąć różnicowanie makrofagów w kierunku fenotypu wspomagającego wzrost guza. Po wystawieniu na działanie nanocząstek tlenku żelaza

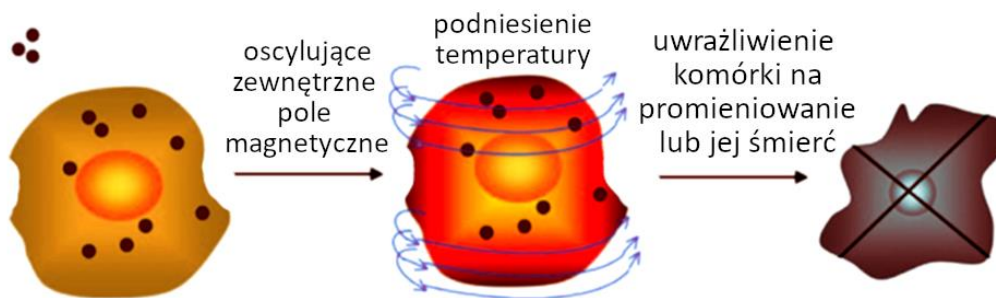
zaobserwowano przesunięcie polaryzacji makrofagów w kierunku aktywności prozapalnej i przeciwnowotworowej [38]. Innym terapeutycznym zastosowaniem nanocząstek SPION jest inżynieria tkankowa, mająca na celu regenerację komórek i tkanek. Nanocząstki magnetyczne wykorzystuje się w niej w celu zwiększenia ilości komórek i ich głębszego ulokowania na rusztowaniach za pomocą magnezu, co ma wpływ na powstawanie tkanek [51]. Bardzo popularne w ostatnim czasie jest również zastosowanie nanocząstek SPION w hipertermii magnetycznej (*MH, ang. Magnetic Hyperthermia*). Ze względu na znaczącą rolę tej metody w niniejszej pracy, zagadnienie to zostanie szerzej omówione w rozdziale 2.1.3.

Wśród zastosowań teranostycznych SPION są również bardzo szeroko wykorzystywane. Dzięki modyfikacji powierzchni nanocząstek za pomocą aptamerów lub przeciwciał oraz niezbędnych łączników, możliwe jest tworzenie takich połączeń technik diagnostycznych i terapeutycznych, jak: MRI i chemioterapia, MH i tomografia komputerowa, MH i kontrolowane dostarczanie leków, MRI i MH czy MH i chemioterapia/radioterapia. Utworzenie zintegrowanego systemu terapeutycznego umożliwia zdiagnozowanie problemu, wdrożenie ukierunkowanej terapii oraz monitorowanie odpowiedzi na leczenie. Przykładem może być zastosowanie SPION jako środka kontrastującego, mającego na celu śledzenie reakcji organizmu na dostarczony lek [13].

2.1.3. SPION w hipertermii magnetycznej

Wykorzystanie ciepła jako narzędzia terapeutycznego w onkologii sięga już początków poprzedniego wieku [52]. Hipertermia jest rodzajem leczenia opartego na wzroście temperatury w tkankach, prowadzącym do śmierci lub dysfunkcji traktowanych w ten sposób komórek [53]. Hipertermia dzieli się na trzy główne kategorie w zależności od wielkości leczonego regionu: hipertermia całego ciała, regionalna (cały narząd) i lokalna [15]. Lokalne podniesienie temperatury pozwala ograniczyć leczenie tylko do chorobowo zmienionych obszarów, co jest szczególnie ważne w przypadku leczenia przeciwnowotworowego. Konwencjonalne terapie (np. chemioterapia, radioterapia) są często związane z uszkodzeniami, jakie powodują one w zdrowych tkankach i mogą inicjować długotrwałe działania niepożądane. Stąd miejscowe i odpowiednio zlokalizowane podnoszenie temperatury jest jednym z głównych wyzwań, jakie należy podjąć w terapii metodą MH [53–55]. Skutecznym rozwiązaniem jest podejście oparte na połączeniu oscylującego pola magnetycznego i nanocząstek magnetycznych, zwykle superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza i nanoferrytów [56,57]. Wystawienie nanocząstek magnetycznych rozproszonych w danym ośrodku na zmienne pole magnetyczne

powoduje lokalne podniesienie temperatury osiągnięte przez konwersję energii oscylacji nanocząstek (Rys. 5) [55].



Rys. 5. Schematyczne przedstawienie zasady działania hipertermii magnetycznej (MH) z zastosowaniem nanocząstek SPION (adaptacja na podstawie Latorre, 2009).

Relaksacja nanocząstki i wytworzenie ciepła może następować na dwa sposoby: poprzez fizyczną rotację całej nanocząstki (relaksacja Browna) lub przez zmianę kierunku namagnesowania wewnątrz nanocząstki, bez jej fizycznego obrotu (relaksacja Néela). Efektywny czas relaksacji (czas reakcji pewnej objętości nanocząstek na zmianę pola magnetycznego) jest zdominowany przez krótszy z czasów dwóch powyższych relaksacji, przy czym relaksacja Browna dominuje przy większych cząstkach (powyżej kilkunastu nanometrów), a Néela przy małych cząstkach (poniżej kilkunastu nanometrów). Relaksacja Browna zależy silnie od właściwości cieczy, w której zawieszone są nanocząstki, natomiast relaksacja Néela jest bardziej związana z właściwościami magnetycznymi nanocząstki [15].

Parametrem charakterystycznym dla MH jest współczynnik absorpcji swoistej (SAR, *ang. Specific Absorption Rate*). Określa on ilościowo zdolność koloidów magnetycznych do pochłaniania energii ze zmiennego pola magnetycznego i można go opisać równaniem (4):

$$SAR = C \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} \cdot \frac{1}{m_{mag}} \quad (4)$$

gdzie: C to pojemność cieplna ośrodka (dla wody $C = 4,189 \frac{J}{g \cdot K}$), T —temperatura [K], t —czas [s], m_{mag} —masa żelaza w próbce. Człon $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ wyznacza się poprzez dopasowanie prostej do początkowego prostoliniowego fragmentu wykresu zależności temperatury od czasu i odczytanie współczynnika nachylenia tej prostej. Eksperymentalnie określone wartości SAR wykazują silną zależność od rodzaju próbki, jednak inne parametry otoczenia, takie jak lepkość, ciepło właściwe, przewodność cieplna mogą również znacząco wpływać na efektywny wzrost temperatury [58,59]. Zależność od zastosowanego pola magnetycznego i jego częstotliwości stanowi pewne ograniczenie w wykorzystaniu parametru SAR, ze względu na trudność w porównaniu z wynikami innych grup badawczych [60]. Aby uniknąć tego ograniczenia

można wyznaczyć parametr ILP (*ang. Intrinsic Loss Power*), który uwzględnia natężenie i częstotliwość pola magnetycznego. Jego wartość oblicza się korzystając z równania (5):

$$ILP = \frac{SAR}{f \cdot H^2} \quad (5)$$

gdzie: H – natężenie pola magnetycznego, f – częstotliwość pola magnetycznego.

Obecnie wiadomo, że zdrowe komórki są w stanie przetrwać temperaturę nawet do 42°C. Komórki nowotworowe natomiast, z powodu nieefektywnego przepływu krwi i transportu tlenu przez nowo utworzone niedojrzałe naczynia krwionośne w obrębie nowotworów, znajdują się w środowisku kwasowym i pozbawionym składników odżywczych, które nadaje im większą wrażliwość termiczną. Istotne jest więc to, że komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na podwyższenie temperatury niż komórki zdrowe [61]. Biologiczne skutki MH mogą być dwójakie: uwrażliwienie komórek nowotworowych na promieniowanie (kwasowe środowisko sprawia, że komórki nowotworowe są bardziej niż zdrowe odporne na promieniowanie) lub bezpośredni efekt cytotoksyczny [55,62]. Optymalny zakres temperatury stosowanej w MH wynosi ok. 41–46°C, ponieważ ogrzewanie powyżej ok. 48°C, powodujące martwicę komórek, może wiązać się z ryzykiem uwolnienia toksyn z uszkodzonego guza. Zwiększenie temperatury powyżej 41°C dodatkowo uszkadza naczynia krwionośne i zmniejsza przepływ krwi powodując tym samym lokalne niedotlenienia i zakwaszenie guza, co w efekcie może prowadzić do jego martwicy [56,63].

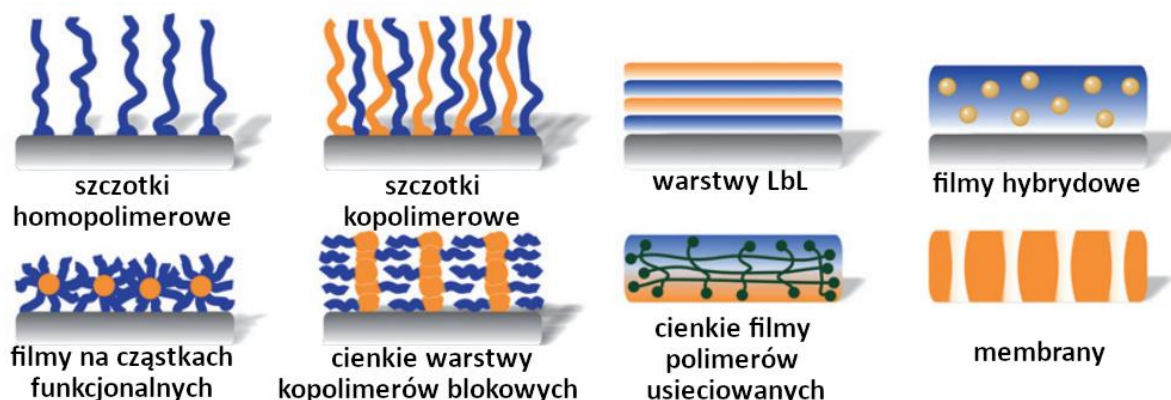
Istotną zaletą MH jest to, że pole magnetyczne, będące bodźcem wzbudzającym wydzielanie ciepła, jest sterowane zdalnie i działa bezkontaktowo (przenika przez tkanki). Dzięki temu MH jest interesującym zabiegiem, mogącym wyeliminować niedostępne, głębokie guzy, których często nie można leczyć chirurgicznie. Ponadto ogrzewanie komórek nowotworowych jest od wielu lat dobrze znane jako terapia skojarzona z radio- i chemioterapią [55]. Badania eksperymentalne dotyczące MH są obecnie ukierunkowane na znalezienie takich magnetycznych nanocząstek oraz parametrów pola magnetycznego, które powodowałyby najwydajniejszy proces ogrzewania. Umożliwiałoby to wprowadzanie do organizmu najmniejszej możliwej dawki nanocząstek. Istnieje wiele doniesień literaturowych o różnych zawiesinach SPION stosowanych w MH. Powstał nawet komercyjny środek oparty na nanocząstkach magnetycznych NanoTherm™, który jest stosowany w leczeniu nowotworów mózgu w Unii Europejskiej od 2011 roku, a w Polsce dopiero od roku 2019 i jest dostępny tylko w Szpitalu Klinicznym w Lublinie [64]. Badania z użyciem tego środka wydają się zachęcające, jednakże dawka wymagana do osiągnięcia efektu terapeutycznego jest stosunkowo wysoka (112 mg/ml) [37]. W literaturze spotyka się zwykle niższe stężenia,

mieszczące się w zakresie od 2,0 do 20,0 mg/ml [18,55,65–68], jednak niektórzy autorzy sugerują konieczność dalszego obniżania stężeń w takich zastosowaniach biologicznych [56,69–72]. Skład SPION można modyfikować przez domieszkowanie różnymi metalami (Mn, Ni, Co, Zn), co prowadzi do powstawania nanoferrytów, które mogą wykazywać lepsze właściwości magnetyczne w celu wydajniejszego ogrzewania w MH. Na szczególną uwagę zasługują tutaj nanocząstki, których struktura została zmodyfikowana cynkiem, ze względu na jego biokompatybilność i endogenność [71]. Cynk jest pierwiastkiem śladowym obecnym w organizmie człowieka w ilości 2–3 g, a jego toksyczna dawka jest stosunkowo wysoka (do 450 mg/dzień) [73]. Ze względu na to, że SAR i efektywny wzrost temperatury zależą silnie także od lepkości cieczy, ciepła właściwego, przewodności cieplnej, ale także siły oddziaływania nanocząstek z cząsteczkami rozpuszczalnika, nie tylko domieszkowanie nanocząstek, ale również funkcjonalizacja ich powierzchni przy użyciu np. otoczki polimerowej powinna być stosowana, aby zwiększyć efektywność MH [59]. Silnie solwatowa powłoka oddziałująca z cząsteczkami rozpuszczalnika, może znacząco zwiększyć tarcie pomiędzy oscylującymi nanocząstkami, a tym samym zwiększyć temperaturę generowaną pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego. MH dzięki nanocząstkom SPION, może być także wykorzystywana w połączeniu z kontrolowanym dostarczaniem leków, gdzie działając zewnętrznym polem magnetycznym można np. podgrzać nanocząstki znajdujące się w otoczce leku i uwolnić substancję aktywną. Można więc wnioskować, że MH z wykorzystaniem nanocząstek SPION jest bardzo obiecującą techniką zarówno terapeutyczną jak i teranostyczną.

2.2. Cienkie warstwy polimerowe na powierzchni

Szeroko zakrojone badania w dziedzinie nauk o powierzchni umożliwiły projektowanie i opracowywanie cienkich warstw oraz powłok funkcjonalnych o właściwościach dostosowanych do pożądanых zastosowań [74]. Takie cienkie warstwy można opisać jako warstwy materiału nieorganicznego lub organicznego o grubości od jednego nanometra do kilku mikrometrów, których jeden wymiar jest znacznie mniejszy niż pozostałe dwa wymiary. Cienkie filmy mogą składać się z pojedynczej warstwy cząsteczek lub stanowić strukturę wielowarstwową i można je osadzać na różnorodnych rodzajach i kształtach podłoży. Badania cienkich warstw doprowadziły bezpośrednio lub pośrednio do rozwoju wielu nowych obszarów badań w fizyce i chemii ciała stałego, w tym inżynierii powierzchni, które opierają się na zjawiskach charakterystycznych dla grubości, geometrii i struktury bardzo cienkiego filmu [75]. Inżynieria powierzchni obejmuje zmianę właściwości powierzchni materiałów, a także dodanie nowych wielofunkcyjnych właściwości powierzchni, m.in.: katalitycznych,

elektrycznych, optycznych, termicznych, chemicznych czy biologicznych. Istnieje wiele metod otrzymywania cienkich warstw, a wśród nich można wyróżnić: metodę pokrywania wirowego „*spin-coating*”, metodę zanurzania „*dip-coating*”, chemiczną (CVD, ang. *Chemical Vapour Deposition*) lub fizyczną (PVD, ang. *Physical Vapour Deposition*) depozycję z fazy gazowej, samoorganizujące się monowarstwy (SAM, ang. *Self-Assembled Monolayer*), metodę „warstwa po warstwie” (LbL, ang. *Layer-by-Layer*) oraz szczepienie z powierzchni szczotek polimerowych [76]. Cienkie filmy znalazły bardzo szerokie zastosowanie, m.in.: w kontroli tarcia (smary) [77], elementach elektronicznych [78], powłokach z barierą termiczną [79], zapewnianiu odporności na zużycie i korozję oraz wielu innych [74]. Jednak najbardziej interesującym z perspektywy badań zawartych w niniejszej pracy obszarem zastosowań jest biomedycyna, w której zastosowano cienkie warstwy w bioimplantach, otoczkach do kontrolowanego dostarczania leków, hodowlach komórkowych, czy w powłokach przeciwdrobnoustrojowych [74,80]. Ze względu na ogromną różnorodność stosowania cienkich filmów, ten rozdział koncentruje się wyłącznie na polimerowych cienkich warstwach. Do głównych przykładów cienkich filmów polimerowych można zaliczyć: szczotki polimerowe szczepione z powierzchni, warstwy LbL, filmy na powierzchni cząstek funkcjonalnych (nanocząstki, micelle), warstwy z kopolimerów blokowych lub usieciowanych polimerów, warstwy w formie membran oraz filmy hybrydowe łączące polimery i materiały nieorganiczne (Rys. 6) [81].

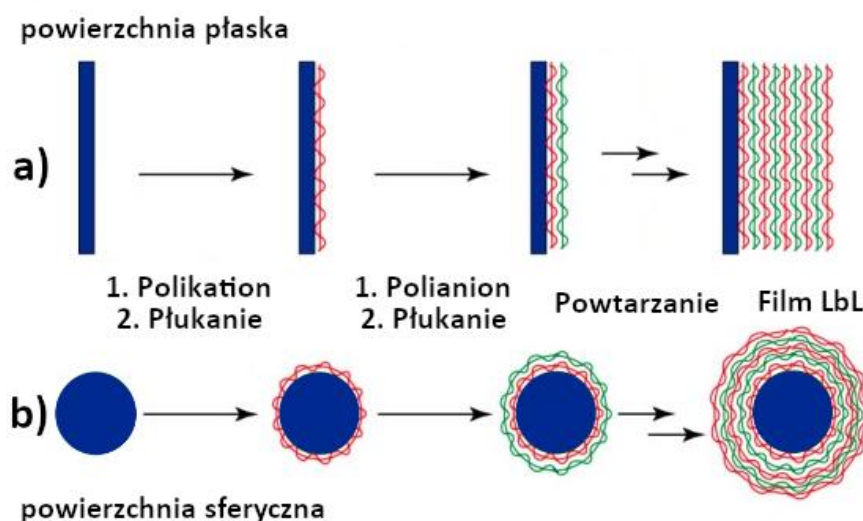


Rys. 6. Najpopularniejsze formy cienkich warstw polimerowych na powierzchni (adaptacja na podstawie Tokarev, 2009).

2.2.1. Filmy polimerowe uzyskiwane metodą „warstwa po warstwie” (LbL)

Jedną z najprostszych i zarazem najpowszechniej stosowanych metod tworzenia cienkich filmów jest metoda „warstwa po warstwie”, czyli sekwencyjna adsorpcja naładowanych substancji na granicy faz ciało stałe-roztwór [82]. Metoda ta zyskała popularność po tym, jak

została szczegółowo opisana w latach 90. ubiegłego wieku przez Dechera [83,84]. Tworzenie filmów LbL obejmuje naprzemienną adsorpcję oddziałujących ze sobą makrocząsteczek (najczęściej o przeciwnym ładunku) prowadzącą do wytworzenia wielowarstwowych filmów. W typowej procedurze stałe podłoże (o dowolnym kształcie) zanurza się na kilka lub kilkadziesiąt minut w wodnym roztworze polielektrolitu, a następnie spłukuje w celu usunięcia słabo zaadsorbowanych cząsteczek. Następnie podłożone z naniesioną pierwszą warstwą polimeru jest zanurzane w roztworze przeciwnie naładowanego polielektrolitu, co powoduje jego adsorpcję oraz powstanie ładunku powierzchniowego o przeciwnym znaku. Proces można naprzemiennie powtarzać, aż do uzyskania pożądanej grubości filmu (Rys. 7) [85]. Poza zanurzaniem w roztworze, cienkie warstwy LbL można również tworzyć poprzez spryskiwanie powierzchni adsorbentu oraz techniką „*spin-assisted*”, która polega na nanoszeniu cienkiej warstwy roztworu substancji adsorbującej na płaską, wirującą dookoła własnej osi z określoną szybkością powierzchnię adsorbentu.



Rys. 7. Schemat nanoszenia warstw polimerów w metodzie LbL na powierzchni płaskiej (a) i sferycznej (b) (adaptacja na podstawie Akiba, 2017).

Chociaż obecnie większość filmów LbL jest wytwarzana przy użyciu oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy poszczególnymi warstwami, nie jest to warunek konieczny. Istnieje wiele innych oddziaływań, które z powodzeniem zastosowano do osadzania warstw LbL, m.in.: oddziaływanie donor-akceptor, wiązania wodorowe, cykle adsorpcji i suszenia, wiązania kowalencyjne, tworzenie stereokompleksów lub specyficzne rozpoznawanie [86]. Metoda LbL umożliwia tworzenie warstw o kontrolowalnych właściwościach i funkcjach, będąc jednocześnie metodą prostą, niedrogą, bardzo precyzyjną w zakresie kontroli grubości i pozwalającą na korzystanie z szerokiego wachlarza substratów. Odpowiedni dobór

nakładanych substancji pozwala bezpośrednio nadawać powierzchni pożądaną funkcjonalność. Zaletą techniki LbL jest również to, że filmy można osadzać na różnych stałych podłożach, niezależnie od rodzaju, rozmiaru oraz topologii substratu, m.in. na: metalach, szkłe, ceramice i próbkach biologicznych. Ponadto grubość powłoki można regulować z nanometryczną dokładnością poprzez zmianę liczby osadzonych warstw [85].

Istnieje wiele czynników, które wpływają na proces tworzenia się filmów LbL. Należą do nich między innymi gęstość ładunku na cząsteczce polielektrolitu, która musi kompensować ładunki warstw poprzednich oraz zapewnić wystarczające oddziaływania do utworzenia kolejnych multiwarstw [87]. Istotna jest również giętkość cząsteczki, odpowiadająca za tworzenie się splątań łańcuchów polimerowych, łączących warstwy w filmie. Kolejnym parametrem jest zmiana pH, która powoduje protonację lub deprotonację grup jonowych. Zbyt mała ilość grup jonowych implikuje niewielką gęstość ładunku, a zbyt duża jonizacja polielektrolitu powoduje rozprostowanie łańcucha i zmianę konformacji (rozciągnięcie łańcucha), co zmniejsza grubość i szorstkość powstających filmów. Zmiana pH reguluje także przepuszczalność filmów polielektrolitowych, gdyż może osłabiać wiązania między warstwami poprzez zmianę stopnia dysocjacji i ułatwiać migrację substancji aktywnych. Innym czynnikiem jest siła jonowa, której wpływ na elektrostatyczne oddziaływania może zmieniać konformację łańcuchów i jednocześnie grubość warstwy. Dodatek soli powoduje także spadek lepkości elektrolitu [88].

2.2.1.1. Polielektrolity stosowane w metodzie LbL

Cienkie warstwy polielektrolitowe stanowią prosty i wydajny sposób modyfikowania i funkcjonalizacji różnych powierzchni. Rodzaj polielektrolitu stosowanego w metodzie LbL decyduje o właściwościach filmu, dlatego jego wybór stanowi istotny element tej techniki. Polielektrolity są to polimery jonowe, w których dostatecznie duża liczba merów zawiera grupy jonowe lub grupy posiadające zdolność jonizacji [89]. Mogą być związkami naturalnymi jak również syntetycznymi zbudowanymi z makrocząsteczek o dużej ilości ładunków grup jonowych (w łańcuchu głównym lub grupach bocznych) oraz odpowiednich przeciwjonów, zapewniających elektroobojętność układu. Wśród polielektrolitów, uwzględniając rodzaj grup jonowych, wyróżniamy trzy podstawowe grupy: polielektrolity kationowe, polielektrolity anionowe oraz poliamfolity. Polikationy to polimery zbudowane z dodatnio naładowanych merów i równoważnej ilości anionów w roli przeciwjonów. Polianiony natomiast to polimery zbudowane z ujemnie naładowanych merów i równoważnej ilości kationów jako przeciwjonów. Ostatnim wymienionym rodzajem polielektrolitów są poliamfolity, które

składają się z makrocząsteczek zawierających zarówno grupy anionowe jak i kationowe. W tworzeniu filmów LbL najczęściej stosowane są polielektrolity syntetyczne takie jak: polietylenoimina (PEI), poli(chlorek diallilodimetyloamoniowy) (PDADMAC), poli-L-lizyna (PLL), polistyrenosulfonian sodu (PSS) i kwas poliakrylowy (PAA), a także polimery pochodzenia naturalnego np. chitozan (Ch), kwas hialuronowy (HA) i alginian (ALG) [90].

PEI to słaby polikation, który występuje w postaci liniowej, gdzie łańcuch zawiera drugorzędowe atomy azotu oraz rozgałęzionej, w której łańcuch posiada w strukturze pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe atomy azotu. Wykazuje on silne możliwości kompleksowania materiału genetycznego oraz wyjątkowe zdolności transfekcyjne. Jest stosowany w produkcji papieru i płyt pilśniowych, procesie galwanizacji cynku i kadmu, oczyszczaniu wody z metali ciężkich, a także w produkcji węgla. PEI znalazł również zastosowanie w badaniach dotyczących terapii genowej, jednak cytotoksyczność w badaniach *in vitro* jest przeszkodą w stosowaniu go w badaniach klinicznych [91]. Do grupy dodatnio naładowanych polielektrolitów należy także PDADMAC, który jest szeroko stosowany jako flokulant. W połączeniu z mezoporowatą krzemionką tworzy elastyczny system nośników do kontrolowanego dostarczania leków [92]. Ponadto może być wykorzystywany w czujnikach chemicznych i bioczujnikach. Innym słabym polikationem jest PLL, która posiada dodatkowo naładowany łańcuch aminokwasowy, który ma jeden bromowoderek na jednostkę lizyny, zapewniający rozpuszczalność w wodzie. PLL jest szeroko stosowana jako cienka powłoka zwiększająca adhezję, rozprzestrzenianie się oraz proliferację komórek na różnych powierzchniach. Została wykorzystana do hodowli szerokiej gamy typów komórek [93]. W podobnej roli wykorzystuje się polianionowy ALG, który jest liniowym polisacharydem pochodzącym z brązowych alg lub bakterii [91]. Innymi anionowymi polielektrolitami są PSS oraz PAA, posiadające szereg ładunków ujemnych wzdłuż łańcucha głównego. Oba te polimery cechuje duża odporność na degradację fizyczną, biologiczną i chemiczną w warunkach *in vivo*. Dzięki czemu mogą być bardziej efektywnymi stabilizatorami zapobiegającymi agregacji nanocząstek oraz nośnikami leków [94]. Oprócz ALG wśród polielektrolitów pochodzenia naturalnego możemy wyróżnić także HA, który jest anionowym polisacharydem. Występuje naturalnie w organizmie, m.in. w: tkankach łącznych, cieple szklistym oka, mazi stawowej, skórze, chrząstce i aorcie [95]. Cechuje się korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi oraz biokompatybilnością, a także pełni funkcje organizująco stabilizujące białek w niektórych tkankach. Dzięki temu znalazł zastosowanie w kontrolowanym dostarczaniu leków oraz inżynierii tkankowej [96]. Ostatnim z wymienionych polielektrolitów pochodzenia naturalnego jest Ch, który wyróżnia się spośród innych, naturalnie występujących polisacharydów,

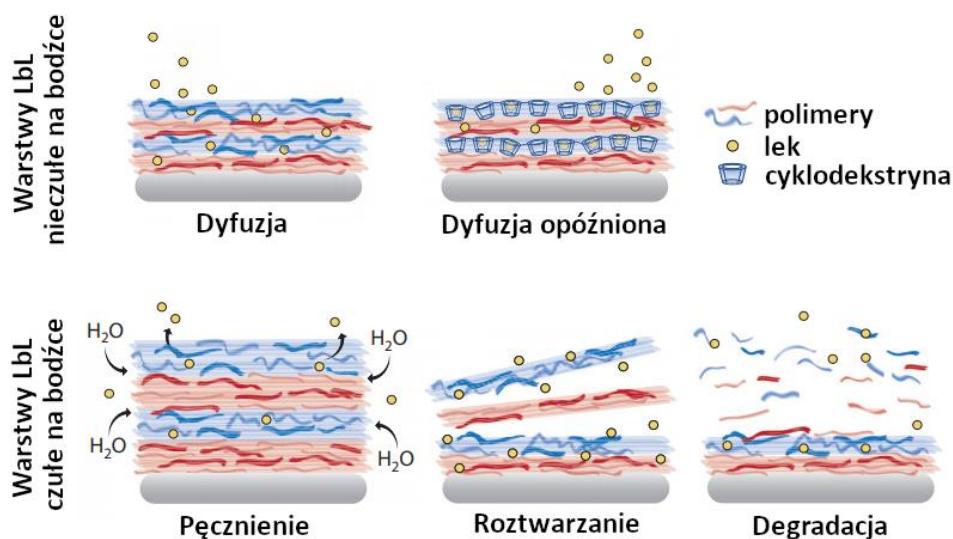
kationowym charakterem w lekko kwaśnym środowisku. Jest nietoksyczny i biokompatybilny, co sprawia, że jest szeroko stosowany w biomedycynie. Jako polikation może z powodzeniem być łączony z polianionami w metodzie LbL, co prowadzi do powstania cienkich wielowarstwowych filmów. Te z kolei mogą zostać wykorzystane w inżynierii tkankowej, dostarczaniu leków lub sztuczne matryce naśladujące mikrośrodowisko pozakomórkowe [97]. Ch jest także doskonałym stabilizatorem, jednak temat ten zostanie szerzej rozwinięty w rozdziale 2.3.1.

2.2.1.2. Zastosowania filmów polimerowych otrzymywanych metodą LbL

Cienkie warstwy, których wytwarzanie bazuje na metodzie LbL, charakteryzują się wieloma zaletami, takimi jak: łatwość i niski koszt otrzymywania, wysoka trwałość oraz odporność na działanie rozpuszczalników wodnych i organicznych, elastyczność, a także różnorodność podłoży i substratów, które można w tej metodzie wykorzystać. Te właściwości w połączeniu z czynnikami umożliwiającymi sterowanie reakcją warstw polielektrolitów sprawiają, że filmy LbL są niezwykle wszechstronną formą cienkich powłok polimerowych. Znalazły one zastosowanie zarówno w przemyśle jak i w aplikacjach biomedycznych. Precyzja filmów LbL w łączeniu polimerów i różnych cząstek, takich jak DNA, nanocząstki, kropki kwantowe lub cząsteczki funkcyjne, umożliwia wykorzystanie ich w urządzeniach elektronicznych, inteligentnych powierzchniach (przełączalnych, antyrefleksyjnych, antystatycznych), ogniwach słonecznych czy membranach o kontrolowanej przepuszczalności. Innym powszechnym zastosowaniem warstw LbL są również powłoki ochronne. Stosuje się je przykładowo w farbach antykorozyjnych, powłokach antygraffiti oraz powłokach samonaprawiających się [98]. Jednak najbardziej interesujące z perspektywy przedstawionych badań zastosowania cienkich warstw polimerowych LbL, można znaleźć w biologii i biomedycynie.

Wyjątkowość filmów LbL do zastosowań biomedycznych wynika głównie z możliwości budowania w kontrolowany sposób multiwarstwowych stabilnych cienkich warstw. Dzięki temu z powodzeniem wykorzystuje się je w badaniach nad kontrolowanym uwalnianiem leków. Głównym problemem w tworzeniu nośników do kontrolowanego uwalniania leków jest efektywność wprowadzania leku, ponieważ duża część cząsteczek terapeutycznych zostaje na powierzchni nośnika i powoduje, często opisywany w literaturze, gwałtowny wyrzut leku na początku (*ang. burst release*), a dopiero później następuje kontrolowane uwalnianie leku znajdującego się wewnątrz nośnika. Cienkie warstwy LbL wykorzystują lek jako jedną z warstw w filmie, stabilizowaną elektrostatycznie, wiązaniami wodorowymi lub kombinacją

tych oddziaływań. Daje to możliwość wprowadzenia dużych stężeń leków o dużej gęstości bez problemów ze stabilnością. Dodatkowo możliwe jest umieszczenie nawet kilku leków, o różnych profilach uwalniania, w podzielonych na segmenty regionach filmu LbL, co pozwala na ich sekwencyjne uwalnianie lub zależne od czasu dostarczanie etapowe. Inną korzyścią jest również możliwość stworzenia różnych trybów uwalniania leku stosując środki pasywnej i aktywnej destabilizacji, pęcznienia i degradacji filmu LbL (Rys. 8) [98].



Rys. 8. Mechanizmy uwalniania leków z czułych i nieczułych na bodźce cienkich warstw polimerowych wytworzonych metodą LbL (adaptacja na podstawie Alkekha, 2020).

Jednym z leków, którego dostarczanie jest problematyczne ze względu na szybkie eliminowanie z organizmu po doustnym podaniu, jest gentamycyna. Jest to lek przeciwbakteryjny, powszechnie stosowany w szpitalach na zakażenia skóry, kości i tkanek miękkich. Lek ten jest również wprowadzany do cementu kostnego jako pokrycie implantów ortopedycznych w celu zapobiegania infekcjom. Ograniczeniem jest tutaj stężenie leku, gdyż gentamycyna może być wprowadzana do cementu kostnego w niewielkich stężeniach aby nie zaburzać integralności cementu, w związku z czym nie jest możliwe wyleczenie już istniejącej infekcji, a jedynie jej zapobieganie [99]. Bezpośrednie warstwowanie dodatnio naładowanej cząsteczki leku siarczanu gentamycyny naprzemiennie z ujemnie naładowanymi polielektrolitami w metodzie LbL pozwala na wytworzenie cienkich warstw uwalniających gentamycynę o grubości mikrometrycznej przy jednoczesnym zapewnieniu jednolitej powłoki na implantach ortopedycznych, szwach czy implantach sercowo-naczyniowych [100].

Innym podejściem w przypadku leków nie obdarzonych ładunkiem i hydrofobowych jest stosowanie policyklodekstryn do izolowania leku (najczęściej przeciwzapalnego lub antybiotyku), a następnie umieszczenie takiego nośnika w wielowarstwowym cienkim filmie.

Uwalnianie leku w takich warstwach LbL jest liniowe, bez początkowego gwałtownego wyrzutu leku. Możliwa jest również kombinacja obu powyższych podejść poprzez połączenie bezpośredniego wprowadzenia jednego leku z zastosowaniem nośnika dla innego leku i również wprowadzeniem go do filmu LbL [98]. Kolejnym przykładem może być wykorzystanie filmów LbL do uwalniania leków za pomocą pH przy wykorzystaniu miceli lub liposomów jako nośników. Tworzy się filmy składające się z naprzemiennie załadowanych lekiem miceli zbudowanych z blokowych polimerów (np. polikaprolaktonu (PCL), poli(tlenku etylenu) (PEG) i PAA), które w niskim pH mają grubość w skali mikrometrycznej i tworzą spójne powłoki. Gdy jednak podda się je działaniu roztworu o pH równym ok. 7,4, to grupy kwasowe stają się wysoce naładowane, co powoduje zerwanie wiązań wodorowych i elektrostatyczne odpychanie implikujące szybkie rozkładanie się filmu i uwolnienie zawartości. Takie podejście może być przydatne w szybkim dostarczaniu leków do rany lub uwalniania substancji leczniczych w miejscach, w których trudno je utrzymać przez dłuższy czas (np. język lub policzek) [101].

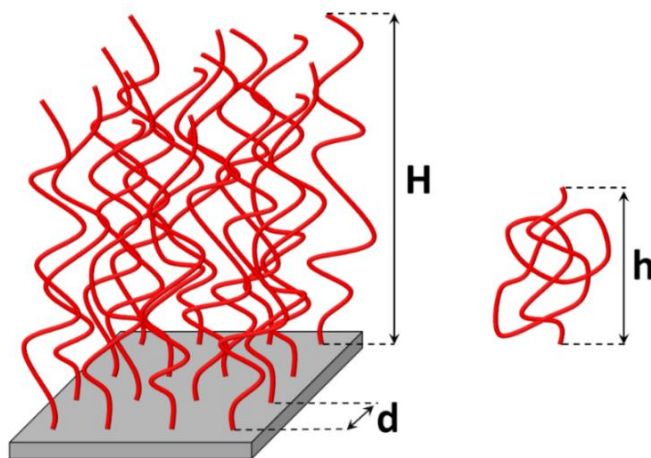
Oprócz dostarczania leków, cienkie polimerowe warstwy otrzymywane metodą LbL są szeroko wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Pozwalają opracowywać funkcjonalne biomateriały, które naśladują środowisko *in vivo*, stanowiąc rusztowania i cząsteczki sygnalizacyjne dla komórek zachowując aktywność wrażliwych biomolekuł, pokonując wiele wyzwań przed którymi stoi dostarczanie szczepionek do komórek prezentujących antygen, a także wpływając na mikrobiom [90]. W przypadku wielu implantów medycznych kluczową kwestią jest promowanie adhezji komórek i integracji tkanek przy jednoczesnym zapobieganiu przylegania bakterii. Problem ten zyskał miano „wyścigu na powierzchnię”, a naukowcy próbują go rozwiązać na wiele sposobów. Cienkie warstwy wykorzystano w takich badaniach przykładowo nakładając czułe na pH i hialuronidazę filmy polimerowe metodą LbL na tytanowe nanorurki wypełnione białkiem morfogenetycznym kości (BMP-2). Tak zaprojektowane powłoki skutecznie zmniejszyły przyczepność i wzrost bakterii przy jednoczesnym promowaniu różnicowania osteoblastów *in vitro* [102].

Również dostarczanie komórek do przeszczepu, terapii komórkowej i inżynierii tkankowej generuje możliwość zastosowania cienkich multiwarstw LbL. W hodowlach komórkowych stosuje się nośniki (rusztowania, pęcherzyki), które wspomagają przeżywanie komórek, ich wzrost oraz potencjalne różnicowanie. Dzięki wytwarzaniu cienkich warstw łączących BMP-2 na przemian z siarczanem chondroityny (komponentem tkanki chrzęstnej) oraz degradowalnym polikationem PBAE (poli(β -amino ester)), możliwe jest dostarczanie BMP-2 w kontrolowany sposób, uzależniony od ilości warstw i wspomaganie wzrostu komórek

[103]. Z kolei poprzez warstwowe powlekanie osteokondukcyjnych kompozytowych rusztowań z PCL i trójfosforanu wapnia za pomocą BMP-2 zawierającego warstwy LbL można stworzyć matrycę do inżynierii tkankowej. Po wszczepieniu takich rusztowań w obszary mięśniowe u szczurów, wokół rusztowania formuje się kość, która powstaje w wyniku „rekrutowania” przez BMP-2 komórek macierzystych ze szpiku kostnego do miejsca implantacji, indukowania ich różnicowania do komórek kościotwórczych oraz ich proliferacji [104]. Pokrycia LbL w formie cienkich warstw wspomnianej wcześniej PLL stosuje się również w pokrywaniu płytek wielodołkowych do hodowli komórkowych oraz podłoży w celu poprawienia adhezji komórek [93].

2.2.2. Szczotki polimerowe

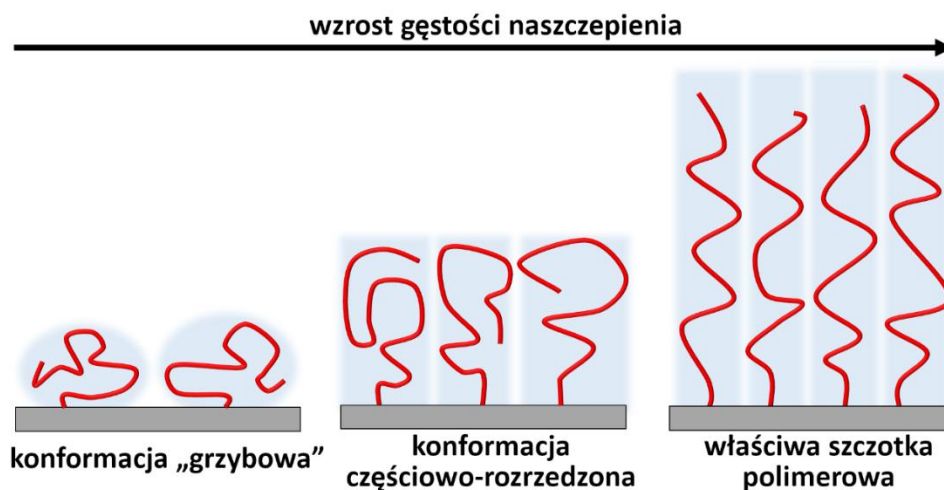
Wśród cienkich warstw polimerowych na szczególną uwagę, ze względu na unikalne właściwości, zasługują szczotki polimerowe, których grubość sięga od kilku nanometrów do kilku mikrometrów. Ogólnie przyjęta definicja opisuje szczotkę polimerową jako układ składający się z łańcuchów polimerowych, rozciągniętych w kierunku prostopadłym do podłoża i związanych jednym końcem z podłożem, przy czym odległości pomiędzy miejscami naszczepień tych łańcuchów (d) są mniejsze niż średnice kłębków statystycznych przyjmowanych przez te makrocząsteczki w roztworze (h), a także mniejsze niż wysokość rozprostowanego łańcucha polimerowego (H). Naszczepienie łańcuchów na powierzchnię powoduje ich rozprostowanie, dzięki czemu w danym rozpuszczalniku wysokość szczotki (H) jest większa niż średnica kłębków statystycznych przyjmowanych przez niaszczepione łańcuchy (h) tego samego polimeru w tym samym rozpuszczalniku. Porównanie wszystkich tych wielkości przedstawiono na Rys. 9.



Rys. 9. Schemat szczotki polimerowej z zaznaczoną wysokością szczotki (H), odległością pomiędzy punktami szczepienia (d) oraz średnicą kłębka statystycznego w roztworze (h) (źródło: opracowanie własne).

Cienkie warstwy złożone ze szczotek polimerowych rozciągających się wzdłuż kierunku prostopadłego do powierzchni szczepionej, mogą wykazywać właściwości odmienne od tych charakterystycznych dla łańcuchów w roztworze, czy też w klasycznym filmie polimerowym. Bliskie sąsiadowanie naszczepionych łańcuchów wpływa na ich rozciąganie mające na celu unikanie zajmowania tej samej przestrzeni co sąsiednie łańcuchy. Stopień rozciągnięcia konformacji łańcucha jest uzależniony głównie od gęstości naszczepienia łańcuchów na podłoże [105,106]. Szczotki polimerowe można przytwierdzić do powierzchni bardzo wielu materiałów o różnorodnych kształtach. Wśród płaskich powierzchni, do naszczepienia szczotek polimerowych wykorzystuje się podłoża wykonane m.in. z: krzemu [107], tlenku glinu [108], złota [109], grafenu [110], tytanu [111], a także filmów polimerowych [112]. Coraz większą popularność w ostatnich latach zyskuje także naszczepianie szczotek polimerowych na powierzchnie sferyczne takie, jak nanocząstki metaliczne [113] i nanocząstki krzemionkowe [114], ale też materiały o innych kształtach, m.in.: włókna celulozowe [115], nanorurki węglowe [116], łańcuchy polimerowe [117], biwarstwy lipidowe [118], białka oraz mikroorganizmy [119].

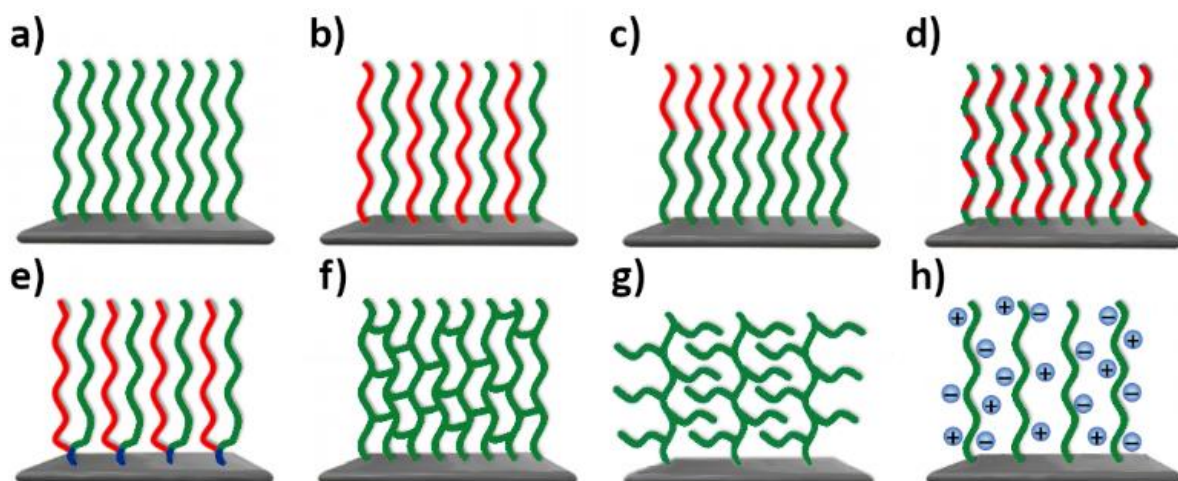
Szczotki polimerowe można podzielić na kilka grup uwzględniając ich strukturę, warunkowaną w dużej mierze przez gęstość naszczepienia, a także typ materiału z jakiego zostały zsyntezowane. Gdy mamy do czynienia ze szczotkami polimerowymi o dużej gęstości naszczepienia, łańcuchy polimerowe są bardzo blisko siebie, przez co silnie na siebie oddziałują, co powoduje ich intensywne rozprostowanie i małe splątanie. Wraz ze spadkiem gęstości naszczepienia, słabną oddziaływania między łańcuchami, co powoduje zmniejszenie rozciągnięcia łańcucha i zmianę konformacji na częściowo-rozrzedzoną (*ang. semi-dilute*). Dalsze zmniejszanie gęstości naszczepienia i doprowadzenie do sytuacji, w której odległość między naszczepionymi łańcuchami (d) jest większa niż średnica kłębka polimerowego (h) w roztworze powoduje, że łańcuchy polimerowe przyjmują konformację „grzybową” (*ang. mushroom*) [120]. Opisane konformacje łańcuchów polimerowych przedstawiono na Rys. 10.



Rys. 10. Ilustracja różnych konformacji łańcucha polimerowego, w zależności od gęstości naszczeplenia na powierzchni (adaptacja na podstawie Goto, 2016).

Na strukturę łańcuchów i zachowanie szczotek polimerowych wpływ ma również rodzaj rozpuszczalnika w jakim się znajdują. Jeżeli łańcuchy polimerowe budujące szczotki są dobrze solwatowane przez cząsteczki rozpuszczalnika, to utrzymują one wyprostowaną strukturę, natomiast zły rozpuszczalnik spowoduje zwinięcie łańcuchów. W przypadku szczotek polimerowych otrzymanych z polielektrolitów, dobór odpowiedniego rozpuszczalnika pozwala na uzyskanie spęcznienia warstwy polimerowej w wyniku działania ładunków obecnych w łańcuchach oraz wzajemnych sił odpychających jednoimiennie naładowanych grup [106].

Szczotki polimerowe można pogrupować również ze względu na architekturę i rodzaj materiału z jakiego są zbudowane. Możemy wyróżnić szczotki homopolimerowe, gdzie wszystkie łańcuchy na całej długości są zbudowane z jednego rodzaju merów, a także szczotki homopolimerowe mieszane, w których pomiędzy łańcuchy jednego polimeru naszczepia się makrocząsteczki z innego (jednego lub więcej) rodzaju polimeru. Kolejnym przykładem są szczotki kopolimerowe blokowe, które są złożone z co najmniej dwóch segmentów różnych polimerów w tym samym łańcuchu. Istnieją także szczotki kopolimerowe nieregularne (bezładne), czyli łańcuchy polimerowe składające się z dwóch różnych powtarzających się jednostek, które są losowo rozmieszczone wzdłuż łańcucha polimerowego. Innymi przykładami rodzajów szczotek polimerowych są: szczotki o łańcuchach w kształcie litery Y; szczotki usieciowane, w których poszczególne łańcuchy są ze sobą połączone; szczotki o łańcuchach rozgałęzionych; a także szczotki polimerowe obdarzone ładunkiem, wynikającym z obecności w łańcuchu naładowanych grup funkcyjnych [119]. Wymienione wybrane typy szczotek polimerowych przedstawiono na Rys. 11.



Rys. 11. Różne rodzaje szczotek polimerowych naszczepionych z płaskiej powierzchni: (a) szczotki homopolimerowe, (b) szczotki homopolimerowe mieszane, (c) szczotki kopolimerowe blokowe, (d) szczotki kopolimerowe losowe, (e) szczotki o mieszanych łańcuchach w kształcie litery Y, (f) szczotki usieciowane, (g) szczotki o łańcuchach rozgałęzionych, (h) szczotki obdarzone ładunkiem (adaptacja na podstawie Zoppe, 2017).

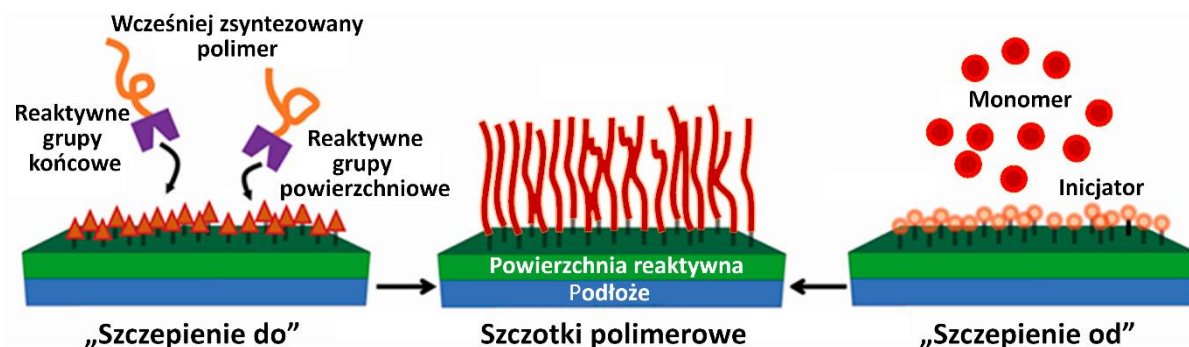
Jak wcześniej wspomniano, ze względu na swoją strukturę, szczotki polimerowe wykazują nowe cechy w porównaniu do łańcuchów polimerowych niezwiązanych z powierzchnią. Przede wszystkim szczotki polimerowe wykazują zwykle większą stabilność i odporność na czynniki zewnętrzne niż inne filmy polimerowe. Inną, istotną z perspektywy potencjału aplikacyjnego właściwością jest opisana wcześniej możliwość otrzymywania szczotek polimerowych na różnorodnych, pod względem kształtu i rodzaju, powierzchniach. Możliwe jest także uzyskiwanie łańcuchów polimerowych wzbogaconych różnymi grupami funkcyjnymi. Ponadto nie bez znaczenia jest wysokie uporządkowanie łańcuchów polimerowych, determinowane przez prostopadłą do powierzchni orientację, a także stosunkowo łatwa kontrola gęstości naszczepienia oraz wysokości otrzymywanych cienkich warstw polimerowych. Szczotki polimerowe wykazują również czułość na różne bodźce zewnętrzne, gdyż łańcuchy w szczotkach mają większą swobodę ruchu niż w klasycznych filmach. Tymi bodźcami mogą być zmiany: temperatury, pH, siły jonowej, potencjału elektrycznego czy zmiana rozpuszczalnika [121]. Na wyżej wymienione właściwości mają wpływ różne czynniki, wśród których najistotniejsze to rodzaj polimeru oraz zastosowana metoda otrzymywania szczotek polimerowych.

2.2.2.1. Metody otrzymywania szczotek polimerowych

Otrzymywanie szczotek polimerowych bazuje na reakcjach polimeryzacji, czyli reakcjach w których małe cząsteczki (monomery) są przekształcane w związki

wielkocząsteczkowe (polimerowe). Uwzględniając przebieg reakcji możemy wyróżnić dwa główne typy polimeryzacji: stopniową (polikondensację i poliaddycję) oraz łańcuchową (jonową, koordynacyjną i rodnikową). Polimeryzacje stopniowe przebiegają stosunkowo powoli, co wynika z wielu pośrednich etapów łączenia się drobin monomeru: powstawanie dimeru, trimeru itd. W tym rodzaju polimeryzacji, polimer tworzy się dopiero po osiągnięciu dużych stopni przereagowania, a poprzedza to etap zaniku monomeru oraz długie utrzymywanie się wysokiego stężenia oligomerów. Inaczej jest w przypadku polimeryzacji łańcuchowej, gdzie podczas przebiegu reakcji w układzie znajdują się równocześnie zarówno monomer jak i powstający polimer, którego łańcuch narasta w szybkim tempie. Ten typ polimeryzacji charakteryzuje się występowaniem czterech podstawowych etapów: inicjacji, propagacji, przeniesienia łańcucha oraz terminacji (zakończenia reakcji).

Ogromne zainteresowanie szczotkami polimerowymi na przestrzeni ostatnich lat doprowadziło do wielu nowatorskich metod ich otrzymywania. Dwa podstawowe podejścia obejmują „szczepienie do” (*ang. grafting to*) oraz „szczepienie z” (*ang. grafting from*). Ich schematyczne zobrazowanie przedstawiono na Rys. 12.



Rys. 12. Schemat przedstawiający dwie strategie syntezy szczotek polimerowych: „szczepienie do” oraz „szczepienie z” (adaptacja na podstawie Kim, 2015).

Pierwsza z tych strategii polega na bezpośrednim zakotwiczeniu, istniejących już w roztworze i reagujących z powierzchnią, łańcuchów polimerowych. „Szczepienie do” jest najczęściej realizowane w dwóch głównych procesach: adsorpcji fizycznej, związanej z oddziaływaniami elektrostatycznymi, van der Waalsa i wiązaniami wodorowymi, oraz chemisorpcji, w której zwykle tworzone są silne wiązania kowalencyjne. W przypadku adsorpcji fizycznej dochodzi do odwracalnej samoorganizacji łańcuchów polimerowych lub kopolimerowych na danej powierzchni. Wśród zalet tego procesu można wymienić właśnie odwracalność, łatwość przeprowadzenia oraz możliwość zaprojektowania struktury i gęstości szczepienia szczotek poprzez odpowiednią modyfikację polimeru i dobór właściwego rozpuszczalnika. Adsorpcja

fizyczna ma jednak również wady, takie jak niestabilność otrzymanych szczotek czy trudność w otrzymaniu wystarczająco grubej i gęsto szczepionej warstwy, co jest związane z częściowym przesłanianiem miejsc aktywnych na powierzchni przez zaadsorbowane łańcuchy polimerowe. Inną metodą jest adsorpcja chemiczna, która jest procesem nieodwracalnym, dzięki utworzeniu wiązań kowalencyjnych. W wyniku tego powstają szczotki wytrzymałe i dużo bardziej odporne na działanie czynników zewnętrznych. W metodzie tej możliwe jest uzyskiwanie różnorodnych szczotek poprzez funkcjonalizację końców łańcuchów polimerowych lub funkcjonalizację samego podłoża. Jednak również ta metoda nie jest wolna od wad. Największą z nich jest niska efektywność związana z trudnością w przyłączeniu do powierzchni dużej ilości polimeru oraz stosunkowo niewielka szybkość procesu. Wynika to, podobnie jak w przypadku adsorpcji fizycznej, z niskiej dostępności reaktywnych miejsc na powierzchni, spowodowanej gęstniejącym z czasem filmem polimerowym. Zatem zarówno adsorpcją fizyczną jak i chemisorpcją uzyskuje się szczotki o niewielkiej wysokości i niskiej gęstości powierzchniowej [122].

W wyniku tych ograniczeń druga strategia, czyli „szczepienie z” stało się preferowaną przez badaczy opcją otrzymywania szczotek polimerowych. Podejście to polega na uzyskaniu warstwy szczotek polimerowych poprzez narastanie łańcucha z powierzchni, co pozwala wyeliminować zasygnalizowane problemy związane z pierwszą strategią. Aby otrzymać szczotki polimerowe drogą „szczepienia z” konieczne jest osadzenie na danej powierzchni warstwy inicjatora, a następnie przeprowadzenie polimeryzacji. Stąd też wzięła się nazwa reakcji tego typu, które są określane mianem polimeryzacji inicjowanych powierzchniowo. Wśród zalet tego podejścia można wymienić dobrą kontrolę nad gęstością szczepienia szczotek poprzez odpowiedni dobór stężenie inicjatora, możliwość sterowania długością otrzymanych szczotek poprzez czas polimeryzacji, a także łatwość w zmienianiu składu szczotek. „Szczepienie z” jest szeroko stosowane w różnych technikach polimeryzacji, takich jak: polimeryzacja z otwarciem pierścienia (*ROP, ang. Ring-Opening Polymerization*), polimeryzacja kationowa lub anionowa czy konwencjonalna polimeryzacja wolnorodnikowa (*FRP, ang. Free Radical Polymerization*) [123]. Ostatnia z nich jest jedną z najbardziej użytecznych metod wytwarzania polimerów na skalę przemysłową. Polimeryzacja rodnikowa charakteryzuje się wysoką wydajnością i powtarzalnością, dużą ilością reaktywnych monomerów, nieskomplikowaną technologią polimeryzacji, wysoką tolerancją na zanieczyszczenia, możliwością stosowania wody jako rozpuszczalnika, a także przewidywalną kinetyką procesu, szczegółowo opisaną w literaturze. Jednak metoda ta posiada pewne ograniczenia. Jednym z nich jest niewielka możliwość kontrolowania przebiegu reakcji

związana z naturą samych rodników, które są bardzo reaktywne chemicznie i niestabilne. Innym istotnym ograniczeniem jest trudność wytworzenia kopolimerów blokowych, które stanowią atrakcyjną pod względem aplikacyjnym grupę szczotek polimerowych. Ograniczenia te stanowiły bodziec do powstania nowych, eliminujących je, metod polimeryzacji, takich jak kontrolowana polimeryzacja rodnikowa (*CRP, ang. Controlled Radical Polymerization*).

Polimeryzacja CRP, nazywana również polimeryzacją rodnikową z odwracalną dezaktywacją, pozwala kontrolować chwilowe stężenie rodników, biorących udział w reakcji polimeryzacji, co sprawia, że otrzymywane polimery są dobrze zdefiniowane i wykazują niską dyspersyjność. Polimeryzacja CRP wykazuje podobieństwo do polimeryzacji żyjącej, czyli polimeryzacji, w której wyeliminowano lub znacząco ograniczono reakcje terminacji (przeniesienia łańcucha). Dzięki temu raz zapoczątkowana propagacja aktywnych makrocząsteczek, biegnie aż do całkowitego przereagowania monomeru lub przerwania reakcji po określonym czasie. Możliwe jest także dodanie nowej porcji tego samego lub innego monomeru, co powoduje dalszą propagację i umożliwia utworzenie kopolimerów blokowych. Duże znaczenie w tej polimeryzacji ma także szybka inicjacja oraz spowolniona propagacja. Rezultatem jest teoretycznie dowolnie długi czas istnienia aktywnych makrocząsteczek oraz równomierny wzrost łańcucha [124]. W przypadku polimeryzacji rodnikowej nie da się jednak przeprowadzić idealnej polimeryzacji żyjącej. Wynika to z wrażliwości rodników na środowisko polimeryzacji, która uniemożliwia całkowite wyeliminowanie procesu terminacji. Dlatego do opisu tego typu reakcji stosuje się czasem określenie „polimeryzacja pseudożyjąca”. Wśród najbardziej znanych kontrolowanych polimeryzacji rodnikowych można wyróżnić: polimeryzację rodnikową z udziałem trwałych rodników nitroksylowych (*NMP, ang. Nitroxide-Mediated Polymerization*), polimeryzację rodnikową z wykorzystaniem inifertera (*IMP, ang. Iniferter-Mediated Polymerization*), polimeryzację z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (*RAFT, ang. Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization*) oraz polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu (*ATRP, ang. Atom Transfer Radical Polymerization*). Wszystkie powyższe polimeryzacje występują również w odmianie powierzchniowo-inicjowanej, której najszerzej stosowanym do modyfikacji powierzchni przykładem jest powierzchniowo-inicjowana polimeryzacja z przeniesieniem atomu (*SI-ATRP, ang. Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization*) [123,125,126]. Polimeryzacje CRP stały się w ostatnich latach bardzo popularne, co jest spowodowane: wysoką skutecznością, szerokim wyborem monomerów, łagodnymi warunkami reakcji, uzyskiwaniem polimerów o jednolitej masie cząsteczkowej, łatwością kontrolowania procesu polimeryzacji, a także możliwością otrzymania struktur

o skomplikowanej strukturze, w tym kopolimerów blokowych [127]. W dalszej części pracy krótko opisane zostaną wyżej wymienione rodzaje kontrolowanych polimeryzacji rodnikowych, z bardziej szczegółowym omówieniem polimeryzacji ATRP oraz SI-ATRP, najistotniejszych z perspektywy przeprowadzonych badań.

Polimeryzacja NMP, w porównaniu do innych technik CRP, jest wykorzystywana w mniejszym stopniu, głównie ze względu na początkowe ograniczenie do niewielkiego zakresu monomerów (styrenu i jego pochodnych). Jednak rozwój stabilnych nitroksydów znacznie rozszerzył grupę monomerów (akrylanów i akrylamidów) kompatybilnych z procesem NMP. Polimeryzacja NMP wykorzystuje efekt trwałego rodnika (*PRE*, ang. *Persistent Radical Effect*), powstającego razem z reaktywnym rodnikiem, zdolnym do propagacji, w procesie homolitycznego rozpadu inicjatora – alkoksyminy, w podwyższonej temperaturze. Trwały rodnik, nazywany nitroksydem, nie reaguje z monomerami, ale może się odwracalnie łączyć z aktywnym rodnikiem. Zatem kontrola w procesie NMP polega na bardzo szybkich procesach aktywacji i dezaktywacji wzrastających rodników za sprawą stabilnego rodnika nitroksylowego, który odgrywa rolę czynnika kontrolującego. Dzięki PRE rosnące łańcuchy polimerowe mają strukturę opartą głównie na alkoksyminie w formie „uśpionej”, która jest zdolna do homolitycznego rozszczepienia w celu ponownego wytworzenia rodnika aktywnego i nitroksydu. Polimeryzacja NMP ma również swoją powierzchniowo-inicjowaną odmianę (SI-NMP), w której szczepi się na powierzchnię inicjatory zawierające grupy alkoksyaminowe (bezpośredni wzrost łańcucha od inicjatora) lub wolnorodnikowe (rozpad inicjatora). Dla lepszej kontroli procesu, w obu przypadkach dodaje się nadmiar rodników nitroksylowych, która ograniczają szybkość procesu terminacji związanego z przesunięciem stałej równowagi reakcji w kierunku dezaktywacji makrorodników. Do zalet tej metody można zaliczyć: brak konieczności używania katalizatorów, co eliminuje dodatkowe etapy oczyszczania i ogranicza prawdopodobieństwo wprowadzenia zanieczyszczeń. Jest to cecha szczególnie przydatna w zastosowaniach biomedycznych i elektronicznych [128]. Jednak konieczność stosowania wysokich temperatur, a także długotrwały proces oczyszczania powierzchni ze względu na dodatek wolnego inicjatora sprawia, że polimeryzacja NMP wciąż nie cieszy się popularnością wśród badaczy zajmujących się szczotkami polimerowymi.

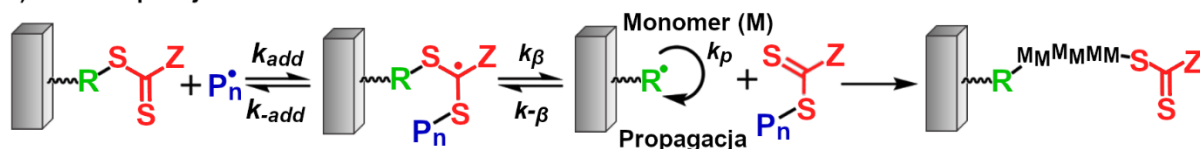
Innym sposobem otrzymywania szczotek polimerowych jest IMP. Wyróżnia się spośród pozostałych technik obecnością inifetera – związku zdolnego do jednoczesnej inicjacji, przeniesienia aktywności łańcucha oraz dezaktywowania reakcji polimeryzacji, stąd też jego nazwa, będąca akronimem od angielskich słów: *Initiator-Transfer Agent-Terminator*. Inifeter ulega rozpadowi na dwa aktywne rodniki, a rozkład ten zachodzi przy najslabszym wiązaniu.

Bardziej reaktywny rodnik bierze udział w inicjacji oraz propagacji łańcucha polimerowego, natomiast drugi, mniej reaktywny, rodnik jest odpowiedzialny za terminację narastającego łańcucha polimerowego. Inifery możemy pogrupować pod względem ich budowy oraz czynnika rozkładającego na aktywne rodniki. W pierwszym przypadku wyróżniamy inifery A–B, w których po rozpadzie powstają dwa rodniki o różnej aktywności ($A^{\bullet}$ i $B^{\bullet}$) oraz A–A których rozpad powoduje powstanie dwóch jednakowych rodników ($A^{\bullet}$). Iniferterami A–B mogą być aminy, alkoksyaminy, halogenki lub tiole, natomiast inifery A–A to najczęściej nadtlarki, disiarczki oraz pochodne tetrafenyloetanu [129]. Rozpatrując czynnik zewnętrzny wywołujący rozpad inifera, wyróżniamy termoinifery, gdzie czynnikiem jest temperatura [130] oraz fotoinifery, w których rozpad zachodzi w wyniku dostarczenia energii świetlnej [131]. Ciekawą możliwością, jaką daje ten typ polimeryzacji, jest opcja modyfikacji struktury inifera poprzez zmianę ilości wiązań ulegających rozpadowi. Pozwala to na uzyskanie polimerów o różnej architekturze (polimery liniowe, gwiazdziste, itp.). Szczególny rodzaj polimeryzacji IMP, jakim jest polimeryzacja z wykorzystaniem fotoinifera (*PIMP*, ang. *PhotoIniferter-Mediated Polymerization*) także ma swoją powierzchniowo-inicjowaną odmianę (SI-PIMP). Wtedy fotoiniferter jest szczepiony na powierzchni, a po umieszczeniu próbki w naczyniu i dodaniu rozpuszczonego monomeru uzyskujemy gotowy układ do fotopolimeryzacji. Dzięki temu jest to jedna z najprostszych i najbardziej uniwersalnych metod syntezy szczotek polimerowych. Wśród wad tej metody można wymienić słabszą kontrolę procesu niż w NMP czy, opisaną w dalszej części tego rozdziału, polimeryzacji RAFT, a także brak możliwości zastosowania PIMP do syntezy szczotek na podłożach sferycznych lub porowatych, ze względu na nierównomierny dostęp światła. Ponadto konieczny jest dostęp do sprzętu, umożliwiającego równomierne naświetlanie o stałej intensywności.

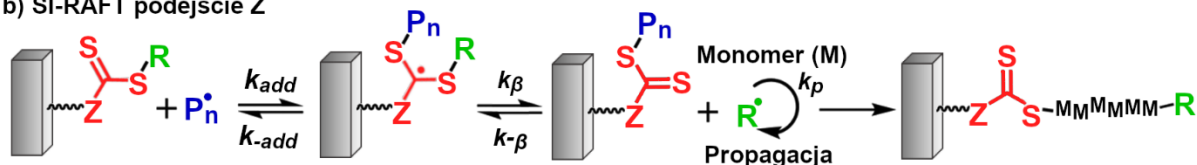
Kolejnym z wymienionych rodzajów polimeryzacji CRP jest polimeryzacja RAFT, czyli polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha. Reakcja ta opiera się na degeneracyjnym mechanizmie przenoszenia łańcucha, w którym zachodzi wymiana nietrwałych grup końcowych między aktywnymi rodnikami i cząsteczkami nieaktywnymi. Charakterystycznymi elementami tej polimeryzacji są inicjatory przenoszenia łańcucha oraz przenośniki łańcucha (*CTA*, ang. *Chain Transfer Agent*), składające się z grupy stabilizującej oraz grupy inicjującej. Na początku reakcji zachodzi proces inicjacji i generacji rodnika, co powoduje powstanie propagującego łańcucha polimerowego. Łańcuch ten szybko reaguje ze środkiem CTA, który sfunkcjonalizuje koniec łańcucha z ugrupowaniem CTA, powodując jego uśpienie. Pozostała część CTA zainicjuje nowy, drugi łańcuch polimeru, który później zareaguje z łańcuchem sfunkcjonalizowanym CTA. W takim środowisku łańcuchy

polimerowe są na przemian uśpione lub aktywne i rosną z podobną szybkością, co sprawia, że mają porównywalną długość. Odwracalne sekwencje addycji-fragmentacji powodują bardzo szybkie i odwracalne procesy przenoszenia łańcucha, co z kolei obniża stężenie centrów reaktywnych (sytuacja analogiczna do odwracalnych procesów aktywacji i dezaktywacji w NMP). Ten typ polimeryzacji występuje także w formie inicjowanej powierzchniowo (SI-RAFT). Uogólniony schemat polimeryzacji SI-RAFT przedstawiono na Rys. 13.

a) SI-RAFT podejście R



b) SI-RAFT podejście Z

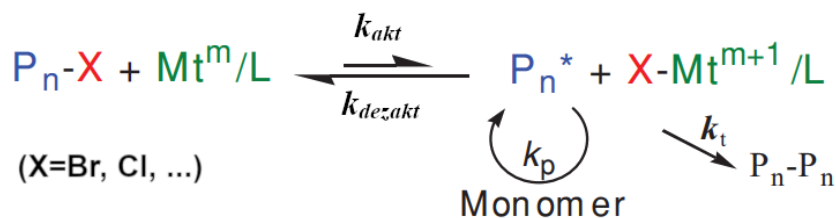


Rys. 13. Uogólniony mechanizm polimeryzacji SI-RAFT: (a) podejście typu R, (b) podejście typu Z. Symbol k_p oznacza stałą szybkości reakcji propagacji, k_{add} i k_{β} oznaczają stałe szybkości odpowiednich procesów addycji, natomiast k_{-add} i k_{β} stałe szybkości odpowiednich procesów fragmentacji (adaptacja na podstawie Wu, 2015).

Realizowane są w niej dwa podejścia: podejście typu R polega na tym, że grupa inicjująca jest związana z powierzchnią i po aktywacji reaguje z monomerem bezpośrednio z powierzchni; natomiast w podejściu typu Z właściwy wzrost łańcucha następuje w roztworze poprzez odchodzącą inicjującą grupę R, ulegającą odwracalnej addycji-fragmentacji z pozostałą częścią CTA. Wśród zalet polimeryzacji RAFT można wymienić jej prostotę, szeroką gamę monomerów oraz łagodne warunki prowadzenia reakcji. Niestety, konieczność używania inicjatora rodnikowego w roztworze, powodującego w przypadku syntezy szczotek problemy z oczyszczaniem powierzchni po reakcji, a także słaba dostępność komercyjnych czynników przenoszenia łańcucha typu RAFT, ogranicza zastosowanie tej metody [132,133].

Jedną z najczęściej używanych metod CRP jest polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ATRP), o czym może świadczyć fakt, że w około 60% pracach dotyczących kontrolowanych polimeryzacji stosuje się właśnie ten typ polimeryzacji. 25 lat temu prof. Krzysztof Matyjaszewski opublikował artykuł [134], w którym po raz pierwszy zaprezentował metodę ATRP. Typowymi elementami układu reakcyjnego w polimeryzacji ATRP, której mechanizm przedstawiono na Rys. 14, są: alkilowy lub aryłowy inicjator z przeciwjonem (P_n-X); metal przejściowy (Mt^m), zdolny do zmiany stopnia utlenienia; ligand

(L), zdolny do utworzenia kompleksu z centrum metalicznym (Mt^m/L); przeciwjon (X), który tworzy wiązanie kowalencyjne lub jonowe z metalem przejściowym (najczęściej jony halogenków); monomer oraz rozpuszczalnik.

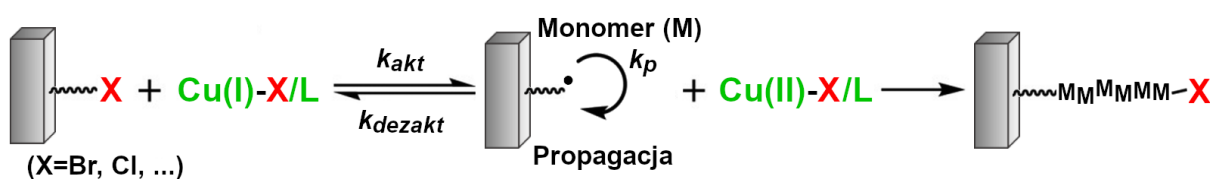


Rys. 14. Schemat klasycznej reakcji ATRP w roztworze, gdzie k_{akt} i k_{dezakt} oznaczają odpowiednio stałe szybkości aktywacji i dezaktywacji (adaptacja na podstawie Matyjaszewski, 2018).

W wyniku homolitycznego rozpadu wiązania węgiel-przeciwjon w inicjatorze (P_n-X), którego aktywatorem jest kompleks soli metalu przejściowego (Mt^m/L), dochodzi do przeniesienia halogenku (X) na kompleks aktywacyjny ze stałą szybkości (k_{akt}). W rezultacie następuje zwiększenie stopnia utlenienia metalu przejściowego o 1 ($X-Mt^{m+1}/L$), a na cząsteczce inicjatora wytwarza się reaktywny rodnik (P_n^*), który jest zdolny do reagowania z cząsteczkami monomeru ze stałą szybkości (k_p) lub ulegania procesom terminacji (połączenie z innym rodnikiem, reakcja dysproporcjonowania) ze stałą szybkości (k_t). Propagujący rodnik, w idealnym procesie, jest dezaktywowany ze stałą szybkości (k_{dezakt}) po bardzo krótkim czasie (rzędu milisekund) poprzez powrotne przeniesienie przeciwjonu z kompleksu aktywacyjnego i wytworzenie wiązania węgiel-przeciwjon. Zatem ATRP wykorzystuje efekt stabilnego rodnika nieulegającego propagacji, którego rolę pełni kompleks metalu przejściowego. Procesy aktywacji i dezaktywacji są odwracalne i następują bardzo szybko, a dynamiczna stała równowagi $k_{ATRP} = \frac{k_{akt}}{k_{dezakt}}$ jest przesunięta w kierunku dezaktywacji łańcucha. Tak szybka dezaktywacja silnie ogranicza stężenie reaktywnych rodników i spowalnia procesy terminacji łańcucha, które są niepożądane z perspektywy polimeryzacji żyjącej [135]. Stała K_{ATRP} , a zarazem szybkość polimeryzacji oraz jej kontrolowalność silnie zależy od rodzaju kompleksu aktywacyjnego i użytego inicjatora. Jako metalu przejściowego w aktywatorze używa się głównie miedzi (w postaci bromków lub chlorków), ze względu na największą efektywność jej kompleksów oraz możliwość stosowania szerokiej gamy monomerów [136]. Innymi metalami przejściowymi stosowanymi w ATRP są m.in.: Ti, Mo, Re, Fe, Ru, Rh oraz Ni [137]. Do najczęściej stosowanych ligandów należą natomiast wielokleszczowe aminy związki na bazie pirydyn, np.: tris(2-(dimetyloamino)etylo)amina (Me_6TREN) [138],

N,N,N',N'',N'''-pentametylodietylenotriamina (PMDETA) [139] lub bipirydyna (bpy) [140]. Reakcja ATRP umożliwia otrzymywanie polimerów zarówno w roztworze jak i szczepionych z powierzchni (SI-ATRP).

Najistotniejsza różnica pomiędzy ATRP w roztworze i SI-ATRP polega na tym, że w przypadku reakcji w roztworze inicjator jest swobodną cząsteczką, natomiast polimeryzacja powierzchniowo-inicjowana wymaga wcześniejszego kowalencyjnego przytwierdzenia inicjatora do powierzchni, stanowiącej podłoże do syntezy szczotek polimerowych (Rys. 15).



Rys. 15. Schemat powierzchniowo-inicjowanej polimeryzacji ATRP (adaptacja na podstawie Wu, 2015).

Ilość inicjatora stosowanego w tej odmianie ATRP, szczególnie w przypadku płaskich powierzchni, jest wielokrotnie mniejsza niż w reakcji w roztworze i zależy od wielkości podłoża. W celu poprawienia kontroli nad procesem otrzymywania szczotek szczepionych z powierzchni często dodaje się niewielką ilość wolnego inicjatora lub soli metalu przejściowego do roztworu, aby zapewnić już na początku reakcji wysokie stężenie dezaktywatora. Metoda SI-ATRP i ATRP w roztworze różnią się także stopniem przereagowania monomeru, który dla reakcji zachodzącej na powierzchni płaskiej jest niewielki ze względu na stosunkowo małą, w porównaniu do reakcji w roztworze, ilość łańcuchów związanych z powierzchnią. W stosunku do reakcji w roztworze, pewnym utrudnieniem tej techniki jest konieczność samodzielnej syntezy inicjatorów powierzchniowych. Zazwyczaj otrzymuje się je poprzez klasyczną syntezę organiczną lub bezpośrednio na powierzchni szczepienia w kilku etapach. Etapowa synteza inicjatora powierzchniowego w uproszeniu rozpoczyna się od zanurzenia odpowiednio oczyszczonej powierzchni w roztworze związku, który posiada na jednym końcu grupę zdolną do utworzenia wiązania kowalencyjnego z powierzchnią, a na drugim końcu grupę, która może przereagować z właściwą cząsteczką inicjatora ATRP (najczęściej jest to bromek bromoizobutyrylu (BIB)). Po zakończeniu reakcji, tak zmodyfikowaną powierzchnię oczyszcza się obficie rozpuszczalnikami, a następnie wprowadza do roztworu właściwego inicjatora ATRP. Zachodzi reakcja pomiędzy grupami końcowymi związku związanego z powierzchnią a inicjatorem, wiążąca go trwale z powierzchnią podłoża. Metoda ta, pomimo kilku etapów,

jest stosunkowo prosta i jest szczególnie przydatna w syntezie inicjatorów, których klasyczne oczyszczanie (kolumna chromatograficzna, destylacja) jest trudna [141]. Polimeryzacja ATRP zarówno w roztworze jak i jej wersja powierzchniowo-inicjowana jest jedną z najefektywniejszych metod polimeryzacji stosowanych w dzisiejszych czasach. Umożliwia uzyskanie polimerów o niskiej dyspersji, a jej dobrze przebadany mechanizm oraz pseudożyjący charakter zapewnia ścisłą kontrolę nad długością otrzymywanych łańcuchów. Ponadto przy jej użyciu możliwe jest otrzymanie szczotek polimerowych i kopolimerowych na powierzchniach różnego rodzaju i kształtu, przy użyciu szerokiej gamy monomerów (ograniczona stosowalność w przypadku monomerów zawierających w strukturze pirydynę lub grupy karboksylowe) [142]. Otrzymane tą metodą cienkie warstwy w postaci szczotek polimerowych charakteryzują się wysoką odpornością na zanieczyszczenia i wysoką trwałością, co sprawiło, że stały się przedmiotem znacznej liczby badań naukowych w ciągu ostatnich dwóch dekad.

2.2.2.2. Zastosowania szczotek polimerowych

Szczotki polimerowe stały się bardzo wszechstronnym narzędziem do modyfikacji różnych powierzchni, dzięki czemu znalazły potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, przemysłu czy ochrony środowiska. Jednym z przykładów takich zastosowań są elementy konstrukcyjne do budowy większych, często hybrydowych, nanostruktur o różnych kształtach. Wykorzystuje się w tym przypadku zarówno homopolimery jak i kopolimery blokowe, które umożliwiają otrzymanie nanostruktur kulistych, rurowych czy włóknistych. [143]. Szczotki polimerowe ułatwiły również tworzenie podłoży wykazujących właściwości elektrochemiczne, nanomechaniczne, fotochemiczne czy też czułe na bodźce. Dzięki kompatybilności z wieloma powierzchniami i nanomateriałami związanymi z energią, szczotki polimerowe wykorzystuje się z powodzeniem w projektowaniu urządzeń do magazynowania i przetwarzania energii. Stanowią one kluczowe jednostki strukturalne i funkcjonalne m.in. w ogniwach słonecznych, organicznych rodnikach, ogniwach fotoelektrochemicznych, akumulatorach litowo-jonowych, superkondensatorach czy ogniwach paliwowych [144]. Szczotki polimerowe znalazły również zastosowanie w: pokryciach redukujących tarcie [145], emulsjach stabilizowanych ciałami stałymi [146], katalizie [119] oraz modyfikowaniu fazy stacjonarnej w kolumnach chromatograficznych [147]. Szczotki polimerowe stały się także ważnym elementem układów łączących polimery i nieorganiczne nanocząstki. Opis takich systemów znajduje się w rozdziale 2.3 dotyczącym układów hybrydowych.

Interesującym zastosowaniem szczotek polimerowych jest wykorzystanie ich jako szablonów do syntezy nanocząstek i cienkich powłok nieorganicznych. Najczęściej wykorzystywanymi szablonami są szczotki polimerowe otrzymane z: poli(metakrylanu 2-hydroksyetylu) (PHEMA) zmodyfikowanego bezwodnikiem bursztynowym, poli(metakrylanu 2-(dimetyloamino)etylu) (PDMAEMA), chlorku poli[(2-metakryloksy)etylotrimetyloamoniowego] (PMETAC) czy poli-4-winylopirydyny (P4VP). Łącuchy szczotek są zazwyczaj modyfikowane metalicznymi prekursorami poprzez zanurzenie w wodnych roztworach soli metali, a po chemicznej redukcji tych soli powstają nanocząstki. Następnie szablon ze szczotek polimerowych jest usuwany i otrzymuje się folie metalowe. Możliwe jest także uzyskiwanie bardziej skomplikowanych struktur. Przykładowo osadzenie szablonowych szczotek polimerowych na powierzchni rdzenia krzemionkowego zamiast płaskiej powierzchni, a następnie usunięcie go, prowadzi do otrzymania wydrążonej cząstki o powłoce polimerowej z wbudowanymi nanocząstkami. W wyniku takiego szablonowania można otrzymać nanocząstki: srebra, złota, platyny, miedzi, niklu, palladu, PbS, CdS czy CdSe. Oprócz nanocząstek metalicznych, dzięki utworzeniu szablonu ze szczotek polimerowych można otrzymać także inne nieorganiczne nanocząstki i filmy. Przykładem mogą być szczotki polimerowe otrzymane z metakrylanu eteru metylowego poli(glikolu etylenowego) (PEGMEMA) wykorzystane do syntezy filmów z TiO_2 lub szczotki otrzymane z poli(N-izopropylakrylamidu) (PNIPAM), które zastosowano jako szablon do otrzymania waterytu – minerału stanowiącego odmianę polimorficzną węglanu wapnia CaCO_3 . Szczotki z PDMAEMA zostały także użyte do tworzenia cienkich wzorzystych filmów z TiO_2 i krzemionki, a szablony otrzymane z kwasu polimetakrylowego (PMAA) posłużyły do uzyskania trójwymiarowych mikro strukturyzowanych filmów kalcytowych [119].

Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się biologiczne i biomedyczne zastosowania szczotek polimerowych, na których koncentruje się dalsza część niniejszego podrozdziału. W zastosowaniach biomedycznych często wymagana jest funkcjonalizacja powierzchni danego materiału, która ma na celu zapewnienie lub poprawienie oczekiwanych właściwości. Jednym z biomedycznych zastosowań szczotek polimerowych są biosensory. W takich układach stosowano przykładowo szczotki kopolimerowe, o wysokiej adhezji, które otrzymano z poli(metakrylamidu karboksybetainy) (PCBMAA) oraz poli[N-(2-hydroksypropylo)metakrylamidu] (PHMAA). Celem było stworzenie efektywnej platformy sensorowej do analizy różnych złożonych próbek żywności. Innym podejściem jest zastosowanie szczotek polimerowych jako warstwy zapobiegającej zanieczyszczeniom, które mogłyby obniżyć czułość sensorów. Szczotki polimerowe, otrzymane z poli(metakrylanu

glicydyli) (PGMA) i PHEMA, przymocowane do przewodzącego polimeru, zastosowano również w stworzeniu nowych czujników glukozy do kowalencyjnego wychwycenia oksydazy glukozowej. Wprowadzenie warstwy szczotek spowodowało odporność sensora na niespecyficzną adsorpcję białka, zwiększając w ten sposób czułość oraz selektywność wykrywania glukozy. Ponadto warstwa PHEMA posłużyła do osiągnięcia znacznie większej pojemności czujnika [148]. Innym analitem, którego wykrywanie jest wspomagane przez szczotki polimerowe z poli(metakrylanu glikolu oligoetylenowego) (POEGMA), jest nadtlenek wodoru [149]. Także spektrometria mas jest dziedziną, w której właściwości adhezyjne szczotek polimerowych okazały się obiecujące. Warstwy szczotek pełnią w niej rolę powłok o wysokiej zdolności wiązania, nakładanych na płytki do analizy w MALDI-TOF MS, w celu poprawienia wykrywalności peptydów. Wykorzystano w tym celu szczotki PHEMA na podłożu wykonanym ze złota, które sfunkcjonalizowano kompleksami nitrylotrioctanu żelaza(III). Stworzenie takiego układu umożliwiło selektywne wiązanie fosfopeptydów i wykrywanie ich na poziomie femtomolowym [119].

Kolejnym zastosowaniem, pod kątem którego szczotki polimerowe są intensywnie badane, jest dostarczanie leków. Polimerowe nanocząstki, utworzone przez samoorganizację szczotek polimerowych z PEG, PAA oraz polilaktydu (PLA), zostały wykorzystane jako nośniki doksorubicyny – leku cytostatycznego (przeciwnowotworowego). Nośniki te nie wykazały cytotoksyczności wobec komórek, a dodatkowo są biokompatybilne. W innych badaniach wykorzystano szczotki z 6-ramiennego PEG, którymi pokryto arkusze tlenku grafenu, zyskującego coraz większą uwagę w dziedzinie dostarczania leków. Tak przygotowany nośnik był stabilny i wykazywał niską toksyczność wobec komórek raka płuca i raka piersi. Po wypełnieniu nośnika paklitaksem – lekiem cytostatycznym, za pomocą oddziaływań hydrofobowych uzyskano nanokompleks, który wykazał znacznie większą cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych niż wolny lek w takich samych warunkach. Mogło to być spowodowane większym wychwytem komórkowym dzięki zastosowaniu nośnika. Oprócz wprowadzania leku poprzez oddziaływania hydrofobowe, opracowano również sposób kowalencyjnego wiązania leku z nośnikiem. W tej metodzie paklitaksel był przymocowany do końca łańcucha PEG, a następnie tak zmodyfikowane łańcuchy przytwierdzano do powierzchni tlenku grafenu. Wyniki tych badań pokazały, że nośnik łączący tlenek grafenu i szczotki polimerowe PEG może być obiecującym nośnikiem dostarczającym lek, zwiększając jego biodostępność [143].

Szczotki polimerowe mogą również przyczyniać się do antybakteryjności modyfikowanej powierzchni. Tworząc pokrycia antybakteryjne wykorzystano np. szczotki

o strukturze hierarchicznej, zsyntezowane z PDMAEMA oraz poli(metakrylanu sulfobetainy) (PSBMA). PDMAEMA użyto jako warstwy czyszczącej, a PSBMA jako powłokę o właściwościach antyprzylegających i antybakteryjnych. Warstwy były eksponowane w zależności od tego, czy znajdują się w suchym czy wodnym środowisku. Eksperymenty bakteriobójcze wykazały, że w stanie suchym warstwa szczotek PSBMA uległa zapadnięciu się, podczas gdy warstwa PDMAEMA spowodowała śmierć zdeponowanych na niej bakterii. W środowisku wodnym natomiast dwubiegunowa warstwa zapobiegała przyłączaniu się bakterii i ich gromadzeniu się na powierzchni [150]. W przygotowywaniu powłok antybakteryjnych stosowane są szczotki polimerowe otrzymane także z innych polimerów, takich jak poli(N-hydroksyetyloakrylamid) (PHEAA), PEG czy poli(metakrylan N,N-dietyloaminoetylu) (PDAEMA) [151–153]. Szczotki polimerowe pomagają także zapobiegać niekontrolowanej adhezji białek, komórek lub innych związków biologicznych, które mogą np. obniżyć czułość lub efektywność niektórych urządzeń medycznych (zastawki serca, cewniki, stenty wieńcowe). To czy dana powłoka powoduje przyleganie białek i komórek, w dużej mierze zależy od jej powinowactwa w stosunku do wody: hydrofobowe powierzchnie sprzyjają adhezji, natomiast hydrofilowe zapobiegają jej. Do hydrofilowych powłok można zaliczyć neutralne szczotki polimerowe otrzymane przykładowo z: polimetakrylanu poli(glikolu etylenowego) (PPEGMA) lub PHEMA, a także szczotki polimerowe zawierające jony obojętne, np. PDAEMA lub POEGMA [149].

Oprócz działania zapobiegającego przyleganiu bakterii, szczotki polimerowe są szeroko badane pod kątem zwiększania adhezji komórek do powierzchni. Chociaż niektóre niesfunkcjonalizowane cienkie warstwy polimerowe umożliwiają adhezję, rozprzestrzenianie się i hodowlę komórek, to duża grupa neutralnych szczotek polimerowych wymaga funkcjonalizacji za pomocą peptydów lub białek adhezyjnych. Wśród tego typu zastosowań można wymienić pokrycia implantów ortopedycznych (np. protezy, śruby, płytki), wykorzystywanych w wielu stanach patologicznych i chorobach układu mięśniowo-szkieletowego, takich jak złamania, osteoporoza czy zapalenie stawów. Szczotki polimerowe w takich pokryciach redukują tarcie i pełnią rolę powierzchni wiążącej odpowiednie białka, co z kolei poprawia osteointegrację implantu *in vivo*. Przykładem są szczotki polimerowe z POEGMA, którymi zmodyfikowano powierzchnię tytanu (Ti) w celu przyłączenia fragmentu fibronektyny, specyficznego dla integrzyn (białka adhezyjne) oraz sekwencji RGD (Arg-Gly-Asp), wiążącej integryny. Badania wykazały, że tak zmodyfikowana powierzchnia Ti wykazała znacznie zwiększoną osteointegrację implantu *in vivo* niż niemodyfikowana powierzchnia Ti oraz powierzchnia Ti zmodyfikowana tylko RGD [154]. Innymi w ten sposób wykorzystanymi

warstwami były szczotki POEGMA oraz PHEMA sfunkcjonalizowane peptydem witronektyny, umożliwiły długoterminową hodowlę pluripotencjalnych komórek macierzystych z zachowaniem ekspresji ważnych markerów tych komórek. Możliwe jest również uzyskanie podłoży powodujących selektywną adhezję komórek. W tym celu zastosowano przykładowo szczotki kopolimerowe z poli(N,N-dimetyloakrylamidu) (PDMAA) i poli(kwasu N-akrylo-m-fenyloboronowego) (PNAAPBA), które stworzyły silniejsze wiązanie z mysimi hybrydowymi komórkami niż z komórkami ludzkiej białaczki szpikowej [155]. Niektóre badania wykazują, że już same właściwości chemiczne polimerów, z których otrzymywano szczotki polimerowe, mają wpływ na zachowanie komórek hodowanych na ich powierzchni. Przykładem może być chiralność powierzchni w przypadku niektórych polimerów: zaobserwowano, że komórki znacznie lepiej przylegają i są rozpląszczone na filmach L, podczas gdy na warstwach D komórki były mocno zaokrąglone i zmniejszały możliwie najbardziej powierzchnię stykającą się ze szczotkami [119]. Na przykładzie szczotek POEGMA potwierdzono również wpływ chropowatości powierzchni na zachowanie komórek. Szorstka powierzchnia szczotek POEGMA znacząco zmniejszała adhezję i rozprzestrzenianie się komórek pomimo funkcjonalizacji za pomocą RGD [155].

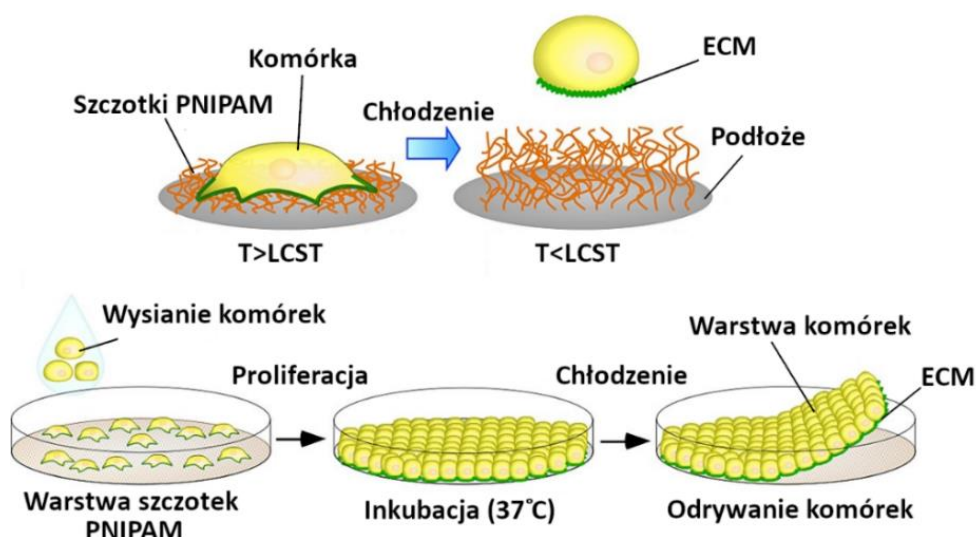
Podobnym podejściem, choć o nieco innym przeznaczeniu, jest stosowanie szczotek polimerowych jako sterowalnych podłoży do hodowli komórkowych. Mają one za zadanie umożliwić kontrolę nad przyleganiem i odrywaniem się komórek, co jest szczególnie przydatne w przypadku inżynierii tkankowej. Jednak w tym przypadku, większe zainteresowanie budzą podłoża czułe na bodźce zewnętrzne [156]. Zostały one przybliżone w odrębnym podrozdziale 2.2.2.3, ze względu na kluczowe znaczenie tego tematu dla badań zawartych w pracy.

2.2.2.3. Inteligentne podłoża polimerowe na bazie szczotek polimerowych

Niektóre polimery, jak polimery funkcjonalne lub inteligentne, ulegają dużym fizycznym i chemicznym, często odwracalnym, zmianom właściwości w wyniku niewielkich zmian otaczającego je środowiska. Takie materiały mogą być wrażliwe na wiele pojedynczych lub grupowych czynników, takich jak temperatura, wilgotność, pH, długość fali oraz intensywność światła, pole elektryczne lub magnetyczne, które indukują w materiale reakcje w postaci zmiany koloru, przewodnictwa, powinowactwa wobec wody, a nawet pęcznienie, zapadanie się czy zmianę struktury i chropowatości powierzchni. Wszystkie te zmiany można wykorzystać w projektowaniu inteligentnych systemów, które są szeroko wykorzystywane w zastosowaniach biomedycznych takich, jak dostarczanie leków [157] czy powierzchnie do hodowli komórkowych [158]. Celem opracowywania takich platform do hodowli

komórkowych jest wytworzenie arkuszy połączonych ze sobą komórek, które z kolei mogłyby być zastosowane do tworzenia struktur podobnych do tkanek i organów do różnych zastosowań w inżynierii tkankowej. Konwencjonalne techniki odłączania komórek, takie jak mechaniczne zeszkrobwanie komórek lub ich enzymatyczne odrywanie komórek (np. trypsynowanie), mogą powodować niewielką ilość uzyskanych komórek, ich degradację oraz upośledzenie funkcjonalności [159]. W związku z tym naukowcy poszukują alternatywnych, mniej inwazyjnych, metod odrywania komórek od podłoża. Zdecydowana większość stosowanych obecnie platform przeznaczonych do odrywania arkuszy komórek opiera się na materiałach termoaaktywnych, jednak zbadano również systemy elektroaktywne, czułe na pH, sterowane światłem i czynniki mechaniczne, a także degradowalne, gdzie komórki odłączane są poprzez usuwanie podłoża [160].

Ze względu na swoją stabilność, odporność na czynniki zewnętrzne oraz możliwość syntezy z polimerów funkcjonalnych, szczotki polimerowe okazały się świetnym materiałem do stosowania jako inteligentne podłoża do hodowli komórkowych. Ponadto zapewniają takie właściwości, jak: kontrolowane pęcznienie i zwilżalność, regulowane parametry makrocząsteczkowe (masa molowa, gęstość szczipienia, współczynnik sieciowania), wielofunkcyjny charakter, podatność na modyfikację, możliwość zmiany kształtu czy konformacji łańcucha, a także kompatybilność z większością podłoży. W porównaniu do wspomnianych wcześniej cienkich folii LbL, szczotki polimerowe ze względu na brak splątania łańcucha charakteryzują się większą elastycznością, co sprawia, że szybciej reagują na bodźce zewnętrzne. Jednymi z najlepiej przebadanych i najefektywniejszych szczotek polimerowych, służącymi do przyłączania i uwalniania komórek, są te wrażliwe na temperaturę. Generalna koncepcja bazuje na szczotkach z PNIPAM, na które nanosi się komórki w temperaturze wyższej niż dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności równa 32°C ($T > \text{LCST}$), kiedy łańcuchy są skurczone. Oderwanie komórek jest wynikiem ochłodzenia warstwy szczotek do temperatury poniżej LCST, przez co łańcuchy ulegają rozprostowaniu. Komórki rosną więc zazwyczaj w temperaturze ok. 37°C na podłożu hydrofobowym, które po obniżeniu temperatury staje się hydrofilowe, przez co komórki bez trudu się od niego oddzielają (Rys. 16). Taka forma odrywania komórek od powierzchni jest mniej inwazyjna niż konwencjonalne metody [161].

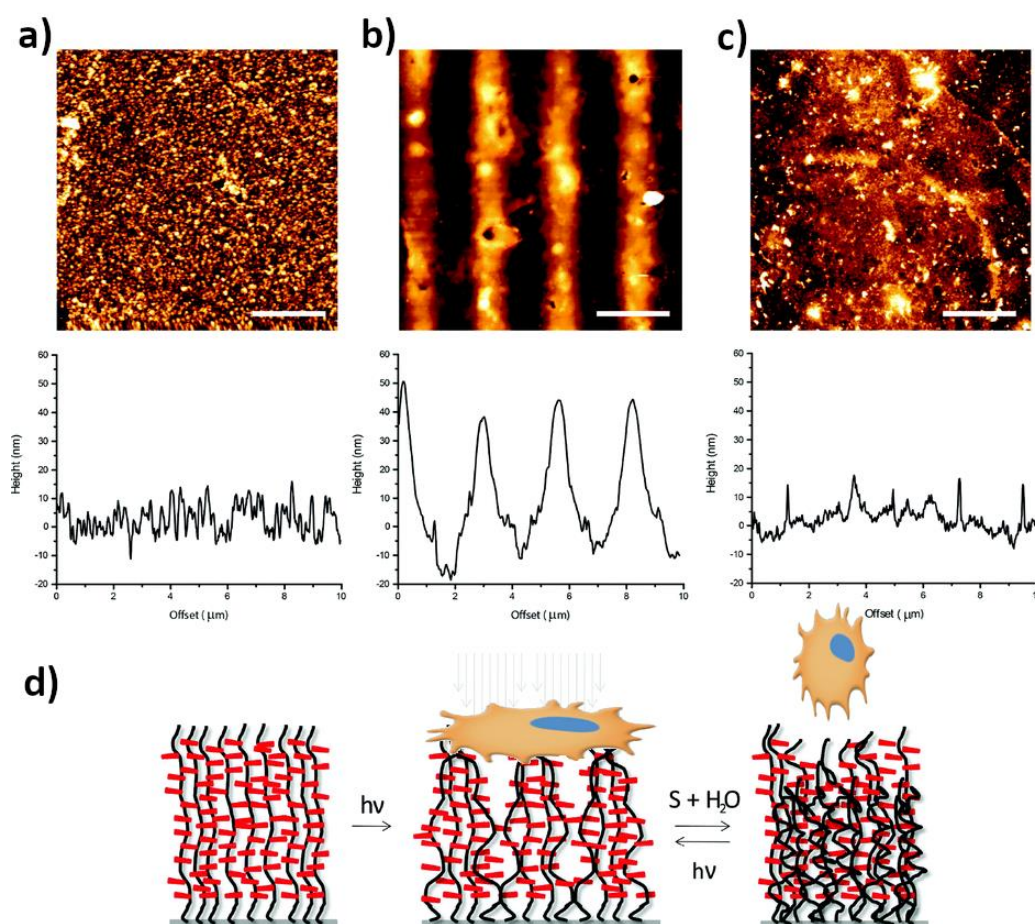


Rys. 16. Schemat zachowania szczotek polimerowych oraz hodowanych na nich komórek w zależności od temperatury (adaptacja na podstawie Nagase, 2018).

Szczotki PNIPAM zostały także wykorzystane do separacji komórek. Wykorzystano do tego fakt, że różne typy komórek przylegają do warstwy szczotek z porównywalną szybkością w temperaturze powyżej LCST, jednak szybkość ich odrywania różni się. Odłączanie zachodzi sekwencyjnie, jednocześnie dla jednego rodzaju komórek, co pozwala na zastosowania różnych profili odrywania i odseparowanie ich. W termoczulych podłożach, oprócz szczotek homopolimerowych z PNIPAM, stosuje się także jego kopolimery np. z metakrylanem metylu, N,N-dimetyloaminopropylomakrylamidem (DMAPAAm) oraz chlorkiem (3-akrylamidopropylu) trimetyloamoniowego (APTAC). Warty odnotowania jest fakt, że dodatnie kationowego monomeru APTAC w badaniach nad komórkami jajnika chomika chińskiego, skutecznie poprawiło proliferację komórek oraz szybkość odrywania komórek od termoczułego podłoża [161,162]. Innym przykładem termoczułego polimeru jest poli(metakrylan eteru monometylowego glikolu dietylenowego) (PDEGMA). Szczotki z tego polimeru zostały wykorzystane do hodowli i termicznego odrywania zarówno jednowarstwowych komórek, jak i sferoidów, które stają się w ostatnim czasie coraz bardziej popularne ze względu na lepsze reprezentowanie zachowania komórek *in vivo* niż komórki jednowarstwowe [163]. Termoczule podłoża do hodowli komórkowych wykorzystują bodziec, który oddziałuje z komórkami i może w pewnym stopniu niekorzystnie wpływać na ich zachowanie. Dlatego istotne jest poszukiwanie materiału, który umożliwiłby bezkontaktowe oddziaływanie na warstwę szczotek, umożliwiając sterowanie ich konformacją.

Cechami tymi charakteryzują się inteligentne światłoczułe podłoża, oparte na szczotkach polimerowych, które zostały już zastosowane jako warstwy do kontrolowanej adhezji

i odrywania komórek, Światło, stanowiące bodziec do zmiany sztywności, topografii czy współczynnika usieciowania, jest dostrojone tak, aby było nieinwazyjne i biokompatybilne dla komórek. Ponadto może być ono precyzyjnie zlokalizowane na podłożu, zaprogramowane w czasie, zdalnie zaadresowane i pozwala na tworzenie złożonych wzorów na powierzchni bez kontaktu, które mogłyby spowodować zanieczyszczenie powierzchni. Ostatnie badania wykazały, że cienkie warstwy z azobenzenu są dobrymi układami reagującymi na światło, jednak ich słabą stroną jest brak stabilności. Dlatego otrzymanie stabilnych i trwale związanych z podłożem szczotek polimerowych z azobenzenu, stało się obiecującym rozwiązaniem. Mechanizm adhezji i odrywania komórek na szczotkach azobenzenowych opiera się na utworzeniu pod wpływem światła, za pomocą bezpośredniej interferencyjnej litografii laserowej (IL), nanowzoru na powierzchni warstwy światłoczułej. Komórki śródbłónka żyły pępowinowej chętnie przylegają do takiej warstwy, a ich oderwanie następuje w wyniku ultradźwiękowego usunięcia wzoru z warstwy szczotek Rys. 17.



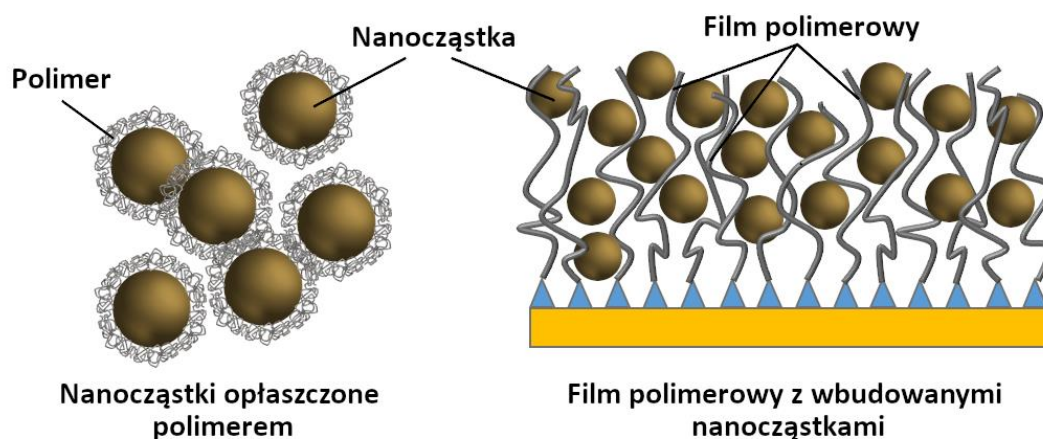
Rys. 17. Obrazy AFM oraz profile przekrojów (a) przed i (b) po 2-godzinnej ekspozycji szczotek azobenzenowych na IL. Zdjęcie (c) obrazuje powierzchnię po ultradźwiękowym usunięciu wzoru, a w części (d) rysunku zilustrowano graficznie zachowanie szczotek oraz komórek na ich powierzchni (adaptacja na podstawie Kollarigowda, 2017).

W badaniach udowodniono, że komórki, po usunięciu wzoru, oderwały się od powierzchni szczotek azobenzenowych a działanie ultradźwięków nie wpłynęło negatywnie na ich kondycję. Tak więc wykorzystanie szczotek polimerowych pozwoliło stworzyć dwuwymiarowe odwracalne powierzchnie do kontrolowanej adhezji oraz łagodnego odrywania komórek. Takie reagujące na światło podłoża są bliższe naturalnemu ECM w porównaniu do termoczułych podłoży, jednak ich ograniczeniem jest zapewnienie odwracalności bez uszkodzenia lub usztywnienia warstwy szczotek azobenzenowych [164].

2.3. Układy hybrydowe polimerowo-nieorganiczne zawierające nanocząstki

W ostatniej dekadzie wiele uwagi poświęcono hybrydowym układom polimerowo-nieorganicznym, ze względu na różnorodny, ale komplementarny charakter właściwości charakterystycznych dla tych dwóch klas materiałów. Na szczególną uwagę zasługuje połączenie nieorganicznych nanocząstek i polimerów, które oferuje możliwość wykorzystania zalet obu tych jednostek: unikalnych właściwości elektronicznych, termicznych, optycznych czy magnetycznych nanoobjektów z niezwykłymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi cienkich warstw polimerowych. Do kontrolowanego wytwarzania dobrze zdefiniowanych hybrydowych nanokompozytów stosuje się szereg technik, takich jak: powlekanie cząstek nieorganicznych łańcuchami polimerowymi przy użyciu metod „szczepienia do” i „szczepienia z” [165], łączenie nanocząstek i cienkich warstw za pomocą metody LbL [98], współstrącanie nanocząstek w obecności polimeru [166], synteza *in situ* nanocząstek pomiędzy łańcuchami polimerowymi szczepionymi powierzchniowo [167], proces samoorganizacji cienkich warstw polimerów zmieszanych z nanocząstkami [168] oraz polimeryzacja monomerów w obecności cząstek nieorganicznych [169]. Zatem polimerowo-nieorganiczne układy hybrydowe uzyskuje się zazwyczaj poprzez łączenie opisanych wcześniej metod otrzymywania nanocząstek i polimerów w różnych konfiguracjach.

W celu lepszego zobrazowania, układy hybrydowe łączące polimery i nieorganiczne nanocząstki, można podzielić na dwa zasadnicze obszary: pierwszy z nich obejmuje nanocząstki pokryte polimerami (*ang. organics-in-inorganics*), natomiast drugi zawiera matryce polimerowe z wbudowanymi nanocząstkami (*ang. inorganics-in-organics*) [170]. Zilustrowanie tych dwóch grup układów hybrydowych przedstawiono na Rys. 18.



Rys. 18. Dwie grupy hybrydowych układów polimerowo-nieorganicznych zawierających nanocząstki (źródło: opracowanie własne).

Wybór podejścia do tworzenia nanokompozytu polimerowo-nieorganicznego zależy od przeznaczenia materiału, które narzuca wymagane właściwości i strukturę materiału. Wśród zastosowań układów hybrydowych można wymienić: hodowle komórkowe, powłoki antybakteryjne, różnego rodzaju sensory, urządzenia fotowoltaiczne, diody emitujące światło, katalizatory i wiele innych. Różnorodność uzyskiwanych właściwości i materiałów wykorzystywanych do budowy hybrydowych układów prowadzi do bardzo szerokiego obszaru zastosowań, generowanego przez zaangażowanie bardzo wielu grup badawczych. Ze względu na to, że nie sposób opisać wszystkie możliwe kombinacje i zastosowania, dalsza część tego rozdziału przedstawia wybrane nanokompozyty polimerowo-nieorganiczne, które wykorzystywane są głównie w biomedycynie.

2.3.1. Nanocząstki pokryte polimerami

Strukturę nanokompozytu zbudowanego z nanocząstki i polimerowej otoczki, można podzielić na dwie główne części: rdzeń i powłokę (*ang. core-shell*). Ponieważ powłoka jest pierwszą częścią, która wchodzi w kontakt ze środowiskiem, to ona zapobiega agregacji nanocząstek oraz decyduje o stabilności koloidalnej (przy różnych wartościach pH, w obecności soli i białek), biokompatybilności, a także zwilżalności powierzchni (hydrofilowość, hydrofobowość). Ponadto powłoka może generować, ulepszać i dostosowywać inteligentne właściwości, takie jak czułość na bodźce zewnętrzne (pH, temperatura, światło) oraz możliwości dalszej funkcjonalizacji, np. markerami, środkami celującymi czy lekami. Stąd też odpowiednie pokrycie ma znaczenie, szczególnie w przypadku systemu nanocząstek do zastosowań biomedycznych, który musi spełniać swoje zadanie w złożonym środowisku płynów biologicznych, komórek i tkanek. Oznacza to, że nanocząstki muszą pozostać stabilne

koloidalnie nie tylko w podłożach zawierających sól i białko, takich jak roztwory buforowe lub podłoża do hodowli komórkowej, ale także podczas ich inkubacji z komórkami biologicznymi (testy *in vitro*) lub ich wstrzyknięcia do krwiobiegu (testy *in vivo*). Powłoki polimerowe oprócz zapewnienia powyższych warunków, eliminują problemy związane z innymi pokryciami organicznymi (naładowanymi lub amfifilowymi małymi cząsteczkami), które dotyczą ich słabego wiązania się z powierzchnią nanocząstek, niespecyficznego adsorpcji dużych biomolekuł, destabilizacji poprzez siłę jonową czy też cytotoksyczności. Pokrycie polimerowe zapewnia stabilizację elektrostatyczną lub przestrzenną, w zależności od tego czy polimer jest odpowiednio naładowany czy obojętny. Odpychanie steryczne między dwiema nanocząstkami pokrytymi polimerem występuje, gdy zbliżają się one do siebie, a najbardziej zewnętrzne warstwy ich powłok polimerowych zaczynają się przenikać, co skutkuje zwiększonym ciśnieniem osmotycznym między nanocząstkami i zmniejszoną entropią konformacyjną łańcuchów polimerowych, dzięki czemu nanocząstki odpychają się nawzajem. W przypadku naładowanych polimerów, tj. polielektrolitów, stabilizacja nanocząstek wynika zarówno z interakcji sterycznych jak i elektrostatycznych. Jakość zarówno elektrostatycznej jak i sterycznej stabilizacji silnie zależy również od rodzaju przyłączenia polimeru do powierzchni nanocząstek (np. szczepienie kowalencyjne, oddziaływania: wodorowe, koordynacyjne, van der Waalsa, elektrostatyczne) oraz struktury powłoki (np. kapsułka polimerowa, warstwa LbL, szczotki polimerowe) [171].

Polimery, które są stosowane do tworzenia układów hybrydowych poprzez pokrywanie nanocząstek, możemy podzielić pod względem ich pochodzenia na dwie zasadnicze grupy: polimery syntetyczne oraz polimery naturalne (biopolimery). Syntetyczne polimery można precyzyjnie zaprojektować, a ich właściwości dostosować do zapotrzebowania. Biopolimery natomiast mają ściśle określoną strukturę, jednak ich ogromna różnorodność, wewnętrzna biokompatybilność i biodegradowalność, rekompensuje mniejszą możliwość manipulacji właściwościami [172]. Wśród polimerów syntetycznych, bardzo szeroko stosowanym polimerem do powlekania cząstek koloidalnych w celu ich zastosowania w biomedycynie, jest PEG. Polimer ten dzięki hydrofilowemu szkieletowi utrzymuje silną i stabilną warstwę hydratacyjną przez wiązanie wodorowe z cząsteczkami wody i został sklasyfikowany jako materiał odporny na niespecyficzną adsorpcję białka [173]. Ponadto został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków, przez co powlekane tym polimerem nanocząstki są już dostępne w wielu zastosowaniach terapeutycznych [171]. PEG znalazł zastosowanie w pokrywaniu kropek kwantowych, gdzie stanowi powłokę tłumiącą cytotoksyczność i zwiększającą rozpuszczalność w wodzie, buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS,

ang. *Phosphate Buffered Saline*) i surowiczej albuminie bydlęcej (BSA, ang. *Bovine Serum Albumin*). Pokrywane PEG kropki kwantowe, ze względu na swoje właściwości fluorescencyjne odgrywają istotną rolę w obrazowaniu nowotworów [174]. Również SPION oraz nanocząstki ferrytów metali przejściowych pokrywa się PEG w celu ich stabilizacji, poprawienia biokompatybilności i zastosowania jako środki kontrastowe w MRI, przy jednoczesnym utrzymaniu właściwości magnetycznych porównywalnych z nanocząstkami stosowanymi klinicznie [40,175]. Pokrywanie PEG jest również szeroko przeprowadzane na nanocząstkach krzemionkowych, zwykle w połączeniu z barwnikami lub magnetycznymi nanocząstkami, aby stworzyć platformy do obrazowania nowotworów i zastosowań terapeutycznych. Wśród metalicznych nanocząstek, pokrywanych PEG w celu zmniejszenia toksyczności, znalazły się także nanocząstki złota, które okazały się obiecującym kandydatem w kontrolowanym dostarczaniu leków oraz jako nośniki środków kontrastowych lub wzmacniacze radioterapii [171]. Pokrywane PEG nanocząstki złota są także obiecującymi systemami do obrazowania *in vivo* przy zastosowaniu rozpraszania światła w bliskiej podczerwieni, a więc również w terapii fototermicznej [176]. Pomimo wielu zalet w stosunku do zastosowań biomedycznych, nanocząstki pokrywane PEG charakteryzują się także pewnymi wadami, m.in. immunogennością i krótkotrwałą stabilnością. W badaniach wykazano, że powłoki PEG nie zapobiegały całkowicie adsorpcji białka na powierzchni nanocząstek (która obniża stabilność), jednak w porównaniu do nanocząstek bez pokrycia polimerem znacząco zmniejszały wychwyt komórkowy. Innym ograniczeniem takich układów hybrydowych jest szybkie utlenianie się otoczki PEG, szczególnie w obecności tlenu i jonów metali przejściowych, a także brak możliwości dalszej funkcjonalizacji [171]. Innym nieobdarzonym ładunkiem, szeroko stosowanym w tworzeniu układów hybrydowych z nanocząstkami, polimerem jest PNIPAM. Jego wrażliwość na temperaturę, stabilność fazowa (brak zmiany LCST ze zmianą długości łańcucha) oraz łatwość kontroli masy i długości łańcucha przy użyciu CRP sprawiła, że w formie hydrożelu lub szczotek stał się elementem wielu nanokompozytów. Wśród nich znalazły się układy nanocząstek złota, którym pokrycie PNIPAM zapewniło stabilność zarówno w wodzie, BSA, jak i PBS [177]. Inny przykład mogą stanowić nanokompozyty, w których nanocząstki z mezoporowatej krzemionki są pokrywane szczotkami polimerowymi z PNIPAM i wykorzystywane jako nanozawory do kontrolowanego uwalniania substancji (w tym leków) [178]. Kolejnym pokryciem nanocząstek, otrzymywanym w wyniku kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, jest poli(winylopirolidon) (PVP). Nanocząstki pokryte PVP charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie i niektórych rozpuszczalnikach organicznych, dzięki czemu możliwe jest przeniesienie fazowe pomiędzy

tymi rozpuszczalnikami. Pokryte przez PVP nanocząstki srebra wykazują wysoką stabilność i biokompatybilność, jednak ograniczenie w zastosowaniach biomedycznych stanowi to, że powłoka z PVP nie ulega degradacji. Oprócz polimerów neutralnych, układy hybrydowe otrzymywane są także z polimerów obdarzonych ładunkiem, tj. polielektrolitów. Otrzymywanie nanocząstek pokrytych polielektrolitami odbywa się najczęściej za pomocą metody LbL, a ładunek powierzchniowy takich hybrydowych układów umożliwia dalszą funkcjonalizację, poprzez doczepienie naładowanych barwników, leków, przeciwciał, peptydów lub aptamerów do polielektrolitowych powłok. Pokrycia polielektrolitowe są bardzo szeroko stosowane w pokrywaniu nanocząstek ze względu na ich zdolność budowania struktur wielowarstwowych. Najpopularniejszymi syntetycznymi polikationami, stosowanymi w pokrywaniu nanocząstek, są: P4VP, PDMAEMA, PDADMAC oraz PEI, a polianionami: PMAA oraz PSS. Przykładem mogą być układy utworzone poprzez pokrycie nanocząstek złota za pomocą PSS, w których wykazano zmniejszenie toksyczności w porównaniu do nanocząstek bez warstwy polimerowej. Jednak ograniczenie stanowią wolne ligandy PSS obecne w roztworze. Nanocząstki pokrywane polielektrolitami często adsorbują na powierzchni przeciwnie naładowane cząstki biologiczne (np. białka), przez co w zastosowaniach *in vivo* najczęściej są łączone dodatkowo z PEG, aby zapobiec temu zjawisku. Przykładem mogą być kropki kwantowe, pokryte PSS oraz znakowanym PEG, które powodują większy wychwyt komórkowy w obszarze nowotworu i mogą być zastosowane w ich obrazowaniu [171]. Oprócz klasycznej struktury rdzeń powłoka, można w przypadku polielektrolitów zastosować kombinację polianionów i polikationów [179].

Ze względu na naturalną biozgodność i stabilność w płynach biologicznych, polimery pochodzenia naturalnego stały się idealnymi kandydatami na pokrycia nanocząstek do zastosowań biologicznych. Głównymi grupami biopolimerów są polinukleotydy (DNA, RNA), polipeptydy (białka, enzymy) oraz polisacharydy (dekstran, celuloza, chitozan). Powłoki polinukleotydowe nanocząstek są stosowane częściej w transfekcji żywych komórek, nadania nanocząstkom selektywności lub origami DNA, niż w celu zapewnienia stabilności czy biokompatybilności. Istnieje kilka artykułów, w których zastosowano DNA do powlekania cząstek koloidalnych takich jak nanocząstki złota lub krzemionki [180], jednak pomimo przesłanek o stabilności takich układów hybrydowych, polinukleotydy nie są szeroko wykorzystywane ze względu na kosztowną i uciążliwą ekstrakcję. Inaczej sytuacja wygląda w przypadku polipeptydów i białek, które charakteryzują się mnogością funkcji wynikających z obecności wielu grup funkcyjnych (m.in. karboksylowych, aminowych, tiolowych, hydroksylowych, fenyłowych) oraz zdolność do organizowania się w uporządkowane

trójwymiarowe struktury. Białka i polipeptydy są stosowane w pokrywaniu nanocząstek w celu zapewnienia biokompatybilności, umożliwienia ich ukierunkowania czy sterowania aktywnością katalityczną. Ponadto pozwalają nanocząstkom uniknąć agregowania oraz niespecyficznego adsorpcji białek na powierzchni, a więc poniekąd ukryć się w środowisku biologicznym. Inną zaletą jest ich przydatność w neutralizacji czynników chorobotwórczych bakterii, w tym zakażeń lekoopornych i stanów zapalnych wywoływanych przez bakterie [181]. Najczęstszymi nanocząstkami stosowanymi do tworzenia układów hybrydowych z białkami są nanocząstki złota, które dzięki modyfikacji powierzchni zyskują silną stabilność zarówno w wodzie jak i płynach ustrojowych, znajdują zastosowanie w dostarczaniu leków oraz wykrywaniu różnych cząstek biologicznych [171].

W grupie polisacharydów najczęściej stosowanym pokryciem dla nanocząstek jest dekstran, będący neutralnym polimerem wytwarzanym z sacharozy. Jest dobrze rozpuszczalny w wodzie oraz niektórych rozpuszczalnikach organicznych oraz charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością, niską toksycznością i zdolnością do stabilizacji nanocząstek [182]. Przykładem układu hybrydowego z dekstranem są środki kontrastujące w MRI, zbudowane z rdzenia magnetycznego w postaci SPION oraz dekstranowej otoczki. Takie nanokompozyty były dostępne komercyjnie, jednak zostały wycofane ze względu na niewystarczającą efektywność związaną z dużą ilością polimeru w stosunku do nanocząstki oraz niską wytrzymałość połączenia polimeru z powierzchnią nanocząstki. Spośród ujemnie naładowanych polisacharydów, do tworzenia układów hybrydowych najczęściej wybierane są ALG, znajdujący się w ścianach komórkowych brązowych alg oraz HA, który jest obecny w organizmie ludzkim, szczególnie w skórze, płucach, płynie maziowym i we krwi. Przykładowym zastosowaniem ALG jest tworzenie układu kropek kwantowych z alginianową otoczką, która oprócz zapewnienia stabilności i możliwości funkcjonalizacji, daje możliwość wykorzystania np. jako czujnik optyczny do wykrywania ibuprofenu [183]. Tworzy się także nośniki łączące nanocząstki mezoporowatej krzemionki pokryte ALG za pomocą LbL, do zastosowań w wewnątrzkomórkowym i reagującym na pH, dostarczaniu leków (np. doksorubicyny) [90]. Z kolei hybrydowe systemy nanocząstek pokrytych HA wykazują zwiększoną stabilność i niską agregację. Przykładem takiego układu mogą być nośniki leków, zbudowane ze SPION pokrytych stabilizującymi HA oraz BSA (z przyłączonym paklitakselem). Układ ten może być stosowany zarówno w leczeniu przeciwnowotworowym jak i w MRI (pokrycie nie ekranuje właściwości magnetycznych nanocząstek), zatem jest obiecującym układem do zastosowań teranostycznych [184]. Innym teranostycznym nośnikiem hybrydowym są nanocząstki mezoporowatej krzemionki pokryte HA i zmodyfikowane

gadolinem, które są badane pod kątem wykorzystania jako nośnik tirapazaminy (eksperymentalny lek przeciwnowotworowy) i jednocześnie kontrast do obrazowania w MRI oraz fluorescencji w bliskiej podczerwieni [90].

Kolejnym naturalnym polimerem, który jest bardzo szeroko stosowany w badaniach dotyczących diagnostyki, terapii i teranostyki, często jako warstwa pokrywająca nanocząstki, jest chitozan. Jest to hydrofilowy, biokompatybilny, biodegradowalny polisacharyd, znajdujący się w skorupiakach morskich i otrzymywany przez deacetylację chityny. Chitozan jest nieimmunogenny i nietoksyczny oraz wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe [185]. Posiada wiele dostępnych grup aminowych i hydroksylowych, które umożliwiają mu pokrywanie nanocząstek zarówno polimerowych i lipidowych, jak i nanocząstek metali oraz tlenków metali. Nanocząstki pokryte chitozanem wykazują niezwykłą stabilność w wodzie oraz różnych buforach, co sprawia, że znacząco zwiększa się ich biodostępność. Polimer ten, oprócz znacznej poprawy stabilności koloidów, umożliwia także wzmocnienie ich właściwości oraz dalszą funkcjonalizację powierzchni (barwnikami, peptydami, biomarkerami czy antyciałami). Przykładem mogą być układy hybrydowe łączące nanocząstki złota lub srebra z powłoką chitozanową, które oprócz zmniejszenia toksyczności były w stanie zwiększyć produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach raka płuc w odniesieniu do nanocząstek powleczonych np. cytrynianem sodu. Złote nanocząstki z otoczką chitozanową zostały też zastosowane w kontrolowanym przez pH dostarczaniu leków do żołądka, zapewniając wyższą aktywność antybakteryjną. Podobnie nanocząstki miedzi, platyny i tytanu pokrywane chitozanem, ze względu na generowanie większej ilości ROS znalazły antybakteryjne zastosowania [186]. Powstają także nośniki łączące nanocząstki mezoporowatej krzemionki oraz chitozan nanoszony za pomocą LbL, do zastosowań w wewnątrzkomórkowym i reagującym na pH dostarczaniu dokсорubicyny [90]. Bardzo ważną cechą chitozanu jest jego zdolność do chelatowania jonów metali [166]. Dzięki wolnej parze elektronów, azot obecny w grupie aminowej może wiązać się z jonami żelaza znajdującymi się na powierzchni nanocząstki tworząc wiązanie koordynacyjne, które jest znacznie trwalsze niż wiązanie wodorowe. Dzięki temu również SPION są łączone z chitozanem w celu stworzenia hybrydowych układów. Znalazły one zastosowanie m.in. jako nietoksyczne multifunkcyjne środki kontrastowe w obrazowaniu MRI połączonym z obrazowaniem fluorescencyjnym [42]. Warto zaznaczyć, że nanokompozyty łączące chitozan i nanocząstki są uważane za bardziej efektywne nawet niż te, w których otoczkę polimerową stanowi popularny PEG.

2.3.2. Nanocząstki w warstwach polimerowych

Drugim rodzajem nanokompozytów polimerowo-nieorganicznych są układy zbudowane z cienkiej warstwy polimerowej (matrycy) oraz nanocząstek nieorganicznych wbudowanych w jej strukturę. Istnieją różne drogi budowania tego typu nanokompozytów, bazujące głównie na syntezie nanocząstek *in situ* w warstwie polimerowej oraz adsorpcji lub utworzeniu wiązania wcześniej przygotowanych nanocząstek z polimerową matrycą. Funkcjonalizacja warstw polimerowych takich, jak warstwy LbL, szczotki polimerowe czy hydrożele, za pomocą składników nieorganicznych, obejmuje wbudowanie m.in. nanocząstek półprzewodnikowych, metali oraz tlenków metali.

Wprowadzenie nanocząstek do warstw LbL powoduje znaczącą poprawę właściwości mechanicznych. Przykład mogą stanowić badania, w których do mikrocząstek LbL z PDADMAC i PSS wprowadzono stabilizowane nanocząstki złota. Badania mechaniczne pokazały znaczny wzrost modułu Younga, co oznacza, że domieszkowanie mikrocząstek polimerowych LbL złotymi nanocząstkami, znacznie zwiększyło sztywność polimerowej warstwy i uczyniło ją bardziej odporną na deformację. Innym przykładem może być połączenie polielektrolitowych mikrokapsuł wielowarstwowych (*PEM*, ang. *polyelectrolyte multilayer*), otrzymanych z poli(chlorowodoru alliloaminy) (PAH) i PSS, z nanorurkami węglowymi. W tym wypadku, oprócz poprawienia właściwości mechanicznych, wykorzystano szeroką absorpcję nanorurek węglowych w zakresie IR i VIS, co umożliwiło zdalną aktywację i otwarcie powłoki za pomocą lasera. Daje to nowe możliwości w zastosowaniach biomedycznych, szczególnie w kontrolowanym uwalnianiu substancji [170]. Potrzeba poprawienia właściwości mechanicznych zachodzi także w przypadku grubych i żelopodobnych powłok LbL, często wytwarzanych przy użyciu PLL i HA. Nanocząstki złota wprowadzone do takich warstw wzmacniają je i usztywniają oraz umożliwiają zastosowanie w kontrolowanym dostarczaniu leków. Zdalne uwalnianie substancji z polimerowych warstw PEM można osiągnąć za pomocą różnych bodźców, w zależności od rodzaju wbudowanych nanocząstek. W tym celu do warstw PEM wbudowano nanocząstki srebra i złota, które umożliwiły uwalnianie poprzez zwiększenie lokalnego wzrostu temperatury wywołanego laserem. Podobne zastosowanie dotyczy nanocząstek złota wprowadzonych do powłok LbL wytwarzanych z PLL i HA, gdzie dodatkowo pełnią funkcję wzmacniającą i usztywniającą. Oprócz światła laserowego do kontrolowanego uwalniania zastosowano również bodziec w postaci pola magnetycznego. Wymagało to wprowadzenia do warstwy PEM magnetycznych nanocząstek (np. SPION), które absorbując pole magnetyczne wytwarzają lokalny wzrost

temperatury i zwiększają przepuszczalność otaczającej warstwy nośnika leku [187]. Również kropki kwantowe zostały wprowadzone do multiwarstwowego filmu otrzymanego z PAH oraz PSS tworząc biokompatybilny i fluorescencyjny układ hybrydowy. Po przyłączeniu przeciwciała monoklonalnego, ukierunkowanego na komórki nowotworowe raka piersi, taki nanokompozyt stanowi czuły i selektywny czynnik fluorescencyjnie znakujący komórki nowotworowe [188]. Kompozytowe filmy LbL, zawierające nieorganiczne nanocząstki, takie jak nanocząstki srebra lub tlenku grafenu, pozwalają także tworzyć powłoki antybakteryjne, które znajdują zastosowanie w implantologii [98].

Szczotki polimerowe, ze względu na brak splątania łańcucha charakteryzują się większą elastycznością, trwałością i szybszą reakcją na bodźce zewnętrzne, co sprawia, że są bardzo dobrym kandydatem do stanowienia matrycy polimerowej w układach hybrydowych. Poza tym, związane z powierzchnią łańcuchy polimerowe, stanowią makrocząsteczkowy reaktor do syntezy nanocząstek oraz rusztowanie do ich unieruchomienia (szerzej omówione w rozdziale 2.2.2.2). Wprowadzenie nanocząstek nieorganicznych do warstw szczotek polimerowych skutkuje, podobnie jak w przypadku warstw LbL, wzmocnieniem i usztywnieniem warstw oraz nadaje im nowe, dodatkowe funkcje. Układy hybrydowe łączące szczotki polimerowe (np. PEG, POEGMA) z nanocząstkami złota lub srebra poprawiają rozpraszanie oraz efektywność metody SERS, która jest techniką z ogromnym potencjałem w diagnostyce biomedycznej (np. detekcji bakterii). Z kolei wbudowanie nanocząstek złota do szczotek polimerowych reagujących na pH, np. PDMAEMA, umożliwia opracowanie nanosensorów do analiz biomedycznych, wykorzystujących kombinację dwóch zjawisk. Z jednej strony układ taki wykorzystuje pęcznienie i kurczenie się warstwy szczotek polimerowych pod wpływem zmian pH, z drugiej natomiast opiera się na powierzchniowym rezonansie plazmonowym wywoływanym przez nanocząstki złota [189]. Innym przykładem biomedycznego zastosowania układów hybrydowych tego typu są powłoki antybakteryjne. Wykorzystano w tym celu szczotki polimerowe z PAA, które posłużyły do unieruchomienia nanocząstek srebra. Utworzono w ten sposób powłokę skutecznie i długotrwale likwidującą bakterie, bez konieczności uwalniania jonów srebra, stanowiącego ograniczenie innych powłok antybakteryjnych [190]. W podobnym celu stosuje się również kompozyty szczotek polimerowych PMETAC z nanocząstkami miedzi, które wykazują długoterminową skuteczną antybakteryjność [191]. Powstają również układy hybrydowe łączące szczotki z poli(metakrylanu 3-sulfopropylowego) oraz SPION. System szczotek zapewnia zachowanie jednolitego kształtu i rozmiaru, przy jednoczesnym zapobieganiu agregacji, a nanocząstki dostarczają układowi właściwości magnetyczne [192]. Innym magnetycznym układem

hybrydowym są szczotki polimerowe PAA z wbudowanymi nanocząstkami holmu, który charakteryzuje się wysokim momentem magnetycznym. Utworzono w ten sposób trójwymiarową, reagującą na magnes sieć polimerową, która może zostać wykorzystana w wielu zastosowaniach opisanych w rozdziale dotyczącym zastosowań szczotek polimerowych [193]. Trójwymiarowe magnetyczne układy hybrydowe stworzono także na bazie hydrożeli polisacharydowych, w których strukturze umieszczono SPION. Znalazły one zastosowanie w badaniach nad hodowlami komórkowymi, gdzie spowodowały poprawę proliferacji komórek oraz adhezji w zewnętrznym polu magnetycznym [194].

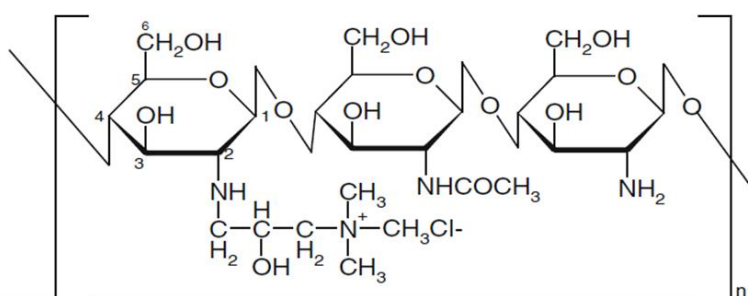
Hybrydowe nanokompozyty zawierające zarówno materiały polimerowe, jak i nieorganiczne nanocząstki odgrywają znaczącą rolę w opracowywaniu zaawansowanych materiałów, w których miękkość, elastyczność i funkcjonalność matrycy polimerowej muszą być uzupełnione twardością i wrażliwością na bodźce zewnętrzne oraz innymi właściwościami oferowanymi przez składniki nieorganiczne. Temat jest wciąż zyskuje popularność i nie został jeszcze dogłębnie przebadany. Różnorodne podejścia do tworzenia hybrydowych układów, połączenie komplementarnych właściwości związków organicznych i nieorganicznych, duża multidyscyplinarność materiałów oraz wskazuje na dalszy gwałtowny rozwój tej dziedziny nauki. Patrząc perspektywicznie, zarówno warstwy LbL, hydrożele jak i szczotki polimerowe dzięki tworzeniu układów hybrydowych z nieorganicznymi nanocząstkami z pewnością zyskają nowe właściwości oraz poszerzą się obszary ich zastosowań [170].

3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

3.1. SPION domieszkowane cynkiem i pokryte kationową pochodną chitozanu do zastosowań w hipertermii magnetycznej

3.1.1. Materiały

Synteza nanocząstek: chlorek żelaza(III), heksahydrat (Sigma-Aldrich, cz.d.a); chlorek żelaza(II), tetrahydrat (POCH S.A, cz.d.a); chlorek cynku, bezwodny (POCH S.A, cz.d.a); amoniak roztwór 25% (POCH S.A, cz.d.a); chlorek sodu (POCH S.A, cz.d.a); chitozan modyfikowany kationowo, stopień podstawienia 47%, (CCh(+)); argon 5.0 (Messer).



Rys. 19. Wzór strukturalny kationowej pochodnej chitozanu (CCh).

Charakterystyka nanocząstek: kwas chlorowodorowy 35–38% (POCH S.A, cz.d.a); witamina C (Sigma-Aldrich, cz.d.a); 1,10-fenantrolina, monohydrat (POCH S.A, 99,5%); woda dejonizowana.

Eksperymenty biologiczne: Pożywka DMEM (*ang. Dulbecco's modified Eagle's medium*) do hodowli komórkowych z L-glutaminą oraz 15 mM czynnika buforującego HEPES (Sigma-Aldrich) uzupełnionej 5% FBS (niepochodząca z USA, sterylnie filtrowana, Sigma-Aldrich); roztwór Penicylina-Streptomycyna (HyClone™); bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT, Sigma-Aldrich, czystość MQ: 200)

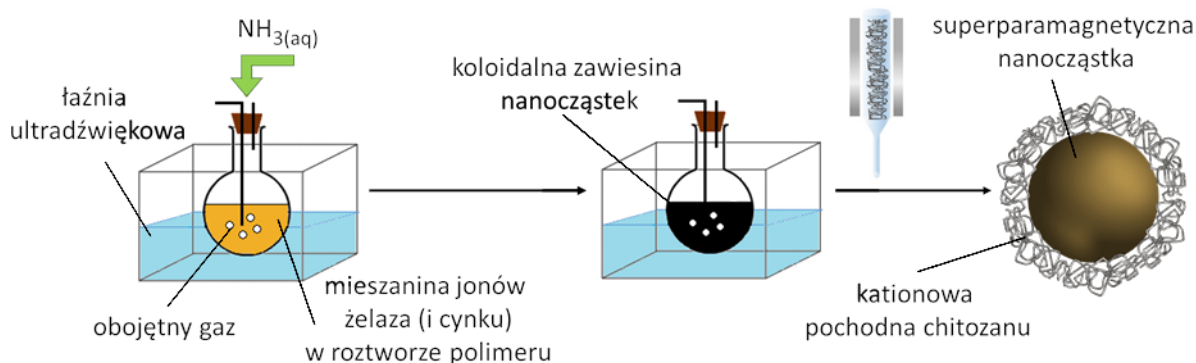
3.1.2. Procedury eksperymentalne

3.1.2.1. Synteza nanocząstek metodą współstrącania

Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, pokryte warstwą kationowej pochodnej chitozanu i domieszkowane cynkiem, otrzymano techniką współstrącania w obecności kationowej pochodnej chitozanu (CCh(+)) z impulsowym poddawaniem działaniu ultradźwięków (Rys. 20). Korzystano z CCh(+) o stopniu podstawienia równym 47%, zsyntezowanego na podstawie zmodyfikowanej metody opisanej przez Cho et al. [195].

Syntezę SPION domieszkowanych cynkiem i pokryte CCh(+) przeprowadzono wprowadzając 0,1622 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0398 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oraz 0,0137 g bezwodnego ZnCl_2 (stosunek molowy $\text{Fe(III)}:\text{Fe(II)}:\text{Zn(II)} = 6:2:1$) do 50 ml roztworu CCh(+) o stężeniu 3 g/l w 0,1 M NaCl. Układ zamknięto i poddawano działaniu ultradźwięków przez 10 minut. Podczas całej syntezy stosowano impulsowe poddawanie działaniu ultradźwięków o częstotliwości: jeden impuls 1-sekundowy co 5 sekund oraz przedmuchiwanie mieszaniny argonem. Następnie do mieszaniny wkroplono 5 ml 5M $\text{NH}_3(\text{aq})$ i poddawano działaniu ultradźwięków przez kolejne 30 minut. W celu utrzymania stałej temperatury mieszaniny reakcyjnej, wynoszącej ok. 20°C, do wody w łaźni ultradźwiękowej dokładano lód, gdy temperatura układu zaczynała się podnosić. Drugą syntezę przeprowadzono wprowadzając 0,1622 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0596 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (stosunek molowy $\text{Fe(III)}:\text{Fe(II)} = 2:1$) do 50 ml roztworu CCh(+) o stężeniu 3 g/l w 0,1 M NaCl. Pozostałe czynności przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym powyżej. Do trzeciej syntezy ponownie przygotowano 0,1622 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 0,0596 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a różnica w otrzymywaniu polegała na tym, że zamiast do roztworu polimeru, wprowadzono je do 50 ml wody dejonizowanej. Dalsze etapy przebiegały tak samo jak w przypadku wcześniejszych syntez. Otrzymano w ten sposób próbki SPION pokrytych polimerem i zawierających różną ilość cynku (SPION-Zn-CCh(+)) oraz próbki odniesienia: SPION w otoczce z chitozanu kationowego (SPION-CCh(+)) oraz SPION bez pokrycia polimerowego (SPION). W dalszej części pracy zastosowano skrócone oznaczenia zawiesin w postaci: SPION-Zn-CCh(+), SPION-CCh(+) oraz SPION.

Kolejnym krokiem było oczyszczenie uzyskanych nanocząstek za pomocą chromatografii magnetycznej. Wykorzystano kolumnę chromatograficzną wypełnioną wełną stalową oraz magnesy neodymowe, ustawione wzdłuż drogi przemywania. Oczyszczone próbki przechowywano w lodówce, w szklanych naczyniach i poddawano kilkuminutowemu ciągłemu działaniu ultradźwięków przed każdą analizą.



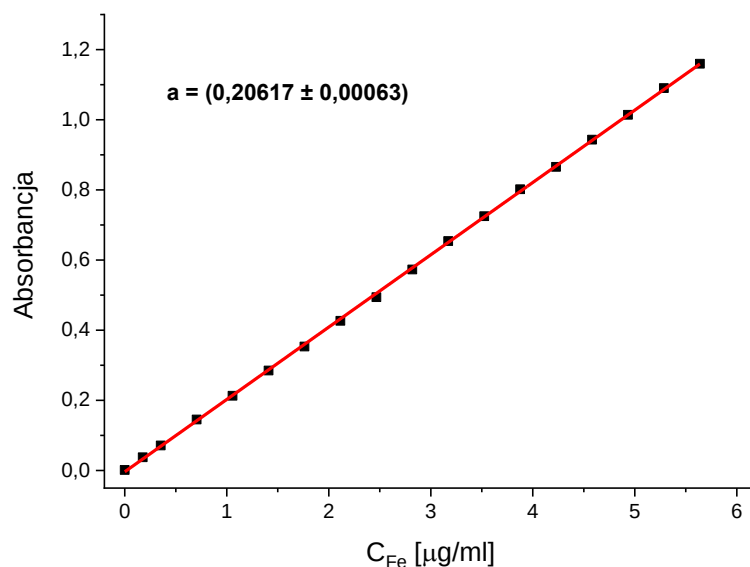
Rys. 20. Schemat syntezy nanocząstek tlenku żelaza metodą współstrącania z impulsowym poddawaniem działaniu ultradźwięków, na przykładzie nanocząstek domieszkowanych cynkiem (źródło: opracowanie własne).

3.1.2.2. Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek

Otrzymane SPION scharakteryzowano fizykochemicznie, określając ich stężenie, rozmiar, stabilność, a także dokładny skład pierwiastkowy.

Oznaczanie zawartości żelaza

Stężenie zawiesin nanocząstek ustalono na podstawie ilościowej zawartości żelaza w poszczególnych próbkach. Zastosowano w tym celu technikę spektroskopii absorpcyjnej UV–Vis. Zawiesinę nanocząstek do pomiarów przygotowywano poprzez rozтворzenie 3 ml próbki w 0,6 ml 3 M HCl. Po 24 h do klarownego roztworu o żółtym zabarwieniu dodawano witaminę C, w ilości odpowiadającej stosunkowi molowemu 1:1 do teoretycznej zawartości żelaza w badanej próbce, co miało na celu zredukowanie obecnych w próbce jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} . Po kolejnej dobie i całkowitym odbarwieniu roztworu, rozcieńczano go odpowiednio oraz odpipetowywano objętość 6,25 ml do kolby na 25 ml, do której wprowadzano również 3 ml 0,2% roztworu wodzianu 1,10-fenantroliny w 0,08 M HCl. Tak przygotowaną kolbę uzupełniano wodą dejonizowaną do kreski i dokładnie mieszano. Po 15 minutach uzyskiwano barwny roztwór kompleksu żelaza(II) z 1,10-fenentroliną, który był badany poprzez rejestrację widm absorpcyjnych oraz pomiar absorbancji przy długości fali charakterystycznej dla utworzonego kompleksu i równej $\lambda_{\text{max}} = 512 \text{ nm}$, za pomocą spektrofotometru UV–Vis Thermo Scientific Evolution 220. Roztwory badano w kwarcowej kuwecie firmy Hellma, a odnośnik stanowiła woda dejonizowana. Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji obliczano zawartość żelaza w otrzymanych zawiesinach, wykorzystując uprzednio wyznaczoną krzywą kalibracyjną, opisującą zależność absorbancji od stężenia jonów Fe^{2+} (Rys. 21).

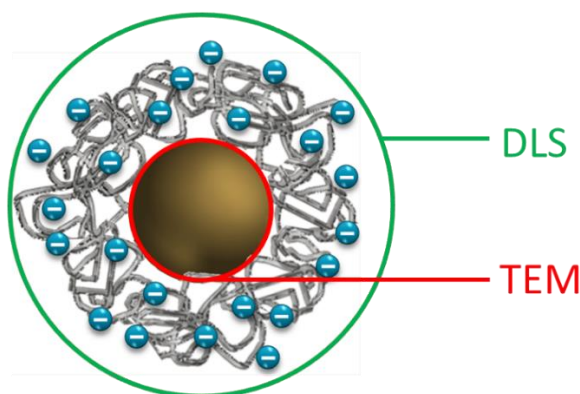


Rys. 21. Krzywa kalibracyjna przedstawiająca zależność absorbancji od stężenia jonów Fe^{2+} , wykorzystywana do obliczenia stężenia żelaza w badanej próbce.

Pomiary rozmiarów nanocząstek

Po ustaleniu stężenia nanocząstek zbadano ich rozmiar, który określono poprzez pomiar dynamicznego rozpraszania światła (*DLS*, ang. *Dynamic Light Scattering*), obrazowanie za pomocą wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego (*HRTEM*, ang. *High-Resolution Transmission Electron Microscopy*), a także rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małym kątem (*SAXS*, *Small Angle X-Ray Scattering*). W celu wyznaczenia średnicy hydrodynamicznej SPION, próbki odpowiednio rozcieńczano, a następnie dokonywano pomiaru za pomocą aparatury Zetasizer Nano ZS firmy Malvern z przystawką do pomiaru dzeta potencjału, wyposażonej w laser helowo-neonowy o długości fali równej 633 nm. Wykorzystywano przy tym dynamiczne rozpraszanie światła mierzone pod kątem 173° w temperaturze 25°C . Rozmiar nanocząstek oraz ich morfologię zbadano również za pomocą mikroskopu HRTEM, model TECNAI TF 20 X-TWIN firmy FEI. Ze względu na obrazowanie w wysokiej próżni próbka wymagała odpowiedniego przygotowania i utrwalenia. Niewielką objętość zawiesiny SPION nanoszono na miedzianą siateczkę pokrytą błoną węglową, która nie zaburza przepływu wiązki elektronów przez próbkę oraz zabezpiecza ją przed uszkodzeniem, a następnie suszono w strumieniu azotu. Na podstawie uzyskanych zdjęć dokonywano pomiaru ok. 100 średnic nanocząstek. Mikroskopia elektronowa TEM, w odróżnieniu od pomiarów DLS, umożliwia wyodrębnienie i pomiar pojedynczych rdzeni nanocząstek. Wynika to z wpływu hydratacji otoczki polimerowej na osiągnięte średnice hydrodynamiczne w pomiarach DLS, związanej z dyfuzją cząsteczek wody we wnętrzu

polimeru. Różnicę w wyniku pomiaru, uzyskiwanym w tych dwóch metodach, obrazuje Rys. 22.



Rys. 22. Schemat obrazujący różnicę w średnicy uzyskiwanej za pomocą mikroskopii TEM oraz pomiarów DLS (źródło: opracowanie własne).

Wielkość nanocząstek zmierzono również za pomocą pomiarów SAXS. Przeprowadził je dr inż. Wojciech Szczerba w ośrodku Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung w Berlinie (Niemcy), w kapilarze przepływowej za pomocą aparatury typu Kratky (SAXSess Anton Paar, Graz, Austria) przy (294 ± 1) K. Aparat SAXSess ma niewielką odległość pomiędzy próbką a detektorem, wynoszącą 30,9 m, co jest użyteczne przy badaniu dyspersji o niskiej intensywności rozpraszania. Próbkę poddawano pomiarowi w postaci zawiesiny otrzymanej w wyniku syntezy, po wcześniejszym 5-cio minutowym wytrząsaniu. Pomiar SAXS opiera się na rejestracji natężenia promieniowania rozproszonego pod małymi kątami (od kilku minut do kilku stopni). Efekt małokątowego rozpraszania pojawia się, gdy w materiale znajdują się cząstki o rozmiarach rzędu kilku nm. Jeśli cząstki w materiale są kuliste, to natężenie promieniowania rozproszonego zależy tylko od kąta rozpraszania, a nie zależy od kierunku. Zmierzone natężenie promieniowania rozproszonego zostało przeliczone na skalę bezwzględną. Wielkość wektora rozpraszania (q) zależy od długości fali promieniowania ($\lambda = 0,154$ nm) zgodnie z równaniem: $q = (4\pi n/\lambda)\sin\theta$, gdzie n —współczynnik załamania światła, θ —kąt rozpraszania. Dekonwolucję krzywych SAXS przeprowadzono za pomocą oprogramowania SAXS-Quant (Anton Paar). Dopasowywanie krzywej przeprowadzono za pomocą oprogramowania SASfit.

Określenie stabilności zawiesin nanocząstek

Stabilność otrzymanych zawiesin zbadano zarówno w wodzie, jak i w płodowej surowicy bydlęcej (mieszanina 200 μ l FBS i 4 ml 0,1% wodnego roztworu NaCl). Najpopularniejszą metodą wykorzystywaną do określenia stabilności zawiesin i koloidów jest pomiar potencjału

dzeta, wykorzystujący laserowy efekt Dopplera. Przyjmuje się, że zawiesina nanocząstek jest stabilna, jeżeli jej potencjał dzeta jest co do wartości bezwzględnej jest większy od 30 mV. Pomiar potencjału dzeta odpowiednio rozcieńczonych próbek wykonano za pomocą tej samej aparatury, którą wykorzystano w pomiarach DLS, dzięki przystawce do pomiaru potencjału dzeta. Innym sposobem pomiaru stabilności jest badanie za pomocą analizatora stabilności Turbiscan® Classic 2 Oil Series. Metodę tą zastosowano do zbadania stabilności SPION-Zn²⁺-CCh(+) zarówno w wodzie jak i w płodowej surowicy bydlęcej. Probówkę z próbką włożono do uchwytu mocującego i oświetlono wiązką z zakresu bliskiej podczerwieni ($\lambda = 850$ nm). Dwa synchroniczne czujniki optyczne mierzyły odpowiednio światło przepuszczane przez próbkę (pod kątem 180° do padającego światła) i światło rozproszone wstecznie przez próbkę (pod kątem 45° do padającego promieniowania). Transmitancję wiązki mierzono wzdłuż długości probówki między jej dnem i meniskiem, a uzyskane wartości uśredniano dla określonego czasu. Pomiar danej próbki prowadzono przez 24 h.

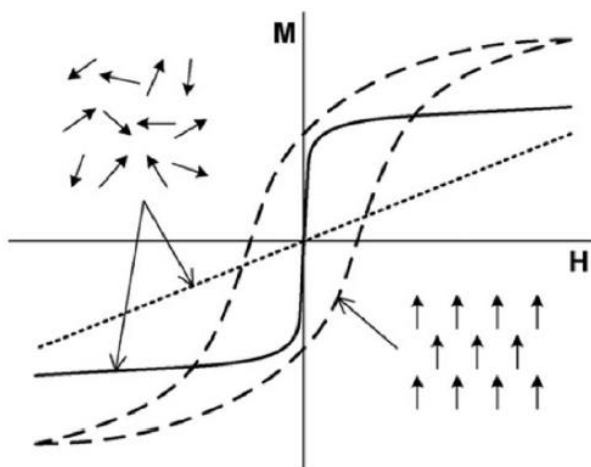
Badanie składu pierwiastkowego nanocząstek

Skład uzyskanych nanocząstek określono za pomocą spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (*XPS, ang. X-ray Photoelectron Spectroscopy*). Próbkę do badań przygotowano poprzez naniesienie niewielkiej ilości zawiesiny nanocząstek na złotą płytkę i wysuszenie jej w strumieniu argonu. Pomiar przeprowadzono przy użyciu spektrometru PHI 5000 Versa Probe II (ULVAC-PHI) wyposażonego w źródło promieniowania Al K α (1486,6 eV). Ciśnienie robocze w komorze analitycznej było mniejsze niż 3×10^{-7} Pa. Widma wysokiej rozdzielczości rejestrowano przy energii przejścia analizatora 29,35 eV. Wszystkie sygnały XPS odniesiono do sygnału węgla C1 znajdującego się przy energii wiązania C–C równej 284,8 eV. Do obliczenia składu pierwiastkowego z obszarów sygnałów zostało użyte oprogramowanie do analizy danych od PHI MultiPak (v.9.7.0.1), a widmo tła odjęto metodą Shirley.

3.1.2.3. Badanie właściwości magnetycznych nanocząstek

Pomiary przy użyciu magnetometru wibracyjnego (*VSM, ang. Vibrating Sample Magnetometer*) przeprowadzono w celu zbadania właściwości magnetycznych otrzymanych SPION. Istotnym kryterium wymaganym do uznania cząstek za superparamagnetyczne jest brak pętli histerezy w profilu VSM oraz natężenie koercyjne równe lub zbliżone do zera (natężenie pola magnetycznego potrzebne do przywrócenia zerowego namagnesowania próbki po poprzednim jej namagnesowaniu do poziomu nasycenia) [196]. Wykresy zależności

magnetyzacji od natężenia zewnętrznego pola magnetycznego dla superparamagnetyków, paramagnetyków i ferromagnetyków przedstawiono na Rys. 23.



Rys. 23. Wykres zależności magnetyzacji (M) od natężenia zewnętrznego pola magnetycznego (H) dla superparamagnetyków (linia ciągła); paramagnetyków (linia przerywana punktowa); ferromagnetyków (linia przerywana kreskowa) (adaptacja na podstawie Chomoucka, 2010).

Próbkę do pomiarów VSM przygotowano poprzez umieszczenie zawiesziny nanocząstek o objętości 40 μl w jednorodnym polu magnetycznym, w uchwycie wykonującym oscylacje pionowe. Oscylacje te indukowały sygnał zmiennego napięcia w układzie czterech cewek pomiarowych, który jest proporcjonalny do momentu magnetycznego próbki. Pozwoliło to na pomiar magnetyzacji w zależności od pola magnetycznego oraz na zapewnienie magnetyzacji nasycenia (M_{nas}) oraz natężenia koercyjnego (H_c) nanocząstek. Przy pomiarach stosowano magnetometr wibracyjny typu 7407 firmy LakeShore. Pomiary wykonano w temperaturze ciekłego azotu (LN, $\sim 80\text{ K}$) oraz w temperaturze pokojowej (RT, $\sim 298\text{ K}$) w funkcji zewnętrznego pola magnetycznego o wartości indukcji do 1,5 T. Zależność temperaturową magnetyzacji, zmierzoną w reżimie ZFC-FC zarejestrowano w następujący sposób: rozmagnesowaną próbkę schładzano do temperatury pokojowej w zerowym polu magnetycznym, a następnie przykładano zadane zewnętrzne pole magnetyczne i rozpoczynano pomiar magnetyzacji, podczas którego próbka była ogrzewana do 250 K z ustaloną prędkością (krzywa ZFC). Po skończonym pomiarze, utrzymując zadane pole magnetyczne, próbkę ponownie schładzano do temperatury pokojowej, rejestrując w tym samym czasie jej magnetyzację (krzywa FC). Obie krzywe rejestrowano w polu magnetycznym o wartości 100 Gs.

3.1.2.4. Badanie struktury SPION-Zn2-CCh(+)

W celu określenia lokalnej struktury atomowej badanych nanocząstek domieszkowanych cynkiem i pokrytych kationową pochodną chitozanu przeprowadzono pomiary spektrometrii mössbauerowskiej oraz wysoko rozdzielczej spektroskopii absorpcji promieni X w pobliżu progu absorpcji (*HERFD XANES*, ang. *High-Energy Resolution Fluorescence Detected X-ray Absorption Near Edge Structure*). Widma mössbauerowskie ^{57}Fe zostały zarejestrowane w temperaturze pokojowej i ciekłego azotu (80K) z wykorzystaniem źródła $^{57}\text{Co/Rh}$. Pomiary były prowadzone w modzie transmisyjnym, w trybie stałego przyspieszenia z badaną próbką w formie adsorbenta. Adsorbent przygotowywano poprzez suszenie zawiesiny, aż do uzyskania proszku. Otrzymane widma niskotemperaturowe analizowano za pomocą procedury dopasowania metodą najmniejszych kwadratów, w przybliżeniu „cienkiego adsorbenta”. Inną metodą, która posłużyła w określeniu struktury otrzymanego związku była spektroskopia HERFD XANES. Pomiary przeprowadzono na stacji badawczej ID26 w Europejskim Synchrotronie (ESRF) w Grenoble. Układ pomiarowy oparty był na spektrometrze emisji rentgenowskiej w geometrii Johanna wyposażonym w zestaw czterech sferycznych analizatorów monokrystalicznych Ge (440) oraz monochromator z podwójnym kryształem Si (311). Rozdzielczość energetyczna dla energii odpowiadającej krawędzi absorpcji K żelaza (7,1 keV) określona na podstawie szerokości połówkowej piku rozpraszania elastycznego wyniosła ok. 0,7 eV. Widma HERFD XANES zbierano z wodnych zawiesin nanocząstek i porównywano z widmami próbek odniesienia: polikrystalicznego $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oraz monokrystalicznego Fe_3O_4 .

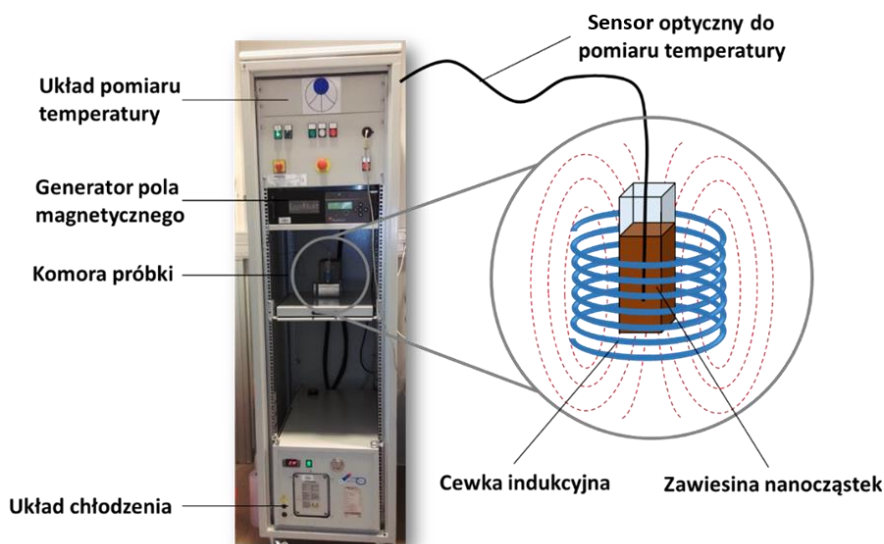
3.1.2.5. Testy cytotoksyczności SPION-Zn2-CCh(+) na liniach komórkowych *neuroblastoma*

Aktywność cytotoksyczną próbki SPION-Zn2-CCh(+) na mysich liniach komórkowych nerwiaka zarodkowego (*neuroblastoma*) oceniono za pomocą testu MTT. Wykorzystuje się w nim aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu mitochondrialnego, obecnego w żywych komórkach, który przekształca rozpuszczalny bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT), w formę zredukowaną, nierozpuszczalny formazan, wytrącający się w postaci kryształów. Komórki w ilości 4×10^4 hodowano w objętości 0,1 ml pożywki hodowlanej na 96-dołkowej płytce (TC Plate, Cell+, F, dla wrażliwych komórek adherentnych, Sarstedt) w obecności różnych stężeń SPION-Zn2-CCh(+) zawieszonych w pożywce. Po 24 h komórki oczyszczono i dalej inkubowano przez 1 godzinę z barwnikiem MTT. Otrzymany niebieski osad formazanu rozpuszczono stosując bufor do solubilizacji

(5 mM HCl w izopropanolu) i inkubowano przez noc w 37°C. Otrzymany barwny roztwór poddano pomiarom absorbancji przy długości fali równej 570 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Każdy wynik przedstawiono jako średnią z czterech niezależnych eksperymentów, z których każdy przeprowadzono w trzech próbach. Dla wszystkich wartości obliczono także odchylenie standardowe. Istotność różnic między wartościami żywotności komórek określono za pomocą testu t-studenta w odniesieniu do próby kontrolnej. We wszystkich przypadkach wartość prawdopodobieństwa (p) mniejsza niż 0,05 została uznana za znaczącą.

3.1.2.6. Eksperymenty hipertermii magnetycznej i badania *in vitro* na liniach komórkowych *neuroblastoma*

W celu określenia zdolności ogrzewania się otrzymanych nanocząstek, przeprowadzono eksperymenty MH, w których rejestrowano krzywe zależności temperatury od czasu ekspozycji na zmienne zewnętrzne pole magnetyczne. Efekt hipertermiczny mierzono za pomocą zestawu zbudowanego w Akademickim Centrum Materiałów i Nanotechnologii Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Układ pomiarowy do MH składał się z generatora do grzania indukcyjnego (EASY Heat 0224 FFC CE), cewki indukcyjnej (7,5 zwoju), układu chłodzenia wodnego cewki (TEXA TCW12NBSBCP0000) oraz sensora optycznego w postaci włókna szklanego (Rys. 24).



Rys. 24. Układ stosowany do pomiaru efektu hipertermicznego (źródło: opracowanie własne).

Całość układu obsługiwana była za pomocą komputera z programem sterującym w środowisku LabView. Za jego pomocą możliwe było regulowanie m.in. natężenia prądu generatora, maksymalnej temperatury oraz maksymalnego czasu pracy. Polimerową probówkę Eppendorf, wypełnioną 400 μ l badanej próbki wraz z optycznym czujnikiem temperatury umieszczano

w środku cewki indukcyjnej. Tak przygotowaną próbkę mocowano w polimerowym statywie wykonanym z próbki o średnicy 2,5 cm, zapewniającym izolację termiczną zawieszyny. Pomiarów wykonywano zmieniając moc generatora pola magnetycznego w zakresie 0,9–1,6 kW, co odpowiadało wyznaczonemu eksperymentalnie natężeniu pola magnetycznego (H) w zakresie 27,6–35,7 kA/m. Częstotliwość zmiennego pola magnetycznego ustalono na 360 kHz. Profile temperaturowe próbek były rejestrowane w czasie rzeczywistym, a następnie korygowane poprzez odjęcie profili temperaturowych zmierzonych dla wody dejonizowanej, które potraktowano jako miarę ogrzewania ła. Szybkość ogrzewania określono jako początkowe (do ok. 200 s) nachylenie zależności temperatury (T) w funkcji czasu (t), do którego dopasowano regresję liniową.

Po zbadaniu zdolności ogrzewania się nanocząstek, przystąpiono do przetestowania ich hipertermicznego działania na komórkach z linii *neuroblastoma*. Komórki te najpierw inkubowano w zawieszynie SPION-Zn₂-CCh(+), a następnie umieszczono we wcześniej opisanym układzie pomiarowym do MH i poddawano działaniu zmiennego pola magnetycznego. Komórki w ilości 4×10^4 , hodowano w sterylnych dołkach wyciętych z płytki 12-dołkowej, aby umożliwić ich umieszczenie wewnątrz cewki indukcyjnej. Komórki inkubowano w pożywce hodowlanej zawierającej zawieszinę SPION-Zn₂-CCh(+) (stężenie 0,18 mg Fe/ml) przez 24 h. Następnie komórki przemyto pożywką hodowlaną, natychmiast umieszczono w aparacie do pomiaru efektu hipertermicznego i poddawano działaniu pola magnetycznego (33,3 kA/m) przez 900 s. Pomiarów rozpoczęto od temperatury 37°C. Taką samą procedurę eksperymentalną zastosowano również dla komórek, które nie były inkubowane z SPION-Zn₂-CCh(+) (eksperyment kontrolny). Po poddaniu działaniu pola magnetycznego wszystkie komórki zostały poddane testowi MTT w trzech seriach, aby ocenić ich przeżywalność.

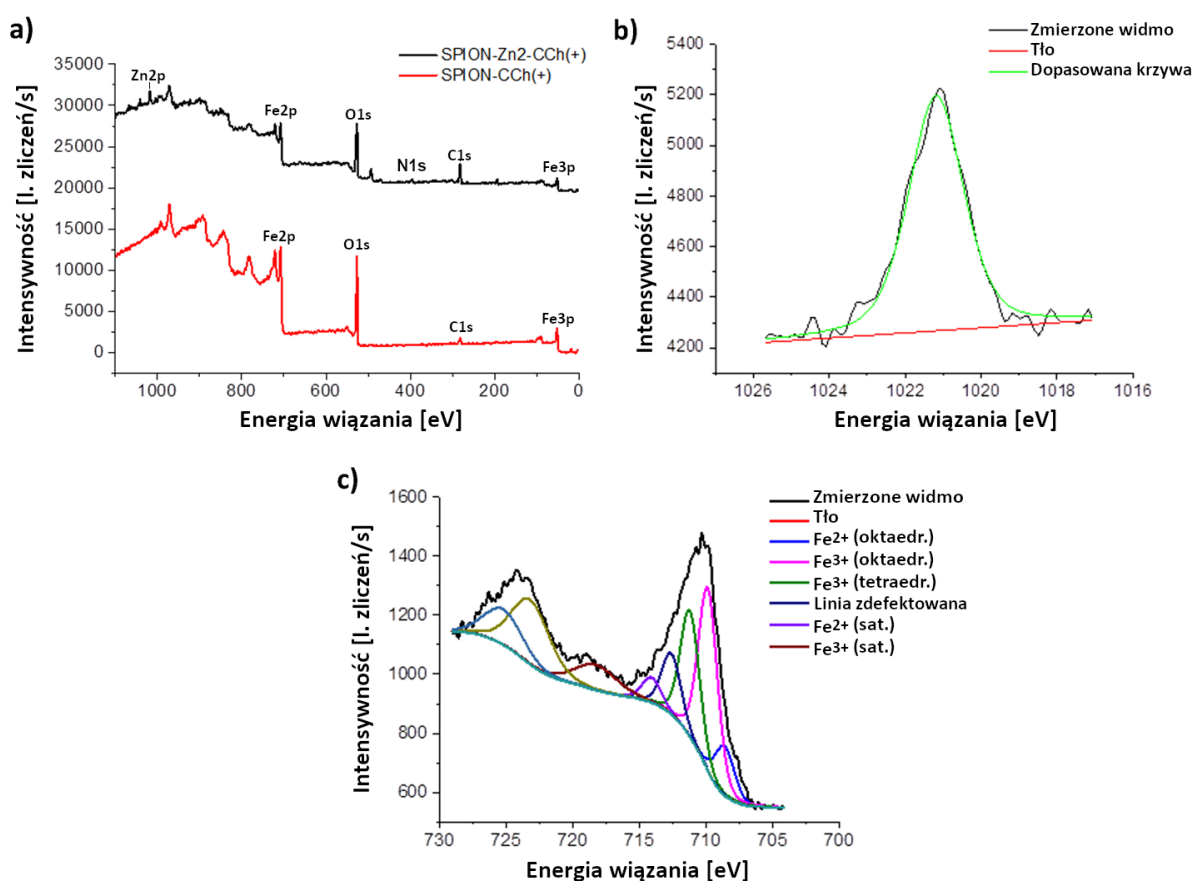
3.1.3. Wyniki oraz ich opracowanie

W wyniku syntezy metodą współstrącania odpowiednich soli (roztwory prekursorów soli zawierających Fe³⁺, Fe²⁺, Zn²⁺) w roztworze wodnym lub roztworze kationowej pochodnej chitozanu (CCh(+)), otrzymano nanoferryty o różnej zawartości cynku. Jak wcześniej wspomniano chitozan może tworzyć kompleksy z jonami żelaza, ale również cynk i inne jony (np. miedź) mogą być koordynowane przez grupy funkcyjne chitozanu, co można wykorzystać do tworzenia powłok na różnych nanoferrytach [197]. Daje to możliwości tworzenia innych domieszkowanych nanocząstek z zastosowaniem polimeru CCh(+), wykorzystanego w badaniach opisanych w dalszych podrozdziałach.

3.1.3.1. Analiza fizykochemiczna nanocząstek

W celu przeprowadzenia ilościowego oznaczenia zawartości żelaza w otrzymanych próbkach poddano je analizie za pomocą absorpcyjnej spektroskopii UV–Vis. Pomiar widm absorpcyjnych dla próbek przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.2.2. Otrzymane maksymalne wartości absorbancji dla określonych długości fali posłużyły do obliczenia stężenia badanych próbek w oparciu o sporządzoną krzywą kalibracyjną zaprezentowaną na Rys. 21. Uzyskane wartości stężeń dla poszczególnych badanych próbek zamieszczono wraz z innymi wielkościami w Tabeli 2.

Skład uzyskanych materiałów, mający na celu potwierdzenie obecności jonów cynku w strukturze SPION, określono za pomocą spektroskopii XPS. Na Rys. 25 przedstawiono wybrane widma uzyskane w wyniku pomiarów XPS dla wybranych próbek SPION-Zn₂-CCh(+) oraz SPION-CCh(+), na podstawie których określono ilościowy skład (Tabela 1, pierwiastki: C, N, O, Fe i Zn).



Rys. 25. Przykładowe zebrane widma XPS: **(a)** porównanie widm dla SPION-CCh(+) i SPION-Zn₂-CCh(+); **(b)** pasmo Zn2p₃ próbki SPION-Zn₂-CCh(+); **(c)** zdekonwulowane pasmo Fe2p próbki SPION-Zn₂-CCh(+).

Tabela 1. Procentowy atomowy skład pierwiastkowy nanocząstek uzyskany na podstawie wyników XPS.

Próbka	C1s	N1s	O1s	Fe2p	Zn2p	Zn/Fe
SPION	13,5	-	65,8	20,5	0,0	0,00
SPION-Zn	12,4	-	64,4	20,1	2,8	0,14
SPION-CCh(+)	42,5	4,4	40,6	12,5	0,0	0,00
SPION-Zn1-CCh(+)	31,5	2,1	51,3	13,8	1,3	0,10
SPION-Zn2-CCh(+)	36,5	3,5	48,4	9,6	2,0	0,21
SPION-Zn3-CCh(+)	53,7	4,5	35,1	5,5	1,3	0,23

Analiza widma Fe2p (Rys. 25c) wykazała obecność jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} w lukach oktaedrycznych, a jonów Fe^{3+} w lukach tetraedrycznych, co świadczy o otrzymaniu nanocząstek magnetytu. Tabela 2 przedstawia stosunki molowe jonów metali w mieszaninie reakcyjnej oraz teoretycznie i eksperymentalnie wyznaczone, w oparciu o wyniki XPS, wzory sumaryczne otrzymanych związków (przy założeniu $\text{Zn}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$), a także ich stężenia, odpowiadające zawartości żelaza.

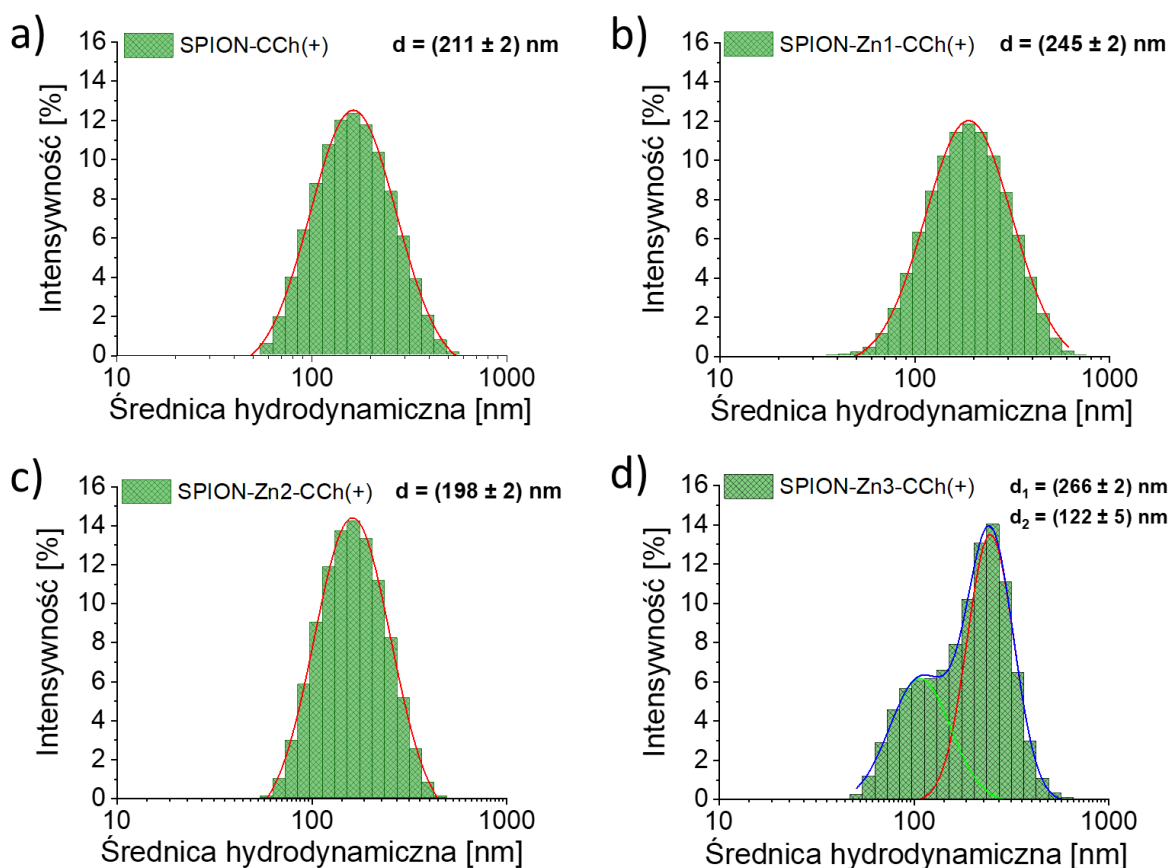
Tabela 2. Stosunek molowy jonów metali w mieszaninie reakcyjnej wraz z teoretycznymi i eksperymentalnymi wzorami sumarycznymi otrzymanych materiałów.

Próbka	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Zn^{2+}	Teoretyczny wzór sumaryczny	Eksperymentalny wzór sumaryczny
SPION	1	2	0	Fe_3O_4	Fe_3O_4
SPION-Zn	2	6	1	$\text{Zn}_{0,33}\text{Fe}_{2,67}\text{O}_4$	$\text{Zn}_{0,37}\text{Fe}_{2,63}\text{O}_4$
SPION-CCh(+)	1	2	0	Fe_3O_4	Fe_3O_4
SPION-Zn1-CCh(+)	2,5	6	0,5	$\text{Zn}_{0,16}\text{Fe}_{2,84}\text{O}_4$	$\text{Zn}_{0,26}\text{Fe}_{2,74}\text{O}_4$
SPION-Zn2-CCh(+)	2	6	1	$\text{Zn}_{0,33}\text{Fe}_{2,67}\text{O}_4$	$\text{Zn}_{0,52}\text{Fe}_{2,48}\text{O}_4$
SPION-Zn3-CCh(+)	0	2	1	ZnFe_2O_4	$\text{Zn}_{0,56}\text{Fe}_{2,44}\text{O}_4$

Na podstawie wyników zaprezentowanych w powyższej tabeli można zauważyć, że eksperymentalnie wyznaczone formuły są zgodne z teoretycznymi przewidywaniami wyłącznie dla próbek SPION, SPION-CCh(+) oraz ferrytu cynkowego bez pokrycia polimerowego (SPION-Zn). W przypadku zawiesin nanocząstek domieszkowanych jonami cynku i zsyntezowanych w obecności CCh(+) zaobserwowano, że zawartość cynku wbudowanego w strukturę tlenku żelaza jest większa niż oczekiwano. Może to być rezultatem tworzenia się kompleksów jonów Zn^{2+} z grupami funkcyjnymi łańcucha polimerowego

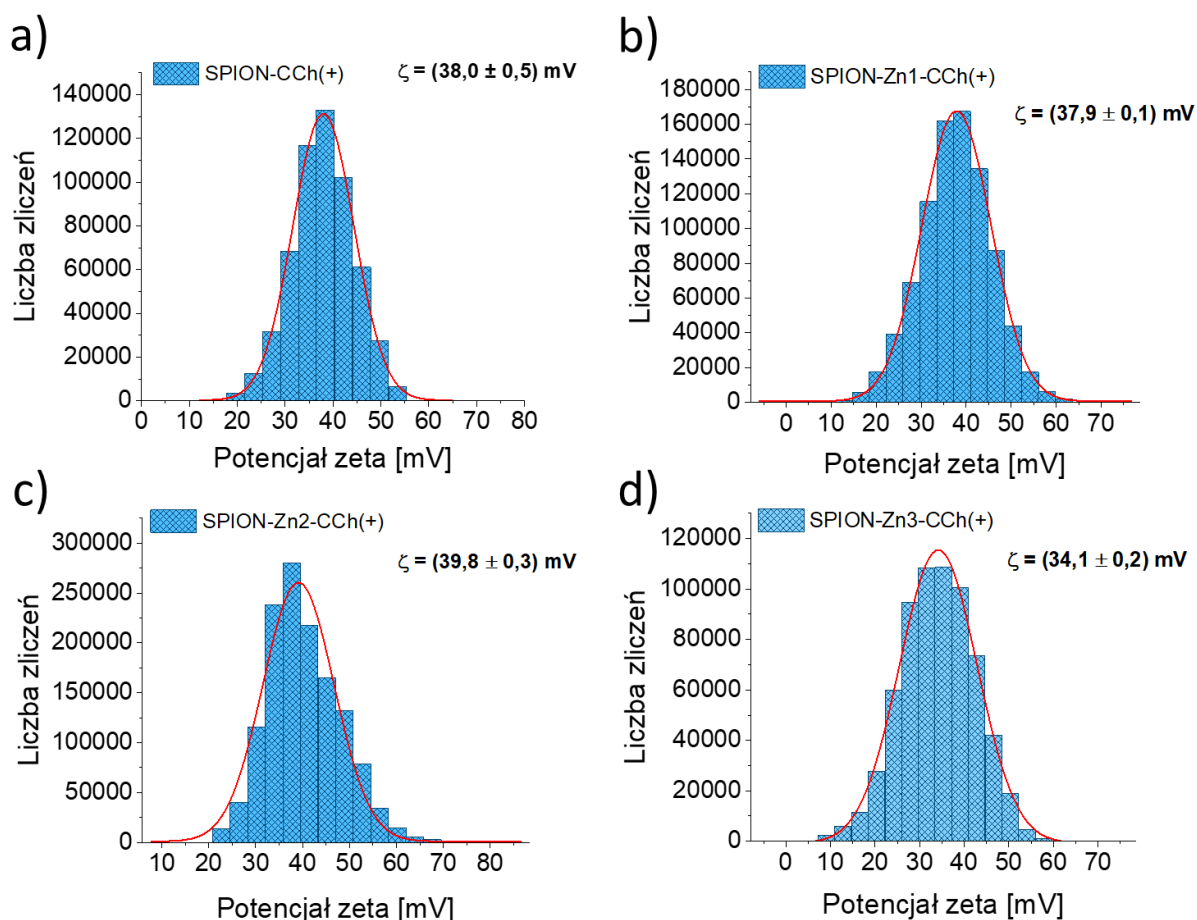
podczas powstawania nanocząstek, które powoduje zwiększone wbudowywanie się cynku w strukturę ferrytu. Wydaje się jednak, że istnieje limit ilości wbudowanych w strukturę SPION jonów cynku, który dla struktury $Zn_xFe_{3-x}O_4$ wynosi nieco powyżej $x = 0,5$. Znaczny wzrost zawartości jonów Zn^{2+} w mieszaninie reakcyjnej dla próbki SPION-Zn3-CCh(+) nie spowodował wyraźnego wzrostu zawartości cynku w strukturze utworzonych nanocząstek.

W celu zbadania wielkości uzyskanych nanocząstek w wodnej zawieszynie dla wszystkich otrzymanych próbek przeprowadzono pomiary DLS, których wyniki przedstawiono na Rys. 26. Wykazały one, że w wodnej dyspersji otrzymane nanocząstki występują w postaci niewielkich agregatów. Średnia średnica hydrodynamiczna dla próbki SPION-CCh(+), uzyskana na podstawie dopasowania krzywej Gaussa, wyniosła (212 ± 2) nm. W przypadku domieszkowanych nanocząstek o niższej zawartości cynku (SPION-Zn1-CCh(+)) i SPION-Zn2-CCh(+)) również zaobserwowano rozkłady rozmiarów o pojedynczym maksimum, a wyznaczone na ich podstawie średnice hydrodynamiczne wyniosły odpowiednio (245 ± 2) nm oraz (198 ± 2) nm. Pomiar próbki o wyższej zawartości cynku (SPION-Zn3-CCh(+)) wykazał bimodalny rozkład średnicy hydrodynamicznej (Rys. 26d) o maksimach dla wartości (266 ± 2) nm oraz (122 ± 5) nm. Taki rozkład sugeruje utworzenie się dwóch rodzajów nanocząstek o różnych średnicach hydrodynamicznych, co może być związane z różnym składem rdzenia lub powłoki. Za pomocą pomiaru DLS otrzymano również wartości współczynników dyspersyjności (PDI) dla poszczególnych próbek. Niskie wartości PDI, od 0,153 dla SPION-CCh(+), przez 0,191 dla SPION-Zn2-CCh(+), 0,195 dla SPION-Zn3-CCh(+) aż do 0,238 dla SPION-Zn1-CCh(+), świadczą o niskiej dyspersyjności otrzymanych zawieszin.



Rys. 26. Rozkłady wielkości nanocząstek niedomieszkowanych cynkiem (a) i ferrytów cynkowych (b–d) pokrytych polimerem, uzyskane metodą DLS (dopasowany rozkład logarytmiczno-normalny).

Dla wszystkich próbek pokrytych warstwą CCh(+) przeprowadzono również badania potencjału dzeta, mające na celu określenie stabilności uzyskanych zawiesin. Otrzymane histogramy, obrazujące rozkład wartości potencjału dzeta dla poszczególnych próbek, przedstawiono na Rys. 27. Dodatnia wartość potencjału dzeta dla wszystkich próbek świadczy o powodzeniu w modyfikacji powierzchni ujemnie naładowanych SPION za pomocą kationowej pochodnej chitozanu. Ponadto wszystkie zawiesiny otrzymane poprzez współstrącanie w obecności CCh(+) charakteryzują się wysoką stabilnością, co potwierdzają większe niż +30 mV wartości potencjału dzeta. Wszystkie otrzymane wartości średnicy hydrodynamicznej oraz potencjału dzeta, a także wartości współczynnika dyspersyjności (PDI) przedstawia Tabela 3.



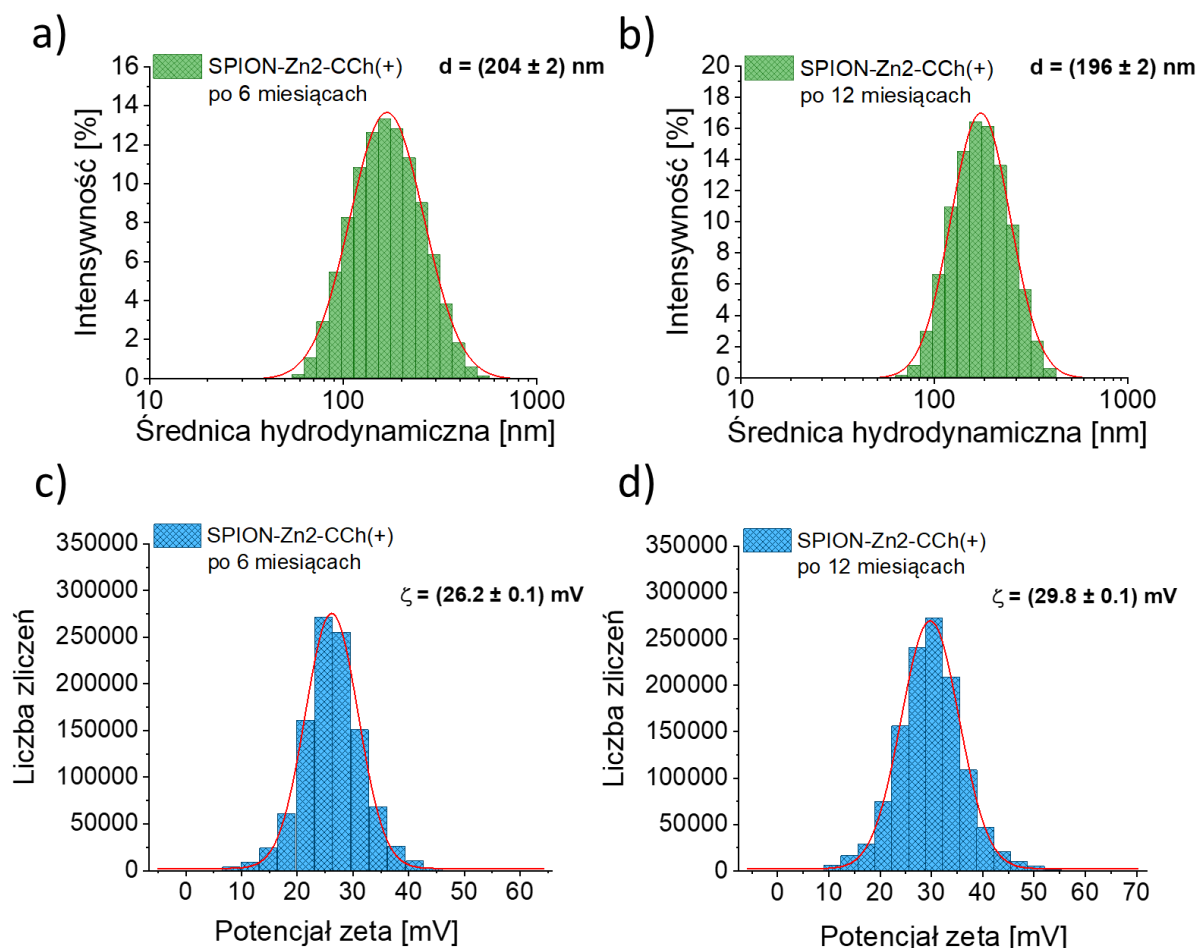
Rys. 27. Rozkłady wartości potencjału dzeta nanocząstek niedomieszkowanych cynkiem (**a**) i ferrytów cynkowych (**b–d**), pokrytych polimerem (dopasowany rozkład Gaussa).

Tabela 3. Średnie wartości potencjału dzeta, średnic hydrodynamicznych oraz współczynniki dyspersyjności (PDI) nanocząstek, określone za pomocą DLS. Przedstawione są średnie wartości maksymalne rozkładów z trzech pomiarów wraz z odpowiednim odchyleniem standardowym.

Próbka	Średnia średnica hydrodynamiczna [nm]	Dzeta potencjał [mV]	PDI
SPION-Zn	niestabilna zawiesina	niestabilna zawiesina	-
SPION	niestabilna zawiesina	niestabilna zawiesina	-
SPION-CCh(+)	212 ± 2	$+38,0 \pm 0,5$	0,153
SPION-Zn1-CCh(+)	245 ± 2	$+37,9 \pm 0,1$	0,238
SPION-Zn2-CCh(+)	198 ± 2	$+39,8 \pm 0,3$	0,191
SPION-Zn3-CCh(+)	$266 \pm 2, 122 \pm 5$	$+34,1 \pm 0,2$	0,195

Z powyższych rezultatów wynika, że najlepsze parametry wykazuje próbka SPION-Zn2-CCh(+). Ponadto charakteryzuje się ona największą zawartością cynku przy jednoczesnym użyciu podczas syntezy zarówno jonów Fe^{2+} jak i Fe^{3+} , zapewniających

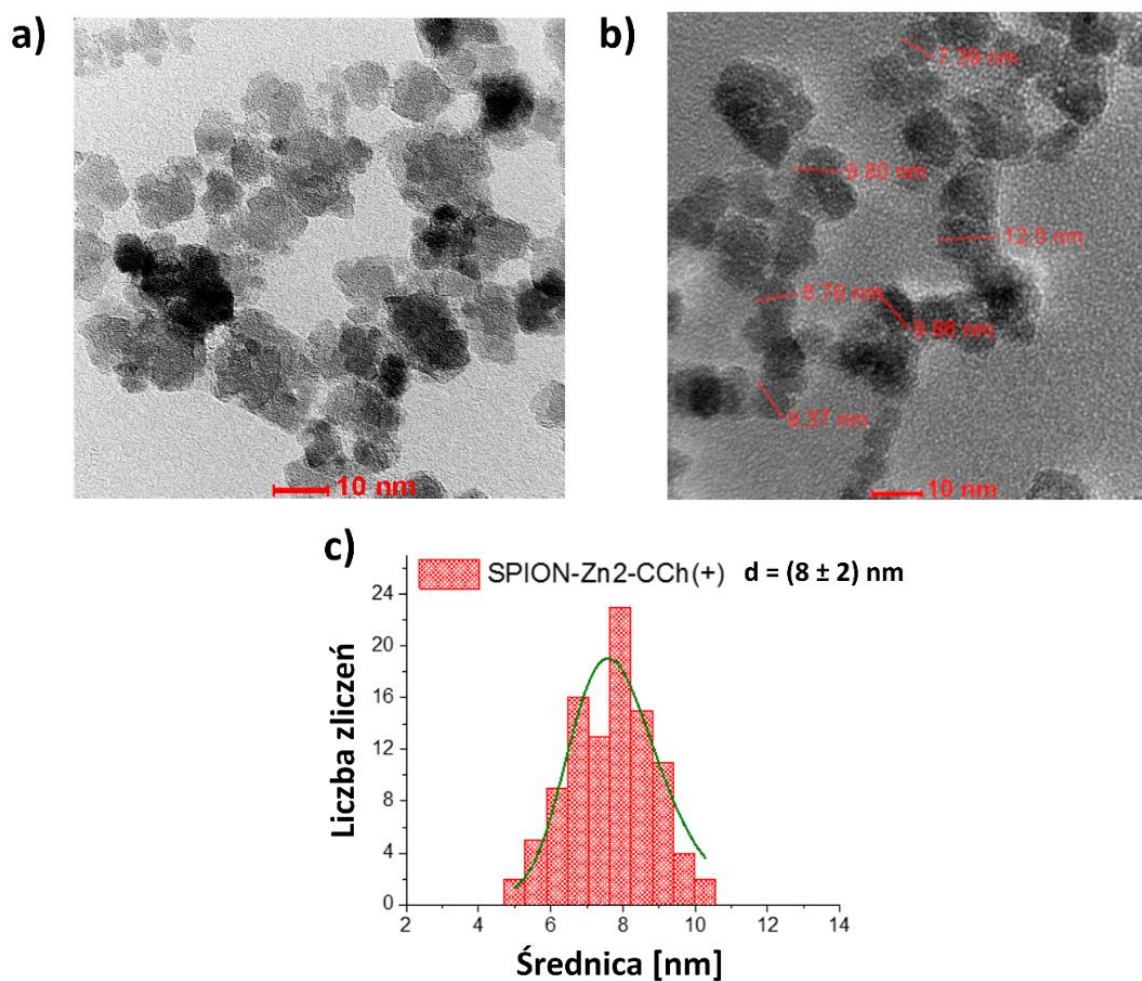
otrzymanie struktury magnetytu. Warto również zaznaczyć, że wodna dyspersja SPION-Zn₂-CCh(+) jest stabilna zarówno po 6 jak i po 12 miesiącach, co potwierdzają wyniki pomiarów wykonanych po tym czasie. Zaobserwowano jedynie nieznaczące zmiany średnicy hydrodynamicznej próbki (Rys. 28a i b) oraz niewielki spadek potencjału dzeta (Rys. 28c i d).



Rys. 28. Wyniki pomiarów DLS oraz potencjału dzeta dla próbki SPION-Zn₂-CCh(+) po 6 miesiącach (a i c) oraz 12 miesiącach (b i d) przechowywania w lodówce (dopasowane rozkłady logarytmiczno-normalny (a i b) oraz rozkład Gaussa (c i d)).

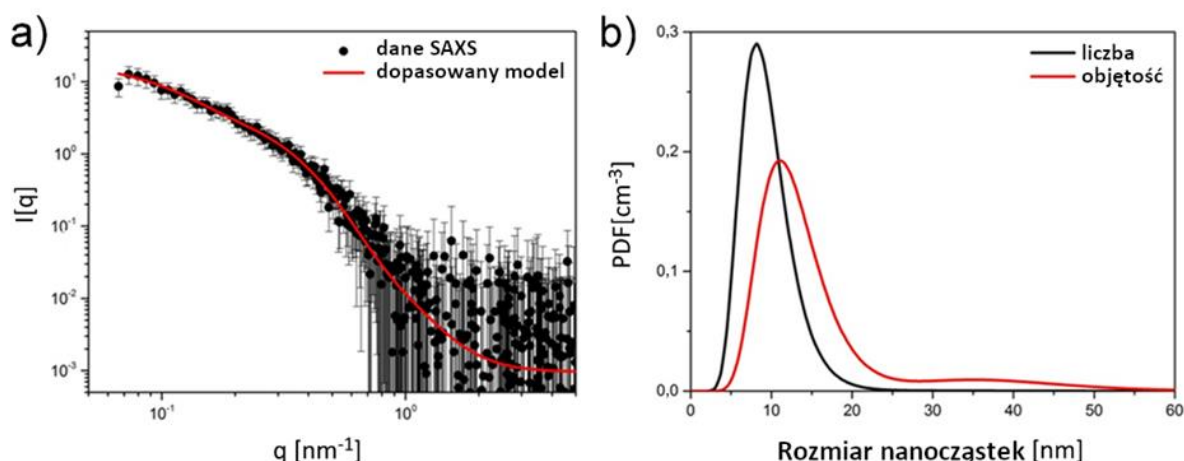
Dlatego to właśnie próbka SPION-Zn₂-CCh(+) została wybrana do kolejnych eksperymentów. W dalszej części pracy przedstawiono wyniki dla tej właśnie próbki oraz dla próbki referencyjnej, którą stanowi zawiesina SPION-CCh(+).

Rozmiar rdzeni nanocząstek w próbkach SPION-CCh(+) oraz SPION-Zn₂-CCh(+) zbadano także za pomocą mikroskopii HRTEM. Obrazy z mikroskopu transmisyjnego (Rys. 29a i b) pokazują nanocząstki w formie niewielkich agregatów. Na podstawie tych obrazów zmierzono 100 średnic nanocząstek i sporządzono histogramy (Rys. 29c), z których po dopasowaniu krzywej Gaussa oraz wyznaczeniu maksimum otrzymano średnie wartości średnicy rdzeni nanocząstek.



Rys. 29. Obrazy HRTEM dla SPION-Zn2-CCh(+) (a) oraz SPION-CCh(+) (b), a także przykładowy histogram rozkładu wielkości nanocząstek dla próbki SPION-Zn2-CCh(+) (c). Do histogramu dopasowano rozkład logarytmiczno-normalny.

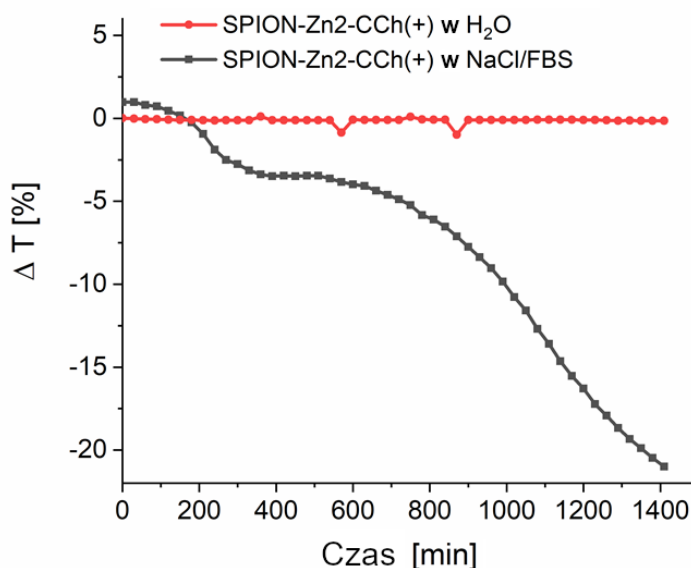
Rozmiar SPION-CCh(+) wynosi (12 ± 2) nm, natomiast rdzeni SPION-Zn2-CCh(+) wynosi (8 ± 2) nm, co wskazuje na niewielki wpływ domieszkowania cynkiem na rozmiar i morfologię nanocząstek. Niestety obrazy HR TEM nie pozwalają na zwizualizowanie cienkiej warstwy CCh(+) pokrywającej nanocząstki [166]. Wyniki otrzymane dla rdzeni nanocząstek za pomocą mikroskopii TEM potwierdzono również stosując rozpraszanie promieniowania X pod małym kątem (SAXS). W związku z przenikaniem promieniowania X przez materię miękką możemy otrzymać rozmiary rdzeni nanocząstek, podobnie jak w TEM (Rys. 22).



Rys. 30. Zależność natężenia promieniowania rozproszonego próbki SPION-Zn₂-CCh(+) od wektora rozproszenia wraz z dopasowanym modelem obejmującym dwie populacje kulistych cząstek (a) oraz zależność funkcji gęstości prawdopodobieństwa od rozmiaru nanocząstek, uzyskana na podstawie modelu i znormalizowana do całkowitej liczby cząstek (b).

Do otrzymanych wyników, przedstawionych na Rys. 30a, dopasowano krzywą rozproszenia typową dla cząstek sferycznych [198]. W próbce zaobserwowano dwie populacje cząstek: mniejsze o średnim rozmiarze (11 ± 3) nm oraz większe o średnim rozmiarze (36 ± 8) nm, jednak frakcja drobniejszych nanocząstek przeważa w próbce. Może to sugerować, że w próbce występują mniejsze pierwotne cząstki o średnicy ok. 11 nm, z których niektóre łączą się w większe struktury o wielkości 36 nm. Potwierdza to wnioski wysnute na podstawie obrazów TEM o występowaniu niewielkich agregatów nanocząstek w próbce SPION-Zn₂-CCh(+).

Ze względu na potencjalne biologiczne zastosowanie otrzymanych SPION-Zn₂-CCh(+) i możliwość ich zastosowania w badaniach *in vivo* przeprowadzono dodatkowo pomiary ich stabilności w płodowej surowicy bydłowej. Wykorzystano do tego analizator skanujący Turbiscan. Badania wykazały mniejszą niż w przypadku wodnej zawiesiny, jednak wystarczająco długotrwałą stabilność dyspersji SPION-Zn₂-CCh(+) w płodowej surowicy bydłowej. Pomimo dodatniego ładunku powierzchniowego nanocząstek ich zauważalna sedimentacja rozpoczęła się dopiero po ok. 10 h (Rys. 31). Jest to czas dłuższy niż typowy czas krążenia nanocząstek w krwiobiegu [199]. Ponadto we wcześniej opublikowanych artykułach dotyczących SPION pokrytych CCh(+) wykazano stabilność i biokompatybilność zawiesin, wymaganą do zastosowań *in vivo* [42].

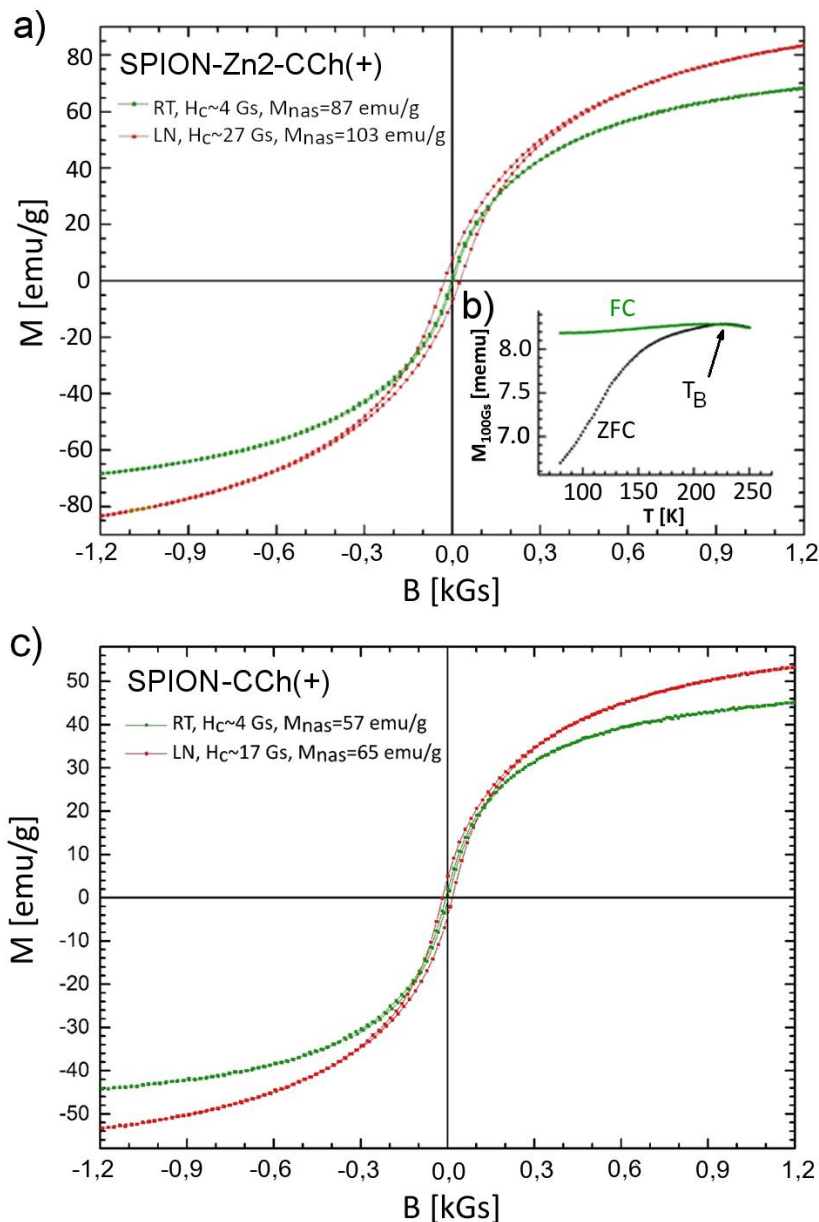


Rys. 31. Zależność zmiany intensywności transmisji w górnej i dolnej części próbki (ΔT) od czasu dla SPION-Zn₂-CCh(+) w wodzie oraz płodowej surowicy bydlęcej.

3.1.3.2. Potwierdzenie właściwości magnetycznych nanocząstek

Wyniki pomiarów VSM zaprezentowano na Rys. 32. Jak opisano w podrozdziale 3.1.2.3, ważnym kryterium wymaganym do uznania cząstek za superparamagnetyczne jest brak pętli histerezy w profilu VSM oraz natężenie koercyjne równe lub zbliżone do zera. Wyniki uzyskane zarówno dla próbki SPION-Zn₂-CCh(+) (Rys. 32a) jak i SPION-CCh(+) (Rys. 32c) w temperaturze ciekłego azotu wykazały obecność pętli histerezy, charakterystycznej dla substancji ferromagnetycznych. Jednak ogrzanie próbki spowodowało zanik pętli histerezy, co potwierdza superparamagnetyczne właściwości SPION-CCh(+) oraz SPION-Zn₂-CCh(+) w temperaturze pokojowej. Magnetyzacja nasycenia przy 80 K dla próbki SPION-Zn₂-CCh(+), mierzona na gram nanocząstek, wynosi 103 emu/g, a dla próbki SPION-CCh(+) wynosi 65 emu/g. W obu przypadkach magnetyzacja nasycenia nieznacznie maleje wraz ze wzrostem temperatury, osiągając odpowiednio 87 emu/g i 57 emu/g w temperaturze 290 K. Istnieją doniesienia literaturowe o różnicach w właściwościach SPION w zależności od metody syntezy [200,201], jednak magnetyzacja nanocząstek domieszkowanych jonami Zn²⁺ w pozycjach tetraedrycznych może osiągać wartość nawet 160 emu/g [202]. W niedomieszkowanych nanocząstkach magnetytu, magnetyzacja nasycenia odpowiada antyferromagnetycznemu sprzężeniu podsieci tetraedrycznej i oktaedrycznej. Ponieważ populacja oktaedrycznych luk wypełnionych jonami żelaza jest dwukrotnie wyższa, dominuje ona wypadkową magnetyzację. Domieszkowanie jonami Zn, które zastępuje jony żelaza w lukach tetraedrycznych, prowadzi do zwiększenia wypadkowej magnetyzacji. Stąd też wyższa wartość magnetyzacji nasycenia

dla SPION-Zn₂-CCh(+) w porównaniu do SPION-CCh(+) nie jest zaskakująca pod warunkiem, że jony cynku zajmują luki tetraedryczne w strukturze ferrytu (co zostanie zbadane w dalszej części pracy).



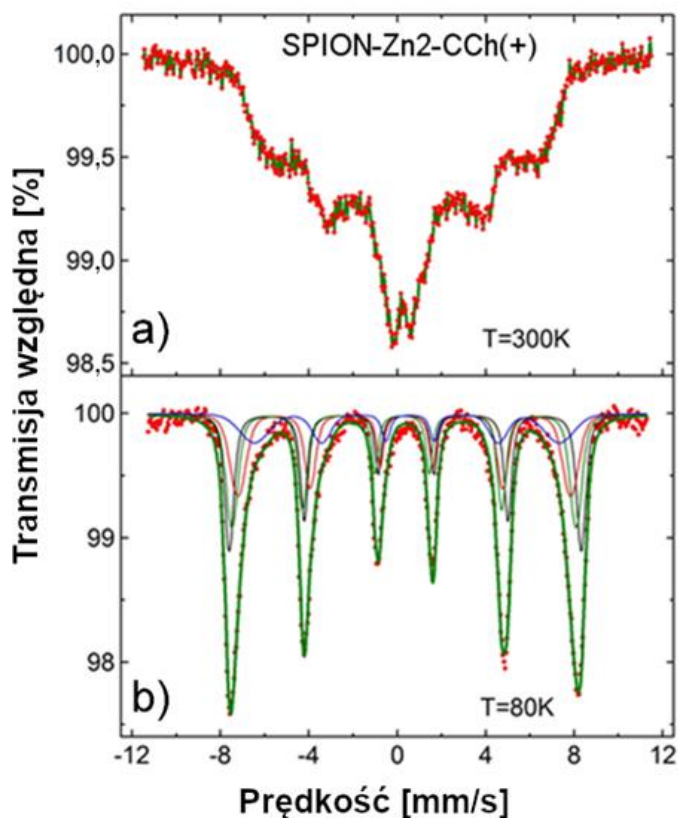
Rys. 32. Profile VSM obrazujące zależność magnetyzacji od indukcji pola magnetycznego dla wysuszonych próbek SPION-Zn₂-CCh(+) (a) oraz SPION-CCh(+) (c) w wybranych temperaturach (LN – temperatura ciekłego azotu (80 K), RT – temperatura pokojowa (290 K)). Rysunek b przedstawia temperaturową zależność magnetyzacji zmierzoną w reżimie ZFC-FC dla próbki SPION-Zn₂-CCh(+), w polu o wartości 100 Gs (T_B – temperatura blokowania).

Na Rys. 32b pokazano temperaturową zależność magnetyzacji zmierzoną w reżimie ZFC-FC, tj. po schłodzeniu próbki w zerowym polu magnetycznym (krzywa ZFC) oraz po schłodzeniu próbki w stałym niezerowym polu magnetycznym (krzywa FC). Można zauważyć, że profile

ZFC i FC w niskiej temperaturze różnią się od siebie, jednak powyżej temperatury 220 K zaczynają się pokrywać. Na Rys. 32b zaznaczono także temperaturę blokowania (T_B), czyli temperaturę, w której osiągane jest maksymalne namagnesowanie. T_B jest wrażliwa na rozkład wielkości cząstek i wskazuje przejście między stanem superparamagnetycznym ($T > T_B$) a stanem zabloковanym ($T < T_B$). Również ten pomiar potwierdza superparamagnetyczne właściwości SPION-Zn2-CCh(+) i ich odblokowanie w temperaturze pokojowej.

3.1.3.3. Określenie struktury nanocząstek

W celu określenia lokalnej struktury jonów Fe dla zsyntezowanych SPION-Zn2-CCh(+), wykonano pomiary efektu Mössbauera na jądrach izotopu ^{57}Fe w temperaturze pokojowej oraz w 80 K. Zmierzone widma zaprezentowano na Rys. 33.



Rys. 33. Widma mössbauerowskie ^{57}Fe zmierzone dla SPION-Zn2-CCh(+) w temperaturze 300 K (a) i w temperaturze 80 K (b).

Relaksacyjny kształt widma w temperaturze 300 K (Rys. 33a) jest efektem szybkich fluktuacji momentów magnetycznych nanocząstek i jest charakterystyczny dla małych nanocząstek ferrytowych. Widmo wykazuje znaczne poszerzenie struktury magnetycznej w zakresie od ok. -8 mm/s do 8 mm/s , z wyraźnym dubлетem kwadrupolowym w środku widma. Porównanie z widmami relaksacyjnymi szczegółowo zbadanymi przez Rebbouh et al. [203] pozwala

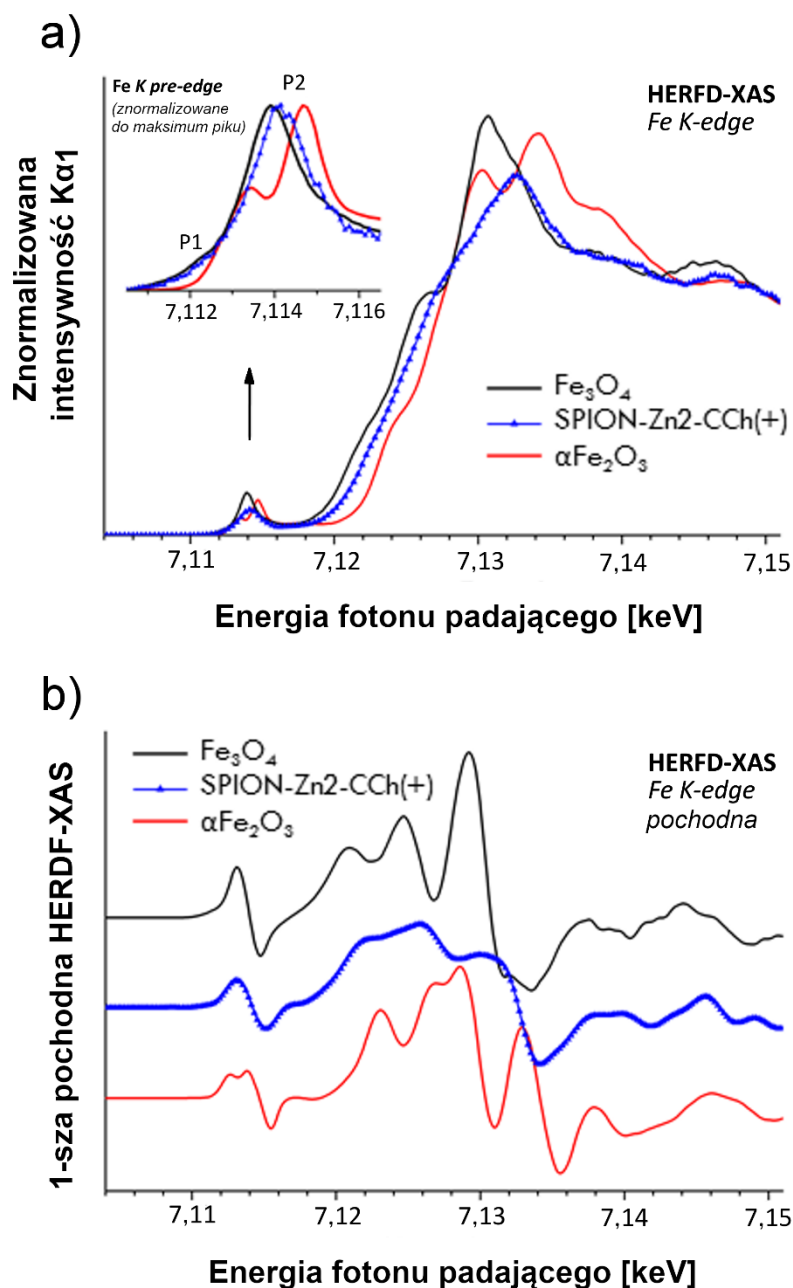
stwierdzić, że badany materiał składa się głównie z nanocząstek o rozmiarach nieznacznie przekraczających 10 nm. Obniżenie temperatury pomiaru do 80 K zmniejsza częstotliwość fluktuacji magnetycznych, znacznie wpływając na kształt widma (Rys. 33b) – obserwuje się wyraźne rozszczepienie magnetyczne. Analiza numeryczna pozwala wyodrębnić cztery składowe magnetyczne i określić parametry oddziaływań nadsubtelnych dla poszczególnych składowych widma. Parametry oddziaływań nadsubtelnych tych składowych przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Parametry oddziaływań nadsubtelnych ^{57}Fe dla SPION-Zn₂-CCh(+): udział składowej, przesunięcie izomeryczne (IS) względem źródła $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$ w 300K, nadsubtelne pole magnetyczne (H), oddziaływanie kwadrupolowe (QS).

	Lp.	Udział składowej [%]	IS [mm/s]	H [kGs]	QS [mm/s]
T = 80K	1	28,9	0,374	493,3	0,017
	2	26,5	0,362	466,2	-0,123
	3	29,0	0,256	482,1	-0,007
	4	15,6	0,504	427,6	-0,023
<IS> = 0,357 [mm/s], <H> = 472,6 [kGs]					

Poszczególne składowe widma przypisano jonom Fe w dwóch odrębnych pozycjach oktaedrycznych: w pozycji tetraedrycznej struktury ferrytu oraz składowej jonów Fe w nieuporządkowanej objętości lub innych rodzajach tlenkowych faz żelaza. Średnia wartość przesunięcia izomerycznego <IS> jest bliska 0,36 mm/s, co wskazuje, że badany materiał zawiera głównie jony żelaza Fe^{3+} . Jedna ze składowych wykazuje znacznie wyższą wartość IS (0,504 mm/s). Można ją przypisać obecności pewnej frakcji jonów Fe^{2+} , tak jak w przypadku ferrytów $\text{Zn}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ o zawartości jonów cynku $x < 1$. Średnia wartość nadsubtelnego pola magnetycznego <H>, równa 472,6 kGs, odpowiada wartościom dla ferrytu cynkowego o strukturze spinelu.

Inną metodą, zastosowaną w celu ustalenia struktury otrzymanej próbki SPION-Zn₂-CCh(+), była wysoko rozdzielcza spektroskopia absorpcji promieni X w pobliżu progu absorpcji (HERFD XANES). Na Rys. 34 przedstawiono widma otrzymane dla badanej próbki (linia niebieska) wraz z widmami referencyjnymi dla magnetytu (linia czarna) oraz maghemitu (linia czerwona), a także ich pierwsze pochodne.



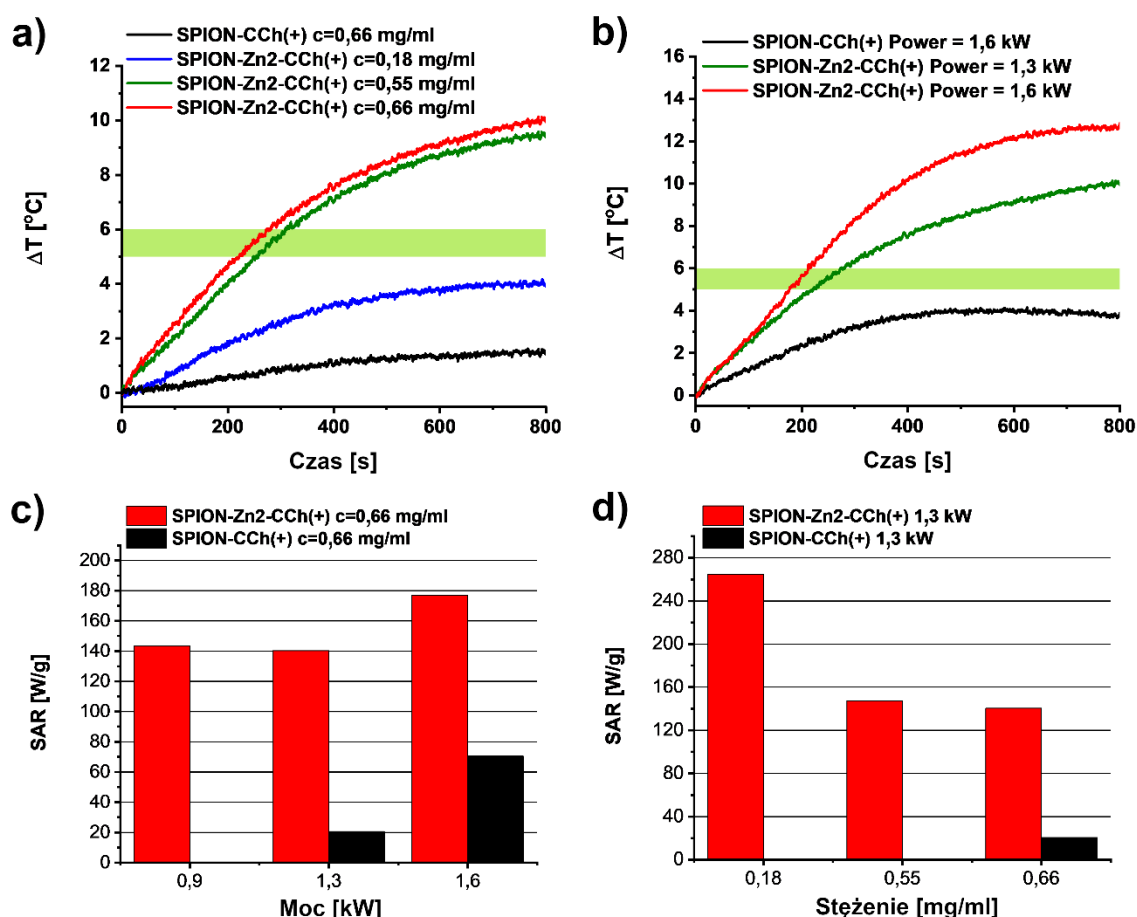
Rys. 34. Widma HERFD XANES na krawędzi K żelaza (a) i odpowiadające im widma pierwszej pochodnej (b) zebrane dla próbki SPION-Zn₂-CCh(+) oraz referencyjnych tlenków żelaza (Fe_3O_4 i $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$). Wykres wstawiony w panelu (a) przedstawia powiększony obszar przedkrawędziowy po normalizacji do maksimum pre-piku, co pozwala na jednoznaczne określenie przesunięcia energii pików P2.

Otrzymane widmo wykazuje cechy charakterystyczne sieci spinelowej odpowiadającej strukturze ferrytu cynkowego [204]. Zaobserwowano niewielkie różnice w położeniu głównej krawędzi absorpcji oraz nieznaczne przesunięcie pików przedkrawędziowych (wykres wstawiony w lewym górnym rogu Rys. 34a). Pierwszy efekt przypisuje się pewnej ilości luk oktaedrycznych zawierających jony Fe^{2+} [198], zaś drugi przypisuje się znacznej ilości

wakancji żelazowych, analogicznie do przesunięcia obserwowanego między stechiometrycznym magnetytem i maghemitem [205]. Pik przedkrawędziowy składający się z dominującego pojedynczego pik (P2) jest wyraźnym wskazaniem, że żelazo zajmuje zarówno luki tetraedryczne, jak i oktaedryczne w sieci spinelu. Jednak poszerzenie i spadek intensywności sygnału w odniesieniu do magnetytu sugerują mniejszą zawartość względną jonów żelaza w lukach tetraedrycznych [206]. Zgodnie z obliczeniami CTM (*ang. charge transfer multiplet*), amplituda przedkrawędziowych cech HERFD, pochodzących z luk tetraedrycznych jest ok. 4-krotnie większa niż z luk oktaedrycznych [207]. W związku z tym zaobserwowane zmniejszenie intensywności pik przedkrawędziowego P2 do ok. 60% wartości obserwowanej w widmie magnetytu wskazuje na to, że ok. 20% jonów żelaza w nanocząstkach znajduje się w lukach tetraedrycznych. Zakładając, że badane nanocząstki tworzą standardową sieć spinelu normalnego (jony cynku zajmują tylko luki tetraedryczne) i nie można wykluczyć wakancji kationowych, maksymalna zawartość cynku w próbce SPION-Zn₂-CCh(+) jest ograniczona do $x < 0,6$. Jest to zgodne z obserwacjami poczynionymi podczas syntezy próbek, kiedy okazało się, że nawet duży nadmiar jonów cynku w mieszaninie reakcyjnej nie spowodował wbudowania większej niż $x > 0,6$ zawartości cynku do spinelu (Tabela 2). Nieznaczne przesunięcie widma próbki SPION-Zn₂-CCh(+) na Rys. 34a względem widma magnetytu może świadczyć o tym, że otrzymana próbka stanowi połączenie struktur Fe₃O₄ oraz α -Fe₂O₃, z przewagą struktury spinelu. Świadczy o tym również widmo pierwszej pochodnej (Rys. 34b), które w przypadku SPION-Zn₂-CCh(+) pokazuje przede wszystkim charakterystyczne cechy widmowe obserwowane dla magnetytu, jednak jest wyraźnie przesunięte w kierunku wyższych energii, charakterystycznych dla tlenków żelaza Fe(III).

3.1.3.4. Eksperymenty hipertermii magnetycznej

Po scharakteryzowaniu fizykochemicznym, strukturalnym i magnetycznym otrzymanych próbek przystąpiono do badań mających na celu ocenienie zdolności grzewczej SPION-Zn₂-CCh(+). Właściwość tę badano w odniesieniu do SPION-CCh(+) chcąc ocenić, czy domieszkowanie jonami cynku wpływa na możliwości grzewcze nanocząstek. Dokonano pomiarów zmian temperatury (ΔT) w czasie dla obu zawiesin nanocząstek przy tych samych stężeniach (odpowiednio: 0,18, 0,55 i 0,66 mg Fe/ml), wywołanych ekspozycją na oscylujące pole magnetyczne ($H = 33,3$ kA/m, częstotliwość równa 360 kHz). Zbadano również zależność temperatury od czasu przy stałym wybranym stężeniu, zmieniając moc generatora pola magnetycznego. Uzyskane zależności przedstawiono na Rys. 35a oraz b.

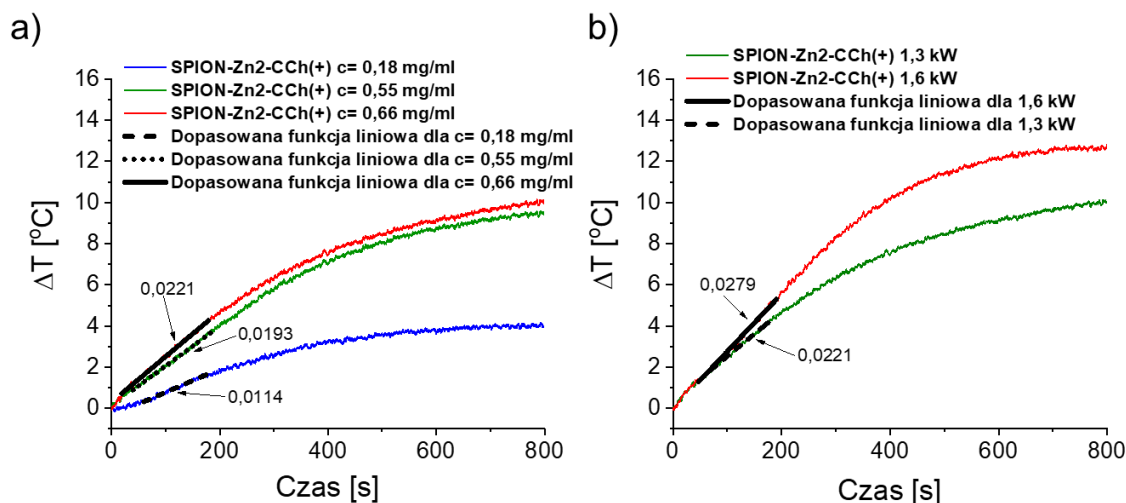


Rys. 35. Wyniki badań MH dla zawiesin SPION-CCh(+) i SPION-Zn2-CCh(+): **(a)** profile wzrostu temperatury (ΔT) w funkcji czasu przy stałej mocy (1,3 kW; $H = 33,3$ kA/m) dla wybranych stężeń (0,18, 0,55 i 0,66 mg/ml); **(b)** krzywe wzrostu temperatury przy ustalonym stężeniu (0,66 mg/ml) dla wybranych wartości mocy generatora (1,3 kW, $H = 33,3$ kA/m oraz 1,6 kW, $H = 35,7$ kA/m); **(c)** wartości SAR wyznaczone przy różnej mocy generatora; **(d)** wartości SAR wyznaczone przy różnych stężeniach zawiesin (moc stała – 1,3 kW). Zielonym paskiem zaznaczono minimalny pożądany wzrost temperatury umożliwiający osiągnięcie temperatury hipertermii przy początkowej temperaturze fizjologicznej (odpowiadający temperaturze optymalnej hipertermii równej 41–46 °C).

Wzrost temperatury dla domieszkowanych cynkiem SPION-Zn2-CCh(+), przy każdym z trzech stężeń, był znacznie silniejszy niż wzrost temperatury dla SPION-CCh(+) o najwyższym stężeniu. Warty odnotowania jest to, że minimalny pożądany wzrost temperatury (5–6 °C), który umożliwia osiągnięcie temperatury hipertermii przy początkowej temperaturze fizjologicznej, został osiągnięty już przy stosunkowo niskim stężeniu ferrytu cynkowego, równym 0,55 mg Fe/ml. Nedomieszkowane SPION-CCh(+), nawet przy najwyższym stężeniu i najwyższej zastosowanej mocy generatora pola magnetycznego, nie osiągnęły wymaganej zdolności grzewczej (Rys. 35b). Wszystkie badane układy wykazały

dobrą stabilność koloidalną podczas prowadzenia pomiarów MH. Nie zaobserwowano sedimentacji nanocząstek zarówno w trakcie jak i po zakończeniu ogrzewania magnetycznego.

W celu dokładniejszej, ilościowej analizy zdolności grzewczych nanocząstek domieszkowanych cynkiem i bez dodatkowych jonów w strukturze, dla obu zawiesin wyznaczono współczynniki SAR. Określono je na podstawie dopasowania funkcji liniowej do początkowego prostoliniowego fragmentu wykresu zależności temperatury od czasu dla danej próbki (Rys. 36) i obliczono zgodnie z równaniem (4) (rozdział 2.1.3).



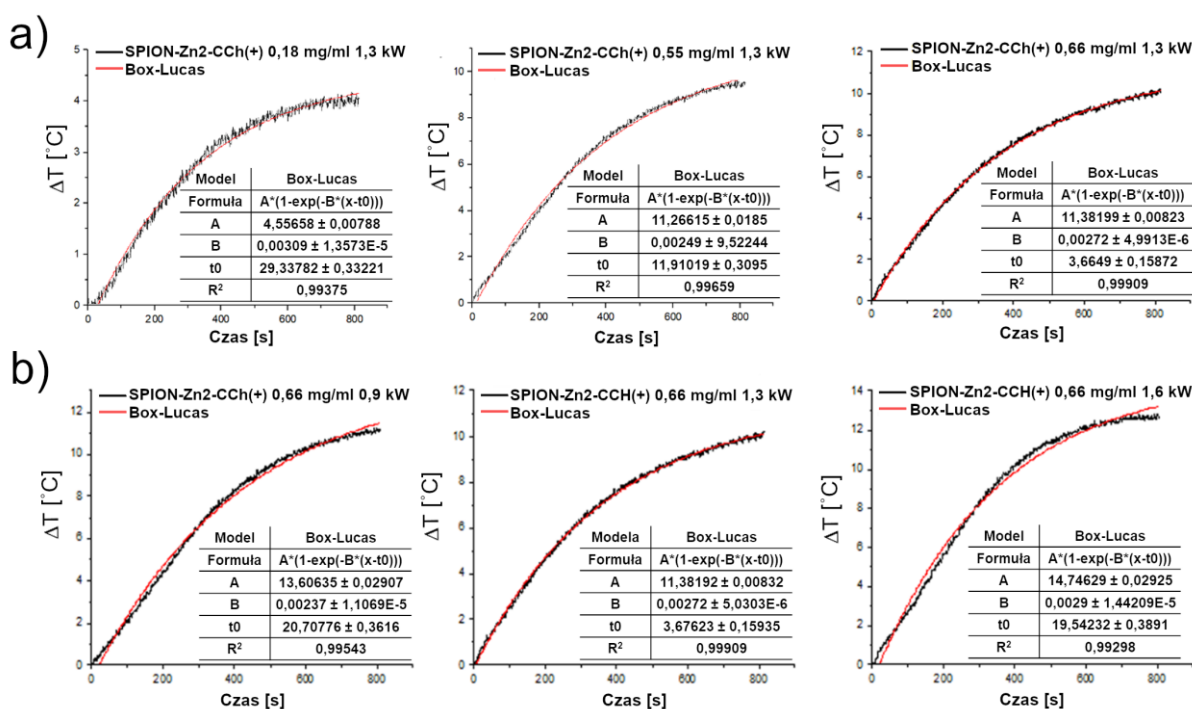
Rys. 36. Przykładowe wykresy obrazujące metodę wyznaczania współczynnika SAR poprzez dopasowanie funkcji liniowych (kolor czarny) do profili temperaturowych dla SPION-Zn2-CCh(+) dla różnych stężeń próbki (a) oraz różnych mocy generatora (b). Na wykresach naniesiono współczynniki nachylenia dla poszczególnych dopasowanych funkcji.

Wartości SAR dla SPION-Zn2-CCh(+), odpowiadające efektywności pochłaniania energii elektromagnetycznej na jednostkę masy biologicznej, sięgają od ok. 264 do 140 W/g Fe, przy stężeniach zawiesiny w zakresie od 0,18 do 0,66 mg Fe/ml (Rys. 35d). Zaobserwowane wysokie wartości SAR zostały osiągnięte prawdopodobnie dzięki połączeniu bardzo dobrej stabilności koloidalnej, wąskiego rozkładu wielkości nanocząstek oraz ich silnych właściwości magnetycznych [208,209]. Wartości SAR generalnie rosną wraz ze wzrostem mocy generatora (Rys. 35c), co wynika z tego, że wytwarzanie ciepła jest proporcjonalne do zastosowanego pola magnetycznego. Otrzymane dla próbki SPION-Zn2-CCh(+) wartości SAR są porównywalne z wartościami podawanymi w literaturze przez inne grupy badawcze zajmujące się MH [68,210]. Interesujące jednak jest porównanie wyników dla nanocząstek domieszkowanych i bez wprowadzonych jonów cynku, aby ocenić wpływ domieszkowania na zdolność ogrzewania się nanocząstek. Zostanie to szerzej omówione w dalszej części tego podrozdziału.

Krzywe wzrostu temperatury można również zanalizować poprzez dopasowanie modelu Boxa-Lucasa [54], opisanego równaniem (6), który również pozwala wyznaczyć wartość SAR:

$$T(t) = A(1 - e^{-B(t-t_0)}) \quad (6)$$

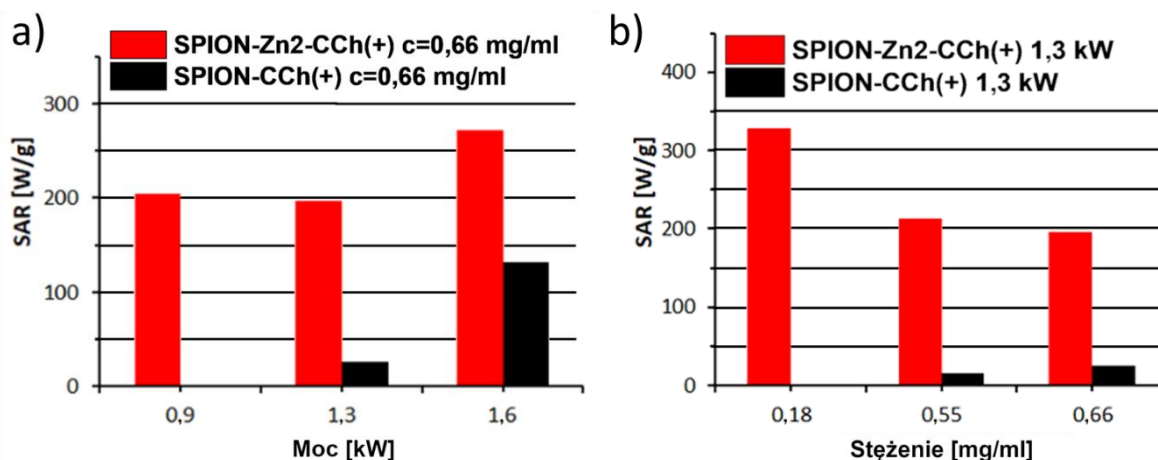
gdzie: T – temperatura, t – czas ekspozycji na pole magnetyczne, A i B to stałe dopasowania, a t_0 to parametr korygujący dla niezerowej temperatury początkowej. Iloczyn stałych A i B w czasie $t = 0$ reprezentuje początkową szybkość wzrostu ciepła i jest równoważny członowi $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ w czasie $t = 0$ (równanie (4) w rozdziale 2.1.3). Przykładowe wykresy, obrazujące metodę wyznaczenia współczynników SAR za pomocą modelu Boxa-Lucasa przedstawiono na Rys. 37.



Rys. 37. Przykładowe wykresy obrazujące metodę wyznaczania współczynnika SAR poprzez dopasowanie modelu Boxa-Lucasa (kolor czerwony) do profili temperaturowych dla SPION-Zn2-CCh(+) dla różnych stężeń próbki (a) oraz różnych mocy generatora (b). Na wykresach naniesiono otrzymane współczynniki nachylenia dla poszczególnych dopasowanych funkcji.

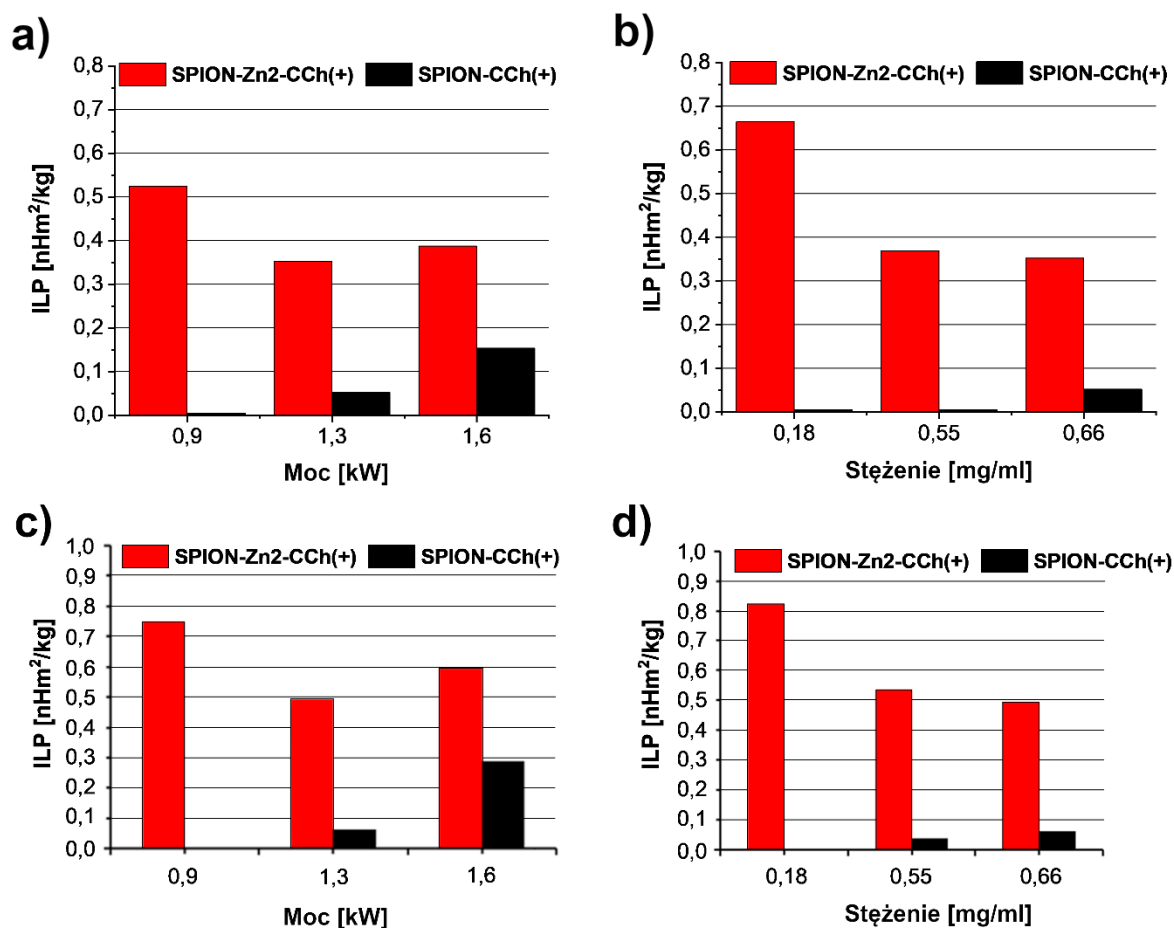
Wartości SAR otrzymane na podstawie tego modelu dla SPION-Zn2-CCh(+) oraz SPION-CCh(+) okazały się nieco wyższe (ok. 20–30%) niż wyniki otrzymane z nachylenia funkcji liniowej dopasowanej do prostoliniowego fragmentu wykresu zmiany temperatury od czasu. Niemniej jednak trend pozostał zachowany dla obu metod, co można zaobserwować porównując wykresy na Rys. 35c i d oraz Rys. 38. Zaobserwowane różnice są związane

z faktem, że model Boxa-Lucasa uwzględnia profil temperaturowy w szerszym zakresie czasowym, nie pomijając efektu wyższego wzrostu temperatury.



Rys. 38. Współczynniki SAR wyznaczone na podstawie dopasowania modelu Boxa-Lucasa przy różnej mocy generatora (a) oraz przy różnych stężeniach zawiesin (b).

Jak wcześniej wspomniano, ograniczeniem prezentowania wartości SAR jest ich zależność od zastosowanego pola magnetycznego i jego częstotliwości, co utrudnia porównanie otrzymanych wyników z wartościami otrzymanymi przez inne grupy badawcze [60]. Dlatego też na podstawie równania (5) przedstawionego w rozdziale 2.1.3, wyznaczono parametr ILP, uwzględniający natężenie i częstotliwość pola magnetycznego. Rys. 39 przedstawia zależności współczynnika ILP od stężenia nanocząstek oraz przyłożonej mocy generatora (w odniesieniu do natężenia pola magnetycznego), wyznaczone z nachylenia prostej dopasowanej do prostoliniowego fragmentu profilu temperaturowego oraz z modelu Boxa-Lucasa. Porównanie współczynników ILP jest bardziej przekonujące niż wartości SAR, jednak wnioski jakościowe pozostają niezmienione.



Rys. 39. Wartości współczynnika ILP dla SPION-Zn₂-CCh(+) i SPION-CCh(+). W górnej części rysunku umieszczono wykresy ILP wyznaczonych z nachylenia prostej dopasowanej do prostoliniowego fragmentu profilu temperaturowego: (a) przy różnej mocy generatora (stałe stężenie—0,66 mg Fe/ml) i (b) różnym stężeniu próbki (stała moc—1,3 kW), natomiast w dolnej części rysunku znajdują się wykresy ILP wyznaczonych z modelu Boxa-Lucasa: (c) przy różnej mocy generatora i (d) różnym stężeniu próbki.

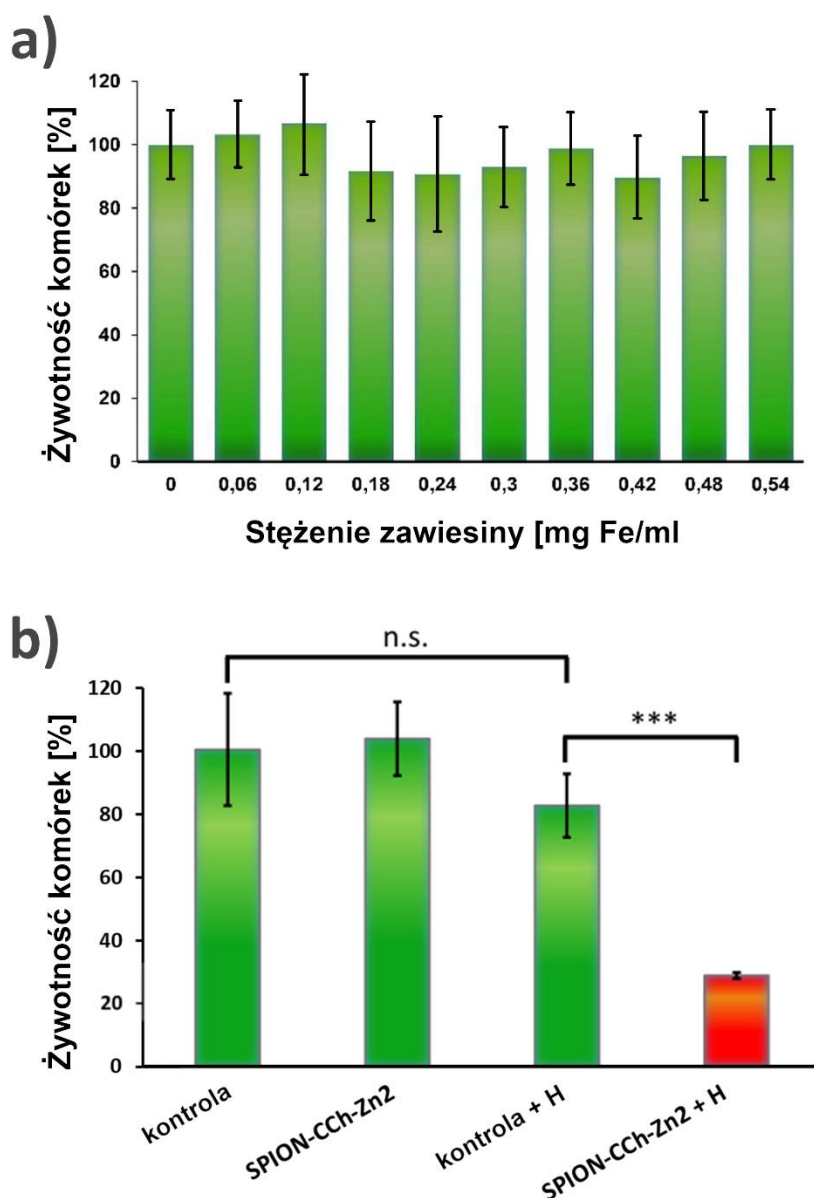
Dla wyższych stężeń nanocząstek ($c \geq 0,55$ mg Fe/ml) wartości ILP są w przypadku SPION-Zn₂-CCh(+) zazwyczaj kilkukrotnie większe niż dla SPION-CCh(+), podczas gdy dla najniższych badanych stężeń nanocząstek niedomieszkowanych współczynnik ILP, a zarazem nagrzewanie magnetyczne, jest bliskie zeru. Można na tej podstawie wnioskować, że wbudowanie jonów cynku do struktury nanocząstek tlenku żelaza prowadzi do znacznego polepszenia emisji ciepła, wywołanej zmiennym polem magnetycznym. Wartości ILP sięgające ok. 0,4 nHm²/kg (ok. 0,5 nHm²/kg biorąc pod uwagę wynik uzyskany z modelu Boxa-Lucasa) dla stosunkowo niskich stężeń nanoferrytów cynkowych (0,55 mg Fe/ml), które umożliwiły osiągnięcie wymaganego wzrostu temperatury, są bardzo obiecujące z perspektywy potencjalnego zastosowania w terapii MH. Najwyraźniejszą zmianę zaobserwowano przy zwiększaniu stężenia od wartości 0,18 do 0,55 mg Fe/ml, jednak dalszy wzrost stężenia

praktycznie nie wpłynął na wartość współczynnika ILP. Można to wytłumaczyć zwiększoną agregacją nanocząstek przy początkowym zwiększaniu ich stężenia, co wpływa na ich właściwości hipertermiczne.

Zjawisko to nie jest jednak niepokojące dzięki obecności dodatnio naładowanej polimerowej powłoki, która zapobiega wystąpieniu silnej agregacji przy wyższych stężeniach nanocząstek. Dodatkowo synteza nanocząstek w otocze polimerowej może prowadzić do powstania nanostruktur podobnych do łańcuchów o jednoosiowej anizotropii (z jednym łatwym kierunkiem namagnesowania) bez udziału pola magnetycznego [211]. Tworzenie się takich nanostruktur podczas pomiarów hipertermii (pod wpływem pola magnetycznego) zostało wcześniej wykazane w literaturze [210]. Taka organizacja nanocząstek i efekt jednoosiowej anizotropii, wywołany magnetycznymi oddziaływaniami dipolowymi, może prowadzić do zwiększenia wydajności ogrzewania nanocząstek magnetycznych, co zostało pokazane przez kilka grup badawczych zarówno teoretycznie [212,213] jak i eksperymentalnie [212–215]. Fakt, że pokrycie polimerowe nanocząstek także wpływa na zdolności grzewcze otrzymanych zawiesin, wynika również ze specyfiki mechanizmów relaksacji Néela i Browna (rozdział 2.1.3). W modelu relaksacji Browna występuje składowa tarcia obrotowego w danym rozpuszczalniku, która powoduje wytwarzanie ciepła. Dzięki temu, takie parametry otoczenia nanocząstek jak lepkość, ciepło właściwe czy przewodność cieplna, które można regulować poprzez funkcjonalizację powierzchni nanocząstek, również mogą znacząco wpływać na efektywny wzrost temperatury [58,59].

3.1.3.5. Badania biologiczne *in vitro* na liniach komórkowych

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowania medyczne otrzymanego nanoferrytu cynkowego, istotne było zbadanie jego cytotoksyczności. W tym celu przeprowadzono testy żywotności (MTT) mysich komórek nerwiaka zarodkowego (*neuroblastoma*), inkubowanych w zawiesinie SPION-Zn²⁺-CCh(+). Wyniki otrzymane w wyniku tych pomiarów zaprezentowano na Rys. 40a.



Rys. 40. Wyniki żywotności komórek (test MTT): **(a)** dla komórek neuroblastoma inkubowanych z zawiesiną SPION-Zn2-CCh(+) o różnych stężeniach; **(b)** dla komórek neuroblastoma inkubowanych wraz z SPION-Zn2-CCh(+) o stężeniu równym 0,18 mg Fe/ml lub bez ich obecności, które następnie poddano działaniu zmiennego pola magnetycznego (H). Słupki niepewności pomiarowych przedstawiają odchylenia standardowe średnich wartości; $n = 4$ **(a)** i $n = 3$ **(b)**. Dla wszystkich próbek na rysunku **(a)** zaobserwowano statystycznie nieistotne odchylenia od grupy kontrolnej. ***— $p < 0,001$; n.s.—nieistotne statystycznie. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu *t*-Studenta.

Testy MTT wykazały, że przy stężeniu żelaza do 0,54 mg Fe/ml, otrzymana zawiesina SPION-Zn2-CCh(+) nie działa toksycznie na badane komórki (zaobserwowano jedynie nieistotne statystycznie odchylenia od grupy kontrolnej, widoczne na Rys. 40a). Ponadto, przeprowadzone eksperymenty MH wykazały, że komórki nowotworowe neuroblastoma są

skutecznie zabijane (Rys. 40b) po inkubacji w SPION-Zn₂-CCh(+), nawet przy najmniejszym badanym stężeniu, równym 0,18 mg Fe/ml. Testy MTT wykazały ponad 70% spadek żywotności komórek po ich wystawieniu na działanie zmiennego pola magnetycznego. Eksperyment kontrolny dla komórek inkubowanych bez zawiesiny SPION-Zn₂-CCh(+) nie spowodował statystycznie istotnego zmniejszenia przeżywalności komórek. Otrzymane wyniki sugerują również wystarczającą absorpcję nanocząstek przez badane komórki, która jest wymagana, aby MH była skuteczna w rzeczywistych układach biologicznych. Kolejnym istotnym aspektem było przeanalizowanie rodzaju śmierci komórkowej, wywoływanej przez MH. Pierwszym z dwóch głównych typów śmierci komórkowej jest apoptoza, w której komórka ginie w sposób zaplanowany, nienaruszający homeostazy całego organizmu, bez wywoływania reakcji ze strony układu immunologicznego, z formowaniem ciałek apoptotycznych i fragmentacją materiału genetycznego. Drugim rodzajem jest nekroza, która charakteryzuje się gwałtowną śmiercią, przebiegającą z przerwaniem błony komórkowej i wypływem cytoplazmy do otoczenia, wywołaną patologiczną przyczyną i zwykle związaną z występowaniem stanu zapalnego w organizmie. Sanz et al. w swojej pracy opisali wyniki obserwacji komórek poddanych MH w optymalnej temperaturze 41–46°C, uzyskane za pomocą mikroskopii TEM oraz FIB-SEM, które wykazały cechy morfologiczne typowe dla śmierci komórki przez apoptozę [55]. Nie bez znaczenia dla rodzaju śmierci komórkowej jest również wysokość osiąganego przez nanocząstki temperatury – zbyt wysoka może powodować nekrozę.

3.1.4. Wnioski

W niniejszej części badań zsyntezowano i scharakteryzowano pod względem strukturalnym, magnetycznym i biologicznym otrzymane układy hybrydowe oparte na superparamagnetycznych nanoferrytach cynkowych pokrytych kationową pochodną chitozanu. Wykazano, że obecność polimeru podczas formowania się nanocząstek (o rozmiarze rdzenia ok. 10 nm, wyznaczonego na podstawie pomiarów TEM oraz SAXS) w metodzie współstrącania, doprowadziła do bardzo efektywnego wbudowania się cynku w strukturę tlenku żelaza. Ponadto chitozanowa powłoka zapewniła stabilizację otrzymanej wodnej zawiesiny SPION-Zn₂-CCh(+) oraz występowanie niewielkich agregatów o średnich średnicach hydrodynamicznych równych ok. 200 nm (na podstawie pomiarów DLS). Co ważne z perspektywy możliwych zastosowań biomedycznych stwierdzono, że otrzymana dyspersja jest bardzo stabilna w czasie, gdyż średnica hydrodynamiczna oraz wartość potencjału dzeta uległy niewielkiej zmianie nawet po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C. Zaproponowana metoda otrzymywania hybrydowych nanoferrytów otwiera również nowe

możliwości łatwego tworzenia ferrytów innych metali, o strukturze i składzie wcześniej trudno osiągalnych i potencjalnie lepszych właściwościach (np. magnetycznych).

Otrzymane hybrydowe nanocząstki, o stosunkowo dużej zawartości cynku, zostały następnie zastosowane jako czynniki grzewcze w eksperymentach MH. W eksperymentach wykazano, że otrzymana zawiesina nanoferrytu cynku w otoczce polimerowej, już przy stosunkowo niskim stężeniu (ok. 0,5 mg Fe/ml), bardzo efektywnie ogrzewa się do temperatur wymaganych w terapii MH. Wydajność ogrzewania, mierzona za pomocą współczynnika ILP była zazwyczaj kilkakrotnie większa (w zależności od stężenia próbki oraz zastosowanego pola magnetycznego) niż w przypadku analogicznych nanocząstek tlenku żelaza o podobnych rozmiarach. Można zatem wnioskować, że domieszkowanie cynkiem pozwala zwiększyć zdolność grzewczą nanocząstek, co z kolei umożliwia stosowanie zawiesin o mniejszych stężeniach, a tym samym zwiększa bezpieczeństwo i komfort pacjenta poddawanego terapii MH. W przeprowadzonych testach *in vitro* na liniach komórkowych wykazano, że otrzymane hybrydowe nanocząstki wywołują skutecznie śmierć komórek nowotworowych nawet przy najmniejszym badanym stężeniu (0,18 mg Fe/ml), co jest bardzo obiecujące z perspektywy ich biomedycznych zastosowań.

Istotnym jest fakt, że otrzymane nanoferryty cynkowe, ze względu na obecność pierwiastka endogennego (Zn) oraz biokompatybilną powłokę chitozanową, nie wykazywały cytotoksyczności wobec komórek w badanym zakresie stężeń. Jest to ważny warunek ich potencjalnego zastosowania w terapii metodą MH. Ponadto stosunkowo duże namagnesowanie otrzymanych nanocząstek wraz z podwyższoną efektywnością generowania ciepła przez otrzymane nanocząstki w otoczce polimerowej sprawiają, że zsyntezowane nanoferryty cynkowe są bardzo obiecującymi kandydatami do terapii metodą MH, umożliwiając zastosowanie znacznie mniejszych stężeń substancji grzewczej niż w aktualnie stosowanych związkach komercyjnych.

3.2. Układy hybrydowe łączące szczotki polimerowe i nanocząstki magnetyczne

3.2.1. Materiały

Synteza i charakterystyka nanocząstek: Chlorek żelaza(III), heksahydrat (Sigma-Aldrich, cz.d.a); chlorek żelaza(II), tetrahydrat (POCH S.A, cz.d.a); amoniak roztwór 25% (POCH S.A, cz.d.a); chlorek sodu (POCH S.A, cz.d.a); argon 5.0 (Messer); kwas chlorowodorowy 35–38% (POCH S.A, cz.d.a); witamina C (Sigma-Aldrich, cz.d.a); 1,10-fenantrolina, monohydrat (POCH S.A, 99,5%); woda dejonizowana.

Synteza szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami i warstwą poli-L-lizyny: (3-aminopropyl)trietyloksysilan (APTES) (Sigma Aldrich, 99%); bromek α -bromoizobutyrylu (BIB) (Sigma Aldrich, 98%); trietyloamina (Sigma Aldrich, 99,5%); N,N,N',N'',N''-pentametylodietylenotriamina (PMDTA) (Sigma Aldrich, 99%); chlorek (3-akrylamidopropyl) trimetyloamoniowy (APTAC) (Sigma Aldrich, 75% roztwór wodny); bromek miedzi(I) (Sigma Aldrich, 99,999%); toluen (Chempur Piekary Śląskie, cz.d.a); metanol (Chempur Piekary Śląskie, cz.d.a); izopropanol (Chempur Piekary Śląskie, cz.d.a); chlorek metylenu, (Chempur Piekary Śląskie, cz.d.a); płytki z wafla krzemowego—Polished Prime Wafers (Cemat Silikon S.A. Warszawa); kwas siarkowy(VI) (Chempur Piekary Śląskie, 96%); perhydrol, (Stanlab Lublin, 30%); bromowodorek poli-L-lizyny (PLL, masa cząsteczkowa: 30000–70000, Sigma Aldrich, czystość MQ: 300).

Eksperymenty biologiczne: Pożywka DMEM (*ang. Dulbecco's modified Eagle's medium*) do hodowli komórkowych z L-glutaminą oraz 15 mM czynnika buforującego HEPES (Sigma-Aldrich) uzupełnionej 5% FBS (niepochodząca z USA, sterylnie filtrowana, Sigma-Aldrich); roztwór Penicylina-Streptomycyna (HyClone™); bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT, Sigma-Aldrich, czystość MQ: 200); paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, czystość MQ: 200); PBS (Sigma-Aldrich, czystość MQ: 200); odczynnik do testu żywotności komórek Alamar Blue® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific).

3.2.2. Procedury eksperymentalne

3.2.2.1. Synteza szczotek polimerowych za pomocą powierzchniowo-inicjowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (SI-ATRP)

Na Rys. 41a (krok 1 i 2) przedstawiono schemat procedury wykorzystanej do otrzymania szczotek polimerowych w niniejszej części pracy. W celu przeprowadzenia powierzchniowo-inicjowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (SI-ATRP) przygotowano

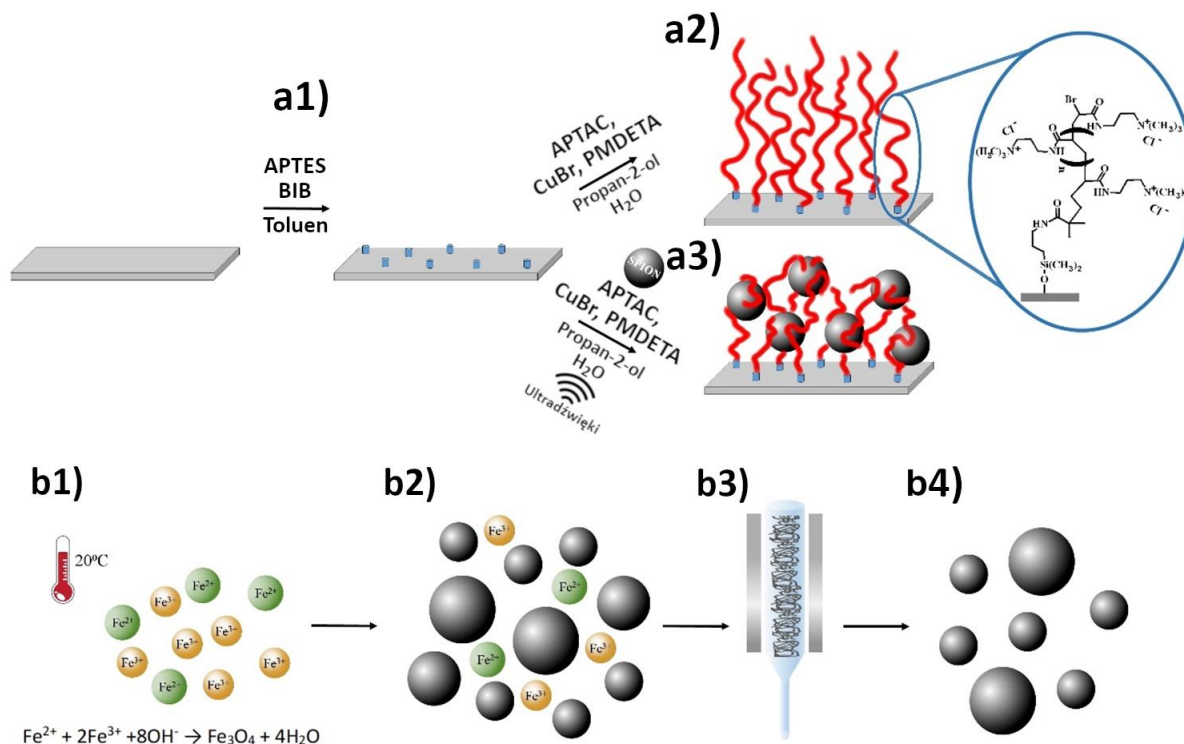
płytkę krzemową z naszczepioną monowarstwą inicjatora powierzchniowego, na której następnie prowadzono polimeryzację. Płytkę umieszczono na 1 h w roztworze piranii ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ w stosunku objętościowym 1:3). Następnie płytkę opłukano wodą, toluenem i osuszono w strumieniu argonu. W kolejnym etapie płytkę umieszczono w suchej fiolce zawierającej 5 ml toluenu. Fiolkę szczelnie zamknięto gumową septą i uszczelniono. Tak przygotowany układ przedmuchiwało strumieniem argonu, a następnie wprowadzono 2 krople inicjatora powierzchniowego (3-aminopropyl)trietoksylsilanu (APTES) w przeliczeniu na jedną płytkę o rozmiarze $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$. Układ taki pozostawiano na 24 h w atmosferze argonu. Po tym czasie płytkę z naniesionym inicjatorem oczyszczono silnym strumieniem pęcherzyków argonu w toluenie i dichlorometanie, a następnie osuszono strumieniem argonu. Kolejnym krokiem było umieszczenie płytki z inicjatorem w szczelnie zamkniętej fiolce zawierającej 5 ml dichlorometanu oraz wprowadzenie do układu za pomocą strzykawek 0,05 ml trietyloaminy (TEA) oraz 0,05 ml bromku bromoizobutyrylu (BIB). Próbkę pozostawiono w atmosferze argonu na 1 h. Po tym czasie płytkę oczyszczono silnym strumieniem pęcherzyków argonu w dichlorometanie oraz mieszaninie izopropanolu i wody dejonizowanej w stosunku objętościowym 1:1, a następnie osuszono strumieniem gazu.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie polimeryzacji SI-ATRP chlorku (3-akrylamidopropylu) trimetyloamoniowego (APTAC). Układ reakcyjny składał się z czterech szczelnie zamkniętych gumowymi septami fiolek, połączonych szeregowo kaniulami i ułożonych kaskadowo od najwyższej do najniższej. W pierwszej (najwyższej) fiolce umieszczono igłę wprowadzającą do układu argon, a w ostatniej igłę wylotową. Dzięki powstającemu ciśnieniu zawartość fiołki znajdującej się wyżej w układzie jest przenoszona kaniulami do fiolek umieszczonych niżej. Zawartość poszczególnych fiolek w układzie była następująca:

- I: 2,5 ml izopropanolu + 2,5 ml H_2O (mieszanina nasycająca środowisko reakcji parami mieszaniny alkoholu i wody),
- II: 3 ml APTAC + 0,5 ml H_2O + 1,5 ml izopropanolu + PMDETA (N,N,N',N'',N'' -pentametyldietylenotriamina),
- III: 20 mg CuBr ,
- IV: płytka krzemowa z naniesionym inicjatorem.

Polimeryzacja była prowadzona w temperaturze pokojowej, w łaźni ultradźwiękowej, stosując ciągle ultradźwięki przez 1, 4 i 10 h (Sonic-6, Polsonic, moc ultradźwiękowa $2 \times 240\text{ W}$). Ważne jest, aby pamiętać, że stosunek $\text{Cu(I)}:\text{chelat}$ (PMDETA) musi być stały (3:4,5 mol),

natomiast stosunek monomer:Cu(I):(chelator) można zmieniać. Po 24 godzinach od rozpoczęcia polimeryzacji płytkę starannie oczyszczano silnym strumieniem pęcherzyków gazu w następujących rozpuszczalnikach: mieszanina izopropanol:woda (1:1), dichlorometan oraz etanol. Następnie suszono w strumieniu argonu. Syntezę tę prowadzono dla różnych ilości płytek, dopasowując odpowiednio ilości poszczególnych odczynników.



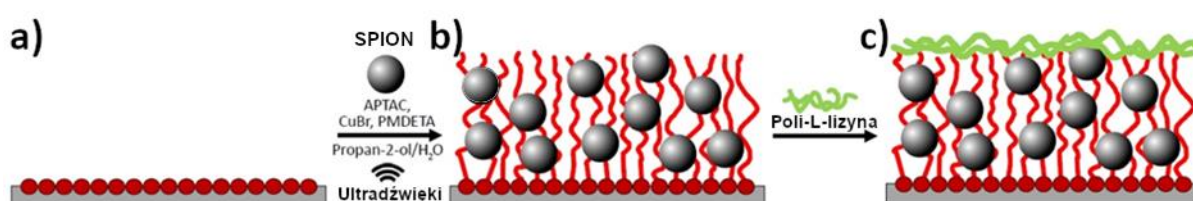
Rys. 41. Procedura otrzymywania układu hybrydowego łączącego nanocząstki i szczotki polimerowe. **(a)** Synteza szczotek polimerowych poli(APTAC) i szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami poli(APTAC)+SPION: 1. Adsorpcja inicjatora na powierzchni krzemu, 2. Utworzenie szczotek polimerowych z poli(APTAC) za pomocą polimeryzacji SI-ATRP monomeru APTAC, 3. Utworzenie układu hybrydowego szczotek polimerowych z poli(APTAC) wraz z SPION, za pomocą polimeryzacji SI-ATRP w obecności tych nanocząstek; **(b)** Synteza magnetycznych nanocząstek: 1. Mieszanina jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} w H_2O , 2. Mieszanina nanocząstek i pozostałości poreakcyjne, 3. Chromatografia magnetyczna, 4. Oczyszczone nanocząstki (źródło: opracowanie własne).

3.2.2.2. Synteza układów hybrydowych łączących szczotki polimerowe i nanocząstki magnetyczne

Synteza układów hybrydowych łączących szczotki polimerowe i magnetyczne nanocząstki również przebiegała dwuetapowo (Rys. 41). W pierwszym etapie otrzymywano SPION bez modyfikacji powierzchni, poprzez wprowadzenie 0,1622 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ i 0,0596 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ do 50 ml wody dejonizowanej, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.1.2.1.

Nanocząstki następnie oczyszczono za pomocą chromatografii magnetycznej i przechowywano je w lodówce, w szklanych naczyniach; poddawano je kilkuminutowemu ciągłemu działaniu ultradźwięków przed każdym użyciem (Rys. 41b). Drugim etapem była polimeryzacja SI-ATRP w obecności uprzednio uzyskanych SPION. Została ona przeprowadzona zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2.2.1. Różnica polegała na tym, że w momencie rozpoczęcia polimeryzacji SI-ATRP, do układu reakcyjnego z płytką krzemową wstrzyknięto 0,2 ml stabilnej zawiesiny SPION w wodzie. Polimeryzacja była prowadzona w łaźni ultradźwiękowej przez 1, 4 i 10 h. Przebieg polimeryzacji zaprezentowano na Rys. 41a (krok 1 i 3). Otrzymane w ten sposób podłoża starannie oczyszczano silnym strumieniem pęcherzyków argonu w następujących rozpuszczalnikach: mieszanina izopropanol:woda (1:1), dichlorometan oraz etanol.

W celu poprawienia biokompatybilności tak przygotowanych podłoży do zastosowań w hodowlach komórkowych, otrzymane warstwy pokrywano dodatkową warstwą polimeru – poli-L-lizyny, poprawiającej adhezję komórek do powierzchni oraz izolującą od silnie kationowych grup w szczotkach poli(APTAC). Zastosowano standardową procedurę, która polegała na przygotowaniu roztworu podstawowego poprzez dodanie 4 mg PLL do 1 ml sterylnej wody o czystości do hodowli komórkowych. Następnie roztwór ten rozcieńczono sterylną wodą 100-krotnie i w stosunku 0,5 ml na 1 cm² użyto do pokrycia przygotowanych hybrydowych podłoży. Próbkę pozostawiono w inkubatorze na 24 h, a następnie odessano roztwór z nad podłoża, a ich powierzchnię dokładnie przepłukano sterylną wodą otrzymując układ zaprezentowany na Rys. 42 na przykładzie szczotek poli(APTAC)+SPION.



Rys. 42. Schemat powstawania podłoża łączącego szczotki poli(APTAC), SPION oraz warstwę PLL: (a) cienka warstwa inicjatora szczepionego powierzchniowo (APTES+BIB), (b) szczotki poli(APTAC) uzyskane poprzez ATRP w obecności SPION, (c) szczotki poli(APTAC) z wbudowanymi SPION pokryte warstwą PLL.

3.2.2.3. Analiza fizykochemiczna nanocząstek wykorzystywanych do utworzenia układu hybrydowego ze szczotkami polimerowymi

SPION przed zastosowaniem w syntezie układów hybrydowych scharakteryzowano fizykochemicznie, określając ich stężenie, rozmiar i dystrybucję, stabilność, a także

właściwości magnetyczne. Stężenie nanocząstek określano na podstawie ilościowej zawartości żelaza w próbce, stosując spektroskopię absorpcyjną UV–Vis. Rozkład rozmiarów uzyskanych nanocząstek wyznaczano wykorzystując dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz obrazując nanocząstki za pomocą mikroskopii HRTEM. Z kolei stabilność zawiesin nanocząstek badano poprzez pomiar potencjału dzeta. Wszystkie powyższe eksperymenty prowadzono zgodnie z procedurami opisanymi w podrozdziale 3.1.2.2.

Właściwości magnetyczne SPION badano za pomocą mikroskopii sił magnetycznych (MFM, *ang. Magnetic Force Microscopy*). Obrazy MFM uzyskano przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM, *ang. Atomic Force Microscopy*) Dimension Icon (Bruker) i standardowych krzemowych sond magnetycznych pokrytych warstwą Co/Cr o nominalnej stałej sprężystości 2 N/m. Wszystkie obrazy MFM nanocząstek naniesionych na krzem zostały zarejestrowane dla odległości ostrza pomiarowego równej 100 nm od powierzchni badanej próbki.

3.2.2.4. Badanie właściwości układów hybrydowych

Zbadanie właściwości otrzymanych układów hybrydowych takich, jak topografia, chropowatość powierzchni, grubość warstw oraz właściwości magnetyczne, było możliwe dzięki zastosowaniu mikroskopii AFM oraz MFM. Obrazy AFM uzyskano również za pomocą mikroskopu Dimension Icon (Bruker) pracującego w powietrzu lub wodzie w trybie PeakForce Tapping (PFT) przy użyciu standardowych sond krzemowych o nominalnej stałej sprężystości 0,4 N/m do pomiarów w powietrzu i 0,12 N/m w cieczy. Obrazy MFM, na podstawie których określono właściwości magnetyczne hybrydowych warstw uzyskano przy użyciu tego samego mikroskopu i standardowych krzemowych sond magnetycznych pokrytych warstwą Co/Cr o nominalnej stałej sprężystości 2 N/m. Obrazy MFM dla układów hybrydowych łączących nanocząstki i szczotki polimerowe zostały zarejestrowane w trybie podnoszenia przy wysokości podnoszenia równej 50 nm. Aby skompensować dodatni ładunek warstw, który mógłby wpłynąć na sygnał fazy magnetycznej badanej warstwy, zastosowano między ostrzem i próbką potencjał o wartości 5 V. Dźwignie użyte do pomiarów zostały przed pomiarami namagnesowane małym magnesem neodymowym. Pomiary ilościowego mapowania nanomechanicznego (QNM, *ang. Quantitative Nanomechanical Mapping*) przeprowadzono przy użyciu wcześniej skalibrowanej sondy przystosowanej do pracy w trybie PFT. Uzyskane wyniki uśredniono dla co najmniej 10 miejsc na każdej próbce. Pomiary grubości przeprowadzono na krawędziach warstw zarysowanych, mechanicznie przy pomocy ostrej pęsety. Analizę XPS otrzymanych podłoży przeprowadzono w systemie skanującym XPS PHI Versa Probe II przy użyciu monochromatycznych promieni rentgenowskich Al K α (1486,6 eV)

zogniskowanych na plamce o wielkości 100 μm . Wyniki zebrano z obszaru próbki o rozmiarze $400 \times 400 \mu\text{m}^2$. Początkowy kąt wiązki wynosił 30° , a energię przejścia w analizatorze ustawiono na 23,50 eV, w celu uzyskania widm o wysokiej rozdzielczości energetycznej dla obszarów C1, N1, O1, Cl 2p, Si 2p i Fe 2p. Ciśnienie w komorze analitycznej było mniejsze niż $4,0 \times 10^{-6}$ Pa. Wszystkie sygnały XPS odniesiono do sygnału węgla C1 znajdującego się przy energii wiązania C–C równej 284,8 eV. Dekonwolucję widm przeprowadzono używając oprogramowania do analizy danych od PHI MultiPak (v.9.7.0.1), a widmo tła odjęto metodą Shirley.

Zbadanie składu układu hybrydowego możliwe było również dzięki zastosowaniu spektrometrii mas jonów wtórnych (SIMS, ang. *Secondary Ion Mass Spectrometry*). Pomiarów te przeprowadzono stosując urządzenie ION TOF TOFSIMS V, wyposażone w ciekłometaliczne źródło jonów pierwotnych (działo jonowe) bizmut-mangan oraz działo jonowe (źródło jonów) wykorzystujące klastry C_{60} . Profile głębokościowe otrzymano w przeplatany trybie dwuwiazkowym. Do napyłania obszaru $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ zastosowano wiązkę jonów C_{60}^+ o energii 20 keV, a do analizy obszaru $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ koncentrycznego względem rozpylanej powierzchni użyto wiązki jonów o energii 30 keV. Dla wszystkich profili minimalna rozdzielczość (przy $^{13}\text{CC}_2\text{H}_{10}\text{N}$ ($m/z = 61$)) wynosiła 6500. Kalibrację masową przeprowadzono z użyciem H, H_2 , CH, C_2H_2 , C_3H_3 i C_4H_4 . Kalibracje głębokościowe wykonano poprzez przeliczenie czasu rozpylania na głębokość na podstawie znanej grubości warstwy polimerowej.

3.2.2.5. Badania biologiczne *in vitro* na liniach komórkowych

Wszystkie komórki do eksperymentów biologicznych hodowano w pożywce DMEM uzupełnionej 5% FBS. Linie komórkowe *neuroblastoma* hodowano w nawilżanym inkubatorze w standardowych warunkach (37°C , 5% CO_2). Komórki rozhodowywano co 2 dni, aż do uzyskania odpowiedniej liczby komórek do badania. Po osiągnięciu około 75% gęstości, komórki trypsynizowano. Następnie zaszczepiano komórki w ilości ok. $7,0 \times 10^4$ komórek/ cm^2 na sterylnych 24-dołkowych płytkach (TC Plate, Cell+, F, dla wrażliwych komórek adherentnych, Sarstedt), w których znajdowały się krzemowe płytki z otrzymanymi hybrydowymi podłożami opartymi na szczotkach polimerowych i magnetycznych nanocząstkach oraz warstwie poli-L-lizyny, podłoża kontrolne w postaci szczotek polimerowych pokrytych poli-L-lizyną bez wbudowanych nanocząstek, płytki krzemowe bez warstwy polimerowej oraz referencyjne płytki polistyrenowe (1 podłoże na 1 dołek). Płytki

inkubowano przez 24 h. Przed przeniesieniem komórek na otrzymane próbki, podłoża wysterylizowano.

W celu zbadania wpływu przygotowanych podłoży w obecności zewnętrznego stałego pola magnetycznego na komórki, po dobowej inkubacji, równoległe do badanej powierzchni (od góry) w stałej odległości 18 mm, przyłożono płytkowe magnesy neodymowe (jeden magnes o wymiarze $40 \times 15 \times 5$ mm i indukcji pola $B = 0,229$ T przypadał na dwa dołki/podłoża). Przez kolejne dwie doby, co 24 godziny zbierano roztwór znad komórek i obserwowano go pod transmisyjnym mikroskopem optycznym (Carl Zeiss Axio Vert.A1) w celu zaobserwowania ewentualnej obecności oderwanych komórek i oceny ich stanu. Po 72 h, aby uzyskać obrazy komórek *neuroblastoma* na podłożach, część podłoży z komórkami przemyto trzykrotnie roztworem buforowym PBS ($\text{pH} = 7,4$) i utrwalono 1% paraformaldehydem w PBS przez 15 minut. Obrazowanie komórek w mikroskopie optycznym wykonano przy użyciu odwróconego mikroskopu Nikon Eclipse LV150N. Pozostałą część podłoży hybrydowych z komórkami, po 3 dobach inkubacji przeznaczono do testów żywotności MTT. Test ten przeprowadzono analogicznie do procedury opisanej w podrozdziale 3.1.2.5. Komórki w ilości 7×10^4 hodowano w objętości 1,1 ml pożywki hodowlanej na 24-dołkowej płytce w obecności różnego rodzaju rusztowań (poli(APTAC)+SPION, poli(APTAC) oraz podłoża referencyjne: krzem i polistyren (TCPS)). Każdy przedstawiony wynik jest średnią z dwóch niezależnych eksperymentów, z których każdy przeprowadzono w trzech seriach. Wszystkie wyniki wyrażono w postaci średniej wraz z odchyleniami standardowymi. Linię komórkową *neuroblastoma* wykorzystano w eksperymentach ze względu na niższą wrażliwość na zmieniające się warunki środowiskowe, co pozwala zaobserwować wyłącznie wpływ pola magnetycznego i zachowania podłoża na adhezję i odrywanie się komórek.

Przeprowadzono również testy proliferacji komórek na poszczególnych badanych podłożach. W tym celu zastosowano test Alamar Blue® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Test zawiera wskaźnik redoks, który przechodzi z formy utlenionej (resazuryna, niefluorescencyjna, niebieska) do formy zredukowanej – rezorufiny (fluorescencyjna, czerwona). Intensywność fluorescencji/absorbancji rezorufiny jest proporcjonalna do liczby żywych komórek, a tym samym generuje ilościowy pomiar żywotności komórek [216]. Żywotność komórek badano po 24, 48 i 72 godzinach. Pożywkę usunięto i zastąpiono 10% AlamarBlue® w pożywce DMEM, a następnie inkubowano przez 2,5 godziny w 37°C (5% CO₂). W następnym etapie pożywkę przeniesiono z każdego dołka na 96-dołkowe płytki (TC Plate, Cell+, F, dla wrażliwych komórek adherentnych, Sarstedt) i zmierzono absorbancję przy długości fali równej 570 oraz 600 nm przy użyciu czytnika mikropłytek TECAN. W celu

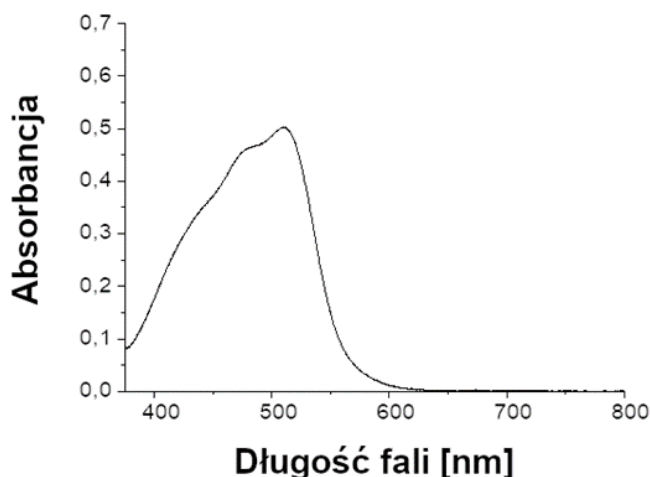
dalszej hodowli komórkowej przemyto je raz buforem PBS, a następnie dodano świeżą pożywkę DMEM. Test proliferacji przeprowadzono przed i po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego.

3.2.3. Wyniki oraz ich opracowanie

W opisanym w niniejszym rozdziale podejściu do tworzenia układów hybrydowych, w pierwszej fazie badań otrzymano SPION, które dokładnie scharakteryzowano, a następnie przystąpiono do opracowania i optymalizacji procesu otrzymywania szczotek polimerowych oraz ich połączenia z nanocząstkami. W wyniku syntez otrzymano układy hybrydowe w postaci szczotek polimerowych z poli(APTAC) z wbudowanymi SPION oraz układy referencyjne w postaci szczotek polimerowych z tego samego polimeru (poli(APTAC)), jednak bez wprowadzonych elementów nieorganicznych.

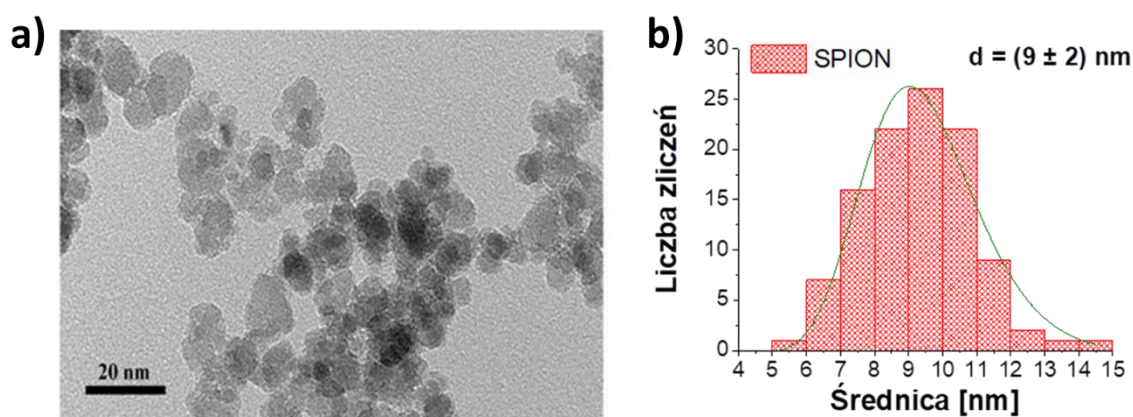
3.2.3.1. Charakterystyka nanocząstek wykorzystywanych do utworzenia układu hybrydowego ze szczotkami polimerowymi

Otrzymane w wyniku syntezy metodą współstrącania i oczyszczone chromatografią magnetyczną SPION scharakteryzowano, określając ich stężenie, rozmiar, ładunek powierzchniowy oraz właściwości magnetyczne. W celu przeprowadzenia ilościowego oznaczenia zawartości żelaza w otrzymanej próbce poddano ją analizie za pomocą absorpcyjnej spektroskopii UV–Vis (Rys. 43). Pomiar widm absorpcyjnych przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.2.2. Otrzymane maksima widm absorpcji posłużyły do obliczenia stężenia otrzymanej próbki w oparciu o sporządzoną krzywą kalibracyjną zaprezentowaną na Rys. 21. Obliczone średnie stężenie żelaza w otrzymywanych zawiesinach SPION wyniosło 0,82 mg Fe/ml.



Rys. 43. Przykładowe widmo absorpcyjne UV-Vis kompleksu fenantroliny z jonami Fe^{2+} , wykorzystane do oznaczania zawartości żelaza w SPION.

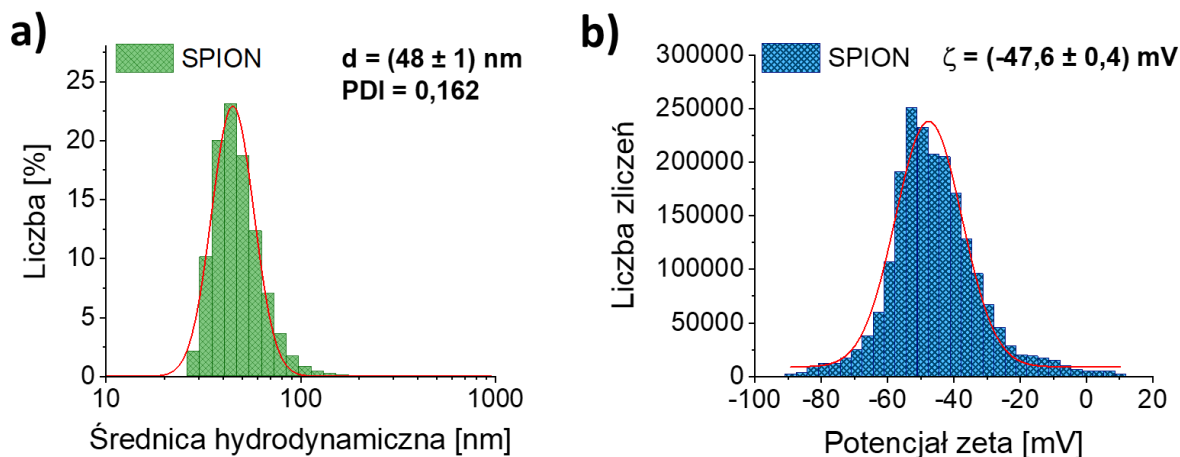
Rozmiar określono obrazując nanocząstki mikroskopią HRTEM. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiono na Rys. 44a, a histogram prezentujący rozkład, zmierzonych na podstawie zdjęć, 100 średnic nanocząstek zaprezentowany został na Rys. 44b. Wyniki otrzymane z analizy obrazów HRTEM wykazały, że nanocząstki mają średnicę (9 ± 2) nm.



Rys. 44. Wyniki pomiarów TEM: przykładowy obraz SPION uzyskany za pomocą mikroskopu TEM (a) oraz histogram utworzony na podstawie średnic zmierzonych na otrzymanych zdjęciach TEM (b). Dopasowano rozkład logarytmiczno-normalny.

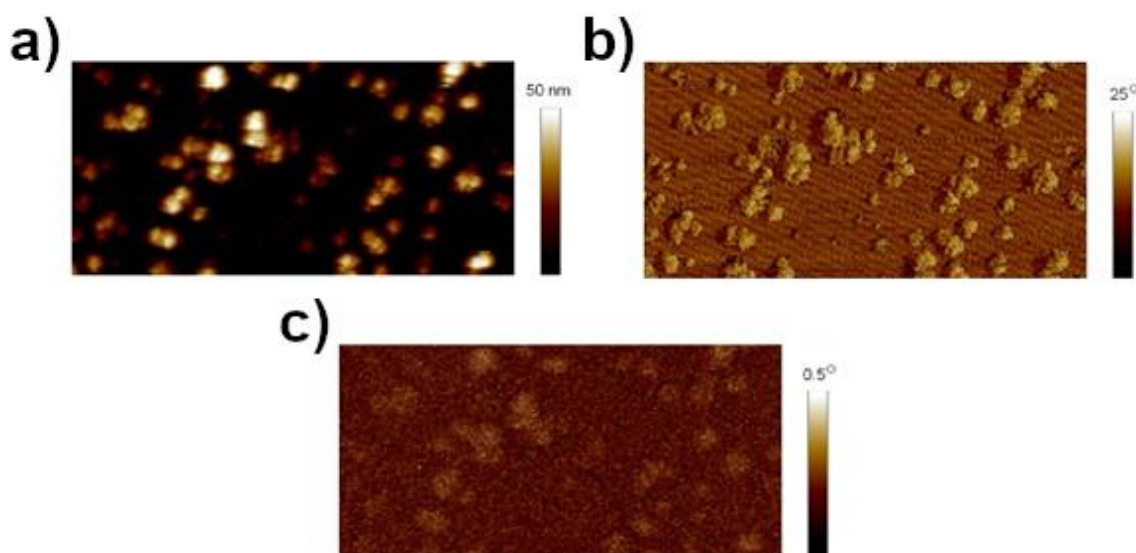
Otrzymaną wodną zawiesinę SPION poddano także badaniom za pomocą DLS oraz określono ładunek powierzchniowy metodą pomiaru dzeta potencjału. Zmierzona średnica hydrodynamiczna miała wartość równą ok. (47 ± 1) nm przy współczynniku PDI równym 0,162 (Rys. 45a), którego niska wartość świadczy o niewielkiej dyspersyjności zawiesiny. Otrzymana wartość jest jednak większa niż w przypadku pomiarów TEM, co może być spowodowane powstawaniem niewielkich agregatów w zawiesinie SPION. Na podstawie histogramu wartości

potencjału dzeta SPION w wodnej zawieszynie o pH = 9,06 stwierdzono, że powierzchnia nanocząstek jest naładowana ujemnie, a średnia wartość dzeta potencjału wyniosła $(-47,6 \pm 0,4)$ mV (Rys. 45b). Uwzględniając warunek stabilności, zawieszinę można uznać za stabilną, gdyż większość nanocząstek wykazuje silnie ujemne wartości potencjału dzeta (poniżej -30 mV). Był to warunek konieczny i kluczowy dla pomyślnego przebiegu polimeryzacji.



Rys. 45. Wyniki pomiarów DLS oraz potencjału dzeta SPION (dopasowane rozkłady logarytmiczno-normalny (a) oraz rozkład Gaussa (b)).

W celu potwierdzenia właściwości magnetycznych otrzymanych SPION, zaobserwowanych wcześniej podczas chromatografii magnetycznej, wykorzystano mikroskopię sił magnetycznych MFM. Mikroskop pracował w trybie „interleave”, zbierającym w trakcie jednego pomiaru obraz topografii próbki wraz z obrazem fazowym (Rys. 46a) i (Rys. 46b) bezkontaktowo (Rys. 46c) w odległości 50 nm od badanej powierzchni obraz fazy magnetycznej. Sygnały na obrazie fazy magnetycznej dobrze pokrywają się z sygnałami dla fazy mechanicznej oraz obrazu wysokościowego próbki, co świadczy o silnych właściwościach magnetycznych zobrazowanych nanocząstek, mierzalnych nawet w pewnej odległości od próbki.

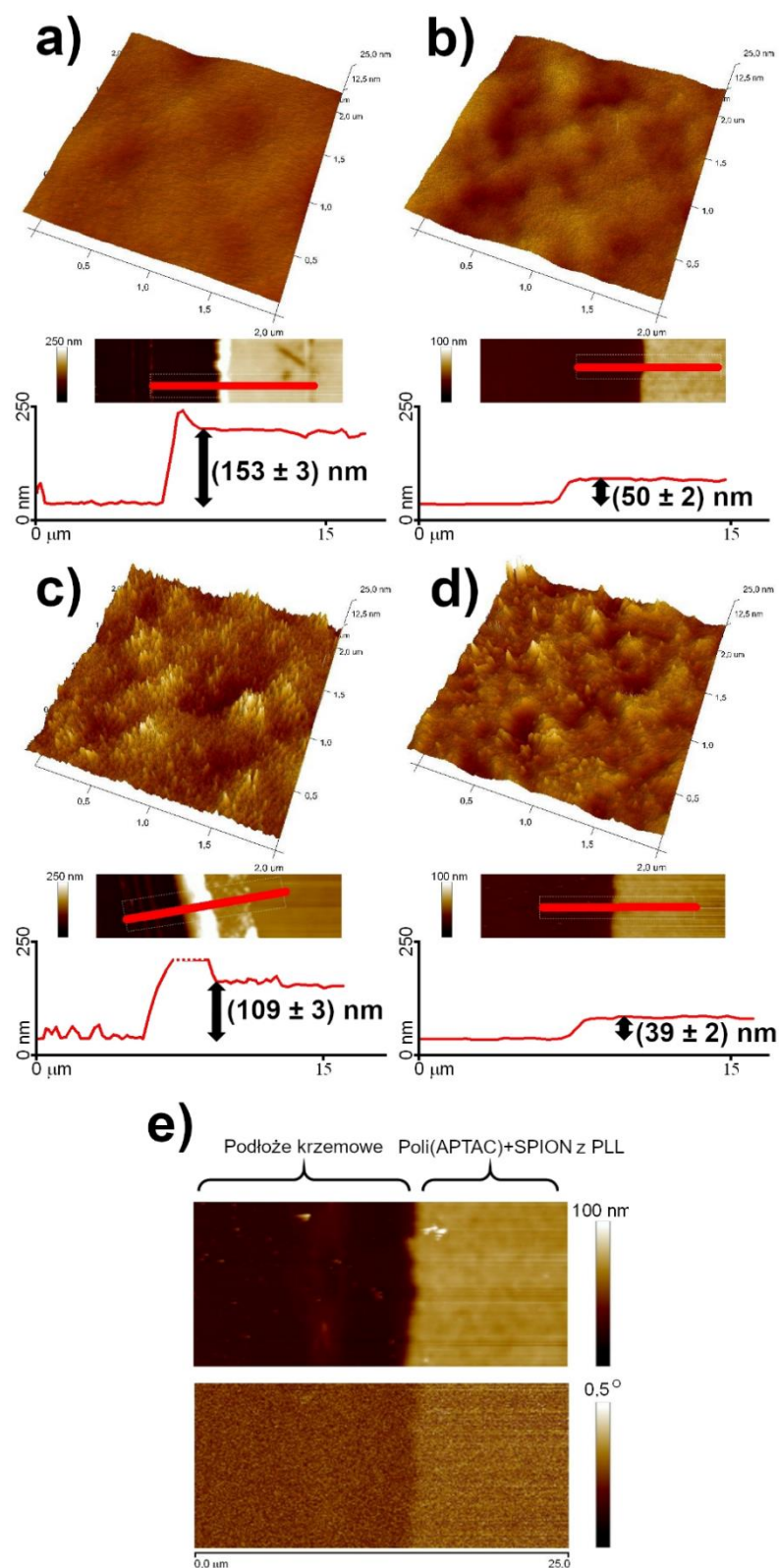


Rys. 46. Obrazy MFM SPION: (a) wysokość, (b) obraz fazowy, (c) faza magnetyczna. Szerokość zdjęcia = 1 μm .

3.2.3.2. Charakterystyka powierzchni układów hybrydowych i szczotek polimerowych

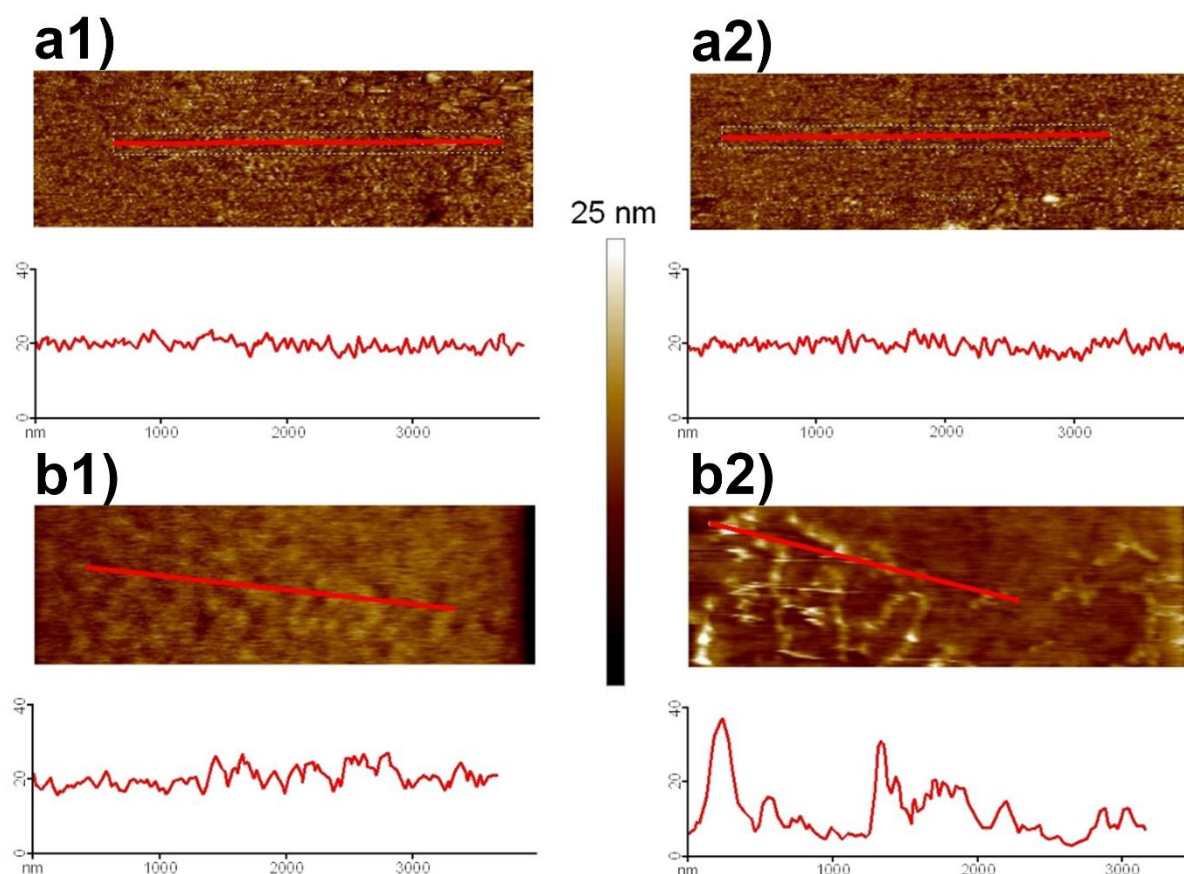
Podczas optymalizowania warunków syntezy nanokompozytów złożonych ze szczotek polimerowych poli(APTAC) z wbudowanymi SPION, otrzymane próbki charakteryzowano za pomocą mikroskopii AFM i MFM. Za pomocą AFM sprawdzono wpływ różnego czasu stosowania ultradźwięków na proces otrzymywania szczotek polimerowych oraz układów hybrydowych (1, 4 lub 10 h). W celu określenia grubości otrzymanej warstwy, na próbkach wykonano rysy przy użyciu ostrej pęsety. Na podstawie otrzymanych wyników, stwierdzono, że warstwy o największej wysokości (ok. 159 nm) otrzymano dla serii układów szczotek bez wprowadzonych nanocząstek, stanowiących odniesienie dla otrzymanych układów hybrydowych. Warstwy z wbudowanymi nanocząstkami wykazały wysokości sięgające ok. 100 nm, są zatem o ok. 1/3 cieńsze. Warstwy o największej wysokości, zarówno w przypadku próbek poli(APTAC) jak i poli(APTAC)+SPION otrzymano przy czasie działania ultradźwięków równym 1 h. Warstwy otrzymane przy 4-godzinny i 10-godzinny działaniu ultradźwięków okazały się nieco niższe, w związku z czym zrezygnowano z tak długiego czasu stosowania ultradźwięków. W dalszej części niniejszego rozdziału przedstawione zostaną wyniki polimeryzacji z zastosowaniem ultradźwięków przez 1 h.

Wysokość warstw szczotek polimerowych, wykorzystanych w dalszych badaniach i określona za pomocą pomiarów AFM, wyniosła (153 ± 3) nm dla próbki poli(APTAC) (Rys. 47a) oraz (109 ± 3) nm dla poli(APTAC)+SPION (Rys. 47c).



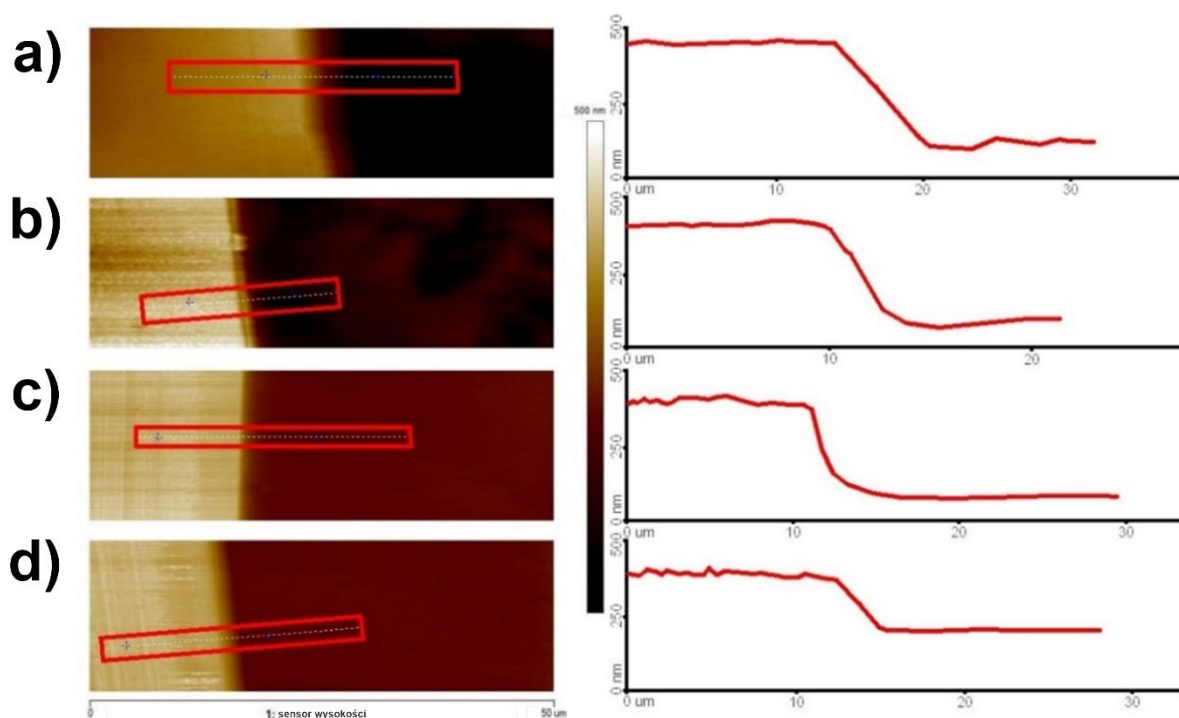
Rys. 47. Obrazy topografii AFM zmierzone w powietrzu z odpowiadającymi im przekrojami szczotek polimerowych: **(a)** poli(APTAC), **(b)** poli(APTAC) pokryte PLL, **(c)** poli(APTAC)+SPION i **(d)** poli(APTAC)+SPION z warstwą PLL; **(e)** Obraz fazowy MFM szczotek poli(APTAC)+SPION pokrytych cienką warstwą PLL (wysokość – górny obraz, faza magnetyczna – dolny obraz).

Zmniejszona wysokość warstwy szczotek z wbudowanymi nanocząstkami została zaobserwowana już w trakcie optymalizacji procesu syntezy układów hybrydowych i najprawdopodobniej jest związana z mechaniczną integracją nanocząstek do warstwy polimeru poprzez sieciowanie łańcuchów. Obrazy topografii wykazują wyraźne różnice pomiędzy obiema próbkami. W przypadku warstwy hybrydowej poli(APTAC)+SPION zaobserwowano wiele obiektów wystających ponad powierzchnię gładkiej warstwy szczotek polimerowych. Obiektów tych nie zarejestrowano na obrazach szczotek bez wbudowanych nanocząstek. Obliczona chropowatość powierzchni, będąca miarą średniego kwadratowego odchylenia RMS (*ang. Root Mean Square*), równa $(1,1 \pm 0,3)$ nm dla próbki poli(APTAC)+SPION, jest prawie dwukrotnie większa niż w przypadku próbki poli(APTAC), gdzie chropowatość wyniosła $(0,7 \pm 0,2)$ nm. Warto zaznaczyć, że na obrazach AFM nie zaobserwowano agregatów na powierzchni szczotek, co jest istotnym aspektem zastosowanej metody syntezy. W kolejnym etapie badań otrzymane i scharakteryzowane podłoża zostały pokryte warstwą PLL, która, jak wcześniej wspomniano, jest często stosowana jako czynnik poprawiający adhezję komórek do powierzchni. Dodatek polielektrolitu na powierzchni szczotek polimerowych spowodował ich znaczne zapadnięcie się. Jak pokazano na Rys. 47b i Rys. 47d, zmierzona wysokość wysuszonych próbek z warstwą PLL na wierzchu zmniejszyła się do wartości (50 ± 2) nm dla poli(APTAC) oraz do wartości (39 ± 2) nm dla poli(APTAC)+SPION. Obliczona chropowatość powierzchni po pokryciu PLL wzrosła nieznacznie i wyniosła $(1,2 \pm 0,4)$ nm dla poli(APTAC)+SPION oraz $(0,8 \pm 0,2)$ nm w przypadku szczotek bez wbudowanych nanocząstek. W celu przeprowadzenia dalszych badań biologicznych, uzyskane podłoża zbadano w środowisku wodnym (woda dejonizowana, pH = 7) przed i po przyłożeniu płytkowych magnesów neodymowych równoległe do badanej powierzchni (od góry) w stałej odległości 18 mm. Zaobserwowano, że chropowatość powierzchni spęczniałych szczotek poli(APTAC)+SPION z warstwą PLL uległa wyraźnemu wzrostowi z wartości $(2,8 \pm 0,5)$ nm do wartości równej $(4,9 \pm 0,9)$ nm po ekspozycji na zewnętrzne pole magnetyczne. Jednocześnie nie zauważono żadnej znaczącej różnicy w chropowatości powierzchni dla referencyjnej próbki poli(APTAC) pokrytej PLL – uzyskano wartości $2,6 \pm 0,4$ nm przed i $2,6 \pm 0,5$ nm po przyłożeniu magnesu neodymowego (Rys. 48).



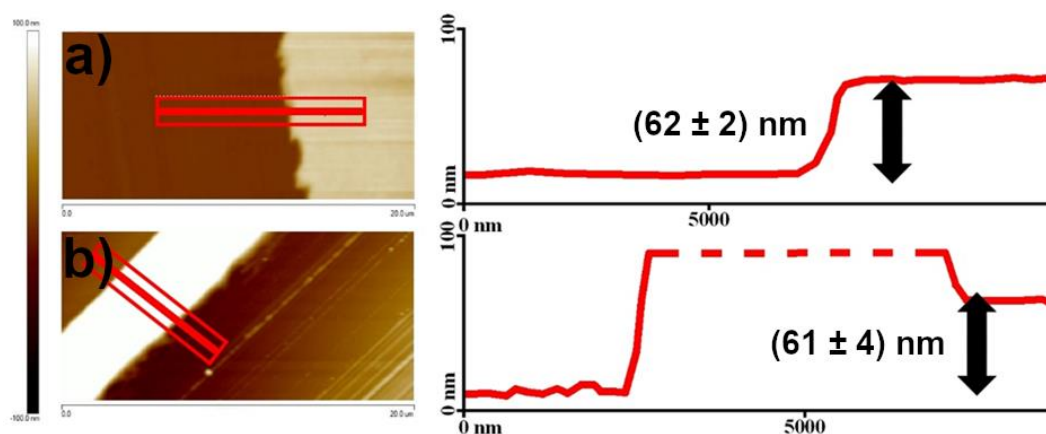
Rys. 48. Obrazy topografii AFM w wodzie szczotek poli(APTAC) pokrytych PLL przed (**a1**) i po (**a2**) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym oraz szczotek poli(APTAC)+SPION pokrytych PLL przed (**b1**) i po (**b2**) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym.

Ponadto zaobserwowano, że zmierzona wysokość spęczniałych szczotek z warstwą PLL była kilkukrotnie większa niż ich wysokość w powietrzu (Rys. 47b i d) zarówno dla próbki poli(APTAC), gdzie wzrosła do (342 ± 11) nm, jak i dla szczotek poli(APTAC)+SPION, których wysokość wyniosła (197 ± 8) nm. Po 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym nie stwierdzono znaczącej różnicy w wysokości warstw. Otrzymano wartości: (344 ± 10) nm dla poli(APTAC) i (195 ± 9) nm dla poli(APTAC)+SPION (Rys. 49).



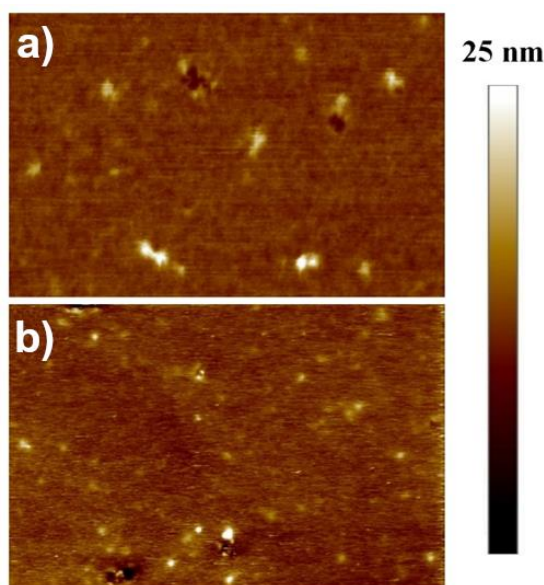
Rys. 49. Obrazy AFM zmierzone w wodzie wraz z odpowiednimi przekrojami szczotek poli(APTAC) pokrytych PLL przed (a) i po (b) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym oraz szczotek poli(APTAC)+SPION pokrytych PLL przed (c) i po (d) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym.

Wykorzystując MFM potwierdzono właściwości magnetyczne podłoża hybrydowych poli(APTAC)+SPION pokrytych PLL. Jak pokazano na Rys. 47e, sygnał magnetyczny jest wyraźnie widoczny na całej powierzchni badanego podłoża. W celu sprawdzenia, czy można wprowadzić nanocząstki do wcześniej przygotowanych szczotek polimerowych (bez konieczności ich syntezy *in situ*) poprzez zastosowanie ultradźwięków przeprowadzono eksperyment kontrolny. Wcześniej przygotowane szczotki poli(APTAC) zanurzono w mieszaninie wody i izopropanolu (rozpuszczalnikach stosowanych podczas syntezy szczotek), po czym do mieszaniny dodano zawiesinę SPION. Układ poddawano działaniu ultradźwięków przez 5 minut. Próbkę następnie wyjęto i oczyszczono opłukując wodą dejonizowaną, a otrzymane wyniki zaprezentowano na Rys. 50. Obrazy AFM nie wykazały różnic w topografii i wysokości szczotek przed i po eksperymencie, co wskazuje, że SPION nie zostały wbudowane do szczotek polimerowych w badanych warunkach.



Rys. 50. Obrazy AFM wraz z przekrojami dla szczotek poli(APTAC) (a) i tych samych szczotek po 5 minutach działania ultradźwięków w zawieszynie SPION (b).

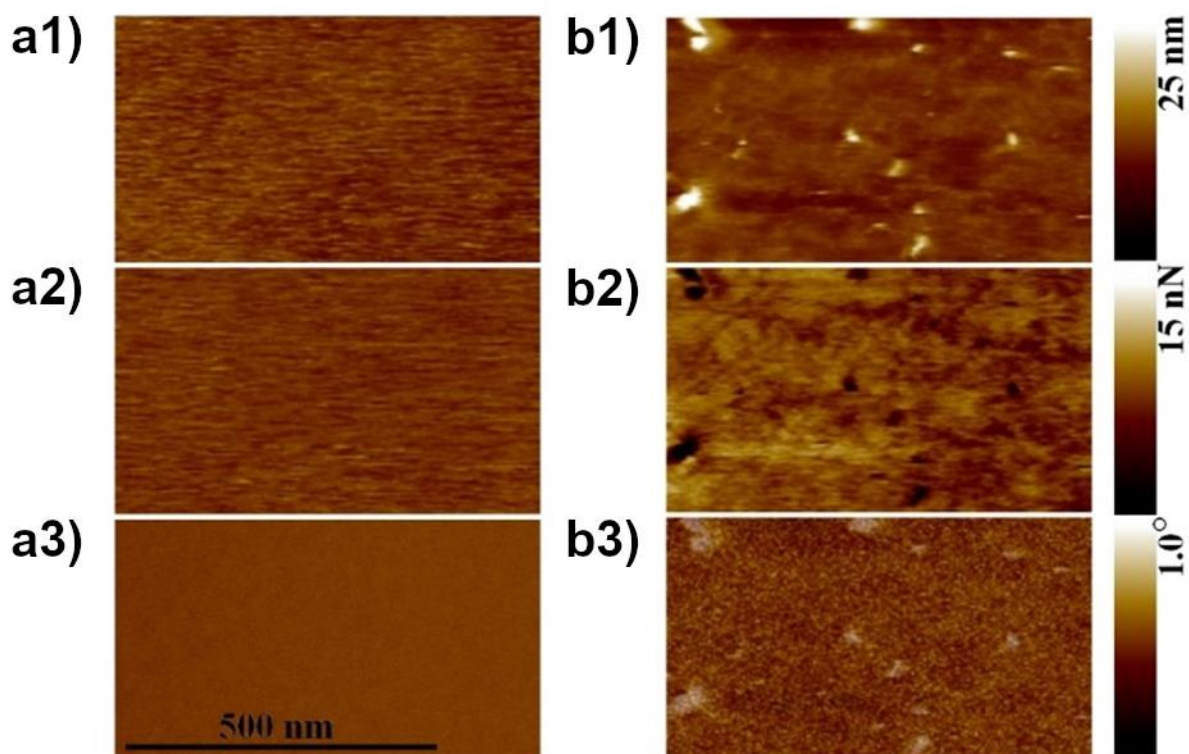
Chcąc sprawdzić stabilność otrzymanych warstw przeprowadzono również pomiary topografii po ok. miesiącu przechowywania próbki w powietrzu atmosferycznym. Wynik odniesiono do obrazu topografii uzyskanego bezpośrednio po syntezie (Rys. 51a). Po 30 dniach na obrazach topografii (Rys. 51b) nie zaobserwowano znaczących zmian w stosunku do obrazu kontrolnego, w tym procesu złuszczenia się warstwy szczotek czy zaniku SPION w warstwie.



Rys. 51. Obrazy topografii AFM próbki poli(APTAC)+SPION bezpośrednio po syntezie (a) oraz po miesiącu przechowywania w powietrzu atmosferycznym (b). Szerokość zdjęcia AFM wynosi 1 μm.

Stosując wysoko-rozdzielczą mikroskopię sił magnetycznych PFMFM (działająca w trybie PeakForce z wykorzystaniem czulszych sond pomiarowych o stałej sprężystości 0,8 N/m) zbadano również magnetyczne właściwości otrzymanych hybrydowych układów poli(APTAC)+SPION. Obrazowanie PF-MFM potwierdziło obecność domen magnetycznych,

które można przypisać dobrze odseparowanym SPION, umieszczonym w matrycy szczotek polimerowych (Rys. 52).

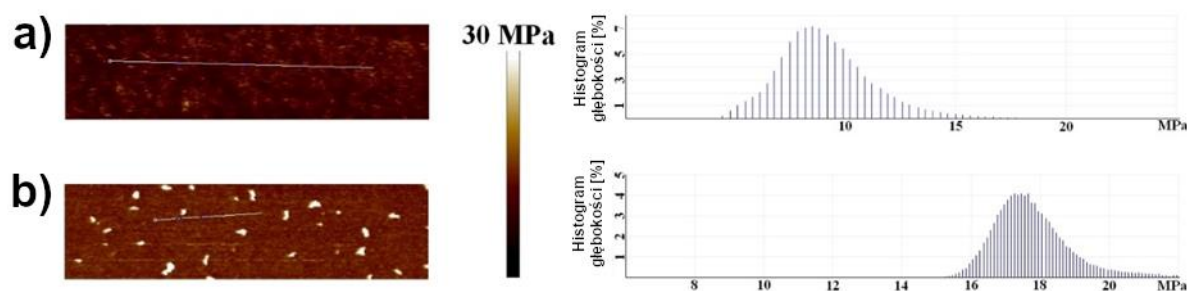


Rys. 52. Obrazy PF-MFM (PeakForce MFM) szczotek poli(APTAC) (**a**) oraz poli(APTAC)+SPION (**b**): 1. topografia, 2. adhezja, 3. faza magnetyczna.

Na Rys. 52b2, prezentującym obraz adhezji próbki poli(APTAC)+SPION, wyraźnie widać niejednorodność powierzchni. Może to być związane z obecnością różnorodnie splątanych łańcuchów polimerowych, w różnych odległościach od osadzonych nanocząstek. W odróżnieniu od szczotek z wbudowanymi nanocząstkami, dla próbki poli(APTAC) nie zaobserwowano niejednorodności zarówno w przypadku topografii, sygnału magnetycznego, jak i adhezji (Rys. 52a1–a3).

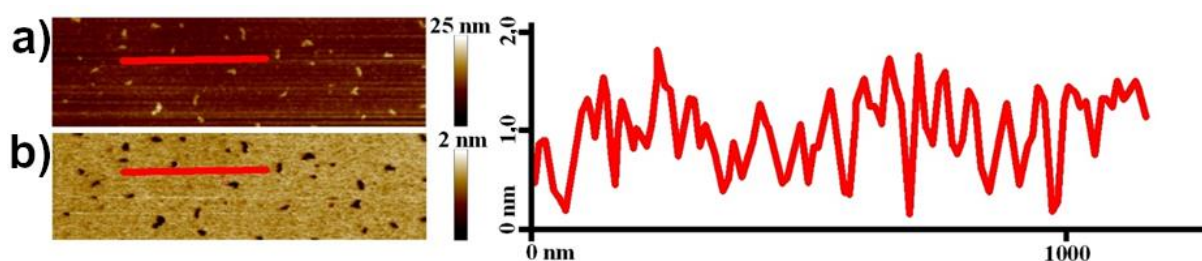
3.2.3.3. Pomiary sztywności warstw

Wyniki pomiarów ilościowego mapowania nanomechanicznego (QNM) także mogą wskazywać na efektywne wbudowywanie nanocząstek w strukturę szczotek polimerowych. Średni moduł DMT (obliczony za pomocą modelu Derjaguin-Mullera-Toporova) [217] szczotek poli(APTAC) szczepionych na powierzchni krzemu wyniósł $(8,8 \pm 1,1)$ MPa, natomiast w przypadku układu hybrydowego poli(APTAC)+SPION był dwukrotnie wyższy i równy $(17,6 \pm 1,3)$ MPa (Rys. 53).



Rys. 53. Wyniki pomiarów QNM dla poli(APTAC) (a) i poli(APTAC)+SPION (b) wraz z odpowiednimi histogramami.

Podane wartości można wiarygodnie porównać, ponieważ średnie wgłębienia zastosowane podczas pomiarów były niewielkie (ok. 1 nm dla próbki poli(APTAC)+SPION, Rys. 54), a tym samym ograniczały wpływ podłoża na wynik.



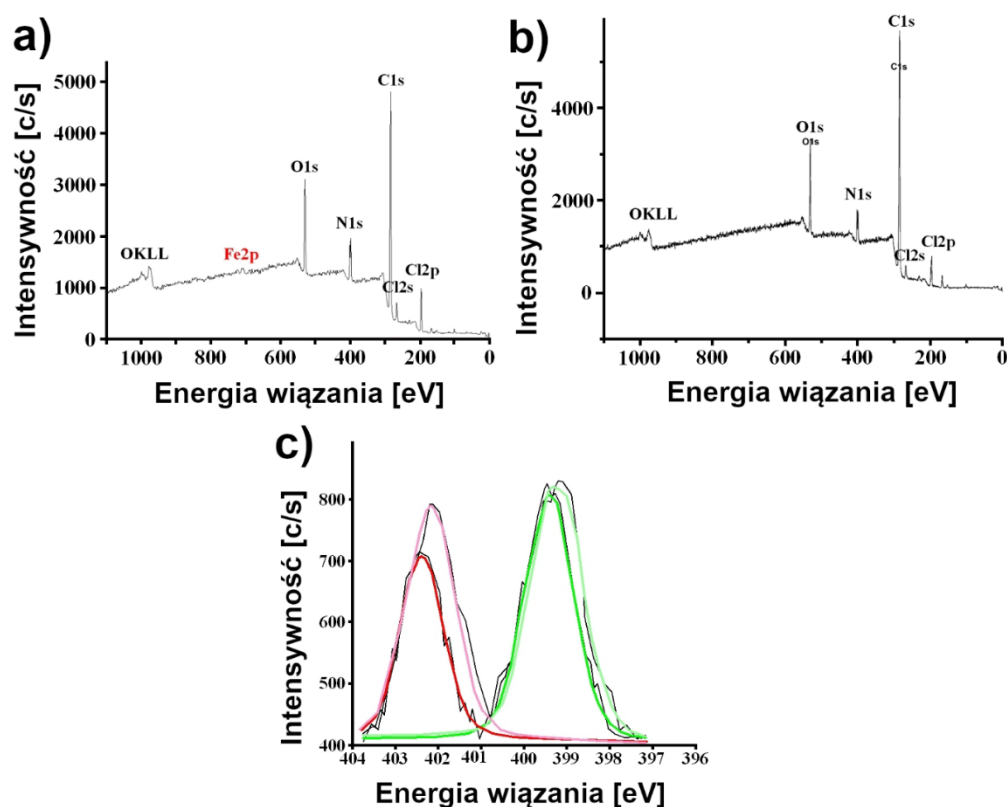
Rys. 54. Wyniki pomiarów AFM dla próbki poli(APTAC)+SPION: topografia (a) i wgłębienie (b) wraz z odpowiednim przekrojem obrazującym wgłębienie ostrza (c).

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że wprowadzone do szczotek polimerowych SPION, które najprawdopodobniej są owinięte przez łańcuchy szczepione z powierzchni, znacząco zwiększają moduł DMT całej warstwy. Na Rys. 54b zaobserwowano obiekty na powierzchni poli(APTAC)+SPION o znacznie wyższym module DMT (116–173 MPa), które mogą się odnosić do SPION znajdujących się w górnej części warstwy. Zmierzone wartości są o trzy rzędy wielkości mniejsze niż wartości literaturowe dla SPION (ok. 151–192 GPa) [218], co może być związane z faktem, że nanocząstki są w badanej próbce wspierane przez miękkie łańcuchy polimerowe, a nie zaadsorbowane bezpośrednio na powierzchni krzemu. Ponadto dużo niższa niż literaturowa wartość modułu DMT wynika także z właściwości zastosowanego ostrza, które służy do pomiaru materii miękkiej, dlatego otrzymane wartości modułów DMT wyznaczone dla SPION wystających z powierzchni nie mogą być traktowane ilościowe. Ostrze to wybrano ze względu na cel badań, którym było określenie właściwości polimeru bez i z wbudowanymi nanocząstkami, a nie pomiaru samych, dużo twardszych, nieorganicznych nanocząstek. Otrzymane wyniki wskazują, że wbudowane

w warstwę szczotek polimerowych SPION integrują całą warstwę poprzez sieciowanie łańcuchów polimerowych, powstałe w ich pobliżu w wyniku oddziaływań elektrostatycznych.

3.2.3.4. Analiza zawartości oraz rozmieszczenia pierwiastków w układach hybrydowych i szczotkach polimerowych

Ilość SPION, wbudowanych w matrycę szczotek polimerowych, określono za pomocą spektroskopii XPS, której wyniki przedstawiono na Rys. 55. W przypadku obu próbek, zarówno poli(APTAC)+SPION jak i referencyjnej poli(APTAC), zaobserwowano sygnały o charakterystycznych dla szczotek polimerowych energiach wiązania: C1s (284–286 eV), N1s (399–403 eV), O1s (531–533 eV) (Rys. 55a i b). Ponadto zaobserwowano również dwa pasma: Cl2s (270 eV) i Cl2p (200 eV) pochodzące od chloru, pełniącego rolę przeciwjonu dla dodatnio naładowanych szczotek poli(APTAC). W widmie poli(APTAC)+SPION widoczny jest również charakterystyczny sygnał odpowiadający energii wiązania 709 eV i pasmu Fe2p, związanemu z obecnością SPION.



Rys. 55. Wyniki XPS: widmo poli(APTAC)+SPION (a), widmo poli(APTAC) (b) oraz fragment widma (c) odpowiadający energiom wiązania N1s dla poli(APTAC)+SPION z pokryciem PLL (jasne linie) i bez pokrycia PLL (ciemne linie) (czerwona linia: $-C(NH)C-$, zielona linia: $-N^+(CH_3)_3$).

Na podstawie wyników XPS oszacowano całkowitą zawartość żelaza (związaną z obecnością SPION) oraz innych pierwiastków, których obecność jest związana z polimerami. Otrzymane wartości przedstawia Tabela 5.

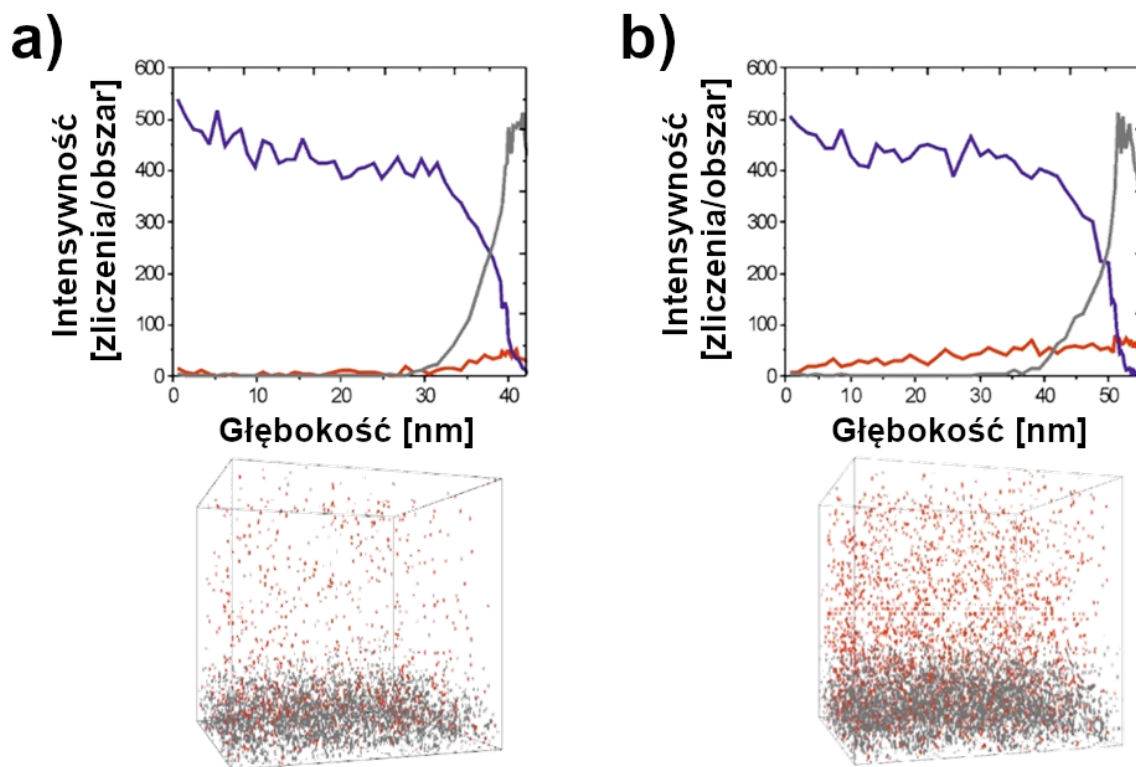
Tabela 5. Procentowy atomowy skład pierwiastkowy warstw poli(APTAC)+SPION i poli(APTAC), uzyskany na podstawie wyników XPS.

Próbka	Zawartość poszczególnych pierwiastków [%]			
	C1s	N1s	O1s	Fe2p
poli(APTAC)	69,8	13,1	12,3	0,0
poli(APTAC)+SPION	74,6	11,8	11,9	0,7

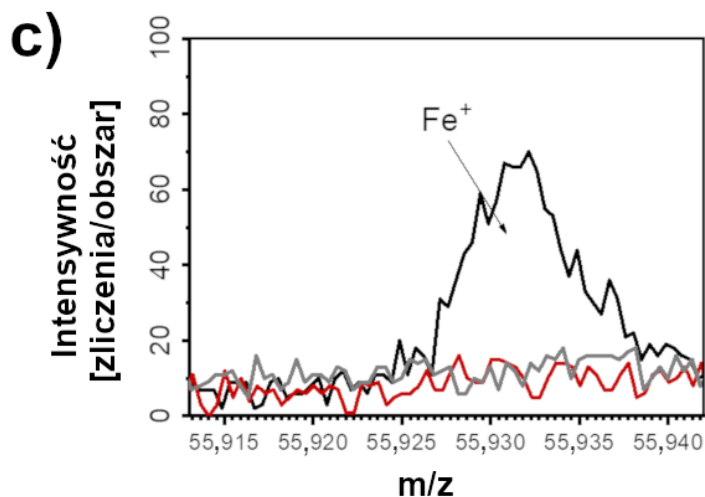
Ważną obserwacją jest również to, że sygnał N1s na widmie XPS jest podzielony na dwa pasma (Rys. 55c): o energii wiązania 399 eV odpowiadającej końcowej grupie kationowej $-N^+(CH_3)_3$ oraz 403 eV związanej z grupą $-CN-$ w łańcuchu głównym poli(APTAC). W związku z tym, na podstawie widm XPS można zaobserwować obecność cienkiej warstwy PLL na powierzchni szczotek poli(APTAC)+SPION. Oba pasma dla N1s na widmie szczotek z wbudowanymi nanocząstkami są nieznacznie zwiększone i przesunięte z powodu obecności dodatkowych grup $-NH-$ i $-NH_2$ związanych z PLL (jasne linie na Rys. 55c).

Jednorodny rozkład nanocząstek w całej objętości warstwy poli(APTAC)+SPION pokrytej PLL potwierdzono za pomocą spektrometrii SIMS. Aby uzyskać porównywalne intensywności w reprezentacji liniowej, w pomiarach zastosowano odpowiednie izotopy pierwiastków. Sygnał $^{13}CC_2H_{10}N^+$, charakterystyczny dla szczotek poli(APTAC) pojawił się również przy pomiarach dla próbki poli(APTAC)+SPION. Intensywność profili głębokościowych (Rys. 56a i b) na początku rozpylania pozostaje stała, aż do momentu gwałtownego spadku, kiedy sygnał ^{29}Si związany z podłożem krzemowych staje się bardziej intensywny. W przypadku próbki poli(APTAC)+SPION sygnał jonów Fe^+ , odpowiadający SPION jest obserwowany w całej warstwie szczotek polimerowych. Po zarejestrowaniu sygnału od podłoża krzemowego (^{29}Si) sygnał żelaza nie spada do zera, ze względu na efekt wbijania indukowany wiązką pierwotną. W próbce referencyjnej widoczny jest niewielki sygnał żelaza o intensywności na poziomie szumów aparaturowych. Ponadto, w dolnej części Rys. 56a i b przedstawiono rekonstrukcje przestrzenne intensywności sygnałów ^{29}Si oraz Fe dla próbek odpowiednio poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION. Na ich podstawie wyraźnie widać, że dla próbki z wbudowanymi nanocząstkami, sygnał żelaza pochodzący od SPION jest równomiernie rozdystrybuowany w matrycy polimerowej. Nieliczne sygnały żelaza widoczne

w próbce referencyjnej (poli(APTAC)) odpowiadają poziomowi tła, związanemu z szumami aparaturowymi (Rys. 56c).



Rekonstrukcja 3D intensywności sygnałów ^{29}Si i Fe

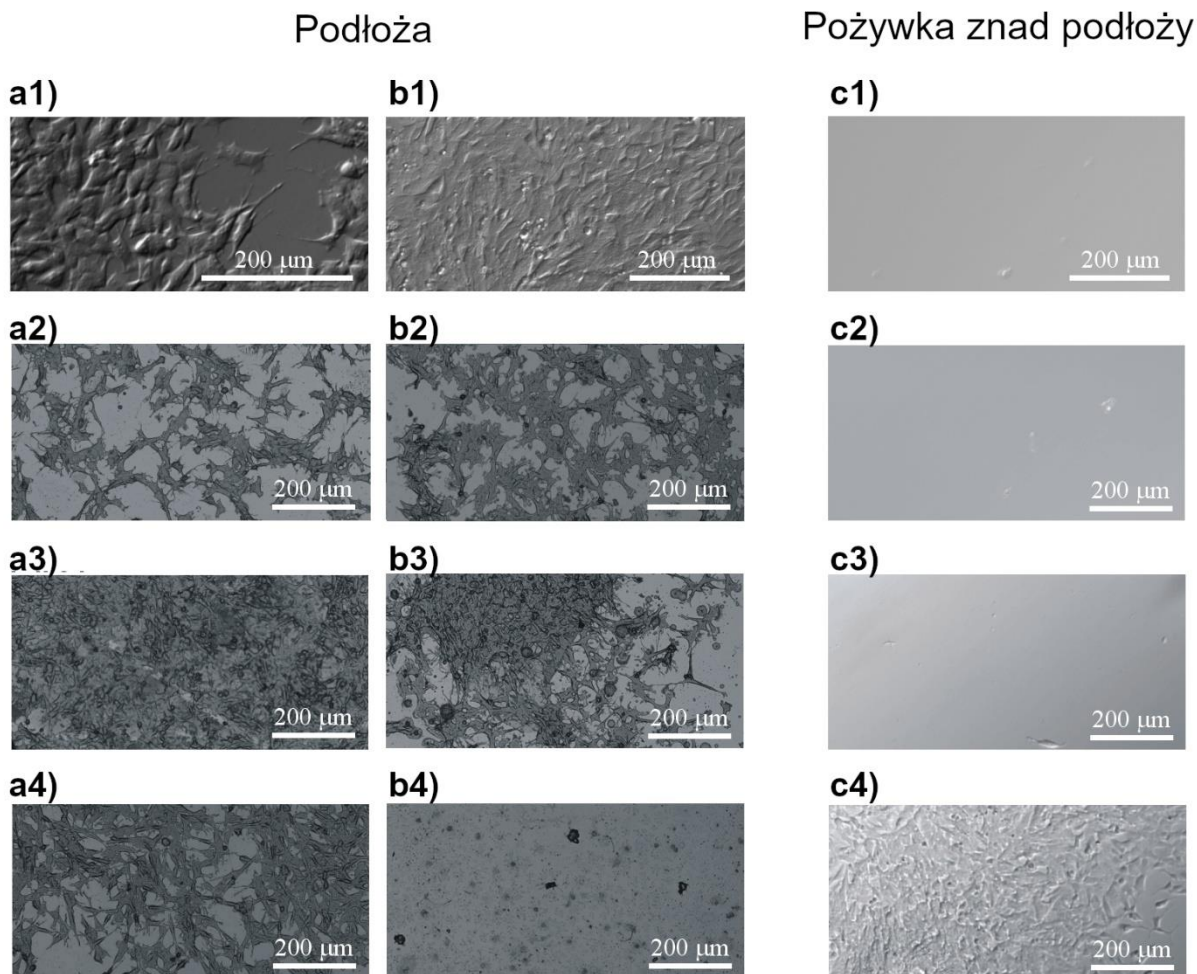


Rys. 56. Wyniki otrzymane na podstawie pomiarów SIMS: profile głębokościowe poli(APTAC) (a) i poli(APTAC)+SPION (b) pokrytych PLL (kolor szary reprezentuje sygnał ^{29}Si , fioletowy $^{13}\text{CC}_2\text{H}_{10}\text{N}$ i czerwony Fe) wraz z odpowiednimi rekonstrukcjami 3D obrazującymi rozkład przestrzenny Fe (czerwony) i ^{29}Si (szary), (c)—fragmenty zebranego widma masowego zawierające sygnał żelaza, zintegrowany z warstwy nad podłożem krzemowym dla szczotek poli(APTAC)+SPION (czarna linia), poli(APTAC) (czerwona linia) oraz niepokrytego krzemu (linia szara).

3.2.3.5. Badanie *in vitro* wpływu bodźca magnetycznego na zachowanie komórek *neuroblastoma*

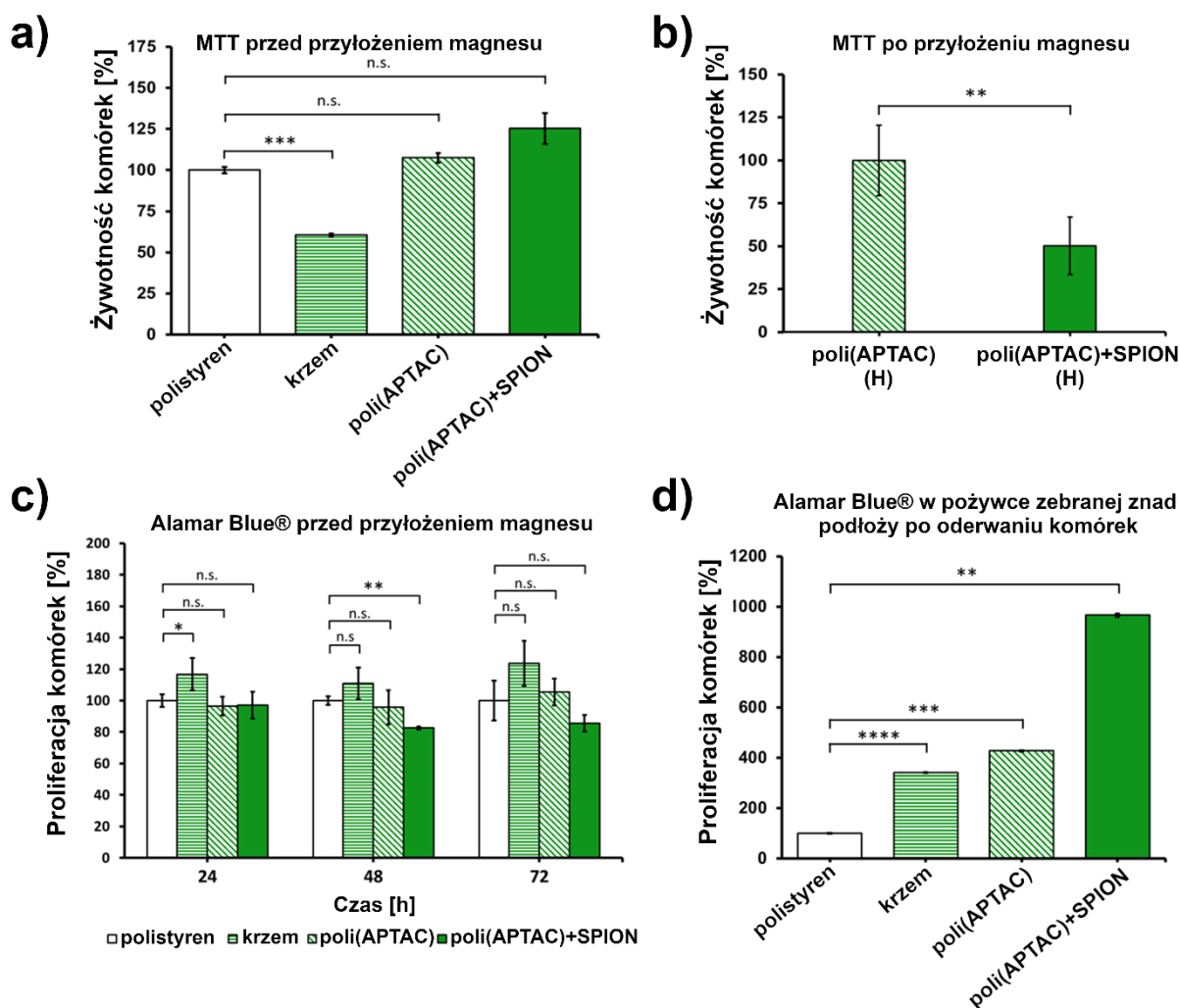
Biorąc pod uwagę możliwość zastosowania otrzymanych hybrydowych warstw w hodowlach komórkowych, istotnym jest określenie morfologii komórek przylegających do powierzchni takich podłoży. Zachowanie komórek *neuroblastoma* hodowanych na podłożach poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION, które wybrano do badań ze względu na niższą wrażliwość na zmieniające się warunki otoczenia, badano poprzez bezpośrednie obserwacje pod mikroskopem optycznym. Przed zastosowaniem bodźca magnetycznego w postaci magnesu neodymowego, wszystkie powierzchnie obrazowano pod kątem niekontrolowanego odrywania komórek bez zewnętrznego czynnika. Jak pokazano na Rys. 57a komórki dobrze przylegały do wszystkich prezentowanych powierzchni (polistyren, krzem, poli(APTAC) oraz poli(APTAC)+SPION). Na Rys. 57b przedstawiono obrazy mikroskopowe, wykonane po 48 h od momentu przyłożenia magnesu neodymowego do podłoży z wyhodowanymi komórkami, dla referencyjnego polistyrenu, podłoża krzemowego z warstwą PLL, szczotek poli(APTAC) oraz układu hybrydowego poli(APTAC)+SPION. Komórki *neuroblastoma* hodowane na powierzchni poli(APTAC) po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego nadal dobrze przylegały do powierzchni warstwy i wykazywały standardową morfologię (Rys. 57b3) porównywalną z polistyrenem (Rys. 57b1) i krzemową próbką referencyjną (Rys. 57b2). Można również zaobserwować, że komórki były stosunkowo równomiernie rozmieszczone na powierzchni próbek. W przypadku komórek hodowanych na powierzchni układu hybrydowego poli(APTAC)+SPION stwierdzono, że większość z nich uległa oderwaniu od powierzchni (Rys. 57b4). Część komórek, która pozostała na powierzchni, wykazywała skurczoną i zapadniętą morfologię. W celu zbadania żywotności komórek oderwanych od powierzchni przeprowadzono obserwację w postaci zdjęć mikroskopowych pożywki hodowlanej zebranej znad badanych podłoży i umieszczonej w sterylnych płytkach wielodołkowych. Jak można zauważyć na Rys. 57c, warstwy komórek odrywały się pod wpływem pola magnetycznego wyłącznie od powierzchni poli(APTAC)+SPION i były widoczne w pobranej znad podłoża pożywce (Rys. 57c4). Efektu tego nie zaobserwowano w przypadku pozostałych trzech próbek – polistyrenowej, krzemowej oraz poli(APTAC) (Rys. 57c1–c3). Przed obrazowaniem optycznym płytkę wielodołkową z pobraną pożywką inkubowano przez 2 h w 37°C, aby umożliwić komórkom adhezję do nowej sterylnej powierzchni. Wartym odnotowania jest fakt, że oderwane od powierzchni poli(APTAC)+SPION komórki obserwowane w pożywce pod mikroskopem optycznym były żywe, zdolne do dalszej adhezji i wykazywały prawidłową

morfologię po przeniesieniu na nowe sterylne podłoże, co potwierdziły przedstawione w dalszej części pracy wyniki testu proliferacji.



Rys. 57. Obrazy z mikroskopu optycznego komórek nerwiaka niedojrzałego hodowanych przed (a) i po (b) przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego oraz komórek oderwanych od powierzchni i znajdujących się w pożywce zbieranej znad płytek (c): 1. Polistyren, 2. Krzem modyfikowany PLL, 3. Szczotki poli(APTAC) z PLL, 4. Szczotki poli(APTAC)+SPION z PLL.

Chcąc ocenić ilościowo jak duża część komórek uległa oderwaniu od powierzchni wykonano test MTT, badający żywotność komórek. Eksperymenty MTT wykazały, że otrzymane podłoża umożliwiają odpowiedni wzrost hodowanych komórek i nie powodują efektu cytotoksycznego. Stwierdzono, że różnica w żywotności komórek między próbką kontrolną (komórki hodowane bezpośrednio na płytce wielodołkowej) a komórkami hodowanymi na powierzchni płytek krzemowych z warstwą poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION jest statystycznie nieistotna (Rys. 58a). Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano jedynie dla komórek hodowanych na podłożu krzemowym bez warstwy polimeru.

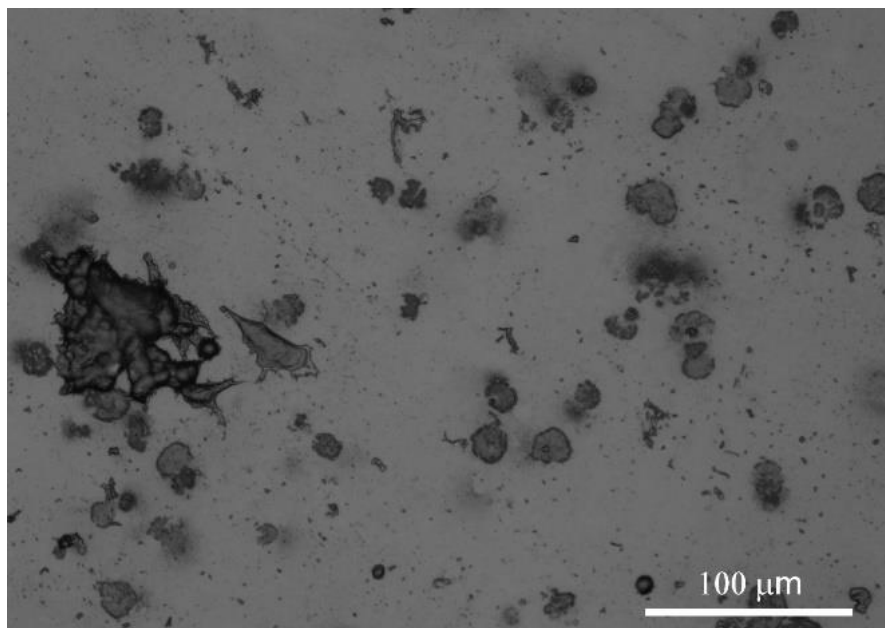


Rys. 58. (a) Wyniki żywotności komórek neuroblastoma (test MTT) dla referencyjnych próbek polistyrenu i krzemu, podłoża poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION przed przyłożeniem pola magnetycznego; (b) Rezultat testu MTT dla komórek neuroblastoma ilustrujący ilość komórek pozostających na powierzchni podłoża poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION po ekspozycji na zewnętrzne pole magnetyczne (H); (c) Wyniki proliferacji komórek neuroblastoma określone za pomocą testu Alamar Blue® przed oderwaniem komórek wywołanym polem magnetycznym oraz (d) po zastosowaniu bodźca magnetycznego i zebraniu pożywki wraz z komórkami znad powierzchni podłoża. Dane przedstawiono jako procentowy wzrost w odniesieniu do polistyrenu (100%). Wartości p podano również w odniesieniu do polistyrenu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta ($n = 3$).

Ponadto komórki hodowane na podłożu poli(APTAC)+SPION zostały z powodzeniem oderwane od powierzchni poprzez zmiany konformacyjne wywołane bodźcem magnetycznym, o czym może świadczyć ilość komórek, które pozostały na powierzchni układu hybrydowego i wykazały zdolność do wytworzenia kryształów formazanu, równą $(50,3 \pm 16,9)\%$ (Rys. 58b). Analogicznie wyniki uzyskane w teście proliferacji przed przyłożeniem magnesu (Rys. 58c) wykazały, że komórki neuroblastoma hodowane na czterech rodzajach podłoży (polistyren,

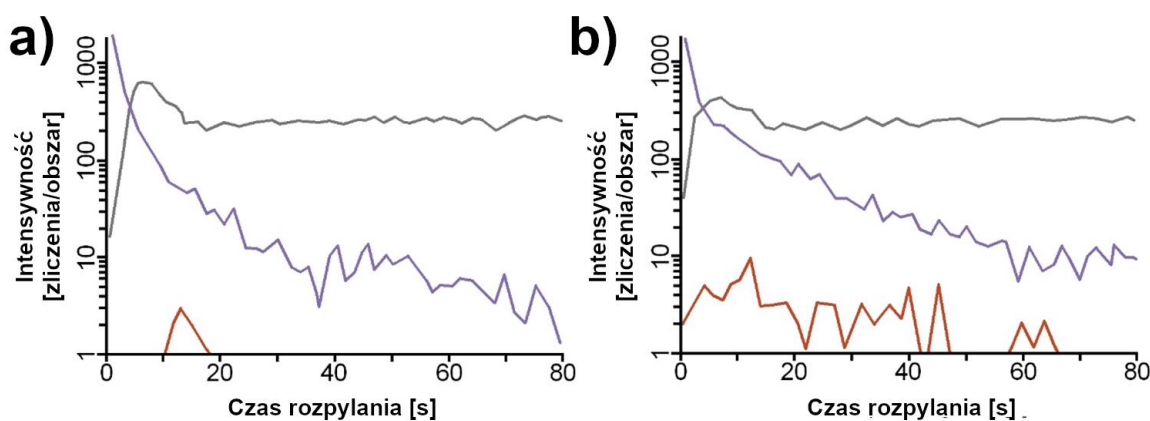
krzem, poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION) proliferowały w podobnym stopniu podczas hodowli, z wyjątkiem komórek hodowanych na krzemie, które wykazywały zwiększoną proliferację względem pozostałych próbek. Ponadto wyniki uzyskane dla pożywki pobranej znad powierzchni każdego z wyżej wymienionych podłoży po zastosowaniu pola magnetycznego (Rys. 58d), wykazały zauważalną różnicę w proliferacji i ilości komórek odłączonych od powierzchni poli(APTAC)+SPION w stosunku do komórek odłączonych z polistyrenu, krzemu i poli(APTAC). Zaobserwowano, że komórki *neuroblastoma* pobrane w pożywce z powierzchni poli(APTAC)+SPION po 48h w zewnętrznym polu magnetycznym wykazywały znacznie większą proliferację niż komórki pobrane z pozostałych podłoży. Może to być związane z większą liczbą komórek oderwanych od powierzchni szczotek poli(APTAC)+SPION i zebranych w pożywce. Wysoka proliferacja komórek odłączonych pod wpływem bodźca magnetycznego od powierzchni poli(APTAC)+SPION świadczy również o ich dobrej kondycji po separacji, co dobrze rokuje na ich potencjalne dalsze wykorzystanie.

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że otrzymane podłoże, składające się ze szczotek polimerowych poli(APTAC) oraz wbudowanych SPION z warstwą PLL, wspomaga wzrost komórek. Dodatkowo warstwa poli(APTAC)+SPION skutecznie indukuje oderwanie się komórek pod wpływem bodźca magnetycznego [162]. Na podstawie pomiarów AFM spęczniałych szczotek polimerowych (Rys. 48) można z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że proces odrywania się komórek od powierzchni jest związany ze zmianami konformacyjnymi szczotek poli(APTAC)+SPION, gdzie nanocząstki powodują znaczący wzrost chropowatości RMS. Może to być spowodowane migracją nanocząstek magnetycznych ku górze, w kierunku magnesu neodymowego, przykładanego w niewielkiej odległości nad powierzchnią podłoża. W rezultacie, łańcuchy poli(APTAC) ulegają wyeksponowaniu spod warstwy PLL. Łańcuchy poli(APTAC) posiadające w swojej strukturze silne kationowe grupy $-NH_4^+$, znacząco utrudniają hodowlę i proliferację komórek *neuroblastoma*, co zostało zaobserwowane po zobrazowaniu powierzchni poli(APTAC)+SPION bez warstwy PLL (Rys. 59), na której wyhodowano komórki nowotworowe. Stąd kontakt komórek z wyeksponowanymi łańcuchami poli(APTAC) powoduje ich oderwanie się od powierzchni poli(APTAC)+SPION.



Rys. 59. Obraz z mikroskopu optycznego komórek neuroblastoma wyhodowanych na szczotkach poli(APTAC)+SPION bez dodatkowej warstwy PLL.

Zastosowanie bodźca magnetycznego do odrywania komórek ma wiele zalet i możliwości, nie powodując jednocześnie uwalniania nanocząstek z warstwy szczotek polimerowych. Jak wykazały widma SIMS po 48 h w polu magnetycznym, SPION nadal znajdują się w warstwie szczotek poli(APTAC) (Rys. 60).



Rys. 60. Wyniki SIMS dla badanych podłoży poddanych działaniu zewnętrznego pola magnetycznego przez 48 godzin: profile głębokościowe SIMS dla poli(APTAC) (a) i poli(APTAC)+SPION (b) po oderwaniu komórek neuroblastoma (kolor szary przedstawia sygnał ^{29}Si , fioletowy $^{13}\text{CC}_2\text{H}_{10}\text{N}$, a czerwony Fe).

Zaprezentowany sposób odrywania komórek jest nieinwazyjny, szczególnie w porównaniu z konwencjonalnymi metodami oddzielania komórek od podłoża, takimi jak mechaniczne zeskrobywanie komórek lub ich enzymatyczne odrywanie (np. trypsynowanie), które mogą powodować ich degradację oraz upośledzenie funkcjonalności [159]. Z kolei

szeroko badane czułe na temperaturę podłoża do hodowli komórkowych, ze względu na bodziec temperaturowy, zawsze oddziałują na całą hodowlę komórkową, stąd nie można osiągnąć kontroli zachowania pojedynczych komórek lub grup komórek w konkretnych obszarach [219]. Istotnym jest fakt, że oderwane komórki są żywe i zdolne do dalszego wzrostu, co daje prezentowanym podłożom ogromne możliwości wykorzystania w inżynierii tkankowej. Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione w tej części pracy wyniki można stwierdzić, że proponowany hybrydowy polimerowo-nieorganiczny system łączący szczotki polimerowe poli(APTAC) i SPION może być obiecującym podłożem, reagującym na bodziec magnetyczny, do zastosowań w hodowlach komórkowych i w kontrolowanym odrywaniu komórek.

3.2.4. Wnioski

W niniejszej części pracy zaprezentowano stosunkowo łatwą i wydajną metodę tworzenia hybrydowych nanokompozytów, opartych na szczotkach polimerowych (poli(APTAC)) oraz SPION, poprzez inicjowaną powierzchniowo polimeryzację ATRP wspomaganą ultradźwiękami. Za pomocą mikroskopii sił magnetycznych MFM przedstawiono sygnały magnetyczne pochodzące od dobrze odseparowanych nanocząstek z całej powierzchni otrzymanej warstwy poli(APTAC)+SPION. Pomimo niewielkiej zawartości SPION (ok. 1%), przy użyciu mapowania QNM wykazano dwukrotnie wyższy moduł sprężystości utworzonych warstw szczotek poli(APTAC)+SPION, w porównaniu do szczotek bez wbudowanych nanocząstek. Pokazano również, że ciągłe poddawanie układu działaniu ultradźwięków podczas polimeryzacji ATRP nie blokuje wzrostu szczotek polimerowych szczepionych z powierzchni krzemu, jednocześnie ograniczając niepożądaną agregację wprowadzanych nanocząstek. Na podstawie obrazów AFM stwierdzono, że na powierzchni próbki poli(APTAC)+SPION nie występują zagregowane SPION. Zaproponowana metoda wykorzystuje nanocząstki utworzone *ex situ*, których właściwości można określić i zoptymalizować przed wprowadzeniem ich do warstwy polimeru. Jednorodne wprowadzenie SPION do szczotek poli(APTAC) zostało również potwierdzone za pomocą trójwymiarowych obrazów przestrzennego rozmieszczenia żelaza i krzemu przy użyciu technik SIMS i XPS. Ponadto spektroskopia XPS została wykorzystana do oszacowania całkowitej ilości żelaza z SPION w hybrydowym podłożu, która wyniosła ok. 0,7% całkowitej masy. Pokazaną metodę otrzymywania układów hybrydowych można potraktować jako model tworzenia innych struktur kompozytowych, złożonych z obdarzonych ładunkiem nanocząstek, oddziałujących elektrostatycznie z przeciwnie naładowanymi łańcuchami polimeru, szczepionymi z powierzchni.

Otrzymane hybrydowe podłoża przebadano pod kątem ich wykorzystania jako czułe na bodźce podłoża do hodowli komórkowych. Zaobserwowano, że komórki *neuroblastoma*, hodowane na szczotkach poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION pokrytych warstwą PLL, przylegały do powierzchni i wykazywały standardową morfologię, co świadczy o braku cytotoksyczności otrzymanych podłoży. Jednak po 48 h pod wpływem przyłożonego pola magnetycznego, komórki hodowane na podłożu poli(APTAC)+SPION oderwały się bądź znacznie zmniejszyły swoją przyczepność do powierzchni. Odłączenie komórek wywołane zewnętrznym bodźcem w postaci pola magnetycznego, umożliwiło nieinwazyjne i niewymagające dodatkowych związków chemicznych, kontrolowane przeniesienie wyhodowanych komórek *neuroblastoma* w nowe miejsce. Obecność SPION w podłożu oraz zastosowanie pola magnetycznego stanowiły niezbędne warunki do kontrolowanego przenoszenia komórek. Wyraźna różnica pomiędzy próbką poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION sprawia, że otrzymany układ hybrydowy posiada wszystkie istotne cechy, aby stać się efektywnym, kontrolowanym i czułym na bodźce podłożem do hodowli komórkowych. Warto również zwrócić uwagę, że wszystkie uzyskane podłoża, pomimo różnic w chropowatości powierzchni i grubości warstwy polimerowej, nie są w stanie spowodować oderwania się hodowanych komórek bez zastosowania bodźca magnetycznego.

4. PODSUMOWANIE ROZPRAWY

W badaniach zaprezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej, dotyczącej polimerowo-nieorganicznych układów hybrydowych zawierających nanocząstki magnetyczne oraz ich zastosowań w biomedycynie, skoncentrowano się na dwóch zasadniczych podejściach do ich tworzenia. Pierwszym było otrzymanie i scharakteryzowanie nanocząstek magnetycznych domieszkowanych cynkiem i pokrytych warstwą polimeru w celu ich zastosowania w hipertermii magnetycznej. Druga część badań dotyczyła warstw szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami magnetycznymi i ich potencjalnym zastosowaniu jako czułe na bodźce podłoża do hodowli komórkowych. Nieorganiczne nanocząstki magnetyczne stanowiły ogniwo łączące obie części badań.

Synteza superparamagnetycznych nanoferrytów cynkowych pokrytych kationową pochodną chitozanu i badania na nich przeprowadzone pozwoliły na stworzenie hybrydowych układów o rozmiarach rdzeni równych ok. 10 nm oraz średnicach hydrodynamicznych sięgających ok. 200 nm. Potwierdzono wbudowanie cynku w strukturę nanocząstek, a chitozanowe pokrycie zapewniło stabilizację otrzymanej wodnej zawiesiny SPION-Zn₂-CCh(+). Istotnym z perspektywy potencjalnych zastosowań biomedycznych jest wysoka stabilność otrzymanej zawiesiny w czasie nawet po 12 miesiącach przechowania. Zaproponowana w niniejszej pracy metoda otrzymywania hybrydowych nanoferrytów otwiera również nowe możliwości łatwego tworzenia ferrytów innych metali, o strukturze i składzie wcześniej trudno osiągalnych i potencjalnie lepszych właściwościach (np. magnetycznych). Eksperymenty hipertermii magnetycznej wykazały, że zastosowanie otrzymanych nanocząstek SPION-Zn₂-CCh(+) jako czynników grzewczych, już przy stosunkowo niskim stężeniu, pozwala efektywnie osiągnąć temperaturę wymaganą w MH (41–46°C). Na podstawie wartości współczynnika SAR oraz ILP stwierdzono, że domieszkowanie cynkiem pozwala zwiększyć zdolność grzewczą nanocząstek, co umożliwia stosowanie zawiesin o niższych stężeniach, zwiększając bezpieczeństwo i komfort pacjenta poddanego terapii MH. Przeprowadzone testy *in vitro* na liniach komórkowych udowodniły, że otrzymane układy hybrydowe skutecznie wywołują śmierć komórek nowotworowych nawet przy najmniejszym badanym stężeniu (0,18 mg Fe/ml). Istotnym jest również fakt, że otrzymane układy ze względu na domieszkowanie pierwiastkiem endogennym (Zn) oraz na biokompatybilną chitozanową powłokę, nie wykazywały cytotoksyczności wobec komórek w badanym zakresie stężeń bez obecności zewnętrznego pola magnetycznego. Ponadto stosunkowo duże namagnesowanie otrzymanych nanoferrytów cynkowych wraz z podwyższoną efektywnością generowania przez

nie ciepła sprawiły, że zsyntezowane układy hybrydowe są bardzo obiecującymi kandydatami do terapii metodą MH, umożliwiającymi zastosowanie znacznie mniejszych stężeń substancji grzewczej niż w aktualnie stosowanych związkach komercyjnych.

Badania dotyczące hybrydowych nanokompozytów, opartych na szczotkach kationowego polimeru zawierających nanocząstki magnetyczne, umożliwiły opracowanie metody otrzymywania bazującej na polimeryzacji ATRP wspomaganej ultradźwiękami. Dzięki zastosowaniu mikroskopii MFM potwierdzono właściwości magnetyczne uzyskanych warstw, a stosując mapowanie QNM wykazano wzrost modułu sprężystości nanokompozytów z wbudowanymi nanocząstkami w odniesieniu do szczotek polimerowych bez wprowadzonych nanocząstek. Na podstawie obrazów AFM, SIMS i XPS stwierdzono również, że poddawanie otrzymanych warstw działaniu ultradźwięków podczas polimeryzacji nie blokuje wzrostu szczotek polimerowych szczepionych z powierzchni krzemu przy jednoczesnym ograniczaniu niepożądanego agregacji nanocząstek zawartych w nanokompozycie. Zaprezentowaną metodę otrzymywania nanokompozytów można potraktować jako model tworzenia innych struktur kompozytowych, złożonych z obdarzonych ładunkiem nanocząstek, oddziałujących elektrostatycznie z przeciwnie naładowanymi łańcuchami polimeru, szczepionymi z powierzchni. Badania przeprowadzone pod kątem zastosowania uzyskanych nanokompozytów jako czułe na bodźce podłoża do hodowli komórkowych udowodniły, że komórki *neuroblastoma* chętnie przylegały do powierzchni otrzymanych podłoży z warstwą PLL i wykazywały standardową morfologię. Na tej podstawie wywnioskowano, że otrzymane nanokompozyty nie wykazywały cytotoksyczności względem badanej linii komórkowej. Co istotne, przyłożenie na 48 h zewnętrznego pola magnetycznego do nanokompozytu zawierającego nanocząstki magnetyczne spowodowało nieinwazyjne i niewymagające dodatkowych związków chemicznych, kontrolowane odłączenie się komórek i umożliwiło ich przeniesienie w nowe miejsce. Wartym odnotowania jest fakt, że obecność SPION w badanym podłożu oraz zastosowanie zewnętrznego pola magnetycznego stanowiły warunek konieczny do kontrolowanego oderwania i przeniesienia komórek— wszystkie uzyskane podłoża nie były w stanie spowodować oderwania się hodowanych komórek bez zastosowania bodźca magnetycznego. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że otrzymany hybrydowy nanokompozyt posiada wszystkie istotne cechy, aby stać się efektywnym, kontrolowanym i czułym na bodźce podłożem do hodowli komórkowych.

Wyniki omówionych powyżej badań stały się przedmiotem trzech publikacji w międzynarodowych czasopismach oraz wystąpień na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych, których spis przedstawiono w części: Dorobek Naukowy.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Müller, K.; Bugnicourt, E.; Latorre, M.; Jorda, M.; Echegoyen Sanz, Y.; Lagaron, J.; Miesbauer, O.; Bianchin, A.; Hankin, S.; Böhlz, U.; et al. Review on the Processing and Properties of Polymer Nanocomposites and Nanocoatings and Their Applications in the Packaging, Automotive and Solar Energy Fields. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 74
- [2] Zhou, L.; Jiang, Y. Recent progress in dielectric nanocomposites. *Mater. Sci. Technol.* **2020**, *36*, 1–16
- [3] Park, W.; Shin, H.; Choi, B.; Rhim, W.K.; Na, K.; Keun Han, D. Advanced hybrid nanomaterials for biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.* **2020**, *114*, 100686
- [4] Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.Y.; Lowry, G. V.; Jolivet, J.P.; Wiesner, M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634–641
- [5] De Crozals, G.; Bonnet, R.; Farre, C.; Chaix, C. Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide. *Nano Today* **2016**, *11*, 435–463
- [6] Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R.N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110
- [7] Liu, S.; Yu, B.; Wang, S.; Shen, Y.; Cong, H. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *281*, 102165
- [8] Gelmi, A.; Schutt, C.E. Stimuli-Responsive Biomaterials: Scaffolds for Stem Cell Control. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2001125
- [9] Schwaminger, S.P.; Bauer, D.; Fraga-García, P.; Wagner, F.E.; Berensmeier, S. Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties. *CrystEngComm* **2017**, *19*, 246–255
- [10] Spaldin, N.A. 9. Ferrimagnetism, In: *Magnetic materials: fundamentals and applications*, Cambridge: Cambridge University Press; **2010**, p. 113–129
- [11] Teja, A.S.; Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2009**, *55*, 22–45
- [12] Bedanta, S.; Kleemann, W. Supermagnetism. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2009**, *42*, 013001
- [13] Belyanina, I.; Kolovskaya, O.; Zamay, S.; Gargaun, A.; Zamay, T.; Kichkailo, A. Targeted magnetic nanotheranostics of cancer. *Molecules* **2017**, *22*, 975: 1-19
- [14] Okuhata, Y. Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *37*, 121–137
- [15] Obaidat, I.M.; Narayanaswamy, V.; Alaabed, S.; Sambasivam, S.; Muralee Gopi, C.V. V. Principles of Magnetic Hyperthermia: A Focus on Using Multifunctional Hybrid Magnetic Nanoparticles. *Magnetochemistry* **2019**, *5*, 67, 1–40
- [16] Gupta, A.K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021
- [17] Karimi, Z.; Karimi, L.; Shokrollahi, H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 2465–2475
- [18] Illés, E.; Szekeres, M.; Tóth, I.Y.; Szabó, Á.; Iván, B.; Turcu, R.; Vékás, L.; Zupkó, I.; Jaics, G.; Tombácz, E. Multifunctional PEG-carboxylate copolymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for

- biomedical application. *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, *451*, 710–722
- [19] Kirschvink, J.L.; Gould, J.L. Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *BioSystems* **1981**, *13*, 181–201
- [20] Baumgartner, J.; Bertinetti, L.; Widdrat, M.; Hirt, A.M.; Faivre, D. Formation of Magnetite Nanoparticles at Low Temperature: From Superparamagnetic to Stable Single Domain Particles. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–6
- [21] Prozorov, T.; Mallapragada, S.K.; Narasimhan, B.; Wang, L.; Palo, P.; Nilsen-Hamilton, M.; Williams, T.J.; Bazylinski, D.A.; Prozorov, R.; Canfield, P.C. Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 951–957
- [22] Yan, L.; Zhang, S.; Chen, P.; Liu, H.; Yin, H.; Li, H. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiol. Res.* **2012**, *167*, 507–519
- [23] Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; Ul Haq, I.; Phull, A.R.; Ali, J.S.; Hussain, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, *9*, 49–67
- [24] Duan, M.; Shapter, J.G.; Qi, W.; Yang, S.; Gao, G. Recent progress in magnetic nanoparticles: Synthesis, properties, and applications. *Nanotechnology* **2018**, *29*, 1–17
- [25] Mohammed, L.; Gomaa, H.G.; Ragab, D.; Zhu, J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology* **2017**, *30*, 1–14
- [26] Amendola, V.; Riello, P.; Meneghetti, M. Magnetic nanoparticles of iron carbide, iron oxide, iron@iron oxide, and metal iron synthesized by laser ablation in organic solvents. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 5140–5146
- [27] Cabrera, L.; Gutierrez, S.; Menendez, N.; Morales, M.P.; Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 3436–3441
- [28] Daou, T.J.; Pourroy, G.; Bégin-Colin, S.; Grenèche, J.M.; Ulhaq-Bouillet, C.; Legaré, P.; Bernhardt, P.; Leuvrey, C.; Rogez, G. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4399–4404
- [29] Glasgow, W.; Fellows, B.; Qi, B.; Darroudi, T.; Kitchens, C.; Ye, L.; Crawford, T.M.; Mefford, O.T. Continuous synthesis of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles via thermal decomposition. *Particuology* **2016**, *26*, 47–53
- [30] El-Sherbiny, I.M.; El-Sayed, M.; Reda, A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) as Multifunctional Cancer Theranostics, In: Sharma S., Javed Y. (eds) Magnetic Nanoheterostructures. Nanomedicine and Nanotoxicology, Springer, Cham; **2020**, p. 223–241
- [31] Liu, Z.L.; Wang, X.; Yao, K.L.; Du, G.H.; Lu, Q.H.; Ding, Z.H.; Tao, J.; Ning, Q.; Luo, X.P.; Tian, D.Y.; et al. Synthesis of magnetite nanoparticles in W/O microemulsion. *J. Mater. Sci.* **2004**, *39*, 2633–2636
- [32] Bae, S.J.; Park, J.A.; Lee, J.J.; Lee, G.H.; Kim, T.J.; Yoo, D.S.; Chang, Y. Ultrasmall iron oxide nanoparticles: Synthesis, physicochemical, and magnetic properties. *Curr. Appl. Phys.* **2009**, *9*, 19–21
- [33] Ramimoghadam, D.; Bagheri, S.; Bee, S.; Hamid, A. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2014**, *368*, 207–229
- [34] Horák, D. Magnetic Nano- and Microparticles in Life Sciences and Medical Imaging, In: Sharma S., Javed Y. (eds) Magnetic Nanoheterostructures. Nanomedicine and Nanotoxicology, Springer, Cham; **2020**, p. 161–221

- [35] Niraula, G.; Shrivastava, N.; Akhtar, K.; Javed, Y.; Coaquira, J.A.H.; Sharma, S.K. Liquid-Phase Synthesis of Multifunctional Nanomaterials: A Recent Update, In: Sharma S., Javed Y. (eds) *Magnetic Nanoheterostructures. Nanomedicine and Nanotoxicology*, Springer, Cham; **2020**, p. 1–56
- [36] Irfan Hussain, M.; Xia, M.; Xiao-NaRen; Akhtar, K.; Nawaz, A.; Sharma, S.K.; Javed, Y. Ferrite Nanoparticles for Biomedical Applications, In: Sharma S., Javed Y. (eds) *Magnetic Nanoheterostructures. Nanomedicine and Nanotoxicology*, Springer, Cham; **2020**, p. 243–265
- [37] Blanco-Andujar, C.; Walter, A.; Cotin, G.; Bordeianu, C.; Mertz, D.; Felder-Flesch, D.; Begin-Colin, S. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 1889–1910
- [38] Dadfar, S.M.; Roemhild, K.; Drude, N.I.; von Stillfried, S.; Knüchel, R.; Kiessling, F.; Lammers, T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 302–325
- [39] Su, C.H.; Tsai, C.Y.; Tomanek, B.; Chen, W.Y.; Cheng, F.Y. Evaluation of blood-brain barrier-stealth nanocomposites for in situ glioblastoma theranostics applications. *Nanoscale* **2016**, *8*, 7866–7870
- [40] Xiao, Y.; Du, J. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 354–367
- [41] Abulrob, A.; Corluka, S.; Blasiak, B.; Gino Fallone, B.; Ponjevic, D.; Matyas, J.; Tomanek, B. LyP-1 Conjugated Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging of Triple Negative Breast Cancer. *Mol. Imaging Biol.* **2018**, *20*, 428–435
- [42] Kania, G.; Sternak, M.; Jaształ, A.; Chlopicki, S.; Błażejczyk, A.; Nasulewicz-Goldeman, A.; Wietrzyk, J.; Jasiński, K.; Skórka, T.; Zapotoczny, S.; et al. Uptake and bioreactivity of charged chitosan-coated superparamagnetic nanoparticles as promising contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2018**, *14*, 131–140
- [43] Grobner, T. Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21*, 1104–1108
- [44] Shibu, E.S.; Ono, K.; Sugino, S.; Nishioka, A.; Yasuda, A.; Shigeri, Y.; Wakida, S.I.; Sawada, M.; Biju, V. Photocaging nanoparticles for MRI and fluorescence imaging in vitro and in vivo. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9851–9859
- [45] Chen, F.; Ellison, P.A.; Lewis, C.M.; Hong, H.; Zhang, Y.; Shi, S.; Hernandez, R.; Meyerand, M.E.; Barnhart, T.E.; Cai, W. Chelator-Free Synthesis of a Dual-Modality PET/MRI Agent. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 13319–13323
- [46] Shin, T.-H.; Choi, Y.; Kim, S.; Cheon, J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4501–4516
- [47] Kuznetsov, A.A.; Filippov, V.I.; Nikolskaya, T.A.; Budko, A.P.; Kovarskii, A.L.; Zontov, S. V.; Kogan, B.Y.; Kuznetsov, O.A. Biodistribution of doxorubicin and nanostructured ferrocenyl carrier particles in organism during magnetically controlled drug delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1575–1579
- [48] Reddy, L.H.; Arias, J.L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818–5878
- [49] Niemirowicz-Laskowska, K.; Mystkowska, J.; Łysik, D.; Chmielewska, S.; Tokajuk, G.; Misztalewska-

- Turkowicz, I.; Wilczewska, A.Z.; Bucki, R. Antimicrobial and Physicochemical Properties of Artificial Saliva Formulations Supplemented with Core-Shell Magnetic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1979, 1–17
- [50] Dheyab, M.A.; Aziz, A.A.; Jameel, M.S.; Noqta, O.A.; Mehrdel, B. Synthesis and coating methods of biocompatible iron oxide/gold nanoparticle and nanocomposite for biomedical applications. *Chinese J. Phys.* **2020**, *64*, 305–325
- [51] Bock, N.; Riminucci, A.; Dionigi, C.; Russo, A.; Tampieri, A.; Landi, E.; Goranov, V.A.; Marcacci, M.; Dediu, V. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 786–796
- [52] Leopold, L. Thyro-Endocrine Hyperthermia. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* **1919**, *82*, 344–346
- [53] Di Corato, R.; Béalle, G.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Espinosa, A.; Clément, O.; Silva, A.K.A.; Ménager, C.; Wilhelm, C. Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2904–2916
- [54] Kumar, R.; Chauhan, A.; Jha, S.K.; Kuanr, B.K. Localized cancer treatment by radio-frequency hyperthermia using magnetic nanoparticles immobilized on graphene oxide: from novel synthesis to *in vitro* studies. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 5385–5399
- [55] Sanz, B.; Calatayud, M.P.; Torres, T.E.; Fanarraga, M.L.; Ibarra, M.R.; Goya, G.F. Magnetic hyperthermia enhances cell toxicity with respect to exogenous heating. *Biomaterials* **2017**, *114*, 62–70
- [56] Mandawala, C.; Chebbi, I.; Durand-Dubief, M.; Le Fèvre, R.; Hamdous, Y.; Guyot, F.; Alphanbéry, E. Biocompatible and stable magnetosome minerals coated with poly-L-lysine, citric acid, oleic acid, and carboxy-methyl-dextran for application in the magnetic hyperthermia treatment of tumors. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 7644–7660
- [57] Pei, P.; Yang, F.; Liu, J.; Hu, H.; Du, X.; Hanagata, N.; Zhao, S.; Zhu, Y. Composite-dissolving microneedle patches for chemotherapy and photothermal therapy in superficial tumor treatment. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 1414–1423
- [58] Ota, S.; Kitaguchi, R.; Takeda, R.; Yamada, T.; Takemura, Y. Rotation of Magnetization Derived from Brownian Relaxation in Magnetic Fluids of Different Viscosity Evaluated by Dynamic Hysteresis Measurements over a Wide Frequency Range. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 170, 1–11
- [59] Lahiri, B.B.; Ranoo, S.; Zaibudeen, A.W.; Philip, J. Magnetic hyperthermia in magnetic nanoemulsions: Effects of polydispersity, particle concentration and medium viscosity. *J. Magn. Magn. Mater.* **2017**, *441*, 310–327
- [60] Wildeboer, R.R.; Southern, P.; Pankhurst, Q.A. On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 1–14
- [61] Behrouzkia, Z.; Joveini, Z.; Keshavarzi, B.; Eyvazzadeh, N.; Aghdam, R.Z. Hyperthermia: How can it be used? *Oman Med. J.* **2016**, *31*, 89–97
- [62] Latorre, M.; Rinaldi, C. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: Magnetic fluid hyperthermia. *P. R. Health Sci. J.* **2009**, *28*, 227–238
- [63] Kosheleva, O.K.; Lai, T.-C.; Chen, N.G.; Hsiao, M.; Chen, C.-H. Selective killing of cancer cells by nanoparticle-assisted ultrasound. *J. Nanobiotechnology* **2016**, *14*, 46, 1–11
- [64] Magforce: Informacje dla Pacjentów, <https://www.magforce.com/pl/home/informacje-dla-pacjentow>

[dostęp 18.05.2020] n.d.

- [65] Zaloga, J.; Stapf, M.; Nowak, J.; Pöttler, M.; Friedrich, R.; Tietze, R.; Lyer, S.; Lee, G.; Odenbach, S.; Hilger, I.; et al. Tangential Flow Ultrafiltration Allows Purification and Concentration of Lauric Acid-/Albumin-Coated Particles for Improved Magnetic Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 19291–19307
- [66] Sabale, S.; Jadhav, V.; Khot, V.; Zhu, X.; Xin, M.; Chen, H. Superparamagnetic MFe₂O₄ (M = Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 1–9
- [67] Thomas, R.G.; Moon, M.J.; Lee, H.; Sasikala, A.R.K.; Kim, C.S.; Park, I.-K.; Jeong, Y.Y. Hyaluronic acid conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticle for cancer diagnosis and hyperthermia therapy. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *131*, 439–446
- [68] Niculaes, D.; Lak, A.; Anyfantis, G.C.; Marras, S.; Laslett, O.; Avugadda, S.K.; Cassani, M.; Serantes, D.; Hovorka, O.; Chantrell, R.; et al. Asymmetric Assembling of Iron Oxide Nanocubes for Improving Magnetic Hyperthermia Performance. *ACS Nano* **2017**, *11*, 12121–12133
- [69] Quinto, C.A.; Mohindra, P.; Tong, S.; Bao, G. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale* **2015**, *7*, 12728–12736
- [70] Mazario, E.; Forget, A.; Belkahla, H.; Lomas, J.S.; Decorse, P.; Chevillot-Biraud, A.; Verbeke, P.; Wilhelm, C.; Ammar, S.; El Hage Chahine, J.-M.; et al. Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles With HSA Protein for Thermal Therapy. *IEEE Trans. Magn.* **2017**, *53*, 1–5
- [71] Li, M.; Bu, W.; Ren, J.; Li, J.; Deng, L.; Gao, M.; Gao, X.; Wang, P. Enhanced Synergism of Thermo-chemotherapy For Liver Cancer with Magnetothermally Responsive Nanocarriers. *Theranostics* **2018**, *8*, 693–709
- [72] Bae, K.H.; Park, M.; Do, M.J.; Lee, N.; Ryu, J.H.; Kim, G.W.; Kim, C.; Park, T.G.; Hyeon, T. Chitosan Oligosaccharide-Stabilized Ferrimagnetic Iron Oxide Nanocubes for Magnetically Modulated Cancer Hyperthermia. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5266–5273
- [73] Fraga, C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 235–244
- [74] Mozetič, M.; Vesel, A.; Primc, G.; Eisenmenger-Sittner, C.; Bauer, J.; Eder, A.; Schmid, G.H.S.; Ruzic, D.N.; Ahmed, Z.; Barker, D.; et al. Recent developments in surface science and engineering, thin films, nanoscience, biomaterials, plasma science, and vacuum technology. *Thin Solid Films* **2018**, *660*, 120–160
- [75] AL-Rashdi, K.; Farooqui, M.; Mohsin, M.; Rabbani, G. Metal Oxide Thin Films: a Mini Review. *J. Adv. Sci. Res.* **2016**, *7*, 1–8
- [76] Mittler, S. Imaging of Thin Films, and Its Application in the Life Sciences, In: Kumar C. (ed) Nanostructured thin films and surfaces. vol. 5, Wiley-VCH; **2011**, p. 363–395
- [77] Dahotre, N.B.; Nayak, S. Nanocoatings for engine application. *Surf. Coatings Technol.* **2005**, *194*, 58–67
- [78] Dawber, M.; Rabe, K.M.; Scott, J.F. Physics of thin-film ferroelectric oxides. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 1083–1130
- [79] Schulz, U.; Saruhan, B.; Fritscher, K.; Leyens, C. Review on Advanced EB-PVD Ceramic Topcoats for TBC Applications. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2005**, *1*, 302–315
- [80] Piedade, A.P.; Veneza, C.; Duarte, C.B. Polyamide 6.6 thin films with distinct ratios of the main chemical groups: Influence in the primary neuronal cell culture. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *490*, 30–37

- [81] Tokarev, I.; Motornov, M.; Minko, S. Molecular-engineered stimuli-responsive thin polymer film: A platform for the development of integrated multifunctional intelligent materials. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6932–6948
- [82] Szczepanowicz, K.; Hoel, H.J.; Szyk-Warszynska, L.; Bielańska, E.; Bouzga, A.M.; Gaudernack, G.; Simon, C.; Warszynski, P. Formation of biocompatible nanocapsules with emulsion core and pegylated shell by polyelectrolyte multilayer adsorption. *Langmuir* **2010**, *26*, 12592–12597
- [83] Decher, G.; Hong, J.D.; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, *210–211*, 831–835
- [84] Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science (80-.)*. **1997**, *277*, 1232–1237
- [85] Akiba, U.; Minaki, D.; Anzai, J.I. Photosensitive layer-by-layer assemblies containing azobenzene groups: Synthesis and biomedical applications. *Polymers (Basel)*. **2017**, *9*, 1–16
- [86] Decher, G. Layer-by-Layer Assembly (Putting Molecules to Work), In: Decher G., Schlenoff J. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, 2nd edition. vol. 1, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; **2012**, p. 1–21
- [87] Hammond, P.T. Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 430–442
- [88] Schönhoff, M. Layered polyelectrolyte complexes: Physics of formation and molecular properties. *J. Phys. Condens. Matter* **2003**, *15*, R1781–R1808
- [89] Hess, M.; Jones, R.G.; Kahovec, J.; Kitayama, T.; Kratochvíl, P.; Kubisa, P.; Mormann, W.; Stepto, R.F.T.; Tabak, D.; Vohlídal, J.; et al. Terminology of polymers containing ionizable or ionic groups and of polymers containing ions (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 2067–2074
- [90] Alkekha, D.; Hammond, P.T.; Shukla, A. Layer-by-Layer Biomaterials for Drug Delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2020**, *22*, 1–24
- [91] Zelikin, A.N. Drug releasing polymer thin films: New era of surface-mediated drug delivery. *ACS Nano* **2010**, *4*, 2494–2509
- [92] Yang, Q.; Wang, S.; Fan, P.; Wang, L.; Di, Y.; Lin, K.; Xiao, F.S. pH-responsive carrier system based on carboxylic acid modified mesoporous silica and polyelectrolyte for drug delivery. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5999–6003
- [93] Hong, C.A.; Son, H.Y.; Nam, Y.S. Layer-by-layer siRNA/poly(L-lysine) Multilayers on Polydopamine-coated Surface for Efficient Cell Adhesion and Gene Silencing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–7
- [94] Germain, M.; Grube, S.; Carriere, V.; Richard-Foy, H.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Composite Nanocapsules: Lipid Vesicles Covered with Several Layers of Crosslinked Polyelectrolytes. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2868–2871
- [95] Ionov, R.; El-Abed, A.; Goldmann, M.; Peretti, P. Interactions of lipid monolayers with the natural biopolymer hyaluronic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2004**, *1667*, 200–207
- [96] Oh, E.J.; Park, K.; Kim, K.S.; Kim, J.; Yang, J.A.; Kong, J.H.; Lee, M.Y.; Hoffman, A.S.; Hahn, S.K. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J. Control. Release* **2010**, *141*, 2–12

- [97] Antunes, J.C.; Pereira, C.L.; Molinos, M.; Ferreira-da-silva, F.; Dess, M.; Gloria, A.; Ambrosio, L.; Gonc, R.M. Layer-by-Layer Self-Assembly of Chitosan and Poly(γ -glutamic acid) into Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 4183–4195
- [98] Zhao, S.; Caruso, F.; Dahne, L.; Decher, G.; De Geest, B.G.; Fan, J.; Feliu, N.; Gogotsi, Y.; Hammond, P.T.; Hersam, M.C.; et al. The Future of Layer-by-Layer Assembly: A Tribute to ACS Nano Associate Editor Helmuth Mohwald. *ACS Nano* **2019**, *13*, 6151–6169
- [99] Fisman, D.N.; Reilly, D.T.; Karchmer, A.W.; Goldie, S.J. Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness of 2 Management Strategies for Infected Total Hip Arthroplasty in the Elderly. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *32*, 419–430
- [100] Moskowitz, J.S.; Blaisse, M.R.; Samuel, R.E.; Hsu, H.P.; Harris, M.B.; Martin, S.D.; Lee, J.C.; Spector, M.; Hammond, P.T. The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6019–6030
- [101] Kim, B.S.; Lee, H. Il; Min, Y.; Poon, Z.; Hammond, P.T. Hydrogen-bonded multilayer of pH-responsive polymeric micelles with tannic acid for surface drug delivery. *Chem. Commun.* **2009**, 4194–4196
- [102] Sutrisno, L.; Hu, Y.; Shen, X.; Li, M.; Luo, Z.; Dai, L.; Wang, S.; Zhong, J.L.; Cai, K. Fabrication of hyaluronidase-responsive biocompatible multilayers on BMP2 loaded titanium nanotube for the bacterial infection prevention. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *89*, 95–105
- [103] Macdonald, M.L.; Samuel, R.E.; Shah, N.J.; Padera, R.F.; Beben, Y.M.; Hammond, P.T. Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1446–1453
- [104] Hammond, P.T. Building biomedical materials layer-by-layer. *Mater. Today* **2012**, *15*, 196–206
- [105] Brittain, W.J.; Minko, S. A structural definition of polymer brushes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 3505–3512
- [106] Minko, S. Responsive Polymer Brushes. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **2006**, *46*, 397–420
- [107] Chmielarz, P.; Kryszewski, P.; Wang, Z.; Wang, Y.; Matyjaszewski, K. Synthesis of Well-Defined Polymer Brushes from Silicon Wafers via Surface-Initiated ATRP. *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218*, 1700106, 1–13
- [108] Bakhti, H.; Laghrissi, A.; Roth, A.; Azrar, L.; Es-Souni, M. Nanomechanical characterization and modeling of anodized porous aluminum oxide thin films with photografted anti-biofouling polymer brushes on their pore walls. *Appl. Nanosci.* **2020**, 1–13
- [109] Park, C.S.; Lee, H.J.; Jamison, A.C.; Lee, T.R. Robust Thick Polymer Brushes Grafted from Gold Surfaces Using Bidentate Thiol-Based Atom-Transfer Radical Polymerization Initiators. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 5586–5594
- [110] Song, Y.; Lü, J.; Liu, B.; Lü, C. Temperature responsive polymer brushes grafted from graphene oxide: An efficient fluorescent sensing platform for 2,4,6-trinitrophenol. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 7083–7092
- [111] Zhang, F.; Xu, F.J.; Kang, E.T.; Neoh, K.G. Modification of titanium via surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP). *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 3067–3073
- [112] Zhao, H.; Zhu, B.; Luo, S.C.; Lin, H.A.; Nakao, A.; Yamashita, Y.; Yu, H.H. Controlled protein absorption and cell adhesion on polymer-brush-grafted poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films. *ACS Appl. Mater.*

- Interfaces* **2013**, *5*, 4536–4543
- [113] Niu, X.; Ran, F.; Chen, L.; Lu, G.J.E.; Hu, P.; Deming, C.P.; Peng, Y.; Rojas-Andrade, M.D.; Chen, S. Thermoswitchable Janus Gold Nanoparticles with Stimuli-Responsive Hydrophilic Polymer Brushes. *Langmuir* **2016**, *32*, 4297–4304
 - [114] Chmielarz, P.; Yan, J.; Kryszewski, P.; Wang, Y.; Wang, Z.; Bockstaller, M.R.; Matyjaszewski, K. Synthesis of Nanoparticle Copolymer Brushes via Surface-Initiated seATRP. *Macromolecules* **2017**, *50*, 4151–4159
 - [115] Morits, M.; McKee, J.R.; Majoinen, J.; Malho, J.M.; Houbenov, N.; Seitsonen, J.; Laine, J.; Gröschel, A.H.; Ikkala, O. Polymer Brushes on Cellulose Nanofibers: Modification, SI-ATRP, and Unexpected Degradation Processes. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 7642–7650
 - [116] Yang, X.R.; Lei, L.; Peng, Z.; Yu, H.R.; Cheng, C.J. Magnetic carbon nanotubes grafted with smart polymer brushes for highly efficient enantioseparation of tryptophan enantiomers. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 5953–5962
 - [117] Matyjaszewski, K.; Tsarevsky, N. V. Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 276–288
 - [118] Nishimura, T.; Tamura, F.; Kobayashi, S.; Tanimoto, Y.; Hayashi, F.; Sudo, Y.; Iwasaki, Y.; Morigaki, K. Hybrid Model Membrane Combining Micropatterned Lipid Bilayer and Hydrophilic Polymer Brush. *Langmuir* **2017**, *33*, 5752–5759
 - [119] Zoppe, J.O.; Ataman, N.C.; Mocny, P.; Wang, J.; Moraes, J.; Klok, H.-A. Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: State-of-the-Art, Opportunities, and Challenges in Surface and Interface Engineering with Polymer Brushes. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 1105–1318
 - [120] Goto, A.; Tsujii, Y. Surface-initiated living radical polymerizations using iodine, organotellurium, and organic catalysts, In: Vana P. (ed) Controlled Radical Polymerization at and from Solid Surfaces. Advances in Polymer Science. vol. 270, Springer International Publishing Switzerland; **2016**, p. 107–122
 - [121] Peng, S.; Bhushan, B. Smart polymer brushes and their emerging applications. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 8557–8578
 - [122] Ayres, N. Polymer brushes : Applications in biomaterials and nanotechnology. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 769–777
 - [123] Kim, M.; Schmitt, S.K.; Choi, J.W.; Krutty, J.D.; Gopalan, P. From self-assembled monolayers to coatings: Advances in the synthesis and nanobio applications of polymer brushes. *Polymers (Basel)*. **2015**, *7*, 1346–1378
 - [124] Khabibullin, A.; Mastan, E.; Matyjaszewski, K.; Zhu, S. Surface-initiated atom transfer radical polymerization, In: Vana P. (ed) Controlled Radical Polymerization at and from Solid Surfaces. Advances in Polymer Science. vol. 270, Springer International Publishing Switzerland; **2015**, p. 29–73
 - [125] Ma, J.; Luan, S.; Song, L.; Jin, J.; Yuan, S.; Yan, S.; Yang, H.; Shi, H.; Yin, J. Fabricating a cycloolefin polymer immunoassay platform with a dual-function polymer brush via a surface-initiated photoiniferter-mediated polymerization strategy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 1971–1978
 - [126] Yan, J.; Pan, X.; Schmitt, M.; Wang, Z.; Bockstaller, M.R.; Matyjaszewski, K. Enhancing Initiation Efficiency in Metal-Free Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization (SI-ATRP). *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 661–665
 - [127] Wu, L.; Glebe, U.; Böker, A. Surface-initiated controlled radical polymerizations from silica nanoparticles,

- gold nanocrystals, and bionanoparticles. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5143–5184
- [128] Phan, T.N.T.; Jestin, J.; Gigmes, D. Nitroxide-mediated polymerization from surfaces, In: Vana P. (ed) Controlled Radical Polymerization at and from Solid Surfaces. Advances in Polymer Science. vol. 270, Springer International Publishing Switzerland; **2016**, p. 1–28
- [129] Otsu, T. Iniferter concept and living radical polymerization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38*, 2121–2136
- [130] Kumar, M.; Kannan, T. A novel tertiary bromine-functionalized thermal iniferter for controlled radical polymerization. *Polym. J.* **2010**, *42*, 916–922
- [131] Fu, Y.; Zhang, L.; Huang, L.; Xiao, S.; Chen, F.; Fan, P.; Zhong, M.; Yang, J. Salt- and thermo-responsive polyzwitterionic brush prepared via surface-initiated photoiniferter-mediated polymerization. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *450*, 130–137
- [132] Keddie, D.J. A guide to the synthesis of block copolymers using reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 496–505
- [133] Zhao, Y.; Perrier, S. Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization from surfaces, In: Vana P. (ed) Controlled Radical Polymerization at and from Solid Surfaces. Advances in Polymer Science. vol. 270, Springer International Publishing Switzerland; **2016**, p. 77–106
- [134] Wang, J.S.; Matyjaszewski, K. Controlled/“Living” Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614–5615
- [135] Matyjaszewski, K. Advanced Materials by Atom Transfer Radical Polymerization. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706441, 1–22
- [136] Guliashvili, T.; Mendonça, P. V.; Serra, A.C.; Popov, A. V.; Coelho, J.F.J. Copper-Mediated Controlled/“Living” Radical Polymerization in Polar Solvents: Insights into Some Relevant Mechanistic Aspects. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 4607–4612
- [137] Mathers, R.T.; Magenau, A.J.D.; Schröder, K.; Matyjaszewski, K. Overview of Controlled/Living polymerization Methods of Vinyl Monomers. *Monit. Polym. React.*, vol. 9780470917, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; **2014**, p. 29–44
- [138] Kubotera, A.; Saito, R. Synthesis of well-defined 3-arm and 6-arm poly(acrylic acid)s via ATRP of methyl acrylate and hydrolyses of 3-arm and 6-arm poly(methyl acrylate)s. *Polym. J.* **2016**, *48*, 611–619
- [139] Pomorska, A.; Wolski, K.; Puciul-Malinowska, A.; Zapotoczny, S. Tailored conditions for controlled and fast growth of surface-grafted PNIPAM brushes. *Polymer (Guildf)*. **2016**, *97*, 380–386
- [140] Pal, A.; Pal, S. Synthesis of copolymer derived from tamarind kernel polysaccharide (TKP) and poly(methacrylic acid) via SI-ATRP with enhanced pH triggered dye removal. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 2958–2965
- [141] Wolski, K.; Gruszkiewicz, A.; Wytrwal-Sarna, M.; Bernasik, A.; Zapotoczny, S. The grafting density and thickness of polythiophene-based brushes determine the orientation, conjugation length and stability of the grafted chains. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 6250–6262
- [142] Yan, W.; Fantin, M.; Ramakrishna, S.; Spencer, N.D.; Matyjaszewski, K.; Benetti, E.M. Growing Polymer Brushes from a Variety of Substrates under Ambient Conditions by Cu⁰-Mediated Surface-Initiated ATRP. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 27470–27477
- [143] Feng, C.; Huang, X. Polymer Brushes: Efficient Synthesis and Applications. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*,

- [144] Giussi, J.M.; Cortez, M.L.; Marmisollé, W.A.; Azzaroni, O. Practical use of polymer brushes in sustainable energy applications: Interfacial nanoarchitectonics for high-efficiency devices. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 814–849
- [145] Mathis, C.H.; Simič, R.; Kang, C.; Ramakrishna, S.N.; Isa, L.; Spencer, N.D. Indenting polymer brushes of varying grafting density in a viscous fluid: A gradient approach to understanding fluid confinement. *Polymer (Guildf)*. **2019**, *169*, 115–123
- [146] Zoppe, J.O.; Venditti, R.A.; Rojas, O.J. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *369*, 202–209
- [147] Wei, Z.; Wang, L.; Li, J.; Liu, X.; Jiang, S. Cyanobiphenyl-mesogened liquid crystalline polymer bonded on silica as the stationary phase with shape and polarity recognition for LC. *Chromatographia* **2011**, *73*, 5–16
- [148] Welch, M.E.; Doublet, T.; Bernard, C.; Malliaras, G.G.; Ober, C.K. A glucose sensor via stable immobilization of the GOx enzyme on an organic transistor using a polymer brush. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2015**, *53*, 372–377
- [149] Chen, W.L.; Cordero, R.; Tran, H.; Ober, C.K. 50th Anniversary Perspective: Polymer Brushes: Novel Surfaces for Future Materials. *Macromolecules* **2017**, *50*, 4089–4113
- [150] Yan, S.; Luan, S.; Shi, H.; Xu, X.; Zhang, J.; Yuan, S.; Yang, Y.; Yin, J. Hierarchical Polymer Brushes with Dominant Antibacterial Mechanisms Switching from Bactericidal to Bacteria Repellent. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1696–1704
- [151] Wang, S.; Song, J.; Li, Y.; Zhao, X.; Chen, L.; Li, G.; Wang, L.; Jia, Z.; Ge, X. Grafting antibacterial polymer brushes from titanium surface via polydopamine chemistry and activators regenerated by electron transfer ATRP. *React. Funct. Polym.* **2019**, *140*, 48–55
- [152] Wang, Y.; Wu, J.; Zhang, D.; Chen, F.; Fan, P.; Zhong, M.; Xiao, S.; Chang, Y.; Gong, X.; Yang, J.; et al. Design of salt-responsive and regenerative antibacterial polymer brushes with integrated bacterial resistance, killing, and release properties. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 5762–5774
- [153] Al-Ani, A.; Pingle, H.; P Reynolds, N.; Wang, P.-Y.; Kingshott, P. Tuning the Density of Poly(ethylene glycol) Chains to Control Mammalian Cell and Bacterial Attachment. *Polymers (Basel)*. **2017**, *9*, 343, 1–17
- [154] Petrie, T.A.; Raynor, J.E.; Reyes, C.D.; Burns, K.L.; Collard, D.M.; García, A.J. The effect of integrin-specific bioactive coatings on tissue healing and implant osseointegration. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2849–2857
- [155] Krishnamoorthy, M.; Hakobyan, S.; Ramstedt, M.; Gautrot, J.E. Surface-initiated polymer brushes in the biomedical field: Applications in membrane science, biosensing, cell culture, regenerative medicine and antibacterial coatings. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10976–11026
- [156] Hao, Y.; Liu, H.; Li, G.; Cui, H.; Jiang, L.; Wang, S. Photo and Thermo Dual-Responsive Copolymer Surfaces for Efficient Cell Capture and Release. *ChemPhysChem* **2018**, *19*, 2107–2112
- [157] Indermun, S.; Govender, M.; Kumar, P.; Choonara, Y.E.; Pillay, V. Stimuli-responsive polymers as smart drug delivery systems: Classifications based on carrier type and triggered-release mechanism, In: Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1, Elsevier; **2018**, p. 43–58

- [158] Zhou, Y.; Zheng, Y.; Wei, T.; Qu, Y.; Wang, Y.; Zhan, W.; Zhang, Y.; Pan, G.; Li, D.; Yu, Q.; et al. Multistimulus Responsive Biointerfaces with Switchable Bioadhesion and Surface Functions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 5447–5455
- [159] Nash, M.E.; Healy, D.; Carroll, W.M.; Elvira, C.; Rochev, Y.A. Cell and cell sheet recovery from pNIPAm coatings; Motivation and history to present day approaches. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 19376–19389
- [160] Civantos, A.; Martinez-Campos, E.; Nash, M.E.; Gallardo, A.; Ramos, V.; Aranaz, I. Polymeric and Non-Polymeric Platforms for Cell Sheet Detachment. *Adv. Mater. Interfaces* **2016**, 463–495
- [161] Nagase, K.; Yamato, M.; Kanazawa, H.; Okano, T. Poly(N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. *Biomaterials* **2018**, *153*, 27–48
- [162] Nagase, K.; Okano, T. Thermoresponsive Polymer Brushes for Thermally Modulated Cell Adhesion and Detachment, In: Azzaroni O., Szleifer I. (eds), *Polymer and Biopolymer Brushes: For Materials Science and Biotechnology. Polym. Biopolym. Brushes Mater. Sci. Biotechnol.*, Wiley Blackwell; **2017**, p. 361–375
- [163] Jiang, S.; Lyu, B.; Müller, M.; Wesner, D.; Schönherr, H. Thickness-Encoded Micropatterns in One-Component Thermoresponsive Polymer Brushes for Culture and Triggered Release of Pancreatic Tumor Cell Monolayers and Spheroids. *Langmuir* **2018**, *34*, 14670–14677
- [164] Kollarigowda, R.H.; Fedele, C.; Rianna, C.; Calabuig, A.; Manikas, A.C.; Pagliarulo, V.; Ferraro, P.; Cavalli, S.; Netti, P.A. Light-responsive polymer brushes: active topographic cues for cell culture applications. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 3271–3278
- [165] Morgese, G.; Shirmardi Shaghasemi, B.; Causin, V.; Zenobi-Wong, M.; Ramakrishna, S.N.; Reimhult, E.; Benetti, E.M. Next-Generation Polymer Shells for Inorganic Nanoparticles are Highly Compact, Ultra-Dense, and Long-Lasting Cyclic Brushes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 4507–4511
- [166] Szpak, A.; Kania, G.; Skórka, T.; Tokarz, W.; Zapotoczny, S.; Nowakowska, M. Stable aqueous dispersion of superparamagnetic iron oxide nanoparticles protected by charged chitosan derivatives. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*, 1372, 1–11
- [167] Benetti, E.M.; Sui, X.; Zapotoczny, S.; Vancso, G.J. Surface-Grafted Gel-Brush/Metal Nanoparticle Hybrids. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 939–944
- [168] Aissou, K.; Fleury, G.; Pecastaings, G.; Alnasser, T.; Mornet, S.; Goglio, G.; Hadziioannou, G. Hexagonal-to-cubic phase transformation in composite thin films induced by FePt nanoparticles located at PS/PEO interfaces. *Langmuir* **2011**, *27*, 14481–14488
- [169] Niemirowicz-Laskowska, K.; Głuszek, K.; Piktel, E.; Pajuste, K.; Durnaś, B.; Król, G.; Wilczewska, A.Z.; Janmey, P.A.; Plotniece, A.; Bucki, R. Bactericidal and immunomodulatory properties of magnetic nanoparticles functionalized by 1,4-dihydropyridines. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 3411–3424
- [170] Saveleva, M.S.; Eftekhari, K.; Abalymov, A.; Douglas, T.E.L.; Volodkin, D.; Parakhonskiy, B. V.; Skirtach, A.G. Hierarchy of hybrid materials-the place of inorganics-in-organics in it, their composition and applications. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 179, 1–21
- [171] Schubert, J.; Chanana, M. Coating Matters: Review on Colloidal Stability of Nanoparticles with Biocompatible Coatings in Biological Media, Living Cells and Organisms. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 4553–4586
- [172] Bhatia, S. Natural Polymers vs Synthetic Polymer, In: *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, Springer

International Publishing; **2016**, p. 95–118

- [173] Lowe, S.; O'Brien-Simpson, N.M.; Connal, L.A. Antibiofouling polymer interfaces: Poly(ethylene glycol) and other promising candidates. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 198–212
- [174] Ulusoy, M.; Jonczyk, R.; Walter, J.G.; Springer, S.; Lavrentieva, A.; Stahl, F.; Green, M.; Scheper, T. Aqueous Synthesis of PEGylated Quantum Dots with Increased Colloidal Stability and Reduced Cytotoxicity. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 414–426
- [175] Banerjee, A.; Blasiak, B.; Pasquier, E.; Tomanek, B.; Trudel, S. Synthesis, characterization, and evaluation of PEGylated first-row transition metal ferrite nanoparticles as: T2 contrast agents for high-field MRI. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 38125–38134
- [176] Abadeer, N.S.; Murphy, C.J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 4691–4716
- [177] Zyuzin, M. V.; Honold, T.; Carregal-Romero, S.; Kantner, K.; Karg, M.; Parak, W.J. Influence of Temperature on the Colloidal Stability of Polymer-Coated Gold Nanoparticles in Cell Culture Media. *Small* **2016**, *12*, 1723–1731
- [178] Baliś, A.; Wolski, K.; Zapotoczny, S. Thermoresponsive Polymer Gating System on Mesoporous Shells of Silica Particles Serving as Smart Nanocontainers. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12*, 888, 1–13
- [179] Müller, M. Sizing, shaping and pharmaceutical applications of polyelectrolyte complex nanoparticles, In: *Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State II: Application Aspects*. vol. 256, Springer New York LLC; **2014**, p. 197–260
- [180] Wang, Y.; Wang, Y.; Zheng, X.; Ducrot, É.; Yodh, J.S.; Weck, M.; Pine, D.J. Crystallization of DNA-coated colloids. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–8
- [181] Piktel, E.; Wnorowska, U.; Cieśluk, M.; Deptula, P.; Pogoda, K.; Misztalewska-Turkowicz, I.; Paprocka, P.; Niemirowicz-Laskowska, K.; Wilczewska, A.Z.; Janmey, P.A.; et al. Inhibition of inflammatory response in human keratinocytes by magnetic nanoparticles functionalized with PBP10 peptide derived from the PIP2-binding site of human plasma gelsolin. *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 1–19
- [182] Ravikumar, C.; Kumar, S.; Bandyopadhyaya, R. Aggregation of dextran coated magnetic nanoparticles in aqueous medium: Experiments and Monte Carlo simulation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *403*, 1–6
- [183] Bharti, S.; Kaur, G.; Jain, S.; Gupta, S.; Tripathi, S.K. Characteristics and mechanism associated with drug conjugated inorganic nanoparticles. *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 813–829
- [184] Vismara, E.; Bongio, C.; Coletti, A.; Edelman, R.; Serafini, A.; Mauri, M.; Simonutti, R.; Bertini, S.; Urso, E.; Assaraf, Y.; et al. Albumin and Hyaluronic Acid-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Biomedical Applications. *Molecules* **2017**, *22*, 1030, 1–25
- [185] Azuma, K.; Osaki, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6*, 33–49
- [186] Frank, L.A.; Onzi, G.R.; Morawski, A.S.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Contri, R. V. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. *React. Funct. Polym.* **2020**, *147*, 104459, 1–14
- [187] Skirtach, A.G.; Yashchenok, A.M.; Möhwald, H. Encapsulation, release and applications of LbL polyelectrolyte multilayer capsules. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12736–12746

- [188] Nifontova, G.; Ramos-Gomes, F.; Baryshnikova, M.; Alves, F.; Nabiev, I.; Sukhanova, A. Cancer Cell Targeting With Functionalized Quantum Dot-Encoded Polyelectrolyte Microcapsules. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 34, 1–11
- [189] Mocny, P.; Klok, H.A. Complex polymer topologies and polymer—nanoparticle hybrid films prepared via surface-initiated controlled radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *100*, 101185, 1–17
- [190] Ambi, A.; Parikh, N.; Vera, C.; Burns, K.; Montano, N.; Sciorra, L.; Epstein, J.; Zeng, D.; Traba, C. Anti-infection silver nanoparticle immobilized biomaterials facilitated by argon plasma grafting technology. *Biofouling* **2018**, *34*, 273–286
- [191] Sun, C.; Li, Y.; Li, Z.; Su, Q.; Wang, Y.; Liu, X. Durable and Washable Antibacterial Copper Nanoparticles Bridged by Surface Grafting Polymer Brushes on Cotton and Polymeric Materials. *J. Nanomater.* **2018**, *2018*, 1–7
- [192] Nie, G.; Li, G.; Wang, L.; Zhang, X.; He, L.; Zhang, L.; Du, G.; Liu, D.; Zhan, J.; Wang, J.; et al. Nanocomposites of polymer brush and inorganic nanoparticles: preparation, characterization and application. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 753–769
- [193] Kohri, M.; Yanagimoto, K.; Kohaku, K.; Shiimoto, S.; Kobayashi, M.; Imai, A.; Shiba, F.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K. Magnetically Responsive Polymer Network Constructed by Poly(acrylic acid) and Holmium. *Macromolecules* **2018**, *51*, 6740–6745
- [194] Rao, K.M.; Kumar, A.; Han, S.S. Polysaccharide-based magnetically responsive polyelectrolyte hydrogels for tissue engineering applications. *J. Mater. Sci. Technol.* **2017**, *34*, 1371–1377
- [195] Cho, J.; Grant, J.; Piquette-Miller, M.; Allen, C. Synthesis and physicochemical and dynamic mechanical properties of a water-soluble chitosan derivative as a biomaterial. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2845–2855
- [196] Chomoucka, J.; Drbohlavova, J.; Huska, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Hubalek, J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 144–149
- [197] Wang, X.; Du, Y.; Liu, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *56*, 21–26
- [198] Szczerba, W.; Costo, R.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Del Puerto Morales, M.; Thünemann, A.F. SAXS analysis of single-and multi-core iron oxide magnetic nanoparticles. *J. Appl. Crystallogr.* **2017**, *50*, 481–488
- [199] Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283–318
- [200] Petrova, E.; Kotsikau, D.; Pankov, V. Structural characterization and magnetic properties of sol-gel derived $\text{Zn}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *378*, 429–435
- [201] Liu, X.; Liu, J.; Zhang, S.; Nan, Z.; Shi, Q. Structural, Magnetic, and Thermodynamic Evolutions of Zn-Doped Fe_3O_4 Nanoparticles Synthesized Using a One-Step Solvothermal Method. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 1328–1341
- [202] Jang, J.T.; Nah, H.; Lee, J.H.; Moon, S.H.; Kim, M.G.; Cheon, J. Critical enhancements of MRI contrast and hyperthermic effects by dopant-controlled magnetic nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 1234–1238
- [203] Rebbouh, L.; Hermann, R.P.; Grandjean, F.; Hyeon, T.; An, K.; Amato, A.; Long, G.J. Fe^{57} Mössbauer spectral and muon spin relaxation study of the magnetodynamics of monodispersed $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

- nanoparticles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2007**, *76*, 1–12
- [204] Szczerba, W.; Żukrowski, J.; Przybylski, M.; Sikora, M.; Safonova, O.; Shmeliov, A.; Nicolosi, V.; Schneider, M.; Granath, T.; Oppmann, M.; et al. Pushing up the magnetisation values for iron oxide nanoparticles via zinc doping: X-ray studies on the particle's sub-nano structure of different synthesis routes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 25221–25229
- [205] Wilke, M.; Farges, F.; Petit, P.E.; Brown, G.E.; Martin, F. Oxidation state and coordination of Fe in minerals: An FeK- XANES spectroscopic study. *Am. Mineral.* **2001**, *86*, 714–730
- [206] Sato Turtelli, R.; Atif, M.; Mehmood, N.; Kubel, F.; Biernacka, K.; Linert, W.; Grössinger, R.; Kapusta, C.; Sikora, M. Interplay between the cation distribution and production methods in cobalt ferrite. *Mater. Chem. Phys.* **2012**, *132*, 832–838
- [207] Juhin, A.; Saintavit, P.; Ollefs, K.; Sikora, M.; Filipponi, A.; Glatzel, P.; Wilhelm, F.; Rogalev, A. X-ray magnetic circular dichroism measured at the Fe K-edge with a reduced intrinsic broadening: X-ray absorption spectroscopy versus resonant inelastic x-ray scattering measurements. *J. Phys. Condens. Matter* **2016**, *28*, 1–10
- [208] Orozco-Henao, J.M.; Coral, D.F.; Muraca, D.; Moscoso-Londoño, O.; Mendoza Zélis, P.; Fernandez Van Raap, M.B.; Sharma, S.K.; Pirota, K.R.; Knobel, M. Effects of Nanostructure and Dipolar Interactions on Magnetohyperthermia in Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 12796–12809
- [209] Barick, K.C.; Hassan, P.A. Glycine passivated Fe₃O₄ nanoparticles for thermal therapy. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *369*, 96–102
- [210] Abenojar, E.C.; Wickramasinghe, S.; Bas-Concepcion, J.; Samia, A.C.S. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2016**, *26*, 440–448
- [211] Chen, J.; Ye, X.; Oh, S.J.; Kikkawa, J.M.; Kagan, C.R.; Murray, C.B. Bistable magnetoresistance switching in exchange-coupled CoFe₂O₄-Fe₃O₄ binary nanocrystal superlattices by self-assembly and thermal annealing. *ACS Nano* **2013**, *7*, 1478–1486
- [212] Mehdaoui, B.; Tan, R.P.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Chaudret, B.; Respaud, M. Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2013**, *87*, 1–10
- [213] Fu, R.; Yan, Y.Y.; Roberts, C. Study of the effect of dipole interactions on hyperthermia heating the cluster composed of superparamagnetic nanoparticles. *AIP Adv.* **2015**, *5*, 1–12
- [214] Nemati, Z.; Alonso, J.; Martinez, L.M.; Khurshid, H.; Garaio, E.; Garcia, J.A.; Phan, M.H.; Srikanth, H. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 8370–8379
- [215] Saville, S.L.; Qi, B.; Baker, J.; Stone, R.; Camley, R.E.; Livesey, K.L.; Ye, L.; Crawford, T.M.; Thompson Mefford, O. The formation of linear aggregates in magnetic hyperthermia: Implications on specific absorption rate and magnetic anisotropy. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *424*, 141–151
- [216] Filipowska, J.; Lewandowska-Łańcucka, J.; Gilarska, A.; Niedźwiedzki, Ł.; Nowakowska, M. In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 692–700
- [217] Dokukin, M.E.; Sokolov, I. Quantitative mapping of the elastic modulus of soft materials with HarmoniX and PeakForce QNM AFM modes. *Langmuir* **2012**, *28*, 16060–16071

- [218] Nicholls, J.R.; Hall, D.J.; Tortorelli, P.F. Hardness and modulus measurements on oxide scales. *Mater. High Temp.* **1994**, *12*, 141–150
- [219] Chen, L.; Yan, C.; Zheng, Z. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. *Mater. Today* **2018**, *21*, 38–59

SPIS RYSUNKÓW I TABEL

Rys. 1. Zachowanie domen magnetycznych w ferromagnetykach i momentów magnetycznych w superparamagnetycznych nanocząstkach tlenku żelaza względem zewnętrznego pola magnetycznego (adaptacja na podstawie Belyanina, 2017).....	19
Rys. 2. Skala wielkości nanocząstek SPION w porównaniu do różnych biomolekuł (adaptacja na podstawie Belyanina, 2017).	20
Rys. 3. Porównanie ilości opublikowanych prac na temat otrzymywania SPION trzema różnymi strategiami (adaptacja na podstawie Ali, 2016).....	21
Rys. 4. Schematy wybranych chemicznych metod otrzymywania SPION (adaptacja na podstawie Dadfar, 2019).....	24
Rys. 5. Schematyczne przedstawienie zasady działania hipertermii magnetycznej (MH) z zastosowaniem nanocząstek SPION (adaptacja na podstawie Latorre, 2009).....	31
Rys. 6. Najpopularniejsze formy cienkich warstw polimerowych na powierzchni (adaptacja na podstawie Tokarev, 2009).....	34
Rys. 7. Schemat nanoszenia warstw polimerów w metodzie LbL na powierzchni płaskiej (a) i sferycznej (b) (adaptacja na podstawie Akiba, 2017).....	35
Rys. 8. Mechanizmy uwalniania leków z czułych i nieczułych na bodźce cienkich warstw polimerowych wytworzonych metodą LbL (adaptacja na podstawie Alkekhia, 2020).....	39
Rys. 9. Schemat szczotki polimerowej z zaznaczoną wysokością szczotki (H), odległością pomiędzy punktami szczepienia (d) oraz średnicą kłębka statystycznego w roztworze (h) (źródło: opracowanie własne).	41
Rys. 10. Ilustracja różnych konformacji łańcucha polimerowego, w zależności od gęstości naszczenia na powierzchni (adaptacja na podstawie Goto, 2016).	43
Rys. 11. Różne rodzaje szczotek polimerowych naszczepionych z płaskiej powierzchni: (a) szczotki homopolimerowe, (b) szczotki homopolimerowe mieszane, (c) szczotki kopolimerowe blokowe, (d) szczotki kopolimerowe losowe, (e) szczotki o mieszanych łańcuchach w kształcie	

litery Y, (f) szczotki usieciowane, (g) szczotki o łańcuchach rozgałęzionych, (b) szczotki obdarzone ładunkiem (adaptacja na podstawie Zoppe, 2017).....	44
Rys. 12. Schemat przedstawiający dwie strategie syntezy szczotek polimerowych: „szczepienie do” oraz „szczepienie z” (adaptacja na podstawie Kim, 2015).....	45
Rys. 13. Uogólniony mechanizm polimeryzacji SI-RAFT: (a) podejście typu R, (b) podejście typu Z. Symbol k_p oznacza stałą szybkości reakcji propagacji, k_{add} i k_{β} oznaczają stałe szybkości odpowiednich procesów addycji, natomiast k_{-add} i k_{β} stałe szybkości odpowiednich procesów fragmentacji (adaptacja na podstawie Wu, 2015).	50
Rys. 14. Schemat klasycznej reakcji ATRP w roztworze, gdzie k_{akt} i k_{dezakt} oznaczają odpowiednio stałe szybkości aktywacji i dezaktywacji (adaptacja na podstawie Matyjaszewski, 2018).....	51
Rys. 15. Schemat powierzchniowo-inicjowanej polimeryzacji ATRP (adaptacja na podstawie Wu, 2015).....	52
Rys. 16. Schemat zachowania szczotek polimerowych oraz hodowanych na nich komórek w zależności od temperatury (adaptacja na podstawie Nagase, 2018).....	59
Rys. 17. Obrazy AFM oraz profile przekrojów (a) przed i (b) po 2-godzinnej ekspozycji szczotek azobenzenowych na IL. Zdjęcie (c) obrazuje powierzchnię po ultradźwiękowym usunięciu wzoru, a w części (d) rysunku zilustrowano graficznie zachowanie szczotek oraz komórek na ich powierzchni (adaptacja na podstawie Kollarigowda, 2017).....	60
Rys. 18. Dwie grupy hybrydowych układów polimerowo-nieorganicznych zawierających nanocząstki (źródło: opracowanie własne).....	62
Rys. 19. Wzór strukturalny kationowej pochodnej chitozanu (CCh).	71
Rys. 20. Schemat syntezy nanocząstek tlenku żelaza metodą współstrącania z impulsowym poddawaniem działaniu ultradźwięków, na przykładzie nanocząstek domieszkowanych cynkiem (źródło: opracowanie własne).....	73
Rys. 21. Krzywa kalibracyjna przedstawiająca zależność absorbancji od stężenia jonów Fe^{2+} , wykorzystywana do obliczenia stężenia żelaza w badanej próbce.....	74
Rys. 22. Schemat obrazujący różnicę w średnicy uzyskiwanej za pomocą mikroskopii TEM oraz pomiarów DLS (źródło: opracowanie własne).....	75

Rys. 23. Wykres zależności magnetyzacji (M) od natężenia zewnętrznego pola magnetycznego (H) dla superparamagnetyków (linia ciągła); paramagnetyków (linia przerywana punktowa); ferromagnetyków (linia przerywana kreskowa) (adaptacja na podstawie Chomoucka, 2010).	77
Rys. 24. Układ stosowany do pomiaru efektu hipertermicznego (źródło: opracowanie własne).	79
Rys. 25. Przykładowe zebrane widma XPS: (a) porównanie widm dla SPION-CCh(+) i SPION-Zn2-CCh(+); (b) pasmo Zn2p3 próbki SPION-Zn2-CCh(+); (c) zdekonwulowane pasmo Fe2p próbki SPION-Zn2-CCh(+).	81
Rys. 26. Rozkłady wielkości nanocząstek niedomieszkowanych cynkiem (a) i ferrytów cynkowych (b–d) pokrytych polimerem, uzyskane metodą DLS (dopasowany rozkład logarytmiczno-normalny).....	84
Rys. 27. Rozkłady wartości potencjału dzeta nanocząstek niedomieszkowanych cynkiem (a) i ferrytów cynkowych (b–d), pokrytych polimerem (dopasowany rozkład Gaussa).....	85
Rys. 28. Wyniki pomiarów DLS oraz potencjału dzeta dla próbki SPION-Zn2-CCh(+) po 6 miesiącach (a i c) oraz 12 miesiącach (b i d) przechowywania w lodówce (dopasowane rozkłady logarytmiczno-normalny (a i b) oraz rozkład Gaussa (c i d)).	86
Rys. 29. Obrazy HRTEM dla SPION-Zn2-CCh(+) (a) oraz SPION-CCh(+) (b), a także przykładowy histogram rozkładu wielkości nanocząstek dla próbki SPION-Zn2-CCh(+) (c). Do histogramu dopasowano rozkład logarytmiczno-normalny.	87
Rys. 30. Zależność natężenia promieniowania rozproszonego próbki SPION-Zn2-CCh(+) od wektora rozproszenia wraz z dopasowanym modelem obejmującym dwie populacje kulistych cząstek (a) oraz zależność funkcji gęstości prawdopodobieństwa od rozmiaru nanocząstek, uzyskana na podstawie modelu i znormalizowana do całkowitej liczby cząstek (b).	88
Rys. 31. Zależność zmiany intensywności transmisji w górnej i dolnej części próbki (ΔT) od czasu dla SPION-Zn2-CCh(+) w wodzie oraz płodowej surowicy bydłowej.	89
Rys. 32. Profile VSM obrazujące zależność magnetyzacji od indukcji pola magnetycznego dla wysuszonych próbek SPION-Zn2-CCh(+) (a) oraz SPION-CCh(+) (c) w wybranych temperaturach (LN – temperatura ciekłego azotu (80 K), RT – temperatura pokojowa (290 K)). Rysunek b przedstawia temperaturową zależność magnetyzacji zmierzoną w reżimie ZFC-FC dla próbki SPION-Zn2-CCh(+), w polu o wartości 100 Gs (T_B – temperatura blokowania)..	90

- Rys. 33.** Widma mössbauerowskie ^{57}Fe zmierzone dla SPION-Zn2-CCh(+) w temperaturze 300 K (a) i w temperaturze 80 K (b). 91
- Rys. 34.** Widma HERFD XANES na krawędzi K żelaza (a) i odpowiadające im widma pierwszej pochodnej (b) zebrane dla próbki SPION-Zn2-CCh(+) oraz referencyjnych tlenków żelaza (Fe_3O_4 i $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$). Wykres wstawiony w panelu (a) przedstawia powiększony obszar przedkrawędziowy po normalizacji do maksimum pre-piku, co pozwala na jednoznaczne określenie przesunięcia energii pików P2. 93
- Rys. 35.** Wyniki badań MH dla zawiesin SPION-CCh(+) i SPION-Zn2-CCh(+): (a) profile wzrostu temperatury (ΔT) w funkcji czasu przy stałej mocy (1,3 kW; $H = 33,3$ kA/m) dla wybranych stężeń (0,18, 0,55 i 0,66 mg/ml); (b) krzywe wzrostu temperatury przy ustalonym stężeniu (0,66 mg/ml) dla wybranych wartości mocy generatora (1,3 kW, $H = 33,3$ kA/m oraz 1,6 kW, $H = 35,7$ kA/m); (c) wartości SAR wyznaczone przy różnej mocy generatora; (d) wartości SAR wyznaczone przy różnych stężeniach zawiesin (moc stała – 1,3 kW). Zielonym paskiem zaznaczono minimalny pożądany wzrost temperatury umożliwiający osiągnięcie temperatury hipertermii przy początkowej temperaturze fizjologicznej (odpowiadający temperaturze optymalnej hipertermii równej 41–46°C). 95
- Rys. 36.** Przykładowe wykresy obrazujące metodę wyznaczania współczynnika SAR poprzez dopasowanie funkcji liniowych (kolor czarny) do profili temperaturowych dla SPION-Zn2-CCh(+) dla różnych stężeń próbki (a) oraz różnych mocy generatora (b). Na wykresach naniesiono współczynniki nachylenia dla poszczególnych dopasowanych funkcji. 96
- Rys. 37.** Przykładowe wykresy obrazujące metodę wyznaczania współczynnika SAR poprzez dopasowanie modelu Boxa-Lucasa (kolor czerwony) do profili temperaturowych dla SPION-Zn2-CCh(+) dla różnych stężeń próbki (a) oraz różnych mocy generatora (b). Na wykresach naniesiono otrzymane współczynniki nachylenia dla poszczególnych dopasowanych funkcji. 97
- Rys. 38.** Współczynniki SAR wyznaczone na podstawie dopasowania modelu Boxa-Lucasa przy różnej mocy generatora (a) oraz przy różnych stężeniach zawiesin (b). 98
- Rys. 39.** Wartości współczynnika ILP dla SPION-Zn2-CCh(+) i SPION-CCh(+). W górnej części rysunku umieszczono wykresy ILP wyznaczonych z nachylenia prostej dopasowanej do prostoliniowego fragmentu profilu temperaturowego: (a) przy różnej mocy generatora (stałe stężenie—0,66 mg Fe/ml) i (b) różnym stężeniu próbki (stała moc—1,3 kW), natomiast w

dolnej części rysunku znajdują się wykresy ILP wyznaczonych z modelu Boxa-Lucasa: (c) przy różnej mocy generatora i (d) różnym stężeniu próbki. 99

Rys. 40. Wyniki żywotności komórek (test MTT): (a) dla komórek neuroblastoma inkubowanych z zawiesiną SPION-Zn2-CCh(+) o różnych stężeniach; (b) dla komórek neuroblastoma inkubowanych wraz z SPION-Zn2-CCh(+) o stężeniu równym 0,18 mg Fe/ml lub bez ich obecności, które następnie poddano działaniu zmiennego pola magnetycznego (H). Słupki niepewności pomiarowych przedstawiają odchylenia standardowe średnich wartości; n = 4 (a) i n = 3 (b). Dla wszystkich próbek na rysunku (a) zaobserwowano statystycznie nieistotne odchylenia od grupy kontrolnej. ***— $p < 0,001$; n.s.—nieistotne statystycznie. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. 101

Rys. 41. Procedura otrzymywania układu hybrydowego łączącego nanocząstki i szczotki polimerowe. (a) Synteza szczotek polimerowych poli(APTAC) i szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami poli(APTAC)+SPION: 1. Adsorpcja inicjatora na powierzchni krzemu, 2. Utworzenie szczotek polimerowych z poli(APTAC) za pomocą polimeryzacji SI-ATRP monomeru APTAC, 3. Utworzenie układu hybrydowego szczotek polimerowych z poli(APTAC) wraz z SPION, za pomocą polimeryzacji SI-ATRP w obecności tych nanocząstek; (b) Synteza magnetycznych nanocząstek: 1. Mieszanina jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} w H_2O , 2. Mieszanina nanocząstek i pozostałości poreakcyjne, 3. Chromatografia magnetyczna, 4. Oczyszczone nanocząstki (źródło: opracowanie własne). 106

Rys. 42. Schemat powstawania podłoża łączącego szczotki poli(APTAC), SPION oraz warstwę PLL: (a) cienka warstwa inicjatora szczepionego powierzchniowo (APTES+BIB), (b) szczotki poli(APTAC) uzyskane poprzez ATRP w obecności SPION, (c) szczotki poli(APTAC) z wbudowanymi SPION pokryte warstwą PLL. 107

Rys. 43. Przykładowe widmo absorpcyjne UV–Vis kompleksu fenantroliny z jonami Fe^{2+} , wykorzystane do oznaczania zawartości żelaza w SPION. 112

Rys. 44. Wyniki pomiarów TEM: przykładowy obraz SPION uzyskany za pomocą mikroskopu TEM (a) oraz histogram utworzony na podstawie średnic zmierzonych na otrzymanych zdjęciach TEM (b). Dopasowano rozkład logarytmiczno-normalny. 112

Rys. 45. Wyniki pomiarów DLS oraz potencjału dzeta SPION (dopasowane rozkłady logarytmiczno-normalny (a) oraz rozkład Gaussa (b)). 113

Rys. 46. Obrazy MFM SPION: (a) wysokość, (b) obraz fazowy, (c) faza magnetyczna. Szerokość zdjęcia = 1 μm 114

- Rys. 47.** Obrazy topografii AFM zmierzone w powietrzu z odpowiadającymi im przekrojami szczotek polimerowych: (a) poli(APTAC), (b) poli(APTAC) pokryte PLL, (c) poli(APTAC)+SPION i (d) poli(APTAC)+SPION z warstwą PLL; (e) Obraz fazowy MFM szczotek poli(APTAC)+SPION pokrytych cienką warstwą PLL (wysokość – górny obraz, faza magnetyczna – dolny obraz)..... 115
- Rys. 48.** Obrazy topografii AFM w wodzie szczotek poli(APTAC) pokrytych PLL przed (a1) i po (a2) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym oraz szczotek poli(APTAC)+SPION pokrytych PLL przed (b1) i po (b2) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym. 117
- Rys. 49.** Obrazy AFM zmierzone w wodzie wraz z odpowiednimi przekrojami szczotek poli(APTAC) pokrytych PLL przed (a) i po (b) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym oraz szczotek poli(APTAC)+SPION pokrytych PLL przed (c) i po (d) 24 h w zewnętrznym polu magnetycznym..... 118
- Rys. 50.** Obrazy AFM wraz z przekrojami dla szczotek poli(APTAC) (a) i tych samych szczotek po 5 minutach działania ultradźwięków w zawiesinie SPION (b). 119
- Rys. 51.** Obrazy topografii AFM próbki poli(APTAC)+SPION bezpośrednio po syntezie (a) oraz po miesiącu przechowywania w powietrzu atmosferycznym (b). Szerokość zdjęcia AFM wynosi 1 μm 119
- Rys. 52.** Obrazy PF-MFM (PeakForce MFM) szczotek poli(APTAC) (a) oraz poli(APTAC)+SPION (b): 1. topografia, 2. adhezja, 3. faza magnetyczna. 120
- Rys. 53.** Wyniki pomiarów QNM dla poli(APTAC) (a) i poli(APTAC)+SPION (b) wraz z odpowiednimi histogramami. 121
- Rys. 54.** Wyniki pomiarów AFM dla próbki poli(APTAC)+SPION: topografia (a) i wgłębienie (b) wraz z odpowiednim przekrojem obrazującym wgłębienie ostrza (c). 121
- Rys. 55.** Wyniki XPS: widmo poli(APTAC)+SPION (a), widmo poli(APTAC) (b) oraz fragment widma (c) odpowiadający energiom wiązania N1s dla poli(APTAC)+SPION z pokryciem PLL (jasne linie) i bez pokrycia PLL (ciemne linie) (czerwona linia: $-\text{C}(\text{NH})\text{C}-$, zielona linia: $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). 122
- Rys. 56.** Wyniki otrzymane na podstawie pomiarów SIMS: profile głębokościowe poli(APTAC) (a) i poli(APTAC)+SPION (b) pokrytych PLL (kolor szary reprezentuje sygnał ^{29}Si , fioletowy $^{13}\text{CC}_2\text{H}_{10}\text{N}$ i czerwony Fe) wraz z odpowiednimi rekonstrukcjami 3D obrazującymi rozkład przestrzenny Fe (czerwony) i ^{29}Si (szary), (c)—fragmenty zebranego

widma masowego zawierające sygnał żelaza, zintegrowany z warstwy nad podłożem krzemowym dla szczotek poli(APTAC)+SPION (czarna linia), poli(APTAC) (czerwona linia) oraz niepokrytego krzemu (linia szara)..... 124

Rys. 57. Obrazy z mikroskopu optycznego komórek nerwiaka niedojrzałego hodowanych przed (a) i po (b) przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego oraz komórek oderwanych od powierzchni i znajdujących się w pożywce zbieranej znad płytek (c): 1. Polistyren, 2. Krzem modyfikowany PLL, 3. Szczotki poli(APTAC) z PLL, 4. Szczotki poli(APTAC)+SPION z PLL..... 126

Rys. 58. (a) Wyniki żywotności komórek neuroblastoma (test MTT) dla referencyjnych próbek polistyrenu i krzemu, podłoża poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION przed przyłożeniem pola magnetycznego; (b) Rezultat testu MTT dla komórek neuroblastoma ilustrujący ilość komórek pozostających na powierzchni podłoży poli(APTAC) i poli(APTAC)+SPION po ekspozycji na zewnętrzne pole magnetyczne (H); (c) Wyniki proliferacji komórek neuroblastoma określone za pomocą testu Alamar Blue® przed oderwaniem komórek wywołanym polem magnetycznym oraz (d) po zastosowaniu bodźca magnetycznego i zebraniu pożywki wraz z komórkami znad powierzchni podłoży. Dane przedstawiono jako procentowy wzrost w odniesieniu do polistyrenu (100%). Wartości p podano również w odniesieniu do polistyrenu (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta (n = 3). 127

Rys. 59. Obraz z mikroskopu optycznego komórek neuroblastoma wyhodowanych na szczotkach poli(APTAC)+SPION bez dodatkowej warstwy PLL. 129

Rys. 60. Wyniki SIMS dla badanych podłoży poddanych działaniu zewnętrznego pola magnetycznego przez 48 godzin: profile głębokościowe SIMS dla poli(APTAC) (a) i poli(APTAC)+SPION (b) po oderwaniu komórek neuroblastoma (kolor szary przedstawia sygnał ^{29}Si , fioletowy $^{13}\text{CC}_2\text{H}_{10}\text{N}$, a czerwony Fe). 129

Tabela 1. Procentowy atomowy skład pierwiastkowy nanocząstek uzyskany na podstawie wyników XPS.....	82
Tabela 2. Stosunek molowy jonów metali w mieszaninie reakcyjnej wraz z teoretycznymi i eksperymentalnymi wzorami sumarycznymi otrzymanych materiałów.....	82
Tabela 3. Średnie wartości potencjału dzeta, średnic hydrodynamicznych oraz współczynniki dyspersyjności (PDI) nanocząstek, określone za pomocą DLS. Przedstawione są średnie wartości maksymalne rozkładów z trzech pomiarów wraz z odpowiednim odchyleniem standardowym.....	85
Tabela 4. Parametry oddziaływań nadsubtelnych ^{57}Fe dla SPION-Zn ₂ -CCh(+): udział składowej, przesunięcie izomeryczne (IS) względem źródła $^{57}\text{Co(Rh)}$ w 300K, nadsubtelne pole magnetyczne (H), oddziaływanie kwadrupolowe (QS).....	92
Tabela 5. Procentowy atomowy skład pierwiastkowy warstw poli(APTAC)+SPION i poli(APTAC), uzyskany na podstawie wyników XPS.....	123

DOROBK NAUKOWY

PUBLIKACJE

1. **Górka-Kumik, W.**[‡]; Garbacz, P.[‡]; Lachowicz, D.; Dąbczyński, P.; Zapotoczny, S.; Szuwarzyński, M.: Tailoring cellular microenvironments using scaffolds based on magnetically-responsive polymer brushes. *J. Mater. Chem. B*, 2020, 8, 10172–10181. DOI: 10.1039/D0TB01853H; IF = 5,34; Punkty MNiSW: 140
[‡] Równy wkład w publikację odnotowany na pierwszej stronie artykułu.
2. **Górka, W.**; Kuciel, T.; Nalepa, P.; Lachowicz, D.; Zapotoczny, S.; Szuwarzyński, M.: Homogeneous Embedding of Magnetic Nanoparticles into Polymer Brushes during Simultaneous Surface-Initiated Polymerization. *Nanomaterials*, 2019, 9, 456, 1–11. DOI: 10.3390/nano9030456; IF = 4,32; Punkty MNiSW: 70
3. Lachowicz, D.[‡]; **Górka, W.**[‡]; Kmita, A.; Bernasik, A.; Żukrowski, J.; Szczerba, W.; Sikora, M.; Kapusta, C.; Zapotoczny, S.: Enhanced hyperthermic properties of biocompatible zinc ferrite nanoparticles with a charged polysaccharide coating. *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 2962–2973. DOI: 10.1039/C9TB00029A; IF = 5,34; Punkty MNiSW: 140
[‡] Równy wkład w publikację odnotowany na pierwszej stronie artykułu.
4. Lachowicz, D.; Wirecka, R.; **Górka-Kumik, W.**; Marzec, M.M.; Gajewska, M.; Kmita, A.; Żukrowski, J.; Sikora, M.; Zapotoczny, S.; Bernasik, A.; Gradient of zinc content in core–shell zinc ferrite nanoparticles – precise study on composition and magnetic properties. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, 21, 23473–23484. DOI: 10.1039/C9CP03591E; IF = 3,43; Punkty MNiSW: 100

UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

1. Projekt Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej - TEAM/2016-1/9, S/FS0/0236.44 „Macromolecular Engineering of Surface-Grafted Polymer Brushes” (11.2016–09.2019), stanowisko: *stypendysta doktorant*
2. Projekt Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej - TEAM/2012-9/4, "Activation of small molecules in photocatalytic systems" (10.2014–12.2015), stanowisko: *stypendysta student*
3. Projekt "Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym" koordynowany przez Jagiellońskie Centrum Leków (10.2013–06.2014), stanowisko: *wolontariusz*

WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

1. **Weronika Górka-Kumik**, Dorota Lachowicz, Szczepan Zapotoczny: *Enhanced hyperthermic properties of biocompatible zinc ferrite nanoparticles with charged polysaccharide coating* – poster, The 33rd Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS), Leuven, Belgium, 8–13.09.2019
2. Paula Nalepa, **Weronika Górka**, Tomasz Kuciel, Michał Szuwarzyński, Szczepan Zapotoczny: *Magnetically-responsive polymeric scaffolds for cell cultures* – poster, NanoOstrava 2019, 6th Nanomaterials and Nanotechnology Meeting, Ostrava, Czechy, 13–16.05.2019
3. Tomasz Kuciel, Paula Nalepa, **Weronika Górka**, Michał Szuwarzyński, Szczepan Zapotoczny: *Nanocomposite systems based on polymer brushes and superparamagnetic iron oxide nanoparticles* – poster, NanoOstrava 2019, 6th Nanomaterials and Nanotechnology Meeting, Ostrava, Czechy, 13–16.05.2019
4. **Weronika Górka**, Paula Nalepa, Tomasz Kuciel, Michał Szuwarzyński, Szczepan Zapotoczny: *Homogeneous embedding of magnetic nanoparticles into polymer brushes during simultaneous surface-initiated polymerization*, Krakow Interdisciplinary Science Seminar, Kraków, Polska, 18.01.2019
5. **Weronika Górka**, Paula Nalepa, Tomasz Kuciel, Michał Szuwarzyński, Katarzyna Berent, Marta Gajewska, Szczepan Zapotoczny: *Hybrid nanocomposites based on nanoparticles and quantum dots embedded in polymer brushes for photovoltaic applications* – poster, The 2018 E-MRS Spring Meeting and Exhibit, Strasbourg, France, 18–22.06.2018
6. **Weronika Górka**, Dorota Lachowicz, Szczepan Zapotoczny: *Superparamagnetic zinc ferrite nanoparticles coated with cationic derivative of chitosan for hyperthermia applications* – poster, The 2018 E-MRS Spring Meeting and Exhibit, Strasbourg, France, 18–22.06.2018
7. Tomasz Kuciel, **Weronika Górka**, Michał Szuwarzyński: *Novel, well defined functional nanomaterials – silica grafted smart polymer brushes with incorporated superparamagnetic nanoparticles*—poster, 20th JCF-Frühjahrssymposium, Konstanz, Germany, 21–24.03.2018

8. Paula Nalepa, **Weronika Górka**, Tomasz Kuciel, Michał Szuwarzyński, Szczepan Zapotoczny: *Nanocomposites based on magnetic nanoparticles and quantum dots embedded in polymer brushes*—poster, 20th JCF-Frühjahrssymposium, Konstancja, Niemcy, 21–24.03.2018
9. Artur Jarema Wójcik, **Weronika Górka**, Mateusz Wróbel, Aleksandra Cebrat, Andrzej Baliś, Agnieszka Puciul-Malinowska, Anna Gruszkiewicz, Tomasz Uchacz, Karol Wolski, Michał Szuwarzyński, Szczepan Zapotoczny: *Novel macromolecular architectures for conversion of light energy* – poster, 2nd Interdisciplinary FNP Conference, Warszawa, 20–21.11 2017
10. **Weronika Górka**, *Superparamagnetic nanoparticles based on iron oxide – magnetic hyperthermia and other potential applications* – wystąpienie ustne, Kraków-Siegen Seminar, Kraków, 02.10.2017
11. Dorota Lachowicz, Angelika Kmita, **Weronika Górka**, Wojciech Szczerba, Marcin Sikora, Szczepan Zapotoczny: *Superparamagnetic nonstoichiometric zinc ferrite nanoparticles coated with charged polysaccharide derivatives for hyperthermia applications* – poster, 7th International Colloids Conference, Sitges, Hiszpania, 18–21.06.2017
12. **Weronika Górka**, Dorota Lachowicz, Szczepan Zapotoczny: *Superparamagnetic nanoparticles of zinc-doped iron oxide coated with cationic derivative of chitosan for hyperthermia applications* – poster, Frontiers in Polymer Science, Sevilla, Hiszpania, 17–19.05.2017