

Uniwersytet Jagielloński

Wydział Chemii



*Nanostrukturalne ultracienkie filmy i kapsuły polimerowe do
zastosowań biomedycznych.*

Maria Bulwan

*Praca doktorska wykonana w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
pod kierunkiem promotor Pani Prof. Dr hab. Marii Nowakowskiej
oraz w współpracy z Panem Dr hab. Szczepanem Zapotocznym.*

Kraków 2011.

Praca doktorska powstała przy wsparciu finansowym programu „TEAM” w ramach Działania 1.2 "Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki" Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. TEAM/2008-2/6/styp1



Fundacja na rzecz Nauki Polskiej



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



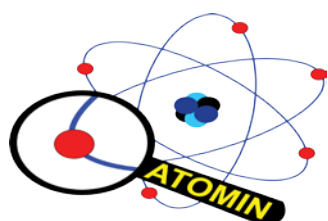
*Praca doktorska została współfinansowana z programu „Doctus: Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów” finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetu Województwa Małopolskiego, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007 - 2013 (Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2 Transfer Wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji).
MCP.ZS.4110-63.4/2008*



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Badania przeprowadzono na sprzęcie, którego zakup został sfinansowany dzięki wsparciu Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, Program „Atomin” POIG.02.01.00-12-023/08



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Składam serdeczne podziękowania:

Pani Prof. dr hab. Marii Nowakowskiej

za przyjęcie mnie do Zespołu i możliwość wykonania niniejszej pracy pod Jej promotorską opieką. Serdecznie dziękuję za zaufanie, motywację, wsparcie, a przede wszystkim za możliwość zgłębiania interesującej tematyki badawczej;

Panu Dr hab. Szczepanowi Zapotocznemu

za interesującą tematykę pracy, wieloletnią współpracę, zaufanie, motywację, nieszablonowe propozycje rozwiązywania problemów oraz przekazanie bardzo przydatnej wiedzy „know-how” ☺;

Zespołowi Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów

*Szanownym Doktorom,
w szczególności:*

*Dr hab. Krzysztofowi Szczubiałce, dr Mariuszowi Kępczyńskiemu, dr Joannie Kowal,
dr Ani Karewicz, dr Asi Lewandowskiej, dr Kasi Wybrańskiej, dr Kindze Nawalany,
dr Karolinie Zazakowny*

oraz

*wszystkim Koleżankom i Kolegom
za miło spędzony czas w pracy jak również poza pracą ☺;*

Mojej Rodzinie,

za grunt, który dzięki Wam mam stale pod nogami;

Moim Przyjaciółom,

za wszystkie wspólnie zdobyte szczyty i przetarte ścieżki; dziękuję przede wszystkim mojej wieloletniej współlokatorce Marcie Kumorek za bardzo miło spędzony czas, życzliwą pomoc podczas niedyspozycji duchowych i fizycznych oraz za wszystkie inspirujące rozmowy ☺.

Osobne podziękowania chciałabym złożyć osobom, które w sposób istotny przyczyniły się do powstania niniejszej pracy:

*Dr hab. Ludomirze Granickiej wraz z Zespołem, za badania nad oplaszczaniem komórek,
Dr Kindze Wójcik za badania mikrobiologiczne,
Dr Piotrowi Bonarce za pomiary ITC,
Dr Bartkowi Gawłowi za pomiary XRD,
Mgr Magdzie Elżbieciak-Wodce za pomoc w badaniach voltamperometrycznych,
Mgr Maćkowi Długoszowi, za pomoc w realizacji projektu związanego z wytworzeniem materiału bakteriostatycznego dla potrzeb przemysłu tekstylnego.*

„The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity”.

“Imagination is more important than knowledge... “

Albert Einstein

Spis treści.

Wstęp	1
Cele pracy	3
Część teoretyczna	4
1. Technika tworzenia ultracienkich filmów polimerowych metodą warstwa-po-warstwie (layer-by-layer, LbL).....	5
1.1 <i>Termodynamika procesu formowania multiwarstw polimerowych</i>	8
2. Chitozan jako biomateriał.....	9
3. Biosyntezywane polimery oparte na elastynie.....	13
4. Biopowłoki.....	17
4.1. <i>Biopowłoki zabezpieczające powierzchnię przed adsorpcją białek</i>	18
4.2. <i>Filmy wykazujące kompatybilność z krwią</i>	19
4.3. <i>Pokrycia antybakteryjne</i>	19
4.4 <i>Enkapsulacja żywych komórek i tkanek</i>	21
5. Mikrocząstki do kontrolowanego uwalniania.....	24
5.1. <i>Mikrocząstki z węgla wapnia jako nośniki nanocząstek srebra do zastosowań w przemyśle tekstylnym</i>	25
Część eksperymentalna	28
I. Materiały.....	29
II. Aparatura.....	30
III. Synteza oraz charakterystyka wytworzonych pochodnych chitozanu.....	32
III.1. <i>Synteza kationowej pochodnej chitozanu (CCh)</i>	33
III.1.1. <i>Charakterystyka CCh</i>	34
III.2. <i>Synteza chitozanu zmodyfikowanego trójtlenkiem siarki (ACh)</i>	36
III.2.1. <i>Charakterystyka ACh</i>	37
III. 3. <i>Synteza CCh z barwnikiem fluorescencyjnym (fluoresceina, FITC) CCh-FITC</i>	38
Rezultaty	40
I. Filmy polielektrolitowe wytwarzane techniką layer by layer.....	41
I.1. <i>Preparatyka filmów polielektrolitowych CCh/ACh</i>	41
I.1.1. <i>Pomiary kąta zwilżania filmów CCh/ACh</i>	45
I.1.2. <i>Stabilność filmów CCh/ACh w środowisku wodnym</i>	46
I.1.3. <i>Termodynamika tworzenia filmów CCh/ACh</i>	48

I.1.4. <i>Miareczkowanie turbidymetryczne filmów CCh/ACh</i>	49
I.2. <i>Filmy polielektrolitowe oparte na pochodnych elastyny (ELRs)</i>	50
I.2.1. <i>Przygotowanie filmów polielektrolitowych z ELRs</i>	50
I.2.2. <i>Termoczulość filmów ELRs</i>	55
I.2.3. <i>Stabilność filmów w środowisku wodnym</i>	58
I.2.4. <i>Filmy ELRs zawierające pochodne azobenzenu</i>	59
I.2.4.1. <i>Fotoaktywność i termoczulość ELRs--azo.(BADANIA</i> <i>WSTĘPNE)</i>	61
I.2.4.1.1. <i>Fotoizomeryzacja w ultracienkich filmach</i> <i>polimerowych</i>	63
II. <i>Biomedyczne zastosowania filmów CCh/ACh</i>	66
II.1. <i>Antyadhezyjne właściwości filmów CCh/ACh</i>	66
II.2. <i>Antykoagulacyjne właściwości nanopowłok chitozanowych</i>	70
II.3. <i>Antybakteryjne właściwości nanopowłok chitozanowych</i>	72
II.4. <i>Badanie wpływu kationowego chitozanu na model błony</i> <i>komórkowej-badania AFM</i>	77
II.5. <i>Badanie wpływu kationowego chitozanu na model błony</i> <i>komórkowej-pomiary elipsometryczne</i>	80
II.6. <i>Badanie przepuszczalności filmów CCh/ACh przy użyciu</i> <i>woltamperometrii cyklicznej</i>	81
II.7. <i>Badanie wpływu środowiska do hodowli komórek na trwałość</i> <i>filmów CCh/ACh</i>	83
III. <i>Ultracienkie filmy polimerowe do opłaszczania żywych</i> <i>biobiektów</i>	85
III.1. <i>Enkapsulacja żywych bioobiektów</i>	85
IV. <i>Mikrocząstki do kontrolowanego uwalniania</i>	89
IV.1. <i>Synteza mikrocząstek do kontrolowanego uwalniania</i>	89
IV.2. <i>Adsorpcja filmów CCh/ACh na powierzchni mikrocząstek</i>	93
IV.3. <i>Kontrolowane uwalnianie kalceiny z mikrocząstek</i>	95
IV.4. <i>Kontrolowane uwalnianie białka BSA-FITC z mikrocząstek</i>	98
IV.5. <i>Mechanizm kontrolowanego uwalniania</i>	100
V. <i>Bakteriostatyczny materiał hybrydowy dla potrzeb przemysłu</i> <i>tekstylnego</i>	102
V.1. <i>Synteza nanocząstek srebra (nAg)</i>	102

V.2. Synteza mikrocząstek z węglanu wapnia jako nośników nAg. ...	105
V.3. Uwalnianie srebra z mikrocząstek z węglanu wapnia.....	106
V.4. Badanie adsorpcji mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra do pierza używanego w przemyśle tekstylnym.....	107
V.5. Modyfikacja ładunku powierzchniowego mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra.....	109
V.6. Badanie właściwości bakteriobójczych/bakteriostatycznych mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra...	111

<i>Podsumowanie i wnioski.....</i>	115
<i>Spis publikacji i wystąpień konferencyjnych związanych z pracą.....</i>	117
<i>Spis rysunków.....</i>	121
<i>Spis tabel.....</i>	125
<i>Spis najczęściej używanych skrótów.....</i>	126
<i>Literatura.....</i>	127

Wstęp.

Obserwowany postęp biomedycyny jest możliwy dzięki wykorzystaniu wiedzy i doświadczenia z wielu dziedzin nauki. Obok interdyscyplinarności badań, wpływ na rozwój nauk biomedycznych mają również nowoczesne technologie, do których bez wątpienia zaliczana jest nanotechnologia. Urządzeniom, a przede wszystkim materiałom projektowanym do zastosowań biomedycznych, stawiany jest warunek ich biokompatybilności z układami biologicznymi. Zwykle warunek ten jest spełniony przez materiały pochodzenia naturalnego. Do takich materiałów zaliczają się naturalne polimery, m.in. polisacharydy, białka oraz blendy tych substancji z materiałem nieorganicznym, np. z różnymi polimorficznymi odmianami węglanów, krzemionką itp. W naturze polimery te syntezowane są w ogromnych ilościach jako materiał budulcowy żywych organizmów. Dzięki obecności różnych reaktywnych grup funkcyjnych dają się one na ogół łatwo modyfikować. Z biomateriałów tych wytwarzane są protezy ortopedyczne, naczyniowe, rozruszniki serca, stenty, rurki intubacyjne, cewniki, dreny, nici czy też narzędzia chirurgiczne. Każdorazowo kontakt biomateriału z układem biologicznym powoduje jego interakcje ze składnikami krwi, osocza, białkami jak również patogenami. Niekontrolowana adhezja białek na powierzchni biomateriału może spowodować szereg reakcji organizmu: koagulację płytek krwi, odpowiedź immunologiczną, zakażenie bakteryjne, wrastanie biomateriału w tkanki organizmu, stany zapalne itp. Poznanie mechanizmów tych procesów umożliwia zaprojektowanie biomateriału, który zapobiegnie lub zminimalizuje niekontrolowane reakcje organizmu.

W wielu przypadkach znaczącą poprawę biokompatybilności uzyskuje się poprzez zastosowanie powłok z biomateriałów na urządzeniach/narzędziach biomedycznych. Jedną z metod wytwarzania takich powłok jest elektrostatyczna samoorganizacja, znana również pod nazwą techniki warstwa po warstwie. Technika ta umożliwia wytworzenie multiwarstwowej, ultracienkiej struktury z łańcuchów biopolimerów. Nanometrowej grubości powłoka powstaje w procesie samoorganizacji, czyli samoistnie, z niewielkim nakładem energii, bezodpadowo, zwykle w temperaturze pokojowej, w środowisku wodnym. Taka biopowłoka może znacząco poprawić właściwości zabezpieczonej powierzchni w jej kontakcie z układami biologicznymi. Dzięki zastosowaniu biomateriału o określonych właściwościach, czasami określanymi mianem „inteligentnych” (reagujących skokowymi zmianami właściwości na zmiany temperatury, zmieniającym swoje właściwości pod wpływem

światła) możliwym staje się projektowanie nanopowłok cechujących się odpowiedzią na określone bodźce fizyczne bądź chemiczne. Ultracienkie powłoki, w zależności od swojej grubości oraz warunków zewnętrznych tj. pH, siła jonowa, temperatura, są selektywnie przepuszczalne. Zazwyczaj pory w ich strukturze umożliwiają swobodną migrację substancji niskocząsteczkowych. Z kolei przepuszczalność dla makrocząstek jest utrudniona. Dlatego powłoki takie znajdują zastosowanie w kontrolowanym uwalnianiu leków lub też innych substancji, kierowanych do konkretnych miejsc działania. Substancje uwalniane są ze specjalnych nośników - mikrocząstek, na których adsorbowane są cienkie polimerowe filmy. Mikrocząstki do kontrolowanego uwalniania takich substancji mogą być wytwarzane również z substancji biokompatybilnej, najczęściej są to więc hybrydy związków organicznych i nieorganicznych, wytwarzane jednoetapowo, szybko, tanio oraz w środowisku wodnym, dzięki czemu stają się atrakcyjne do szerszych zastosowań komercyjnych. Ultracienkie biopowłoki stosowane są również jako ochronne nanostrukturalne płaszcze dla żywych komórek bądź tkanek. „Nanopłaszcze” zaadsorbowane na powierzchni bioobjektów umożliwiają im swobodną wymianę gazową oraz substancji odżywczych. Jednocześnie stanowią one immunoizolację bioobjektu, co ma szczególne znaczenie podczas przeszczepów komórkowych/tkankowych. Ultracienkie płaszcze chronią również żywe obiekty przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, np. niską temperaturą czy też uszkodzeniami mechanicznymi.

Cele pracy.

Głównym celem pracy doktorskiej było wytworzenie ultracienkich filmów polimerowych opartych na biopolimerach (filmy z pochodnych chitozanu oraz filmy z polimerów elastynopochodnych) oraz synteza mikrocząstek polimerowo-nieorganicznych. Zarówno ultracienkie filmy jak również mikrocząstki zostały wytworzone dla potrzeb biomedycznych.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej dążono do wytworzenia ultracienkich powłok polimerowych o określonych właściwościach fizykochemicznych (o określonej topografii powierzchni, zwilżalności, trwałości podczas przechowywania w warunkach imitujących środowisko wewnętrzne organizmu itp.). Dobrze scharakteryzowane cienkie filmy polimerowe sprawdzono również pod kątem zastosowań biomedycznych: antyadhezyjności w stosunku do białek, antykoagulacyjności, antybakteryjności. Celem pracy było również sprawdzenie możliwości stosowania cienkich polimerowych filmów do enkapsulacji żywych bioobjektów (komórek, tkanek) jako ochronnych nanostrukturalnych płaszczy podczas przechowywania w niskich temperaturach, czy też dla potrzeb immunoizolacji. W trakcie badań wytworzono i scharakteryzowano ultracienkie filmy z wytworzonych pochodnych chitozanu oraz z polimerów elastynopochodnych. Nanostrukturalne filmy z pochodnych chitozanu sprawdzono również pod kątem wyżej wymienionych zastosowań biomedycznych.

Celem pracy doktorskiej było również wytworzenie mikrocząstek do kontrolowanego uwalniania. Mikrocząstki wytworzono z węgla wapnia oraz z polimeru: pochodnej chitozanu, którą zastosowano dla mikrocząstek do zastosowań biomedycznych oraz z dodatkiem polimeru syntetycznego - takie mikrocząstki zaprojektowano dla potrzeb branży tekstylnej. Dobór odpowiednich parametrów syntezy umożliwił otrzymanie mikrocząstek o pożądanym parametrach fizykochemicznych. Na etapie syntezy mikrocząstek zamknięto w nich substancję mającą się później uwolnić, najlepiej w sposób kontrolowany. W przypadku mikrocząstek do zastosowań biomedycznych zamknięto substancję modelową: kalceinę oraz substancję wielkocząsteczkową (białko). Kontrolę nad procesem uwalniania zamkniętej wewnątrz mikrokapsuły substancji osiągnięto poprzez adsorpcję na powierzchni mikrocząstki ultracienkich filmów polimerowych. W przypadku mikrocząstek wytworzonych do zastosowań w branży tekstylnej, substancją zamkniętą w ich wnętrzu były nanocząstki srebra.

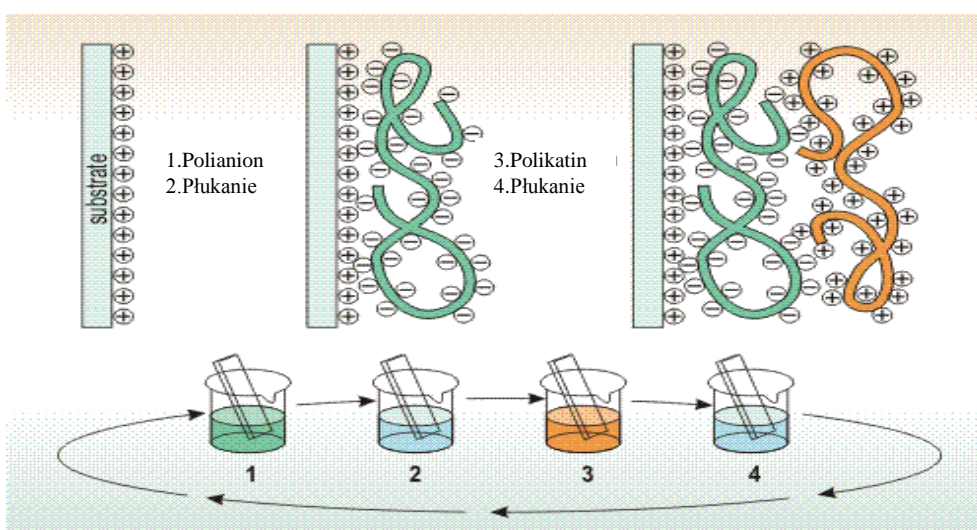
Część teoretyczna.

1. Technika tworzenia ultracienkich filmów polimerowych metodą warstwa-po-warstwie (layer-by-layer, LbL).

„Metoda jest prosta, nawet prymitywna.....Jednocześnie pozwala wytworzyć warstwy polimerowe, adsorbować białka, wirusy i nanocząstki”. Y. Lvov¹

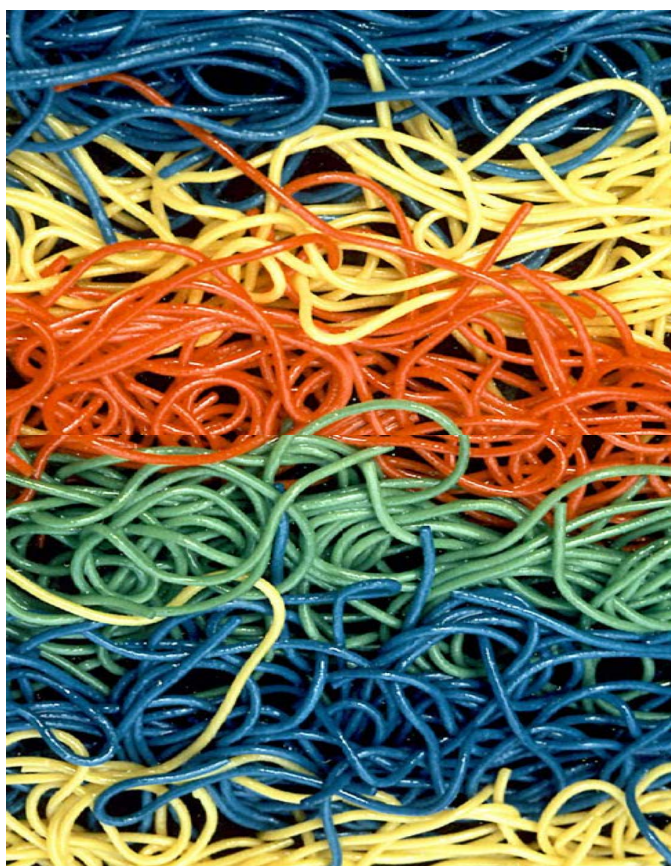
Technika elektrostatycznej samoorganizacji polielektrolitów (layer by layer, LbL) została opisana w literaturze w latach 60 XX w, jednak jej intensywny rozwój przypada na lata 90 XX w dzięki pracom Dechera, Mówalda oraz Lvowa¹. Prostota metody, niewielkie koszty wytworzenia, szeroki wachlarz stosowanych substancji oraz substratów, jak również niewiarygodna precyzja, umożliwiająca manipulację w skali nano, spowodowała szybki wzrost zastosowań: od modyfikacji powierzchni np. w celu jej ochrony przed korozją, zakażeniem bakteryjnym, zwiększeniem jej biokompatybilności z komórkami/tkankami do wytwarzania celek fotowoltaicznych, powłok antyadhezyjnych czy też powierzchni ulegających samooczyszczaniu. Metoda LbL służy również do otrzymywania trójwymiarowych struktur wykorzystywanych jako samodzielne układy reaktorów membranowych, diody emisyjne czy też membrany służące do separacji. Pierwszym, komercyjnym produktem uzyskanym techniką LbL były soczewki kontaktowe CIBA-Vision, które weszły na rynek w kwietniu 2002 w USA¹.

Kilkusetapowy proces formowania multiwarstwowego filmu polielektrolitowego przedstawiono na poniższym schemacie (Rys. 1)². Polielektrolit można zaadsorbować na dowolnej powierzchni obdarzonej przeciwnym ładunkiem. Po naprzemiennej adsorpcji substancji, z powierzchni usuwa się nadmiar niezaadsorbowanego polimeru.

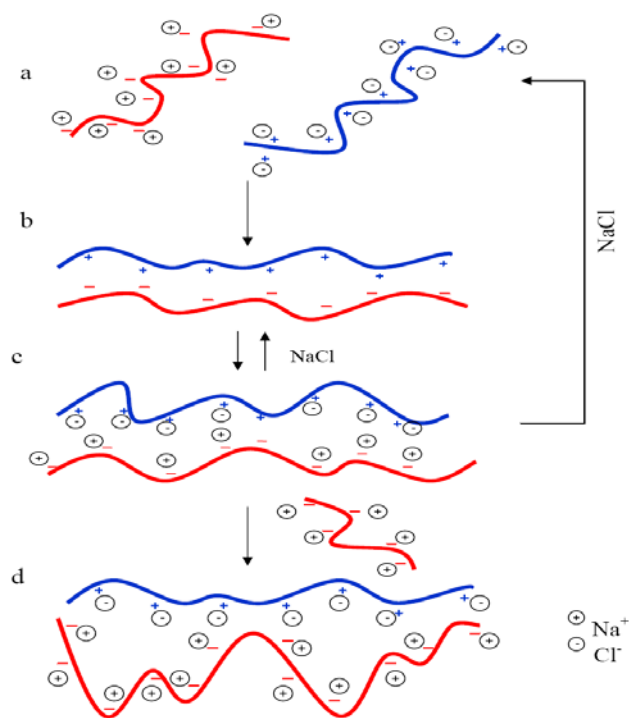


Rys. 1. Schemat wytwarzania multiwarstwowego filmu polielektrolitowego.

Adsorpcja polielektrolitów prowadzi do powstania sieci (Rys. 2) wzajemnie przenikających się łańcuchów polimerów. Układ „sieci”: wielkość powstałych porów, jej przepuszczalność, homogeniczność warstw, trwałość struktury zależy od wielu czynników. Jednym z nich jest siła jonowa (Rys. 3); zbyt duża powoduje ekranowanie ładunków, polielektrolit w roztworze występuje w postaci kłęбка, co prowadzi do adsorpcji grubego filmu polielektrolitowego, gdzie łańcuchy nie przenikają się wzajemnie, przez co słabiej ze sobą oddziałują i w rezultacie wytworzona struktura nie jest trwała³. Innym czynnikiem jest pH - czynnik ten wpływa na ładunek słabych polielektrolitów; manipulacja pH umożliwia wytworzenie stabilnego filmu ze słabych polielektrolitów⁴. Istotną rolę odgrywa także rodzaj zastosowanych polimerów (stężenia, pK naładowanych grup, gęstości ładunku, elastyczności łańcucha, oddziaływań pomiędzy polielektrolitami i rozpuszczalnikiem) itp.



Rys. 2. Makroskopowy model multiwarstwowego filmu polielektrolitowego.



Rys. 3 Wpływ soli na tworzenie multiwarstwowego filmu polielektrolitowego. W roztworze ładunek polielektrolitu jest ekranowany przez jony soli (a). Podczas tworzenia kompleksu polielektrolitowego dochodzi do wydzielania jonów soli do roztworu (b). Sól obecna w roztworze wnika do wnętrza filmu polielektrolitowego. Wówczas może dojść do dekompozycji mniejszych, słabiej zaadsorbowanych fragmentów łańcuchów polimeru (c). Adsorpcja polielektrolitu do powierzchni w obecności soli powoduje, że część ładunku jest ekranowana przez przeciwjony, dzięki czemu możliwa jest adsorpcja kolejnej warstwy polielektrolitu (d).

Adsorpcja i struktura multiwarstw zależy również od właściwości substratu: gęstości ładunku, homogeniczności powierzchni czy też jej hydrofobowości/hydrofilowości. Multiwarstwowe filmy polimerowe tworzone są przede wszystkim dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym, jakkolwiek w tworzeniu multiwarstwowych struktur mogą uczestniczyć także wiązania wodorowe czy też oddziaływania van der Waalsa pomiędzy fragmentami hydrofobowymi łańcuchów polimerów⁵.

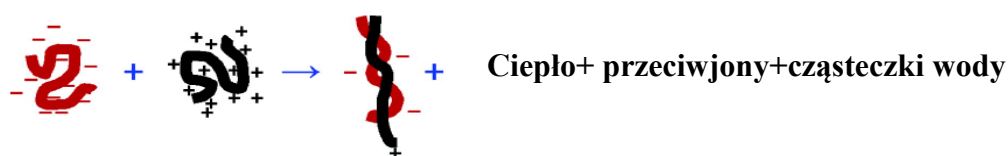
W zależności od powyższych parametrów uzyskuje się multiwarstwowy film polimerowy o różnym stosunku przedstawionych poniżej fragmentów:

- „train” – tworzą go fragmenty łańcucha będące w kontakcie z powierzchnią substratu,
- „loop” – fragmenty łańcucha polimeru otoczone przez rozpuszczalnik, zaadsorbowane do substratu przez sąsiadujące fragmenty „train”,
- „tail” - wolne końce łańcuchów polimerowych, skierowane do roztworu, przymocowane jednym końcem (część „train”) do powierzchni.

Zwykle dąży się do wytworzenia stabilnego filmu multiwarstwowego składającego się głównie z fragmentów „train”. Trwałe filmy polielektrolitowe można uzyskać z mocnych, syntetycznych polielektrolitów, które w szerokim zakresie pH są zdysocjowane. W przypadku polielektrolitów pochodzenia naturalnego wytworzenie stabilnego multiwarstwowego filmu jest utrudnione z wielu powodów. Po pierwsze polielektrolity naturalne niejednokrotnie są słabo zdysocjowane. Dodatkowo problemem podczas tworzenia multiwarstw jest sztywność łańcucha głównego polimeru, która może prowadzić do powstania zawady sterycznej utrudniającej adsorpcję. Dlatego wytworzenie stabilnego multiwarstwowego filmu opartego na polielektrolitach naturalnych, głównie na polisacharydach, często kończyło się niepowodzeniem lub wytworzeniem jedynie cienkiego filmu np. w przypadku filmu zbudowanego z kwasu hialuronowego i chitozanu ⁶. Dla przykładu, uzyskanie trwałego filmu ze słabych polielektrolitów wymagało doboru pH roztworu np. w filmach heparyna-chitozan oraz alginian-chitozan ^{7, 8}.

1.1. Termodynamika procesu formowania multiwarstw polimerowych.

Proces formowania filmów polielektrolitowych rozpatrywać można jako specyficzny przypadek tworzenia polielektrolitowych kompleksów w roztworze (Rys. 4). Badania NMR w ciele stałym oraz ATR-FITR potwierdziły, że strukturalnie oraz termodynamicznie można je rozpatrywać jako zaadsorbowane na powierzchni filmy polielektrolitowe ⁹.



Rys. 4 . Proces formowania kompleksu polielektrolitowego w roztworze ⁹.

Proces ten zachodzi spontanicznie kiedy zmiana entalpii swobodnej mieszania polielektrolitów jest ujemna $\Delta G_{\text{mix}} < 0$. Wartość ΔG_{mix} , przy zadanej temperaturze T, można obliczyć z ogólnej zależności pomiędzy entalpią ΔH_{mix} a entropią mieszania ΔS_{mix} [1]

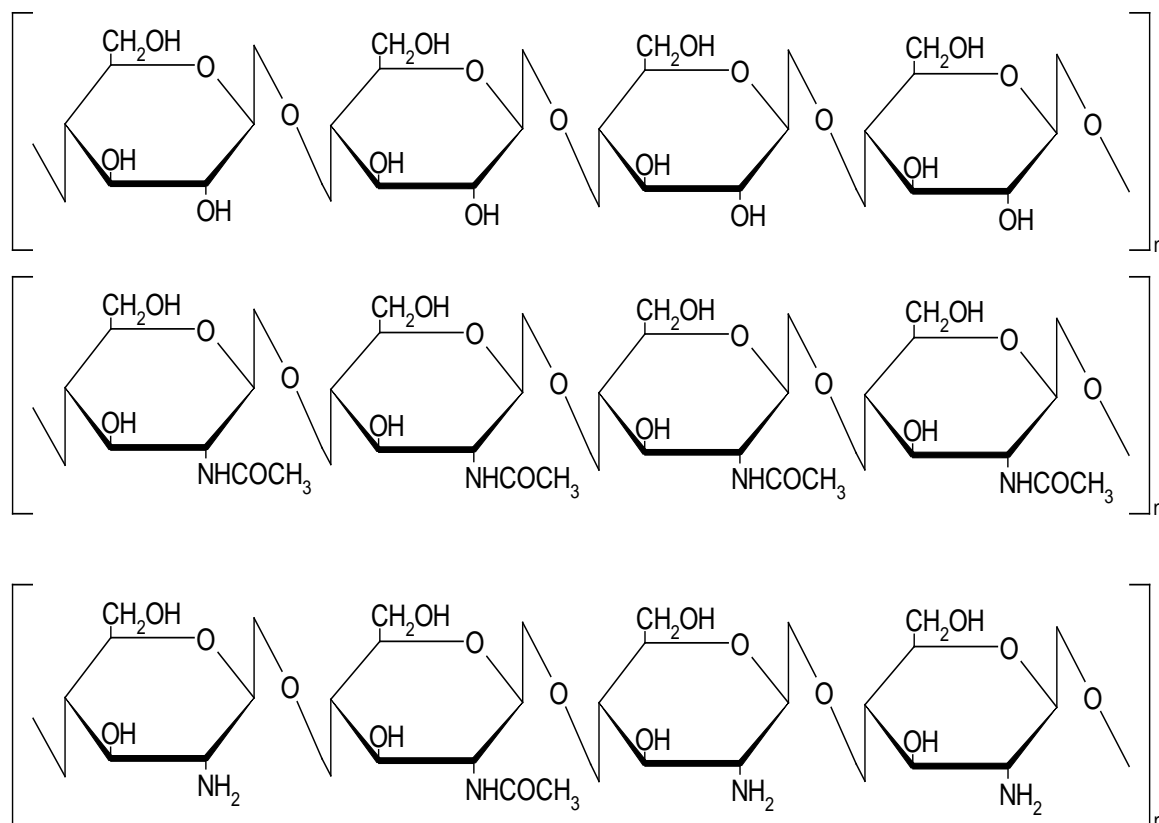
$$\Delta G_{\text{mix}} = \Delta H_{\text{mix}} - T \Delta S_{\text{mix}} \quad [1]$$

Jak potwierdziły badania ITC¹⁰ i ATR-FITR¹¹, proces mieszania polielektrolitów obdarzonych przeciwnym ładunkiem i proces formowania kompleksów polielektrolitowych jest procesem atermalnym¹² albo słabo egzotermicznym. Dotychczas prezentowane dane podają, że całkowita zmiana entalpii mieszania wynosi ok. 2 kJ/mol¹³. Dlatego proces formowania filmów polielektrolitowych jest procesem entropowym. Wzrost entropii ΔS_{mix} spowodowany jest głównie uwalnianiem przeciwjonów oraz cząsteczek wody podczas procesu formowania się kompleksu. Zapewnia to spontaniczność tworzenia kompleksów ($\Delta G_{\text{mix}} < 0$). Stabilne filmy polielektrolitowe tworzą się wtedy, kiedy stosunek stechiometryczny polikationu oraz polianionu jest bliski jedności.

2. Chitozan jako biomateriał.

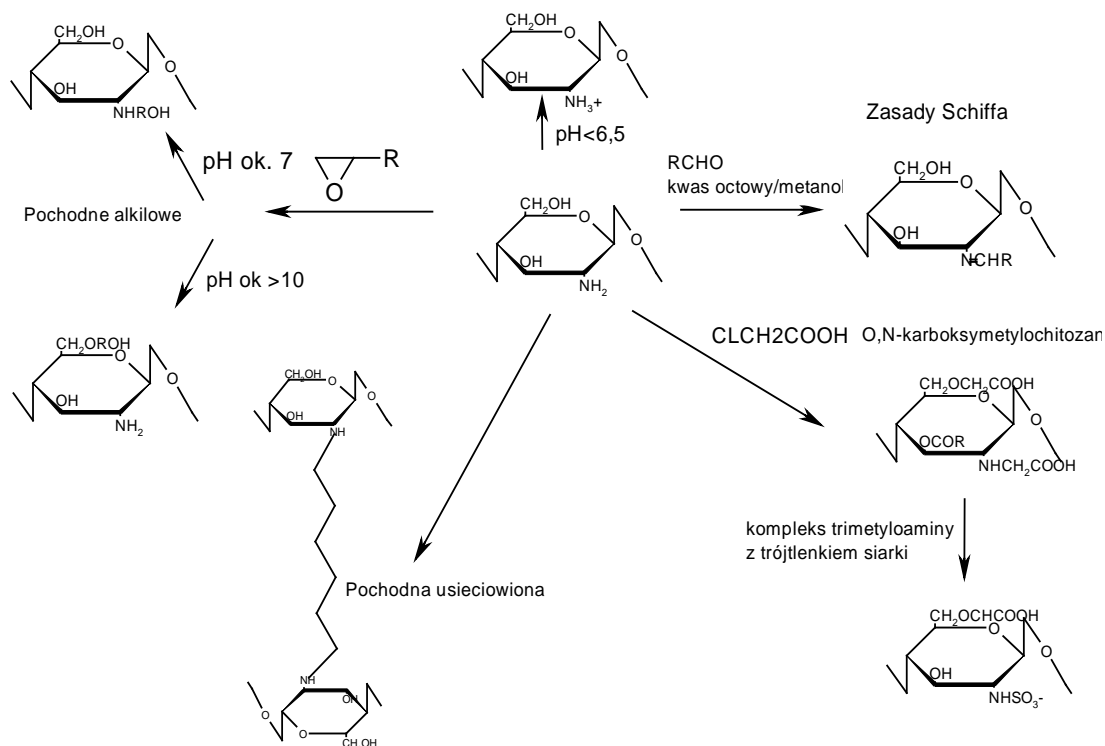
Chityna obok celulozy jest najbardziej rozpowszechnionym polisacharydem w przyrodzie. Jest ona niskoreaktywnym polimerem strukturalnym. Chityna jest słabo rozpuszczalna w większości rozpuszczalników, za wyjątkiem heksafluoroizopropanolu i heksafluoroacetonu¹⁴. Podobnie jak celuloza w królestwie roślin, chityna jest materiałem budulcowym w rodzinie zwierząt bezkręgowych oraz grzybów. Spełnia swoje funkcje dzięki niskiej elastyczności, sztywności oraz twardości. Biodegradacja chityny odbywa się przy udziale enzymów, chitanaz oraz lizozymów, wytwarzanych przez niektóre mikroorganizmy oraz w żołądkach niektórych zwierząt. Chitozan jest deacetylowaną pochodną chityny, o stopniu deacetylacji co najmniej 50%. Może być również wytwarzany przez pleśń *Absidia orchidis*¹⁵. Komercyjnie produkcja chitozanu odbywa się w kilku etapach. Zmielony materiał z muszli skorupiaków poddawany jest początkowo reakcji polegającej na usunięciu białka. W tym celu chitozan traktuje się 3-5% NaOH w temperaturze 80-90 °C przez kilka godzin. Następnie usuwa się związki nieorganiczne, 3-5% HCl w temperaturze pokojowej aż do uzyskania białej bądź beżowej chityny. Następnie przeprowadza się właściwy proces deacetylacji chityny, traktując ją 40-50% NaOH. Otrzymuje się nierozpuszczalny osad-chitozan, który płucze się wodą. Warunki, w jakich przeprowadza się proces deacetylacji, determinują rodzaj uzyskanego chitozanu. Dalsze oczyszczanie chitozanu polega na jego rozpuszczeniu w 2% kwasie octowym, celem usunięcia nierozpuszczalnego materiału, następnie przeprowadza się neutralizację NaOH, a dalsze jego oczyszczanie jest konieczne właściwie tylko wtedy, gdy ma być użyty do celów farmaceutycznych oraz biomedycznych. Polega ono głównie na odbarwieniu chitozanu, przeważnie roztworem nadmanganianu

potasu. Taki sposób pozyskiwania chityny i chitozanu jest ekonomicznie opłacalny, gdyż w przemyśle spożywczym muszle krabów oraz kałamarnic w zasadzie traktuje się jak odpad^{16, 17}. Produkt deacetylacji chityny jest rozpuszczalny w rozcieńczonych kwasach: octowym czy mrówkowym dzięki protonacji grup aminowych. Strukturalne podobieństwo celulozy, chityny oraz chitozanu przedstawiono na poniższym schemacie (Rys. 5):



Rys. 5. Schemat struktury: od góry: celuloza, chityna i N-deacetylowana pochodna chityny: chitozan.

Czynnikiem wyróżniającym chitozan spośród innych, naturalnie występujących polisacharydów: celulozy, alginianu, dekstranu, pektyn czy karragenianów jest jego kationowy charakter w lekko kwaśnym środowisku. Dzięki obecności reaktywnych grup: $-NH_2$ oraz $-OH$ daje się łatwo modyfikować, a jego modyfikacje znajdują wiele zastosowań (Rys. 6.) oraz Tabela 1.



Rys. 6. Przykładowe modyfikacje chitozanu ¹⁸.

Tab.1. Zastosowanie modyfikacji chitozanu ¹⁹

Pochodne	Przykłady otrzymania	Potencjalne zastosowanie
Pochodne N-acylowe chitozanu	Reakcje z kwasami karboksylowymi, bezwodnikami kwasowymi, chlorkami kwasowymi.	Tekstyliia, membrany oraz zastosowania biomedyczne.
Pochodne N-karboksyalkilowe chitozanu, Pochodne arylowe	N-karboksybenzyl, N-karboksymetylochitozan.	Substancje służące do chromatografii oraz substancje wykorzystywane przy kompleksowaniu jonów metali.
Pochodne O-karboksyalkilowe chitozanu	O-karboksymetylochitozan.	Sita molekularne, kompleksowanie jonów metali, konserwant do przetworów owocowych
Pochodne alkilowe chitozanu	Chitozan modyfikowany np. chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym.	Kosmetologia, farmaceutyka, implanty.
Pochodne N-i O- sulfonowe	Modyfikacja chitozanu kompleksem trimetyloaminy z trójtlenkiem siarki w środowisku wodnym.	Środki antyseptyczne, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne.
Chelaty metaliczne	Pallad, miedź, srebro.	Katalizatory, zastosowania w fotografii.
Semisyntetyczne żywice chitozanowe	Kopolimery chitozanu oraz metakrylanu metylu, uretanu.	Tekstyliia, oczyszczanie wody, kompleksowanie metali, przemysł kosmetyczny.
Naturalne kompleksy z polisacharydami oraz z innymi polielektrolitami	Chitozan-glukan, chitozan-chitozan, chitozan-alginian itp.	Flokulant, kompleksacja metali, odsalanie wody, membrany do dializy, immobilizacja enzymów, wypełniacze żywności oraz środek kompleksujący cholesterol.
Produkty usieciowane kowalencyjnie, tzw. żele chemiczne	Modyfikacja przy udziale dialdehydów: glioksalowym, glutarowym, genipinem.	Produkty usieciowane są trwalsze, mniej wrażliwe na zmiany pH oraz temperatury w stosunku do polimerów wyjściowych, zachowując jednocześnie jego właściwości za wyjątkiem krystaliczności, zastosowania to przede wszystkim kontrolowane uwalnianie leków.

Chitozan znajduje szereg zastosowań biomedycznych. Z uwagi na strukturalne podobieństwo do glikoaminoglikanów obecnych w skórze, wykorzystywany jest jako środek przyspieszający gojenie skóry po poparzeniach bądź po ingerencji chirurgicznej²⁰. Stosowany jest także w formie membrany wspomagającej tworzenie nowych komórek skóry²¹. Z chitozanu wytwarza się również nici chirurgiczne²², soczewki kontaktowe²³. Jako substancja zdolna do wytworzenia hydrożelu wykorzystywany jest w procesie kontrolowanego uwalniania leków²⁴ np. w postaci mikrocząstek chitozan/alginian²⁵. Chitozan, zwłaszcza jego sulfonowana pochodna nazywana jest heparynoidem z uwagi na strukturalne oraz czynnościowe podobieństwo do heparyny: zapobiega koagulacji oraz krzepnięciu krwi, dlatego polimer ten może znaleźć zastosowanie w dializie, do produkcji membran²⁶. Jako substancja wykazująca powinowactwo do lipidów, stosowany jest również w środkach odchudzających, wiążących tłuszcz z przewodu pokarmowego²⁷. Chitozan jest szeroko stosowanym biomateriałem, którego dodatkową zaletą są niewielkie koszty wytwarzania i możliwość modyfikacji.

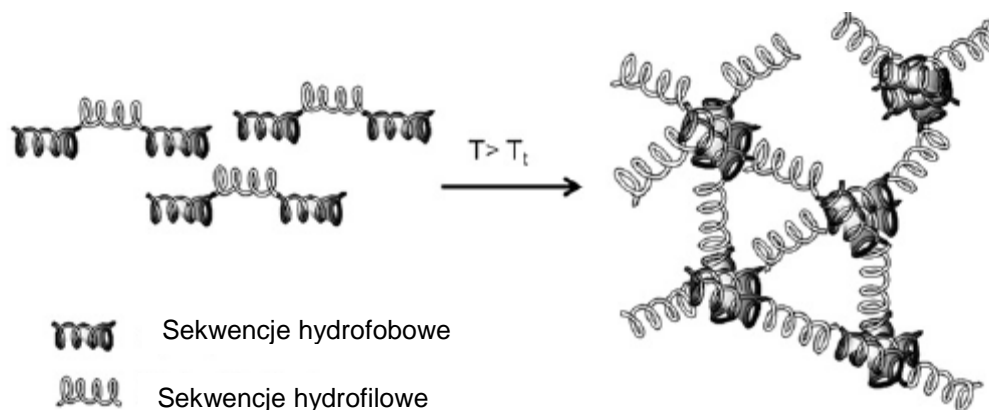
3. Biosyntezowane polimery oparte na elastynie.

Polimery elastynopochodne to grupa „półsyntetycznych” polipeptydów wytwarzanych drogą inżynierii genetycznej. Stanowią interesującą, ze względu na swoje właściwości, grupę polimerów chętnie wykorzystywanych w inżynierii materiałowej. W organizmie naturalne polipeptydy pełnią funkcje budulcowe, w których kluczową rolę odgrywają ich zdolności do samoorganizacji. Polipeptydy są również katalizatorami wielu reakcji biochemicznych. Sposób syntezy białka o określonych właściwościach, o określonej sekwencji aminokwasów zapisany jest w materiale genetycznym. Translacja jest procesem wieloetapowym i skomplikowanym, a najdrobniejsza pomyłka, pominięcie bądź zamiana jednego aminokwasu, może całkowicie zmienić właściwości białka i prowadzić nawet do jego inaktywacji. Jednocześnie prawidłowo przebiegająca synteza konkretnego białka prowadzi do powstania polimeru charakteryzującego się precyzją w sekwencji aminokwasów oraz monodispersyjnością w rozkładzie masy cząsteczkowej, niemożliwą do osiągnięcia metodami klasycznej syntezy chemicznej. Stąd synteza białek, zachowujących swoje właściwości, jest możliwa tylko poprzez syntezę w żywym organizmie, którego materiał genetyczny został odpowiednio zmodyfikowany drogą inżynierii genetycznej. Organizmami wykorzystywanymi do biosyntezy polipeptydów są głównie bakterie, np. *E.Coli*²⁸ ale także rośliny, np. tytoń (występująca w glebie bakteria: *Agrobacterium tumefaciens* dzięki swoim

naturalnym zdolnościom do transferu genów wbudowuje zmodyfikowaną informację genetyczną w DNA komórki roślinnej, która następnie produkuje polipeptyd i wydziela go do przestrzeni międzykomórkowej lub bezpośrednio do środowiska hodowlanego przez system korzeniowy²⁹).

Oczyszczanie w ten sposób wytworzonych polipeptydów nie jest skomplikowane. Polimery w wyższych temperaturach wykazują tzw. temperaturę przejścia, (*inverse temperature transition, ITT*) powyżej której wytrącają się z roztworu. Proces jest odwracalny, poniżej ITT polipeptydy stają się znów rozpuszczalne w roztworze, dlatego ich oczyszczanie polega na podgrzaniu reaktora zawierającego biosyntezujące bakterie, odwirowaniu osadu, rozpuszczaniu w roztworze przy równoczesnym chłodzeniu. Cały proces bioprodukcji jest relatywnie tani i pozwala na otrzymanie wysokiej jakości materiału.

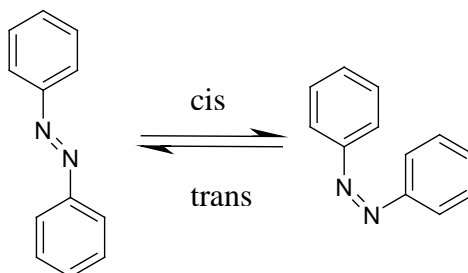
Polimery elastynopochodne (Elastin-like Recombiners, ELRs) oparte są na sekwencji Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, gdzie Xaa może być każdy naturalny aminokwas za wyjątkiem proliny³⁰. Sekwencje te są charakterystyczne dla tropoelastyny³¹, która jest rozpuszczalna w wodzie, a w organizmie jest prekursorem samoorganizacji elastyny w nanowłókna³². Strukturalne podobieństwo do polimeru występującego w organizmie powoduje, że ELRs nie są rozpoznawalne przez układ immunologiczny za obce, przez co wykazują niezwykłą biokompatybilność z komórkami organizmu. Cechą charakterystyczną ELRs jest ich termoczułość i LCST, która utożsamiana jest z ITT. Powyżej temperatury ITT drugorzędowa struktura polipeptydu ulega zmianie z wydłużonej na zagregowaną, co skutkuje wytrąceniem się białka z roztworu³³. Poniżej temperatury ITT cząsteczki polimeru w roztworze wodnym występują w postaci statystycznego kłęбка polimerowego i są całkowicie zhydratowane. Hydratacja ta związana jest z występowaniem klastrów wody wokół apolarnych fragmentów polimeru. Powyżej temperatury ITT polipeptyd zmienia konformację z nieregularnej kulistej na uporządkowaną β -spiralną, w której pozbywa się klastrów z wodą, staje się nierozpuszczalny i w końcu wytrąca się z roztworu. Zmiany w strukturze zaprezentowano na Rys. 7. Proces jest odwracalny, a wytrącenie białka z roztworu występuje w wąskim przedziale temperaturowym (ok. 3⁰C), zależne jest od pH roztworu, siły jonowej, długości łańcucha polipeptydu oraz rodzaju aminokwasu Xaa³⁴.



Rys. 7. Zachowanie tri blokowego ELRs wykazującego temperaturę ITT w roztworze wodnym.

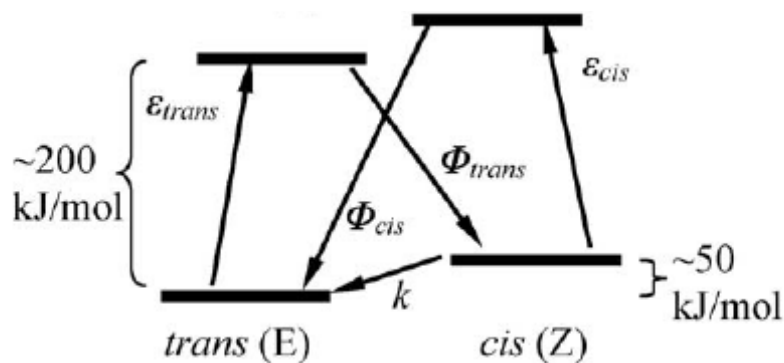
Polimery elastynopochodne stosowane są w produkcji nanocząstek do kontrolowanego uwalniania leków³⁵, rusztowań wykorzystywanych w inżynierii tkankowej³⁶ (polipeptydy z sekwencją VPGVG wykazują powinowactwo do komórek, obserwowano adhezję i proliferację komórek do powierzchni pokrytej warstwą takiego polipeptydu). Z ELRs wytwarzano także hydrożele wykorzystywane do hodowli komórkowej 3D³⁷. Podejmowano także próby wykorzystania takich polimerów jako tzw. „przełączniki molekularne” (*molecular switches*)³⁸.

Osobną, ciekawą grupę polimerów ELRs stanowią polipeptydy z kowalencyjnie dołączonym chromoforem ulegającym szybkiej, wydajnej oraz w pełni odwracalnej fotoizomeryzacji. Przykładem takiego chromoforu jest azobenzen. Związek ten pod wpływem naświetlania światłem o długości fali 366 nm ulega fotoizomeryzacji do izomeru cis, z kolei naświetlanie światłem o długości 436 nm prowadzi do powstania pochodnej typu trans. Przejście z cis do trans może odbywać się również poprzez relaksację termiczną. Zmiany te zaprezentowano na Rys. 8.



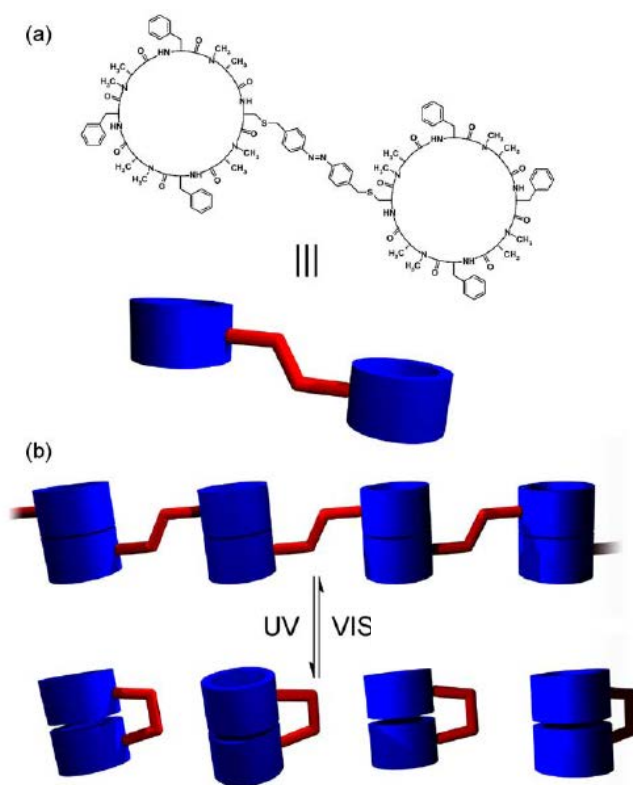
Rys. 8. Fotoizomeryzacja azobenzenu.

Z termodynamicznego punktu widzenia preferowany jest izomer trans, gdyż jest bardziej stabilny o ok. 50 kJ/mol. Bariera energetyczna stanu wzbudzonego wynosi ok. 200 kJ/mol (Rys. 9.) W ciemności lub w warunkach zwykłego dziennego światła roztwór azobenzenu jest mieszaniną dwóch izomerów. Absorpcja fotonu przez izomer trans prowadzi do tworzenia izomeru cis, z kolei absorpcja przez formę cis prowadzi do powstania izomeru trans³⁹.



Rys. 9. Fotoizomeryzacja azobenzenu. Naświetlenie światłem o określonej długości fali prowadzi do ruchu pierścieni fenylowych z ułożenia trans (E) do cis (Z). Wydajność kwantowa wzbudzenia (ϵ), wydajność kwantowa fotoizomeryzacji (ϕ).

Izomery cis i trans różnią się konformacją oraz rozmiarem. Zmiany geometryczne cząsteczki pod wpływem naświetlania umożliwiają również zmiany jej otoczenia na poziomie makroskopowym. Azobenzen dodawano do roztworów polimerów w celu kontroli właściwości materii przed i po naświetlaniu, jednak najbardziej efektywną kontrolę uzyskano poprzez kowalencyjne przyłączenie azobenzenu do cząsteczki polimeru. W układzie takim nie dochodziło do agregacji oraz krystalizacji chromoforu. Znane są prace, gdzie w ciemności wytwarzano micelle z polipeptydu z kowalencyjnie przyłączonym azobenzenem, które fotoizomeryzują z utworzeniem izomeru cis⁴⁰. Możliwości azobenzenu w „foto-przełączaniu” zaprezentowano na schemacie poniżej (Rys. 10.) Cykliczny polipeptyd połączony jest azobenzenem. W formie trans jednostki są ułożone liniowo. W formie cis organizują się w rodzaj sieci, gdzie znaczącą rolę odgrywają również wiązania wodorowe. Pod wpływem naświetlania dochodzi do zerwania wiązań wodorowych i z powrotem do wykształcenia wyjściowej struktury⁴¹.



Rys. 10. Fotoizomeryzacja w przykładowym układzie biologicznym

Właściwości azobenzenu zostały wykorzystane w kilku układach biologicznych. Kowalencyjne podłączenie azobenzenu do niektórych aminokwasów wykorzystywane było do zmiany ich chiralności⁴². Azobenzen łączono z enzymami, by poprzez ich naświetlanie modyfikować ich aktywność⁴³. Z kolei przyłączenie pochodnych azobenzenu do DNA pozwoliło na fotochemiczną kontrolę ekspresji niektórych genów⁴⁴. Fotomechaniczne efekty obserwowano również w ultracienkich filmach polimerowych zawierających azobenzen⁴⁵. Azobenzen został również kowalencyjnie podłączony do ELRs na drodze wieloetapowej syntezy⁴⁶.

4. Biopowłoki.

Biopowłoki stosowane są w celu poprawienia biokompatybilności implantów/urządzeń mających kontakt z tkankami organizmu. Do tego typu urządzeń zalicza się: bypass-y, pompy krwi, sztuczne nerki, serca, balony stosowane do rozszerzania aorty, dializery, urządzenia służące do separacji surowicy, sztuczne soczewki stosowane w chirurgii katarakty. Częstym problemem pojawiającym się po wprowadzeniu tego typu przyrządów do organizmu jest agregacja komórek krwi, której zapobiega się stosując zewnętrzne środki

farmakologiczne, które z kolei stosowane przez dłuższy czas mogą spowodować zmniejszenie ilości płytek krwi. Biomateriał może również ulec zakażeniu bakteryjnemu, które zazwyczaj jest konsekwencją niekontrolowanej adsorpcji białek, takich jak albumina, fibrynogen, czynników wzrostu. Ostatecznie dochodzi do odpowiedzi immunologicznej organizmu, stanów zapalnych i w końcu odrzucenia przeszczepu czy też konieczności bezzwłocznego usunięcia implantu/urządzenia z ustroju.

4.1. Biopowłoki zabezpieczające powierzchnię przed adsorpcją białek.

Zabezpieczanie powierzchni mających kontakt z żywą tkanką (np. przeszczepów, implantów itp.) przed adsorpcją białek jest istotne w związku z potrzebą zapewnienia biokompatybilności zastosowanego materiału. Niekontrolowana adsorpcja białka z ludzkiej surowicy może powodować uruchomienie szeregu reakcji powodujących powstawanie skrzepów czy też odpowiedzi immunologicznej organizmu. Adsorpcja białka na powierzchni powoduje także adhezję makrofagów, która promuje wydzielanie szeregu enzymów powodujących rozkład zastosowanego materiału. Adsorpcja białka promuje również adhezję i rozwój mikroorganizmów. Niekontrolowaną adsorpcję białek hamuje się poprzez modyfikacje powierzchni zwiększającą jej hydrofilowość. W literaturze podawane są przykłady powłok opartych na glikolu polietylenowym PEG⁴⁷. Antyadhezyjne w stosunku do fibrynogenu oraz albuminy okazały się również powłoki oparte na chitozanie sieciowanym przy pomocy PEG-u⁴⁸. Pomimo doskonałych właściwości antyadhezyjnych, PEG jest materiałem termicznie nietrwałym oraz podatnym na utlenienie. Trwalsze i wykazujące podobne właściwości do PEG okazały się powłoki zawierające rozgałęzione polimery tj. dendrymeryczne poliglicerole, które dzięki obecności wielu rozgałęzień posiadają większą liczbę grup hydrofilowych, przez co wzrasta ich skuteczność antyadhezyjna. Adsorpcja białek hamowana jest również sferycznie przez przestrzenną organizację powłoki. Ponadto poliglicerole wykazują podobieństwo do glikokalyksu (substancji zewnątrzkomórkowej), lecz wykazują większą podatność do adsorpcji bakterii⁴⁹. Istnieją również powłoki oparte na polimerach zwitterjonowych, których antyadhezyjny charakter związany jest z ich podobieństwem do budującej błonę komórkową fosforylocholino⁵⁰. Jako powłoki antyadhezyjne stosowane są również cienkie multiwarstwowe filmy polimerowe wytwarzane techniką LbL. Antyadhezyjne właściwości w stosunku do albuminy wykazywały filmy zbudowane z poli (chlorku allylaminowego, PAH)/ poli (styrenosulfonianu sodu, PSS)⁵¹, By poprawić biokompatybilność filmów PAH/PSS

ostatnią warstwę pokryto polilizyną PLL szczepioną PEG. Filmy takie wykazywały trzy razy mniejsze powinowactwo do adsorpcji białka z ludzkiej surowicy, niż filmy składające się z samego PAH/PSS⁵². Antyadhezyjne wielowarstwowe filmy wytwarzano również ze zmodyfikowanych zwitterjonowo polielektrolitów: poli (kwasu L-glutaminowego, PGA), poli (kwasu akrylowego, PAA) oraz PLL⁵³.

4.2. Filmy wykazujące kompatybilność z krwią.

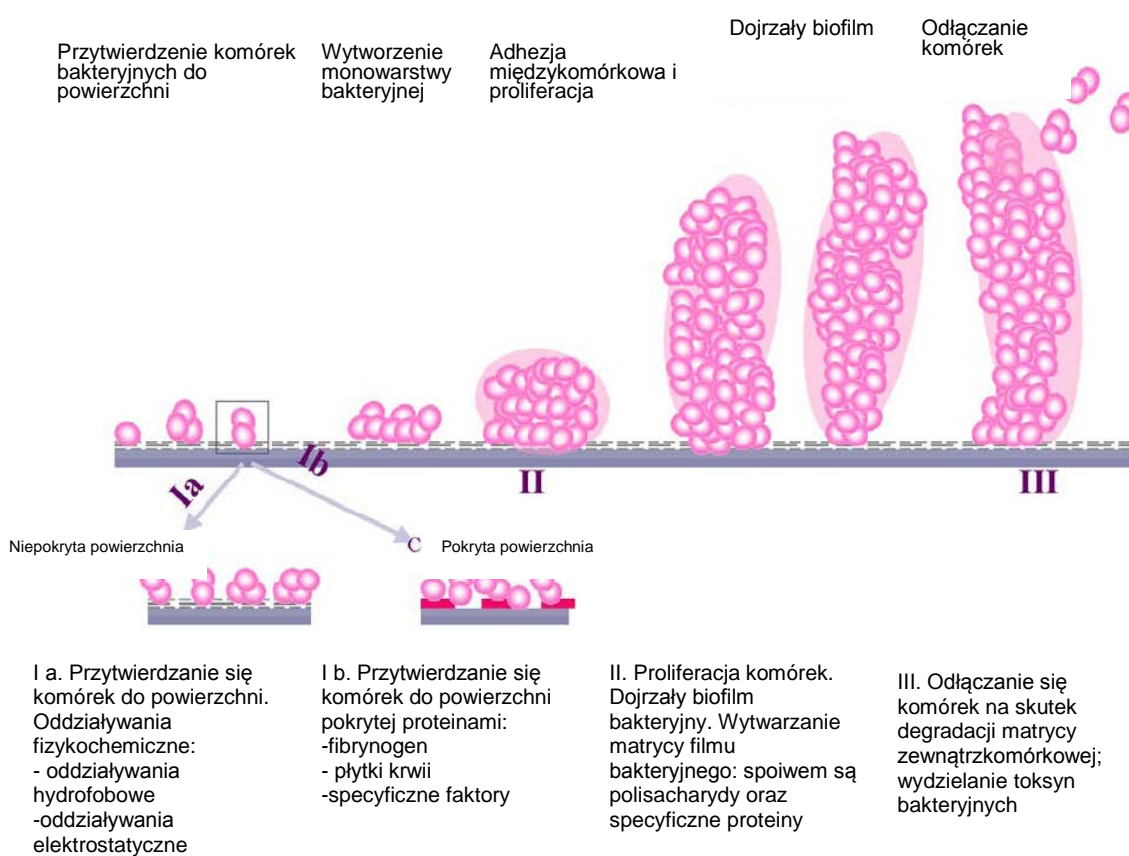
Biokompatybilność powierzchni materiału z krwią jest silnie związana z obecnością odpowiednich grup na powierzchni materiału. Zaobserwowano, że grupy –COOH obecne na powierzchni skutecznie chronią ją przed adsorpcją fibrynogenu, płytek krwi oraz leukocytów⁵⁴. Wzrost hydrofilowości powierzchni powoduje także zmniejszenie adhezji płytek krwi oraz surowiczej albuminy aktywującej ich adhezję. Kompatybilne z ludzką krwią są również powierzchnie pokryte heparyną. Heparyna jest polisacharydem elektrostatycznie oddziaływującym z trombiną. Nieaktywna trombina zabezpiecza fibrynogen przed przemianą w fibrynę; trombina wpływa także na koagulację płytek krwi oraz aktywuje adsorpcję niektórych protein. Stąd inaktywacja trombiny powoduje zahamowanie krzepnięcia krwi⁵⁵. Multiwarstwowe filmy polimerowe wytwarzane techniką LbL wykorzystywano również do ochrony membran mających kontakt z krwią. Układy wytworzono z chitozanu oraz dekstranu zawierającego grupy sulfonowe. Filmy takie wykazywały zmniejszoną adsorpcję płytek krwi oraz fibrynogenu⁵⁶. Technika LbL wytworzono także filmy z chitozanu oraz kwasu hialuronowego, które zaadsorbowano na powierzchni żywych naczyń krwionośnych. W przypadku uszkodzenia takiego naczynia zaadsorbowane filmy zabezpieczyły je przed powstaniem skrzepów oraz adhezją płytek krwi. Z kolei wytworzenie multiwarstwowych filmów z chitozanu, kwasu hialuronowego oraz L-argininy skutkowało zwiększeniem antyadhezyjnych właściwości zabezpieczonych naczyń krwionośnych⁵⁷.

4.3. Pokrycia antybakteryjne.

Pokrycia wykazujące działanie antybakteryjne są niezwykle pożądane w modyfikacji powierzchni implantów. W przypadku stosowania implantów naczyń krwionośnych najpopularniejszym źródłem zakażenia jest *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* występujących fizjologicznie na skórze człowieka, z kolei w przypadku implantów metalicznych dochodzi do zakażenia *Escherichia coli*⁵⁸. Do zakażenia implantu/ tkanek

wewnętrznych dochodzi poprzez przedostawanie się bakterii do wnętrza organizmu ze skóry lub błon śluzowych. Należy zaznaczyć, iż zdrowa skóra jest siedliskiem wielu mikroorganizmów, także tych mających zdolność budowy biofilmu bakteryjnego (np. *Staphylococcus aureus*). Zakażenia bakteryjne tego typu mikroorganizmami są szczególnie uciążliwe z uwagi na oporność w leczeniu i trudności związane z usunięciem dobrze wykształconego filmu bakteryjnego z zainfekowanej powierzchni. Wzrost biofilmu bakteryjnego jest procesem wieloetapowym i jest poprzedzony adsorpcją różnych substancji na powierzchni. Wzrost biofilmu został przedstawiony na poniższym schemacie (Rys. 11.)

59



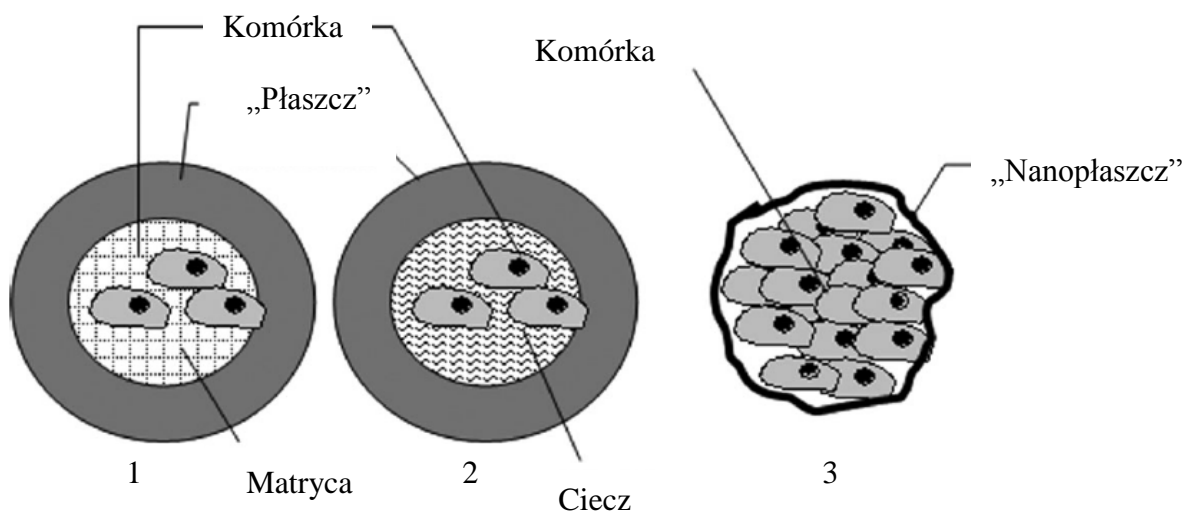
Rys. 11. Schemat budowy filmu bakteryjnego.

Często stosuje się pokrycia antybakteryjne otrzymane w oparciu o substancje posiadające w swojej strukturze czwartorzędowe grupy amoniowe, fosfonowe albo pirydynowe⁶⁰. Modyfikuje się również polimery grupami fluoroalkilowymi bądź wprowadza się PEG lub poli (metakrylany). Stosuje się również hybrydowe pokrycia, np. zbudowane z

polietylenoiminy zawierającej nanocząstki srebra ⁶¹, multiwarstwowe filmy PLL/ kwasu hialuronowego, HA, zawierającego liposomy z nanocząstkami srebra ⁶², multiwarstwy z PAH/kwasu poliakrylowego, PAA, z mikrocząstkami silikonowymi ⁶³, multiwarstwowe filmy zbudowane z chitozanu i heparyny zawierające nanocząstki z dwutlenku tytanu ⁶⁴. Znane są również przypadki zastosowania kowalencyjnego połączenia pomiędzy polimerem a antybiotykiem. By wytworzyć tego typu połączenie zastosowano metakrylan 2-hydroksymetylowy, który polimeryzowano techniką ATRP. Następnie grupy hydroksylowe w powstałej szczotce polimerowej zostały zamienione na grupy karboksylowe lub aminowe, do których kowalencyjnie przyłączano antybiotyki: gentamycynę oraz penicylinę. Tak zmodyfikowana powierzchnia wykazywała właściwości bakteriobójcze w stosunku do bakterii *S. aureus* ⁶⁵. Powierzchnię zabezpieczano także przed adhezją bakteryjną multiwarstwowymi filmami z PAH/PAA. Zaobserwowano, że film polimerowy o grubości 50 nm skutecznie zabezpiecza powierzchnię przed adhezją bakterii *S. epidermis* ⁶⁶. Wytwarzano także ultracienkie filmy PAH/PSS z białkami wykazującymi działanie antibakteryjne ⁵⁸.

4.4. Enkapsulacja żywych komórek i tkanek.

Mikro i nanoenkapsulacja komórek jest techniką rozwijającą się od niespełna 10 lat. Płaszcze adsorbowane na żywych obiektach służą jako ochrona enkapsulowanych komórek np. w trakcie przechowywania w obniżonej temperaturze, przedłużają żywotność komórek, ochraniają je przed makrofagami po przeszczepie, gdyż maskują receptory komórkowe obecne na powierzchni komórki. Opłaszczane komórki znajdują zastosowanie w terapii komórkowej, jako biosensory, przy immobilizacji komórek w celu produkcji białek oraz przeciwciał czy też enkapsulacji probiotyków dla przemysłu spożywczego. Enkapsulowane komórki/ tkanki wydają się obiecujące w leczeniu następujących schorzeń: cukrzycy (enkapsulacja komórek wysp Langerhansa wytwarzających insulinę), chronicznego bólu (enkapsulacja komórek układu nerwowego wytwarzających adrenalinę), a nawet hemofilii (enkapsulacja genetycznie zmodyfikowanych komórek wytwarzających IX czynnik potrzebny do procesu krzepnięcia krwi) ⁶⁷. Stosowane obecnie mikro i nanopłaszcze przedstawiono na poniższym schemacie (Rys. 12) ⁶⁸.



Rys. 12. Techniki enkapsulacji komórek/tkanek.

Technika 1. Enkapsulowane komórki znajdują się w rdzeniu zbudowanym najczęściej z hydrożelu (alginian sieciowany Ca^{2+} , alginian/chitozan, alginian/polilizyna). Niewątpliwą zaletą tej techniki jest fakt, że tak opłaszczone komórki chronione są dodatkowo w warstwie delikatnego biomateriału, co ogranicza stres związany z enkapsulacją jak również stres związany z ich późniejszym wykorzystaniem. Zwykle na powierzchni biomateriału adsorbuje się substancję mającą poprawić biokompatybilność („płaszcz” z PEG-u, Ch, PLL). Udowodniono jednak, że sieć hydrożelu, w której zawieszono są komórki, redukuje ich wzrost. Ponadto hydrożelowy rdzeń ogranicza również wymianę gazową oraz wymianę substancji odżywczych.

Technika 2. Enkapsulowane komórki znajdują się w rdzeniu płynnym. Wytwarzanie tego typu mikrocząstek odbywa się drogą koacerwacji. W ten sposób wytworzono płynne rdzenie z poliakrylanów wkraplanych do roztworu surfaktantu. Ograniczenie tej metody stanowi konieczność użycia rozpuszczalników organicznych, które są toksyczne dla zamkniętych komórek. Poza tym tak przygotowane mikrocząstki wykazywały tendencję do sklejania się. Technika ta nie pozwala na kontrolę grubości wytwarzanej membrany, toteż pojawiają się problemy związane z przepuszczalnością kapsuł⁶⁹. Tego typu struktury wytwarzano również poprzez wkraplanie roztworu CaCl_2 zawierającego hydroksypropylocelulozę oraz zawieszono komórki do roztworu alginianu sodowego⁷⁰.

Technika 3. Bezpośrednio przylegające ultracienkie płaszcze z polielektrolitów. Zarówno mikrokapsuły z trwałym rdzeniem jak i te z płynnym nie dają pełnej kontroli nad zabezpieczaniem opłaszczanych komórek. Zdarza się, że pojedyncze komórki wydostają się

poza obręb kapsuły. W przypadku terapii komórkowej zastosowanie takich mikrosfer jest chybione z uwagi na kształt i topografię powierzchni kapsuły. Układ immunologiczny zazwyczaj bardzo łatwo rozpoznaje i odrzuca przeszczepione komórki enkapsulowane wewnątrz dużej mikrokapsuły. Poza tym mikrokapsuły znacząco zwiększają objętość przeszczepu co obniża ilość transportowanych substancji odżywczych oraz np. sekrecję białek. Stąd zastosowanie ultracienkich powłok polimerowych, o określonej przepuszczalności (ultracienkie filmy polimerowe wykazują przepuszczalność w stosunku do niskocząsteczkowych związków, makromolekuły są zatrzymywane) niweluje problemy związane z ograniczoną przepuszczalnością, sekrecją czy też zwiększoną objętością przeszczepu. Ponadto multiwarstwowy ultracienki film polimerowy doskonale odwzorowuje adsorbowaną powierzchnię przez co ultracienkie powłoki spełniają wymagania dotyczące immunoizolacji ⁷¹. Dotychczas przy powlekaniu komórek/tkanek stosowano różnego typu polielektrolity, które adsorbowano używając techniki warstwa po warstwie. Z uwagi na ujemny ładunek błony komórkowej, pierwszą adsorbowaną warstwą jest polikation, który doprowadzić może do zaburzeń w pracy błony komórkowej, np. zaburzenia w funkcjonowaniu pompy sodowo-potasowej. Reakcja polikationu z obdarzoną ujemnym ładunkiem błoną komórkową doprowadzić może także do zerwania jej ciągłości, zwiększenia przepuszczalności, zmniejszenia grubości co związane jest z usuwaniem lipidów. W warunkach *in vivo* wymienione niekorzystne procesy skutkować mogą zaburzeniami funkcjonowania komórki/tkanki lub bezpośrednio śmierci enkapsulowanego bioobiekta. Znane są badania negatywnego wpływu polikationu na błonę komórkową. Niektóre komercyjne dostępne polikationy tj. poli (etyleno imina) (PEI), (PLL), dietyloaminoetylowy dekstran (DEAE-DEX) prowadzą do wspomnianych wcześniej zaburzeń. Dodatkowo polimery rozgałęzione, również dendrymery, niszczą błonę komórkową. Natomiast polimery liniowe tj. glikol polietylenowy czy też alkohol poliwinylowy nie powodują powstawania dziur w dwuwarstwie lipidowej oraz nie zwiększają rozmiaru inkapsulowanego bioobiekta ⁷². Nierzadko stosowane polielektrolity, przede wszystkim polikationy nie wykazywały należytej biokompatybilności z komórką. Stosowano następujące polielektrolity: PEI, PAH, PDADMAC, protaminę, polikwas fosforowy, PSS ⁷³. Z polielektrolitów naturalnych znane są powłoki zbudowane z PLL, HA ⁷⁴.

5. Mikrocząstki do kontrolowanego uwalniania.

Obecnie wytwarzanych jest wiele nośników substancji, które mają być uwalniane w sposób kontrolowany. W przypadku zastosowań farmaceutycznych, kontrolowane uwalnianie odnosi się do takiej kinetyki uwalniania zamkniętej substancji, by utrzymane było odpowiednie stężenie tej substancji w przedziale tzw. okna terapeutycznego oraz by nie dochodziło do fluktuacji tego stężenia we krwi pacjenta. Do takich nośników należą liposomy⁷⁵, mikrocząstki wytworzone z polimerów tj. poli (ϵ -kaprolakton), PLL, PVA, alginian, chitozan, HA, kolagen, żelatyna oraz wiele innych polimerów i kopolimerów⁷⁶. Do kontrolowanego uwalniania służą również mikrocząstki silikonowe⁷⁷. Spośród nośników nieorganicznych na szczególną uwagę zasługują mikrocząstki zbudowane z węgla wapnia. Struktury te są w zasadzie materiałem hybrydowym, zawierającym niewielki procent materii organicznej (różne typy polimerów). Ich synteza jest prosta i szybka, a dodatkowym atutem jest fakt, że proces ten prowadzony jest w środowisku wodnym. Mikrocząstki z węgla wapnia powstają poprzez strącenie soli nieorganicznych w obecności polimeru, dzięki czemu węgiel wapnia krystalizuje w postaci sferycznego walerytu. Ten typ mikrocząstek cechuje duża porowatość, a przestrzeń ta może zostać wypełniona przez substancje: leki, barwniki, proteiny, nanocząstki srebra itp. Zamykanie substancji we wnętrzu mikrocząstki może odbywać się jednoetapowo poprzez współstrącenie jednocześnie wszystkich składników. Wówczas możliwe jest wbudowanie uwalnianej substancji do struktury krystalicznej mikrocząstki. Mikrocząstki z węgla wapnia można przechowywać w postaci stałej, a przed użyciem (przed przeprowadzeniem procesu kontrolowanego uwalniania) zdyspergować w odpowiednim medium. Cecha ta ma szczególne znaczenie w przypadku zastosowań komercyjnych mikrocząstek. Powierzchnia tak przygotowanych mikrocząstek obdarzona jest ładunkiem (w przypadku węgla wapnia jest to ładunek ujemny), stąd też można ją łatwo modyfikować poprzez adsorpcję polielektrolitów. W ten sposób możliwa jest taka modyfikacja powierzchni mikrocząstki, by później ułatwić jej adsorpcję do wybranego substratu. Przede wszystkim jednak, zaadsorbowane na powierzchni mikrocząstek multiwarstwy polimerowe kontrolują proces uwalniania zawartych wewnątrz cząstek substancji. Im większa jest ilość zaadsorbowanych warstw, tym dłuższe uwalnianie zamkniętej substancji. Węgiel wapnia jest substancją zaliczaną do biokompatybilnych. W przypadku zastosowania do produkcji mikrocząstek węglanowych biokompatybilnych polimerów, takich jak chitozan, układ taki nadaje się do zastosowań biomedycznych. W mikrocząstkach węglanowych zamykano i przeprowadzano kontrolowane uwalnianie leków

(doksorubicyna) ⁷⁸, hormonów (insulina) ⁷⁹, białek ⁸⁰ czy też nanocząstek srebra ⁸¹. W większości przypadków wykorzystywano porowatą strukturę mikrocząstek węglanowych, gdzie adsorbowano wybraną substancję zwykle poprzez zanurzenie mikrocząstek w jej roztworze. W dotychczas przedstawianych w literaturze pracach mikrocząstki traktowano jako podkład, na którym adsorbowano multiwarstwowe filmy polielektrolitowe, po czym wytrawiano węglan wapnia najczęściej roztworem EDTA. W ten sposób powstawała kapsuła, w której zamknięta była uwalniana później substancja ⁸². Czasami również przeprowadzano również proces „napełniania” pustych mikrokapsuł i kolejno przeprowadzano proces kontrolowanego uwalniania.

5.1. Mikrocząstki z węglanu wapnia jako nośniki nanocząstek srebra do zastosowań w przemyśle tekstylnym.

Zawiesina nanocząstek srebra (nAg) jest dość dobrze znanym materiałem bakteriobójczym i bakteriostatycznym wykorzystywanym na szeroką skalę w różnych gałęziach przemysłu. Działanie bakteriobójcze/bakteriostatyczne nAg to głównie działanie na poziomie komórkowym. Niewielki rozmiar nAg umożliwia im mechaniczne niszczenie błony komórkowej, w wyniku tworzenia „dziur” w tej strukturze ⁸³. Działanie bakteriobójcze wiąże się głównie z uwalnianiem z powierzchni nAg jonów Ag^+ , które łączą się z szeregiem ujemnie naładowanych cząsteczek w komórce, w tym z DNA, RNA skutecznie zaburzając procesy życiowe drobnoustrojów ⁸⁴. W literaturze znaleźć można niewiele informacji na temat bezpośredniego zagrożenia jakie stwarza nAg dla organizmu człowieka i dla środowiska. Biorąc jednak pod uwagę fakt, iż Ag jest metalem ciężkim, można oczekiwać, że jony Ag^+ będą na poziomie komórkowym wykazywały reaktywność podobną do tej obserwowanej w komórkach bakterii/grzybów (reakcje jonów Ag^+ z ugrupowaniami zawierającymi siarkę: DNA, grupy tiolowe w białkach itp. odpowiednio dezaktywując te struktury). Dodatkowo nanocząstki nAg, ze względu na swój rozmiar mogą z łatwością pokonywać bariery wewnątrz organizmu, odkładać się w płucach, czy za pośrednictwem krwioobiegu, także w innych organach, powodując stany zapalne ⁸⁵. Problem ten został już zauważony i stopniowo wprowadza się regulacje dotyczące bezpiecznej pracy z nAg i bezpiecznego stężenia w bezpośrednim otoczeniu człowieka ⁸⁶. Potencjalne toksyczne właściwości blokują bezpośrednie biomedyczne zastosowania nAg (biosensory, bioobrazowanie). Dlatego też podejmuje się próby zabezpieczania nAg poprzez otaczanie ich

polimerami syntetycznymi np. poliwinylpirolidonem, polimerami naturalnymi w tym polisacharydami, silanami czy też surfaktantami ⁸⁷. Takie zabezpieczenia zapobiegają również agregacji nAg jak i utracie przez nAg ich bakteriobójczych właściwości (jedynie niezagregowane nanocząstki srebra posiadają właściwości bakteriobójcze). Nanocząstki srebra wykorzystywane są powszechnie w przemyśle, w tym w przemyśle tekstylnym. Niestety zastosowanie, a później eksploatacja materiału o takich właściwościach wiąże się z uwalnianiem nAg do środowiska oraz obecnością nAg w ściekach poprodukcyjnych, co może zakłócić pracę biologicznej oczyszczalni ścieków ⁸⁸. Wstępne badania dowodzą, że w procesie oczyszczania wody zawierającej nAg (na etapie oczyszczania w osadzie czynnym) powstające z nich jony Ag^+ przekształcają się w trudno rozpuszczalną formę siarczku srebra, która może zaburzać pracę oczyszczalni ⁸⁹. Dlatego istotne jest kontrolowanie uwalniania nAg z urządzeń/materiałów je zawierających. Matryca węglanowa o dużej porowatości służy jako medium, w którym rozproszone są nAg, chroni je przed agregacją (nAg dłużej zachowują swoje właściwości antybakteryjne), pozwala na ich długotrwałe uwalnianie (przedłużony efekt działania) oraz nadaje materiałowi kolor biały (wolne nanocząstki są zielone i mogą odbarwiać produkty nimi zabezpieczane). Matryca zabezpiecza przed bezpośrednim kontaktem nAg ze skórą, co czyni materiał atrakcyjnym również dla innych zastosowań biomedycznych. Materiał hybrydowy można przechowywać w postaci suchego proszku bez ryzyka utraty jego właściwości (w przeciwieństwie do wolnych nanocząstek, które mają tendencję do agregowania) i w razie potrzeby zdyspergować w odpowiedniej objętości wody. Tak przygotowany materiał może znaleźć zastosowanie w przemyśle tekstylnym: ochrona pierza, włókien przed nadmiernym rozwojem drobnoustrojów skórnych. Zdrowa ludzka skóra jest siedliskiem wielu bakterii oraz grzybów występujących ze sobą w równowadze. Zachwianie tej równowagi przez czynniki zewnętrzne tj. środki bakteriobójcze może doprowadzić do kolonizowania skóry przez inne mikroorganizmy powodując np. grzybicę. Z kolei stały kontakt skóry z materiałem będącym pożywką dla rozwoju mikroorganizmów (tj. pierze) prowadzi może do nadmiernego rozwoju mikroorganizmów, będących źródłem alergenów. Skóra poprzez zachodzące w jej obrębie procesy (złuszczenie naskórka, termoregulacja, wytwarzanie lipidowej bariery ochronnej) staje się środowiskiem bytowania różnych drobnoustrojów. W warunkach fizjologicznych drobnoustroje te nie stwarzają zagrożenia. Kontakt skóry z naturalnymi włóknami czy pierzem prowadzi do ich kolonizacji i zwiększenia ilości skórnych drobnoustrojów, skutkując np. alergiami. Stąd ważne jest zastosowanie odpowiedniego środka działającego bakterio i grzybobójczo. Z uwagi na późniejszą

eksploatację tak zabezpieczonego materiału ważne jest także zastosowanie optymalnego stężenia środka bakteriobójczego, tak, aby spełniał swoją funkcję podczas użytkowania zabezpieczonego materiału, uwalniał się stopniowo oraz nie przedostawał w nadmiernej ilości do środowiska. Korzystne jest zatem zamknięcie nAg w węglanowej matrycy.

Część eksperymentalna.

I. Materiały.

Związki i odczynniki:

- **Ch** *Chitozan* (Aldrich, niskocząsteczkowy, stopień deacetylacji DDA=72%)
- **CMC** *O,N-karboksymetylochitozan* (Nova Chem Ltd., Halifax, Kanada, Biomedical Grade; stopień podstawienia grupami karboksymetylowymi DS.=1,17; Mv= 670 000 ± 50 000 g/mol (wyznaczona wiskozymetrycznie)
- **PSS** *Poli (4 styrenosulfonian sodowy)* (Aldrich, średnia masa M_w ~70,000 g/mol)
- **PAH** *Poli (chlorek allyloaminowy)* (Aldrich, średnia masa M_w ~15,000 g/mol)
- NaCl, Na₂CO₃, NaOH, HCl, aceton, metanol, kwas octowy (POCH Gliwice)
- **DMSO** (dimetylosulfotlenek), chlorek glicydylotrimetyloamoniowy **GTMAC**, trimetylosulfotlenek **TMST**, D₂O, CF₃COOD (Sigma Aldrich)
- **BSA-FITC** (albumina z kowalencyjnie dołączoną fluoresceiną, Sigma, Aldrich)
- **TGF-β1** (czynnik wzrostu, Sigma, Aldrich)
- **TBS** (Fluka BioChemika)
- **PBS** (Fluka BioUltra, pH=7.4)
- **MTT** (Fluka, 0.05 % in PBS)

Wafle krzemowe (Cemat Silicon, Poland)

Płytki kwarcowe (Hellma, Germany)

II. Aparatura.

- Spektrofotometr IR Bruker IFS 48. Próbki przygotowywano w postaci pastylek w KBr.
- Spektrofotometr UV-VIS HP 8452. Pomiary przeprowadzono w absorpcyjnych kuwetach kwarcowych (Helmma) o drodze optycznej 1cm. Odnośnikiem każdorazowo był rozpuszczalnik, w którym sporządzano próbkę. W przypadku filmów polielektrolitowych wykorzystywano płytki kwarcowe, a stosowanym odnośnikiem było powietrze.
- Spektrofluorymetr SLM Aminco 8100 wyposażony w lampę ksenonową o mocy 450 W. Pomiary przeprowadzono w absorpcyjnych kuwetach kwarcowych (Helmma) o drodze optycznej 1cm.
- Spektrometr NMR Bruker AMX 500. By zmniejszyć szumy aparaturowe dobierano większą ilość skanów, ok. 4000 na każdą polimerową próbkę. Polimer CMC rozpuszczano w D₂O, Ch, CCh rozpuszczono w D₂O z dodatkiem fluorowanego kwasu octowego CF₃COOD a w przypadku ACh dodatkiem DMSO.
- Mikroskop Sił Atomowych (AFM Picoforce, Veeco, USA), do pomiarów używano krzemowych dźwigni (Veeco) o stałej siłowej 40 N/m i średnicy ostrza 10 nm oraz dźwigni z azotku krzemu Si₃N₄ jednostronnie pokrytych złotem (Veeco) o stałej siłowej 0.12 N/m i średnicy ostrza 40 nm.
- Mikroskop elektronowy (SEM, FE-SEM, Hitachi S-4700).
- Pomiary voltamperometrii cyklicznej przeprowadzono przy użyciu pracującej elektrody dyskowej pokrytej złotem połączonej z w potencjostatem typu PGSTAT302N. Elektroda odniesienia była elektroda chlorosrebrowa. Pomiar został przeprowadzony w 0,15 M NaCl (elektrolicie podstawowym) a roztwór przed pomiarem w celu odtlenienia przedmuchano argonem. Stężenie czynnika depolaryzacyjnego (naftochinon, porfiryne) wynosiło 1g/dm³. Zmiana napięcia wynosiła 100 mV/s.
- Mikroskop optyczny i fluorescencyjny (Nikon Eclipse Ti), zaopatrzony w lampę ksenonową PRIOR Lumen 100 i kamerę CCD.
- Analizator elementarny CHNS Elementar Vario EL III 2 GmbH, Hanau, Niemcy
- Pomiar kąta zwilżania, Instrument Surfents Universal, OEG GmbH, Frankfurt, Niemcy.
- Kalorymetr ITC VP-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA).
- Elipsometr spektroskopowy (M-2000U Woolam)

- Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) Malvern Instruments Ltd.
- Dyfraktometr proszkowy D5005 Bruker AXS współpracujący z bazą danych PDF-2
- Analizator termiczny TGA/SDTA 851^e firmy Mettler Toledo.
- wielofunkcyjne urządzenie pomiarowe CX-741 zaopatrzone w szklaną elektrodę (EPS-2zM) oraz czujnik umożliwiający automatyczną korekcję temperaturową; urządzenie używane do pomiarów pH.

III. Synteza oraz charakterystyka wytworzonych pochodnych chitozanu.

Obliczenie stopnia deacetylacji DDA wyjściowego chitozanu Ch.

Stopień deacetylacji DDA został wyznaczony stosując analizę elementarną. Zakładając, że stosunek zawartości węgla do azotu C/N dla całkowicie zdeacetylowanego chitozanu wynosi 5,145 a w chitynie 6,861, można określić, że stopień deacetylacji DDA [2] wynosi:

$$DDA=1-(C/N-5,145)/(6,861-5,145)^{90} \quad [2]$$

$$C= 39,568\%$$

$$N= 7,016\%$$

$$DDA=71\%$$

Obliczanie stopnia podstawienia DS wyjściowego O,N-karboksymetylochitozanu.

DS został wyznaczony stosując analizę elementarną. Z otrzymanych drogą analizy elementarnej wyników obliczono masę węgla M_C oraz azotu M_N w O,N-karboksymetylochitozanie (CMC). Zakładając, że na 100 merów CMC podstawionych grupą karboksymetylową występuje x podstawionych oraz $100-x$ niepodstawionych, przy założonym podstawieniu jednej z trzech możliwych grup w jednostce glukozaminy, M_N oraz M_C można obliczyć z równań:

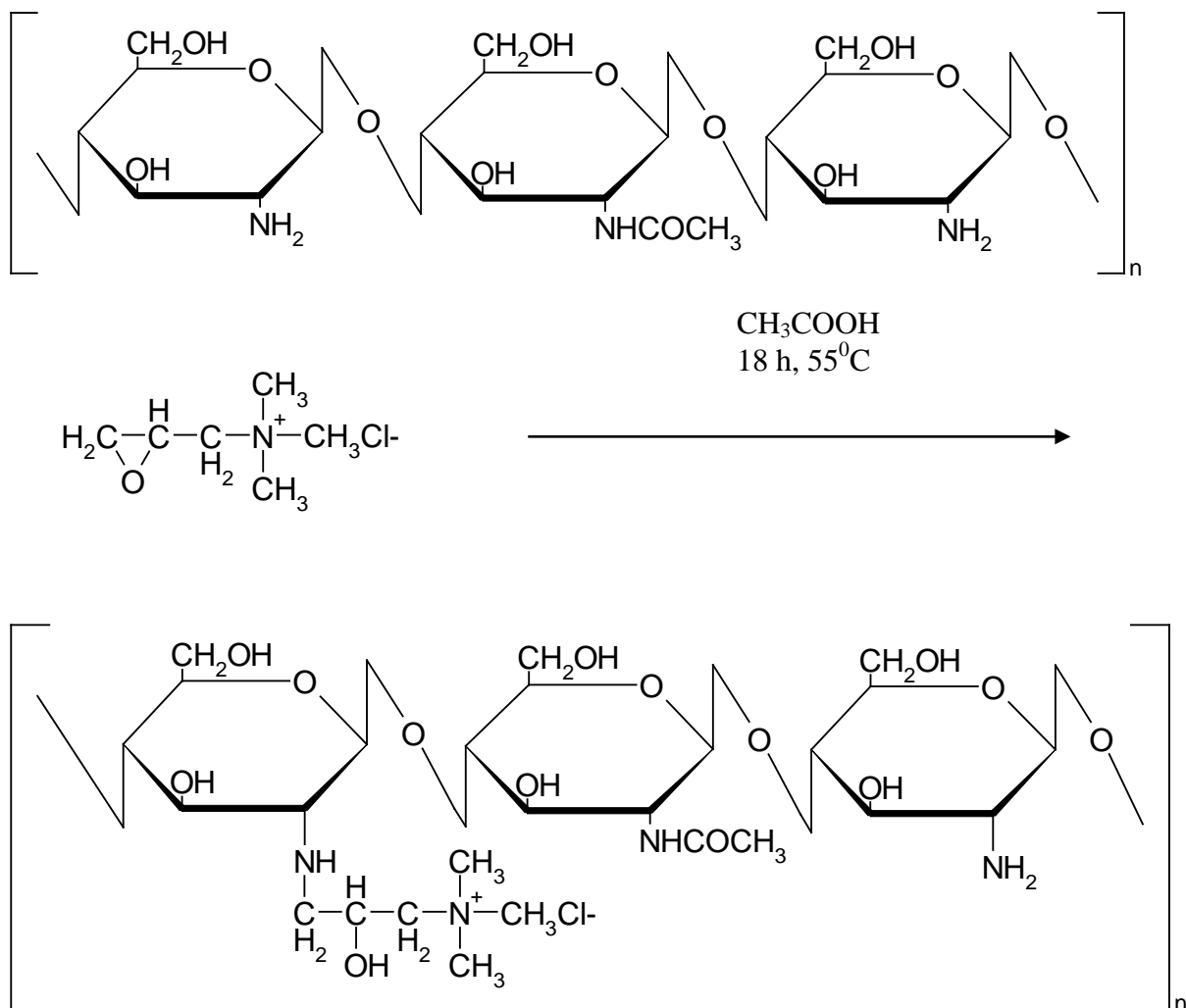
$$M_C=(100-x)72 + 96x \quad [3]$$

$$M_N=(100-x)14+14x. \quad [4]$$

Zakładając, że otrzymany z analizy elementarnej stosunek C/N (C=34.552%, N=4,823%) jest proporcjonalny do M_C/M_N , wyliczony stopień podstawienia wynosi **$x=1,17$** . Wartość ta sugeruje, że podstawienie grupą karboksymetylową występuje przy większej ilości grup w merze.

III.1. Synteza kationowej pochodnej chitozanu (CCh).

Kationową pochodną chitozanu otrzymano poprzez modyfikację chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej zgodnie z poniższym schematem (Rys. I.1).

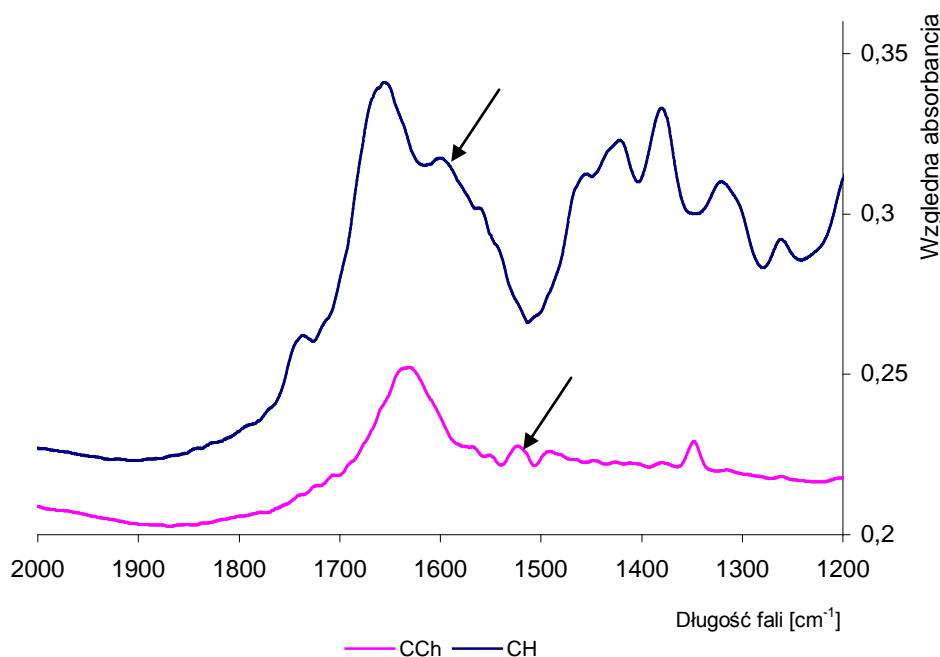


Rys. I.1. Schemat kationowej modyfikacji chitozanu.

W tym celu odważono 2,5 g Ch, zdyspergowano w 100 ml wody destylowanej, następnie dodano kwasu octowego C=0,5% tak, aby pH mieszaniny reakcyjnej wynosiło ok. 5. Przygotowaną w ten sposób mieszaninę pozostawiono na 30 min na mieszadle magnetycznym. Następnie wkraplano chlorek glicydylotrimetyloamoniowy GTMAC w ilości 6,9 ml. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 18 godzin na mieszadle magnetycznym w temperaturze 55 °C. Po przeprowadzonej reakcji nieprzereagowany polimer został odwirowany przy prędkości 4000 rpm przez 20 min. Zebrany supernatant przefiltrowano oraz potraktowano niewielką ilością metanolu w celu usunięcia nadmiaru GTMAC. Zmodyfikowany kationowo chitozan CCh oczyszczano poprzez trzykrotne naprzemienne strącanie w acetonie oraz rozpuszczanie w wodzie destylowanej. Następnie zmodyfikowany polimer wysuszono pod obniżonym ciśnieniem.

III.1.1. Charakterystyka CCh.

Widma IR. Zaobserwowano pasmo przy długości fali 1520 cm^{-1} charakterystyczne dla grup metylowych obecne w zmodyfikowanym chitozanie, nieobecne w chitozanie wyjściowym oraz przy 1595 cm^{-1} charakterystyczne dla pierwszorzędowych amin, obserwowane w niezmodyfikowanym chitozanie, nie obserwowane w CCh (Rys.I.2).



Rys. I.2. Widmo IR CCh.

Analiza ^1H NMR. W celu obliczenia stopnia podstawienia GTMAC, przeprowadzono analizę ^1H NMR. Widma NMR dla CCh oraz dla chitozanu wyjściowego Ch wykonano w D_2O z dodatkiem CF_3COOD . W celu obliczenia stopnia podstawienia glicydylem GTMAC w CCh, przeprowadzono integrację I_1 pasm pochodzących od protonów w grupie $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ przy przesunięciu 3,2 ppm, przy którym obserwuje się także pasma pochodzące od C_2 oraz integrację I_2 pasm pochodzących od protonów $\text{C}_3, \text{C}_4, \text{C}_5, \text{C}_6$ grupy glukozaminowej przy przesunięciu 3,6-4,2 ppm. Zakładając, że na 100 jednostek glukozaminy występuje $9x$ protonów od GTMAC oraz 100 protonów C_2 przy I_1 jak również 100 · 5 protonów od glukozaminy przy I_2 , można przyjąć, że stopień podstawienia wynosi:

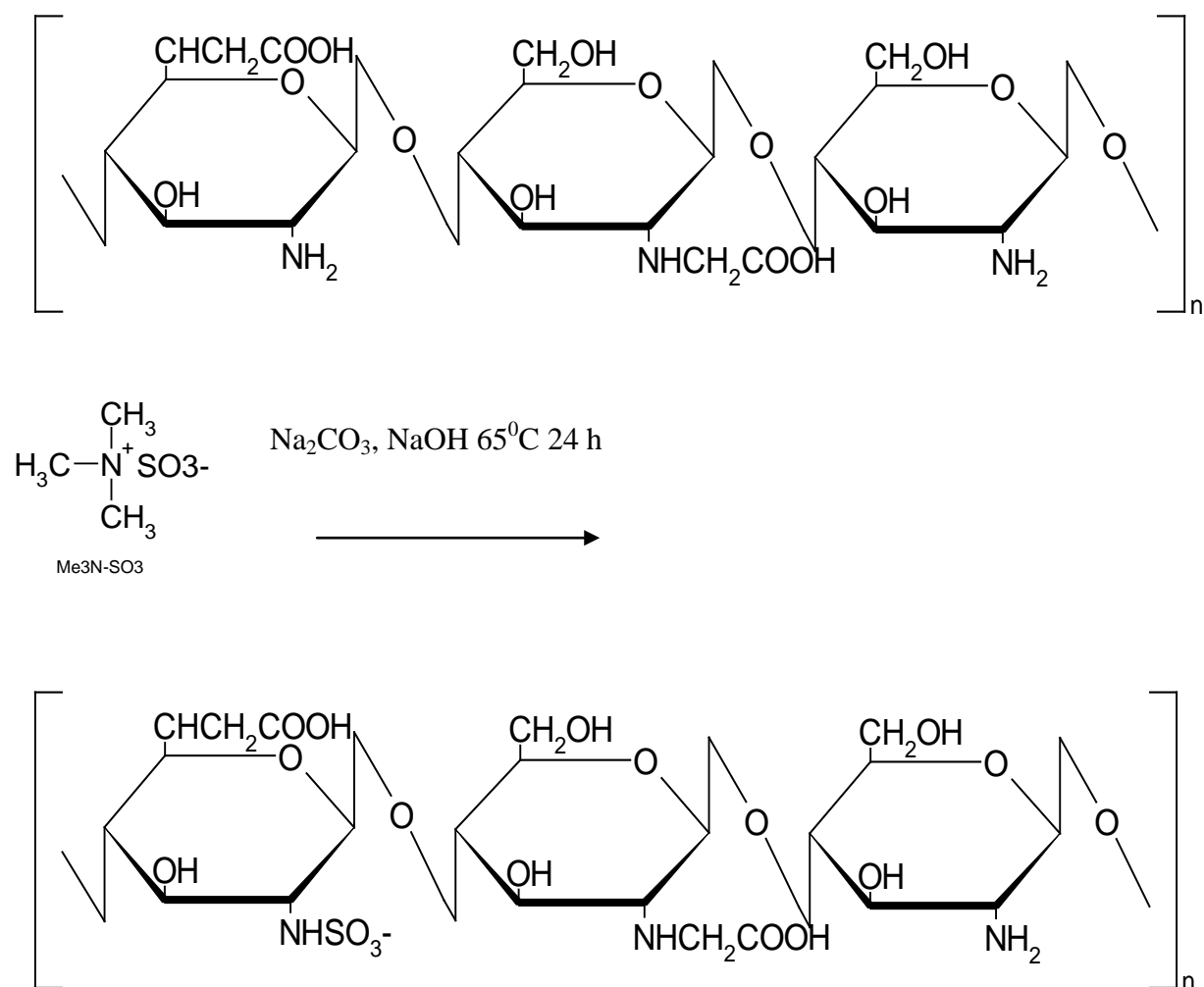
$$I_1/I_2 = (9x + 100/500) \quad [5]$$

1,495 = $(9x + 100/500)$ stąd stopień podstawienia glicydylem $x = \text{DS}_{\text{GTMAC}}$ wynosi:

$$\text{DS}_{\text{GTMAC}} = 72\%$$

III.2. Synteza chitozanu zmodyfikowanego trójtlenkiem siarki (ACh).

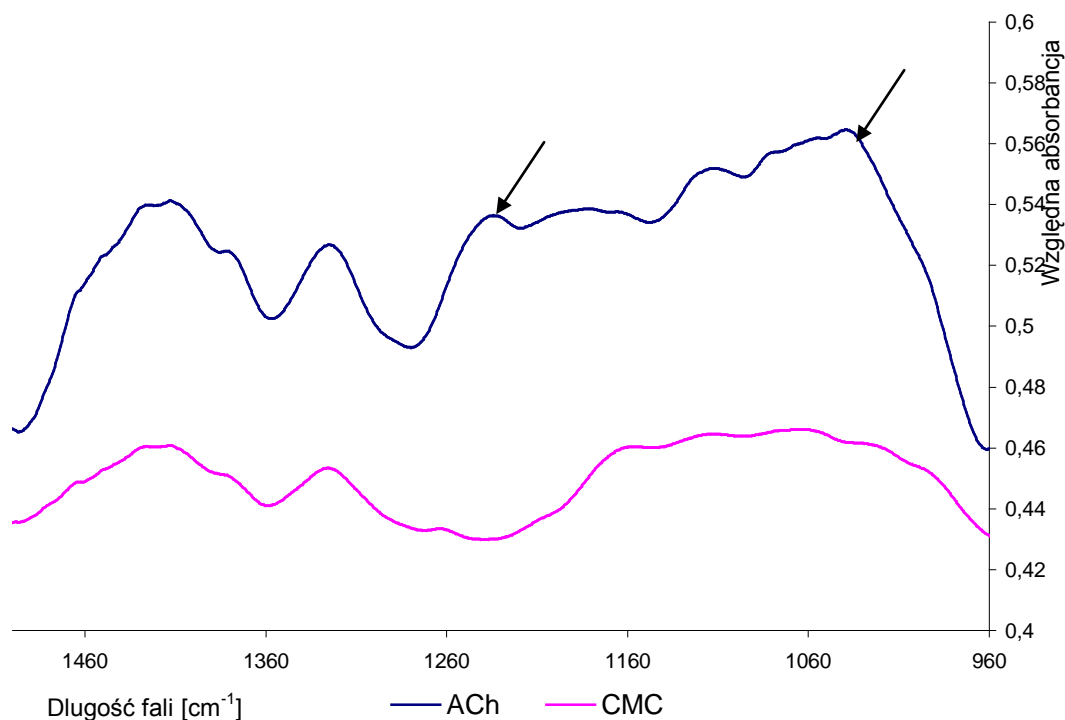
Syntezę ACh przeprowadzono z użyciem CMC, rozpuszczonego w destylowanej wodzie z dodatkiem węgla sodu (1g CMC, 1.3g Na₂CO₃ i 2.5g Me₃N-SO₃). Reakcję przeprowadzono w temperaturze 55⁰C przez 24h w atmosferze azotu przy jednoczesnym mieszaniu. Schemat reakcji przedstawiono poniżej (Rys. I.3). Mieszaninę poreakcyjną dializowano względem wody destylowanej przez 72h, wcześniej odparowując nadmiar wody na wyparce. Następnie oczyszczoną substancję wymrażano pod zmniejszonym ciśnieniem aż do uzyskania białego puszystego materiału.



Rys. I.3. Schemat syntezy anionowej pochodnej chitozanu.

III.2.1. Charakterystyka ACh.

Widma IR. W widmie FITR ACh można wyróżnić charakterystyczne pasma przy 1235 cm^{-1} , odpowiadające drganiom asymetrycznym grupy O=S=O, przy 1035 cm^{-1} drgania symetryczne grupy O=S=O. W CMC nie obserwuje się powyższych drgań (Rys. I.4).



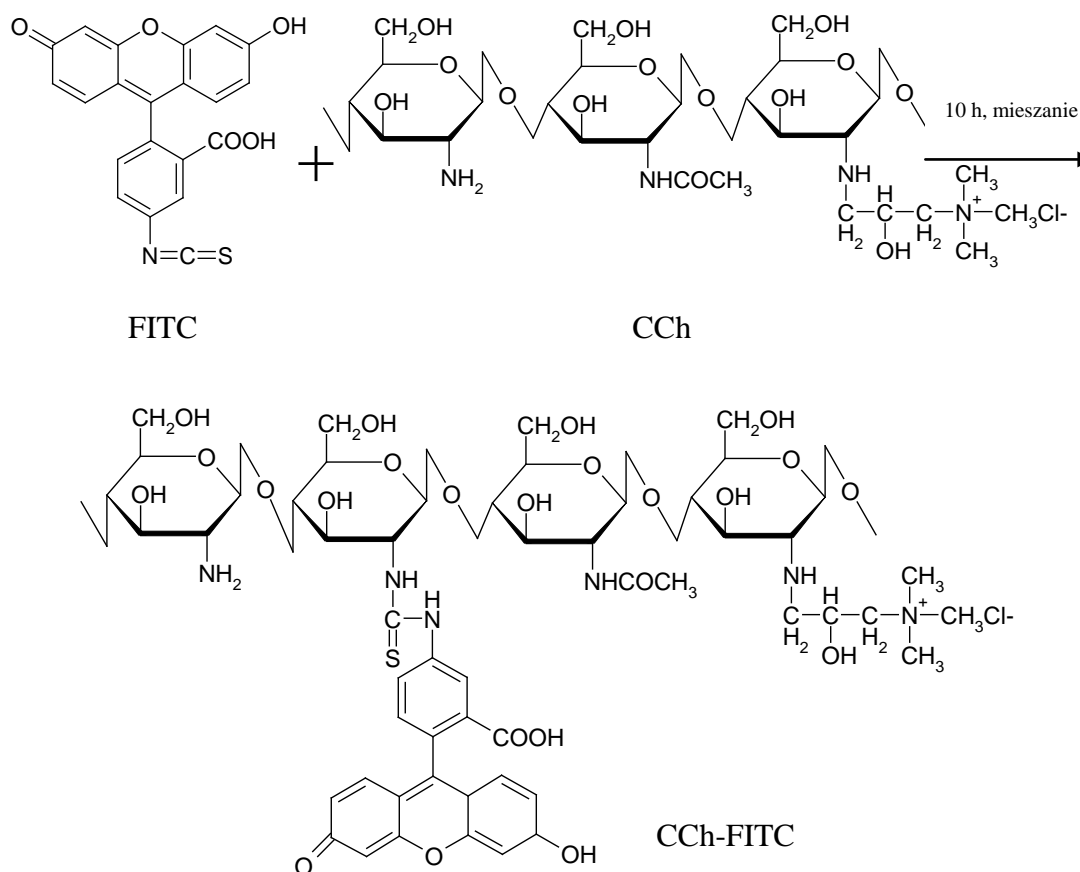
Rys. I.4. Widmo IR ACh.

Do obliczenia DS posłużono się analizą elementarną. Analiza elementarna wykazała, że zawartość kolejno węgla, azotu oraz siarki w badanym materiale wynosi: C=29,615%, N=4,675%, S=4,910%. Obliczając stopień podstawienia grupą sulfonową w ACh wykorzystano uzyskaną drogą analizy elementarnej wartość procentową N oraz S, którą podzielono kolejno przez masę molową azotu oraz siarki. W ten sposób otrzymano zawartość molową tych pierwiastków, wynoszące dla azotu 0,334 mola a dla siarki 0,153 mola. Daje to wynik **46%** podstawienia grupami sulfonowymi w ACh. Wartość ta najprawdopodobniej jest maksymalną możliwą dla CMC przy obliczonym podstawieniu grupami karboksymetylowymi wynoszącym 1,17. Jak już wcześniej wspomniano, część grup aminowych w CMC było podstawionych grupami karboksylowymi, przez co były one niedostępne dla podstawienia grupami sulfonowymi.

III.3. Synteza CCh z barwnikiem fluorescencyjnym (fluoresceina, FITC). CCh-FITC.

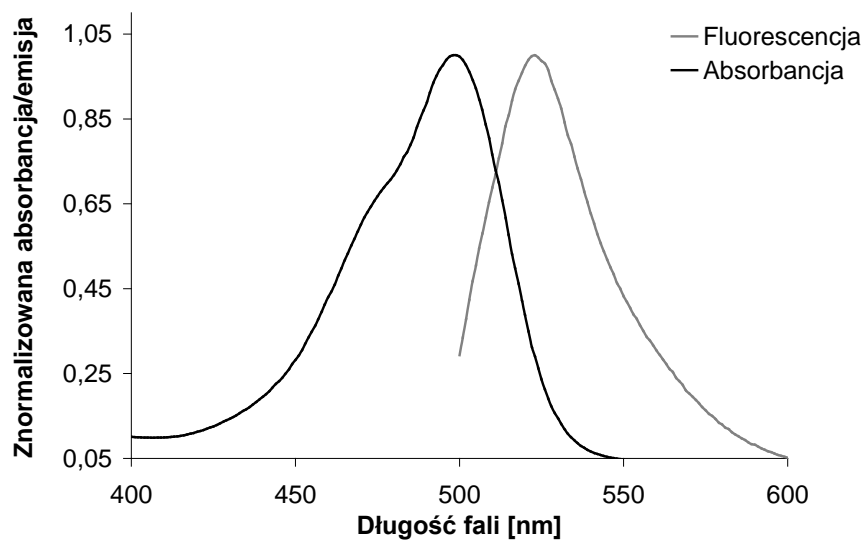
Syntezę CCh-FITC przeprowadzono według schematu prezentowanego w literaturze dla znaczenia barwnikiem fluorescencyjnym białek. Dotychczas w wyniku przedstawionej reakcji otrzymano znaczone fluorescencyjnie chitozan ⁹¹.

Odważono 0,005 g CCh, który następnie zdyspergowano w 5 cm³ wody. Następnie do roztworu polimeru dodano 10 mg FITC. Mieszaninę pozostawiono na mieszadle magnetycznym przez 10h. Mieszaninę reakcyjną przefiltrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 um następnie polimer dializowano przez 36h do wody. Schemat syntezy przedstawiono na schemacie poniżej (Rys. I.5).



Rys. I.5. Schemat otrzymywania CCh-FITC.

Widmo absorpcyjne jak również emisyjne przedstawiono na poniższym wykresie. Maksimum absorpcji wynosi 497 nm, emisji 530 nm (Rys. I.6) i dowodzi podstawienia grup -NH₂ przez FITC.



Rys.I.6. Widmo absorbancji i emisji CCh-FITC.

Rezultaty.

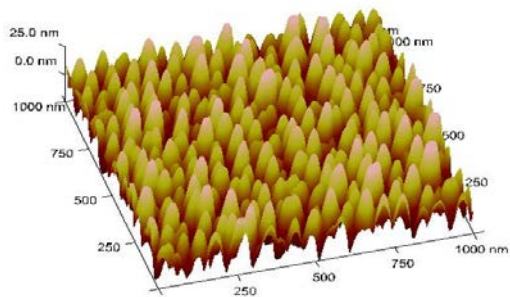
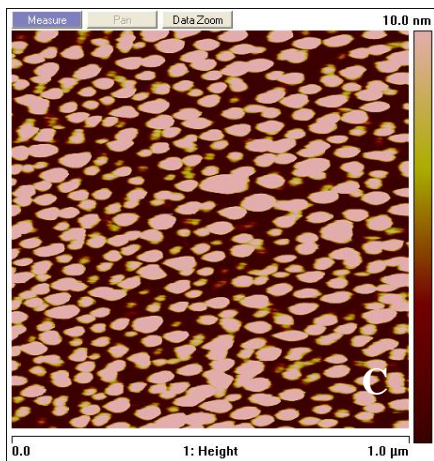
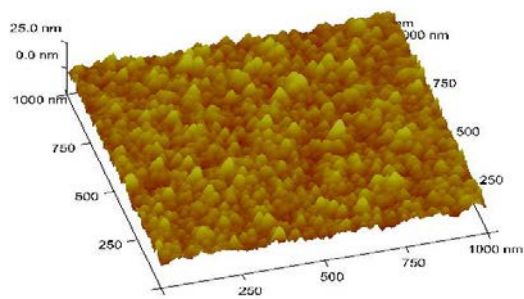
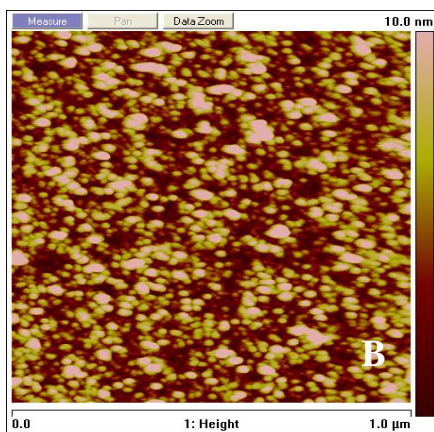
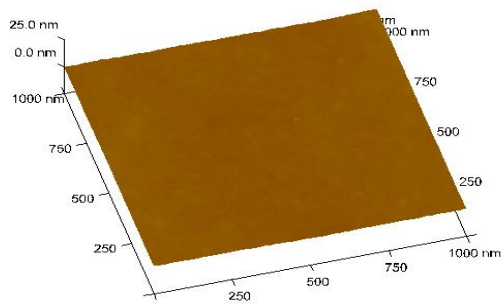
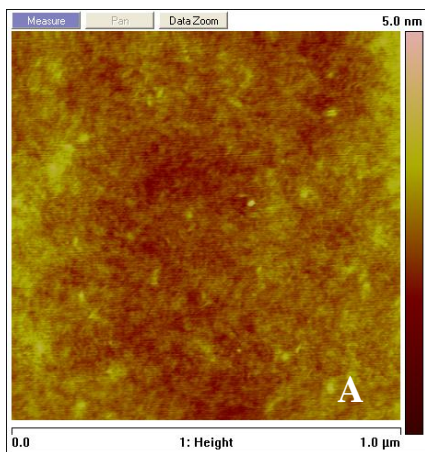
I. Filmy polielektrolitowe wytwarzane techniką layer by layer.

Ultracienkie filmy polimerowe przygotowane z polielektrolitów naturalnych są wysoce cenionym materiałem używanym do zastosowań biomedycznych. Zorganizowane w multiwarstwowych filmach biopolimery zachowują swoje właściwości biologiczne. Optymalizacja procesu wytwarzania ultracienkich filmów polimerowych oraz ich charakterystyka fizykochemiczna, np. : określenie grubości powstającej struktury, jej przepuszczalności, szorstkość, hydrofilowość, trwałość w środowisku izotonicznym, są istotne ze względu na ich późniejsze zastosowania biomedyczne. W rozdziale zaprezentowano charakterystykę fizykochemiczną ultracienkich filmów polielektrolitowych otrzymanych z pochodnych chitozanu oraz z polimerów elastynopochodnych (ELRs).

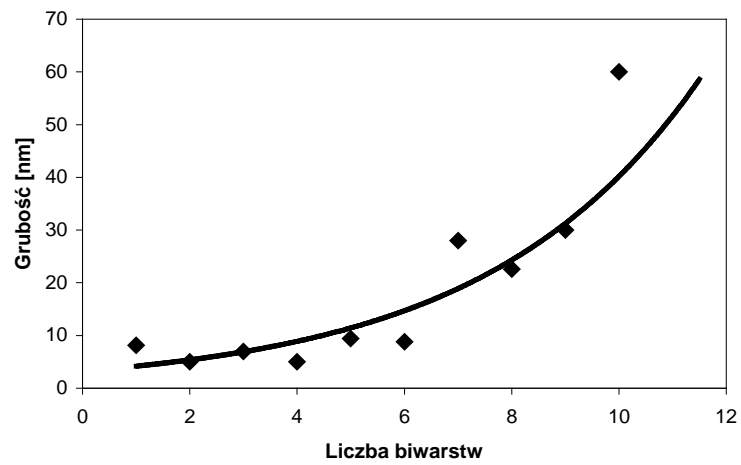
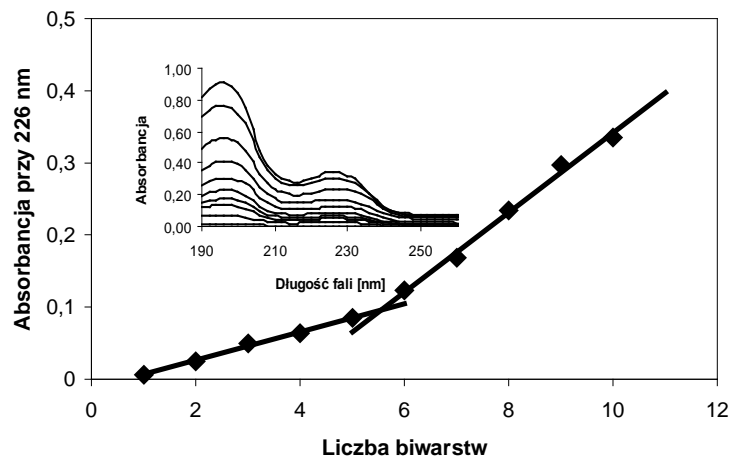
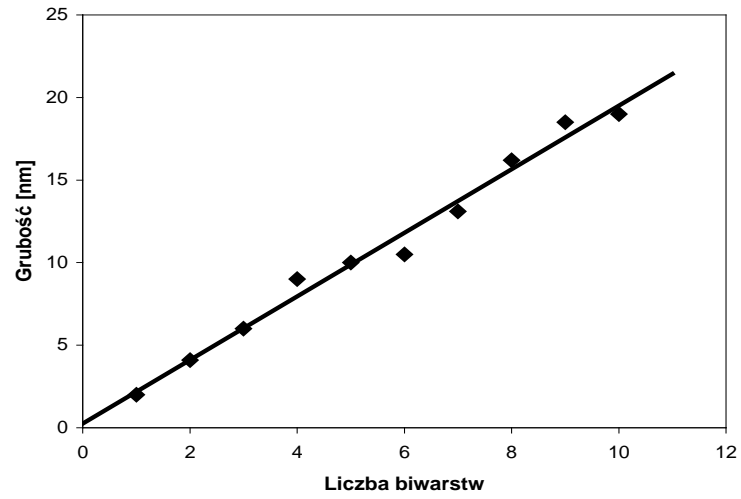
I.1. Preparatyka filmów polielektrolitowych CCh/ACh.

Ultracienkie filmy polielektrolitowe zostały wytworzone metodą elektrostatycznej samoorganizacji (warstwa po warstwie, layer-by-layer, LbL). Jak już wskazano, metoda ta polega na naprzemiennej adsorpcji polianionu/polikationu na obdarzonej ładunkiem powierzchni (kwarc, krzem, szkło). Każdorazowo po etapie osadzania nadmiar niezaadsorbowanego polielektrolitu spłukiwano wodą. Roztwory polimerów przygotowano w 0,1 M NaCl, stężenia użytych polimerów to 1g/dm^3 (CCh, Ach) oraz $0,1\text{ g/dm}^3$ dla PSS oraz PAH. Przygotowane roztwory polielektrolitów wykazywały neutralne pH za wyjątkiem PAH, gdzie $\text{pH} \approx 4.7$. Adsorpcję przeprowadzano przez 5 min, w temperaturze 40°C , na łaźni ultradźwiękowej. Warunki adsorpcji zostały wcześniej zoptymalizowane tak by uzyskać efektywny stopień adsorpcji. Po uzyskaniu pożądanej ilości ultracienkich warstw polimerowych, próbki osuszano w strumieniu azotu.

Wytworzono filmy polielektrolitowe z trzech par polimerów: CCh/ACh (jednoskładnikowy film, wytworzony do zastosowań biomedycznych) oraz ultracienkie filmy hybrydowe, wytworzone z polielektrolitu syntetycznego oraz z jednej z otrzymanych pochodnych chitozanu: PAH/ACh oraz CCh/PSS. Topografię 6 biwarstw przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. II.1)



Rys. II.1. Topografia multiwarstwowych filmów (6 biwarstw). A-CCh/ACh, B-CCh/PSS, C-PAH/ACh. Badania AFM.



Rys. II.2. Przyrost grubości filmów polielektrolitowych. A. CCh/ACh, B. CCh/PSS, C. PAH/ACh.

Użycie wyższej temperatury oraz zastosowanie ultradźwięków pozwoliło na skrócenie czasu adsorpcji polielektrolitów do 5 min. Dotychczas makromolekuły podobne do chitozanu, posiadające sztywny łańcuch główny, adsorbowano przez ok. 20-30 min. Wyższa temperatura oraz sonikacja dostarczyły do układu więcej energii, przez co została obniżona kinetyczna bariera adsorpcji, szybciej osiągnięto równowagę kinetyczną oraz zwiększono liczbę punktów adsorpcji. Regularny, liniowy wzrost filmów polielektrolitowych (Rys.II.2) zaobserwowano tylko dla układu CCh/ACh. Wpływ substratu (do 5 biwarstwy) zaobserwowano dla układu CCh/PSS. Adsorpcja dalszych warstw prowadzi do liniowego wzrostu grubości filmu. Wzrost eksponencjalny grubości filmów zaobserwowano dla układu hybrydowego PAH/ACh. W przypadku układu CCh/ACh użyte polimery posiadają ten sam łańcuch główny, co sprzyja przestrzennemu dopasowaniu łańcuchów oraz ułatwia oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy łańcuchami polielektrolitów. Dodatkowo CCh oraz ACh posiadają większą gęstość ładunku wzdłuż łańcucha w środowisku o biologicznym pH neutralnym w przeciwieństwie do niezmodyfikowanej formy chitozanu. Prowadzi to do zwiększenia ilości oddziaływań elektrostatycznych podczas adsorpcji CCh na obdarzonym ładunkiem ujemnym substracie (krzem, kwarc, szkło) oraz zmniejsza ilość luźno związanych „ogonów”, które zwykle zmniejszają stabilność multiwarstwowego filmu. Dzięki temu dochodzi do wymieszania sąsiadujących warstw, co prowadzi do powstania jednorodnego filmu, którego grubość wzrasta liniowo, a szorstkość RMS (Tab. II.1) filmu jest niewielka i nie wzrasta z kolejną zaadsorbowaną biwarstwą (Rys. II.2.A). Z kolei zarówno w układzie PAH/ACh jak w CCh/PSS powstawały agregaty o średnicy ok. 60 nm dla PAH/ACh i 30 nm dla CCh/PSS (Rys. II.1.B i C) , co jest spowodowane niekompatybilnością w rozkładzie ładunku na polimerowych łańcuchach układu CCh/PSS. Przypadek PAH/ACh jest bardziej skomplikowany, ponieważ oprócz braku kompatybilności w rozkładzie ładunków, PAH w roztworze o neutralnym pH zastosowanym w eksperymencie, wykazuje niski stopień jonizacji. Dlatego dla obu układów hybrydowych nie zaobserwowano pożądaných liniowych wzrostów grubości, a powstające struktury wykazują znaczną szorstkość RMS. Szorstkość ta wzrasta z każdą kolejną zaadsorbowaną biwarstwą (Tab.II.1) co sugeruje, że dochodzi do akumulacji powstających defektów/agregatów.

Tab. II.1. Szorstkość AFM filmów polimerowych.

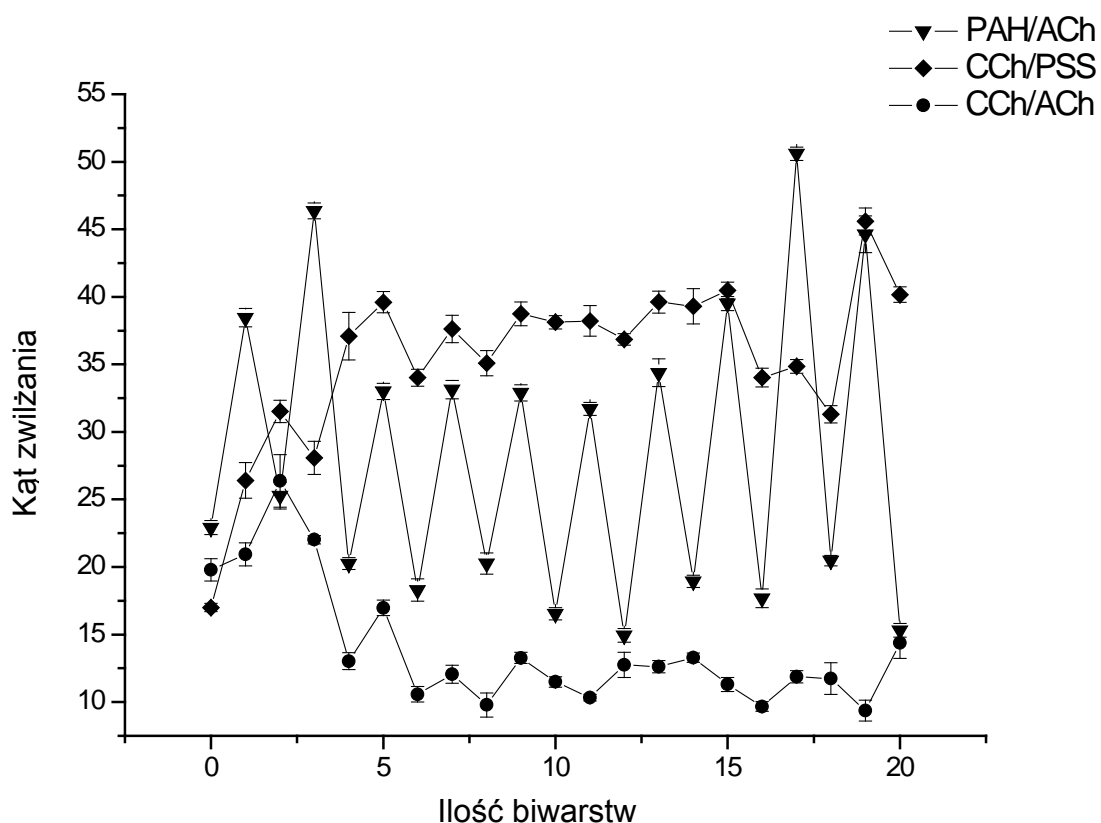
Szorstkość RMS AFM [nm]			
	1 biwarstwa	6 biwarstw	10 biwarstw
PAH/ACh	1.1	3.7	11.3
CCH/PSS	1.5	2.5	2.9
CCh/ACh	0.32	0.28	0.35

Jedoskładnikowe, ultracienkie filmy polielektrolitowe wytworzone techniką LbL z dwóch pochodnych chitozanu są jednorodne oraz wykazują monotoniczny, liniowy, czyli dający się łatwo kontrolować wzrost grubości.

I.1.1. *Pomiary kąta zwilżania filmów CCh/ACh.*

Zwilżalność powierzchni jest istotnym parametrem z punktu widzenia zastosowań biomedycznych. Zabezpieczona ultracienkimi filmami powierzchnia wykazująca wysoką hydrofilowość, przeciwdziała niekontrolowanej adsorpcji białek, komórek jak również patogenów. Pomiary kąta zwilżania powierzchni krzemu zabezpieczonej ultracienkimi filmami przeprowadzano każdorazowo po zaadsorbowanej na płycie krzemowej warstwie polimeru w układach: CCh/ACh oraz dla porównania w układach hybrydowych: CCh/PSS oraz PAH/ACh. Po adsorpcji polimeru płytkę suszono w strumieniu azotu. Rozpuszczalnikiem używanym w pomiarach kąta zwilżania była woda.

Zaobserwowano bardzo niskie wartości kąta zwilżania dla układu CCh/ACh (Rys. II.3). Wartości te oscylują średnio w granicach 10-15°, co czyni z tak zmodyfikowanego substratu powierzchnię superhydrofilową. Zwilżalność zmierzona dla układów porównawczych, hybrydowy CCh/PSS oraz PAH/ACh wykazywała odmienny, jednakże interesujący charakter. Istotne zmiany w wartościach kąta zwilżania mierzonego po każdej warstwie były widoczne dla układu PAH/ACh (Rys. II.3). Jest to spowodowane niską gęstością ładunku na łańcuchu PAH w warunkach eksperymentu oraz wysoką szorstkością materiału (Tab. II.1). Wysokie wartości kąta zwilżania zanotowano dla układu CCh/PSS. W układzie tym dochodzi do niekompletnej adsorpcji CCh na PSS, przez co hydrofobowy charakter grupy benzoilowej jest stale „widoczny” w trakcie pomiarów.



Rys. II.3. Zmiany wartości kąta zwilżania w zależności od ilości warstw dla układów: PAH/ACh, CCh/PSS i CCh/ACh.

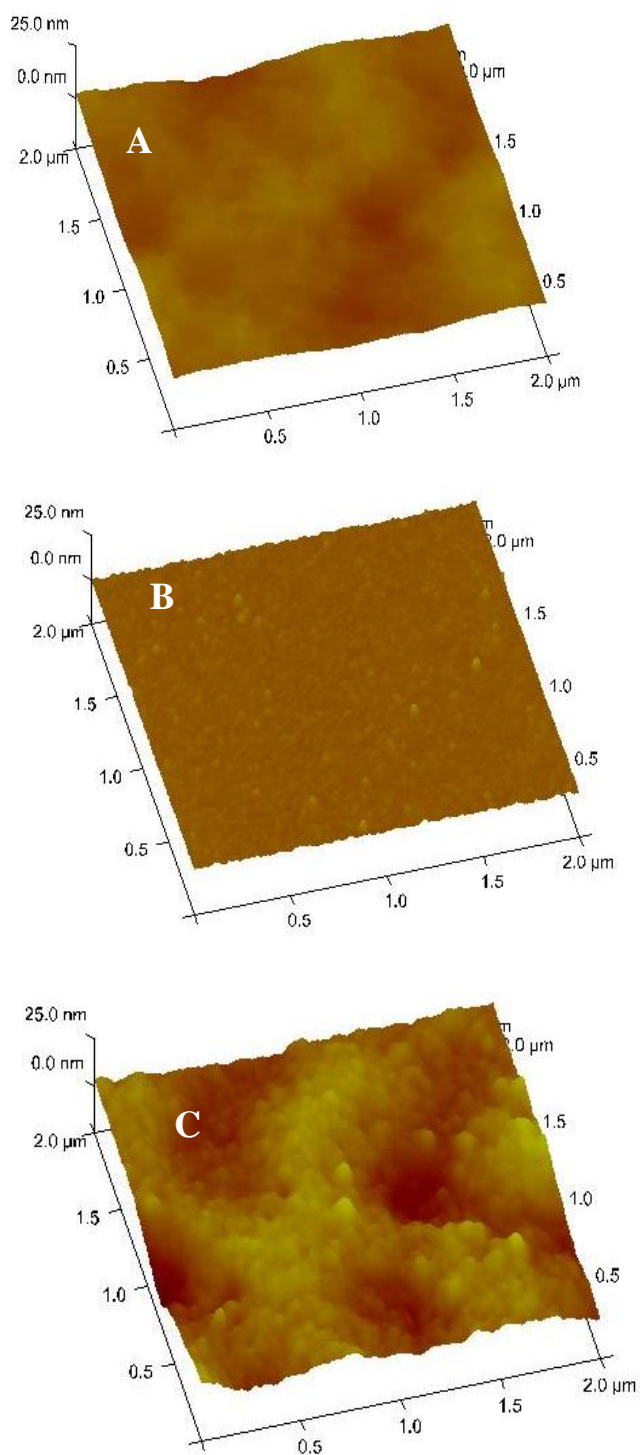
Jednoskładnikowe filmy zbudowane z CCh/ACh wykazują wysoką hydrofilowość. Należy się spodziewać, iż powierzchnia zabezpieczona filmami CCh/ACh w kontakcie z układem biologicznym (tkanką, płynem ustrojowym itp.) będzie wykazywać właściwości antyadhezyjne z uwagi na obecność warstwy wody na filmie CCh/ACh.

I.1.2. Stabilność filmów CCh/ACh w środowisku wodnym.

Stabilność otrzymanych jednoskładnikowych, chitozanowych struktur w środowisku wodnym jest kolejnym, niezwykle istotnym parametrem w kontekście zastosowań biomedycznych. Trwałość filmów polielektrolitowych testowano poprzez zanurzenie płytek krzemowych z zaadsorbowanymi warstwami CCh/ACh, CCh/PSS oraz PAH/ACh w roztworze soli fizjologicznej przez 7 dni.

Obrazy AFM topografii powierzchni (Rys. II.4) wykonane po tym okresie wykazały trwałość struktury filmów CCh/ACh. Nie doszło do przerwania ciągłości filmu oraz zmian

topografii powierzchni filmu CCh/ACh. Obraz wykonany po tygodniu zanurzenia w roztworze soli fizjologicznej nie różni się znacząco od obrazu AFM filmu CCh/ACh, który nie był przechowywany w soli fizjologicznej (Rys. II.1.A). Z kolei filmy hybrydowe zatraciły swoją pierwotną strukturę, w porównaniu z Rys. II.1.B i C).



Rys. II.4. Stabilność filmów po tygodniowym przechowywaniu w soli fizjologicznej. A. CCh/ACh. B. CCh/PSS. C. PAH/ACh.

Eksperyment potwierdził wysoką stabilność jednoskładnikowego filmu CCh/ACh w środowisku izotonicznym, czyli środowisku imitującym wewnątrzustrojowe płyny biologiczne. Spełnia więc kolejny wymóg do potencjalnych zastosowań biomedycznych.

I.1.3. Termodynamika tworzenia filmów CCh/ACh.

Badania termodynamiczne miały na celu określenie stabilności kompleksów polielektrolitowych. Parametry termodynamiczne procesu tworzenia filmów polimerowych badano metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC). Pomiar ITC przeprowadzono poprzez dodawanie 10 μ l wodnego roztworu polikationu (2,5 g/L w 0,1 M NaCl) do 2,5 ml roztworu polianionu (0,1 g/L w 0,1 M NaCl). Po każdym dodatku roztworu polimeru mierzono ΔH_{mix} . Pomiar został przeprowadzony w temperaturze 40°C.

Badania ΔH_{mix} przeprowadzone przy użyciu izotermicznego miareczkowania mikrokalorymetrycznego (ITC) wykazały następujące zmiany (Tab.II.2):

Tab. II. 2. Wartości entalpii mieszania ΔH_{mix} dla poszczególnych par polielektrolitów.

	CCh/PSS	PAH/ACh	CCh/ACh
ΔH_{mix}	-4.2 ± 0.2 kJ/mol	-2.8 ± 0.2 kJ/mol	-5.3 ± 0.2 kJ/mol

Entalpia mieszania osiągnęła największą wartość dla układu jednoskładnikowego CCh/ACh. Rozpatrując proces tworzenia kompleksu polielektrolitowego zgodnie z Rys. 4. (*Proces formowania kompleksu polielektrolitowego w roztworze*), można stwierdzić, że do wydzielania przeciwjonów podczas tworzenia kompleksów polielektrolitowych dochodzi wówczas, gdy powstają oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy łańcuchami polielektrolitów. Stąd najwyższa wartość ΔH_{mix} dla układu CCh/ACh w porównaniu z układami hybrydowymi potwierdza wydzielanie się podczas formowania kompleksu polielektrolitowego CCh/ACh przeciwjonów. Można zatem stwierdzić, że w układzie CCh/ACh w porównaniu z układami hybrydowymi jest więcej miejsc, w których dochodzi do oddziaływań elektrostatycznych. Czyli polielektrolity o tym samym łańcuchu głównym, takie jak CCh i ACh są bardziej stabilne niż układy hybrydowe, w trakcie tworzenia których wydziela się znacznie mniej ciepła. Stąd można wnioskować, że oddziaływania elektrostatyczne w układach hybrydowych są słabsze.

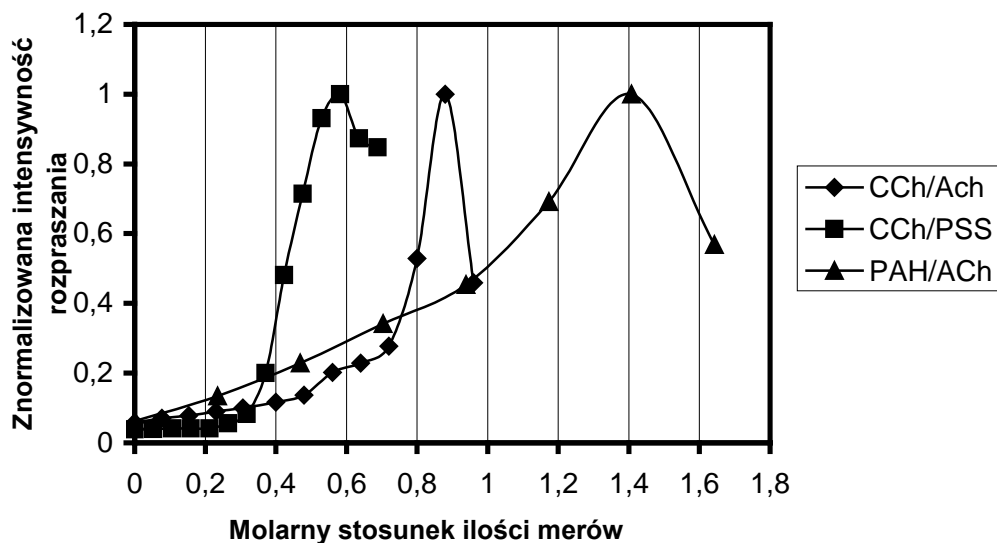
Na podstawie pomiarów parametrów termodynamicznych kompleksów polielektrolitowych należy się spodziewać, że filmy zbudowane z CCh/ACh będą wykazywać większą stabilność niż filmy hybrydowe, co zresztą zostało potwierdzone badaniami stabilności filmów w warunkach izotonicznych (Rozdział I.1.2). Wstępne badania dla układu CCh/ACh pokazały również, że entropia mieszania ΔS_{mix} dla układu CCh/ACh jest wysoka (105 ± 6) J/mol, a wartości entalpii swobodnej mieszania ΔG_{mix} potwierdzają, że proces formowania filmów jest procesem samorzutnym ($\Delta G_{\text{mix}} = -38.2$ kJ/mol w 40°C).

I.1.4. Miareczkowanie turbidymetryczne filmów CCh/ACh.

Miareczkowanie turbidymetryczne zostało przeprowadzone w celu oszacowania stechiometrii tworzenia się kompleksów. Pomiar stopnia rozpraszania światła przez kompleksy polielektrolitowe został przeprowadzony w roztworze przy długości fali 600 [nm], w temperaturze 40°C (warunki tworzenia filmów polielektrolitowych) z jednoczesnym mieszaniami. Dodawano 10 μl wodnego roztworu polikationu (2,5 g/L w 0,1 M NaCl) do 2,5 ml roztworu polianionu (0,1 g/L w 0,1 M NaCl). Każdorazowo po dodatku polikationu roztwór mieszano przez 1 min po czym odczytywano wartość absorpcji przy zadanej długości fali.

Dla układu CCh/ACh (Rys. II.5) stosunek stechiometryczny wynosi 0,9, podczas gdy dla pozostałych kompleksów jest on w granicach 1,4 (PAH/ACh) i 0,6 (CCh/PSS). Brak stechiometryczności w tworzeniu kompleksów w układach hybrydowych (PAH/ACh i CCh/PSS) spowodowany jest różnicami w budowie łańcucha głównego zastosowanych polimerów oraz różnicą w gęstości ładunku polimerów.

Pomiary termodynamiczne dowodzą raz jeszcze, że przestrzenne dopasowanie oraz rozmieszczenie ładunków na łańcuchu polimerowym dla układu CCh/ACh jest lepsze niż dla pozostałych układów hybrydowych. Wyniki turbidymetryczne są więc kolejnym dowodem na stabilność układu CCh/ACh, wynikającą ze stechiometryczności tworzenia kompleksów.



Rys. II.5. Miareczkowanie turbidymetryczne wykonane dla par polielektrolitów: CCh/ACh, CCh/PSS, PAH/ACh.

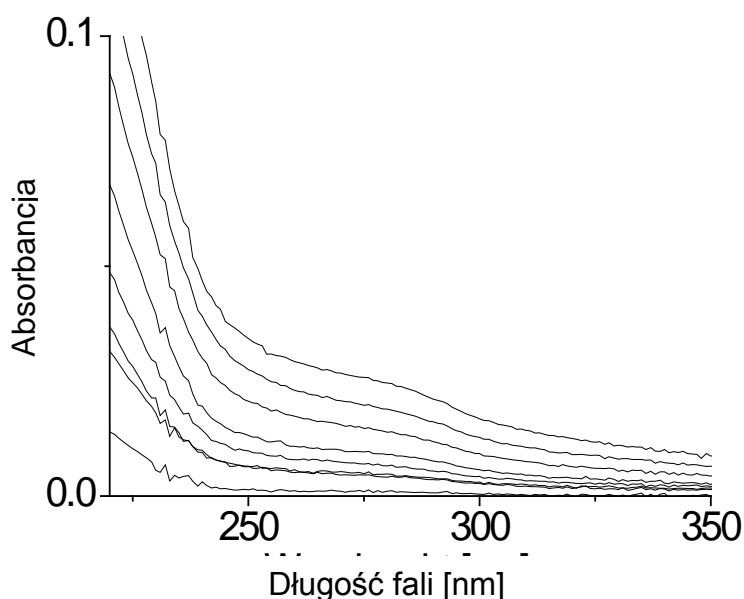
I.2. Filmy polielektrolitowe oparte na pochodnych elastyny (ELRs).

I.2.1. Przygotowanie filmów polielektrolitowych z ELRs.

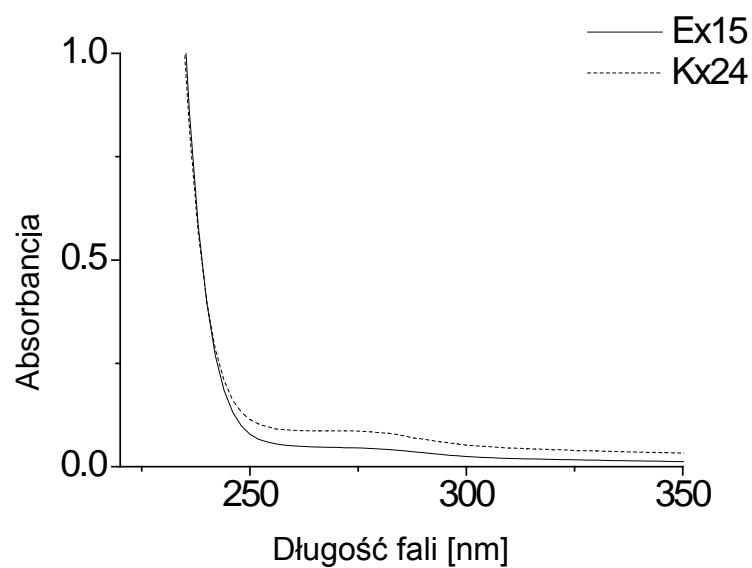
Z uwagi na właściwości biologiczne ELRs omówione w części teoretycznej w Rozdziale 3, wytworzenie ultracienkich filmów z tych polimerów jest interesujące z punktu widzenia ich późniejszych zastosowań biologicznych. Ultracienkie filmy z ELRs wytworzono z kationowego ELR [(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂₄ (Kx24, M=51 980 g·mol⁻¹, gdzie o kationowym charakterze decyduje lizyna K, pK_a=9.4 dla polilizyny) i z anionowego polipeptydu [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅ (Ex15 (M=31943 g·mol⁻¹, gdzie o anionowym charakterze decyduje kwas glutaminowy, E, o pK_a=5.1 dla kwasu poli(L-glutaminowego)). Filmy ELRs zostały wytworzone poprzez naprzemienne zanurzenie substratu w roztworze polipeptydu w 0,1 M NaCl o określonym pH, którego osiągnięcie było możliwe poprzez dodatek roztworu HCl lub NaOH. Stężenie ELRs wynosiło 1g/litr. Adsorpcję prowadzono przez 15 min w temperaturze 4⁰C. Każdorazowo po procesie adsorpcji substrat dokładnie przepłukiwano wodą. Filmy adsorbowano na krzemie oraz na

płytkę kwarcowej. Topografię oraz grubość filmów ELRs zmierzono AFM. Przyrost grubości był również monitorowany przy pomocy widm absorpcyjnych UV-VIS.

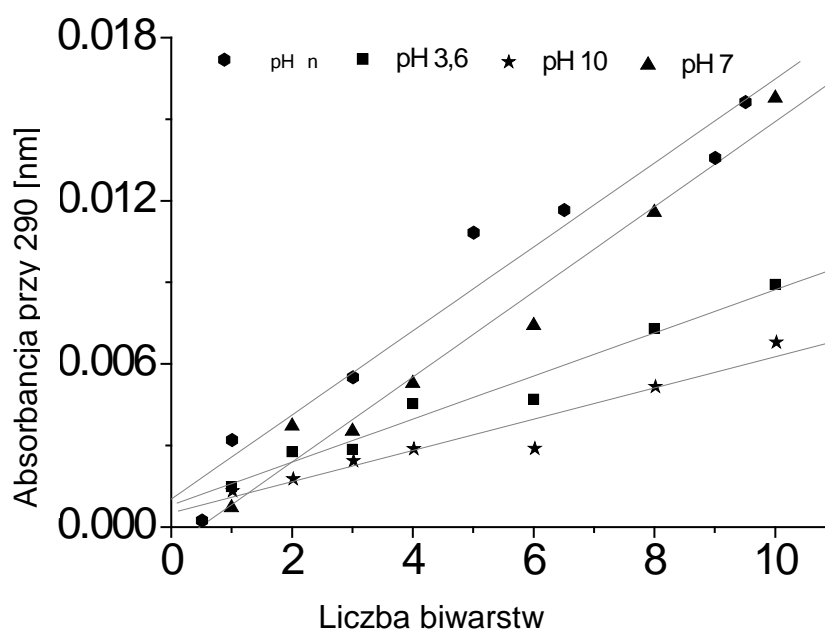
Przyrost grubości filmów ELRs monitorowano przy długości fali 290 nm. Przy tej długości fali roztwory zastosowanych ELRs wykazują niewielką absorbcję (Rys.II.7.) Przeprowadzono pomiary przy pH=3,6; 7; 10 oraz w pH wyjściowym dla ELRs (w 0,1 M NaCl pH dla Kx24= 8 a pH dla Ex15 wynosiło 4,2). Przykładowy wzrost grubości filmu zaprezentowano na Rys.II.6. Wyniki monitorowania przyrostu filmów z ELRs dla wszystkich warunków przedstawiono na Rys.II.8. Największy wzrost grubości zaobserwowano dla pH=7 oraz w przypadku, gdy pH polimerów nie było modyfikowane. W pH kwaśnym (pH=3,6), poniżej pKa kwasu glutaminowego $pH < pK_a$ oraz w pH zasadowym (pH=10) $pH > pK_a$ polilizyny dochodziło do zmniejszenia gęstości ładunku na łańcuchu polimerowym, co prowadziło do słabszej adsorpcji i obniżonej depozycji polimerów na powierzchni.



Rys. II.6. Monitorowanie przyrostu grubości filmu ELRs dla pH=7. Kolejno 1,2,3,4,6,8,10 biwarstw Kx24/Ex15.

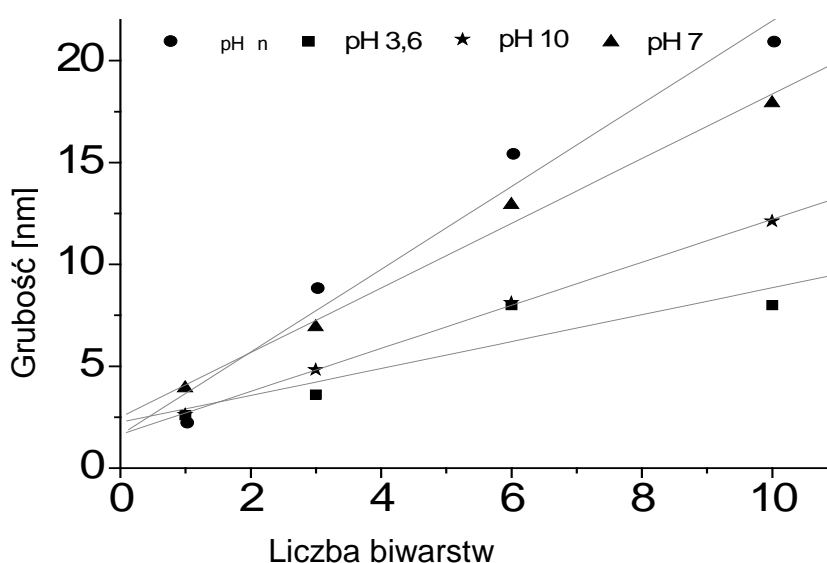


Rys. II.7. Widma roztworów Ex15 i Kx24.



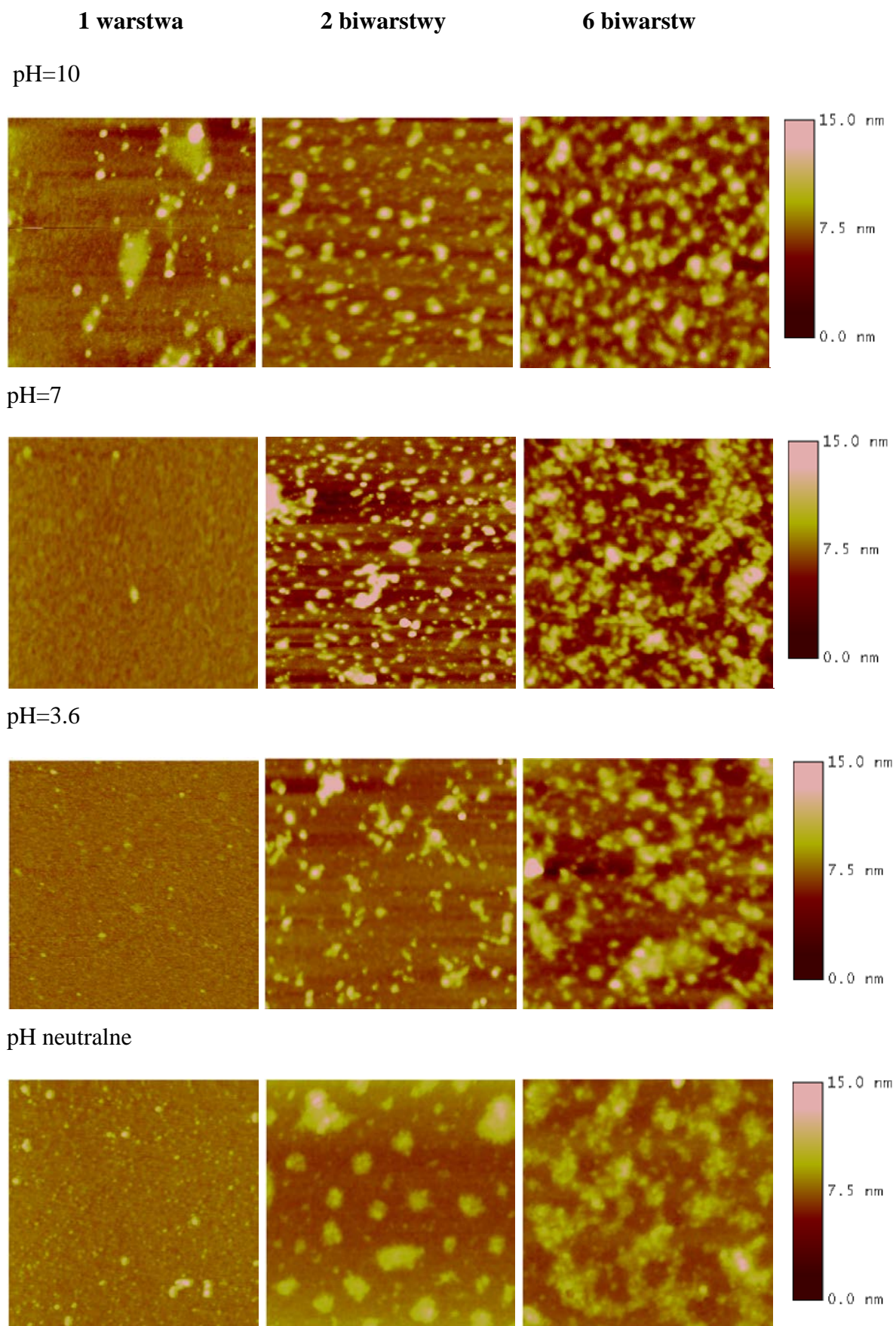
Rys. II.8. Przyrost grubości filmów Kx24/Ex15 w zależności od pH, gdzie pH n oznacza pH niemodyfikowane. Pomiary UV-VIS.

Z kolei pomiar AFM (Rys.II.9.) grubości filmów Kx24/Ex15 koreluje z rezultatami otrzymanymi przy użyciu pomiarów absorbancji w zakresie UV-VIS. Najwięcej materiału osadziło się w pH=7 oraz w warunkach naturalnego pH, niezmodyfikowanego dodatkiem kwasu bądź zasady. Różnica w porównaniu z wynikami z UV-VIS dotyczy pH 3,6 oraz ilości materiału odłożonego przy pH=10. Prawdopodobnie w niższym pH dochodzi do zwiększenia ilości wiązań wodorowych, gęstość zaadsorbowanego filmu jest większa w porównaniu z pH=10, stąd nawet w przypadku adsorpcji większej ilości materiału, grubość powstającego filmu jest mniejsza.



Rys. II.9. Przyrost grubości filmów Kx24/Ex15 w zależności od pH, gdzie pH n oznacza pH niemodyfikowane. Pomiary AFM.

Topografia filmów Kx24/Ex15 została przedstawiona na zdjęciach AFM poniżej (Rys.II.10). Obrazy pokazują tworzące się agregaty polimerów i wzrastającą szorstkość filmów polipeptydowych (Tab.II.3). Największa gęstość agregatów filmów ELRs została zaobserwowana dla pH=7, z kolei najmniejsza dla pH naturalnego. Potwierdza to bardziej efektywną adsorpcję filmów ELRs w pH naturalnym, w którym łańcuchy polimerów nie są całkowicie zdysocjowane, przez co mogą tworzyć gładszy film. W każdym z możliwych przypadków uzyskano powierzchnię o określonej nanostrukturze (Rys.II.10.), co może być istotne dla zastosowań biomedycznych.



Rys. II.10. Topografia powierzchni filmów Kx24/Ex15.

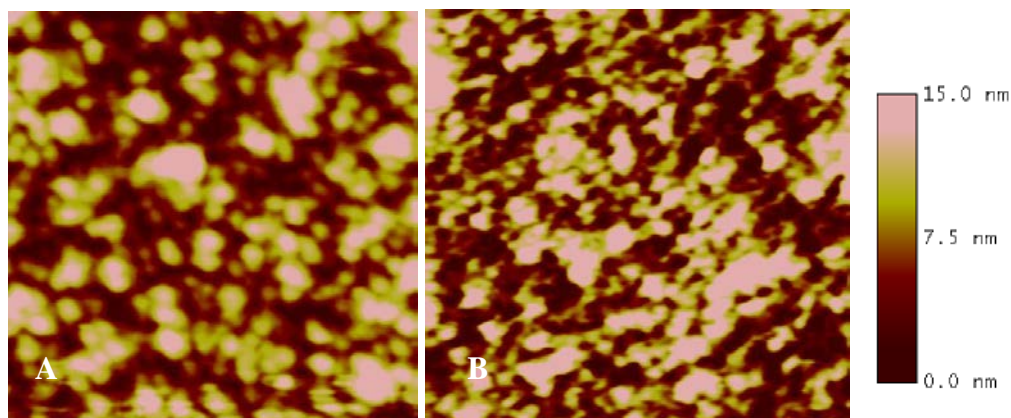
Tab. II.3. Szorstkość RMS filmów Kx24/Ex15.

	Szorstkość $\pm 10\%$ [nm]		
	Kx24	[Kx24/Ex15] ₁	[Kx24/Ex15] ₃
pH=10	1.3	1.2	1.7
pH= 7	0.3	1.4	1.9
pH= 3.6	0.3	1.2	1.7
pH neutralne pH=8.0 dla Kx24 pH=4.2 dla Ex15	0.6	1.0	1.2

I.2.2. Termoczulość filmów Kx24/Ex15.

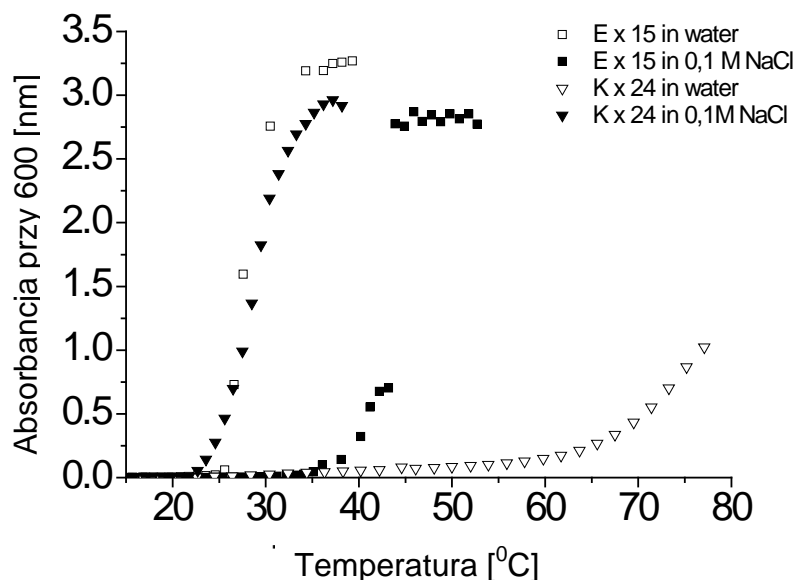
Polimery ELRs wykazują tzw. temperaturę przejścia ITT, utożsamianą z LCST. Termoczulość polimerów ELRs w roztworze polega na skokowych zmianach właściwości polimerów zachodzących w określonej temperaturze, zwykle blisko temperatury fizjologicznej. Wykonano pomiary LCST ELRs metodą turbidymetryczną w wodzie oraz w 0,1 M NaCl. By sprawdzić termoczulość filmów ELRs, wykonano pomiary topografii ich powierzchni metodą AFM. Badania AFM przeprowadzono w celce wodnej, w różnych temperaturach. Zmiany topografii powierzchni powodują również zmiany w hydrofilowości powierzchni filmów ELRs. Dlatego przeprowadzono również pomiary kąta zwilżania filmów Kx24/Ex15 wodą w różnych temperaturach: 4⁰C i 40⁰C płytki i równocześnie wody.

Pomiary termoczulości filmów Kx24/Ex15 zostały przeprowadzone dla 6 warstw wytworzonych w pH=7 (Rys.II.11). Pomiary przeprowadzono w wodzie w temperaturze 25⁰C i 40⁰C. Skany AFM przedstawiono na Rys.II.11. W wyższej temperaturze zaobserwowano kurczenie się agregatów ELRs. W niższej temperaturze agregaty miały średnicę ok. 70 nm +/- 5nm, w temperaturze wyższej agregaty skurczyły się do rozmiaru ok. 30 nm +/- 5nm.



Rys. II.11. Termoczułość 3 biwarstw Kx24/Ex15. AFM w wodzie w temperaturze A 25⁰C i B 40⁰C. Skala 1µm x 1µm x 15 nm.

Wyniki uzyskane dla filmów korelują z wynikami LCST uzyskanymi dla roztworów polimerów (Rys. II.12. i Tab. II.4.). W filmie ELRs obecne są jony soli, stąd zarówno dla Kx24 jak i dla Ex15 występuje temperatura ITT. Powyżej tej temperatury, z uwagi na zmiany jakie zachodzą w strukturze polipeptydu (zmiana z nieregularnej konformacji kulistej na konformację β -spiralną), zwiększa się hydrofobowość polipeptydu na skutek utraty wody w przestrzeniach/klastrach otaczających struktury apolarne. Zmiany te zaobserwowano w filmach w trakcie pomiarów kątów zwilżania. Pomiarów te przeprowadzono w temperaturze 4⁰C i 40⁰C. Zmiany w hydrofilowości/hydrofobowości zaobserwowano powyżej 10 warstw zaadsorbowanych polimerów. Dla grubszych filmów średnia wartość kąta zwilżania w 4⁰C wynosiła $65\pm 1^\circ$ z kolei w 40⁰C $71\pm 2^\circ$.



Rys. II.12. Pomiary LCST polipeptydów.

Tab. II.4.LCST ELRs.

	Ex15	Kx24
LCST w 0,1 M NaCl*	35 ⁰ C	23 ⁰ C
LCST w wodzie (native pH) **	26 ⁰ C	65 ⁰ C
LCST pH=3,5		-
LCST pH=7	-	-
LCST pH=10	-	

* pH po dodatku soli Ex15= 4,21, Kx24= 7,96

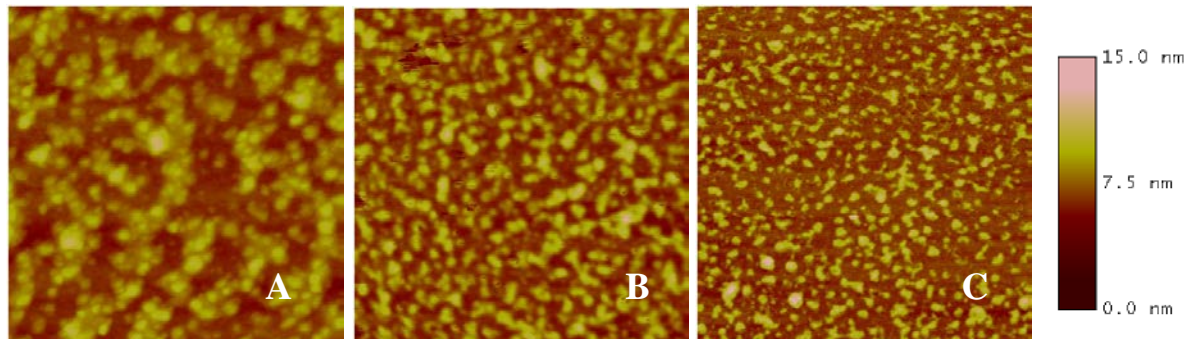
** niemodyfikowane pH dla Ex15= 3,60; dla Ex24=9,66

Ultracienkie filmy zbudowane z ELRs wykazują temperaturę ITT korelującą z LCST, przejawiającą się skokowymi zmianami w ich właściwościach w temperaturze fizjologicznej organizmu. Zmiany te zachodzą również w ultracienkich filmach polimerowych wytworzonych z ELRs i przejawiają się zmianą topografii powierzchni oraz zwilżalności filmu z ELRs. Zmiany w szorstkości RMS i co za tym idzie w ziarnistości filmu oraz jego zwilżalności powyżej temperatury przejścia polimerów mogą znaleźć praktyczne zastosowanie biomedyczne (jako tzw. przełączniki molekularne, „*molecular switches*” regulowane temperaturą).

1.2.3. Stabilność filmów w środowisku wodnym.

Stabilność filmów Kx24/Ex15 w środowisku wodnym, w szczególności izotonicznym, jest istotna ze względu na ich późniejsze zastosowania biomedyczne. Badania stabilności filmów ELRs przeprowadzono na płytkach krzemowych pokrytych 10 biwarstwami Kx24/Ex15. Następnie płytki przechowywano w 37⁰C przez okres 2, 24 i 72 h w 0,1 M NaCl. Po tym okresie płytki przepłukano wodą, osuszono strumieniem azotu i dokonano pomiaru zmian topografii powierzchni za pomocą AFM.

Topografie powierzchni filmów przedstawiono na Rys.II.13. Dłuższe przechowywanie filmów polipeptydowych w środowisku wodnym nie spowodowało zerwania ciągłości filmów. Najprawdopodobniej wyższa temperatura w okolicy LCST polipeptydów spowodowała zmiany nie tylko na powierzchni, ale również wewnątrz struktury. Po dłuższym przechowywaniu filmy stały się mniej przepuszczalne dla wody. Takie zachowanie filmów LbL wytworzonych ze słabych polielektrolitów jest dość nietypowe. Zwykle obserwowano desorpcję oraz powstawanie porów po przechowywaniu w roztworze soli ⁹².



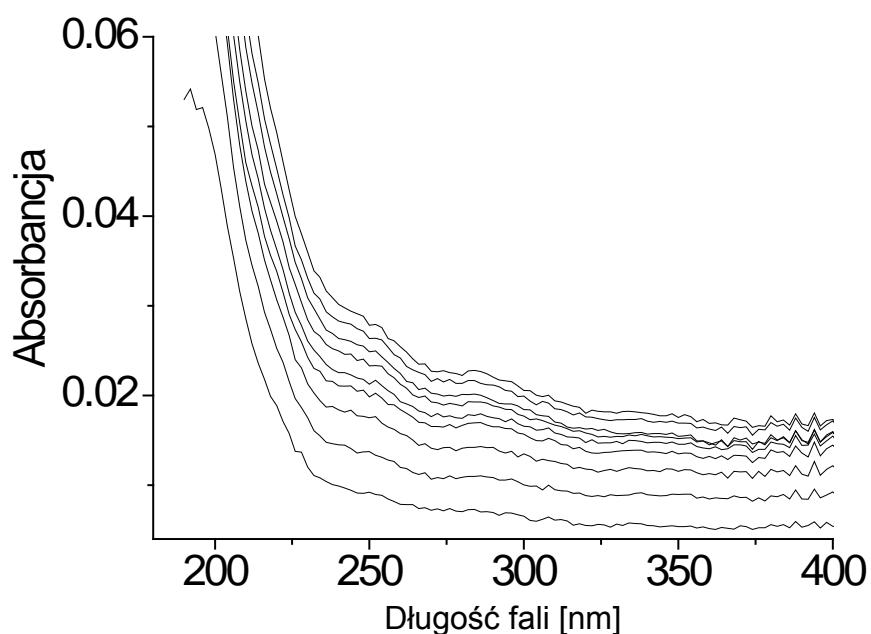
Rys. II.13. AFM powierzchni 10 biwarstw Kx24/Ex15 po przechowywaniu w wodzie. A 2h, B 24h, C 72h.

Ultracienkie filmy polimerowe wytworzone z ELRs są stabilne podczas przechowywania w środowisku izotonicznym w temperaturze fizjologicznej. Mogą więc znaleźć praktyczne biomedyczne zastosowania jako ochronne powłoki dla różnych medycznych urządzeń.

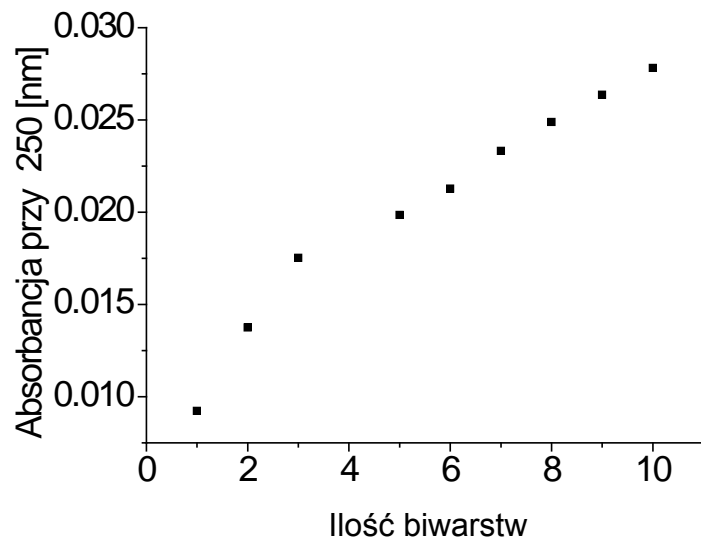
I.2.4. Filmy ELRs zawierające pochodną ulegającą procesowi fotoizomeryzacji. (BADANIA WSTĘPNE).

Filmy ELRs zawierające pochodną ulegającą procesowi fotoizomeryzacji są ciekawym przypadkiem ultracienkich filmów polimerowych, których właściwości można łatwo modyfikować przy użyciu światła, zwykle z zakresu widzialnego (dla azobenzenu światło widzialne). Ultracienkie filmy zostały wytworzone analogicznie z procedurą opisaną dla filmów ELRs przygotowanych w roztworach o pH naturalnym, niemodyfikowanym. Użyto Kx24 jako polikationu oraz Ex15-azo, z kowalencyjnie podłączonym azobenzenem⁹³ (ok.5%).

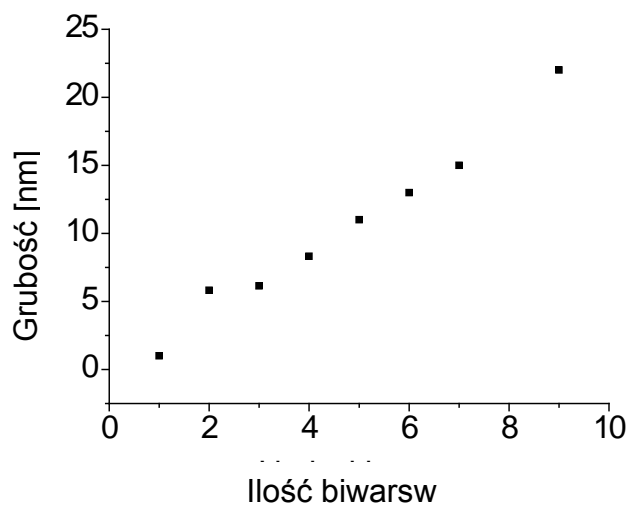
Przyrost filmu Kx24/Ex15-azo monitorowano przy użyciu spektroskopii UV-VIS oraz AFM („scratching”) zgodnie z procedurami opisanymi wcześniej. Wzrost absorbancji po każdej zaadsorbowanej biwarstwie zaprezentowano na Rys.II.14 Grubość powstającego filmu przedstawiono na Rys.II.15. Przykładową topografię powierzchni przedstawiono na Rys.II.16. Pomiary UV-VIS jak również AFM potwierdziły powstawanie filmu Kx24/Ex15-azo, w którym obserwowano monotoniczny przyrost grubości struktury.



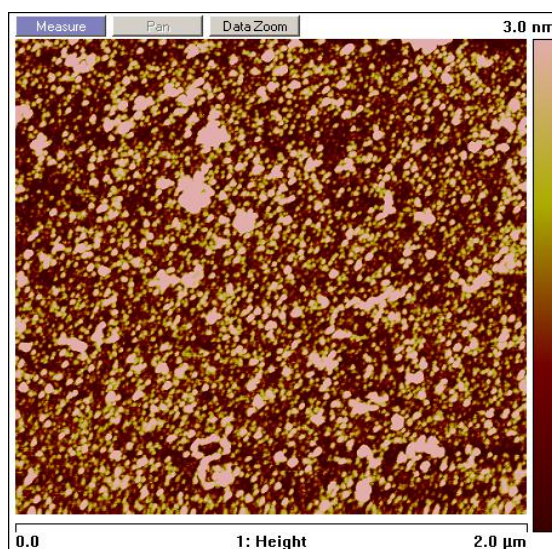
Rys. II.14.A Przyrost grubości biwarstw Kx24/Ex15-azo. Kolejno od 1 do 10 biwarstw.



Rys. II.14.B. Przyrost grubości biwarstw Kx24/Ex15-azo. Kolejno od 1 do 10 biwarstw.



Rys. II.15. Przyrost grubości filmów Kx24/Ex15-azo mierzona AFM.



Rys. II.16. Topografia 8 biwarstw filmu Kx24/Ex15-azo. RMS=1,45nm.

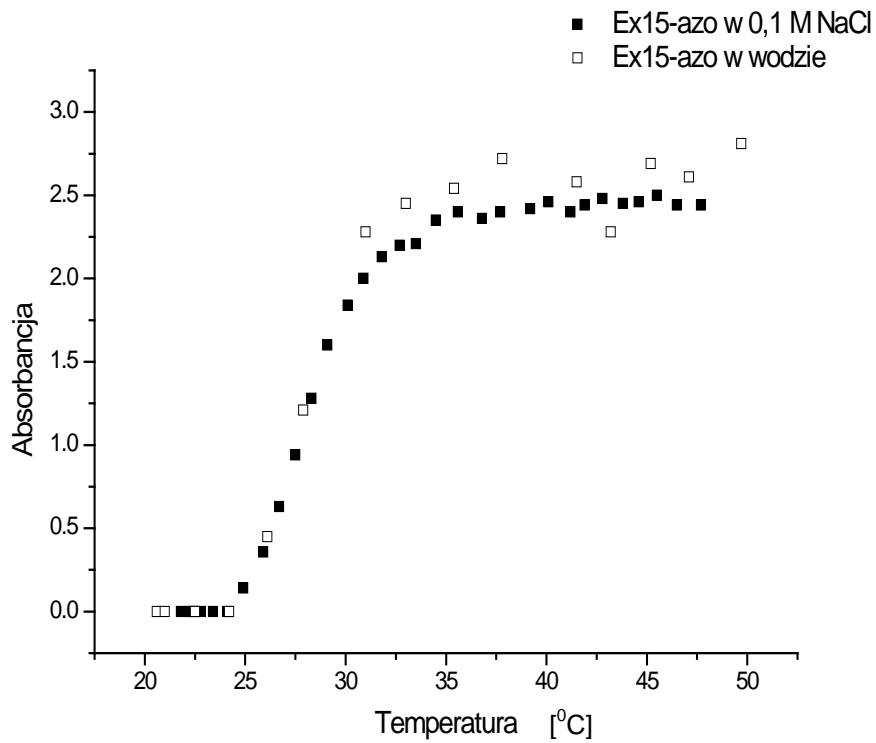
Wstępne badania potwierdzają, że dla zastosowanych warunków adsorpcji możliwe jest wytworzenie stabilnego filmu z polimerów ELRs zawierających azobenzen.

1.2.4.1. Fotoaktywność i termoczulość ELRs-azo. (BADANIA WSTĘPNE).

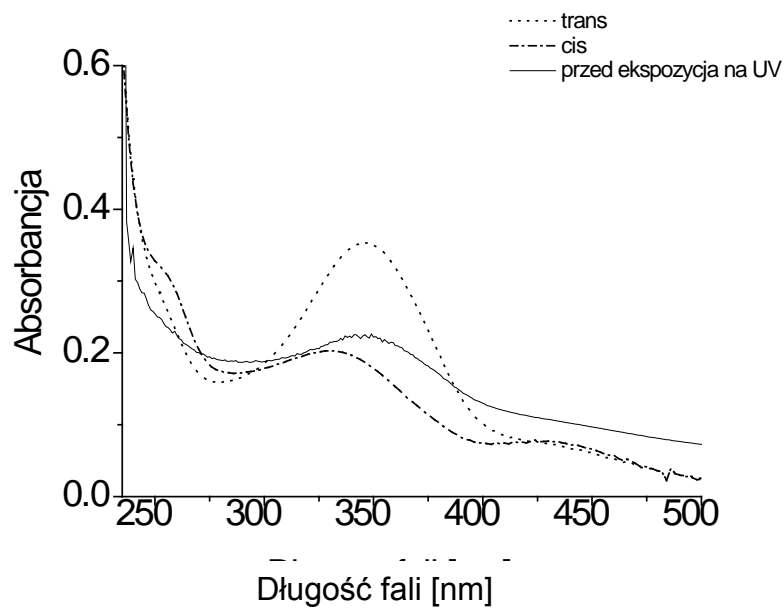
Badania nad termoczulością Ex15-azo miały za zadanie sprawdzenie zachowania się polimeru zawierającego kowalencyjnie dołączony chromofor w wyższej temperaturze. Termoczulość Ex15-azo sprawdzono mierząc LCST roztworu polimeru w wodzie i w 0,1 M NaCl. Zdolność kowalencyjnie przyłączonego do Ex15 azobenzenu do ulegania fotoizomeryzacji sprawdzono poprzez naświetlanie roztworu polimeru światłem o określonej długości fali 366 nm i 430 nm, charakterystyczną dla pasma absorpcji dla azobenzenu, w temperaturze 15⁰C przez 20 min. Obserwację fotoizomeryzacji dokonano poprzez pomiar widma UV-VIS roztworów po naświetleniu.

Polipeptyd Ex15-azo wykazuje temperaturę ITT zarówno w roztworze soli jak i w wodzie. Obie temperatury są takie same i wynoszą ok. 26⁰C (Rys.II.17.) W przypadku polimeru bez kowalencyjnie dołączonego chromoforu (Ex15), temperatury LCST mierzone w wodzie i w roztworze soli różniły się (Rys. II.12). Wskazuje to na fakt, że nawet niewielka zmiana składu makrocząsteczki ma istotny wpływ na jej termoczule zachowanie. Widma UV-VIS roztworów po naświetleniu światłem o określonej długości fali dowodzą zachodzących fotoizomeryzacji. Po naświetleniu światłem niebieskim o długości 430 nm powstawała pochodna trans (charakterystyczny wzrost absorpcji przy 350 nm). Naświetlanie

światłem UV o długości 366 nm dawało pochodną cis, a w widmie UV-VIS powodowało wzrost absorpcji przy ok. 250 nm (Rys.II.18).



Rys. II.17. LCST Ex15-azo w wodzie i w 0,1 M NaCl.



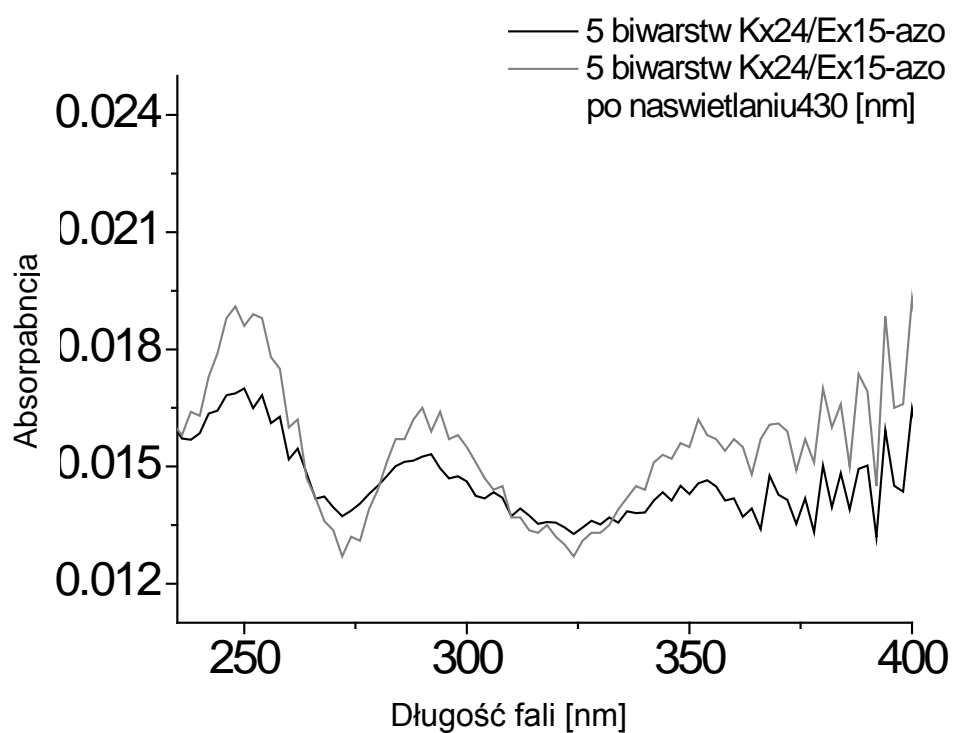
Rys. II.18. Fotoizomeryzacja roztworu Ex15-azo.

Polimer Ex15-azo wykazuje zatem LCST (26°C) a przyłączone do makrocząsteczki grupy azobenzenowe ulegają fotoizomeryzacji.

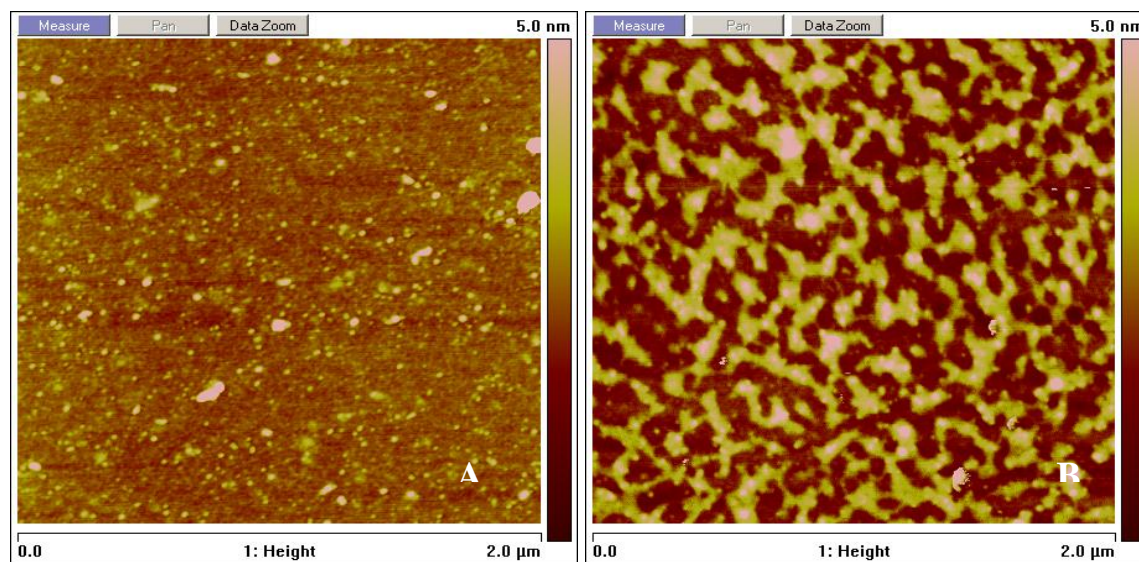
1.2.4.1.1. Fotoizomeryzacja w ultracienkich filmach polimerowych.

Badania nad zdolnością do fotoizomeryzacji Ex15-azo w ultracienkich filmach polimerowych są istotne ze względu na późniejsze potencjalne zastosowanie takich układów jako tzw. przełączników molekularnych, sterowanych światłem. W celu zbadania możliwości fotoizomeryzacji azobenzenu w cienkim filmie polimerowym, przygotowano film Kx24/Ex15-azo na płytce kwarcowej (5 biwarstw) oraz na płytce krzemowej (1 biwarstwa). Zmierzono widmo UV-VIS przygotowanego filmu polimerowego (płytką kwarcową). Następnie płytkę naświetlano przez 1 h światłem o długości fali 430 nm w roztworze 0,1 M NaCl w temperaturze $<10^{\circ}\text{C}$ (zlewka umieszczona była na lodzie). Z kolei płytkę krzemową z zaadsorbowaną 1 biwarstwą Kx24/Ex15-azo naświetlano również światłem o długości fali 430 nm. Płytkę krzemową z filmem została umieszczona w roztworze 0,1 M NaCl w temperaturze $<10^{\circ}\text{C}$.

Widmo UV-VIS płytki po naświetlaniu wykazało niewielkie zmiany zachodzące pod wpływem naświetlania. Widmo nienaświetlanego związku zaadsorbowanego na płytce różni się od widma fotoizomeryzującego związku w roztworze. Trudno stwierdzić, czy wzrost absorpcji przy ok. 250, 290 i 300 nm jest związany z powstawaniem izomeru trans (Rys.II.19.), gdyż czułość pomiaru jest zbyt mała dla tak cienkich filmów. Niemniej jednak topografia filmu zaadsorbowanego na płytce krzemowej (Rys.II.20.) wykazuje istotne zmiany po procesie naświetlania. Zmiany w topografii powierzchni filmu spowodowały również wzrost jego hydrofobowości. Dla 8 biwarstw kąt zwilżania przed naświetlaniem wynosił $38,1^{\circ} \pm 0,1$ zaś po naświetlaniu jego wartość wzrosła do $47,8^{\circ} \pm 1$. Może to świadczyć o zachodzącej fotoizomeryzacji, która na skalę makro przejawia się wytworzeniem charakterystycznych struktur. By zniwelować ewentualny wpływ przechowywania filmu w roztworze na powstałą strukturę, płytkę nienaświetlaną poddano przed pomiarem AFM takiej samej procedurze, tzn. przechowywano przez 1 h w 0,1 M NaCl.



Rys. II.19. Widmo 5 biwarstw filmu Kx24/Ex15-azo.



Rys. II.20. 1 biwarstwa Kx24/Ex15-azo po 1 h przechowywaniu w 0,1 M NaCl bez naświetlania (A) z naświetlaniem 430 nm (B).

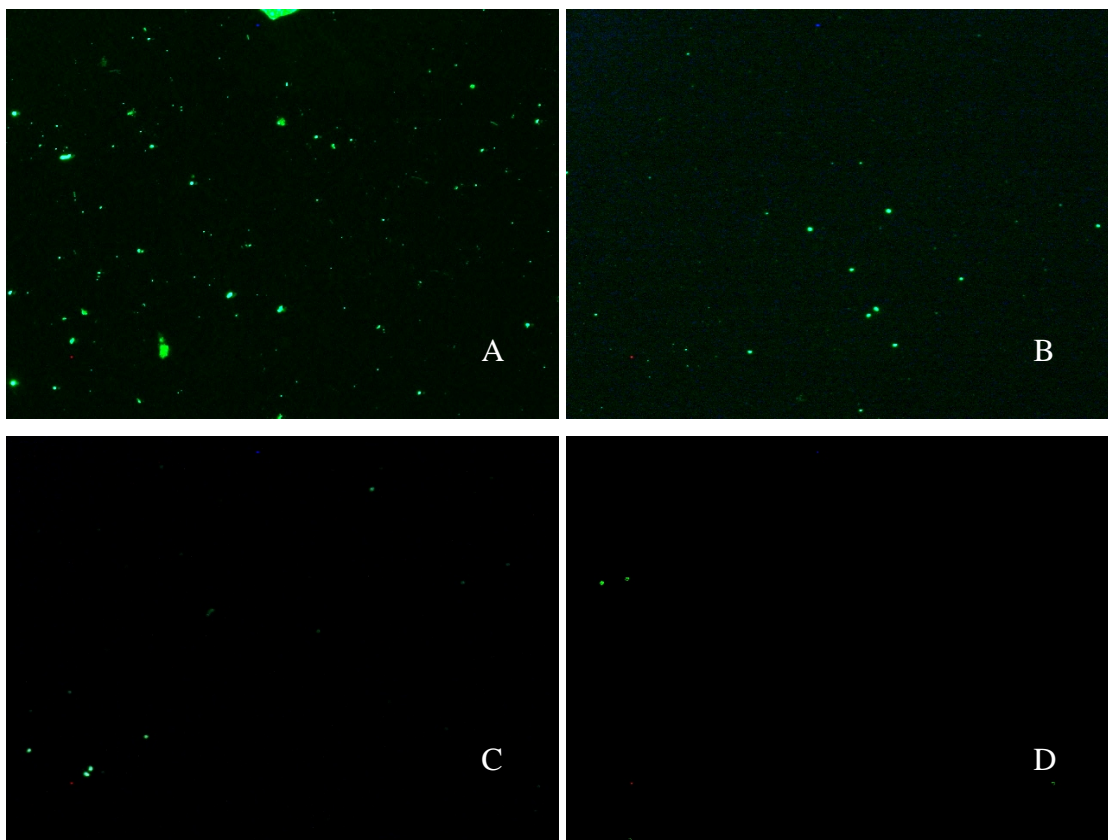
Wstępne badania nad fotoizomeryzacją filmów zbudowanych z ELRs-azo są obiecujące. Konieczne są jednak dalsze badania w zakresie zmian spektralnych w filmach polimerowych, czy też zmian grubości filmu (np. badania elipsometryczne). Zmiany w strukturze powierzchni pod wpływem naświetlania światłem niebieskim można wykorzystać np. w inżynierii tkankowej („fotoodklejanie” arkuszy komórek z podłoża).

II. Biomedyczne zastosowania filmów CCh/ACh.

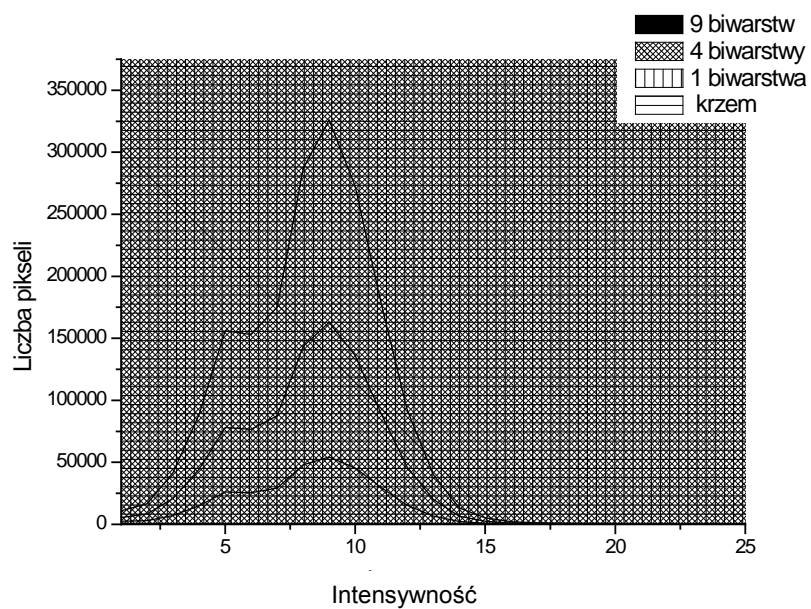
II.1. Antyadhezyjne właściwości filmów CCh/ACh.

Właściwości antyadhezyjne powierzchni będącej w kontakcie z żywą tkanką są wymagane dla niektórych zastosowań biomedycznych, np. antyadhezyjne w stosunku do białek powinny wykazywać się powierzchni implantów czy protez. Adsorpcja protein uruchomić może szereg niepożądanych procesów, prowadzących do powstania stanu zapalnego wokół protezy, rozwoju mikroorganizmów, wrastania protezy w tkanki organizmu. Antyadhezyjne właściwości powierzchni filmu chitozanowego sprawdzano poprzez adsorpcję na jego powierzchni białek jak również komponentów surowicy ludzkiej. W tym celu płytki krzemowe (1cm x 1cm) zostały pokryte 1, 4 i 9 biwarstwami CCh/ACh i inkubowano je przez 2 h w 1cm³ BSA-FITC (1g/dm³ w 0,9% NaCl). Następnie płytki wymyto w wodzie i wysuszono w strumieniu azotu. Na powierzchni płytek krzemowych (1cm x 1cm) zabezpieczonych 1,4 oraz 10 biwarstwami filmu CCh/ACh adsorbowano również białko TGF-β1 przez 72h w 1cm³ TGF-β1 (1g/dm³ w 0,9% NaCl). Następnie płytki wymyto w wodzie po czym wysuszono w strumieniu azotu. Adsorpcję komponentów ludzkiej surowicy przeprowadzono na płytkach krzemowych (1cm x1 cm) pokrytych 1,4 i 10 biwarstwami CCh/ACh. W tym celu płytki zanurzono w 1 cm³ przez 2 h w 36,6 °C. Następnie płytki przeniesiono do sterylne go izotonicznego roztworu na 15 min, po czym przemyto wodą i wysuszono w strumieniu azotu.

Albumina z kowalencyjnie dołączoną fluoresceiną BSA-FITC jest często wykorzystywana do sprawdzenia adsorpcji białka na różnych powierzchniach ponieważ można szybko i bardzo dokładnie określić ilość zaadsorbowanego białka wykorzystując technikę fluorescencyjną^{94,95,96}. W warunkach izotonicznych, w których został przeprowadzony eksperyment, albumina była obdarzona ładunkiem ujemnym, co utrudniało jej adsorpcję na powierzchni pokrytej warstwami CCh/ACh, zakończonymi każdorazowo ACh. Pomimo tego zaobserwowano zależny od zwiększającej się ilości CCh/ACh spadek w adsorpcji BSA-FITC (Rys.II.21) Ilościowo zależność ta została przedstawiona na histogramie intensywności fluorescencji (Rys. II.22 oraz Tab. II.5.). Eksperyment jest dowodem na antyadhezyjną naturę filmów CCh/ACh.



Rys. II.21. Zdjęcia wykonane mikroskopem fluorescencyjnym płytek pokrytych CCh/ACh z zaadsorbowanym białkiem BSA-FITC. Zdjęcia przedstawiają kolejno: A:0, B:1, C:4, D:9 biwarstw CCh/ACh w powiększeniu (20x100).

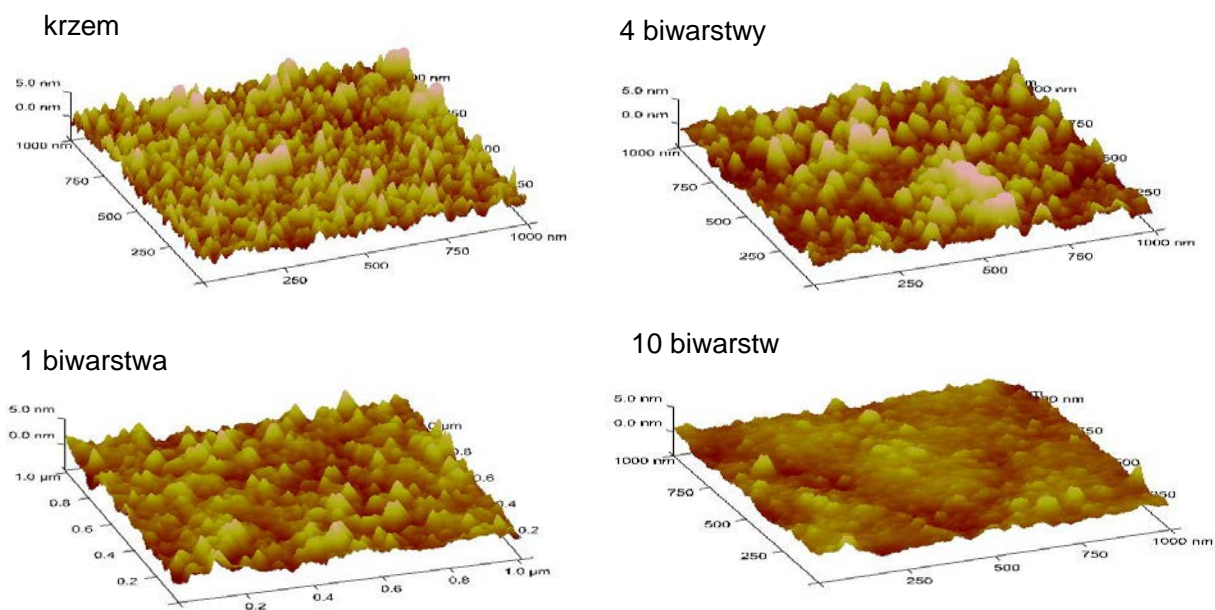


Rys. II.22. Histogram intensywności fluorescencji w zależności od ilości zaadsorbowanych biwarstw.

Tab. II.5. Znormalizowana powierzchnia histogramu intensywności fluorescencji.

	Znormalizowana powierzchnia pod histogramem
Krzem	100
1 biwarstwa	66
4 biwarstwy	34
9 biwarstw	2

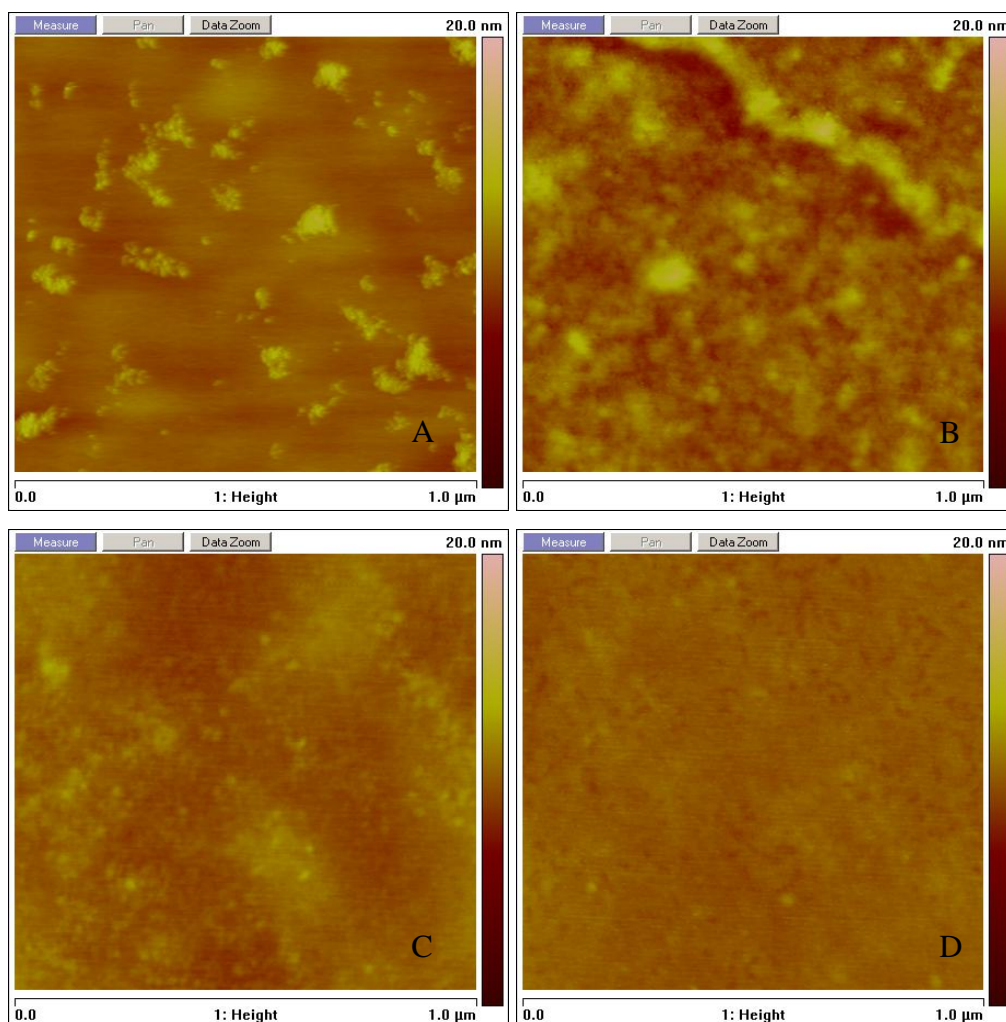
Badania antyadhezyjności zostały przeprowadzone także z wykorzystaniem białka TGF- β 1, które w warunkach izotonicznych obdarzone jest ładunkiem dodatnim. Adsorpcję białka monitorowano techniką AFM (Rys.II.23.) Zaobserwowano, że białko TGF- β 1 adsorbuje się znacznie efektywniej na niezabezpieczonej nanopowłoką CCh/ACh płytce krzemowej. Z kolei następne warstwy filmu CCh/ACh, zakończone warstwą ujemną ACh, hamowały elektrostatycznie korzystną adsorpcję białka. Niewielka szorstkość ultracienkich filmów CCh/ACh oraz ich wysoka hydrofilowość utrudniają adsorpcję białka.



Rys. II.23. Obrazy AFM płytek krzemowych pokrytych i niepokrytych filmami CCh/ACh po 72 godzinnym przechowywaniu w roztworze zawierającym białko TGF- β 1.

W kolejnym etapie badań sprawdzono adsorpcję komponentów ludzkiej surowicy na powierzchni zabezpieczonej filmami CCh/ACh. W tym celu płytki krzemowe zabezpieczone oraz niezabezpieczone CCh/ACh zanurzono na 2h w ludzkiej surowicy w temperaturze

fizjologicznej 37⁰C. Badania AFM (Rys.II.24.) dowiodły, że nanopowłoki chitozanowe chronią powierzchnię krzemu przed adsorpcją komponentów ludzkiej surowicy, co czyni je niezwykle atrakcyjnym do zastosowań biomedycznych (zabezpieczenie urządzeń medycznych, implantów, membran itp. mających kontakt z ludzką krwią).



Rys. II.24. Adsorpcja ludzkiej surowicy na płytkach krzemowych. A niezabezpieczony krzem, B 1 biwarstwa CCh/ACh, C 4 biwarstwy CCh/ACh, D 10 biwarstw CCh/ACh.

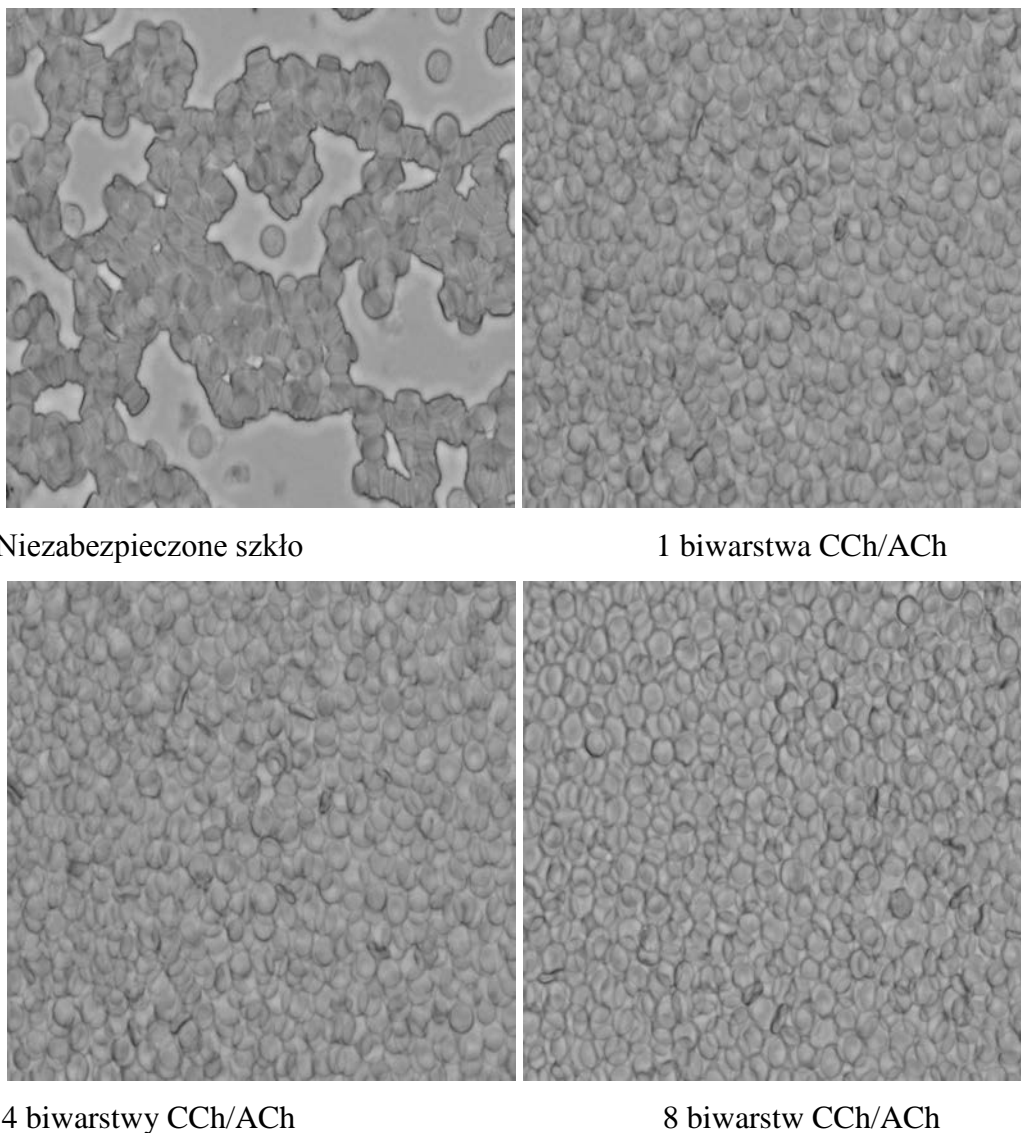
Podawane w literaturze przykłady powierzchni antyadhezyjnych opartych na niezmodyfikowanym chitozanie (cienkie filmy polimerowe chitozan/heparyna) zostały wytworzone w warunkach $\text{pH} < 6$, zaś struktury te działały efektywnie w $\text{pH}=2,9$ ⁹⁷. Jednoskładnikowe powłoki chitozanowe wytworzono w środowisku wodnym a efektywność ich antyadhezyjnego działania jest optymalna w warunkach fizjologicznych. Jak wykazano w eksperymencie, powłoki posiadały właściwości antyadhezyjne w układzie modelowym zarówno dla białka obdarzonego ładunkiem dodatnim jak również ujemnym. Antyadhezyjne

działanie powłok chitozanowych sprawdzono również w stosunku do układu naturalnego: na powierzchni zabezpieczonej filmem chitozanowym nie dochodziło do adsorpcji komponentów surowicy ludzkiej.

II.2. Antykoagulacyjne właściwości nanopowłok chitozanowych.

Koagulacja ludzkiej krwi aktywowana jest wieloma czynnikami. Jeden z nich, czynnik XII aktywuje ten proces podczas kontaktu komponentów krwi z powierzchniami obdarzonymi ujemnym ładunkiem np. podczas kontaktu ze szkłem, czy poli (chlorkiem winylowym) ⁹⁸. W celu sprawdzenia potencjalnych właściwości antykoagulacyjnych powierzchni zabezpieczonych filmem chitozanowym, przygotowano ultracienkie filmy chitozanowe (0,1,4,8,10 biwarstw) na szklanych płytkach (1cm x 1cm), po czym na tak zabezpieczone płytki nałożono świeżą ludzką krew. Właściwości antykoagulacyjne obserwowano natychmiast pod mikroskopem optycznym.

W przeprowadzonym eksperymencie (Rys.II.25.) zauważono, że tkanka nie koaguluje, gdy szkło zabezpieczone jest nanopowłokami CCh/ACh. Proces ten jest zahamowany przy zastosowaniu zaledwie jednej biwarstwy chitozanowej.



Rys. II.25. Antykoagulacyjne właściwości filmów CCh/ACh. Obraz z mikroskopu optycznego (10x50) zachowania świeżej ludzkiej krwi na zabezpieczonej i niezabezpieczonej nanopowłoką chitozanową szklanej płytki.

Na antykoagulacyjne właściwości nanopowłok chitozanowych wpływa obecność grup sulfonowych. Podobne właściwości zostały zaobserwowane w roztworze w obecności polimeru ACh⁹⁹. Poza tym struktura chitozanu przypomina strukturę heparyny, naturalnego

czynnika antykoagulacyjnego występujący we krwi, stąd zapewne już jedna biwarstwa chitozanu wystarcza, by zapewnić powierzchni właściwości antykoagulacyjne.

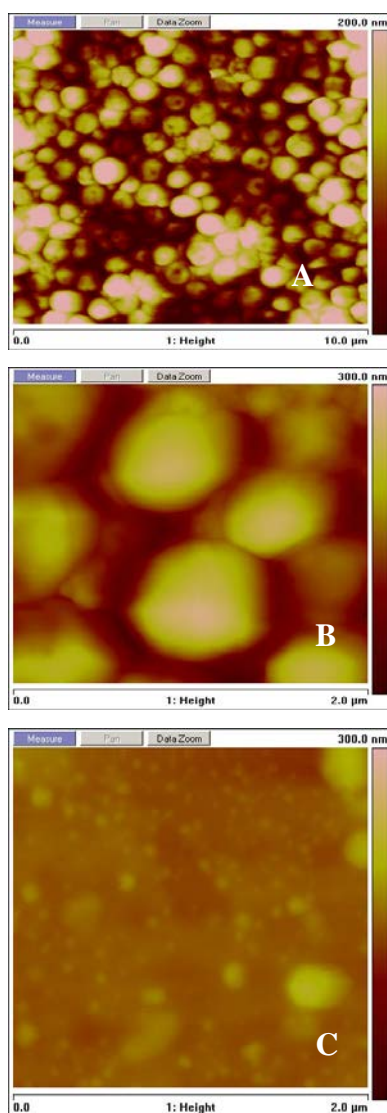
II.3. Antybakteryjne właściwości nanopowłok chitozanowych.

Właściwości antybakteryjne nanopowłok chitozanowych zostały sprawdzone w teście *in vitro* z użyciem wyizolowanych klinicznych szczepów *S. aureus*, znanych z formowania opornych biofilmów bakteryjnych na urządzeniach medycznych, protezach itp. Test przeprowadzono z udziałem płytek krzemowych/szklanych pokrytych 10 biwarstwami filmu CCh/ACh. Przygotowane płytki zostały zanurzone w inokulum bakteryjnym na 24h w 37⁰C. Kliniczny, wyizolowany szczep *Staphylococcus aureus* hodowano przez 18 h w 37⁰C (TBS z 0,5% glukozy). Następnie kultura bakteryjna została rozcieńczona 1:100 świeżym roztworem TBS zawierającym 0,5% glukozy. Płytki pokryte i niepokryte nanopowłoką z CCh/ACh umieszczono w jałowych, polistyrenowych płytkach do hodowli tkanek (Sarstedt), które wypełniono 1 cm³ przygotowanym wcześniej inokulum. Filmy bakteryjne hodowano przez 24h w 37 C bez wytrząsania. Następnie płytki krzemowe zostały przeniesione na 24 h do jałowego izotonicznego roztworu, później wypłukane dejonizowaną wodą a następnie wysuszone w strumieniu azotu (badania AFM oraz obserwacje mikroskopem optycznym). Do badań SEM próbki zostały utrwalone w 70% etanolu, następnie wysuszone i przygotowane po pomiaru SEM.



Rys. II.26. Obraz z mikroskopu optycznego (10x50) 24h hodowli bakteryjnej. A. Niezabezpieczone szkło. B. Szkło zabezpieczone 10 biwarstwami filmu CCh/ACh.

Obraz z mikroskopu optycznego pokazuje, że powierzchnia szkła niezabezpieczona filmem CCh/ACh została całkowicie pokryta przez wielowarstwowy film bakteryjny (Rys.II.26.A.). Natomiast na powierzchni szkła zabezpieczonej filmem CCh/ACh nie doszło do uformowania filmu bakteryjnego (Rys.II.26.B.) Widoczne bakterie nie tworzą charakterystycznych dla gronkowców struktur. Wykonane obrazy AFM (Rys.II.27.A.B.) pokazują, że niezabezpieczona nanopowłokami powierzchnia krzemu została całkowicie pokryta przez porowaty, dobrze zorganizowany biofilm bakteryjny. Tymczasem powierzchnia zabezpieczona 10 biwarstwami CCh/ACh (ok. 20 nm) skutecznie utrudniała adhezję bakterii (Rys.II.27.C.). Widoczne są jedynie pojedyncze bakterie oraz fragmenty biofilmu bakteryjnego. Nie obserwuje się dobrze zorganizowanych struktur bakteryjnych.

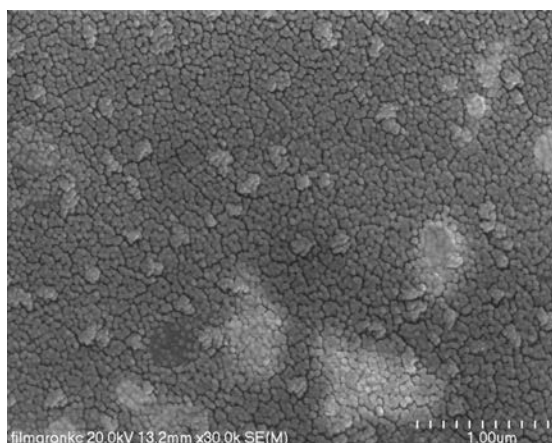


Rys. II.27. Obrazy AFM płytek krzemowych niepokrytych (A,B) oraz pokrytych (C) 10 biwarstwami CCh/ACh.

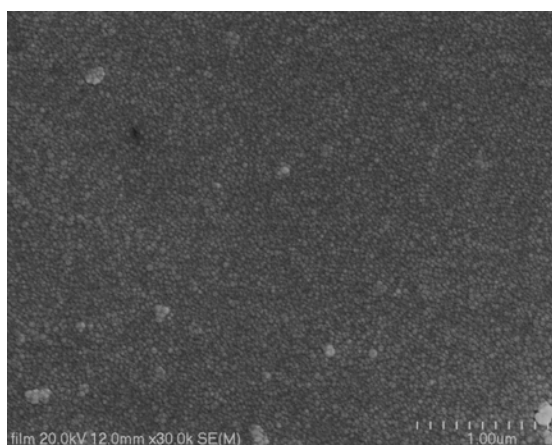
Najprawdopodobniej do adhezji bakterii na powierzchni zabezpieczonej nanopowłoką z chitozanu nie dochodzi ze względu na fizykochemiczne właściwości filmów CCh/ACh. Szorstkość takiej powierzchni jest niewielka, jednocześnie wykazuje ona dużą hydrofilowość, przez co nie dochodzi do zaadsorbowania bakterii oraz do produkcji biofilmu bakteryjnego. Eksperyment przeprowadzono w pH neutralnym (pH=7,4). W tych warunkach komórki bakterii wykazują potencjał ujemny, rzędu -35mV^{100} . Ostatnia powłoka zabezpieczająca krzem obdarzona była również ładunkiem ujemnym, co utrudnia adsorpcję i adhezję bakterii. Niemniej adsorpcję i adhezję oraz powstanie dobrze zorganizowanego filmu bakteryjnego obserwowano na powierzchni niezabezpieczonego krzemu, który również posiada ładunek ujemny. Dowodzi to, że proces adhezji bakterii do powierzchni nie może zostać wyeliminowany jedynie przez odpychające oddziaływania elektrostatyczne. Ważnym czynnikiem jest również wysoka hydrofilowość powierzchni, która zupełnie ogranicza hydrofobowy charakter oddziaływań bakteria-powierzchnia.

Wyniki AFM zostały potwierdzone badaniami SEM powierzchni krzemu zabezpieczonej (Rys.II.28.) oraz niezabezpieczonej (Rys.II.29.) filmami CCh/ACh. Dodatkowo zauważono, że hodowla bakteryjna nie wpłynęła na topografię filmu oraz nie zniszczyła ciągłości nanopowłok CCh/ACh. Zaobserwowano ślady aktywności bakterii (białe plamy), lecz ciągłość filmu nie została przerwana. (Rys.II.28.). Badania SEM filmu chitozanowego traktowanego przed pomiarem w ten sam sposób jak nanopowłoki poddane działaniu bakterii wykazały brak białych obszarów (plam), co sugeruje, że są one wynikiem działalności bakterii (Rys.II.30).

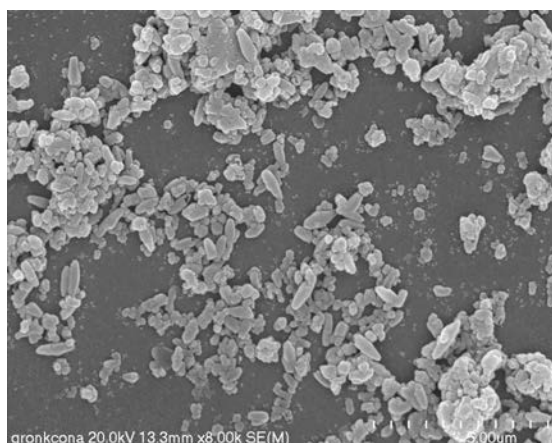
Badania przeprowadzone techniką AFM razem z badaniami SEM dowodzą, że *S. aureus* nie są w stanie wytworzyć chemicznego połączenia z powierzchnią z powodu wspomnianych wcześniej fizykochemicznych właściwości materiału. Dowodzi to także braku chemicznej kompatybilności pomiędzy nanopowłokami chitozanowymi, powierzchnią bakterii oraz wydzielaną zewnątrzkomórkową bakteryjną substancją polimerową, z której powstaje biofilm bakteryjny. Dlatego nie dochodzi do adhezji bakterii na powierzchni zabezpieczonej CCh/ACh.



Rys. II.28. Obraz SEM filmu chitozanowego po hodowli bakteryjnej.



Rys. II.30. Obraz SEM filmu chitozanowego przed hodowlą bakteryjną.

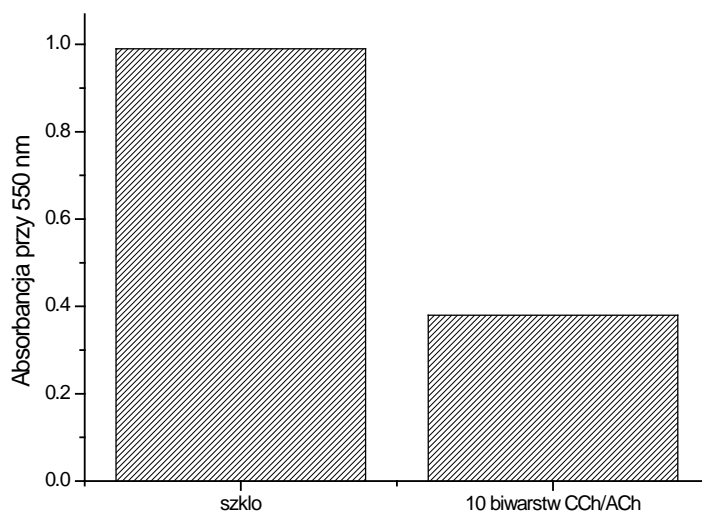


Rys. II.29. Płytki krzemowa niepokryta filmami chitozanowymi po hodowli bakteryjnej.

W celu sprawdzenia bakteriostatyczności i działania antybakteryjnego filmów CCh/ACh przeprowadzono również test MTT. Test na obecność reduktazy mitochondrialnej (test MTT) został przeprowadzony zgodnie z dobrze znaną procedurą¹⁰¹. Filmy bakteryjne po hodowli bakteryjnej zostały przepłukane trzykrotnie każdorazowo 1 cm³ roztworu PBS. Następnie płytki przeniesiono do 800 ul roztworu MTT (w 0,05% PBS). Płytki inkubowano

przez 2 h w 37⁰C. Następnie roztwór MTT zastąpiono 800 ul 5mM HCl w izopropanolu. Po 20 min zmierzono absorbcancję tak uzyskanego roztworu przy 550 nm.

Test wykazał, że na powierzchni pokrytej ochronną nanopowłoką chitozanową znajdowało się o połowę mniej żywych bakterii w porównaniu z powierzchnią niezabezpieczoną (Rys.II.31.).



Rys. II.31. Badania antybakteryjności powierzchni.

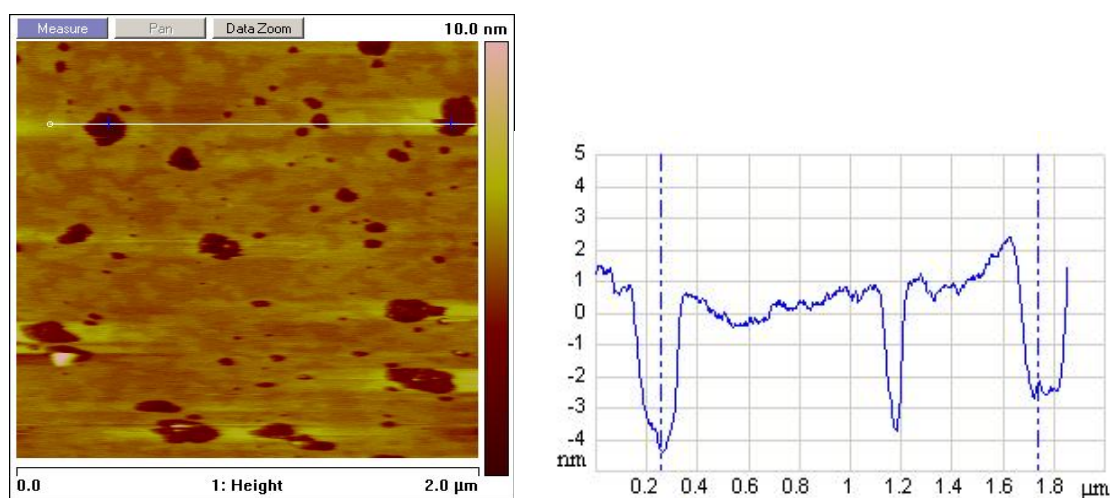
Badania MTT dowodzą, że bakterie nie są trwale zaadsorbowane na podłożu, przez co nie są w stanie proliferować oraz tworzyć trwałych filmów. Badania potwierdzają przeprowadzone wcześniej obserwacje przy użyciu mikroskopu optycznego oraz elektronowego (SEM), gdzie bakterie nie tworzyły trwałych struktur. Stąd powierzchnia zabezpieczona filmem chitozanowym wykazuje właściwości antybakteryjne i zabezpiecza powierzchnię przed kolonizacją bakterii tworzących biofilm.

II.4. Badanie wpływu kationowego chitozanu na model błony komórkowej-badania AFM.

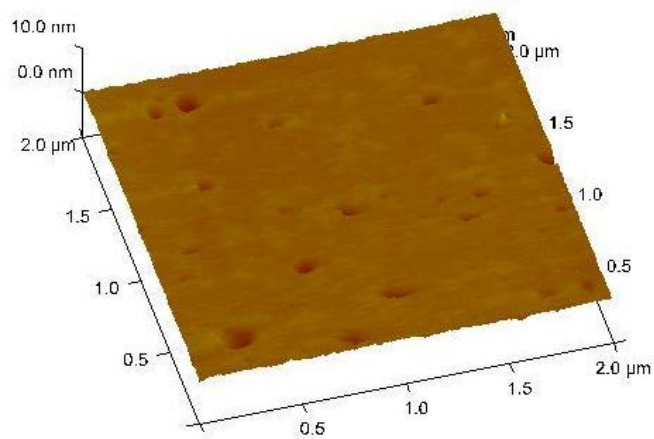
Badanie wpływu polikationu na błonę komórkową jest szczególnie istotne z punktu widzenia późniejszych zastosowań polimerowych filmów jako tzw. nanopłaszczki w procesie enkapsulacji komórek czy tkanek. Błona komórkowa obdarzona jest ładunkiem ujemnym, stąd silnie oddziałuje z polikationem. W celu sprawdzenia ewentualnego negatywnego wpływu CCh na błonę komórkową, w pierwszym etapie badań wytworzono model błony

komórkowej, która powstała z 1,2-dimirystylo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DMPC) zgodnie z dobrze znaną procedurą^{102, 103, 104}. W pierwszym etapie sporządzono jednowarstwowe liposomy metodą hydratacji filmu lipidowego. W tym celu 0,67 mg DMPC rozpuszczono w 1 cm³ chloroformu, który następnie odparowano. Film lipidowy hydratowano 1 cm³ 0,1 M NaCl. Powstałe wielowarstwowe struktury ekstrudowano tak, by uzyskać jednowarstwowe liposomy o średnicy 100 nm. Następnie przygotowano i oczyszczono mikę (płytki 1cm x 1cm) i potraktowano ją 80 ul przygotowanego wcześniej roztworu z jednowarstwowymi liposomami. Po 20 min na powierzchni miki powstała dwuwarstwa lipidowa, będąca modelem błony komórkowej. Z kolei nadmiar liposomów usunięto poprzez przemycie miki 0,1 M NaCl. Wykonano zdjęcie AFM dwuwarstwy lipidowej w 0,1 M NaCl w temperaturze 30⁰C powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów (28⁰C). Na tak przygotowanej dwuwarstwie lipidowej adsorbowano 1 cm³ CCh o stężeniu 1g/litr przez 20 min. Następnie nadmiar niezaadsorbowanego polimeru spłukano 0,1 M NaCl. Wykonano zdjęcie AFM w 0,1 M NaCl w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów (30⁰C).

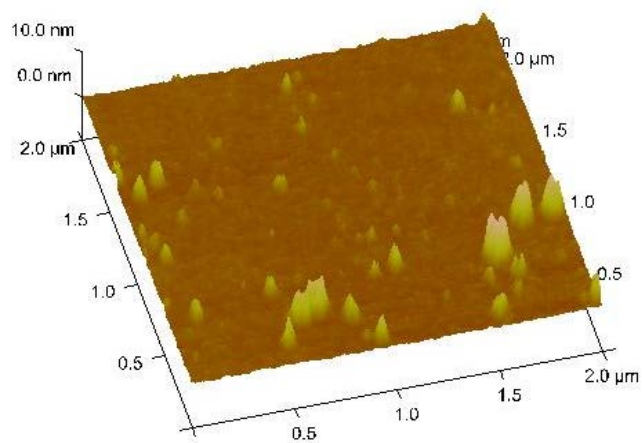
Przeprowadzono badania adsorpcji CCh na przygotowanej dwuwarstwie lipidowej (Rys.II.32,33). Badania pokazują, że CCh nie zaburza ciągłości modelowej błony komórkowej. Początkowo obserwowano nieznaczną szorstkość (Rys.II.34.) po czym po upływie 2h układ dwuwarstwa lipidowa/CCh wykazywał jednorodną topografię (Rys.II.35.). Przeprowadzone wcześniej badania pokazują, że CCh silnie oddziałuje z lipidami³⁰. Można więc wysunąć hipotezę, że CCh „scala” dwuwarstwę lipidową. W przypadku enkapsulacji bioobjektów może pełnić więc dodatkowe funkcje ochronne i zabezpieczające komórki.



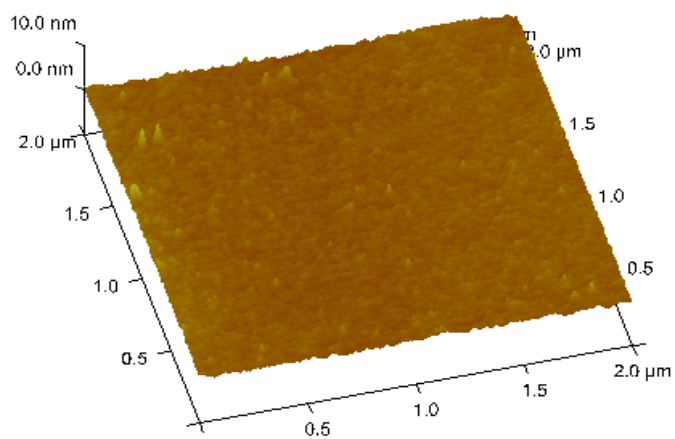
Rys. II.32. Dwuwarstwa lipidowa zaadsorbowana na powierzchni miki.



Rys. II.33. Dwuwarstwa lipidowa z DMPC w 0,1 M NaCl.



Rys. II.34. Dwuwarstwa lipidowa DMPC z zaadsorbowanym CCh (1g/litr w 0,1 M NaCl) po 20 min.



Rys. II.35. Dwuwarstwa lipidowa DMPC z zaadsorbowanym CCh (1g/litr w 0,1 M NaCl) po 120 min.

II.5. Badanie wpływu kationowego chitozanu na model błony komórkowej-pomiary elipsometryczne.

Badania elipsometryczne miały na celu sprawdzenie grubości powstającego na modelowej błonie komórkowej filmu polielektrolitowego. Grubość adsorbowanego na błonie komórkowej filmu jest istotna ze względu na przepuszczalność struktury. Do pomiarów elipsometrycznych wykorzystano model błony komórkowej przygotowany w sposób opisany w punkcie II.4. Błone lipidową przygotowano na płytce krzemowej. Adsorpcję CCh oraz ACh na modelu błony komórkowej przeprowadzono również w sposób opisany powyżej, przy czym po adsorpcji CCh błonę lipidową przemyto z nadmiaru niezaadsorbowanego polimeru 0,1 M NaCl i w sposób analogiczny zaadsorbowano ACh. Przeprowadzono pomiar grubości filmów polimerowych na powierzchni dwuwarstwy lipidowej po 30 min adsorpcji. Pomiar przeprowadzono w celce do pomiarów w cieczy przy zadanej wartości kąta 70° w granicach długości fali 246-700 nm.

Pomiary elipsometryczne potwierdziły odczytaną z pomiarów AFM grubość dwuwarstwy lipidowej. Pokazały też, że grubość zaadsorbowanego polimeru na powierzchni dwuwarstwy lipidowej wynosi ok. 1 nm (Tab.II.6).

Tab.II.6. Badania elipsometryczne dwuwarstwy lipidowej z zaadsorbowanymi CCh oraz ACh.

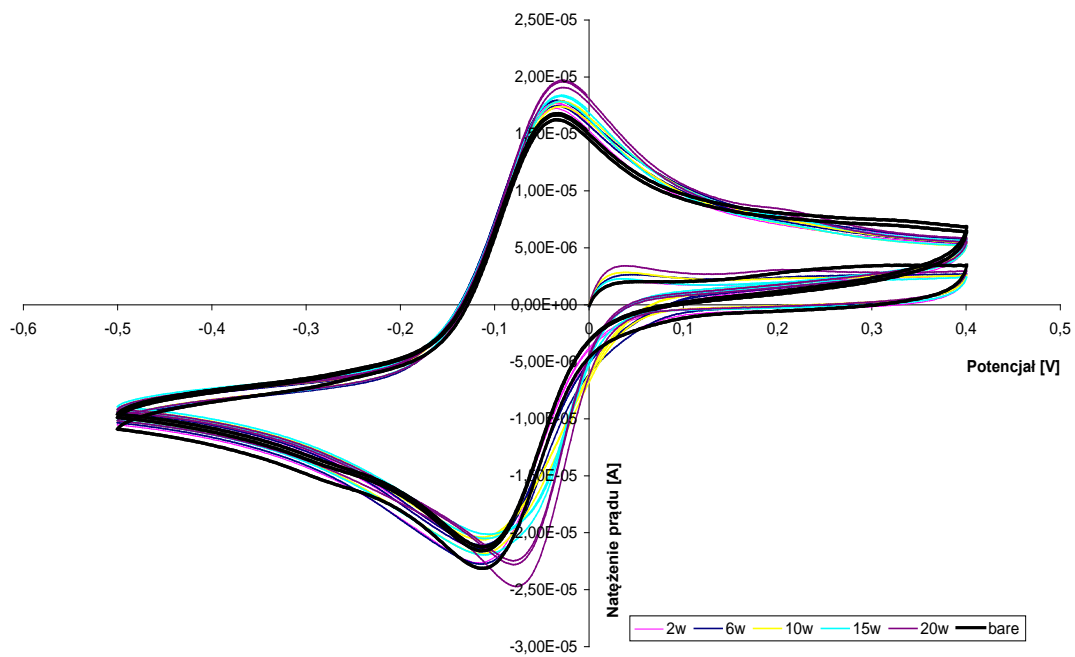
		Grubość	Model	Parametry optyczne
Substrat	Si	-	Si_JAW	Zadane przez model
Warstwa 1	SiO₂	2.88 +/- 0.21 nm	SiO2_JAW	Zadane przez model
Warstwa 2	DMPC	3.17 +/- 0.30 nm	B-Spline	n=1.5, k=0,
Warstwa 3	CCh	1.03+/-0.30 nm	B-Spline	n=1.5, k=0,
Warstwa 4	ACh	1.00+/-0.27 nm	B-Spline	n=1.5, k=0,

Badania elipsometryczne pokazały, że możliwa jest adsorpcja polielektrolitów na modelu błony komórkowej. Grubość adsorbowanego filmu (1 warstwa) wynosi ok. 1 nm, stąd najprawdopodobniej grubość adsorbowanego filmu na powierzchni żywych komórek wynosić będzie również ok. 1 nm.

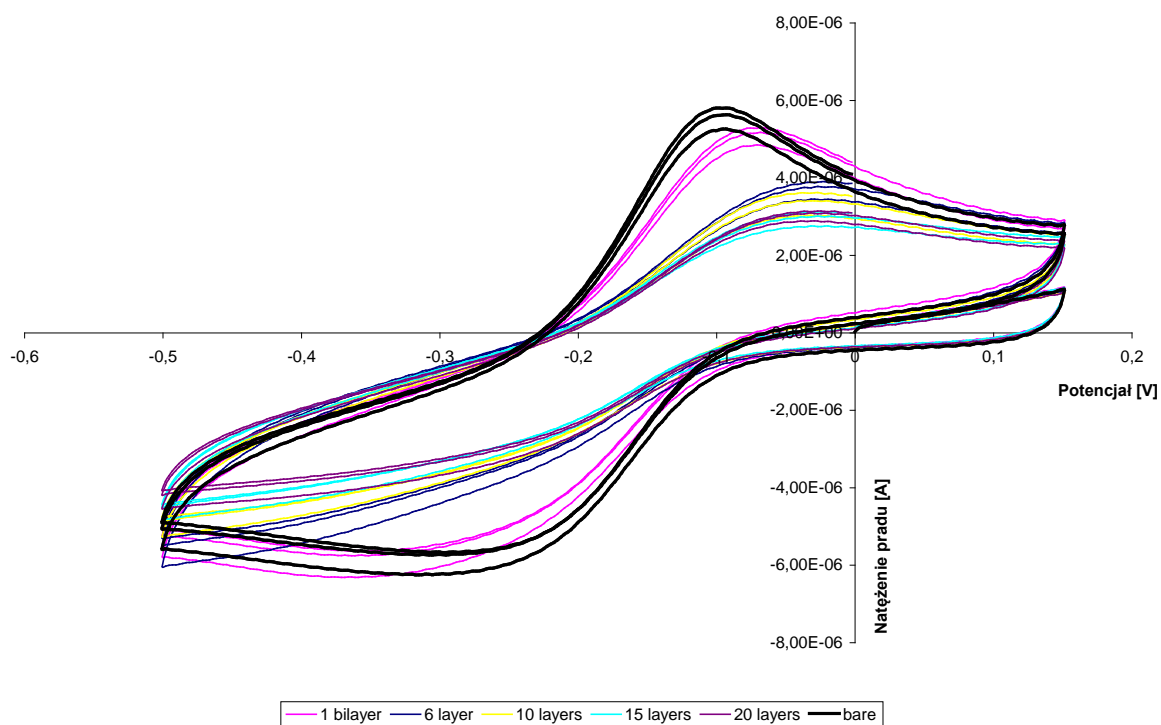
II.6. Badanie przepuszczalności filmów CCh/ACh przy użyciu woltamperometrii cyklicznej.

Przepuszczalność ultracienkich filmów polielektrolitowych jest istotna w enkapsulacji żywych bioobiektów. Nanostrukturalne płaszcze powinny wykazywać się selektywną przepuszczalnością. Przez ultracienkie filmy polimerowe nie powinny dyfundować większe cząsteczki, np. białka odpowiedzi immunologicznej, ale jednocześnie transport mniejszych substancji, np. substancji odżywczych, metabolitów, nie powinien być zakłócony. Badania woltamperometryczne przeprowadzono dla dwóch czynników depolaryzacyjnych, różniących się masą cząsteczkową. Badania zostały przeprowadzone przy użyciu pracującej elektrody dyskowej pokrytej złotem zaopatrzonej w potencjostat. Elektroda odniesienia była elektroda chlorosrebrowa. Pomiar został przeprowadzony w 0,15 M NaCl elektrolicie podstawowym a roztwór przed pomiarem w celu odtlenienia przedmuchano argonem. Stężenie czynnika depolaryzacyjnego (naftochinon, porfiryne) wynosiło 1g/litr.

Pomiary woltamperometrii cyklicznej wykazały, że małe cząsteczki, tj. naftochinon przenikają przez wszystkie zaadsorbowane warstwy CCh/ACh. Ultracienki film polimerowy nie stanowi przeszkody w przenikaniu małych cząsteczek, wraz ze wzrostem ilości biwarstw nie obserwowano spadku natężenia przepływającego prądu (Rys.II.36.). Z kolei duża oraz sferyczna cząsteczka porfiryne jest zatrzymywana przez film CCh/ACh o grubości ok. 10 nm (Rys.II.37.). Informacja ta jest istotna z punktu widzenia zastosowań filmów chitozanowych w procesie enkapsulacji żywych komórek oraz tkanek. Selektywna przepuszczalność nanopłaszczy pozwala na swobodną wymianę gazową oraz przepływ substancji odżywczych oraz produktów przemiany materii, podczas gdy większe cząsteczki, np. białka odpowiedzi immunologicznej nie przenikają przez nanopłaszczy.



Rys. II.36. Woltamperometria cykliczna przeprowadzona dla naftochinonu.

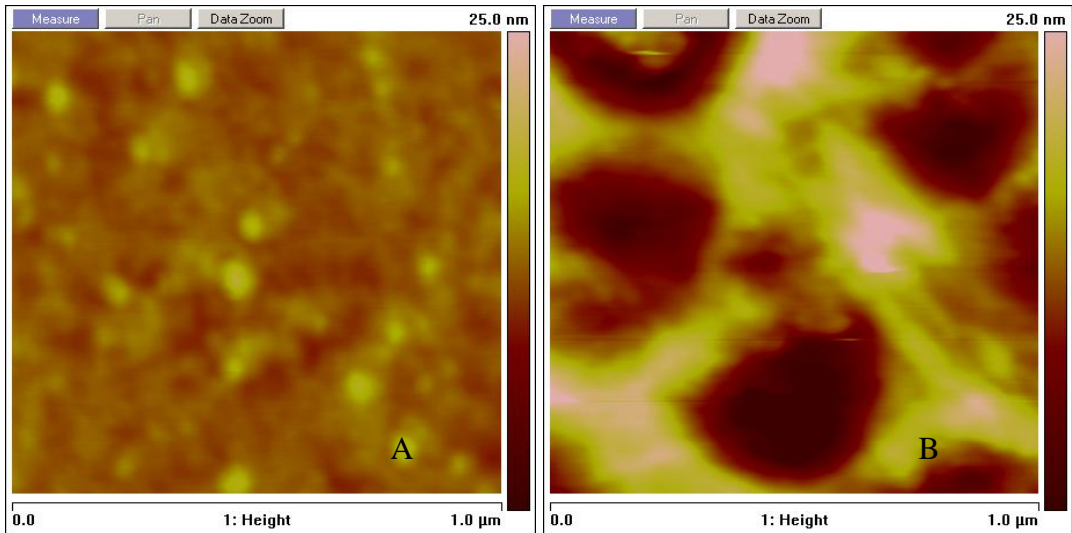


Rys. II.37. Woltamperometria cykliczna przeprowadzona dla porfiryny.

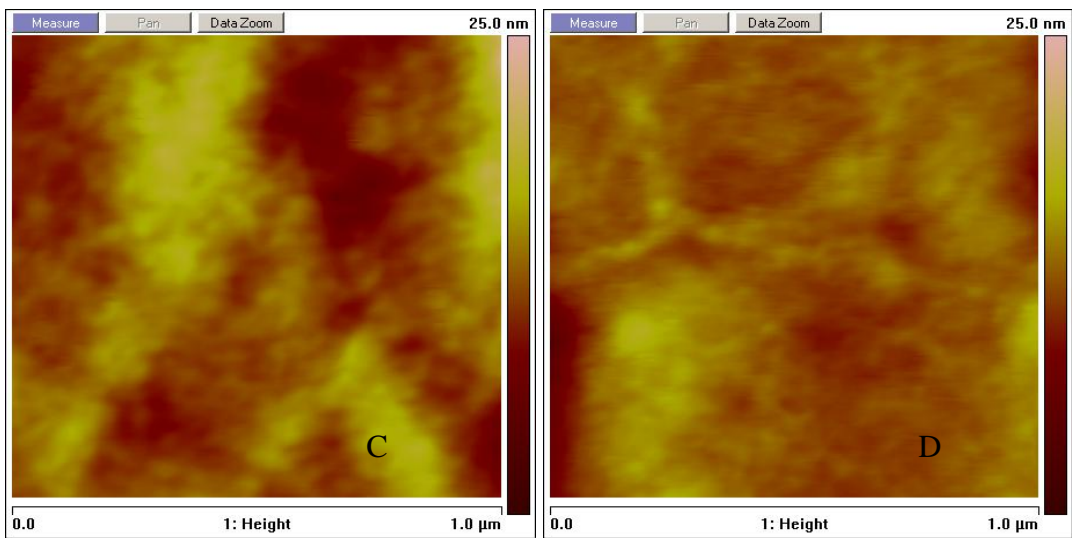
II.7. Badanie wpływu środowiska do hodowli komórek na trwałość filmów CCh/ACh.

Podłoże do hodowli komórek ludzkich (RPMI z 10% dodatkiem surowicy płodowej) składa się z szeregu komponentów (soli nieorganicznych, aminokwasów, witamin, glukozy, antybiotyków itp.) potrzebnych do prawidłowego wzrostu komórek. Eksperyment miał na celu sprawdzenie ewentualnych interakcji środowiska hodowlanego z filmami CCh/ACh w warunkach hodowli komórek. Filmy CCh/ACh przygotowano na płytkach krzemowych. Następnie płytki z zaadsorbowanym filmem chitozanowym zanurzono w roztworze przeznaczonym do hodowli komórkowej (RPMI) i przechowywano w warunkach hodowlanych (37⁰C) przez 12h i 84h. Do pomiarów AFM filmy przepłukano wodą oraz wysuszono w strumieniu azotu.

Otrzymane wyniki pokazują, że jedna biwarstwa zaadsorbowanego filmu wykazuje trwałość po 12h symulowanej hodowli, lecz po 84h ciągłość filmu zostaje przzerwana (Rys.II.38.). Zwiększenie ilości zaadsorbowanego materiału w obu przypadkach (po 12h oraz 84h) nie wpłynęło dramatycznie na ciągłość zaadsorbowanego filmu polimerowego (Rys.II.39).



Rys. II.38.1 biwarstwa CCh/ACh po 12h przechowywaniu w RPMI (37⁰C).

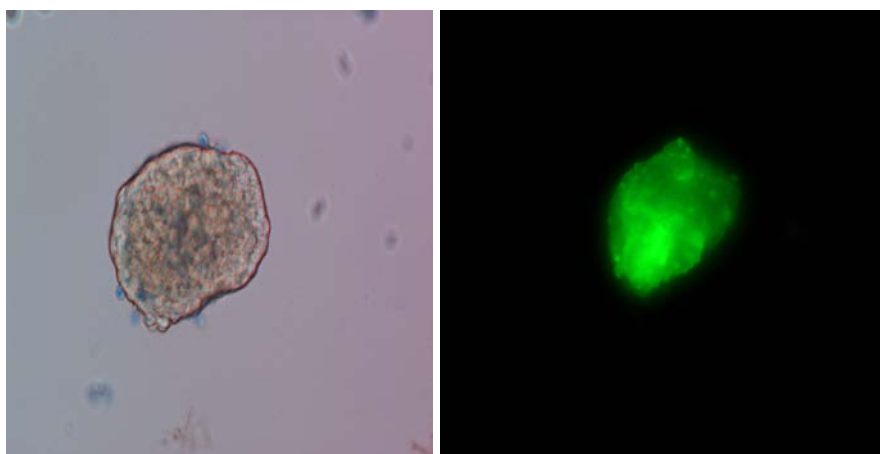


Rys. II.39.10 biwarstw CCh/ACh po 84h przechowywaniu w RPMI (37⁰C).

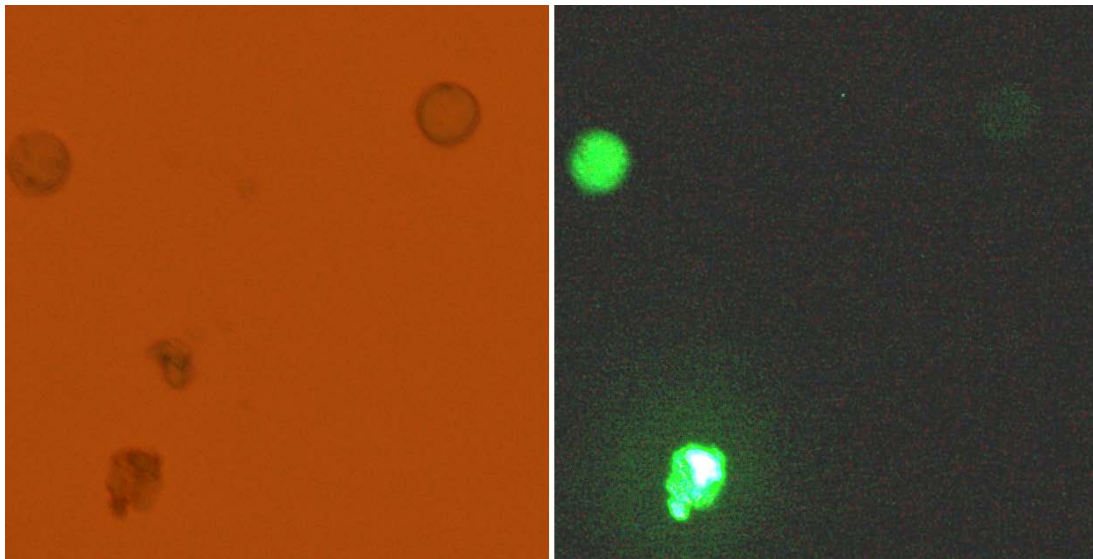
III. Ultracienkie filmy polimerowe do opłaszczania żywych bioobjektów.

III.1. Enkapsulacja żywych bioobjektów.

Ultracienki płaszcz polimerowy zaadsorbowany na powierzchni komórki/tkanki może spełniać funkcje ochronne, np. w przypadku konieczności przechowywania bioobjektów w obniżonej temperaturze czy też jako selektywna powłoka immunoizolacyjna. Ze wszystkich stosowanych obecnie metod enkapsulacji bioobjektów ze względu na niewielką ilość zaadsorbowanego materiału metoda tworzenia multiwarstwowych filmów polimerowych wydaje się najbardziej efektywna. Adsorpcję nanopłaszczki na powierzchni bioobjektów prowadzono w następujący sposób. Żywe komórki (HL-60) oraz tkanki (wysepki Langerhansa) pokrywano polimerami (PAH, PMMA-PR, 0,1 g/litr w 0,1 M NaCl) oraz CCh, ACh, CCh-FITC (1g/litr w 0,1 M NaCl). Po każdym etapie adsorpcji polimeru odwirowywano jego nadmiar stosując delikatne parametry wirowania oraz przepłukiwano komórki 0,1M NaCl. Adsorpcję filmu CCh/ACh na powierzchni komórek HL-60 przeprowadzono w sposób analogiczny jak dla wysp Langerhansa. Opłaszczony filmem CCh/ACh komórki hodowano w RPMI z 10% zawartością surowicy płodowej w 37⁰C w 5% CO₂. Zdjęcia (Rys.II.40.) pokazują żywą szczurzą wyspę Langerhansa pokrytą 1 biwarstwą PAH/PMMA-PR. Obraz fluorescencyjny potwierdza, że zaadsorbowany polimer dokładnie pokrywa powierzchnię komórek. Wykonano również zdjęcia pod mikroskopem fluorescencyjnym opłaszczonych CCh-FITC komórek HL-60 (Rys.II.41.). Wyniki przedstawiono poniżej.

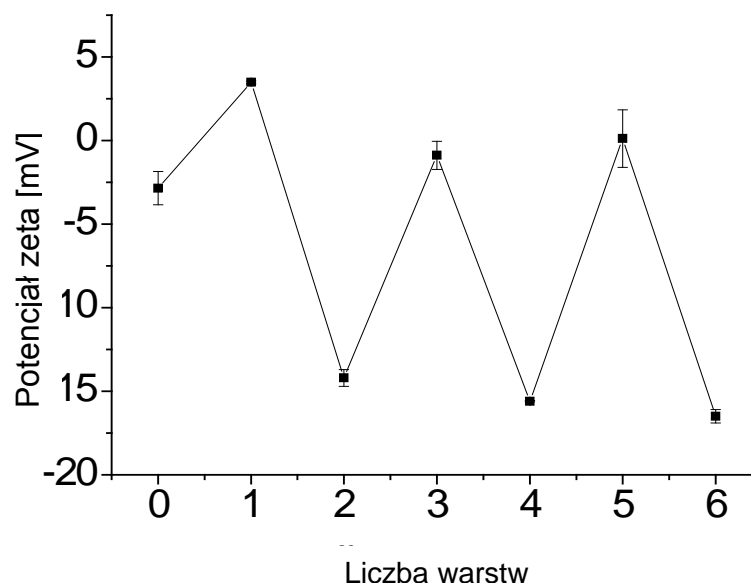


Rys. II.40. Wyspa Langerhansa szczurza pokryta 1 biwarstwą PAH/PMMA-PR (200x) w świetle przechodzącym (A), mikroskopia fluorescencyjna (B).



Rys. II.41. Komórki HL-60. Zdjęcie wykonane w mikroskopie optycznym oraz fluorescencyjnym. Powiększenie 500x.

Badania potencjału zeta przeprowadzone po adsorpcji każdej warstwy udowodniły zachodzący proces adsorpcji na powierzchni komórek (Rys.II.42.). Żywe komórki HL-60 pokrywano polimerami CCh/ACh (1g/litr w 0,1 M NaCl). Po każdym etapie adsorpcji polimeru odwirowywano jego nadmiar stosując delikatne parametry wirowania oraz przepłukiwano komórki 0,1M NaCl. Pomiar potencjału zeta prowadzono po adsorpcji każdej warstwy na powierzchni komórki. Potencjał zmieniał się po każdej zaadsorbowanej warstwie, co dowodzi zachodzącej adsorpcji polimeru na powierzchni komórek.



Rys. II.42. Zmiany potencjału zeta powierzchni komórek HL-60 po adsorpcji warstw CCh/ACh.

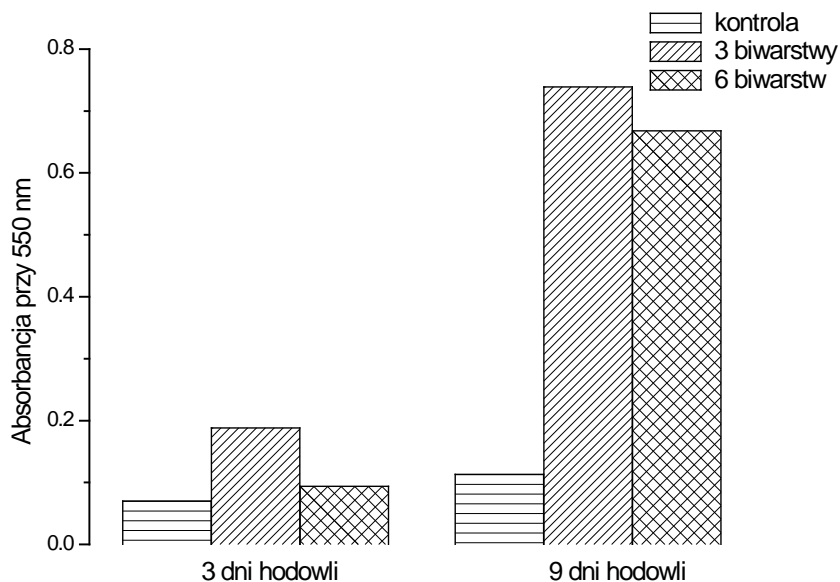
Z kolei żywotność opłaszczonych komórek sprawdzano testem MTT. Zabezpieczone filmem CCh/ACh komórki przechowywano również przez 24h w obniżonej temperaturze 4⁰C po czym hodowano w RPMI w 37⁰C w 5% CO₂ przez 24h i sprawdzono ich żywotność testem MTT. Test MTT prowadzony był każdorazowo również dla próby kontrolnej, niezabezpieczonej filmem CCh/ACh.

Test na aktywność reduktazy mitochondrialnej (MTT) dla komórek HL-60 pokrytych nanopłaszczem chitozanowym pokazuje, że film chitozanowy nie jest wobec komórek toksyczny. Proliferacja komórek również nie jest zahamowana; zaobserwowano znaczny wzrost ilości komórek pokrytych nanopłaszczem w porównaniu z próbą kontrolną po 9 dniach hodowli (Rys.II.43.). Uzyskane wyniki oznaczają, że film CCh/ACh jest półprzepuszczalną, całkowicie kompatybilną z komórkami nanomembraną oraz najprawdopodobniej nie blokuje ich podstawowych funkcji życiowych. W celu wykluczenia addytywnego wkładu samego chitozanu w absorbcję (w teście MTT), przeprowadzono również próbę ślepą, która wykazała maksymalnie ok. 10% wkład.

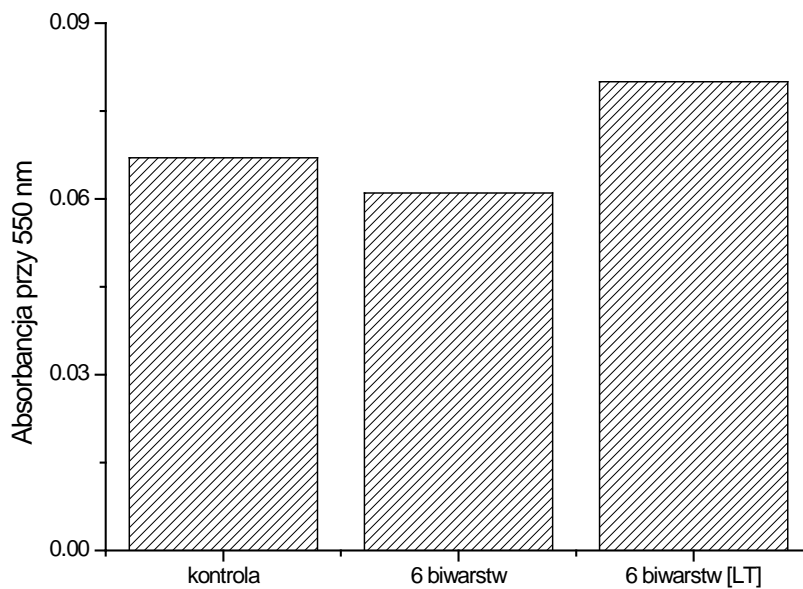
Bardzo obiecujące wydają się natomiast wyniki testu MTT przeprowadzonego dla komórek HL-60 po 24h przechowywaniu w obniżonej temperaturze. Sześć biwarstw filmu

CCh/ACh stanowiło wystarczającą ochronę komórek podczas przechowywania w 4⁰C. (Rys.II.44.).

Dla komórek nie pokrytych filmem chitozanowym po 24h przechowywaniu w obniżonej temperaturze nastąpiła całkowita nekroza.



Rys. II.43. Pomiary żywotności/prolifracji komórek HL-60 pokrytych filmem CCh/ACh.



Rys. II.44. Test przeżywalności komórek HL-60 opłaszczonych CCh/ACh po 24 przechowywaniu w obniżonej temperaturze 4⁰C [LT].

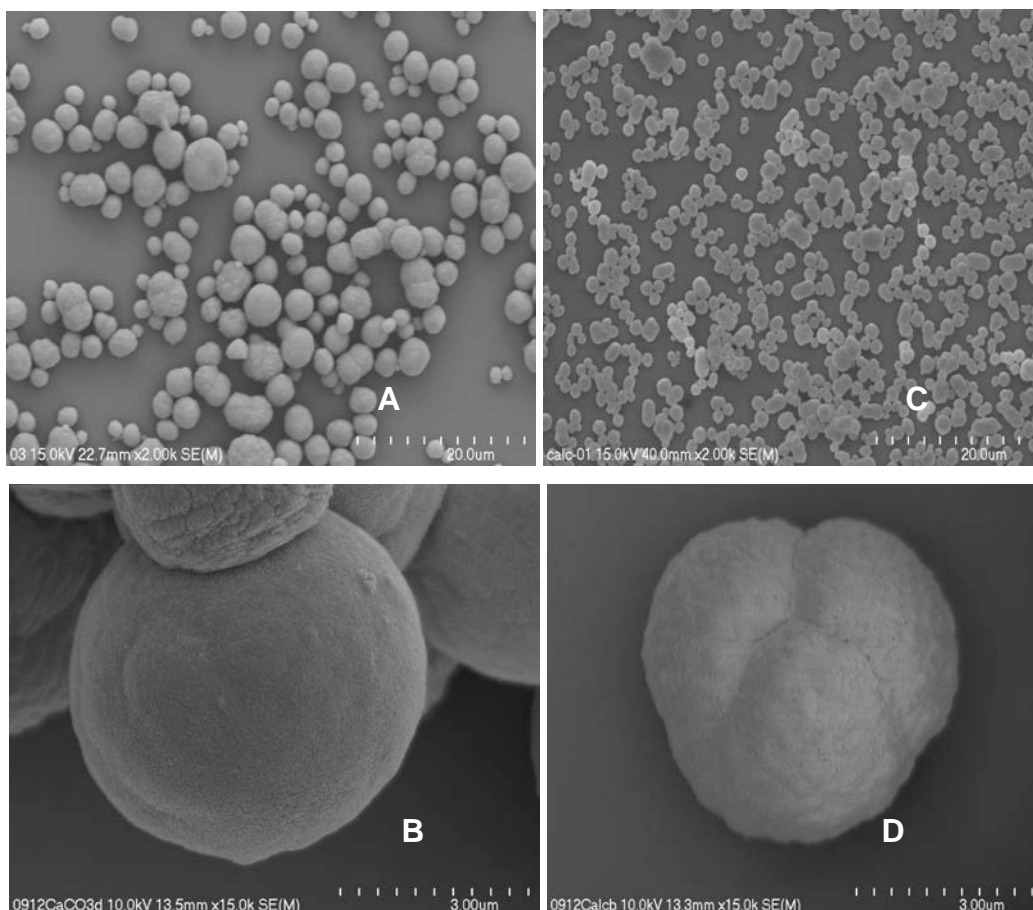
IV. Mikrocząstki do kontrolowanego uwalniania.

Jednym z kolejnych etapów pracy było wytworzenie mikrocząstek, które mogłyby znaleźć zastosowania w procesie kontrolowanego uwalniania. Skupiono się na wytworzeniu biokompatybilnych mikrocząstek, zbudowanych z nietoksycznych dla organizmu żywego materiałów. Priorytetem było opracowanie taniej i szybkiej metodologii otrzymywania takich struktur, przez co mogłyby one stać się konkurencyjne dla innych opisywanych w literaturze mikrocząstek, zbudowanych np. z syntetycznych polimerów, czy też takich mikrocząstek, których wytwarzanie na szerszą skalę mogłoby być nieopłacalne, z uwagi na koszty syntezy. Opisany poniżej sposób wytwarzania mikrocząstek polega na jednoetapowym strącaniu wszystkich składników mikrocząstki, włącznie z substancją mającą się później uwolnić. Może to być zarówno substancja nisko jak i wysokocząsteczkowa. Cały proces odbywa się w środowisku wodnym, stąd jest również nieszkodliwy dla środowiska naturalnego.

IV.1. Synteza mikrocząstek do kontrolowanego uwalniania.

Mikrokapsuły syntezowano poprzez strącanie węglanu wapnia w reakcji dwóch nieorganicznych soli $\text{Na}_2(\text{CO}_3)$ oraz $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (oba roztwory 50 ml 0,025 M) w obecności 3,3 ml 1,25% O,N-karboksymetylochitozanu (w przypadku kapsuł z kalceiną jej stężenie wynosiło 1,12 M w stosunku do wszystkich składników, kalceina została rozpuszczona w $\text{Na}_2(\text{CO}_3)$); dla kapsuł z substancją wielkocząsteczkową- białkiem BSA-FITC, postępowano analogicznie jak w przypadku kapsuł z kalceiną) w 40°C przez 5 min pod wpływem ultradźwięków. Produkt syntezy został następnie odwirowany przy 4000 obrotów/minutę przez 5 min. Kolejno mikrocząstki zostały trzykrotnie przemyte wodą, a jej nadmiar usuwano każdorazowo odwirowując ją przy zadanych warunkach. Przeprowadzono charakterystykę fizykochemiczną uzyskanego materiału (obserwacja mikroskopowa, SEM, pomiary termogravimetryczne, XRD).

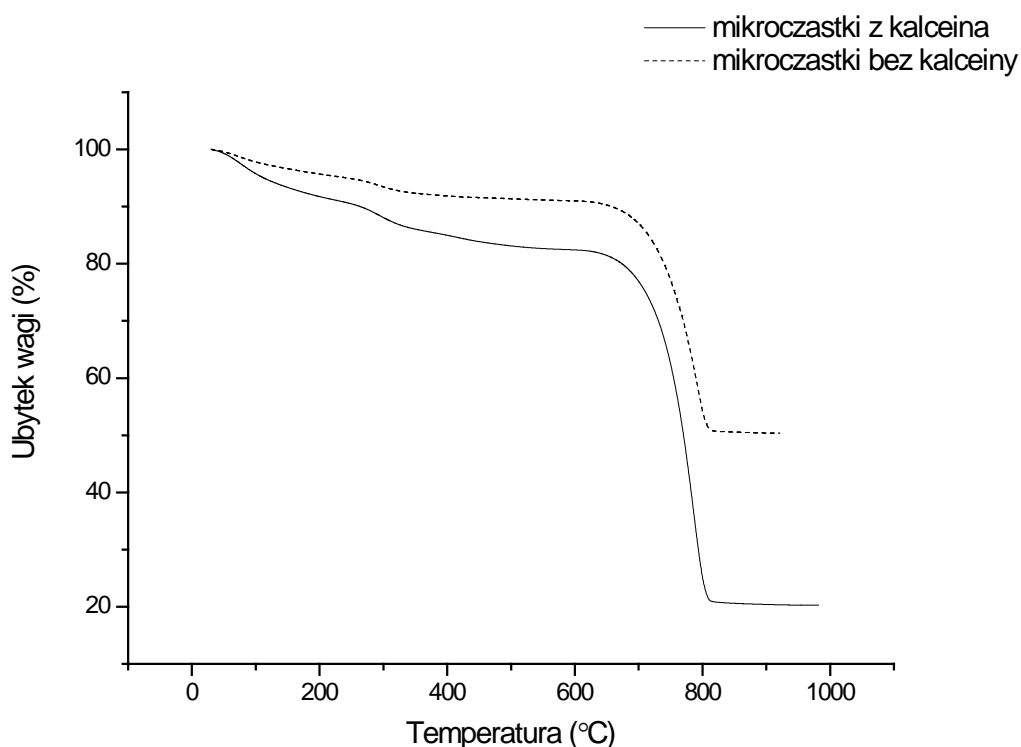
Zsyntezowany materiał został zobrazowany przy użyciu mikroskopii elektronowej (SEM). Otrzymane mikrocząstki są sferyczne (Rys.II.45). Charakterystykę mikrocząstek węglanowych przedstawiono w tabeli poniżej (Tab.II.7.) Poniżej umieszczono również wykres z analizy termogravimetrycznej (Rys.II.46.) oraz wyniki z analizy krystalograficznej (Rys.II.47.).



Rys. II.45. Obraz SEM mikrocząstek z węglańu wapnia.

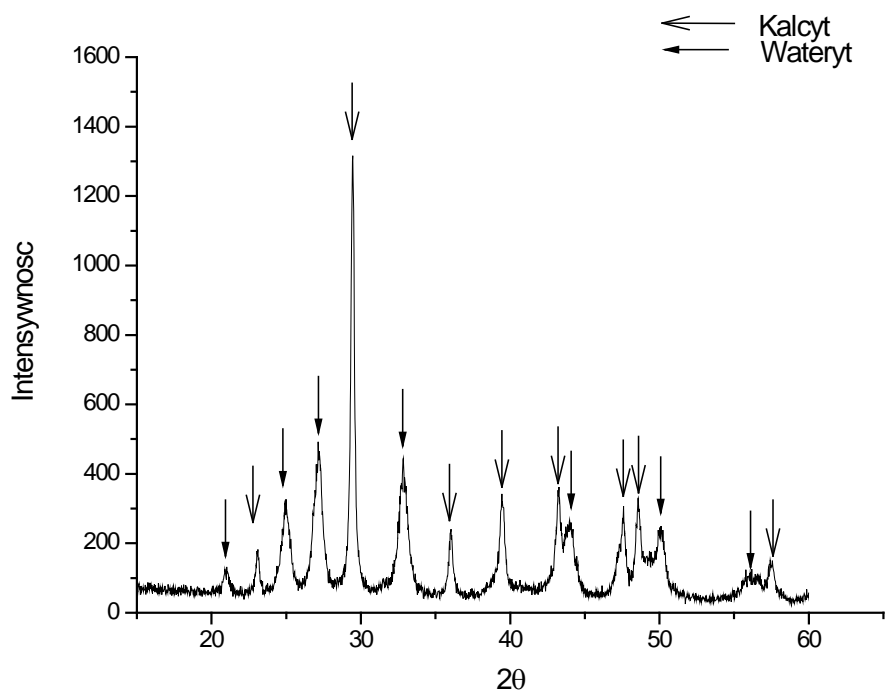
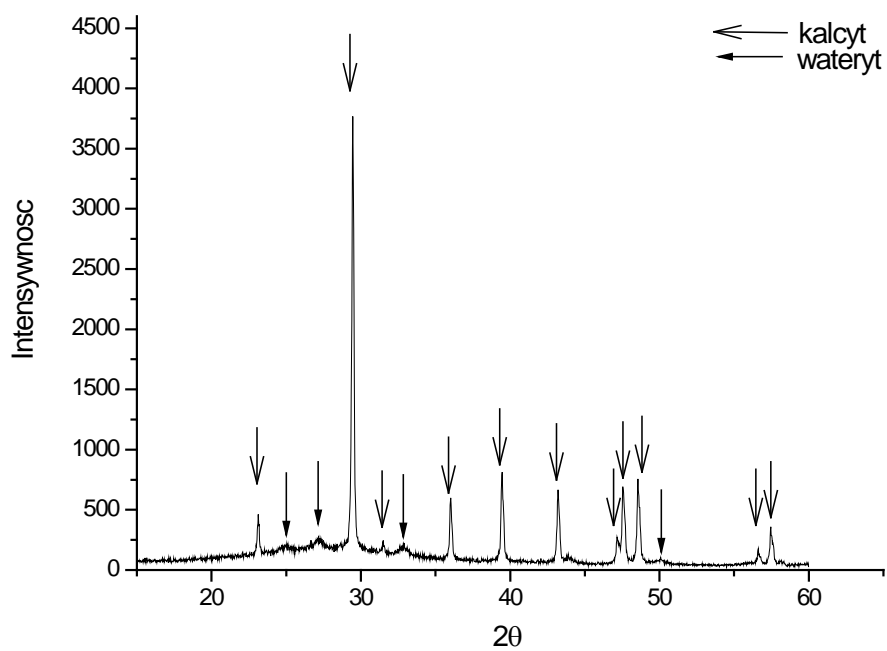
Tab.II.7. Charakterystyka fizykochemiczna mikrocząstek węglanowych.

Charakterystyka rdzeni mikrocząstek.	
Bez kalceiny	Z kalceiną
<i>Wielkość (mierzona przy pomocy mikroskopii optycznej)</i>	
3 um	2,5 um
<i>Zawartość substancji organiczej (TGA)</i>	
10%	17%
<i>Zawartość kalceiny (badania fluorescencyjne)</i>	
-	0,7%
<i>Analiza krystalograficzna</i>	
Kalcyt + wateryt (niewiele)	Kalcyt + wateryt (50%)



Rys. II.46. Analiza termogravimetryczna mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających kalceinę i bez kalceiny.

Analiza termogravimetryczna mikrocząstek zbudowanych z czystego węglanu wapnia wykazuje ubytek masy w zakresie temperatury 50-520°C rzędu <1,5%¹⁰⁵. W tym samym zakresie temperatury straty dla mikrocząstek zawierających O,N-karboksymetylochitozan wynosiły 10%, z kolei dla mikrocząstek zawierających kalceinę procentowy ubytek masy wynosił 17,11%. Wynika z tego, że materia organiczna lokuje się wewnątrz mikrocząstki z węglanu wapnia. W przypadku mikrocząstki zawierającej kalceinę ilość materii organicznej wewnątrz mikrocząstki jest większa. Prawdopodobnie dlatego mikrocząstki z kalceiną są bardziej homogeniczne oraz mniejsze.



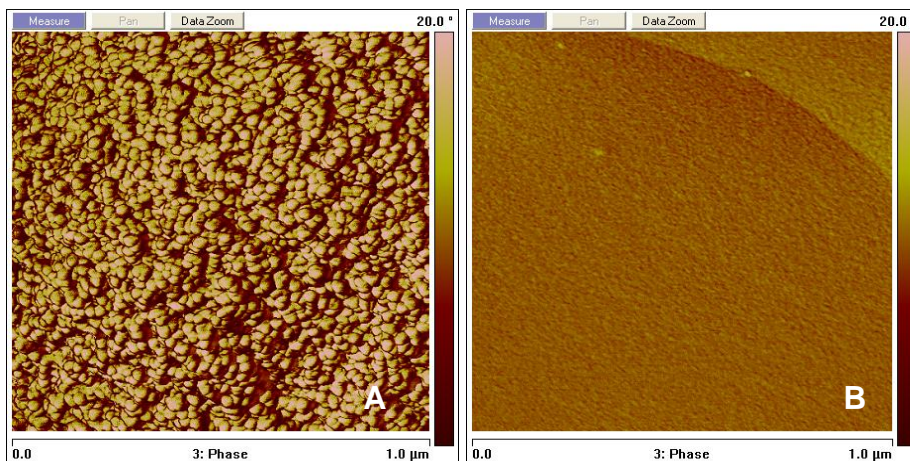
Rys. II.47. Analiza krystalograficzna mikrocząstek bez kalceiny (rysunek górny) oraz z kalceiną (rysunek dolny).

Analiza XRD mikrocząstek pokazuje, że nieznaczny dodatek substancji organicznej powoduje znaczą zmianę struktury krystalograficznej. Zwiększenie ilości materii organicznej powoduje krystalizację węgla wapnia w kulistą, mniej trwałą termodynamicznie strukturę waterytu.

IV.2. Adsorpcja filmów CCh/ACh na powierzchni mikrocząstek.

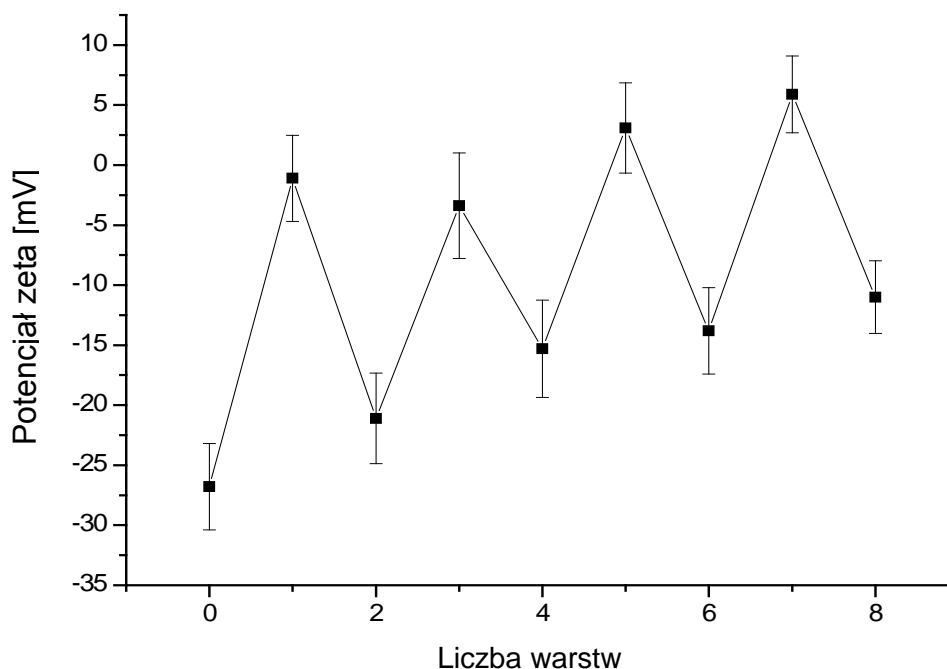
Na powierzchni mikrocząstek z węgla wapnia zaadsorbowano ultracienki film polimerowy z CCh/ACh techniką LbL. Adsorpcja ultracienkiego płaszcza z polimerów na powierzchni mikrocząstek umożliwiła kontrolę uwalniania substancji zamkniętej wewnątrz mikrocząstki, gdyż wraz ze wzrostem ilości zaadsorbowanych warstw CCh/ACh wzrastał również czas, w którym następowało uwalnianie zamkniętej wewnątrz mikrocząstki substancji. Polielektrolity zaadsorbowano na powierzchni mikrokapsuł używając techniki warstwa po warstwie. Do oczyszczonej zawiesiny mikrokapsuł dodano 1ml roztworu CCh (1g/litr w 0,1 M NaCl). Adsorpcję prowadzono przez 15 min, następnie nadmiar polimeru odwirowano (4000 obrotów/minutę przez 5 min), zawiesinę przepłukano wodą dejonizowaną odwirowując jej nadmiar. Kolejno mikrokapsuły zanurzono w roztworze ACh (1g/litr w 0,1 M NaCl) powtarzając dalsze etapy adsorpcji jak w przypadku CCh. Adsorpcję prowadzono otrzymując kolejno 2,4,6 oraz 8 warstwowe kapsuły. Proces adsorpcji monitorowano badając topografię przy użyciu AFM oraz potencjał zeta po każdej zaadsorbowanej warstwie. Potencjał zeta badano w 0,001M NaCl przeprowadzając trzy pomiary dla każdej próbki.

Monitorowanie procesu adsorpcji filmów polielektrolitowych na powierzchni mikrocząstek przeprowadzono badając topografię ich powierzchni bez oraz z zaadsorbowanym filmem polimerowym wykorzystując AFM. Zmiany w topografii fragmentu powierzchni mikrocząstek niepokrytych oraz pokrytych polimerem przedstawiono na Rys.II.48.



Rys. II.48. Powierzchnia mikrocząstki niepokrytej filmem polimerowym (A) oraz pokrytej filmem polimerowym 3 biwarstw CCh/ACh (B). Obrazy fazowe.

Analiza fazowa powierzchni mikrocząstek wykazała różnicę pomiędzy powierzchnią mikrocząstek niepokrytą i pokrytą ultracienkim filmem polimerowym (Rys. II.48). Na Rys. II.48 A widać wyraźną strukturę krystaliczną węglanu wapnia (kuliste kryształy waterytu). Z kolei powierzchnia mikrocząstki niepokrytej cienkim polimerowym filmem wykazuje odmienną topografię (Rys. II.48. B); kryształy waterytu nie są widoczne. Stąd pomiary AFM potwierdzają adsorpcję CCh/ACh na powierzchni mikrocząstek. Występuje również wyraźna różnica w pomiarach RMS. Dla próbki A RMS=51 nm, dla próbki B RMS= 4 nm. Różnica w RMS potwierdza także adsorpcję polimeru na powierzchni mikrocząstki. Dodatkowo przeprowadzono pomiary potencjału zeta (Rys.II.49.) po każdej zaadsorbowanej warstwie. Początkowy potencjał zeta mikrokapsuł wynosił $-26,0 \text{ mV} \pm 0,3 \text{ mV}$. Zaobserwowano wyraźne skokowe zmiany potencjału zeta. Nie następowało jednak całkowite „odwrócenie” ładunku po każdej zaadsorbowanej warstwie polimeru najprawdopodobniej ze względu na wpływ podłoża (mikrocząstki).



Rys. II.49. Zmiany potencjału zeta mierzone każdorazowo po adsorpcji polimeru.

Przeprowadzone pomiary AFM oraz potencjału zeta dowodzą, że na powierzchni mikrocząstek dochodzi do adsorpcji filmów polimerowych.

IV.3. Kontrolowane uwalnianie kalceiny z mikrocząstek.

Przeprowadzono badania kontrolowanego uwalniania zamkniętej wewnątrz mikrocząstki substancji modelowej (kalceiny). Uwalnianie kalceiny z mikrocząstek przeprowadzono do wody oraz do roztworu o pH=3,5 i pH=10,3. Wyjściową zawiesinę mikrocząstek w wodzie dejonizowanej (uzyskane z syntezy przeprowadzonej zgodnie z punktem IV.1) zagęszczono do 2 ml a następnie, już w standardowej kuwecie do pomiarów fluorescencyjnych, rozcieńczono 8-krotnie. Uwalnianie substancji z mikrocząstek monitorowano fluorescencyjnie. Kontrolowane uwalnianie substancji uzyskano dzięki zastosowaniu różnej ilości warstw polimerów zaadsorbowanych na powierzchni mikrocząstek.

Prezentowane w niniejszej pracy podejście do kontrolowanego uwalniania z mikrocząstek węglanowych jest nowatorskie z kilku względów. Po pierwsze proces zamykania substancji przeprowadzono jednoetapowo. Następnie proces uwalniania

zamkniętej substancji odbywał się wprost z mikrocząstki, bez uprzedniego procesu wytrawiania rdzenia. Do kontrolowanego uwalniania zamkniętej wewnątrz substancji zostały użyte mulitiwarstwowe jednoskładnikowe filmy polielektrolitowe z CCh/ACh. Wszystkie zastosowane do produkcji mikrocząstek substancje zaliczane są do biokompatybilnych, stąd wytworzone mikrocząstki spełniają również wymogi biokompatybilności. W przypadku zastosowań przemysłowych mikrocząstek, polimery biokompatybilne mogą zostać zastąpione przez syntetyczne, z uwagi na mniejsze koszty produkcji i mniej restrykcyjne kryteria w porównaniu z zastosowaniami biomedycznymi.

Kinetyka uwalniania kalceiny do wody z mikrocząstek pokrytych 4 i 6 warstwami polimerów nie różniła się od kinetyki uwalniania kalceiny z mikrocząstek niepokrytych warstwami polimerów. Różnice w kinetyce tego procesu zauważono dopiero dla mikrocząstek pokrytych większą liczbą warstw- 8 warstw CCh/ACh (Rys.II.50). Dobierając zatem ilość zaadsorbowanych biwarstw możliwa jest kontrola uwalniania zamkniętej wewnątrz mikrocząsteczek kalceiny.

W środowisku o pH=10,3 (Rys.II.51) zaobserwowano, że kinetyka uwalniania kalceiny dla każdego z rozważanych przypadków- mikrocząstki niepokryte CCh/ACh, pokryte 4, 6 i 8 warstwami CCh/ACh różni się. Zaobserwowano również, że zwiększenie liczby zaadsorbowanych biwarstw skutecznie wydłużało czas potrzebny do uzyskania plateau. Z kolei badania prowadzone w środowisku kwaśnym o pH=3,5 (Rys.II.52) dają profile uwalniania znacząco różniące się od prezentowanych wcześniej. Przede wszystkim z mikrocząstek niepokrytych polielektrolitami kalceina uwalnia się niemal natychmiast. Z kolei zwiększenie liczby zaadsorbowanych biwarstw modyfikuje proces uwalniania. Początkowo prawdopodobnie dochodzi do uwalniania kalceiny zawartej w filmie polielektrolitowym i na powierzchni mikrocząstek, później w wyniku dalszego rozpuszczania mikrocząstki dochodzi do stopniowego uwolnienia kalceiny zawartej wewnątrz mikrocząstki.

W celu umożliwienia porównania profili uwalniania, znormalizowano je zgodnie z następującą zależnością:

$$I_n=(I_t-I_0)/(I_{max}-I_0) \quad [6]$$

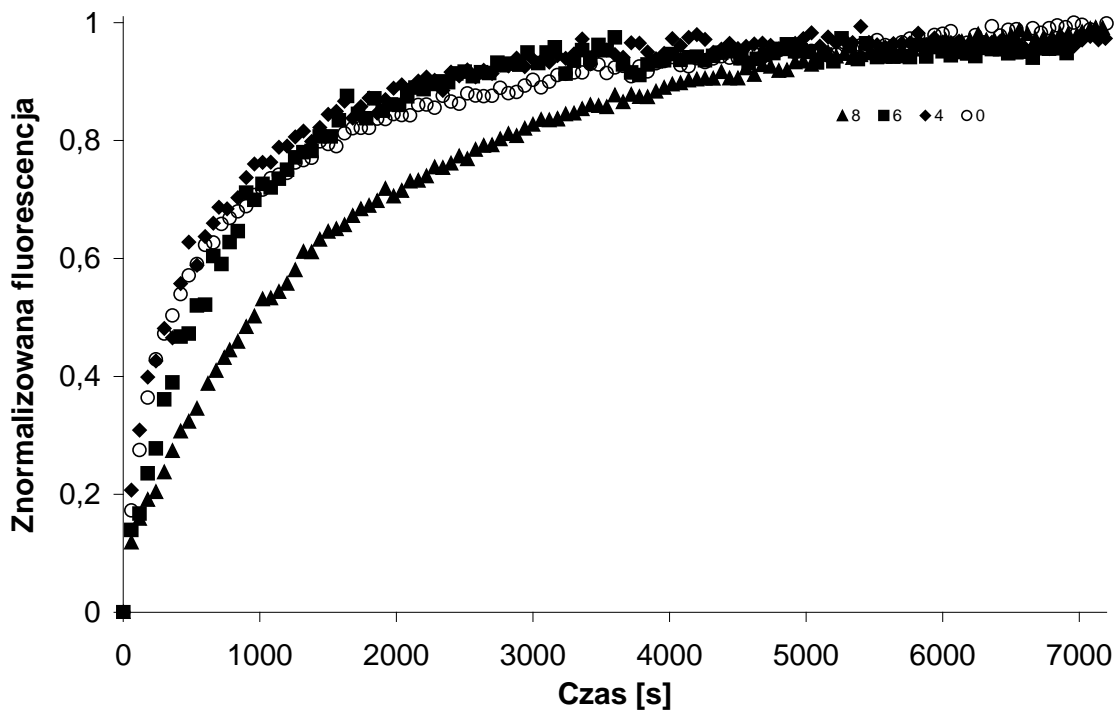
Gdzie:

I_n - fluorescencja normalizowana

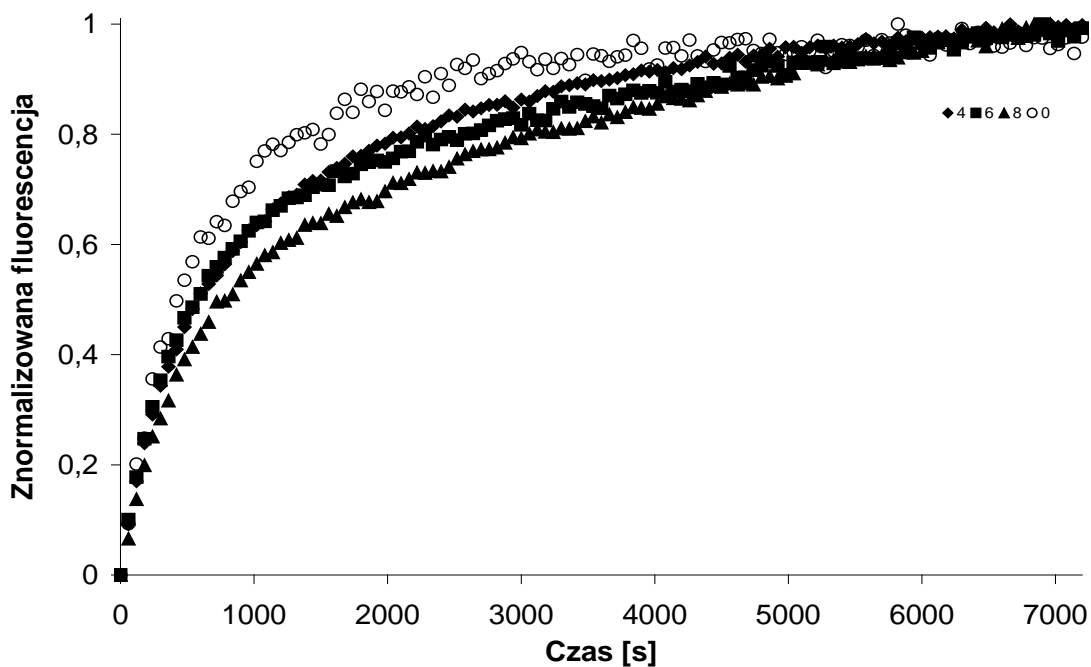
I_t - fluorescencja po czasie t

I_0 - fluorescencja po czasie 0

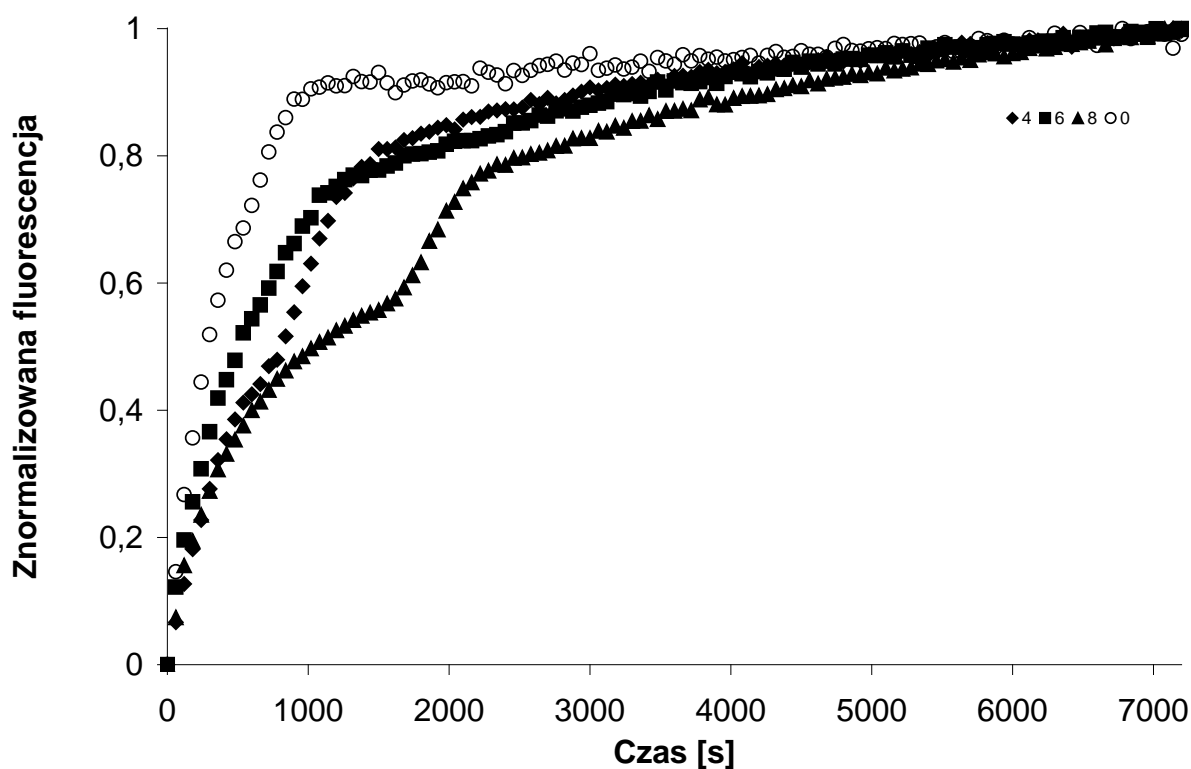
I_{max} - fluorescencja maksymalna



Rys. II.50. Profile uwalniania kalceiny do wody dla mikrocząstek pokrytych 0,4,6,8 warstwami CCh/ACh.



Rys. II.51. Uwalnianie kalceiny z mikrocząstek do roztworu o pH=10,3 dla mikrocząstek pokrytych 0,4,6,8 warstwami CCh/ACh.



Rys. II.52. Uwalnianie kalceiny z mikrocząstek do roztworu o pH=3.5 dla mikrocząstek pokrytych 0,4,6,8 warstwami CCh/ACh.

Profile uwalniania kalceiny z mikrocząstek dowodzą, że kontrolę nad tym procesem można uzyskać poprzez zastosowanie odpowiedniej liczby biwarstw zaadsorbowanych na powierzchni mikrocząstek. Kontrola procesu uwalniania może zostać osiągnięta poprzez zastosowanie roztworu o odpowiednim pH.

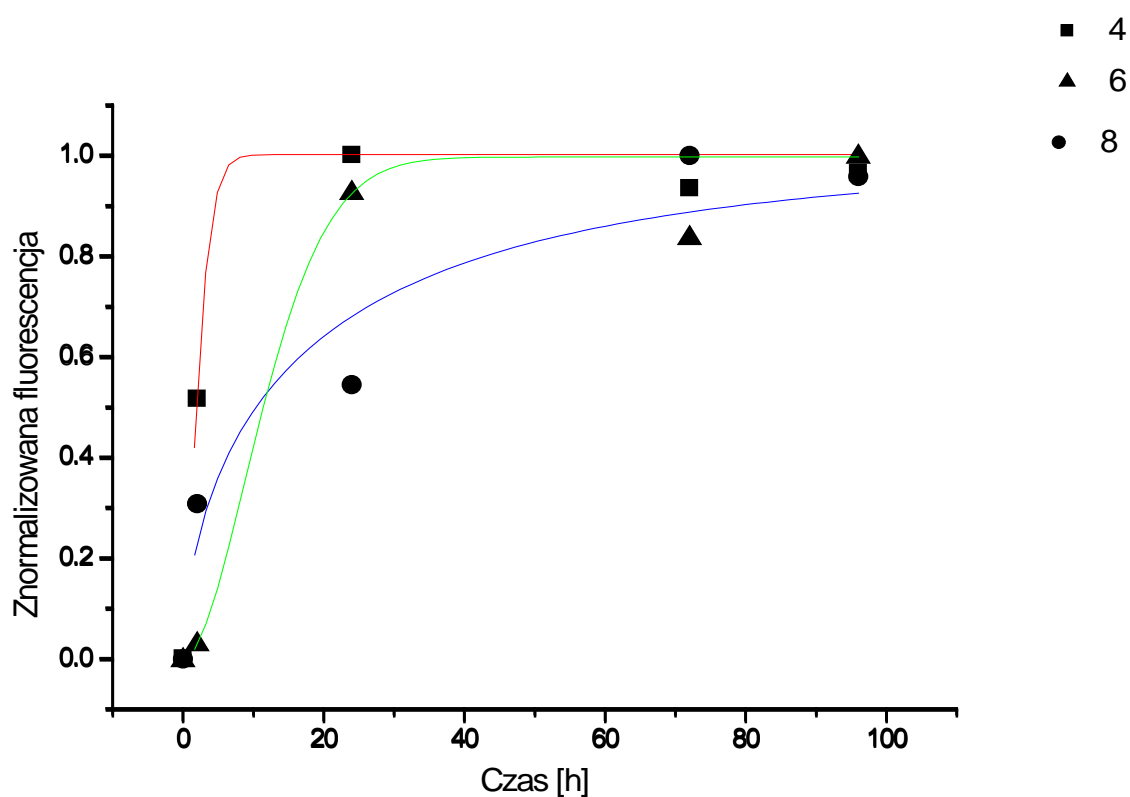
IV.4. Kontrolowane uwalnianie białka BSA-FITC z mikrocząstek.

Badania nad kontrolowanym uwalnianiem substancji wielkocząsteczkowej z mikrocząstki z węgla wapnia zostały przeprowadzone w celu sprawdzenia, czy za pomocą ultracienkich filmów chitozanowych możliwa jest kontrola procesu uwalniania zamkniętej wewnątrz mikrocząstki substancji wielkocząsteczkowej.

Uwalnianie substancji wielkocząsteczkowej z mikrocząstki węglanowej prowadzono przez kilkadziesiąt godzin. Mikrocząstki zawierające BSA-FITC zanurzono w roztworze HCl o pH=3,5 i pozostawiono na wytrząsarce. W określonych odstępach czasu próbki odwirowywano, zbierano supernatant i mierzono w nim zawartość BSA-FITC

fluorescencyjnie. Uwalnianie przeprowadzono w układzie zamkniętym, nie zmieniając roztworu, do którego było przeprowadzanie uwalnianie.

Uwalnianie substancji wielkocząsteczkowej z mikrocząstek węglanowych uzależnione jest również ilością zaadsorbowanych warstw polielektrolitów na powierzchni mikrocząstek. Grubsza powłoka chitozanowa spowalniała proces uwalniania białka (Rys.II.53.). Zaobserwowano również, że dla mikrocząstek nie pokrytych polielektrolitami proces uwalniania białka nastąpił niemal natychmiastowo. Nie zaobserwowano bowiem znaczących zmian we fluorescencji w określonych przez eksperyment przedziałach czasowych.



Rys. II.53. Uwalnianie BSA-FITC z mikrocząstek do HCl o pH=3.5. Profile uwalniania z dopasowanym wykresem funkcji Weibull'a.

IV.5. Mechanizm uwalniania-dopasowanie funkcji.

Znajomość mechanizmu uwalniania zamkniętej wewnątrz mikrocząstki substancji jest istotna z punktu widzenia np. kinetyki uwalniania substancji. Mechanizm uwalniania kalceiny z mikrocząstek analizowano poprzez dopasowanie do profili uwalniania jednej z używanych do tego celu funkcji: funkcji Weibull'a:

$$Y = A - (A - B) \exp(-(kx)^d)$$

Gdzie ¹⁰⁶:

A- Maksimum ilości uwolnionej substancji

B- Minimum ilości uwolnionej substancji

d- stała określająca mechanizm dyfuzji, $d < 0,75$ dyfuzja Ficka, $0,75 < d < 1$ mechanizm złożony, $d = 1$ dyfuzja pierwszego rzędu, $d > 1$ mechanizm złożony

k- stała związana z kinetyką uwalniania

W tabelach Tab. II.8,9,10 poniżej zebrano wyniki dopasowania krzywej Weibull'a do profili uwalniania kalceiny do wody oraz do roztworów o pH=3,5 i pH=10,3.

Tab. II.8. Wyniki dopasowania funkcji Weibull'a do profili uwalniania kalceiny do wody.

Liczba warstw	d	k	R ²
0	0,57	0,00144	0,99
4	0,76	0,00170	0,99
6	0,78	0,00121	0,99
8	0,76	0,00062	0,99

Tab. II.9. Wyniki dopasowania funkcji Weibull'a do profili uwalniania kalceiny do roztworu o pH=10,3

Liczba warstw	d	k	R ²
0	0,74	0,00162	0,99
4	0,63	0,00094	0,99
6	0,53	0,00082	0,98
8	0,59	0,00047	0,99

Tab. II.10. Wyniki dopasowania funkcji Weibull'a do profili uwalniania kalceiny do roztworu o pH=3,5.

Liczba warstw	d	k	R ²
0	0,87	0,00265	0,97
4	0,94	0,00105	0,98
6	0,66	0,00118	0,99
8	0,89	0,00054	0,99

Zaobserwowano, że uwalnianie kalceiny zachodzi zgodnie z mechanizmem Ficka jedynie w przypadku uwalniania do roztworu o pH=10,3 (Tab. II.9). W przypadku prowadzenia tego procesu do wody, mechanizm zgodny z mechanizmem Ficka obserwowany jest dla mikrocząstek niepokrytych warstwami CCh/ACh. Dla mikrocząstek z zaadsorbowanymi filmami CCh/ACh dyfuzja zachodzi w sposób złożony, gdyż $0,75 < d < 1$ (Tab. II.8). W przypadku uwalniania kalceiny do roztworu o pH=3,5 (Tab. II.10) mechanizm uwalniania jest również złożony, z pominięciem jednego przypadku (6 warstw CCh/ACh). Przypuszcza się, że wpływ na proces uwalniania kalceiny ma proces rozpadu węglanowego rdzenia, zachodzący szybciej w środowisku kwaśnym. Dlatego obserwuje się złożony mechanizm dyfuzji kalceiny z mikrocząstek w pH=3,5 i w wodzie (pH≈5,5) a zwykły mechanizm dyfuzji Ficka w przypadku uwalniania tej substancji do środowiska zasadowego, w którym rozpad mikrocząstek z węglanu wapnia zachodzi wolniej niż w pozostałych przypadkach.

W każdym z przypadków: uwalnianie kalceiny do wody, do roztworu o pH=3,5 oraz do roztworu o pH=10,3 zaobserwowano zmniejszanie się wartości stałej k wraz ze wzrostem ilości zaadsorbowanych warstw CCh/ACh. Najprawdopodobniej więc parametr ten związany jest z kinetyką uwalniania.

V. Bakteriostatyczny materiał hybrydowy dla potrzeb przemysłu tekstylnego.

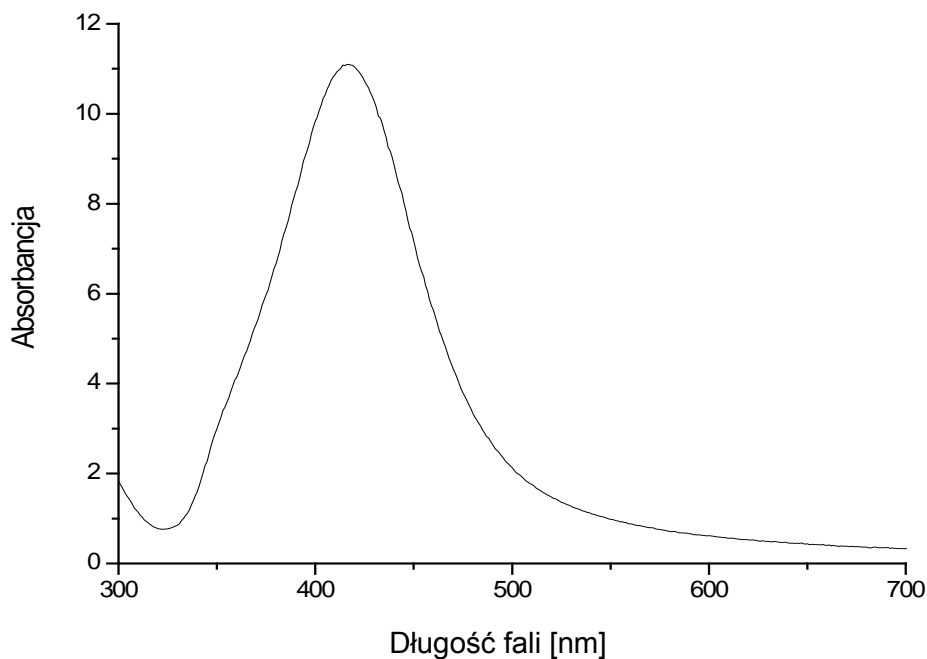
Jednym z etapów badań było wytworzenie bakteriostatycznego materiału dla potrzeb przemysłu tekstylnego. Tekstylia mające kontakt bezpośrednio ze skórą człowieka nierzadko są miejscem niekontrolowanego rozwoju mikroorganizmów występujących w równowadze na zdrowej skórze człowieka. Naturalne materiały, np. pierze stosowane do różnych wypełnień, mogą stać się dodatkową pożywką dla rozwoju mikroorganizmów. Rozwój mikroorganizmów na różnych tekstyliach znacząco wpływa na obniżenie komfortu podczas ich użytkowania (niekontrolowany rozwój mikroorganizmów powoduje nieprzyjemny zapach, zmianę koloru materiału, odczyny alergiczne). Nanocząstki srebra są szeroko stosowaną substancją bakteriobójczą w różnych gałęziach przemysłu, także w branży tekstylnej. Przedłużenie ich właściwości bakteriobójczych jest możliwe dzięki zastosowaniu matrycy, z której mogą być uwalniane w sposób kontrolowany. Matryca ma też właściwości ochronne, zabezpieczające nanocząstki srebra. Jako matrycę wybrano mikrocąstki z węgla wapnia. Do wytworzenia matrycy zawierającej nanocząstki srebra wykorzystano wiedzę nabytą we wcześniejszych eksperymentach z tego typu mikrocząsteczkami.

V.1. Synteza nanocząstek srebra (nAg).

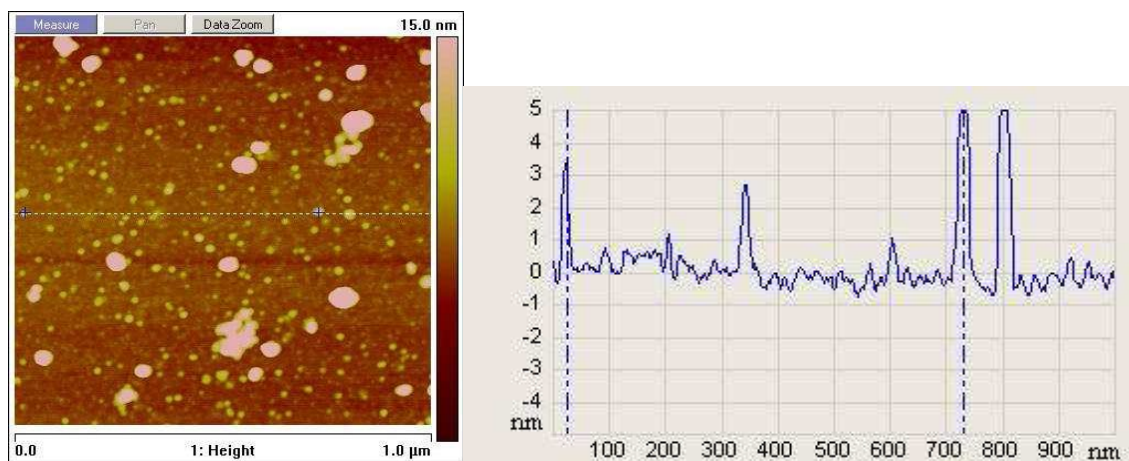
Nanocząstki srebra nAg zostały zsyntezowane metodą Lee i Meisel'a¹⁰⁷, którą nieznacznie zmodyfikowano na potrzeby eksperymentu. Modyfikacja polegała na redukcji jonów srebra w niższej temperaturze, przy zastosowaniu ultradźwięków. Tak przeprowadzona synteza umożliwiła otrzymanie w jednoetapowym procesie monodispersyjnych nAg. W tym celu mieszaninę reakcyjną sporządzono rozpuszczając 45 mg AgNO₃ w 250 ml wody dejonizowanej, a następnie dodając 5 ml 1% roztworu cytrynianu trójsodowego. Reakcje prowadzono przez 60 minut w nagrzanej do 75°C łaźni ultradźwiękowej.

Otrzymano dyspersję nanocząstek nAg, których widmo absorpcyjne przypada na 418 nm (Rys.II.54.). Rozmiary nanocząstek syntezowanych przez 60 min wahają się od 40 do 50 nm a ich kształt jest kulisty (Rys.II.55 B). Czas syntezy nanocząstek został zoptymalizowany, dla porównania w syntezie prowadzonej krócej otrzymano nanocząstki o znacznie mniejszej homogeniczności (Rys. II.55 A). Przypuszcza się, że nanocząstki srebra

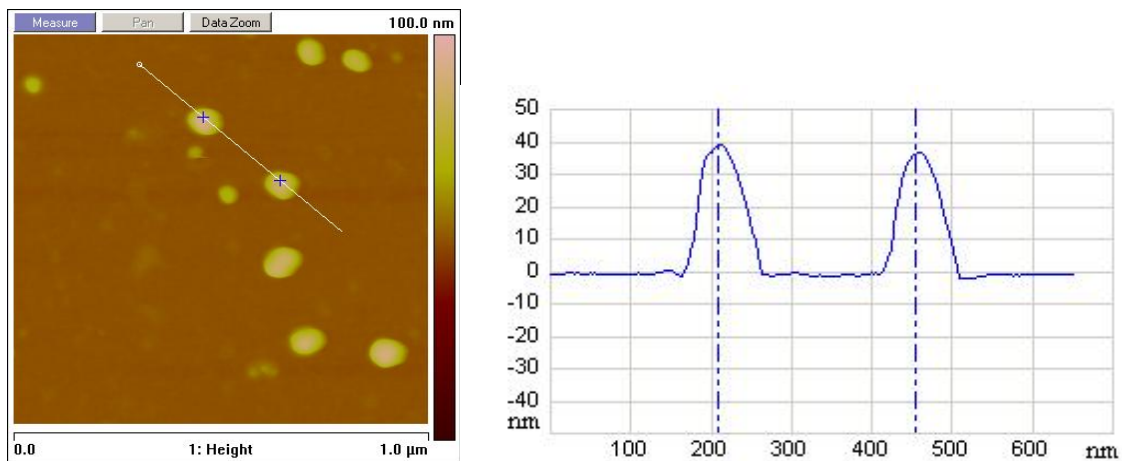
o rozmiarze 40-50 nm łatwiej lokują się we wnętrzu matrycy węglowej (mikrocząstek węglanowych), przez co proces uwalniania Ag^+ jest dłuższy i lepiej kontrolowany. Proces wzrostu ilości nanocząstek podczas syntezy monitorowany był również metodą UV-VIS (Rys.II.56.). Wartość absorbancji rośnie wraz ze wzrostem rozmiaru nAg, zaś przesunięcie położenia maksimum pasma związane jest ze zwiększeniem rozmiaru nanocząstek srebra¹⁰⁸.



Rys. II.54. Widmo dyspersji nAg w wodzie.



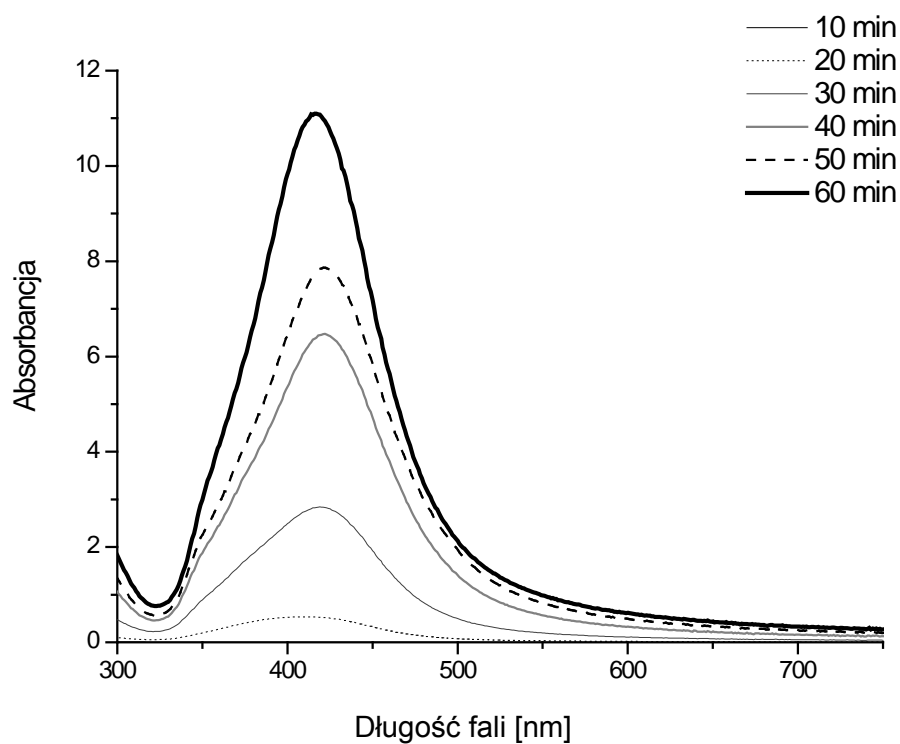
A



B

Rys. II.55. Zdjęcie AFM suchych nanocząstek srebra otrzymanych w wyniku zmodyfikowanej syntezy osadzone na krzemie. A. 20 min, B 60 min.

Do dalszych badań wykorzystano nanoAg syntezowane przez 60 min (Rys. II. 55 B)

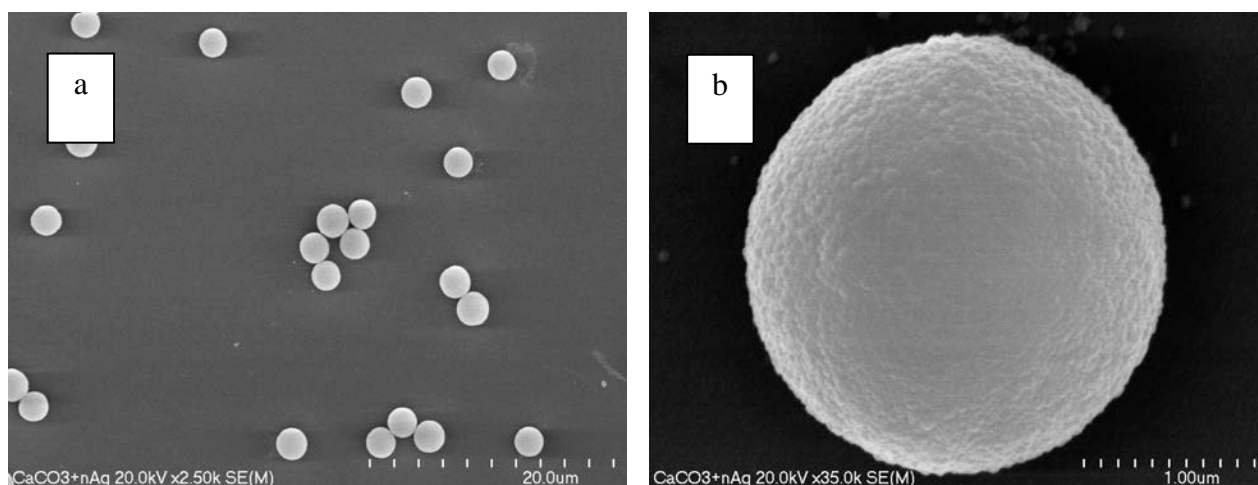


Rys. II.56. Monitorowanie wzrostu ilości nAg podczas syntezy.

V.2. Synteza mikrocząstek z węglanu wapnia jako nośników nAg.

Kolejnym krokiem po optymalizacji procesu syntezy nanocząstek srebra było zoptymalizowanie jednoetapowego procesu wytwarzania mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra. W tym celu do 20 ml odwirowanego koloidu nanocząstek srebra znajdującego się na łaźni ultradźwiękowej wlewo równocześnie 50 ml 0,03 M Na_2CO_3 zawierającego PSS w stężeniu 4,8 g/l oraz 50 ml 0,03 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Strącanie wspomagane ultradźwiękami prowadzono jeszcze przez 5 minut w temperaturze 25°C. Otrzymany roztwór odwirowano przy prędkości 4000 rpm przez 5 minut. Otrzymany osad oczyszczono trzykrotnie przemywając wodą dejonizowaną oraz wirując w wyżej określonych warunkach. Mikrocząstki zawierające nAg zobrazowano SEM oraz sprawdzono zawartość nAg. W tym celu mikrocząstki zawierające nAg rozpuszczono w 0,2 M EDTA, po czym zmierzono widmo UV-VIS tak otrzymanego roztworu. Informację ilościową na temat zawartości srebra we wnętrzu mikrocząstek węglanowych uzyskano techniką atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA).

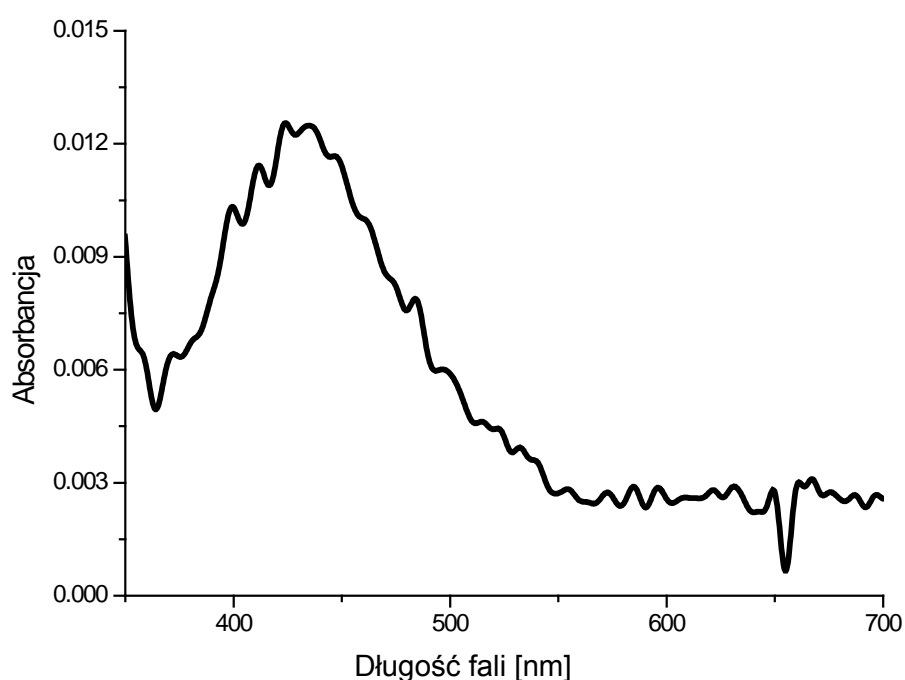
Mikrocząstki z węglanu wapnia zawierające nAg zobrazowano przy pomocy mikroskopii SEM. Zdjęcia pokazują, że mikrocząstki z węglanu wapnia są sferyczne oraz że ich średnica wynosi ok. 2 μm (Rys.II.57).



Rys. II.57. Zdjęcia SEM mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nAg.

Obecność nAg w mikrocząstkach potwierdzono spektrofotometrycznie. Widmo rozpuszczonych w EDTA mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nAg przedstawiono na (Rys. II.58.). Charakterystyczny pik przy długości fali ok. 420 nm dowodzi obecności nAg w badanym materiale.

Ilościowe badania zawartości nAg w matrycy zostały przeprowadzone metodą ASA i wykazały, że na każdy 1g suchego proszku matrycy zawierającej nAg, 15 mg stanowi samo srebro. Badania ASA przeprowadzono następująco. Odważono 0,05981 g suchego osadu μ -CaCO₃ zawierających nAg i roztworzono w 30 ml 0,12 M HNO₃. Następnie sporządzono wzorce do analizy, w których stężenie srebra wynosiło: 1; 2; 3; 4 mg/dm³. W tym celu rozpuszczono odpowiednie ilości AgNO₃ w 0,12 M HNO₃, który posłużył także jako tło. Uzyskane wyniki wskazują, że z początkowej ilości nAg stosowanej do syntezy 21% zostaje zamknięte w μ -CaCO₃, natomiast zaokludowane srebro stanowi 0,015% masy otrzymanych μ -CaCO₃.



Rys. II.58. Widmo UV-Vis roztworu po roztworzeniu materiału hybrydowego za pomocą EDTA.

V.3. Uwalnianie srebra z mikrocząstek z węglanu wapnia.

Kolejnym etapem pracy było przeprowadzenie uwalniania nanocząstek srebra z matrycy węglanowej. W tym celu określoną objętość (1350 ml) dyspersji materiału hybrydowego otrzymanej w wyniku syntezy odwirowano przy prędkości 4000 rpm, następnie oczyszczono przepłukując trzykrotnie wodą i wirując w wyżej określonych

warunkach. Materiał podzielono na 3 równe części. Roztwory buforowe sporządzono poprzez wymieszanie w odpowiednich proporcjach roztworów 0,2 M Na₂HPO₄ i 0,1 M kwasu cytrynowego, a ich pH zmierzono za pomocą pH-metru. Do każdej z trzech próbek dodano 8 ml odpowiedniego roztworu buforowego lub wody i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. W określonych odstępach czasu wirowano próbkę przy prędkości 4000 rpm przez 5 minut w celu oddzielenia srebra od mikrocząstek węglanowych. Do dalszych badań zbierano supernatant i dodawano kolejną porcję roztworu, tak, by każdorazowo uzyskać objętość 8 ml.

Uwalnianie srebra z mikrocząstek węglanowych prowadzono przez 14 dni. Wyniki dotyczące uwalniania srebra przedstawiono poniżej w tabeli (Tab. II.11.):

Tab. II.11. Procentowe uwalnianie srebra z mikrocząstek węglanowych.

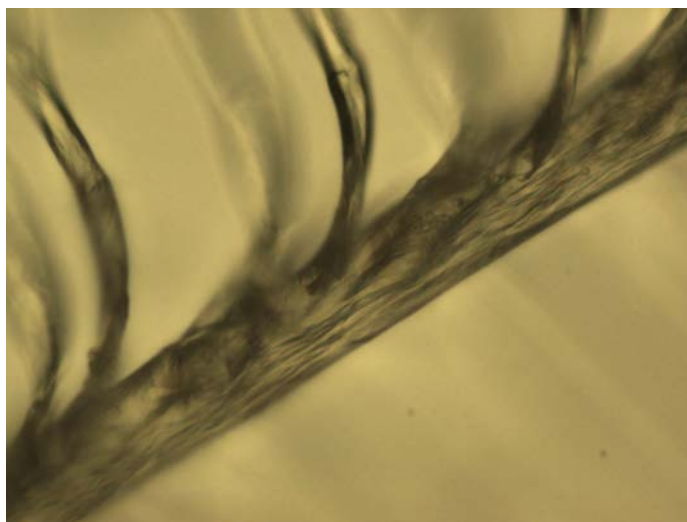
	Procent uwolnionego srebra [%]						Ilość pozostała w kapsułach [%]
	1	2	3	4	8	14	
Bufor o pH =5,37	0,960	14,016	5,888	0,560	1,280	0,752	76,544
Bufor o pH = 6,77	3,552	3,504	3,504	0,240	1,824	7,440	79,936

Na podstawie eksperymentu stwierdzono, że srebro jest mocno związane w kapsułach a nanocząstki nie roztwarzają się w roztworach nawet o pH bliskim 5 oraz są zbyt duże aby opuścić wnętrze mikrocząstki (nie zaobserwowano widm UV-VIS z roztworu supernatantu). Uzyskano zatem efekt kontrolowanego w czasie uwalniania nAg.

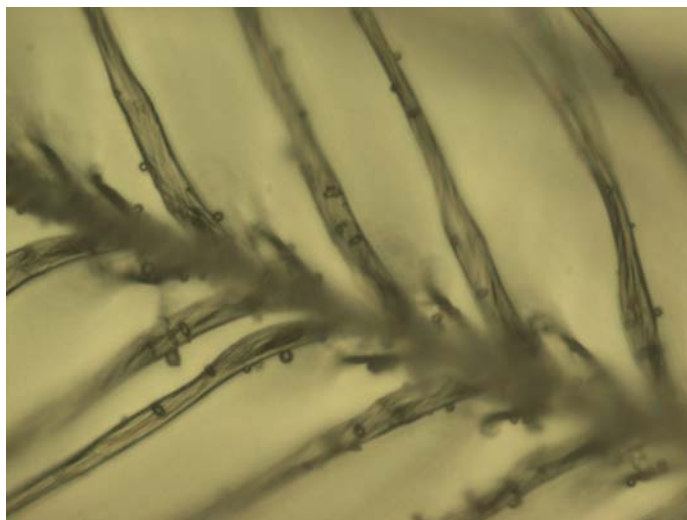
V.4. Badanie adsorpcji mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra do pierza używanego w przemyśle tekstylnym.

W celu sprawdzenia, czy mikrocząstki z węglanu wapnia są w stanie osadzać się na piórach (naturalne pióra z gęsi, po procesie obróbki przygotowującej pierze do użytkowania, Firma Euro Comfort) oraz pozostawać na nich podczas użytkowania pierza, materiał ten osadzono na piórach w następujący sposób. Przygotowano 10 ml roztworu 0,6% materiału hybrydowego. Następnie po 0,025 g piór umieszczono w roztworach wytrząsano przez 30 min po czym osuszono w strumieniu argonu. Próbkę badano pod mikroskopem optycznym oraz SEM.

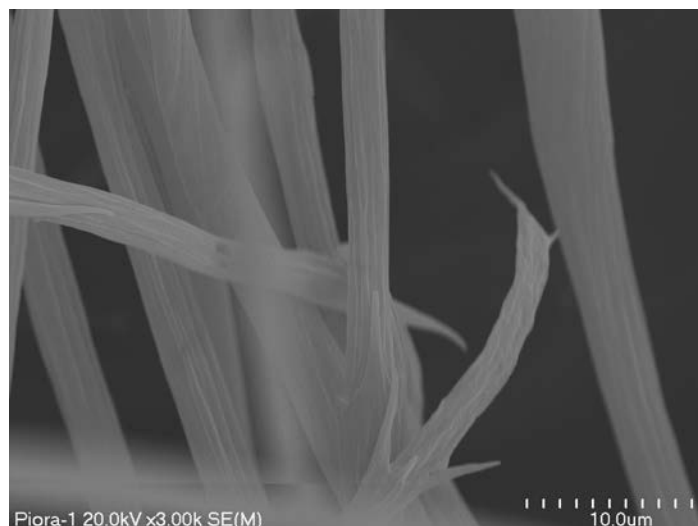
Adsorpcję mikrocząstek z węgla wapnia na powierzchni piór badano przy użyciu mikroskopii optycznej (Rys. II. 59, 60.) SEM (Rys.II.61, 62). Na zdjęciach poniżej widoczne są zaadsorbowane mikrocząstki na powierzchni piór. Przeprowadzone badania potwierdziły, że mikrocząstki z węgla wapnia zawierające nanocząstki srebra osadzają się na powierzchni piór.



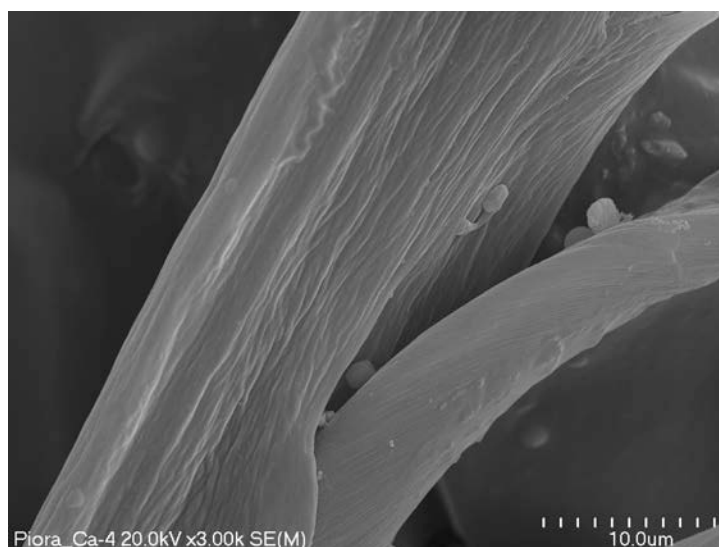
Rys. II.59. Zdjęcie piór wykonane przed adsorpcją mikrocząstek z węgla wapnia (50x).



Rys. II.60. Zdjęcie piór z zaadsorbowanymi mikrocząstkami z węgla wapnia (50x).



Rys. II.61. Zdjęcie SEM piór bez zaadsorbowanych mikrocząstek węglanowych.



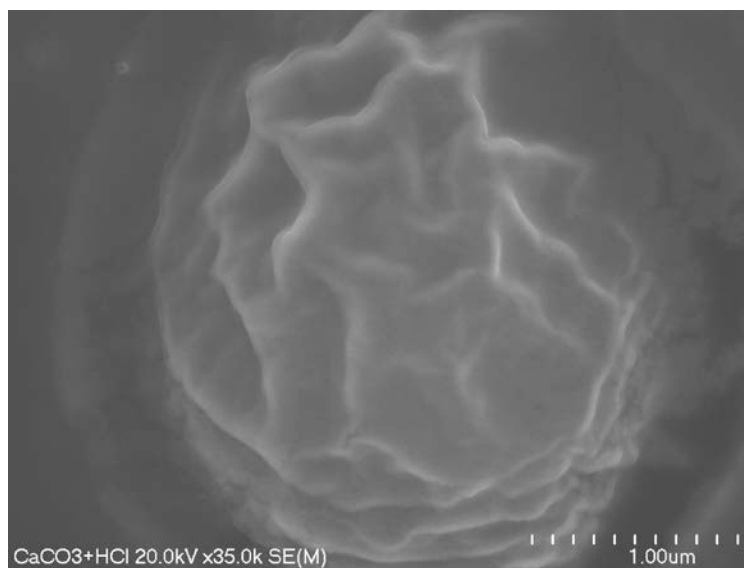
Rys. II.62. Zdjęcie SEM piór z zaadsorbowanymi mikrocząstkami z węglanu wapnia.

V.5. Modyfikacja ładunku powierzchniowego mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra.

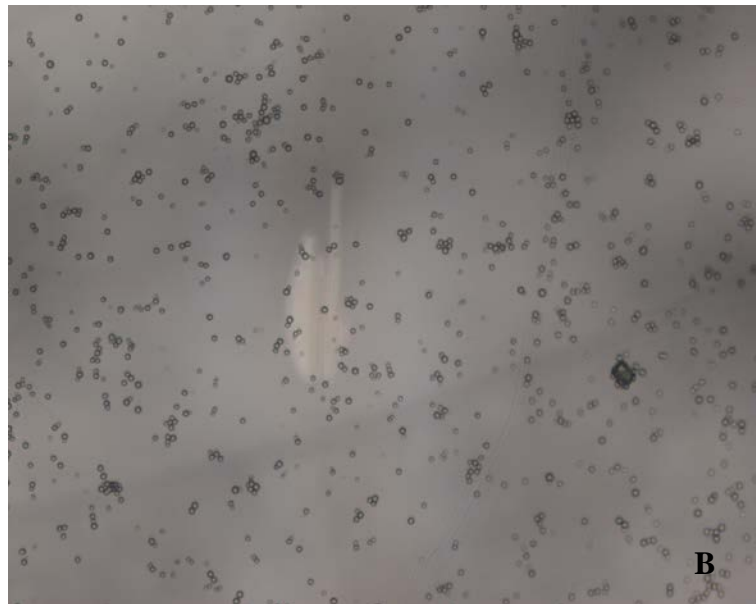
Przeprowadzono adsorpcję polikationu na powierzchni mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra. Modyfikacja ta pozwala na uzyskanie mikrocząstki posiadającej ładunek dodatni. Łatwość modyfikacji powierzchni mikrocząstki ułatwia adsorpcję mikrocząstki w zasadzie na każdym typie powierzchni (obdarzonej zarówno ładunkiem dodatnim jak również ujemnym). Adsorpcję polimeru na powierzchni przeprowadzono w następujący sposób. Mikrocząstki zawierające nAg pokryto 1 warstwą polikationu PAH. W tym celu do odwirowanej dyspersji mikrocząstek dodano 1 ml PAH (1g/litr, w 0,1M NaCl). Adsorpcję PAH-u, prowadzoną przez 15 min, sprawdzono przy

pomocy SEM. W tym celu mikrocząstki wytrawiono 0,2 M EDTA, by zaobserwować zewnętrzną zaadsorbowaną warstwę. Zmodyfikowane powierzchniowo mikrocząstki zaadsorbowano do powierzchni miki. W tym celu płytki miki zanurzone w zawiesinie mikrocząstek, spłukano nadmiar niezaadsorbowanych mikrostruktur, wysuszono pod strumieniem azotu i zbadano pod mikroskopem optycznym.

Uzyskany obraz SEM wytrawionej powierzchni kapsuł (Rys.II.63) potwierdza obecność PAH-u na powierzchni mikrocząstek. Z kolei Rys.II.64. pokazuje, że mikrocząstki ze zmodyfikowaną kationowo powierzchnią adsorbują się w większych ilościach do powierzchni miki. Obliczono, że modyfikacja 1 warstwą PAH-u zwiększa ilość zaadsorbowanych mikrocząstek prawie siedmiokrotnie. Zaobserwowano, iż na powierzchni miki wielkości 1 cm² zaadsorbowało się 10x10⁴ mikrocząstek niezamodyfikowanych kationowo, podczas gdy korzystna z elektrostatycznego punktu widzenia adsorpcja mikrokapsuł zmodyfikowanych kationowo dała ok. 70x10⁴ zaadsorbowanych mikrokapsuł na 1 cm². Stąd możliwość zmiany ładunku powierzchniowego ułatwia szybką i efektywną adsorpcję do dowolnej powierzchni.



Rys. II.63. Wytrawiona EDTA mikrocząstka z węgla wapnia.



Rys. II.64. Zdjęcie wykonane mikroskopem optycznym (200x) powierzchni miki pokrytej mikrocząstkami o powierzchniowym ładunku ujemnym (A) oraz mikrocząstkami o powierzchniowym ładunku dodatnim (B).

V.6. Badanie właściwości bakteriobójczych/bakteriostatycznych dla mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nanocząstki srebra.

Właściwości bakteriostatyczne materiału zostały sprawdzone w zawiesinie bakteryjnej. Szczepy bakterii użyte w eksperymencie zostały pobrane ze zdrowej ludzkiej skóry. Zawiesina to dyspersja bakteryjna w soli fizjologicznej o określonym stężeniu wg

skali McFarlanda. Dodawano do niej substancje, które miały działać bakteriostatycznie i po 24h sprawdzano stężenie bakterii przy użyciu densometru. Stężenie bakterii w samej soli fizjologicznej po 24h nie zmienia się (lub nieznacznie spada w granicach maksymalnie do 5%). Badanie bakteriostatyczności piór z zaadsorbowanymi nAg w $\mu\text{-CaCO}_3$ przeprowadzono w ten sam sposób, przy czym stężenie badano po „dekantacji” piór, tak, by mieć pewność, że sam substrat nie zaburza pomiaru.

Badania bakteriostatyczności/bakteriobójczości przeprowadzono w zawiesinie bakteryjnej w soli fizjologicznej. Zawartość bakterii określano metodą densymetryczną, wg tzw. skali McFarlanda (Tab.II.12.). Badania mikrobiologiczne potwierdzają bakteriostatyczność nAg w stosunku do wyizolowanych szczepów gronkowca (Tab. II.13.) Obserwowano znaczne zmniejszenie gęstości optycznej badanej zawiesiny bakteryjnej z dodatkiem nanocząstek srebra. Mikrocząstki z węgla wapnia zawierające nAg wykazywały również bakteriostatyczność w stosunku do wykorzystanych szczepów bakterii (Tab.II.14.) Z kolei mikrocząstki zawierające nAg zabezpieczyły pióra przed rozwojem bakterii (Tab.II.15.). Puch niezabezpieczony mikrocząstkami zawierającymi nAg został zakażony przez bakterie. Obserwowano zwiększenie gęstości optycznej roztworu zawierającego pierze niezabezpieczone mikrocząstkami zawierającymi nanocząstki srebra (Tab. II.16). Badania wykazały zatem, iż wytworzony hybrydowy materiał działa bakterio i grzybobójczo, stąd może znaleźć zastosowanie jako materiał zabezpieczający naturalne pierze.

Tab. II. 12. Skala McFarlanda.

Stopień McF	Stężenie BaSO ₄ [mol/litr]
0,5	$2,40 \times 10^{-5}$
1	$4,80 \times 10^{-5}$
2	$9,60 \times 10^{-5}$
3	$1,44 \times 10^{-4}$
4	$1,92 \times 10^{-4}$
5	$2,40 \times 10^{-4}$

Tab. II.13. Badanie bakteriobójczości nAg.

nAg	Stężenie wyjściowe bakterii [⁰ McF]	Stężenie po dodatku substancji badanej [⁰ McF]	Stężenie po 24h inkubacji [⁰ McF]
Staphylococcus aureus 1	1	1,7	1,2
Staphylococcus aureus 2	0,5	1,1	0,8
Staphylococcus aureus 3	0,5	0,9	0,7
Staphylococcus epidermidis	1	1,4	0,8
Staphylococcus epidermidis 1	0,5	1	0,8
Staphylococcus epidermidis 2	0,5	1,1	0,7
Staphylococcus epidermidis 3	0,5	1	0,9
Staphylococcus epidermidis 4	0,5	1	0,7
Staphylococcus epidermidis 5	0,5	1	0,7

Tab. II.14. Badanie bakteriobójczości oraz grzybobójczości materiału hybrydowego μ -CaCO₃ zawierającego nAg.

μ -CaCO ₃	Stężenie wyjściowe bakterii [⁰ McF]	Stężenie po dodatku substancji badanej [⁰ McF]	Stężenie po 24h inkubacji [⁰ McF]
Candida species 3	0,9	1,7	0,7
Candida species 2	1,2	1,7	0,9
Staphylococcus species 3	0,9	1,7	0,7
Staphylococcus species 4	0,9	1,7	0,7

Tab.II.15. Badanie bakteriostatyczności pierza zabezpieczonego materiałem hybrydowym zawierającym nAg.

Pióra z μ -CaCO ₃	Stężenie wyjściowe bakterii [⁰ McF]	Stężenie dodatku po substancji badanej [⁰ McF]	Stężenie po 24h inkubacji [⁰ McF]
Staphylococcus epidermidis 3	1	0,8 (możliwa adsorpcja bakterii na piórach obserwowana pod mikroskopem optycznym)	0,7
Staphylococcus epidermidis 4	1	1	0,8

Tab.II.16. Rozwój bakterii na pierzu niezabezpieczonym materiałem hybrydowym z nanocząstkami srebra.

	Próbka kontrolna ^a	Próbka badana ^b
Staphylococcus aureus 1	0,3	0,4
Staphylococcus epidermidis 4	0,2	0,3
Staphylococcus epidermidis 5	0,4	0,5
Staphylococcus epidermidis 6	0,4	0,5

^a Zawiesina bakteryjna bez dodatku puchu; pomiar po 24h

^b Zawiesina z niezabezpieczonym puchem; pomiar po 24h

Podsumowanie i wnioski.

Przeprowadzone badania przedstawione w niniejszej pracy pozwoliły osiągnąć zamierzone cele w zakresie syntezy i badania nowych materiałów do zastosowań biomedycznych. Otrzymano jonowe pochodne chitozanu, rozpuszczalne w środowisku wodnym o neutralnym pH. Pochodne chitozanu zachowują bio właściwości materiału wyjściowego. Z uzyskanych pochodnych udało się z powodzeniem uzyskać jednoskładnikowe multiwartstwowe ultracienkie filmy, co stanowi niewątpliwy sukces, gdyż jednoskładnikowe filmy zbudowane techniką warstwa po warstwie uzyskano po raz pierwszy. Przeprowadzono dokładną analizę fizykochemiczną materiału: zbadano topografię powierzchni, szorstkość oraz grubość filmu opartego na chitozanie. Przeprowadzono także pomiary kąta zwilżania oraz określono parametry termodynamiczne tworzenia kompleksów. Pomiary prowadzono równolegle z badaniami nad filmami hybrydowymi, zbudowanymi z pochodnych chitozanu i z polimeru syntetycznego. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że filmy zbudowane z CCh/ACh odznaczają się wyjątkową hydrofilowością, ich szorstkość jest niewielka, stanowi ułamek nanometra. Filmy CCh/ACh są wytrzymałe i stabilne- zmiany entalpii mieszania dla pary CCh/ACh są wyższe niż dla układów hybrydowych, co świadczy o entropowym procesie formowania struktur.

Po wytworzeniu i scharakteryzowaniu układu opartego na pochodnych chitozanu przebadano go pod kątem zastosowań biomedycznych. Film CCh/ACh okazał się stabilny podczas przechowywania w warunkach izotonicznych. Dzięki wysokiej hydrofilowości oraz niewielkiej szorstkości nie dochodziło do adsorpcji białek na jego powierzchni. Film CCh/ACh wykazywał także stabilność podczas przechowywania w surowicy ludzkiej. Nie zaobserwowano również adsorpcji komponentów surowicy ludzkiej na powierzchni filmu chitozanowego. Układ wykazywał właściwości antykoagulacyjne oraz antybakteryjne. Układ może zatem znaleźć zastosowanie jako powłoka zabezpieczająca do pokrywania urządzeń/narzędzi mających bezpośredni kontakt z układami biologicznymi.

Ultracienki film CCh/ACh wykorzystano również do pokrycia (opłaszczenia) żywych bioobiektów. Filmy chitozanowe zaadsorbowano z sukcesem na powierzchni komórek HL-60. Komórki wykazywały żywotność po pokryciu płaszczem chitozanowym. Ultracienki film chitozanowy pełnił również funkcje ochronne podczas przechowywania w obniżonej temperaturze. Film wykazywał także stabilność podczas przechowywania w środowisku służącym do hodowli komórek oraz selektywną przepuszczalność, zależną od wielkości

cząstek: dla substancji wielkocząsteczkowych przepuszczalność filmu chitozanowego jest utrudniona, co jest szczególnie istotne dla późniejszych zastosowań immunoizolacyjnych.

Otrzymano również hybrydowe mikrocząstki oparte na węglanie wapnia z dodatkiem karboksymetylochitozanu. Zoptymalizowano ich syntezę otrzymując mikrocząstki o małej polidispersyjności. Przeprowadzono analizę fizykochemiczną mikrocząstek. Zoptymalizowano również proces napełniania mikrocząstek, który odbywa się w procesie jednoetapowym. Mikrocząstki z sukcesem pokryto ultracienkim filmem chitozanowym i z sukcesem przeprowadzono proces kontrolowanego uwalniania w różnych warunkach pH. Z napełnionych mikrocząstek uwalniano substancję niskocząsteczkową, modelową, oraz wysokocząsteczkową – białko.

Jednym z celów pracy było również otrzymanie antybakteryjnych mikrocząstek do zastosowań w przemyśle tekstylnym. Mikrocząstki zawierały nanocząstki srebra, których syntezę również zoptymalizowano. Badania mikrobiologiczne wykazały, że tak przygotowany materiał może stać się alternatywą dla obecnie stosowanych specyfików w branży tekstylnej.

Praca doktorska obejmowała również badania nad wytworzeniem stabilnych filmów polielektrolitowych z polimerów elastynopochodnych. Udało się wytworzyć stabilne struktury w różnych warunkach pH oraz przeprowadzić ich charakterystykę fizykochemiczną. Polimery te zaliczane są do grupy tzw. „inteligentnych”. Reagują skokowymi zmianami właściwości na zmianę parametrów, np. przy zmianie temperatury. Wykazano, że wytworzone ultracienkie filmy elastynowe również wykazują zmiany pod wpływem działającego bodźca fizycznego, co może być istotne w konkretnych zastosowaniach praktycznych takich nanostruktur.

Spis publikacji i wystąpień konferencyjnych związanych z pracą.

Spis publikacji:

1. Maria Bulwan, Szczepan Zapotoczny, Maria Nowakowska „Robust „one component” chitosan-based ultrathin films fabricated using layer-by-layer technique”, *Soft Matter*, 2009,5,4726-4732

2. Maria Bulwan, Kinga Wójcik, Szczepan Zapotoczny, Maria Nowakowska. „Chitosan-based ultrathin films as antifouling, anticoagulant and antibacterial protective coatings”. Wysłane do *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*

3. Monika Golonka, Maria Bulwan, Maria Nowakowska, Ana María Testera, José Carlos Rodríguez-Cabello, Szczepan Zapotoczny. “Polymeric multilayer films based on ionic elastin-like recombinamers”. Wysłane do *Soft Matter*

4. Szczepan Zapotoczny, Maria Bulwan, Maciej Długosz, Maria Nowakowska, „Hybrydowy materiał zawierający nanocząstki srebra, sposób wytwarzania ,materiału hybrydowego oraz jego zastosowanie. Zgłoszenie patentowe (nr P.395002 z dnia 24.05.2011).

5. Maria Bulwan, Szczepan Zapotoczny, Maria Nowakowska, “Hybrid calcium carbonate-chitosan microparticles for controlled delivery” (w przygotowaniu dla *Journal of Colloids and Interface Science*)

6. Maria Bulwan, Magdalena Antosiak-Iwańska, Ewa Godlewska, Ludomira Granicka, Szczepan Zapotoczny, Maria Nowakowska; “Chitosan-based protective nanocoating for cell encapsulation” (w przygotowaniu dla *Biomaterials*)

7. Maciej Długosz, Maria Bulwan, Szczepan Zapotoczny, Maria Nowakowska „Hybrid calcium carbonate/polymer microparticles containing silver nanoparticles as antibacterial agent”. W przygotowaniu.

Spis wystąpień konferencyjnych.

1. Wykład na zaproszenie pt: “Nanocoatings and microparticles for biomedical applications” 8.06.2011. Yale University, Department of Biomedical Engineering, 55 Prospect Street, New Haven, CT 06511, USA.
2. XXI International Symposium of Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 8-12.05.2011 Krakow, Poland, poster: “Universal chitosan-based antifouling and protective nanocoatings”. M.Bulwan, K.Wójcik, Sz.Zapotoczny, M.Nowakowska.
3. XXI International Symposium of Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 8-12.05.2011 Krakow, Poland, poster: “Hybrid material of calcium carbonate/polymer microparticles containing silver nanoparticles as antibacterial agent”. M.Długosz, M.Bulwan, Sz.Zapotoczny, M.Nowakowska.
4. E-MRS ICAM IUMRS 2011 Spring Meeting 9-13.05.2011 Nice, France, wykład na zaproszenie: “Chitosan-based protective nanocoating for cells encapsulation” Szczepan Zapotoczny, M.Bulwan, Magdalena Antosiak-Iwańska, Ewa Godlewska, Ludomira Granicka, Maria Nowakowska.
5. Zing Conferences Ltd. “Frontiers in polymers” 19-22.11.2010 Puerto Morelos, Mexico. Poster: “Chitosan-based Ultrathin Films As Universal Antifouling and Protective Nanocoatings”. M. Bulwan, M. Antosiak-Iwańska, E. Godlewska, K. Wójcik, L. Granicka, S. Zapotoczny, M. Nowakowska
6. Zing Conferences Ltd. “Frontiers in polymers” 19-22.11.2010 Puerto Morelos, Mexico. Poster: “The enhancement of the layer-by-layer deposition method by application of sonication”. W. Niemiec, M. Bulwan, M. Kopec, Sz. Zapotoczny, M. Nowakowska
7. Zing Conferences Ltd. “Frontiers in polymers” 19-22.11.2010 Puerto Morelos, Mexico. Poster: “The interaction of pegylated isoflavone and porphyrin with the biological membranes”. M. Kumorek, K. Nawalany, M. Kępczyński, M. Bulwan, A. Rusin, P. Filipczak, B. Kozik, Z. Krawczyk, M. Nowakowska

8. 53. Meeting of PTChem and SITPChem, 14-18.09.2010, Gliwice, Poland, Poster: "Examining wettability of water-soluble bio-polymer compositions containing polysaccharides and polyacrylates" B.Grabowska, M.Bulwan, Sz.Zapotoczny, E.Witek
9. YES 2010. 4th Young European Scientists Workshop. 5-10.09.2010. Kraków, Poland. Poster: "Ultrathin polypeptide-based multilayered films for biomedical applications. M. Bulwan, M. Golonka, J.C. Rodríguez-Cabello, A.M. Testera, M. Nowakowska, S. Zapotoczny
10. US-Poland Workshop and Summer School : Nanoscale Phenomena in Materials and at Interfaces . 6-10.06.2010 Kraków, poster: "Ultrathin polypeptides and chitosan-based multilayer films for biomedical applications." M. Bulwan, M. Golonka, J.C. Rodríguez-Cabello, M. Nowakowska, S. Zapotoczny
11. 23rd Conference of the European Colloid and Interface Society 06.-11.09.2009 Antalya, Turkey. Prezentacja ustna: "One-component" Chitosan-Based Multilayer Films as Biocompatible Nanocoatings of Microparticles for Tunable Release Applications. S. Zapotoczny, M. Bulwan, P. Bonarek, M. Nowakowska
12. ESF research conferences ESF-EMBO Symposium Biological Surfaces and Interfaces 27.06.-2.07.2009 Sant Feliu de Guixols, Spain, poster: "Chitosan based nanocoatings for immunoisolation and antifouling applications." M. Bulwan, M. Antosiak-Iwańska, E. Godlewska, K. Wójcik, P.Bonarek, L. Granicka, S. Zapotoczny, M.Nowakowska
13. 2nd International Symposium on Surface Imaging/Spectroscopy at the Solid/Liquid Interface. Kraków 31.05.-3.06.2009, poster: "Advanced imaging of surfaces modified by biopolymers using Layer-by-Layer (LbL) method". M. Bulwan, K. Wójcik, P. Bonarek, S. Zapotoczny, M. Nowakowska
14. 22nd European Colloid and Interface Society Conference Kraków, 31.08-5.09.2008; poster: "Novel hybrid calcium carbonate-chitosan microcapsules designed for biomedical applications". M. Bulwan, Ł. Dubiel, S. Zapotoczny, Ł. Zych, M. Nowakowska.

15. V STM/AFM Seminar, 26-30.11.2008 Zakopane, Poland, oral presentation: „AFM characteristic of ultrathin multilayered polyelectrolytes films” W.Niemiec, M.Bulwan, Sz.Zapotoczny, M.Nowakowska

16. International Polymer Seminar Gliwice, Poland, 26 lipiec 2008; poster: „Electrostatic self-assembled single component chitosan ultrathin films and capsules for bioscience applications” M. Bulwan, Ł. Dubiel, S. Zapotoczny, M. Nowakowska

17. 10. Fruhjarssymposium, 10th young scientists conference on chemistry 27-29.03.2008 Rostock, Germany; poster: “Single-component chitosan ultrathin films. M. Bulwan, S. Zapotoczny, M. Nowakowska.

<i>Spis rysunków.</i>	<i>Str.</i>
Rys. 1. Schemat wytwarzania multiwarstwowego filmu polielektrolitowego.	5
Rys. 2. Makroskopowy model multiwarstwowego filmu polielektrolitowego.	6
Rys. 3 Wpływ soli na tworzenie multiwarstwowego filmu polielektrolitowego.	7
Rys. 4 . Proces formowania kompleksu polielektrolitowego w roztworze.	8
Rys. 5. Schemat struktury: od góry: celuloza, chityna i N-deacetylowana pochodna chityny: chitozan.	10
Rys. 6. Przykładowe modyfikacje chitozanu.	11
Rys. 7. Zachowanie tri blokowego ELRs wykazującego temperaturę ITT w roztworze wodnym.	15
Rys. 8. Fotoizomeryzacja azobenzenu.	15
Rys. 9. Fotoizomeryzacja azobenzenu.	16
Rys. 10. Fotoizomeryzacja w przykładowym układzie biologicznym.	17
Rys. 11. Schemat budowy filmu bakteryjnego.	20
Rys. 12. Techniki enkapsulacji komórek/tkanek.	22
Rys. I.1. Schemat kationowej modyfikacji chitozanu.	33
Rys. I.2. Widmo IR CCh.	35
Rys. I.3. Schemat syntezy anionowej pochodnej chitozanu.	36
Rys. I.4. Widmo IR ACh.	37
Rys. I.5. Schemat otrzymywania CCh-FITC.	38
Rys.I.6. Widmo absorpcji i emisji CCh-FITC.	39
Rys. II.1. Topografia multiwarstwowych filmów (6 biwarstw).	42
Rys. II.2. Przyrost grubości filmów polielektrolitowych.	43
Rys. II.3. Zmiany wartości kąta zwilżania w zależności od ilości warstw dla układów: PAH/ACh, CCh/PSS i CCh/ACh.	46
Rys. II.4. Stabilność filmów po tygodniowym przechowywaniu w soli fizjologicznej.	47
Rys. II.5. Miareczkowanie turbidymetryczne wykonane dla par polielektrolitów: CCh/ACh, CCh/PSS, PAH/ACh.	50
Rys. II.6. Monitorowanie przyrostu filmu ELRs dla pH=7.	51
Rys. II.7. Widma roztworów Ex15 i Kx24.	52
Rys. II.8. Przyrost grubości filmów Kx24/Ex15 w zależności od pH.	52
Rys. II.9. Przyrost grubości filmów Kx24/Ex15 w zależności od pH.	53
Rys. II.10. Topografia powierzchni filmów Kx24/Ex15.	54

Rys. II.11. Termoczułość 3 biwarstw Kx24/Ex15.	56
Rys. II.12. Pomiary LCST polipeptydów.	57
Rys. II.13. AFM powierzchni 10 biwarstw Kx24/Ex15 po przechowywaniu w wodzie.	58
Rys. II.14.A Przyrost grubości biwarstw Kx24/Ex15-azo.	59
Rys. II.14.B. Przyrost grubości biwarstw Kx24/Ex15-azo.	60
Rys. II.15. Przyrost grubości filmów Kx24/Ex15-azo mierzona AFM.	60
Rys. II.16. Topografia 8 biwarstw filmu Kx24/Ex15-azo.	61
Rys. II.17. LCST Ex15-azo w wodzie i w 0,1 M NaCl.	62
Rys. II.18. Fotoizomeryzacja roztworu Ex15-azo.	62
Rys. II.19. Widmo 5 biwarstw filmu Kx24/Ex15-azo.	64
Rys. II.20. 1 biwarstwa Kx24/Ex15-azo po 1 h przechowywaniu w 0,1 M NaCl bez naświetlania (A) z naświetlaniem 430 nm (B).	64
Rys. II.21. Zdjęcia wykonane mikroskopem fluorescencyjnym płytek pokrytych CCh/ACh z zaadsorbowanym białkiem BSA-FITC.	67
Rys. II.22. Histogram intensywności fluorescencji w zależności od ilości zaadsorbowanych biwarstw.	67
Rys. II.23. Obrazy AFM płytek krzemowych pokrytych i niepokrytych filmami CCh/ACh po 72 godzinnym przechowywaniu w roztworze zawierającym białko TGF- β 1.	68
Rys. II.24. Adsorpcja ludzkiej surowicy na płytkach krzemowych.	69
Rys. II.25. Antykoagulacyjne właściwości filmów CCh/ACh.	71
Rys. II.26. Obraz z mikroskopu optycznego (10x50) 24h hodowli bakteryjnej.	73
Rys. II.27. Obrazy AFM płytek krzemowych niepokrytych (A,B) oraz pokrytych (C) 10 biwarstwami CCh/ACh.	74
Rys. II.28. Obraz SEM filmu chitozanowego po hodowli bakteryjnej.	76
Rys. II.29. Płytką krzemową niepokrytą filmami chitozanowymi po hodowli bakteryjnej.	76
Rys. II.30. Obraz SEM filmu chitozanowego przed hodowlą bakteryjną.	76
Rys. II.31. Badania antybakteryjności powierzchni.	77
Rys. II.32. Dwuwarstwa lipidowa zaadsorbowana na powierzchni miki.	78
Rys. II.33. Dwuwarstwa lipidowa z DMPC w 0,1 M NaCl.	79
Rys. II.34. Dwuwarstwa lipidowa DMPC z zaadsorbowanym CCh (1g/litr w 0,1 M NaCl) po 20 min.	79

Rys. II.35. Dwuwartwa lipidowa DMPC z zaadsorbowanym CCh (1g/litr w 0,1 M NaCl) po 120 min.	79
Rys. II.36. Woltamperometria cykliczna przeprowadzona dla naftochinonu.	82
Rys. II.37. Woltamperometria cykliczna przeprowadzona dla porfiryny.	82
Rys. II.38.1 biwarstwa CCh/ACh po 12h przechowywaniu w RPMI (37 ⁰ C).	84
Rys. II.39.10 biwarstw CCh/ACh po 84h przechowywaniu w RPMI (37 ⁰ C).	84
Rys. II.40. Wyspa Langerhansa szczurza pokryta 1 biwarstwą PAH/PMMA-PR (200x) w świetle przechodzącym (A), mikroskopia fluorescencyjna (B).	85
Rys. II.41. Komórki HL-60. Zdjęcie wykonane w mikroskopie optycznym oraz fluorescencyjnym. Powiększenie 500x.	86
Rys. II.42. Zmiany potencjału zeta powierzchni komórek HL-60 po adsorpcji warstw CCh/ACh.	87
Rys. II.43. Pomiary żywotności/prolifracji komórek HL-60 pokrytych filmem CCh/ACh.	88
Rys. II.44. Test przeżywalności komórek HL-60 opłaszczonych CCh/ACh po 24 przechowywaniu w obniżonej temperaturze 4 ⁰ C [LT].	88
Rys. II.45. Obraz SEM mikrocząstek z węglanu wapnia.	90
Rys. II.46. Analiza termograwimetryczna mikrocząstek.	
Rys. II.46. Analiza termograwimetryczna mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających kalceinę i bez kalceiny.	91
Rys. II.47. Analiza krystalograficzna mikrocząstek bez kalceiny (rysunek górny) oraz z kalceiną (rysunek dolny).	92
Rys. II.48. Powierzchnia mikrocząstki niepokrytej filmem polimerowym (A) oraz pokrytej filmem polimerowym 3 biwarstw CCh/ACh (B).	94
Rys. II.49. Zmiany potencjału zeta mierzone każdorazowo po adsorpcji polimeru.	95
Rys. II.50. Profile uwalniania kalceiny do wody dla mikrocząstek pokrytych 0,4,6,8 warstwami CCh/ACh.	97
Rys. II.51. Uwalnianie kalceiny z mikrocząstek do roztworu o pH=10.3 dla mikrocząstek pokrytych 0,4,6,8 warstwami CCh/ACh.	97
Rys. II.52. Uwalnianie kalceiny z mikrocząstek do roztworu o pH=3.5 dla mikrocząstek pokrytych 0,4,6,8 warstwami CCh/ACh.	98
Rys. II.53. Uwalnianie BSA-FITC z mikrocząstek do HCl o pH=3.5.	99
Rys. II.54. Widmo dyspersji nAg w wodzie.	103

Rys. II.55. Zdjęcie AFM suchych nanocząstek srebra otrzymanych w wyniku zmodyfikowanej syntezy osadzone na krzemie. A. 20 min, B 60 min.	104
Rys. II.56. Monitorowanie wzrostu ilości nAg podczas syntezy.	104
Rys. II.57. Zdjęcia SEM mikrocząstek z węglanu wapnia zawierających nAg.	105
Rys. II.58. Widmo UV-Vis roztworu po roztworzeniu materiału hybrydowego za pomocą EDTA.	106
Rys. II.59. Zdjęcie piór wykonane przed adsorpcją mikrocząstek z węglanu wapnia (50x).	108
Rys. II.60. Zdjęcie piór z zaadsorbowanymi mikrocząstkami z węglanu wapnia (50x).	108
Rys. II.61. Zdjęcie SEM piór bez zaadsorbowanych mikrocząstek węglanowych.	109
Rys. II.62. Zdjęcie SEM piór z zaadsorbowanymi mikrocząstkami z węglanu wapnia.	109
Rys. II.63. Wytrawiona EDTA mikrocząstka z węglanu wapnia.	110
Rys. II.64. Zdjęcie wykonane mikroskopem optycznym (200x) powierzchni miki pokrytej mikrocząstkami o powierzchniowym ładunku ujemnym (A) oraz mikrocząstkami o powierzchniowym ładunku dodatnim (B).	110

<i>Spis tabel.</i>	<i>Str.</i>
Tab.1. Zastosowanie modyfikacji chitozanu.	12
Tab. II.1. Szorstkość AFM filmów polimerowych.	45
Tab. II. 2. Wartości entalpii mieszania ΔH_{mix} dla poszczególnych par polielektrolitów.	48
Tab. II.3. Szorstkość RMS filmów Kx24/Ex15.	55
Tab. II.4.LCST ELRs.	57
Tab. II.5. Znormalizowana powierzchnia histogramu intensywności fluorescencji	68
Tab.II.6. Badania elipsometryczne dwuwartwy lipidowej zaadsorbowanymi CCh oraz ACh.	80
Tab.II.7. Charakterystyka fizykochemiczna mikrocząstek węglanowych.	90
Tab. II.8. Wyniki dopasowania funkcji Weibull'a do profili uwalniania kalceiny do wody.	100
Tab. II.9. Wyniki dopasowania funkcji Weibull'a do profili uwalniania kalceiny do roztworu o pH=10,3	100
Tab. II.10. Wyniki dopasowania funkcji Weibull'a do profili uwalniania kalceiny roztworu o pH=3,5.	101
Tab. II.11. Procentowe uwalnianie srebra z mikrocząstek węglanowych.	107
Tab. II. 12. Skala McFarlanda.	112
Tab. II.13. Badanie bakteriobójczości nAg.	113
Tab. II.14. Badanie bakteriobójczości oraz grzybobójczości materiału hybrydowego $\mu\text{-CaCO}_3$ zawierającego nAg.	113
Tab.II.15. Badanie bakteriostatyczności pierza zabezpieczonego materiałem hybrydowym zawierającym nAg.	114
Tab.II.16. Rozwój bakterii na pierzu niezabezpieczonym materiałem hybrydowym z nanocząstkami srebra.	114

Spis najczęściej używanych skrótów.

Ch	- chitozan
CCh	- chitozan zmodyfikowany chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym
CCh-FITC	- chitozan zmodyfikowany chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym z kowalencyjnie dołączoną fluoresceiną (FITC)
CMC	- O,N- karboksymetylochitozan
ACh	- O,N- karboksymetylochitozan zmodyfikowany trójtlenkiem siarki
PAH	- poli (chlorek allilamniowy)
PSS	- poli (4-styrenosulfonian sodu)
PEG	- glikol polietylenowy
PLL	- polilizyna
PGA	- poli (kwas L-glutaminowy)
HA	- kwas hialuronowy
PEI	- poli (etyleno imina)
PDADMAC	- poli (chlorek diallyldimetylamoniowy)
PVA	- poli (alkohol winylowy)

Literatura.

- ¹ G. Decher, J. B. Schlenoff Wiley “*Multilayer thin films*” VCH 2003
- ² G. Decher, *Science* **277**, 1232 (1997)
- ³ J. B. Schlenoff, H. Ly, M. Li, *J Am Chem Soc* **120**, 7626 (1998)
- ⁴ M. Elzbieciak, S. Zapotoczny, P. Nowak, R. Krastev, M. Nowakowska, P. Warszyński, *Langmuir* **25**, 3255 (2009)
- ⁵ P.T. Hammond, *Curr Opin Colloid In* **4**, 430 (2000)
- ⁶ Q. Feng, G. Zeng, P. Yang, C. Wang, J. Cai, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **257–258**, 85 (2005).
- ⁷ J. Fu, J. Ji, W. Yuan, J. Shen, *Biomaterials* **26**, 6684 (2005)
- ⁸ W. Yuan, H. Dong, C. M. Li, X. Cui, L. Yu, Z. Lu, Q. Zhou, *Langmuir* **23**, 13046 (2007).
- ⁹ S. Bharadwaj, R. Montazeri, D. T. Haynie, *Langmuir* **22**, 6093 (2006)
- ¹⁰ S. Bharadwaj, R. Montazeri, D. T. Haynie, *Langmuir*, **22**, 6093 (2006)
- ¹¹ C. B. Bucur, Z. Sui, J. B. Schlenoff, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13690 (2006)
- ¹² H. J. Bixler, A. S. Michaels, *Encycl. Polym. Sci. Technol.*, **10**, 765 (1969)
- ¹³ X. Feng, M. Leduc, R. Pelton, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **317**, 535 (2008)
- ¹⁴ P. Madhavan (Ed.), *Chitin, Chitosan and their Novel Applications*, Science Lecture Series, CIFT, Kochi, 1992, p. 1.
- ¹⁵ Miesięcznik Politechniki Warszawskiej, marzec 2006, str.20-21 www.mpw.pw.edu.pl
- ¹⁶ M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.* **31** 603 (2006)
- ¹⁷ N.V. Majeti, R. Kumar *React Funct Polym* **46**, 1 (2000)
- ¹⁸ G. Crini, *Prog. Polym. Sci.* **30**, 38 (2005)
- ¹⁹ *Wielowarstwowe ultracienkie filmy i nanokapsuły chitozanowo-chitozanowe uzyskane techniką elektrostatycznej samoorganizacji (ESA)*. Praca magisterska Maria Bulwan. 2007.
- ²⁰ W.G. Malettas, H.J. Quingley, E.D. Adickes, in: R.A.A. Muzzarelli (Ed.), *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, 1986, p. 435.
- ²¹ I.V. Yannas, H.F. Burke, D.P. Orgill, E.M. Skrabut, *Science* **215**, 174 (1982)
- ²² K.Y. Kim, D.S. Min, *Trans. Soc. Biomater.* **11**, 658 (1988)
- ²³ M.L. Markey, M.L. Bowman, M.V.W. Bergamini (Eds.), *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, 1989, p. 713.
- ²⁴ J. Kost, R. Langer, in: N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, CRC Press, Boca Raton, 1987, p. 95.
- ²⁵ Y.J. Yuji, M.X. Xu, X. Chen, K.D. Yao, *Chin. Sci. Bull.* **41**, 1266 (1996)
- ²⁶ S. Hirano, *Polym. Int.* **48**, 732 (1999)
- ²⁷ J. Wadstein, E. Thom, E. Heldman, S. Gudmunsson, B. Lilja, *Biopolymer L* **112**, *A chitosan with fat binding properties and potential as a weight reducing agent: a review of in vitro and in vivo experiments*, in: R.A.A. Muzzarelli (Ed.), Grottammare, Italy, 2000.
- ²⁸ D.T. McPherson, *Protein Expr. Purif.* **7**, 51 (1996)

-
- ²⁹ D. M. Floss, K. Schallau, S. Rose-John, U. Conrad, J. Scheller *Trends in Biotechnology* **28**, 1 (2009)
- ³⁰ D. E. Meyer, A. Chilkoti, *Biomacromolecules*, **5**, 846 (2004)
- ³¹ W. D. Urry, in “*Biomaterials Handbook—Advanced Applications of Basic Sciences and Bioengineering*”, D. L. Wise, V. Hasirci, M. J. Yaszemski, D. E. Altobelli, K. U. Lewandrowski, D. J. Trantolo, Eds.; Marcel Dekker: New York, 2003.
- ³² Urry DW. What sustains life? consilient mechanisms for protein-based machines and materials. New York: Springer-Verlag; 2005.
- ³³ J. C. Rodríguez-Cabello, M. Alonso, T. Perez, M. M. Herguedas, *Biopolymer*, **54**, 282 (2000)
- ³⁴ H. Nuhn, H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, **9**, 2755 (2008)
- ³⁵ R. Herrero-Vanrell, A.C. Rincon, M. Alonso, V. Rebo, IT Molina-Martinez, JC Rodriguez-Cabello *J Control Release* **102** 22 (2005)
- ³⁶ C.J. Buchko, L.C. Chen, Y. Shen, DC. Martin. *Polymer* **26**, 407 (1999)
- ³⁷ L. Martin, M. Alonso, A. Girotti, F.J. Arias, JC Rodriguez-Cabello, *Soft Matter*, **5**, 3 (2009)
- ³⁸ J. Hyun, W.-K. Lee, N. Nath, A. Chilkoti, S. Zauscher, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7330.
- ³⁹ K.G. Yager, C.J. Barrett doi:10.1016/j.jphotochem.2006.04.021
- ⁴⁰ M. Higuchi, N. Minoura, T. Kinoshita, *Chem. Lett.* **227** (1994)
- ⁴¹ C. Steinem, A. Janshoff, M.S. Vollmer, M.R. Ghadiri, *Langmuir* **15**, 3956 (1999)
- ⁴² A. Fissi, O. Pieroni, F. Ciardelli, *Biopolymers* **26**, 1987 (1993)
- ⁴³ K. Komori, K. Yatagai, T. Tatsuma, *J. Biotechnol.* **108**, 11 (2004)
- ⁴⁴ M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1009 (2005)
- ⁴⁵ H. Menzel, M.L. Hallensleben, A. Schmidt, W. Knoll, T. Fischer, J. Stumpe, *Macromolecules* **26**, 3644 (1993)
- ⁴⁶ M. Alonso, V. Rebo, L. Guiscardo, V. Mate and J. C. Rodriguez-Cabello *Macromolecules* **34**, 8072 (2001)
- ⁴⁷ J.H. Lee, H.B. Lee, and J.D. Andrade, *Progress in Polymer Science*, **20**, 79 (1995).
- ⁴⁸ Y. Zhou, B. Liedberg, N. Gorochoveva, R. Makuska, A. Dedinaite. and P.M. Claesson *J Colloid Interf Sci*, **305**, 62 (2008)
- ⁴⁹ C. Siegers, M. Biesalski, R. Haag, *Chemistry – A European Journal*, **10**, 8 (2004)
- ⁵⁰ J.A. Hayward, D. Chapman *Biomaterials*, **5**, 42 (1984)
- ⁵¹ G. Ladam, C. Gergely, B. Senger, G. Decher, J.-C. Voegel, P. Schaaf, F.J.G. Cuisinier, *Biomacromolecules*, **1**, 87 (2000)
- ⁵² R. Heuberger, G. Sukhorukov, j. V ö r ö s, M. Textor, H. M ö h w a l d *Advanced Functional Materials*, **15**, 66 (2005)
- ⁵³ A. Reisch, J.-C. Voegel, G. Decher, P. Schaaf, P.J. M é s i n i, *Macromol Rapid Comm*, **28**, 2217 (2007)
- ⁵⁴ S.N. Rodrigues, I.C. Gon ç a l v e s, M.C.L Martins, M.A. Barbosa, B.D. Ratner, *Biomaterials*, **27**, 5357 (2006)
- ⁵⁵ *Nanomaterials for the Life Sciences Vol.5: Nanostructured Thin Films and Surfaces*. Edited by Challa S. S. R. Kumar 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-32155-1
- ⁵⁶ D. - G. Yu, C-H. Jou, W-C. Lin, M-C. Yang, *Colloids Surface B*, **54**, 222 (2007)
- ⁵⁷ B. Thierry, F.M. Winnik, Y. Merhi M. Tabrizian, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 7494 (2003)

-
- ⁵⁸ O. Etienne, C. Picart, C. Taddei, Y. Haikel, J. L. Dimarcq, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. A. Ogier, C. Egles, *Antimicrob Agents Ch* , 3662 (2004)
- ⁵⁹ M. Katsikogianni, Y.F. Missirlis* MEu. rKopatesaink oCgeiallnsn ain adn dM Ya.tFe.r iMaliss sViorlli.s 8 (pages 37 - 57) (2004)
- ⁶⁰ E-R. Kenawy, S.D. Worley, R. Broughton, *Biomacromolecules* , **8** , 1359 (2007)
- ⁶¹ C. Aymonier, U. Schlotterbeck , L. Antonietti, P. Zacharias, R. Thomann , J.C. Tiller S. Mecking, *Chemical Communications* , **24** , 3018 (2002)
- ⁶² M. Malcher, D. Volodkin, B. Heurtault, P. André, P. Schaaf, H. Möhwald, J-C. Voegel, A. Sokolowski, V. Ball, F. Boulmedais, B.Frisch, *Langmuir* , **24** , 10209 (2008)
- ⁶³ Z. Li, D. Lee, X. Sheng, R.E. Cohen, M.F. Rubner, *Langmuir* , **22** , 9820 (2006)
- ⁶⁴ W. Yuan , J. Ji , J. Fu , J. Shen, *J Biomed Mat Res* , **85B** , 556 (2007)
- ⁶⁵ F. Zhang, Z.L. Shi, P.H. Chua, E.T. Kang, K.G. Neoh, *Industrial and Engineering Chemistry Research* , **46** , 9077 (2007)
- ⁶⁶ J.A. Lichter, M.T. Thompson, M. Delgadillo, T. Nishikawa, M.F. Rubner, K.J.V. Vliet, *Biomacromolecules* , **9** , 1571 (2008)
- ⁶⁷ R.P. Lanza and W.L. Chick, *Surgery* **121**, 1 (1997)
- ⁶⁸ J.M. Rabanel, X. Banquy, H.Zouaoui, M. Mokhtar, *Biotechnol. Prog.*, **25**, 4 (2009)
- ⁶⁹ M.V. Sefton, WTK. Stevenson, *Adv Polym Sci.* **107**, 143 (1993)
- ⁷⁰ Y. Chai , LH. Mei, LG. Wu, DQ. Lin , SJ. Yao, *Biotechnol Bioeng.* **87**, 228 (2004)
- ⁷¹ A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi, *Langmuir*, **18**, 5047 (2002)
- ⁷² S. Hong,, R. Pascale, L. Leroueil, E. K. Janus, J. L. Peters, M-M Kober, M.T. Islam, B.G. Orrames R. Baker, M. Banaszak, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 728 (2006)
- ⁷³ M. Chanana, A. Gliozzi, A. Diaspro, I. Chodnevskaia, S. Huewel, V. Moskalenko, K. Ulrichs, HJ. Galla, S. Krol, *Nano Lett.* **5**, 2605 (2005)
- ⁷⁴ C. Picart, P. Lavalle, P. Hubert, FJG. Cuisinier, G. Decher, P, Schaaf, JC. Voegel, *Langmuir*, **17**. 7414 (2001)
- ⁷⁵ NO.Dhoot, MA.Wheatley, *J Pharm Sci.* **3**, 679 (2003)
- ⁷⁶ H.M. Mansour, M. Ji Sohn, A. Al-Ghananeem, P. P. DeLuca, *Int J Mol Sci.* **9**, 3298 (2010)
- ⁷⁷ J. Salonen, L. Laitinenm A.M. Kaukonenm J. Tuura, M. Bjorkqvistm T. Heikkila, K. VahaHeikkila, J. Hirvonen, V-P. Lehto, *J Control Release*, **108** , 362 (2005)
- ⁷⁸ J. Wang, Ji-Si Chen, J.-Yi Zong, D. Zhao, F. Li, R.-Xi Zhuo, Si-X. Cheng *J. Phys. Chem. C*, **114**, 18940 (2010)
- ⁷⁹ D.V. Volodkin, R. von Klitzing, H.Mohwald DOI: 10.1002/anie.201005089 *Protein Microspheres*
- ⁸⁰ Z. She, M. N. Antipina, J. Li, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* , **11**, 1241 (2010)
- ⁸¹ T. V. Bukreeva, B. V. Parakhonskiy I. V. Marchenk , B. N. Khlebtsov N. G. Khlebtsov O. V. Dementieva M. N. Savvateev L. A. Feigin and M. V. Kovalchuk, *Nanotechnologies in Russia.*, **3**,85 (2008)
- ⁸² A. A. Antipov, D.Shchukin, Y.Fedutik, A.I. Petrov, G.B. Sukhorukov, H.Mohwald *Colloids and Surfaces A*, **224**, 175 (2003)

-
- ⁸³ J.R. Morones J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B., Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, *Nanotechnology* **16** 2346 (2005)
- ⁸⁴ Q.L. Feng J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, *J Biomed Mater*, **52**, 662 (2008)
- ⁸⁵ J.M. Koziara, P.R. Lockman, D.D. Allen, R.J. Mumper, *Pharmaceutical Research* **20**, 1772 (2003)
- ⁸⁶ F.W. Weier, *Am Ind Hyg Assoc J*, **40**, 245 (1979)
- ⁸⁷ G.A. Sotiriou, T. Sannomiya, A. Teleki, F. Krumeich, J. Vörös, S.E. Pratsinis, *Adv Funct Mater*, **20**, 4250 (2008)
- ⁸⁸ V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin, *Adv Colloid Interface Sci* **145**, 83(2009)
- ⁸⁹ B. Kim, C-S. Park, M. Murayama, M.F. Hochella, *Environ Sci Tech*, **44**, 7509 (2010)
- ⁹⁰ M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.* **31**, 603 (2006)
- ⁹¹ Z. Jiayin, W. Jianmin, *Chin J Anal Chem*, **34**, 1555 (2006)
- ⁹² S. T. Dubas, J. B. Schlenoff, *Macromolecules*, **34**, 3736 (2001)
- ⁹³ M. Alonso, V. Reboato, L. Guiscardo, V. Mate, J. C. Rodríguez-Cabello, *Macromolecules* **34**, 8072 (2001)
- ⁹⁴ A.J. Downard, S.L. Jackson S.Q. Emylen, *Australian Journal of Chemistry* **58**, 256 (2005)
- ⁹⁵ Y.H. Miao, L.E. Helseth, *Colloids and Surfaces B*, **66**, 299 (2008)
- ⁹⁶ J. Benesh, G. Hungerford, K. Suhling, C. Tregidgo, J.F. Mano and R.L. Reis *J Colloid Interf Sci.*, **312**, 193 (2007)
- ⁹⁷ J. Fu, J. Ji, W. Yuan, J. Shen, *Biomaterials* **26**, 6684 (2005)
- ⁹⁸ J. Hong, A. Larsson, K.N. Ekdahl, G. Elgue, R. Larsson and B. Nilsson, *J Lab Clin Med* **138** (2001)
- ⁹⁹ R. Huang, Y. Du., J. Yang, L. Fan., *Carbohydr Res* **338**, 483 (2003)
- ¹⁰⁰ E. Kłodzińska, M. Szumski, K. Hryniewicz, E. Dzibatkiewicz, M. Jackowski and B. Buszewski, *Electrophoresis*, 3086 (2009)
- ¹⁰¹ J. Kwieciński, S. Eick, K. Wójcik, *Int J Antimicrob Ag* **4**, 343 (2009)
- ¹⁰² S. Hong, PR. Leroueil, EK. Janus, JL. Petersm, MM. Kober, MT. Islam, BG. Orr, JR. Baker, MM. Holl *Bioconjugate Chem.* **17**, 728 (2006)
- ¹⁰³ A. Mecke, S. Uppuluri, T. M. Lee, D-K. Ramamoorthy, J.R. Baker, M.M. Holl, *Chem. Phys. Lipids* **132**, 3 (2004)
- ¹⁰⁴ A. Mecke, I.J. Majoros., A. Patri, K., Baker, M.M. Holl, B.G. Orr, *Langmuir* **21**, 10348 (2005)
- ¹⁰⁵ Q. Zhao, Z. Mao, C. Gao, J. Shen, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **17**, 997 (2006)
- ¹⁰⁶ V. Papadopoulou, K. Kosmidis, M. Valachou, P. Macheras, *Inter J Pharm* **309**, 44 (2006)
- ¹⁰⁷ P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **86**, 339 (1982)
- ¹⁰⁸ D.K. Bhui, H. Bar, P. Sarkar, G.P. Sahoo, S.P. De, A. Misra, *Journal of Molecular Liquids* **145**, 33 (2009)