



**UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

**Wydział Chemii
Instytut Nauk Chemicznych**

mgr Klaudia Szafran

**Właściwości fizykochemiczne wieloskładnikowych
filmów wybranych substancji bioaktywnych
osadzonych na nośniku PET w aspekcie zastosowań
medycznych**

Rozprawa doktorska
wykonana w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych
pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Jurak, prof. UMCS (promotor)
oraz dr. Roberta Mroczi, KUL (promotor pomocniczy)

Lublin 2023

**„Jedyny sposób by poznać, gdzie są granice naszych możliwości, to
przekroczyć je, dokonując tego, co niemożliwe”**

Arthur C. Clarke

Pragnę złożyć podziękowania moim promotorom

dr hab. Małgorzacie Jurak, prof. UMCS

oraz ***dr. Robertowi Mrocze,***

a także

dr hab. Agnieszce Ewie Wiącek, prof. UMCS

za opiekę naukową, poświęcony czas oraz cenne wskazówki i rady podczas
prowadzenia badań i powstawania niniejszej rozprawy.

Dziękuję także wszystkim osobom, bez pomocy których nie byłoby możliwe
zrealizowanie mojej pracy doktorskiej.

Rodzicom i Mężowi za nieustającą wiarę we mnie i wsparcie.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	6
Wstęp i cel pracy	9
<i>Część literaturowa</i>	14
1. Biomateriały	15
1.1. Podstawowe pojęcia opisujące biomateriał	15
1.2. Najważniejsze czynniki wpływające na biokompatybilność materiałów	16
1.2.1. Skład chemiczny powierzchni biomateriału	17
1.2.2. Topografia powierzchni biomateriału	18
1.2.3. Zwilżalność powierzchni biomateriału	19
2. Materiały stosowane do projektowania powierzchni biokompatybilnych	21
2.1. Polimery/Biopolimery	21
2.1.1. Poli(tereftalan etylenu)	21
2.1.2. Chitozan	23
2.2. Substancje bioaktywne	25
2.2.1. Leki. Cyklosporyna A	25
2.2.2. Przeciwtleniacze. Galusan laurylu	28
2.2.3. Składniki błon biologicznych. Fosfolipidy	29
3. Metody wykorzystywane do preparatyki filmów oraz ich charakterystyki na granicy faz ciecierz/powietrze	32
3.1. Metoda Langmuira	32
3.1.1. Tworzenie monowarstw Langmuira	32
3.1.2. Stan fizyczny monowarstw Langmuira	35
3.1.3. Oddziaływania międzycząsteczkowe	36
3.2. Metoda wibrującej płytki	38
3.3. Mikroskopia kąta Brewstera (BAM)	39
3.4. Metoda Langmuira-Blodgett	40
4. Metody modyfikacji powierzchni polimerów. Aktywacja plazmą	42
5. Metody wykorzystywane w charakterystyce powierzchni stałych	43
5.1. Mikroskopia sił atomowych (AFM)	43
5.2. Spektrometria mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS)	44
5.3. Pomiar kąta zwilżania (CA) i wyznaczanie swobodnej energii powierzchniowej	46
5.4. Mikrowaga kwarcowa (QCM)	48
5.5. Woltamperometria cykliczna (CV)	49
<i>Część eksperymentalna</i>	51
6. Odczynniki i nośniki	52
7. Przygotowanie roztworów	53

7.1.	Roztwory jedno- i wieloskładnikowe.....	53
7.2.	Subfazy.....	53
8.	Otrzymywanie monowarstw Langmuira oraz badanie ich właściwości	54
8.1.	Wyznaczanie izoterm $\pi - A$	54
8.2.	Wyznaczanie izoterm $\Delta V - A$	56
8.3.	Określanie morfologii	56
9.	Otrzymywanie monowarstw Langmuira-Blodgett.....	56
10.	Przygotowanie płytek PET.....	57
10.1.	Czyszczenie płytek.....	57
10.2.	Aktywacja niskotemperaturową plazmą powietrzną.....	57
11.	Badanie właściwości fizykochemicznych monowarstw Langmuira-Blodgett.....	57
11.1.	Określanie topografii powierzchni przy pomocy AFM	57
11.2.	Określanie organizacji cząsteczkowej przy pomocy TOF-SIMS.....	58
11.3.	Określanie zwilżalności przy pomocy pomiarów kąta zwilżania CA.....	59
11.4.	Określanie stopnia pokrycia powierzchni nośnika przy pomocy QCM.....	59
11.5.	Określanie jakości pokrycia przy pomocy CV.....	60
	<i>Opis oraz dyskusja wyników</i>	<i>62</i>
12.	Charakterystyka monowarstw (filmów) Langmuira jedno- i wieloskładnikowych (DOPC, CsA, i/lub LG) otrzymanych na różnych subfazach (woda, AA, Ch).....	63
12.1.	Izotermie $\pi - A$	64
12.2.	Moduł ściśliwości.....	72
12.3.	Analiza termodynamiczna mieszalności składników.....	78
12.4.	Morfologia monowarstw.....	86
12.5.	Izotermie $\Delta V - A$ oraz zależności $\mu_a - A$	88
12.6.	Mechanizm oddziaływań cząsteczek monowarstwy i ciekłej fazy nośnej.....	93
13.	Dobór optymalnych warunków przenoszenia i określenie efektywności przenoszenia monowarstw (filmów) Langmuira z granicy faz ciecz/powietrze na nośnik stały.....	101
13.1.	Stabilność monowarstw w czasie (izotermie $\pi - t$).....	102
13.2.	Odwracalność procesu sprężania (izotermie sprężania-rozprężania).....	111
13.3.	Współczynnik przeniesienia.....	113
13.4.	Stopień pokrycia powierzchni.....	116
13.5.	Jakość pokrycia powierzchni	119
14.	Charakterystyka monowarstw (filmów) Langmuira-Blodgett jedno- i wieloskładnikowych (DOPC, CsA i/lub LG) otrzymanych na różnych nośnikach.....	123
14.1.	Topografia i chropowatość powierzchni.....	123
14.2.	Organizacja cząsteczkowa	138
14.3.	Zwilżalność i swobodna energia powierzchniowa.....	157
15.	Podsumowanie i wnioski.....	175

16.	Literatura.....	181
17.	Dorobek naukowy	209
17.1.	Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej	209
17.2.	Pozostałe publikacje i monografie nieobjęte rozprawą doktorską	211
17.3.	Konferencje naukowe.....	212
17.4.	Szkoły letnie.....	221
17.5.	Współpraca naukowo-badawcza	221
17.6.	Nagrody i wyróżnienia	221
17.7.	Dodatkowa aktywność organizacyjna i członkostwo naukowe	222
17.8.	Prowadzenie zajęć dydaktycznych.....	223
18.	Streszczenie.....	224
19.	Summary	227

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

AA	- kwas octowy
A	- powierzchnia przypadająca na cząsteczkę
A_0	- powierzchnia przypadająca na cząsteczkę, przy której zauważalny jest wzrost ciśnienia powierzchniowego podczas sprężania monowarstwy
A_e	- powierzchnia nadmiarowa
A_{el}	- powierzchnia elektrody
A_i	- powierzchnia przypadająca na cząsteczkę przy ciśnieniu przenoszenia
A_{lim}	- powierzchnia graniczna
A_s	- powierzchnia nośnika
AB	- oddziaływania polarne kwasowo-zasadowe
AFM	- mikroskop sił atomowych
BAM	- mikroskop kąta Brewstera
C	- faza stała monowarstwy
CA	- kąt zwilżania
Ch	- chitozan
CsA	- cyklosporyna A
C_s^{-1}	- moduł ściśliwości
$C_{s,max}^{-1}$	- maksymalna wartość modułu ściśliwości
CV	- woltamperometria cykliczna
DD	- stopień deacetylacji
DOPC	- 1,2-dioleilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
DPPC	- 1,2-dipalmitoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
DPPE	- 1,2-dipalmitoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DPPG	- 1,2-dipalmitoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
DPPS	- 1,2-dipalmitoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoseryna
DSPA	- kwas 1,2-distearoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydowy
DSPG	- 1,2-distearoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
$E_{p,a}$	- potencjał anodowy
$E_{p,c}$	- potencjał katodowy
f_0	- podstawowa częstotliwość rezonansowa
G	- faza gazowa monowarstwy
I_w	- intensywność względna
$J_{p,a}$	- gęstość prądu anodowego

$J_{p,c}$	- gęstość prądu katodowego
LB	- film Langmuira-Blodgett
LC	- faza ciekła skondensowana monowarstwy
LE	- faza ciekła rozprężona monowarstwy
LG	- galusan lauryłu
LW	- oddziaływania Lifshitz-van der Waalsa
m/z	- stosunek masy do ładunku
PET	- poli(tereftalan etylenu)
PET _p	- poli(tereftalan etylenu) aktywowany plazmą powietrzną
PL	- fosfolipidy
POPC	- 1-palmitoilo-2-oleoilo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
QCM	- mikrowaga kwarcowa
ROS	- reaktywne formy tlenu
R	- stała gazowa
S	- faza stała monowarstwy
S_a	- średnia arytmetyczna odchylenia profilu chropowatości
S_q	- średnie kwadratowe odchylenie profilu chropowatości
T	- temperatura
TOF-SIMS	- spektrometria mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu
TR	- współczynnik przeniesienia
W_A^α	- praca adhezji
γ	- napięcie powierzchniowe subfazy w obecności monowarstwy
γ_0	- napięcie powierzchniowe subfazy
γ_l	- napięcie powierzchniowe cieczy
γ_s	- swobodna energia powierzchniowa ciała stałego
γ_{sl}	- swobodna energia międzyfazowa ciało stałe/ciecz
γ_s^{AB}	- składowa kwasowo-zasadowa swobodnej energii powierzchniowej
γ_s^{LW}	- składowa Lifshitz-van der Waalsa swobodnej energii powierzchniowej
γ_s^{tot}	- całkowita swobodna energia powierzchniowa
$\gamma_{s/l}^+$	- parametr elektrono-akceptorowy swobodnej energii powierzchniowej
$\gamma_{s/l}^-$	- parametr elektrono-donorowy swobodnej energii powierzchniowej
Γ	- stopień pokrycia
ΔA_m	- wartość powierzchni przypadającej na cząsteczkę skorygowana o desorpcję cząsteczek z monowarstwy do fazy nośnej

ΔG_e	- nadmiarowa energia mieszania Gibbsa
ΔG_m	- całkowita energia mieszania Gibbsa
Δm	- zmiana masy
ΔV	- zmiana potencjału powierzchniowego
ε	- przenikalność monowarstwy
ε_0	- przenikalność w próżni
θ	- kąt zwilżania
θ^D	- wstępujący kąt zwilżania diiodometanu
θ^F	- wstępujący kąt zwilżania formamidu
θ^W	- wstępujący kąt zwilżania wody
μ_a	- pozorny moment dipolowy
μ_{ak}	- moduł ścinania kwarcu
μ_n	- efektywny moment dipolowy
π	- ciśnienie powierzchniowe
π_c	- ciśnienie załamania monowarstwy
π_t	- wartość ciśnienia powierzchniowego w czasie
π_0	- początkowa wartość ciśnienia powierzchniowego
ρ_q	- gęstość kwarcu
χ	- ułamek molowy

Wstęp i cel pracy

W ostatnich dziesięcioleciach biomateriały stosowane jako implanty zyskały ogromne znaczenie w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Do ich wytwarzania najpowszechniej stosuje się metale oraz polimery naturalne i/lub syntetyczne. Wśród polimerów na uwagę zasługuje poli(tereftalan etylenu), PET, wykorzystywany w rekonstrukcji naczyń krwionośnych, jako zewnętrzna warstwa stentów metalowych albo samodzielnie [1-3]. Siatka wykonana z PET poprawia przepływ krwi i zmniejsza ryzyko przedostania się blaszki miażdżycowej do naczynia [4]. Pomimo odpowiedniej odporności chemicznej [2], elastyczności i wytrzymałości włókna, PET w kontakcie z żywymi komórkami wywołuje negatywną odpowiedź immunologiczną, która może skutkować odrzuceniem implantu [1]. Jest to spowodowane niską biokompatybilnością polimeru. Dlatego też, konieczna jest modyfikacja jego powierzchni. Okazuje się, że powlekanie PET naturalnym polimerem, przykładowo wybranym do badań chitozaniem (Ch) zwiększa stopień biozgodności, dodatkowo chroniąc przed stanami zapalnymi wywoływanymi przez drobnoustroje [5, 6]. Ponadto ten naturalny polisacharyd może jednocześnie pełnić funkcje systemu kontrolowanego uwalniania leków, eliminując problem ograniczonej biodostępności. Istnieją badania, które potwierdzają, że układy, w których obecny jest chitozan są dobrymi nośnikami leków zapobiegającymi nawrotom zwężenia naczyń krwionośnych [7-9]. Z drugiej strony, efektem niepożądanym jest to, że chitozan w kontakcie z krwią zyskuje ładunek dodatni, co sprzyja adhezji składników krwi i tworzeniu skrzepu [10]. W związku z tym, aby zwiększyć biokompatybilność konieczna jest dalsza modyfikacja powierzchni PET z naniesionym filmem chitozanowym prowadząca do uzyskania warstwy wierzchniej o optymalnych właściwościach fizykochemicznych i dodatkowo zmniejszająca ryzyko aktywacji układu odpornościowego, tworzenia skrzepów krwi lub powstania stanów zapalnych.

W tym celu pojawiła się idea wykorzystania wybranych substancji bioaktywnych o właściwościach immunosupresyjnych (przykładowo cyklosporyny A - CsA), przeciwutleniających (galusanu laurylu - LG) i/lub przyjaznych dla komórek, składników naturalnych błon biologicznych (z grupy fosfolipidów - PL). CsA jest lekiem powszechnie stosowanym w zapobieganiu odrzucenia przeszczepu, między innymi poprzez zdolność do hamowania aktywacji limfocytów T [11]. Jednakże ze względu na wysoką lipofilowość i małą przepuszczalność przez błony biologiczne, terapia doustna jest mało efektywna [12-14]. Dlatego też wprowadzenie CsA bezpośrednio na

powierzchnię stentów może znacząco poprawić jej biodostępność. Jednakże, terapia tym immunosupresantem wywołuje szereg niepożądanych skutków ubocznych związanych z uwalnianiem reaktywnych form tlenu, które wobec braku lub osłabionych mechanizmów naprawczych komórki, prowadzą do utleniania lipidów w błonach. Tego typu procesy uszkadzają komórki organizmu [15, 16], co w konsekwencji skutkuje odrzuceniem implantu. Dlatego, aby zapobiec efektom negatywnym działania leku (między innymi nefro-, hepato- i kardiotoxycznosci) pojawiła się koncepcja wprowadzenia związków o aktywności przeciwutleniającej. Jednym z takich związków jest galusan laurylu (LG) - pochodna kwasu galusowego. Badania potwierdzają jego zdolność do znacznego hamowania procesu utleniania lipidów [17, 18]. Dodatkowo LG wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe [19]. Ponadto podobnie jak kwas galusowy, może wywierać pozytywny wpływ na poprawę funkcji serca podczas terapii CsA [20].

Z kolei użycie fosfolipidów doskonale imituje środowisko błon biologicznych, co jest bardzo ważne w zrozumieniu oddziaływań implant/komórka, a w zastosowaniach praktycznych zapewnia naturalne połączenie implantu z otaczającymi go tkankami.

Jednymi z pierwszych stentów wykorzystywanych w medycynie były nieulegające degradacji stenty metaliczne, między innymi wykonane ze stali szlachetnej. Do wytwarzania szkieletu stentów metalicznych stosuje się także tantal, stop kobaltu i chromu, platyny i chromu, nitinol (stop niklu i tytanu), oraz stopy magnezu [4, 21]. Pomimo zadowalających właściwości mechanicznych, w wyniku korozji powierzchni, jony metali mogą się uwalniać do otaczających tkanek. Taki proces wywołuje niekorzystne skutki uboczne, takie jak powstawanie skrzepów, stan zapalny, namnażanie się i przerost tkanek na styku stentu z tkanką naczyniową lub krwią, a nawet zawężenie leczonego naczynia krwionośnego [22-24]. Dlatego też naukowcy prowadzą badania nad pokryciami metalicznych stentów, które mają na celu poprawę biokompatybilności oraz zapobieganie uwalnianiu jonów z ich powierzchni [24]. Jako powłokę ochronną tego typu stentów można zastosować między innymi warstwę złota. Złoto cechuje się dużą odpornością na korozję oraz łatwością dostosowywania się do tkanek w organizmie ludzkim, a także niewielką adhezją płytek krwi i w efekcie redukcją tworzenia skrzepin. Pomimo tego, że stenty pokryte złotem przeszły wszelkie rygorystyczne badania, wyniki kliniczne nie były zadowalające [24]. Dlatego koniecznym wydaje się ich dalsza modyfikacja. Co więcej, użycie przewodzącego podłoża metalicznego otwiera

możliwości wykorzystania w badaniach dodatkowych technik służących charakterystyce pokryć.

Wybrane do badań związki, wyłączając chitozan, mogą tworzyć zorganizowane monowarstwy Langmuira, jedno- lub wieloskładnikowe, o ściśle zdefiniowanym składzie i orientacji cząsteczek, na ciekłej fazie nośnej. Roztwory polisacharydów stanowią wówczas subfazę dla monowarstw. Tego typu układy mogą zostać użyte do pokrycia powierzchni PET i/lub złota za pomocą techniki Langmuira-Blodgett (LB) w celu uzyskania kontroli nad właściwościami jego powierzchni, tj. składem chemicznym, topografią, zwilżalnością, które wpływają na adhezję komórek, a tym samym na pozytywną odpowiedź organizmu na ciało obce. Przeprowadzenie takich badań jest konieczne w projektowaniu powłok nowej generacji dla implantów w aspekcie wzrostu ich biokompatybilności.

Biorąc pod uwagę złożony proces projektowania nowoczesnych biokompatybilnych powłok do zastosowań w chirurgii rekonstrukcyjnej celem dysertacji było:

- 1) *Scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych cienkich filmów jedno-, dwu- i trójskładnikowych zawierających fosfolipid, immunosupresant i/lub przeciwutleniacz, utworzonych na ciekłej fazie nośnej o różnym składzie (woda, roztwór kwasu octowego, roztwór chitozanu);*
- 2) *Określenie mechanizmu oddziaływań między cząsteczkami tworzącymi monowarstwy jedno-, dwu- i trójskładnikowe oraz cząsteczkami subfazy;*
- 3) *Przeniesienie badanych monowarstw o ściśle określonym składzie i właściwościach na nośnik stały (PET, mikę, mikę i/lub szkło z naniesioną warstwą złota);*
- 4) *Scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych monowarstw przeniesionych na ciało stałe pod kątem struktury i oddziaływań międzycząsteczkowych, w oparciu o mikroskopię sił atomowych, spektrometrię mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu oraz pomiary kąta zwilżania.*

Realizacja założonych celów pozwoliła na uzyskanie nowych informacji na temat organizacji przestrzennej mieszanych filmów wieloskładnikowych, ich upakowania, uporządkowania, orientacji cząsteczek, mieszalności, stabilności oraz rodzaju i wielkości oddziaływań. Poszerzenie stanu wiedzy w tym zakresie jest niezbędne dla pełnego zrozumienia i przewidywania procesów fizykochemicznych zachodzących

w skomplikowanych układach biologicznych w obszarze implant (stent)/tkanka. Literatura przedmiotu w tym zakresie jest bardzo obszerna, ale z uwagi na złożoność procesów zachodzących w organizmie człowieka, indywidualny przebieg choroby, wysoką specyficzność odpowiedzi immunologicznej u poszczególnych pacjentów wciąż pojawiają się nowe doniesienia przybliżające naukowców i lekarzy do otrzymania biomateriału idealnego [2, 24-37]. Zaplanowane badania ściśle wpisują się w te trendy i mają na względzie przede wszystkim lepsze poznanie mechanizmów biofizycznych oraz pełniejszą charakterystykę czynników odpowiedzialnych za oddziaływania na poziomie cząsteczkowym, istotnych w projektowaniu nowatorskich zamienników tkanek i/lub systemów kontrolowanego uwalniania leków.

W trakcie planowania badań wchodzących w zakres dysertacji zdecydowano, że w realizacji głównych celów badawczych pomocne będą następujące cele cząstkowe:

- 1) preparatyka i charakterystyka monowarstw jedno- i wieloskładnikowych fosfolipidu 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DOPC) i/lub 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DPPC), cyklosporyny A, przeciwutleniacza LG na subfazach ciekłych o odmiennym składzie przy użyciu techniki Langmuira i technik sprzężonych:
 - a) otrzymanie zależności ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie (izoterm $\pi - A$),
 - b) określenie stanu fizycznego monowarstw w oparciu o wartości modułu ściśliwości,
 - c) jakościowa i ilościowa analiza oddziaływań w układach wieloskładnikowych na podstawie zmian wartości powierzchni nadmiarowej i nadmiarowej energii mieszania Gibbsa,
 - d) badanie morfologii powierzchni i grubości otrzymanych monowarstw przy użyciu mikroskopii kąta Brewstera (BAM),
 - e) otrzymanie zależności zmian potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie (izoterm $\Delta V - A$),
 - f) określenie wpływu składu ciekłej fazy nośnej na właściwości monowarstw Langmuira.
- 2) Dobór optymalnych warunków przenoszenia i przenoszenie monowarstw o zdefiniowanym składzie i orientacji cząsteczek na powierzchnię PET aktywowaną niskotemperaturową plazmą powietrzną i/lub inne nośniki (mikę, mikę pokrytą

złotem, szkło pokryte złotem, kryształ kwarcu z napyłonymi elektrodami złotymi), przy użyciu techniki Langmuira-Blodgett:

- a) monitorowanie zmian ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu (stabilność monowarstw),
 - b) określenie zmian powierzchni przypadającej na cząsteczkę w czasie przy stałym ciśnieniu powierzchniowym,
 - c) wyznaczenie izoterm sprężania-rozprężania przy wybranych wartościach ciśnienia powierzchniowego,
 - d) wyznaczenie współczynnika przeniesienia monowarstw (TR),
 - e) określenie wpływu rodzaju podłoża na współczynnik przeniesienia badanych monowarstw.
- 3) Charakterystyka właściwości fizykochemicznych powierzchni jedno- i wieloskładnikowych filmów badanych substancji osadzonych na aktywowanej powierzchni PET i/lub innych nośnikach (mice, mice pokrytej złotem, szkłe pokryte złotem, kryształy kwarcu z napyłonymi elektrodami złotymi) poprzez:
- a) badanie struktury morfologicznej oraz cząsteczkowej przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM), spektrometrii mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS),
 - b) pomiary kątów zwilżania cieczy testowych o znanych składowych napięcia powierzchniowego (wody, formamidu, diiodometanu),
 - c) wyznaczenie oddziaływań apolarnych Lifshitz-a-van der Waalsa (LW) i polarnych kwasowo-zasadowych (AB) przy wykorzystaniu podejścia van Ossa, Gooda i Chaudhury'ego (LWAB) oraz oszacowanie zmian pozornej całkowitej swobodnej energii powierzchniowej,
 - d) wykorzystanie mikrowagi kwarcowej (QCM) oraz woltamperometrii cyklicznej (CV) w celu pełniejszej charakterystyki powierzchni przy zastosowaniu nośników stałych z osadzoną warstwą złota,
 - e) określenie wpływu podłoża na właściwości monowarstw osadzonych na nośniku stałym.
- 4) Poszukiwanie korelacji pomiędzy właściwościami zorganizowanych monowarstw wieloskładnikowych utworzonych na cieczy i analogicznych po przeniesieniu na nośnik stały pod kątem struktury i oddziaływań międzycząsteczkowych.

Część literaturowa

1. Biomateriały

1.1. Podstawowe pojęcia opisujące biomateriał

Inżynieria tkankowa to interdyscyplinarna dziedzina medycyny, której zadaniem jest regeneracja i utrzymanie lub poprawa funkcjonowania tkanek. W tym celu wytwarzane są materiały zdolne do ich naprawy lub też wymiany w organizmie ludzkim, tak zwane biomateriały. **Biomateriał** definiuje się jako materiał naturalny lub syntetyczny o określonej formie, który poprzez oddziaływania z żywymi komórkami może kierować przebiegiem procedury diagnostycznej lub terapeutycznej [38]. Materiały wykorzystywane do tego celu muszą przypominać strukturę naturalnej tkanki i mieć zbliżone do niej właściwości mechaniczne. Biomateriałem może być między innymi proteza lub implant. Najczęściej stosowanym terminem opisującym odpowiednie wymagania biologiczne biomateriału jest **biokompatybilność (biozgodność)**. Termin ten oznacza zdolność materiału do wywoływania prawidłowej odpowiedzi gospodarza, czyli dokładnie takich reakcji, jakie spowodowałaby analogiczna tkanka ciała w określonym zastosowaniu nie powodując żadnych niepożądanych efektów ubocznych [29, 32, 39, 40]. Ponadto materiał biokompatybilny powinien posiadać odpowiednie właściwości powierzchniowe wpływające na adhezję komórek i biodegradowalność [35, 41, 42]. Z kolei „prawidłowa **odpowiedź gospodarza**” oznacza identyfikację i charakterystykę reakcji tkanek, które mogą okazać się szkodliwe dla gospodarza i/lub doprowadzić do ostatecznego uszkodzenia biomateriału w wyniku działania mechanizmów homeostatycznych [29].

Niezwykle ważnym pojęciem jest także **hemokompatybilność** oznaczająca właściwość materiału, która umożliwia mu funkcjonowanie w kontakcie z krwią bez wywołania reakcji niepożądanych. Powierzchnia hemokompatybilna to taka, która wywołuje niewielką adhezję i aktywację płytek krwi lub też nie wywołuje ich wcale. W związku z tym, nie powinna powodować powstawania zakrzepów oraz stanów zapalnych, natomiast powinna ułatwiać gojenie tkanek [28, 32]. Ze względu na fakt, że krew jest pierwszym płynem ustrojowym, który ma kontakt z każdym biomateriałem, hemokompatybilność ma ogromne znaczenie w wielu procedurach klinicznych, w tym w rekonstrukcji naczyń krwionośnych, przeszczepach naczyniowych, wprowadzaniu stentów, zastawek serca, itp. [28].

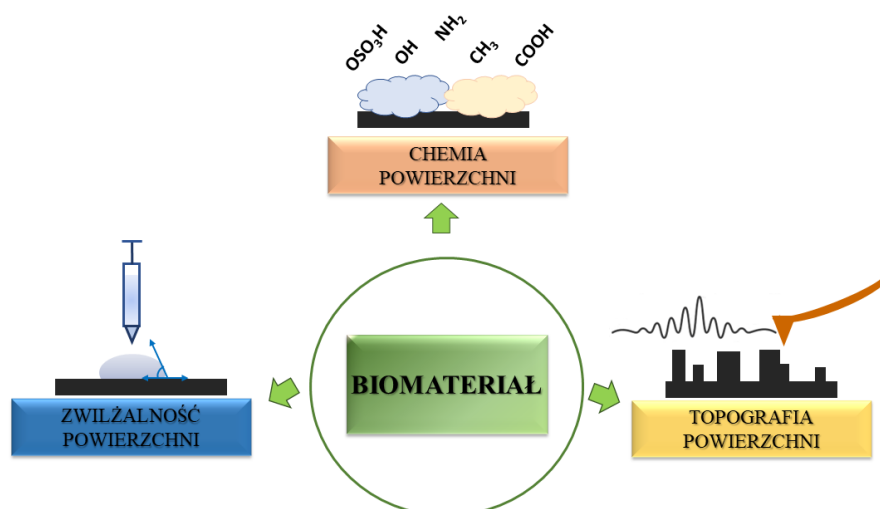
Ponadto biomateriały mogą również pełnić funkcję nośników komórek oraz skutecznie dostarczać leki w pożądanym miejscu, eliminując problem biodostępności

medykamentów lub skutków ubocznych terapii. W ostatnich dziesięcioleciach sztuczne materiały zostały znacznie ulepszone dzięki inżynierii biomedycznej, ale nadal wymagają większej biokompatybilności i biofunkcjonalności [43].

1.2. Najważniejsze czynniki wpływające na biokompatybilność materiałów

Rozważając zespół reakcji fizjologicznych po wprowadzeniu biomateriału do organizmu, często w pierwszej kolejności bierze się pod uwagę niepożądane reakcje w skali makro. Obejmują one przede wszystkim rozwój ostrych i przewlekłych stanów zapalnych będących odpowiedzią na ciało obce. Ogólnie w tych procesach kluczową rolę odgrywa adsorpcja białek na powierzchni materiału, wytwarzanie i działanie (aktywność) komórek układu immunologicznego, w tym leukocytów, oraz rozwój reakcji zapalnej kontrolowany przez obecne w środowisku mediatory zapalenia [44, 45]. Na adaptację biomateriału po wprowadzeniu do organizmu ma wpływ wiele czynników. Przede wszystkim właściwości powierzchniowe materiału mają szczególne znaczenie, ponieważ determinują oddziaływania zachodzące między jego powierzchnią zewnętrzną a otaczającymi ją komórkami [41, 46-48]. Dlatego też to zewnętrzna warstwa materiału stanowi łącznik pomiędzy komórkami a biomateriałem, odpowiadając za jego żywotność. Do głównych cech wpływających na biokompatybilność materiału można zaliczyć (Rysunek 1):

- skład chemiczny,
- topografię,
- degradację,
- charakter hydrofilowo-hydrofobowy,
- zwilżalność,
- swobodną energię powierzchniową,
- zdolność do wiązania białek.



Rysunek 1 Schemat kluczowych czynników wpływających na biokompatybilność biomateriału. Opracowanie własne.

Znajomość i zrozumienie, jak powierzchnia wszczepionego biomateriału wpływa na szlaki biochemiczne jest kluczowe w opracowaniu metod optymalizacji właściwości materiałów przed implantacją [41].

1.2.1. Skład chemiczny powierzchni biomateriału

Skład chemiczny powierzchni biomateriału to pierwsza z istotnych właściwości, którą należy wziąć pod uwagę podczas projektowania biokompatybilnych materiałów stosowanych w medycynie. Obecność ściśle określonych grup funkcyjnych, które warunkują odpowiednią topografię oraz zwilżalność powierzchni, a także nano- i mikrostruktura wpływają na adhezję komórek oraz wiązanie białek. Ponadto w pierwszym etapie po implantacji, powierzchnia biomateriału oddziałuje z cząsteczkami wody oraz płynami ustrojowymi. W związku z tym na powierzchni materiału powinny znaleźć się grupy funkcyjne umożliwiające adhezję tych cząsteczek. Dzięki przyłączeniu białek możliwe są dalsze procesy integracji ciała stałego w organizmie, do których można zaliczyć adhezję, migrację, proliferację oraz różnicowanie komórek [49-52].

W przypadku biomateriału stosowanego w układzie krwionośnym w celu poprawy jego hemokompatybilności wprowadza się dodatkowe grupy funkcyjne, $-OH$, $-NH_2$, $-CH_3$, $-COOH$, $-OSO_3H$ [25, 53, 54]. Ich obecność zmienia odpowiedź biologiczną organizmu. Może powodować zwiększenie namnażania komórek, zmniejszenie adhezji płytek krwi lub umożliwić immobilizację cząsteczek innych

substancji bioaktywnych. Zaobserwowano, że wzrost stężenia powierzchniowych grup hydroksylowych powoduje zwiększoną aktywację składników osocza [55], podczas gdy zwiększona metylacja skutkuje zmniejszeniem ich aktywacji [56]. Poza tym wykazano także, że zwiększone stężenie tlenu zmniejsza aktywację krzepnięcia [57, 58].

Jedną z metod wprowadzania nowych grup funkcyjnych na powierzchnię biomateriału jest zastosowanie plazmy [26, 59, 60], która jednocześnie wpływa na jego topografię, zwiększając chropowatość [26]. Wykazano również, że krótkotrwała ekspozycja biomateriału na zjonizowany gaz poprawia adhezję, a w niektórych przypadkach aktywację płytek krwi, głównie poprzez wzbogacenie powierzchni o nowe grupy zawierające tlen. Jednak efekty obróbki plazmą nie są długotrwałe i mogą z czasem ustępować [30].

1.2.2. Topografia powierzchni biomateriału

W celu wytworzenia biomateriałów istotne jest rozważenie wpływu architektury powierzchni materiału na reakcję żywego organizmu. Ta właściwość biomateriału wpływa przede wszystkim na reakcje komórkowe oraz odpowiedź komórek gospodarza na uwalniany lek. Zróżnicowana topografia powierzchni generuje różne formy kontaktu komórek z otaczającym je środowiskiem. Chropowatość powierzchni w skali mikro modyfikuje odpowiedź komórek *in vitro* oraz biokompatybilność i adhezję tkanek *in vivo*. Ponadto zmiany powierzchni w skali nano- i mikrometrów indukują zmiany w procesach: adhezji, orientacji, rozprzestrzeniania i tworzenia cytoszkieletu makrofagów [27, 30].

Chropowatość jest najczęściej używanym w literaturze terminem do charakteryzowania powierzchni [41]. Parametr ten odnosi się do struktury i topografii zewnętrznej warstwy powierzchni materiału i bardzo często jest stosowany do opisu matrycy do testów *in vitro*. Niemniej jednak zawsze należy mieć na uwadze, że oszacowane parametry chropowatości mogą się znacząco różnić w zależności od wielkości mierzonego obszaru. Ponadto chropowatość nie zawsze wskazuje na rzeczywistą topografię powierzchni. Wpływ chropowatości powierzchni na zachowanie komórek może być bezpośredni i pośredni oraz ściśle zależy od ich rodzaju i wielu związanych z nimi złożonych procesów wieloetapowych [32]. Literatura podaje, że duża chropowatość powierzchni polimeru powoduje znaczące zmniejszenie kontaktu z płytkami krwi wpływając na odpowiedź hemostatyczną organizmu [28]. Poza tym, naukowcy określili przedziały wielkości chropowatości powierzchni, które kontrolują kontakt i adhezję płytek krwi. Kiedy chropowatość jest większa niż 2 μm uzyskuje się

większą powierzchnię kontaktu polimer-płytki krwi, co prowadzi w większym stopniu do powstawania zakrzepów. Za najbardziej optymalną wielkość tego parametru uważa się wartości mniejsze niż 2 μm i większe niż 50 nm. Taka powierzchnia cechuje się występowaniem wypukłości oraz zagłębień. W związku z tym, płytki krwi mogą przylegać tylko do wypukłości na powierzchni, co powoduje, że kontakt tych składników krwi z biomateriałem jest mniejszy. W efekcie występuje mniejsza adhezja płytek i ograniczone tworzenie skrzepliny. Z kolei chropowatość mniejsza niż 50 nm ma niewielki wpływ na wiązanie komórek krwi z powierzchnią [28]. Można zatem stwierdzić, że określenie topografii biomateriału jest niezbędne w aspekcie jego biokompatybilności i poprzez różne modyfikacje może być odpowiednio projektowane.

1.2.3. Zwilżalność powierzchni biomateriału

Kolejny parametr powierzchni, zwilżalność jest również uważana za jeden z najważniejszych czynników wpływających na odpowiedź biologiczną organizmu po wprowadzeniu biomateriału związaną z adsorpcją białek [41, 61]. Jest ona warunkowana wcześniej omówionymi właściwościami materiału, tj. składem chemicznym oraz topografią powierzchni. Cząsteczki wody, jako pierwsze oddziałują i wiążą się z powierzchnią biomateriału [62, 63] wpływając na interakcje z białkami oraz pozostałymi cząsteczkami. Powierzchnie hydrofobowe znacznie częściej wiążą białka niż powierzchnie hydrofilowe. Wynika to przede wszystkim z obecności silnych oddziaływań odpychających białko-hydrofilowa powierzchnia biomateriału, na której występują w dużej mierze właśnie związane cząsteczki wody [64]. Dodatkowo ze względu na fakt, że w płynach ustrojowych znajduje się wiele różnych białek dochodzi pomiędzy nimi do rywalizacji o powierzchnię biomateriału, a to z kolei może wpływać na wiązanie i/lub aktywację płytek krwi oraz zmiany konformacji białek [61].

Doniesienia literaturowe na temat wpływu zwilżalności powierzchni na hemokompatybilność nie są jednoznaczne, co prawdopodobnie wiąże się ze złożonością procesów, jakie zachodzą we krwi oraz umiejętnością ich powiązania z parametrami biomateriałów, takimi jak skład chemiczny i morfologia powierzchni [54, 65-67]. Chociaż istnieją prace, w których odnotowano większą adsorpcję białek na powierzchni hydrofilowej, to aktywacja białek była większa na powierzchniach o większej hydrofobowości [65, 68]. Poza tym, wiele badań potwierdziło, że największa liczba płytek krwi występuje na powierzchniach hydrofilowych badanych próbek [54, 66]. Ponadto inni naukowcy dowiedli, że największa szybkość wiązania i rozprzestrzeniania

się komórek wystąpiła na powierzchniach, na których wartości kąta zwilżania wody były mniejsze niż 60° , a dla powierzchni bardziej hydrofobowych szybkość była znacznie niższa [69]. Do podobnych wniosków doszli także Xu i współ. [67] stwierdzając, że przy wartościach kąta zwilżania wody pomiędzy 60° a 65° wystąpił znaczny wzrost adhezji badanych białek.

Biomateriały stosowane w inżynierii tkankowej obejmują polimery naturalne (np. chitozan [70-72]) i syntetyczne (m.in. poli(tereftalan etylenu) [1, 3, 73, 74]), metale (przykładowo złoto [75-77]), materiały nieorganiczne, materiały pochodzenia biologicznego oraz materiały kompozytowe, w których skład mogą wchodzić wyżej wymienione. Ponadto wiele innych substancji bioaktywnych może ułatwiać naprawę i regenerację tkanek.

2. Materiały stosowane do projektowania powierzchni biokompatybilnych

2.1. Polimery/Biopolimery

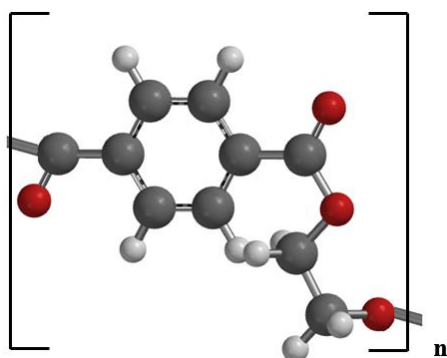
Polimery można podzielić na dwie główne klasy w zależności od pochodzenia: syntetyczne i naturalne. Polimery pochodzenia syntetycznego mają szerokie spektrum zastosowań ze względu na możliwość dostosowania ich właściwości i szybkości degradacji w zależności od potrzeb. Natomiast polimery naturalne cechują się doskonałą biokompatybilnością, ale nie zostały w pełni zbadane ze względu na ich niepożądane właściwości [78]. Niestabilność polimerów prowadząca do biodegradacji okazała się niezwykle ważna w wielu zastosowaniach medycznych [79]. Biodegradowalne polimery oferują ogromny potencjał w wielu dziedzinach, takich jak dostarczanie leków, inżynieria tkankowa, terapia genowa, medycyna regeneracyjna, implanty tymczasowe, powłoki na implantach [80-82]. Podstawowymi kryteriami wyboru polimeru do zastosowania jako biomateriał są: dopasowanie właściwości mechanicznych i szybkości degradacji, nietoksyczne produkty degradacji, biokompatybilność, okres stabilności, przetwarzalność i koszt [78, 83]. Właściwości mechaniczne powinny być dopasowane do zastosowania, tak aby uzyskać wytrzymałość wystarczającą do czasu wygojenia otaczającej tkanki [84]. Dostępnych jest wiele polimerów, przy czym wybór odpowiedniego zależy od wymagań, jakie musi spełniać dany biomateriał. Wśród nich można wyróżnić między innymi te, użyte w badaniach wchodzących w skład dysertacji, poliestry (poli(tereftalan etylenu)) oraz polisacharydy (chitozan).

2.1.1. Poli(tereftalan etylenu)

Poliestrami nazywa się związki wielkocząsteczkowe powstałe w wyniku reakcji polikondensacji zachodzącej między monomerami, w której wiązanie między cząsteczkami zachodzi poprzez tworzenie grup estrowych w obrębie głównych łańcuchów makrocząsteczek [85]. Poliestry mogą występować naturalnie lub być syntetyzowane. Poliestry naturalne są biodegradowalne, a syntetyczne w większości nie ulegają biodegradacji [86]. O właściwościach poliestrów decyduje rodzaj stosowanych substratów oraz grup funkcyjnych produktu, a także ich stopień nienasycenia. Poliestry można podzielić na liniowe, nienasycone oraz żywice alkidowe. Do pierwszej grupy polimerów, którą stanowią poliestry alifatycznych kwasów dikarboksylowych i glikoli należy *poli(tereftalan etylenu)*, PET. PET to liniowy nasycony poliester kwasu

tereftalowego i/lub jego metylowych pochodnych oraz glikolu etylenowego lub tlenku etylenu (Rysunek 2). Został odkryty w 1941 r. w Wielkiej Brytanii. Naukowcy wykazali, że ten aromatyczny poliester na bazie kwasu tereftalowego daje mocny, odporny materiał o wysokiej temperaturze topnienia i dobrych właściwościach mechanicznych [85, 87]. Istnieje kilka metod otrzymywania tego polimeru, do których można zaliczyć:

- wymianę estrową i polikondensację prowadzoną w sposób ciągły lub okresowy,
- polikondensację kwasu tereftalowego i glikolu etylenowego,
- polikondensację kwasu tereftalowego i tlenku etylenu.



Rysunek 2 Struktura meru poli(tereftalanu etylenowego). Opracowanie własne przy użyciu programu Spartan 08 V 1.2.0. Kolor szary symbolizuje atomy węgla, czerwony atomy tlenu, a biały atomy wodoru.

PET może być otrzymany w postaci amorficznej lub krystalicznej [87]. Obecność dużych pierścieni benzenowych w powtarzających się jednostkach nadaje polimerowi znaczną sztywność i wytrzymałość, zwłaszcza gdy łańcuchy polimeru są ustawione względem siebie w sposób uporządkowany. Ponadto hydrofobowe grupy aromatyczne kwasu tereftalowego zapewniają biostabilność poprzez ograniczenie degradacji hydrolitycznej. Temperatura topnienia wynosi około 260°C, a temperatura zeszklenia mieści się w przedziale 80-100°C. Poliester charakteryzuje się wytrzymałością na wydłużenie w zakresie 20-40 %. Dodatkowo cechuje go niska chłonność wilgoci (0,5 % w T = 25°), dobra odporność na działanie temperatury i chemikaliów oraz dobre właściwości mechaniczne [85, 87].

Dzięki korzystnym właściwościom PET znalazł zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu jako materiał do wyrobu folii, elementów maszyn, samochodów, butelek, pojemników oraz włókien [60, 86].

Dodatkowo PET jest stosowany w medycynie do wytwarzania membran do szwów chirurgicznych, siatek chirurgicznych, rusztowań, cewników moczowych, sztucznych więzadeł i ścięgien oraz w chirurgii sercowo-naczyniowej do produkcji

zastawek serca, stentów naczyń krwionośnych i/lub ich pokrycia [1-3, 88-94]. Siatka wykonana z PET znacznie poprawia przepływ krwi i zmniejsza ryzyko przedostania się fragmentów blaszki miażdżycowej do światła naczynia nie tylko podczas implantacji, ale także zapobiega embolizacji pooperacyjnej [4]. Włókna PET mają jednak pewne ograniczenia związane z niską hemokompatybilnością, hydrofobowością oraz niezadowalającą adhezją do jego powierzchni komórek istotnych w przeszczepach naczyniowych [33, 34]. Poza tym PET jest wrażliwy na powolną degradację hydrolityczną prowadzącą do niekorzystnych reakcji biologicznych [1]. W związku z tym rusztowania syntetyczne mogą powodować częste występowanie infekcji pooperacyjnych oraz przewlekłą odpowiedź immunologiczną [89], a także trombogenność (tworzenie skrzepów), która jest główną przyczyną zawężania światła sztucznego przeszczepu wieńcowego [88]. Wobec tego powierzchnia PET wymaga modyfikacji przed kontaktem z krwią pacjenta [2].

Dlatego naukowcy prowadzą zaawansowane badania w celu zmniejszenia procesu zakrzepowego, przy równoczesnym wzmocnieniu oddziaływań polimer-komórka oraz adhezji komórek śródbłonna. Biokompatybilne i biodegradowalne polimery naturalne, takie jak chitozan, mogą być stosowane jako powłoki powierzchniowe PET i/lub matryce do kontrolowanego uwalniania leku [95].

2.1.2. Chitozan

Polisacharydy opisuje wzór sumaryczny $(C_6H_{10}O_5)_n$. Są to związki zbudowane z cukrów prostych połączonych ze sobą wiązaniami glikozydowymi [87]. Wytwarzane są głównie przez rośliny, ale także przez grzyby lub pancerze skorupiaków morskich oraz insektów. W organizmach żywych pełnią rolę materiału budulcowego i zapasowego [41]. Ponadto należą do grupy związków wielofunkcyjnych, gdyż w swojej strukturze zawierają liczne grupy, takie jak: hydroksylowa, ketonowa i aldehydowa [96]. W ostatnich latach zainteresowanie polisacharydami w obszarze nauk biomedycznych znacznie wzrosło. Wśród nich największe znaczenie aplikacyjne ma między innymi chitozan (Ch). Ch to kopolimer $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy i $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy lub też homopolimer $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy [97]. Polimer ten występuje naturalnie w przyrodzie, jest produkowany przez grzyby *Mucor rouxii* i *Choanephora cucurbitarum*. Może być także otrzymywany w wyniku deacetylacji chityny, która występuje w pancerzach skorupiaków [97, 98]. W zależności od tego, w jakich warunkach zachodzi proces, otrzymywany jest Ch

o różnym stopniu deacetylacji (z ang. *deacetylation degree*, DD), a co za tym idzie o różnych właściwościach fizykochemicznych. DD jest parametrem określającym procentową zawartość molową jednostek monomerycznych glukozaminy (0-100%), który warunkuje właściwości chitozanu.

Jedną z cech zależnych od DD jest biodegradowalność. W wyniku biodegradacji powstają nieszkodliwe dla człowieka oligosacharydy, które z łatwością mogą być przetwarzane przez szlaki metaboliczne i/lub wydalane przez organizm [99, 100]. Ponadto Ch jest biokompatybilny oraz cechuje się zdolnością do uwalniania substancji aktywnych, wiązania tłuszczu, mukoadhezją, a także właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi i aktywnością immunologiczną poprzez absorbowanie metali toksycznych [6, 97, 101]. Dodatkowo może tworzyć kompleksy z jonami metali, wykazuje duże powinowactwo do barwników. Dzięki powyżej omówionym właściwościom Ch znalazł zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu (Rysunek 3).



Rysunek 3 Zastosowanie chitozanu w różnych gałęziach przemysłu. Opracowanie własne na podstawie [97].

Ze względu na cele postawione w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej, w następnym etapie omówione zostaną zastosowania chitozanu w medycynie.

Chitozan może być używany w inżynierii tkankowej, ponieważ stymuluje adhezję i namnażanie komórek, co skutkuje skróconym czasem regeneracji tkanek [41]. Dzięki obecności grup funkcyjnych w strukturze chitozanu, biopolimer jest podatny na modyfikowanie jego powierzchni i możliwe jest tworzenie wielu materiałów oraz kompozytów o udoskonalonych właściwościach [102-106]. Bierze udział

w budowie tkanek zastępczych, przyspiesza także regenerację kości. W literaturze można znaleźć badania dotyczące opracowania połączeń chitozanu z hydroksyapatytem, chondroityną i innymi biopolimerami, które mogą wspomagać namnażanie osteoblastów i proces wrastania kości w implant [102, 107-111]. Co więcej, Ch chroni komórki tkanki chrzęstnej sprzyjając jej odbudowie [112, 113].

Naukowcy przeprowadzili badania nad hydrożelami z dodatkiem chitozanu, które pomogły w odbudowie skóry [110, 114]. Chitozan w postaci hydrożeli jest także stosowany do otrzymywania systemów kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych. Jest to możliwe dzięki łatwości w regulowaniu jego właściwości poprzez zmiany pH, temperatury lub siły jonowej rozpuszczalnika [115-117].

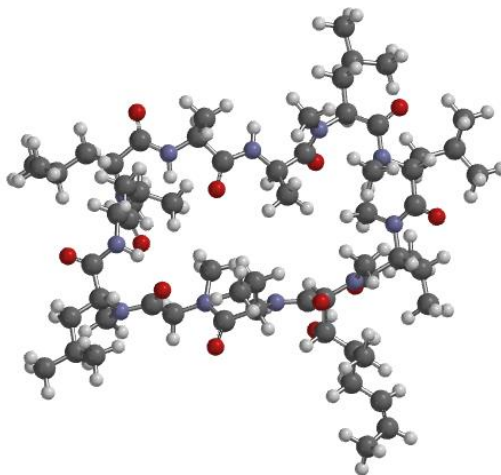
Ponadto chitozan jest wykorzystywany jako pokrycie matrycy lub biomateriałów (w tym implantów). Dzięki temu, możliwe jest dostarczanie leków bezpośrednio w pożądane miejsce. Poza tym tego typu pokrycia spowalniają tempo degradacji, modulują odpowiedzi komórkowe i miejscowe uwalnianie czynników wzrostu z powierzchni biomateriału, w efekcie czego minimalizowane są powikłania pooperacyjne [7, 9, 118-120]. Właściwość ta jest niezwykle istotna w przypadku substancji silnie hydrofobowych, których wchłanianie z przewodu pokarmowego jest znacznie zmniejszone. Jednakże w krwiobiegu dodatnio naładowany chitozan ($-NH_3^+$) może wchodzić w oddziaływania z ujemnie naładowanymi płytkami krwi, prowokując tworzenie się skrzepów [10]. Tak więc jednoczesne stosowanie chitozanu z innymi substancjami wydaje się być odpowiednie, aby zmniejszyć gęstość jego ładunku, a tym samym uczynić go mniej trombogennym.

2.2. Substancje bioaktywne

2.2.1. Leki. Cyklosporyna A

Substancje bioaktywne to takie, które mogą wykazywać potencjalne zastosowanie terapeutyczne jednocześnie zmniejszając stan zapalny oraz skutki stresu oksydacyjnego i zaburzeń metabolicznych [121]. Z kolei lek według definicji podanej przez encyklopedię Britannica to każda substancja chemiczna, która wpływa na funkcjonowanie organizmów żywych wywołujących choroby (w tym bakterie, grzyby i wirusy) w organizmie pacjenta [122]. Wśród leków można wyróżnić różne związki chemiczne. Przedstawicielami takich substancji są peptydy. Peptydy to związki chemiczne zawierające w strukturze reszty aminokwasowe połączone ze sobą wiązaniami

peptydowymi. Peptydy, które zawierają od 10 do 100 reszt aminokwasowych nazywa się polipeptydami [123]. Do grupy polipeptydów należy cyklosporyna A (z łac. *Ciclosporinum*, CsA). CsA to cykliczny związek o wzorze sumarycznym $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$, składający się z 11 aminokwasów o strukturze rozgałęzionej (Rysunek 4) [13, 124, 125]. W środowisku naturalnym jest produkowana przez grzyby *Tolypocladium inflatum* [124, 125] oraz *Beauveria nivea* [126]. Ponadto może być także wytworzona w procesie biosyntezy bezpośredniej lub syntezy chemicznej [124].

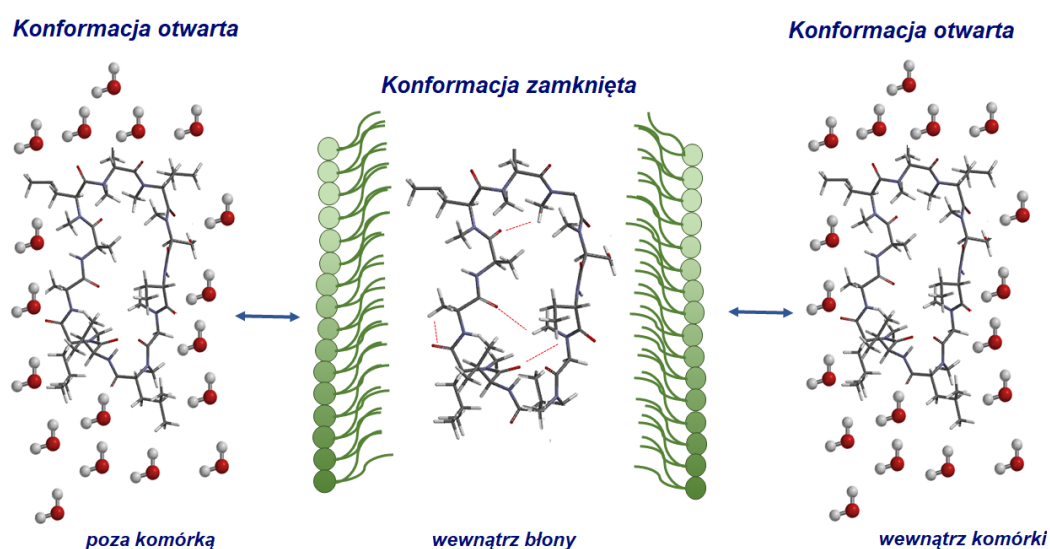


Rysunek 4 Struktura cyklosporyny A. Opracowanie własne przy użyciu programu Spartan 08 V 1.2.0. Kolorem szarym oznaczono atomy węgla, czerwonym atomy tlenu, białym atomy wodoru, a niebieskim atomy azotu.

CsA należy do grupy leków immunosupresyjnych, a jej skuteczność potwierdzono w 1978 roku. Wykazuje również dodatkową aktywność biologiczną, w tym przeciwwgrzybiczą, przeciwzapalną i przeciw pasożytniczą [13]. Dzięki powyższym właściwościom jest stosowana w transplantologii w celu zapobiegania odrzuceniu przeszczepu (serca, płuc i nerek) lub implantu oraz szpiku kostnego. Znajduje zastosowanie także w dermatologii oraz okulistyce [13, 124]. Co więcej, w 1977 roku CsA została zatwierdzona jako lek przeciw łuszczycy oraz reumatoidalnemu zapaleniu stawów. Wykorzystanie CsA jako leku jest możliwe dzięki zdolności do przenikania przez błony na drodze dyfuzji biernej. Proces ten wiąże się ze zmianami konformacji CsA (Rysunek 5) [127], która ściśle zależy od polarności otaczającego ośrodka. Jedną z nich stanowi konformacja „otwarta”, którą przyjmuje cząsteczka w otoczeniu polarnym. Wówczas grupy polarne obecne w strukturze CsA mogą oddziaływać z rozpuszczalnikiem poprzez wiązania wodorowe. Z kolei w środowisku niepolarnym, przykładowo tworzonym przez łańcuchy węglowodorowe błony (dwuwarstwy

lipidowej), cząsteczka CsA zmienia konformację na tak zwaną „zamkniętą”, w której dominują wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe [127, 128].

Działanie CsA polega na hamowaniu reakcji immunologicznych zależnych od limfocytów T bez naruszania komórek szpiku [11, 124]. Ze względu na wąski zakres terapeutyczny i zmienną charakterystykę wchłaniania CsA, podczas terapii niezbędne jest dokładne monitorowanie jej stężenia we krwi [13]. Inną wadą leku jest szeroki zakres działań niepożądanych, w szczególności nefrotoksyczność charakteryzująca się wzrostem stężenia kreatyniny i mocznika w surowicy, który może skutkować nieodwracalnym uszkodzeniem nerek, takim jak zwłóknienie śródmiąższowe.



Rysunek 5 Zmiany konformacji CsA podczas transportu biernego. Opracowanie własne na podstawie [127].

Ponadto produkowane podczas terapii wolne rodniki mogą także powodować hepato- i kardiotoxycywność [11-15, 129]. Nadmierny stres oksydacyjny indukowany przez reaktywne formy tlenu (z ang. *reactive oxygen species*, ROS) i wolne rodniki, które chemicznie uszkadzają cząsteczki biosubstancji, takie jak lipidy, białka, kwasy nukleinowe, prowadzi do stanu zapalnego, starzenia się komórek, a nawet śmierci [15, 16].

Ze względu na dużą masę cząsteczkową (1202,61 Da) oraz możliwość tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, CsA jest słabo rozpuszczalna w wodzie i płynach ustrojowych [13]. W związku z tym pojawiają się problemy z biodostępnością i biogodnością CsA, które sprawiają, że doustne podawanie leku nie jest efektywne (20-50%) [13, 124, 130]. Dlatego też naukowcy pracują nad wynalezieniem nośników, które pozwolą na bardziej skuteczne dostarczanie leku i zminimalizowanie efektów ubocznych

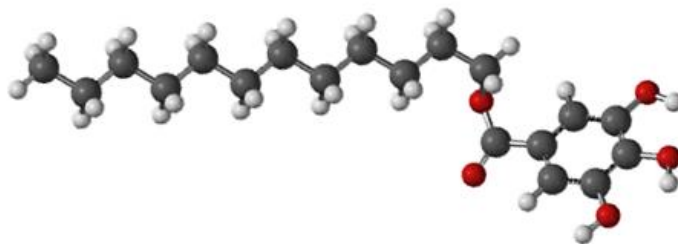
terapii. Wśród nich można znaleźć mikroemulsje, biodegradowalne nanocząstki polimerowe i lipidowe oraz systemy złożone z polisacharydów (w tym chitozanu) [13, 131-136].

Z punktu widzenia inżynierii tkankowej niezbędne jest zaprojektowanie nowatorskich biopowłok dla stentów na bazie chitozanu, które mogą być używane do dostarczenia leku, jego miejscowego uwalniania i wchłaniania do krwi. Z kolei, aby zredukować skutki negatywne terapii można jednocześnie w tego typu powłoce zastosować przeciwutleniacz.

2.2.2. Przeciwutleniacze. Galusan laurylu

Reakcje utleniania są niezbędne do życia, ponieważ wspierają funkcjonowanie złożonych układów naszego ciała, ale mogą być również destrukcyjne. Powstające w wyniku stresu oksydacyjnego wolne rodniki oraz ROS powodują uszkodzenia tkanek, ich starzenie, a nawet śmierć. Procesy te generują liczne choroby, między innymi serca, wątroby, a nawet nowotwory [137].

Przeciwutleniacz, to związek, który już przy niskich stężeniach w odniesieniu do substratu może opóźnić, zahamować lub nawet całkowicie zapobiec jego utlenieniu poprzez niszczenie ROS [137-140]. Jednym z przedstawicieli substancji o właściwościach przeciwutleniających jest galusan laurylu (dodecyłu), LG (Rysunek 6). LG to ester kwasu galusowego i alkoholu *n*-dodecyłowego. Działanie przeciwutleniające zawdzięcza budowie części polarnej - ugrupowaniu pirogalolowemu zawierającemu trzy grupy hydroksylowe, oraz - niepolarnemu łańcuchowi węglowodorowemu C12 [17, 18]. W wielu układach biologicznych surfaktanty o podobnej grupie polarnej, posiadające łańcuch C10 lub C12, wykazują maksymalną aktywność błonową [141], co zapewnia optymalną zdolność do oddziaływań z dwuwarstwą lipidową. Tym samym galusan laurylu jest najbardziej aktywny spośród pochodnych kwasu galusowego i bardziej aktywny niż sam kwas galusowy [142].



Rysunek 6 Struktura galusanu laurylu. Opracowanie własne przy użyciu programu Spartan 08 V 1.2.0. Kolor szary symbolizuje atomy węgla, czerwony atomy tlenu, a biały atomy wodoru.

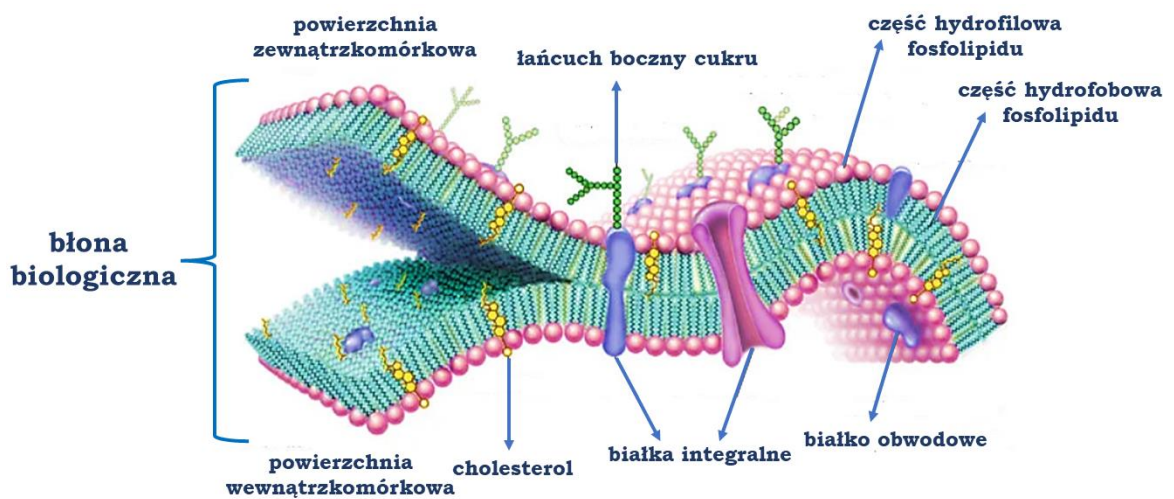
Kubo i współ. wykazali, że LG wychwytyjąc wolne rodniki hamuje w znacznym stopniu peroksydację lipidów, a dodatkowo wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-dodatnich [19]. Poza tym zapobiega utlenianiu kwasu linolenowego w większym stopniu niż kwas galusowy [18, 143] oraz chroni czerwone krwinki przed stresem oksydacyjnym [18]. Ponadto niektóre badania pokazują, że LG wykazuje potencjalną aktywność przeciwnowotworową w stosunku do wywołanych chemicznie guzów skóry [144], czerniaka [145] czy raka piersi [146]. Badania opisane przez Calcabrini i współ. [146] wykazały, że LG wywołuje apoptozę ludzkich komórek raka piersi, co może być bezpośrednio związane z hamowaniem glikoproteiny P przez ten galusan. Zdolność tę można wykorzystać do zmniejszenia oporności komórek nowotworowych na leczenie różnymi lekami.

Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach biologicznych powoduje spadek płynności błony [147] oraz zaburza jej strukturę i funkcjonowanie [148, 149]. Tak więc podstawową rolą biologiczną przeciwutleniaczy jest ochrona przed tego typu uszkodzeniami oksydacyjnymi. Dlatego określenie oddziaływań pomiędzy przeciwutleniaczem LG a fosfolipidami wchodzącymi w skład błon wydaje się konieczne w celu opracowania biokompatybilnego pokrycia dla biomateriałów stosowanych w inżynierii tkankowej.

2.2.3. Składniki błon biologicznych. Fosfolipidy

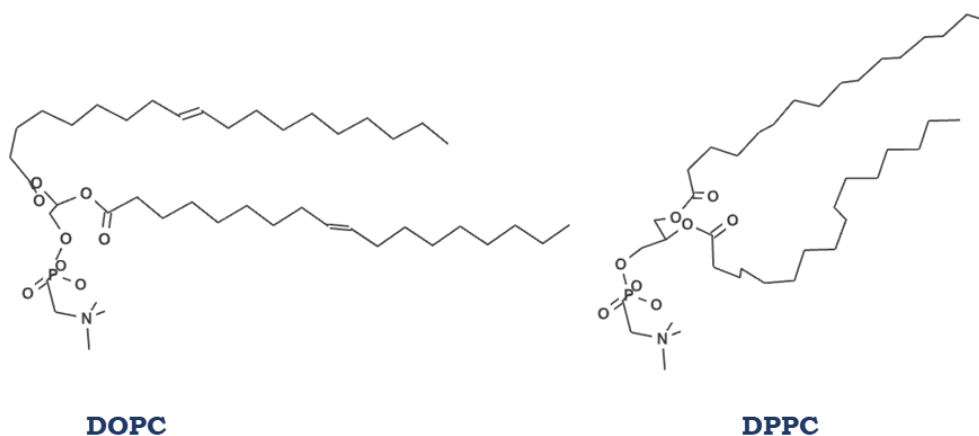
Dwuwarstwa lipidowa, składająca się z podwójnej warstwy cząsteczek fosfolipidów, cholesterolu i glikolipidów, uważana jest za podstawową jednostkę budującą błony biologiczne (Rysunek 7). Zapewnia ona także funkcjonalną barierę między poszczególnymi sekcjami komórki oraz między komórką a jej środowiskiem [150, 151]. W dwuwarstwie lipidowej osadzone są białka, które transportują jony i cząsteczki rozpuszczalne w wodzie przez błonę.

Lipidy pełnią kilka głównych funkcji w komórkach. Po pierwsze są wykorzystywane do magazynowania energii. Po drugie, macierz błon komórkowych jest utworzona przez lipidy, które składają się z części hydrofobowej i hydrofilowej. Skłonność ugrupowań hydrofobowych do samoasocjacji oraz tendencja ugrupowań hydrofilowych do oddziaływań ze środowiskiem wodnym i między sobą jest fizyczną podstawą spontanicznego tworzenia się błon. Oprócz funkcji barierowej, lipidy zapewniają błonom cechy niezbędne do podziału komórek, rozmnażania i transportu. Ponadto umożliwiają również agregację określonych białek w błonach, a innym rozpraszanie. Wreszcie, lipidy mogą działać jako przekaźniki w procesach biochemicznych [152-155]. Dodatkowo lipidy nadają błonom komórkowym charakter płynny.



Rysunek 7 Budowa błony biologicznej. Opracowanie własne na podstawie Encyclopedia Britannica.

Najczęściej występującymi lipidami w błonie komórkowej są **fosfolipidy**. W strukturze fosfolipidów można wyróżnić część hydrofilową, która zawiera grupę fosforanową związaną z pozostałą częścią cząsteczki. Fosfolipidem, który jest najbardziej powszechnie występującym w błonach komórkowych jest **fosfatydylocholina** [150]. W skład fosfolipidów wchodzi między innymi 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC) oraz 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC). Oba fosfolipidy różnią się od siebie nasyceniem łańcuchów węglowodorowych. Ich struktury przedstawia Rysunek 8.



Rysunek 8 Struktury fosfolipidów DOPC i DPPC. Opracowanie własne przy użyciu programu Spartan 08 V 1.2.0.

Ze względu na różnice w nasyceniu łańcuchów węglowodorowych fosfolipidy DOPC i DPPC są najczęściej wybierane do badań, ponieważ doskonale nadają się do tworzenia modelowych błon biologicznych. Jedną z powszechnie stosowanych metod do określenia oddziaływań, jakie mogą zachodzić w modelowych błonach jest technika Langmuira.

3. Metody wykorzystywane do preparatyki filmów oraz ich charakterystyki na granicy faz ciecz/powietrze

3.1. Metoda Langmuira

Historia monowarstw Langmuira i Langmuira-Blodgett (LB) sięga około 100 lat, kiedy to zostały opublikowane pionierskie prace Agnes Pockels, Irvinga Langmuira i Katherine Blodgett. Substancje tworzące monowarstwy Langmuira na granicy faz ciecz/powietrze powinny spełniać dwa podstawowe wymagania: muszą być amfifilowe i nierozpuszczalne w wodzie. Ugrupowania hydrofobowe odpowiadają za nierozpuszczalność związku w subfazie, podczas gdy ugrupowania hydrofilowe umożliwiają utrzymanie cząsteczek na powierzchni cieczy [156, 157]. Pierwsze substancje amfifilowe stosowane jako monowarstwy Langmuira miały długie łańcuchy alkilowe. Były to kwasy tłuszczowe i fosfolipidy. Większość tych substancji w temperaturze pokojowej występuje w stanie stałym. Po wprowadzeniu do cieczy ich cząsteczki tworzą struktury koloidalne, w postaci micel i liposomów.

3.1.1. Tworzenie monowarstw Langmuira

Monowarstwa Langmuira tworzy się, gdy substancje amfifilowe zostaną umieszczone na granicy faz z roztworu przygotowanego w lotnym rozpuszczalniku niemieszającym się z wodą. Powierzchnia międzyfazowa ciecz/powietrze posiada dodatkową energię wynikającą z różnicy sił spójności. Różnica stanu energetycznego cząsteczek znajdujących się wewnątrz fazy oraz na powierzchni powoduje powstawanie tak zwanej energii międzyfazowej. Swobodną energię międzyfazową można wyznaczyć poprzez pomiary napięcia powierzchniowego. Napięcie powierzchniowe wody wynosi około 73 mN m^{-1} w 20°C , które jest wyższe od napięcia większości substancji chemicznych. Czyni ją to bardzo dobrą fazą nośną stosowaną do badań monowarstw.

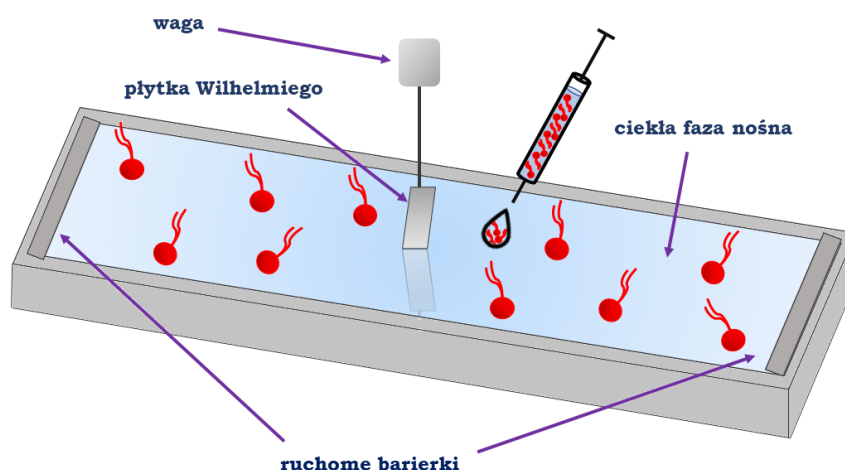
Gdy roztwór związku amfifilowego zostanie umieszczony na subfazie poprzez nakropienie za pomocą mikrostrzykawki, szybko rozprzestrzeni się, pokrywając dostępny obszar. W miarę odparowywania rozpuszczalnika formuje się monowarstwa. Gdy powierzchnia dostępna dla monowarstwy jest duża, odległość między sąsiednimi cząsteczkami także jest znacząca, a ich oddziaływania są słabe. Monowarstwę można wtedy uznać za dwuwymiarowy gaz. W tych warunkach monowarstwa ma niewielki wpływ na napięcie powierzchniowe wody. Jeśli dostępna powierzchnia monowarstwy ulegnie zmniejszeniu na skutek sprężania, cząsteczki zaczynają się odpychać. Ta

dwuwymiarowa analogia ciśnienia nazywana jest ciśnieniem powierzchniowym (Równanie 1),

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

gdzie γ_0 to napięcie powierzchniowe subfazy bez naniesionej monowarstwy, a γ to napięcie powierzchniowe subfazy w obecności monowarstwy.

Monowarstwy Langmuira są badane przy użyciu wanny Langmuira [156]. Urządzenie utrzymujące ciekłą fazę nośną (subfazę) najczęściej jest wykonane z teflonu, aby zapobiec jej wyciekowi poza krawędzie. Stałą temperaturę fazy nośnej zapewnia zastosowanie termostatu. Powierzchnię monowarstwy można zmieniać przy użyciu jednej lub dwóch ruchomych barierki (Rysunek 9). Podczas sprężania monowarstw ciśnienie powierzchniowe i średnia powierzchnia przypadająca na cząsteczkę są stale monitorowane.



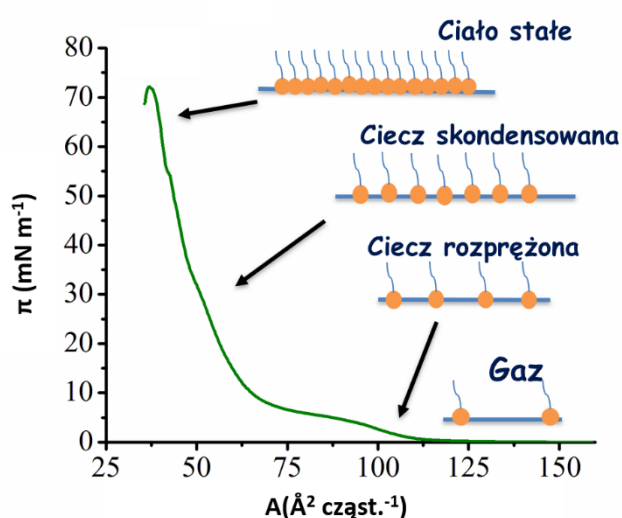
Rysunek 9 Wanna Langmuira. Opracowanie własne.

Napięcie powierzchniowe wyznacza się przy użyciu platynowej płytki Wilhelmy'ego. Jednakże płytki może być także wykonana z innego materiału, na przykład miki, szkła lub bibułki filtracyjnej. Metoda opiera się na pomiarze siły działającej na płytkę częściowo zanurzoną w ciekłej fazie nośnej. Znając wymiary płytki siła ta jest następnie przekształcana przy użyciu odpowiednich równań w napięcie powierzchniowe.

Najważniejszym wskaźnikiem właściwości monowarstwy materiału amfifilowego jest pomiar ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A) [158]. Pomiar odbywa się w stałej temperaturze

a wyznaczana krzywa jest znana jako izoterma $\pi - A$. Zwykle izoterma jest rejestrowana przez sprężanie monowarstwy w wyniku ruchu barierki poruszających się ze stałą szybkością, przy ciągłym monitorowaniu ciśnienia powierzchniowego. Rysunek 10 przedstawia schematyczną izotermę $\pi - A$ [156].

Na podstawie uzyskanej izotermi monowarstwy możliwe jest określenie dwuwymiarowych stanów skupienia (faz), w których monowarstwa występuje podczas procesu sprężania. Każda z faz odpowiada innemu odcinkowi na izotermie $\pi - A$ i charakteryzuje ją współczynnik nachylenia [159]. Zachowanie fazowe monowarstwy zależy głównie od właściwości fizycznych i chemicznych substancji amfifilowej oraz temperatury i składu subfazy.



Rysunek 10 Przykładowa izoterma $\pi - A$ wraz z zaznaczonymi stanami fizycznymi (fazami) monowarstwy. Opracowanie własne.

Można wyróżnić fazę:

- gazową (z ang. *gaseous*, G), w której cząsteczki znajdujące się na ciekłej fazie nośnej są zlokalizowane w dużych odległościach, a więc można założyć, że nie występują pomiędzy nimi oddziaływania. Dlatego monowarstwa zachowuje się jak gaz dwuwymiarowy,
- ciekłą rozprężoną (z ang. *liquid-expanded*, LE) pojawiającą się przy pewnym sprężeniu monowarstwy, które redukuje odległości między cząsteczkami powodując powstawanie słabych oddziaływań. Monowarstwa przyjmuje wtedy stan dwuwymiarowej cieczy rozprężonej,

- ciekłą skondensowaną (z ang. *liquid-condensed*, LC), w której cząsteczki znajdują się tak blisko siebie, że są jednakowo zorientowane, i w związku z tym oddziaływania pomiędzy nimi są coraz silniejsze,
- stałą (z ang. *condensed*, C), w której monowarstwa wykazuje największe upakowanie cząsteczek, przyjmując fazę odpowiadającą dwuwymiarowemu kryształowi.

Dalsza redukcja powierzchni przypadającej na cząsteczkę prowadzi do załamania monowarstwy, któremu odpowiada wartość ciśnienia załamania (z ang. *collapse surface pressure*, π_c). π_c ściśle zależy od wielu czynników, w tym od temperatury, pH subfazy oraz szybkości sprężania monowarstwy. Po załamaniu tworzy się struktura trójwymiarowa. Ponadto można wyróżnić fazy przejściowe, w których badana monowarstwa wykazuje właściwości pośrednie pomiędzy danymi fazami, np. LE-LC [156, 157].

3.1.2. Stan fizyczny monowarstw Langmuira

Ścisłość jest parametrem powszechnie stosowanym parametrem do charakterystyki monowarstw. Określa ona stan fizyczny badanej monowarstwy i najczęściej jest przedstawiana jako, tak zwany moduł ścisłości. Może być obliczony bezpośrednio z danych izoterm $\pi - A$ zgodnie z Równaniem 2:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_{T,p} \quad (2)$$

gdzie C_s^{-1} to moduł ścisłości, A to powierzchnia przypadająca na cząsteczkę.

Moduł ścisłości, znany również jako moduł sprężystości Younga, określa elastyczne właściwości monowarstwy poddawanej kompresji tylko w jednym kierunku, gdy przyłożona jest do niej siła. Moduł Younga służy do oszacowania, jak bardzo monowarstwa jest upakowana przy określonej wartości ciśnienia powierzchniowego. Otrzymane zależności $C_s^{-1} = f(\pi)$ dostarczają informacji o stanie fizycznym monowarstw ściśle związanym z upakowaniem i uporządkowaniem cząsteczek na granicy faz ciecz/powietrze.

Zgodnie z klasyfikacją Daviesa i Rideala [160] w zależności od wartości modułu ścisłości monowarstwa występuje w określonej fazie (Tabela 1). Im większa jest wartość C_s^{-1} tym badana monowarstwa jest bardziej upakowana i skondensowana.

Tabela 1 Wartości C_s^{-1} oraz przypisane im stany fizyczne monowarstwy [160].

C_s^{-1} (mN m ⁻¹)	Stan fizyczny monowarstwy
0-12,5	Gaz (G)
12,5 do 50	Ciecz rozprężona (LE)
50-100	Pośredni LE-LC
100 do 250	Ciecz skondensowana (LC)
> 250	Stały (C)

Podobne zakresy występowania monowarstwy w danych fazach podali także inni naukowcy [161-163]. Dodatkowo wyznaczenie modułu ściśliwości umożliwia śledzenie przejść fazowych, które na wykresie $C_s^{-1} = f(\pi)$ są widoczne jako charakterystyczne minima.

3.1.3. Oddziaływania międzycząsteczkowe

Monowarstwy mieszane, utworzone z więcej niż jednego składnika, można analizować w aspekcie termodynamicznym, podobnie jak mieszaniny trójwymiarowe. Dlatego na podstawie izoterm $\pi - A$ można przeprowadzić analizę oddziaływań występujących pomiędzy cząsteczkami.

Oddziaływania te można scharakteryzować zgodnie z zasadą addytywności [158, 164]. W tym celu bezpośrednio z izoterm $\pi - A$ wyznacza się wartości średniej powierzchni na cząsteczkę w monowarstwach dwu- (A_{12}) lub trójskładnikowych (A_{123}) przy danym ciśnieniu powierzchniowym i zestawia się z tymi uzyskanymi w przypadku idealnej mieszalności pomiędzy cząsteczkami lub całkowitego jej braku (Równania 3 i 4):

$$A_{12}^{id} = A_1\chi_1 + A_2\chi_2 \quad (3)$$

$$A_{123}^{id} = A_{12}(\chi_1 + \chi_2) + A_3\chi_3 \quad (4)$$

gdzie A_1 , A_2 i A_3 oznaczają średnie wartości powierzchni przypadającej na cząsteczkę przy danym ciśnieniu powierzchniowym w monowarstwach jednoskładnikowych, a χ_1 , χ_2 i χ_3 to ułamki molowe, odpowiednio 1-szego, 2-giego oraz 3-ciego składnika w monowarstwach mieszanych.

Następnie, aby wyznaczyć rodzaj możliwych oddziaływań (przyciąganie lub odpychanie) między cząsteczkami w filmach dwu- i trójskładnikowych oblicza się nadmiarową powierzchnię (A_e) (Równania 5 i 6):

$$A_e = A_{12} - A_{12}^{id} \quad (5)$$

$$A_e = A_{123} - A_{123}^{id} \quad (6)$$

Powierzchnia nadmiarowa równa zero świadczy o idealnej mieszalności lub całkowitym braku mieszalności składników w monowarstwie, podczas gdy ujemne wartości A_e wskazują na silniejsze oddziaływania przyciągające między składnikami w monowarstwie mieszanej niż pomiędzy cząsteczkami w monowarstwach jednoskładnikowych. Ponadto wartości $A_e < 0$ mogą również wynikać z efektów sterycznych, np. wprowadzenia jednej cząsteczki w strukturę drugiej w celu utworzenia kompleksu.

Dodatkowo wielkość oddziaływań można ocenić na podstawie nadmiarowej energii mieszania Gibbsa, ΔG_e (Równanie 7):

$$\Delta G_e = N \int_0^\pi A_e d\pi \quad (7)$$

gdzie N oznacza liczbę Avogadra.

Następnie, na podstawie obliczonej całkowitej energii mieszania Gibbsa (ΔG_m) można scharakteryzować stabilność termodynamiczną monowarstw wieloskładnikowych (Równanie 8):

$$\Delta G_m = \Delta G_e + \Delta G_{id} \quad (8)$$

gdzie idealną energię mieszania Gibbsa, ΔG_{id} można wyrazić jako (Równania 9 i 10):

$$\Delta G_{id} = RT(\chi_1 \ln \chi_1 + \chi_2 \ln \chi_2) \quad (9)$$

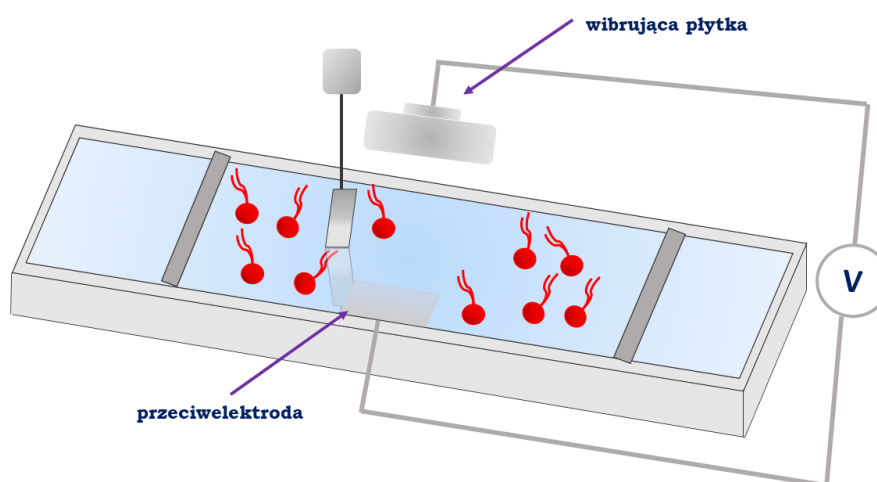
$$\Delta G_{id} = RT[(\chi_1 + \chi_2) \ln(\chi_1 + \chi_2) + \chi_3 \ln \chi_3] \quad (10)$$

gdzie R jest stałą gazową, a T oznacza temperaturę.

3.2. Metoda wibrującej płytki

Wyznaczenie izoterm zmian potencjału powierzchniowego w funkcji powierzchni na cząsteczkę ($\Delta V - A$) jest pomocne w określeniu upakowania i orientacji cząsteczkowej podczas sprężania monowarstwy [157]. Zmiana potencjału powierzchniowego zwana potencjałem powierzchniowym ΔV monowarstwy jest określana jako różnica potencjałów między czystą ciekłą fazą nośną a subfazą pokrytą monowarstwą [165, 166]. Wielkość ta zależy zarówno od gęstości upakowania, jak i orientacji cząsteczek. Monowarstwę na granicy faz ciecz/powietrze można traktować jako zbiór dipoli cząsteczkowych, które przyczyniają się do jej polaryzacji.

Jedną z metod wyznaczania potencjału powierzchniowego jest metoda wibrującej płytki. Polega na umieszczeniu elektrod, jednej pod subfazą (przeciwelektroda), a drugiej nad nią (tak zwana sonda Kelvina), które podczas sprężania monowarstwy rejestrują zmiany potencjału powierzchniowego (Rysunek 11).



Rysunek 11 Schemat wanny Langmuira sprężonej z miernikiem potencjału powierzchniowego. Opracowanie własne.

Zmiany potencjału powierzchniowego są związane z efektywnym momentem dipolowym cząsteczek tworzących monowarstwę równaniem Helmholtza (Równanie 11) [160, 166, 167]:

$$\Delta V = \frac{\mu_n}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot A} \quad (11)$$

gdzie μ_n to efektywny moment dipolowy, ε oznacza przenikalność monowarstwy, ε_0 - przenikalność w próżni ($8,85417 \times 10^{-12}$ F m⁻¹), A - powierzchnię przypadającą na cząsteczkę.

Ze względu na fakt, że przenikalność monowarstwy (ε) jest wartością nieznaną, zmiany efektywnego momentu dipolowego cząsteczek tworzących monowarstwę podczas kompresji można wyznaczyć jako tak zwany pozorny moment dipolowy (μ_a) na podstawie równania (Równanie 12):

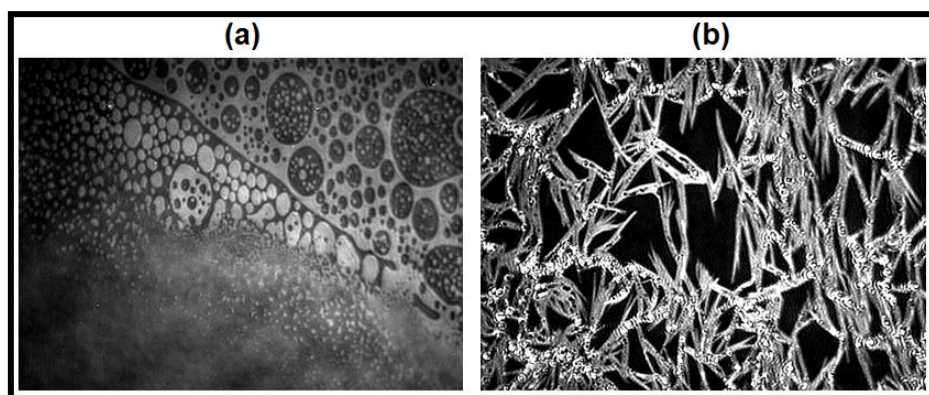
$$\mu_a = \frac{\mu_n}{\varepsilon} = \Delta V \cdot A \cdot \varepsilon_0 \quad (12)$$

Potencjał powierzchniowy jest zwykle zerowy przy dużych wartościach powierzchni przypadającej na cząsteczkę, ponieważ właściwości elektryczne monowarstwy nie różnią się zasadniczo od tych dla czystej ciekłej fazy nośnej. Podczas sprężania monowarstwy, ΔV ma tendencję do zwiększania się, ponieważ dipole orientują się w kierunku bardziej pionowym do granicy faz. Ponadto tworzenie domen sprawia, że monowarstwa jest wystarczająco zwarta, aby spowodować gwałtowny wzrost potencjału powierzchniowego, który dodatkowo zwiększa się wraz z reorientacją dipoli. Powierzchnia przypadająca na cząsteczkę, przy której zachodzi tworzenie się domen jest większa niż powierzchnia, przy której ma miejsce wzrost ciśnienia powierzchniowego, co oznacza, że izoterma $\Delta V - A$ jest bardziej odpowiednia do monitorowania początkowych etapów tworzenia się monowarstwy niż izoterma $\pi - A$ [157].

3.3. Mikroskopia kąta Brewstera (BAM)

Mikroskopia kąta Brewstera (z ang. *Brewster Angle Microscopy*, BAM) to nowoczesna technika, która w sprzężeniu z wanną Langmuira umożliwia badanie morfologii monowarstw otrzymanych na granicy faz ciecz/powietrze w czasie rzeczywistym. Zasada pomiaru opiera się na właściwości światła *p*-spolaryzowanego wytworzonego przez laser, które pada na granicę dwóch ośrodków (ciecz/powietrze) pod kątem Brewstera (53° , gdy subfazą jest woda) [157]. W powyższych warunkach odbicie światła od powierzchni fazy ciekłej nie występuje. W efekcie tego otrzymuje się obraz zaciemniony. Po naniesieniu roztworu badanej substancji na fazę nośną i utworzeniu cienkiego filmu część promieniowania padającego ulega odbyciu w wyniku zmiany współczynnika refrakcji przy jednoczesnym braku zmiany (lub zmiany w niewielkim stopniu) wartości kąta Brewstera. Światło odbite kierowane jest do kamery i na ekran monitora. W celu zaabsorbowania promieniowania rozproszonego na dnie wanny umieszcza się czarną płytkę szklaną. W efekcie uzyskuje się obraz w skali mikrometrów o wysokiej rozdzielczości. Przykładowe obrazy otrzymane w ten sposób ilustruje Rysunek 12.

Dodatkowo umieszczenie mikroskopu w obudowie zapewnia ochronę zarówno przed zanieczyszczeniami, jak i rozproszonym światłem laserowym.



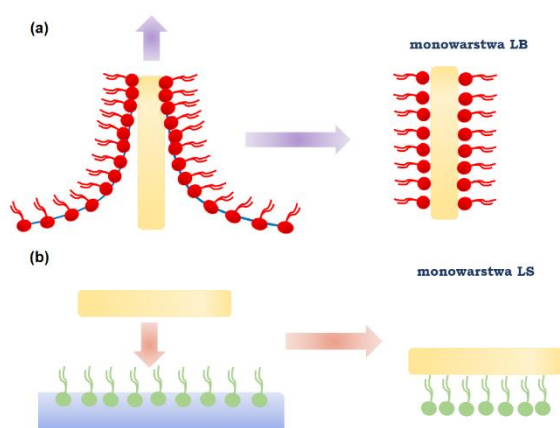
Rysunek 12 Obraz BAM ($720 \times 400 \mu\text{m}^2$) uzyskany dla monowarstwy galusanu laurylu (a) podczas przejścia G-LE ($\sim 0,5 \text{ mN m}^{-1}$) oraz (b) po jej załamaniu ($\sim 47 \text{ mN m}^{-1}$) na granicy faz woda/powietrze.

3.4. Metoda Langmuira-Blodgett

Przenoszenie monowarstw na podłoże stałe zostało zapoczątkowane w latach trzydziestych XX wieku przez Katherine Blodgett [157, 168]. Metoda polega na pionowym przesuwaniu nośnika stałego przez nierozpuszczalną monowarstwę rozpostartą na granicy faz ciecz/powietrze. Jako nośniki można stosować różnego rodzaju materiały (metale, polimery, mikę, kwarc, szkło) [156]. Materiał ten jest zwykle wybierany na podstawie zamierzonego zastosowania lub metody charakteryzacji monowarstw Langmuira-Blodgett.

Typowa procedura przenoszenia obejmuje sprężenie monowarstwy Langmuira do zadanego ciśnienia powierzchniowego, po czym wcześniej zanurzony nośnik stały jest wynurzany z ciekłej fazy nośnej przy pomocy mechanizmu zanurzająco/wynurzającego. Dzięki temu otrzymuje się monowarstwę Langmuira-Blodgett (LB, Rysunek 13a). Powyższą procedurę stosuje się, gdy powierzchnia podłoża stałego ma charakter hydrofilowy. Wanna Langmuira-Blodgett poza typowym wyposażeniem wanny Langmuira posiada rynienkę, do której zanurzany jest materiał stały [156].

Podczas przenoszenia monowarstwy utrzymywana jest stała wartość ciśnienia powierzchniowego dzięki balansującym ruchom barierek. Równocześnie możliwe jest wyznaczenie współczynnika przeniesienia (z ang. *transfer ratio*, *TR*), którego wartość bliska jedności wskazuje na ilościowe przełożenie monowarstwy z fazy ciekłej na nośnik stały.



Rysunek 13. Schemat otrzymywania monowarstw (a) Langmuira-Blodgett oraz (b) Langmuira-Schaefera. Opracowanie własne na podstawie [157].

W przypadku metody Langmuira-Schaefera nośnik stały o powierzchni hydrofobowej przykładła się poziomo do monowarstwy (Rysunek 13b). Z kolei połączenie dwóch powyżej omówionych wariantów pozwala na uzyskanie złożonych dwuwarstw lipidowych jako alternatywy do bezpośredniego osadzania liposomów na podłożu stałym.

4. Metody modyfikacji powierzchni polimerów. Aktywacja plazmą

Często w przypadku biomateriałów stosowanych w medycynie konieczna jest modyfikacja ich powierzchni ze względu na niekorzystne właściwości, na przykład niską swobodną energią powierzchniową lub nieefektywną adhezję komórek. Do takich metod można zaliczyć obróbkę fizyczną, chemiczną, powlekanie powierzchni oraz modyfikację w fazie objętościowej w celu utworzenia materiału kompozytowego [169].

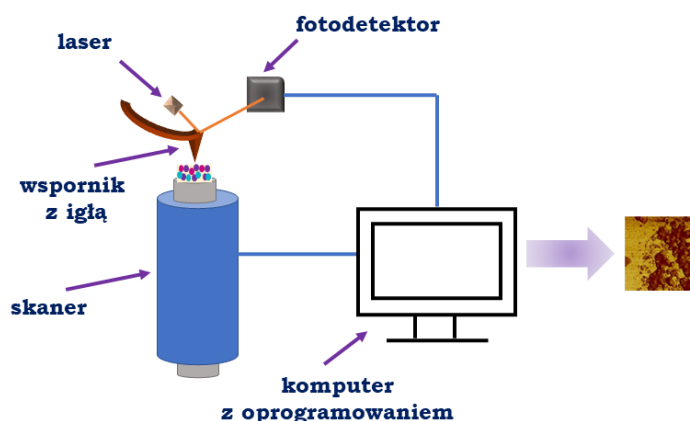
Modyfikacja plazmą od dawna uznawana jest za skuteczną metodę zmian właściwości powierzchniowych biomateriałów. Plazma to czwarty stan skupienia materii, który zawiera różne formy aktywne, takie jak atomy, cząsteczki, jony, elektrony, rodniki i fotony. Zjonizowany gaz może być wytwarzany w zamkniętym układzie reaktora zawierającego niskociśnieniową mieszaninę gazów poprzez wzbudzenie falami elektromagnetycznymi [170, 171]. Tak wygenerowane reaktywne cząsteczki gazu mogą oddziaływać z powierzchnią biomateriału i modyfikować jego właściwości fizyczne i chemiczne (bez zmian w fazie objętościowej), zachowując jednocześnie właściwości mechaniczne, elektryczne i optyczne materiału. Działanie plazmą wpływa na topografię, swobodną energią powierzchniową i zwilżalność powierzchni [172, 173]. Ponadto plazma jest często stosowana ze względu na brak konieczności użycia toksycznych chemikaliów [171].

Wiele danych literaturowych potwierdza, że działanie plazmą powoduje wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych na powierzchnię badanego materiału [26, 59, 60, 174-177], które w dalszej modyfikacji, jaką jest na przykład osadzanie monowarstw na nośnik stały sprawiają, że proces ten zachodzi bardziej efektywnie.

5. Metody wykorzystywane w charakterystyce powierzchni stałych

5.1. Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Mikroskopia sił atomowych (z ang. *atomic force microscopy*) po raz pierwszy została opisana w 1986 roku [178]. Aktualnie jest powszechnie stosowana do badania i obrazowania topografii powierzchni w różnych ośrodkach. Zasada działania AFM (Rysunek 14) opiera się na pomiarze siły występującej pomiędzy ostrą igłą a powierzchnią badanej próbki. W wyniku tej siły wspornik ugina się, a jej pomiar jest możliwy poprzez ogniskowanie wiązki lasera oraz detekcję wiązki odbitej [179-181]. Rozdzielczość uzyskanego obrazu zależy od geometrii igły.



Rysunek 14 Schemat budowy i działania AFM. Opracowanie własne.

Pomiary AFM można prowadzić w różnych trybach w zależności od tego, jakie cechy powierzchni mają być scharakteryzowane i wyodrębnione na obrazie. Najbardziej powszechnie stosowanymi trybami są kontaktowy (z ang. *contact mode*), kontaktu przerywanego (z ang. *intermittent contact mode lub tapping mode*) oraz bezkontaktowy (z ang. *non-contact mode*) [180, 181]. Pierwszy z wymienionych opiera się na oddziaływaniach igły z powierzchnią bez przerywania kontaktu między nimi. Dzięki prowadzeniu pomiarów w tym trybie, który jest szybki i prosty, możliwe jest także wyznaczanie innych parametrów (np. tarcia, rezystancji). Jednakże podstawową wadą jest możliwość uszkodzenia próbki, szczególnie kiedy posiada wrażliwą powierzchnię (polimery, próbki biologiczne, itp.), oraz wprowadzenia zanieczyszczeń, ale także szybsze zużycie igły [180].

Z kolei w trybie przerywanym zasada prowadzenia pomiaru jest analogiczna jak w kontaktowym, z tym, że igła kontaktuje się z badaną powierzchnią przez bardzo krótki okres czasu. Natomiast tryb bezkontaktowy to taki, w którym wspornik z igłą wibruje z daną częstotliwością rezonansową zbliżając się do powierzchni próbki. W wyniku oddziaływań igła-powierzchnia częstotliwość ta jest zmieniana.

Najczęściej stosowanym parametrem do określenia chropowatości powierzchni jest średnie kwadratowe odchylenie profilu (z ang. *root mean square*, S_q). S_q wyliczany jest zgodnie z Równaniem 13:

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} [z(x_k, y_l)]^2} \quad (13)$$

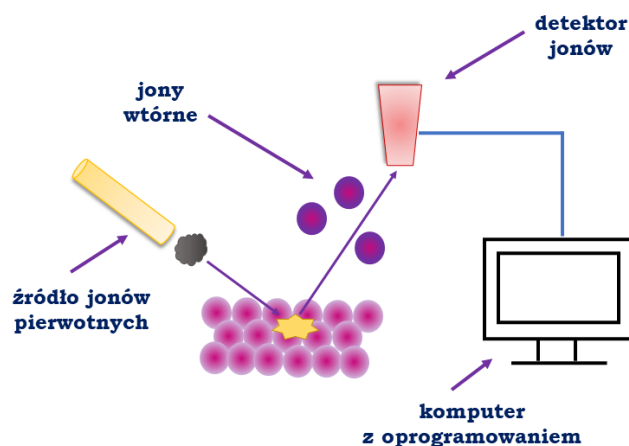
gdzie x i y to współrzędne, z to odchylenie prostopadłe od idealnie gładkiej powierzchni, M to liczba punktów w kierunku x , N to liczba punktów w kierunku y , k i l to punkty pomiarowe.

AFM ma bardzo szeroki aspekt aplikacyjny. Możliwe jest uzyskanie nie tylko obrazu morfologii powierzchni, ale także obrazu fazowego, a stosując inne tryby pomiarowe można także otrzymać obrazy rozkładu potencjału powierzchniowego. Istotne jest także to, że można go zastosować do scharakteryzowania filmów organicznych, osadzonych na nośnikach stałych [173, 182-186]. Dodatkowo ogromną zaletą AFM jest fakt, że nie trzeba pokrywać próbki warstwą przewodzącą złota, jak jest to konieczne w przypadku skaningowego mikroskopu elektronowego (z ang. *scanning electron microscope*, SEM).

5.2. Spektrometria mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS)

Spektrometria mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (z ang. *time of flight secondary ion mass spectrometry*, TOF-SIMS) to wariant spektrometrii mas, który znajduje zastosowanie w charakteryzowaniu między innymi powierzchni polimerów oraz osadzonych na nich warstw, ale także biomateriałów i tkanek [173, 186-196].

TOF-SIMS polega na bombardowaniu powierzchni wysokoenergetyczną wiązką jonów pierwotnych. W wyniku tego procesu powstają jony wtórne, które są analizowane w dalszych etapach pomiaru (Rysunek 15). Analizator czasu przelotu umożliwia jednoczesne wykrywanie jonów o różnych stosunkach masy do ładunku (m/z) z dużą szybkością (sięgającą 50 kHz) i czułością [197-199].



Rysunek 15 Schemat budowy i działania aparatu TOF-SIMS. Opracowanie własne.

Jony wtórne są przyspieszane ze stałym potencjałem (zwykle 2-8 keV), którego polaryzacja decyduje o tym, czy w detektorze są rejestrowane jony dodatnie czy ujemne. Jony charakteryzujące się małą masą poruszają się z większą prędkością i docierają wcześniej do detektora. Separacja jonów jest możliwa wtedy, gdy energia analizowanych jonów jest stała. Zebrane dane są konwertowane na widma masowe o bardzo wysokiej rozdzielczości (np. 10 000 dla piksu Si o masie 29 u), które poddawane są dalszej analizie [197-199].

W ciągu ostatniej dekady nastąpił znaczny rozwój źródeł jonów. Obecnie stosowane umożliwiają znacznie mniej destrukcyjną analizę bardziej miękkich materiałów, takich jak próbki organiczne, polimerowe i biologiczne. Ciekłokrystaliczne działło jonowe uwalnia wiązkę jonów służącą do analizy w urządzeniu TOF-SIMS. Pierwotnie stosowanymi działami były te oparte na jonach galu, złota, a obecnie na jonach bizmutu [197]. Istotną zaletą działła bizmutowego jest możliwość formowania małych klastrów, co zwiększa wydajność jonów wtórnych a jednocześnie pozwala osiągnąć rozdzielczość boczną poniżej 50 nm. Dodatkowo próbkę można poddać trawieniu jonowemu z użyciem jonów cezu, tlenu lub argonu, co pozwala otrzymać rozkład przestrzenny pierwiastków w próbce (profile głębokościowe). W przypadku TOF-SIMS rozdzielczość wgłębna jest na poziomie około 1 nm. Ponadto ostatnio wdrożono jonowe argonowe działło klastrowe (ang. *gun cluster argon ion beam*), w którym wiązka argonu zbudowana jest z 1000-3000 atomów, co powoduje, że energia oddziaływania z próbką jest kilka-kilkaset tysięcy razy mniejsza w stosunku do źródeł Cs lub O. Pozwala to uzyskać widma przy rejestracji profili głębokościowych dla grubszych warstw organicznych.

5.3. Pomiar kąta zwilżania (CA) i wyznaczenie swobodnej energii powierzchniowej

Jak zostało wcześniej wspomniane zwilżalność powierzchni biomateriału jest bardzo ważną cechą, która determinuje odpowiedź organizmu na sztuczny materiał. Zwilżalność powierzchni najczęściej jest określana poprzez pomiary kąta zwilżania, który jest definiowany jako „kąt między styczną do powierzchni kropli osadzonej na powierzchni ciała stałego, w punkcie trójfazowego kontaktu, a jej rzutem na powierzchnię graniczną ciało stałe-gaz”. Kąt zwilżania między cieczą a powierzchnią idealną ciała stałego (to znaczy taką, która jest atomowo gładka, chemicznie jednorodna, niereaktywna i nieodkształcalna pod wpływem cieczy) był tradycyjnie definiowany za pomocą równania Younga (Równanie 14), który powiązał kąt zwilżania z napięciem powierzchniowym [200].

$$\gamma_l \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{sl} \quad (14)$$

gdzie θ to kąt zwilżania, γ_l to napięcie powierzchniowe cieczy, γ_s to swobodna energia powierzchniowa ciała stałego, γ_{sl} to swobodna energia międzyfazowa ciało stałe/ciecz.

Na podstawie powyższego równania można stwierdzić, że powierzchnia badanego ciała stałego charakteryzująca się wysoką swobodną energią powierzchniową (powierzchnia hydrofilowa) będzie powodowała, że mierzony kąt zwilżania będzie niski. I odwrotnie, uzyskany kąt zwilżania będzie wysoki, gdy swobodna energia powierzchniowa danego materiału jest niska (powierzchnia hydrofobowa) [201]. Najczęściej stosowaną cieczą do określenia zwilżalności poprzez pomiar kąta zwilżania jest woda. Według jej wartości określa się powierzchnie superhydrofobowe ($CA > 150^\circ$) i superhydrofilowe ($CA < 10^\circ$) [202].

Istnieje kilka metod pomiaru kąta zwilżania:

- metoda siedzącej kropli,
- pęcherzykowa,
- Wilhelmy'ego,

przy czym pierwsza z nich jest najczęściej stosowana. Technika siedzącej kropli polega na umieszczeniu kropli cieczy testowej z mikrostrzykawki na powierzchni badanego materiału. Po jej postawieniu na materiale można zmierzyć wstępujący kąt zwilżania, zwykle za pomocą goniometru. Natomiast po odciągnięciu części objętości kropli z powierzchni badanego materiału można zmierzyć cofający kąt zwilżania.

W metodzie pęcherzykowej badany materiał jest zanurzony w cieczy, pod którym umieszczana jest rurka kapilarna dozująca pęcherzyk powietrza. Kąt zwilżania to kąt utworzony między ciałem stałym a cieczą. W celu zmierzenia wstępującego kąta zwilżania pęcherzyk jest zasysany ponownie do strzykawki.

Z kolei metoda Wilhelmy'ego polega na zanurzeniu płytki przyczepionej do mikrowagi w roztworze cieczy, którą następnie powoli się wynurza. Kąt wstępujący stanowi kąt pomiędzy badanym ciałem stałym a meniskiem cieczy, a cofający to kąt między materiałem stałym a cieczą [203].

Dodatkowo na bazie zmierzonych kątów zwilżania można wyznaczyć swobodną energię powierzchniową dla badanego materiału, która umożliwi głębszą charakterystykę oddziaływań, jakie zachodzą pomiędzy materiałem stałym a cieczą testową. Jednym ze stosowanych podejść do wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej jest teoria LWAB (Lifshitz -van der Waals/Acid-Base) [204-206]. Na jej podstawie praca adhezji zależy od oddziaływań zachodzących pomiędzy ciałem stałym a cieczą na granicy faz (Równanie 15)

$$W_A^\alpha = \gamma_l(1 + \cos \theta_A) = 2\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + 2\sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+} \quad (15)$$

Autorzy podejścia LWAB zdefiniowali całkowitą swobodną energię powierzchniową jako sumę oddziaływań apolarnych γ_s^{LW} i polarnych γ_s^{AB} (Równania 16 i 17):

$$\gamma_s^{tot} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (16)$$

$$\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^-\gamma_s^+} \quad (17)$$

gdzie θ_A to średni wstępujący kąt zwilżania, γ_s^{tot} to całkowita swobodna energia powierzchniowa, γ_s^{LW} składowa Lifshitza-van der Waalsa, γ_s^{AB} to składowa kwasowo-zasadowa, $\gamma_{s/l}^-$ oznacza parametr elektrono-donorowy, a $\gamma_{s/l}^+$ parametr elektrono-akceptorowy.

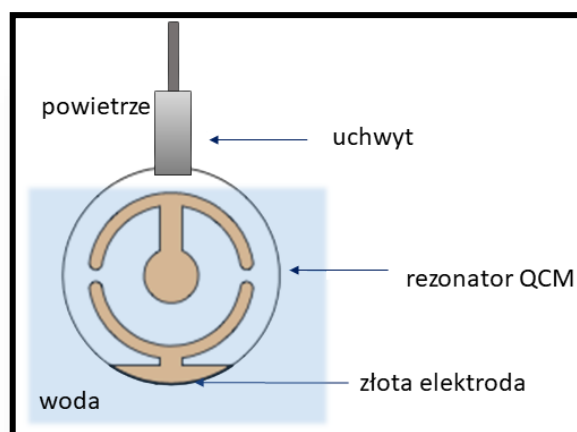
Aby obliczyć γ_s^{tot} należy rozwiązać trzy równania (16) z trzema niewiadomymi.

Ponadto teoria ta zakłada konieczność zastosowania dwóch cieczy polarnych i jednej niepolarniej. Wybór trzech cieczy testowych służących do wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych nadal stanowi kwestię dyskusyjną.

W zależności od zastosowanego układu cieczy można uzyskać różne wartości składowych swobodnej energii powierzchniowej. W celu weryfikacji Jańczuk i współ. badali różne kombinacje pięciu cieczy: wody, formamidu, glicerolu, diiodometanu i bromoformu [207]. W wyniku pomiarów kąta zwilżania na powierzchniach cholesterolu i/lub soli kwasów żółciowych stwierdzili, że optymalna trójka cieczy powinna składać się z jednej cieczy niepolarniej o stosunkowo wysokim napięciu powierzchniowym (przykładowo diiodometanu) oraz dwóch cieczy polarnych o istotnie różnych składowych napięciu powierzchniowego (np. wody i formamidu). Dowiedli, że zastosowanie takiego zestawu do pomiarów kąta zwilżania skutkuje najmniejszym błędem przy wyznaczaniu składowych swobodnej energii powierzchniowej, a tym samym zapewnia najbardziej wiarygodne wyniki. Ponadto autorzy nie rekomendują użycia dwóch cieczy słabo polarnych (diiodometanu i bromoformu) lub dwóch cieczy polarnych o podobnych składowych napięciu powierzchniowego (formamidu i glicerolu) ze względu na znaczne odchylenia w obliczeniach składowych swobodnej energii powierzchniowej.

5.4. Mikrowaga kwarcowa (QCM)

Mikrowaga kwarcowa (z ang. *quartz crystal microbalance*, QCM) to czułe na masę urządzenie, które może mierzyć masę w zakresie od nano- do mikrogramów. QCM składa się z piezoelektrycznego kryształu kwarcu o cięciu AT (Rysunek 16), umieszczonego pomiędzy górną i dolną elektrodą. QCM określa ilościowo zmianę masy, mierząc zmianę częstotliwości rezonansowej kryształu kwarcu [208]. QCM działa w oparciu o zasadę odwrotnego efektu piezoelektrycznego. Zmienne napięcie jest przykładane między dwiema elektrodami, które wytwarzają pole elektryczne powodując mechaniczne wibracje w kryształach kwarcu z powodu indukowanego naprężenia [208, 209].



Rysunek 16 Schemat rezonatora QCM z napyloną elektrodą złotą po zanurzeniu w subfazie wodnej przed osadzeniem monowarstwy Langmuira.

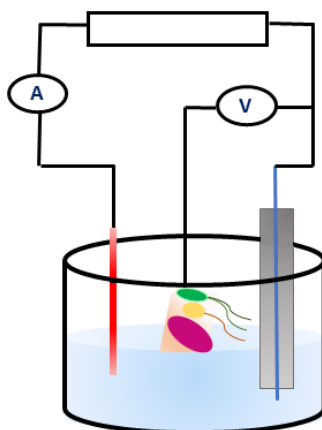
W przypadku materiałów stałych z osadzonymi monowarstwami Langmuira można określić ich pokrycie ilościowo przy zastosowaniu równania Sauerbrea [210] (Równanie 18):

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2 \Delta m}{A_{el} \rho_q^{1/2} \mu_q^{1/2}} \quad (18)$$

gdzie f_0 to podstawowa częstotliwość rezonansowa, Δm to zmiana masy, A_{el} to powierzchnia elektrody, μ_{ak} to moduł ścinania kwarcu ($2,95 \times 10^{11}$ dyn cm⁻²), ρ_q to gęstość kwarcu.

5.5. Woltamperometria cykliczna (CV)

Woltamperometria cykliczna (z ang. *cyclic voltammetry*, CV) jest wszechstronną techniką elektrochemiczną wykorzystywaną w szerokim zakresie zastosowań przemysłowych i badawczych [211]. Konwencjonalne pomiary CV są wykonywane w układzie trójelektrodowym, składającym się z elektrody pracującej, przeciwelektrody i elektrody odniesienia. Technika ta umożliwia monitorowanie reakcji elektrodowych poprzez pomiar prądu rejestrowanego na elektrodzie pracującej w funkcji przykładanego potencjału. Rysunek 17 przedstawia schemat takiego układu.



Rysunek 17 Schemat układu trójelektrodowego stosowanego w pomiarach CV. Opracowanie własne.

Typowe zastosowania CV obejmują między innymi ocenę jakości leków w farmaceutykach [212, 213], oznaczanie fenoli i przeciwutleniaczy w żywności i winie [214] oraz wykrywanie biomolekuł na przykład hormonów [213, 215], a także sprawdzanie homogeniczności monowarstw LB na nośnikach stałych [185, 216, 217].

Część eksperymentalna

6. Odczynniki i nośniki

Do utworzenia monowarstw Langmuira na granicy faz ciecz/powietrze i filmów Langmuira-Blodgett oraz do zbadania ich właściwości fizykochemicznych zastosowano poniżej podane odczynniki chemiczne i nośniki stałe.

- 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC), $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
- 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC), $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich, Polska,
- cyklosporyna A (CsA), $\geq 99,0\%$, Alfa Aesar, Niemcy,
- galusan laurylu (LG), $\geq 99,0\%$, Aldrich, Stany Zjednoczone,
- chitozan, MW 100000 - 300000 Da, stopień deacetylacji $82\% \pm 2$, Acrös Organics, Szwecja,
- kwas octowy, 99,5–99,9%, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
- chloroform, 99,8%, Macron Fine Chemicals, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
- metanol, $\geq 99,9\%$, Fluka™, Szwecja lub ROMIL-SpS™ Super Purity Solvents Specifications, Polska,
- aceton, $\geq 99,9\%$, Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska,
- woda dejonizowana o oporze właściwym 18,2 M Ω cm, oczyszczona przez system Milli-Q Plus 185, Millipore, Stany Zjednoczone,
- formamid, 99,5%, Acrös Organics, Szwecja,
- diiodometan, 99,0%, Sigma-Aldrich, Polska,
- poli(tereftalan etylenu), Bayer Material Science, Niemcy,
- mika, Continental Trade, Polska,
- mika pokryta warstwą złota, Georg Albert PVD Beschichtunben, Niemcy,
- szło pokryte warstwą złota, Arrandee, Niemcy.

7. Przygotowanie roztworów

7.1. Roztwory jedno- i wieloskładnikowe

W celu sporządzenia roztworów potrzebnych do utworzenia monowarstw Langmuira przygotowano naważki DOPC, DPPC, CsA oraz LG. Następnie rozpuszczono je w mieszaninie rozpuszczalników chloroform:metanol (4:1, v:v) uzyskując roztwory podstawowe o stężeniu równym 1 mg mL^{-1} . W dalszej kolejności zmieszano odpowiednie objętości roztworów bazowych otrzymując roztwory dwu- i trójskładnikowe (Tabela 2). W przypadku mieszanin trójskładnikowych zachowano stały stosunek molowy dwóch pierwszych składników równy 1:1, zaś ułamek molowy składnika trzeciego wynosił 0,25; 0,50 lub 0,75.

Tabela 2 Skład roztworów wieloskładnikowych użytych do tworzenia monowarstw Langmuira wyrażony ułamkiem molowym i stosunkiem molowym poszczególnych komponentów.

	Ułamek molowy	Stosunek molowy				
	χ^*	DOPC	:	CsA	:	LG
DOPC-CsA	0,25	3		1		0
	0,50	1		1		0
	0,75	1		3		0
DOPC-CsA-LG	0,25	3		3		2
	0,50	1		1		2
	0,75	1		1		6

* ułamek molowy χ dotyczy ostatniego (drugiego lub trzeciego) składnika

7.2. Subfazy

Do przeprowadzenia eksperymentu techniką monowarstw Langmuira zastosowano trzy ciekłe fazy nośne: wodę z systemu Milli-Q, 0,1 % roztwór kwasu octowego (AA) oraz $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ roztwór chitozanu (Ch). 0,1 % roztwór kwasu octowego sporządzono przez rozcieńczenie kwasu stężonego wodą dejonizowaną. Następnie odważoną ilość Ch rozpuszczono w 0,1 % AA i poddano homogenizacji z szybkością 7000 obrotów na minutę przy użyciu homogenizatora SilentCrusher M (Niemcy) w czasie 20 minut. Roztwór po przygotowaniu przechowywano w lodówce.

8. Otrzymywanie monowarstw Langmuira oraz badanie ich właściwości

Do utworzenia monowarstw Langmuira na granicy faz ciecz/powietrze i/lub ich przeniesienia na nośnik stały zastosowano następujące wanny Langmuira/Langmuira-Blodgett:

- wannę Langmuira-Blodgett KSV NIMA o powierzchni całkowitej równej 783 cm^2 , sprzężoną z mikroskopem kąta Brewstera nanofilm_ultrabam (Accurion GmbH, Niemcy), będącą na wyposażeniu Katedry Zjawisk Międzyfazowych, Instytutu Nauk Chemicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej,
- wannę Langmuira-Blodgett KSV 2000 Standard (KSV, Finlandia), o powierzchni całkowitej równej 780 cm^2 , sprzężoną z miernikiem potencjału powierzchniowego (z ang. *Surface Potential Sensor*, SPOT, KSV NIMA) będącą na wyposażeniu Katedry Zjawisk Międzyfazowych, Instytutu Nauk Chemicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej,
- wannę Langmuira KSV NIMA 702, o powierzchni całkowitej równej 720 cm^2 , sprzężoną z miernikiem potencjału powierzchniowego (Kelvin Probe, Nanofilm Technologie GmbH), będącą na wyposażeniu Katedry Chemii Fizycznej, Wydziału Nauk, Uniwersytetu w Saragossie,
- wannę Langmuira-Blodgett KSV NIMA KN 2003, o powierzchni całkowitej 841 cm^2 , będącą na wyposażeniu Katedry Chemii Fizycznej, Wydziału Nauk, Uniwersytetu w Saragossie.

Teflonowe wanny wyposażone były w dwie barierki, wykonane również z teflonu lub z poliacetalu Delrin umożliwiając kompresję symetryczną. Wanny umieszczono na stołach antywibracyjnych, w obudowach z zaciemnionymi ścianami, pomieszczeniach o zmniejszonym zanieczyszczeniu lub typu *clean room*.

8.1. Wyznaczanie izoterm $\pi - A$

Zmiany napięcia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (izoterm $\pi - A$) rejestrowano przy użyciu platynowej płytki Wilhelmy'ego lub paska bibułki chromatograficznej z dokładnością $\pm 0,1 \text{ mN m}^{-1}$. W celu uniknięcia wprowadzenia zanieczyszczeń przed każdym pomiarem płytkę platynową płukano metanolem, potem wodą i wyprażano w płomieniu palnika. W przypadku zastosowania

bibułki, każdorazowo przed pomiarem nowy pasek zanurzano w etanolu i suszono w powietrzu. Stałą temperaturę ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) subfazy ciekłej utrzymywano za pomocą systemu obiegu wody z termostatem Alpha RA 8 (Lauda, Niemcy) i/lub klimatyzacji stacjonarnej w pomieszczeniu laboratoryjnym.

Przed wykonaniem eksperymentu przeprowadzano procedurę mycia wanny Langmuira/Langmuira-Blodgett. Powierzchnię wanny oraz barierok przecierano przy użyciu chusteczek bezpyłowych nasączanych acetonem. Po 15 minutach czynność powtarzano stosując metanol. Po kolejnych 15 minutach, gdy rozpuszczalnik odparował, wannę przepłukiwano trzykrotnie wodą dejonizowaną, a następnie napełniano ją subfazą do pomiaru odsysając nadmiar cieczy wraz z ewentualnymi zanieczyszczeniami za pomocą pompy próżniowej Suction Pump SP20 (Penlon, Anglia). Czystość powierzchni fazy nośnej sprawdzano poprzez pomiar napięcia powierzchniowego podczas ruchu barierok w kierunku środka wanny. Jeżeli wartość zmiany napięcia nie przekraczała $0,30 \text{ mN m}^{-1}$ uznawano, że powierzchnia nie zawiera zanieczyszczeń. W przeciwnym wypadku, procedurę mycia powtarzano.

Po doczyszczeniu powierzchni ciekłej fazy nośnej наносono roztwór badanej substancji, rozpuszczonej w mieszaninie chloroform:metanol (opis przygotowania roztworów podano wcześniej), przy użyciu mikrostrzykawki Hamiltona (Hamilton–Bonaduz, Szwajcaria). Znając powierzchnię wanny oraz masy molowe związków dobierano objętość roztworów ($15 - 70 \mu\text{L}$) w taki sposób, aby po nakropleniu uzyskać monowarstwę w stanie gazowym. Po naniesieniu roztworu na powierzchnię fazy ciekłej odczekiwano 10 minut w celu całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Następnie monowarstwę poddawano kompresji symetrycznej, ze stałą szybkością ruchu barierok równą 20 mm min^{-1} .

Ponadto w celu określenia stabilności badanych monowarstw rejestrowano zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu przy trzech wybranych wartościach początkowych π_0 ($5, 10, 15 \text{ mN m}^{-1}$) oraz izotermy sprężania-rozprężania ($\pi_0 = 10 \text{ mN m}^{-1}$), które dodatkowo dostarczyły informacji o odwracalności procesu. Dla każdej monowarstwy uzyskano co najmniej trzy izotermy $\pi - A$. Maksymalny błąd pomiarowy wynosił $\pm 4 \text{ \AA}^2 \text{ cząst.}^{-1}$, a najbardziej reprezentatywne izotermy zostaną przedstawione w dysertacji (Rozdział 12.1).

8.2. Wyznaczanie izoterm $\Delta V - A$

W celu wyznaczenia zmian potencjału powierzchniowego (ΔV) zachodzących podczas mechanicznego ściskania monowarstwy wykorzystano miernik potencjału SPOT. Wartości ΔV zostały wyznaczone jako różnica potencjałów pomiędzy płytką wibrującą umieszczoną nad subfazą a przeciwelektrodą zanurzoną w subfazie, z dokładnością do ± 1 mV. Zdjęcie wanny Langmuira-Blodgett KSV 2000 Standard wraz z miernikiem przedstawiono na Rysunku 18. W oparciu o wartości zmiany potencjału powierzchniowego obliczono wartości pozornego momentu dipolowego cząsteczek tworzących monowarstwę korzystając z równania Helmholtza (Równanie 12):

8.3. Określanie morfologii

Bezpośrednią obserwację morfologii oraz pomiary grubości monowarstw Langmuira utworzonych na granicy faz ciecz/powietrze prowadzono przy zastosowaniu mikroskopu kąta Brewstera sterowanego komputerowo (nanofilm_ultrabam Accurion GmbH, Rysunek 18). Rozdzielczość lateralna (boczna) mikroskopu wynosi 2 μm .

9. Otrzymywanie monowarstw Langmuira-Blodgett

W celu przeniesienia monowarstw Langmuira z fazy ciekłej na ciało stałe stosowano wannę Langmuira-Blodgett KSV 2000 Standard przedstawioną na Rysunku 18. Wanna służąca do osadzania monowarstw Langmuira dodatkowo wyposażona jest w niewielkie zagłębienie (rynnienkę) oraz mechanizm zanurzająco-wynurzający z uchwytem (z ang. *dipper*), który umożliwia zanurzanie/wynurzanie ciała stałego na określoną głębokość/wysokość.

Przed przystąpieniem do eksperymentu analogicznie prowadzono procedurę mycia opisaną wcześniej. Po sprawdzeniu czystości subfazy, nośnik stały mocowano w uchwycie i zanurzano w cieczy. Następnie nanoszono chloroformowo-metanolowy roztwór badanej substancji. Po odparowaniu rozpuszczalników monowarstwę poddawano kompresji symetrycznej do ciśnienia powierzchniowego równego 10 mN m^{-1} . Powyższa wartość ciśnienia, mniejsza niż ciśnienie załamania monowarstw poszczególnych związków, zapewniła obecność wszystkich substancji w monowarstwie podczas przenoszenia i po osadzeniu. Monowarstwy sprężano przy szybkości ruchu barierki wynoszącej 20 mm min^{-1} . Bezpośrednio po osiągnięciu zadanego ciśnienia powierzchniowego nośnik wynurzano ze stałą szybkością 5 mm min^{-1} , utrzymując

jednocześnie stałą wartość ciśnienia. Następnie podłoże z naniesioną monowarstwą pozostawiono do całkowitego odparowania wody i umieszczono w eksykatorze z ciemnego szkła chroniącym przed działaniem promieni słonecznych, w czasie przed dalszymi badaniami.

10. Przygotowanie płytek PET

10.1. Czyszczenie płytek

Przed modyfikacją powierzchni PET, płytki ($20 \times 20 \times 3 \text{ mm}^3$) pocięte z handlowo dostępnej płyty (Bayer Material Science, Niemcy) umyto metanolem oraz dwukrotnie wodą z systemu Milli-Q. Każdorazowo płytki zanurzone w obu cieczach umieszczono w łaźni ultradźwiękowej (UM4, Unima, Polska) na 15 minut. Następnie płytki wysuszono oraz przechowywano w eksykatorze wykonanym z ciemnego szkła w temperaturze pokojowej.

10.2. Aktywacja niskotemperaturową plazmą powietrzną

W celu aktywowania powierzchni PET umyte i wysuszone płytki polimeru włożono do komory generatora niskotemperaturowej oraz niskociśnieniowej (0,20 mbar) plazmy powietrznej (Pico, Diener Electronic, Niemcy, Rysunek 18) na 1 minutę (PET_p). Moc plazmy powietrznej wynosiła 460 W, a proces plazmowania przebiegał przy stałym przepływie gazu równym 22 sccm. Bezpośrednio po zakończonym procesie aktywacji powierzchnię PET poddano dalszej modyfikacji.

11. Badanie właściwości fizykochemicznych monowarstw Langmuira-Blodgett

11.1. Określanie topografii powierzchni przy pomocy AFM

Po osadzeniu monowarstw na płytkach z poli(tereftalanu etylenu) i/lub miki ($20 \times 30 \times 0,5 \text{ mm}^3$), miki pokrytej złotem ($5 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$) oraz szkła z warstwą złota ($5 \times 10 \times 2 \text{ mm}^3$) określono ich właściwości fizykochemiczne. Do zbadania nanostruktury monowarstw Langmuira-Blodgett zastosowano dwa mikroskopy sił atomowych (5600LS AFM, Agilent Technologies oraz Bruker Multimode 8). Pierwszy z nich (Rysunek 18) został wykorzystany, gdy monowarstwy przenoszono na poli(tereftalan etylenu). Badania wykonano w trybie kontaktu przerywanego (z ang.

tapping mode) przy użyciu igły skanującej o promieniu < 7 nm, częstotliwości rezonansowej 330 kHz z rozdzielczością 256×256 i w obszarze skanowania $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. Pomiary prowadzono w co najmniej trzech losowo wybranych miejscach próbki rozmieszczonych w obszarze $10 \times 10 \text{mm}^2$.

Z kolei mikroskop Bruker Multimode 8 z jednostką sterującą Nanoscope V był używany do pomiarów dla monowarstw LB przeniesionych na mikę oraz mikę z warstwą złota. W tym przypadku skanowanie prowadzono również w trybie bezkontaktowym, z częstotliwością skanowania 1 Hz, ale stosując igłę firmy Bruker o promieniu 8 nm, częstotliwości rezonansowej 90-210 kHz, oraz stałej sprężystości równej 5N m^{-1} . Powierzchnie próbek skanowano w co najmniej trzech losowo wybranych miejscach rozmieszczonych w obszarze $1 \times 1 \text{mm}^2$.

11.2. Określanie organizacji cząsteczkowej przy pomocy TOF-SIMS

Po wykonaniu pomiarów z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych próbki umieszczono w komorze spektrometru mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS, ION-TOF GmbH, Niemcy, Rysunek 18). Pomiary prowadzono w warunkach ultrawysokiej próżni (ciśnienie robocze $p < 10^{-9}$ mbar). Wzbudzenie jonów wtórnych uzyskano poprzez bombardowanie próbki jonami Bi^+ o energii 30 keV (prąd wiązki jonowej $> 1,0$ pA) w trybie *Spectrometry mode*. Nominalna średnica wiązki w tym trybie pomiarowym wynosiła poniżej $5 \mu\text{m}$, a rozdzielczość masowa 29 000, mierzona dla pików Si (29 u). Czas ekspozycji próbki na wiązkę pierwotną ustalono w taki sposób, aby zachować warunki reżimu statycznego, gwarantującego uzyskanie widma masowego o wysokiej jakości (dawka $< 1 \times 10^{12}$ jonów cm^{-2}). Obszar skanowania wynosił $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ przy rozdzielczości 256×256 punktów pomiarowych. Zastosowano 1 strzał/piksel. Do neutralizacji ładunku pozostałego na powierzchni użyto wiązki elektronów o energii 20 eV i potencjale powierzchniowym ($U = -360$ V). Widma masowe rejestrowano w trybie dodatnim (z ang. *positive mode*) w zakresie mas 0-1200 u. Analizę statyczną i identyfikację charakterystycznych fragmentów prowadzono przy użyciu oprogramowania *SurfaceLab 6.7* (ION-TOF). Otrzymane widma skalibrowano uwzględniając pozycję fragmentów CH_3^+ , C_2H_3^+ , C_2H_5^+ . Intensywności (pola pików) znormalizowano względem intensywności całkowitej (z ang. *total intensity*).

11.3. Określanie zwilżalności przy pomocy pomiarów kąta zwilżania CA

Następnie określono zwilżalność powierzchni nośników przed i po modyfikacji plazmą i/lub monowarstwami badanych substancji. W tym celu zmierzono wartości kąta zwilżania metodą siedzącej kropli za pomocą aparatu DGD ADR, GBX S.A.R.L sprężonego z kamerą oraz stolikiem o stopniu nachylenia kontrolowanym automatycznie (Rysunek 18), sterowanych przez oprogramowanie Windrop++. Do każdego eksperymentu wykorzystano trzy ciecze testowe o różnej polarności i dobrze znanych składowych napięcia powierzchniowego: wodę Milli-Q, formamid oraz dijdometan (Tabela 3). W każdym przypadku do pomiaru kąta zwilżania zastosowano taką samą objętość cieczy, która wynosiła 6 μL . Pomiar kąta wstępującego odbywał się na podstawie kształtu kropli bezpośrednio po jej postawieniu. Uzyskane wartości kąta zwilżania wody, formamidu i dijdometanu posłużyły do obliczeń swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych przy zastosowaniu podejścia LWAB (Równanie 16).

Tabela 3 Napięcie powierzchniowe oraz jego składowe dla cieczy testowych stosowanych w pomiarach kąta zwilżania wyrażone w mN m^{-1} [204-206].

Ciecz testowa	γ^{tot}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^{-}	γ^{+}
Woda	72,8	21,8	51,0	25,5	25,5
Formamid	58,0	39,0	19,0	39,6	2,28
Dijdometan	50,8	50,8	0,0	0,0	0,0

Ponadto do pomiarów kąta zwilżania wody metodą siedzącej kropli na monowarstwach osadzonych na mice, mice pokrytej warstwą złota oraz szkle pokrytym warstwą złota zastosowano tensjometr optyczny (Attension Theta Lite, Rysunek 18). Kąt zwilżania zmierzono umieszczając za każdym razem kroplę o takiej samej objętości przy pomocy mikrostrzykawki na powierzchni próbki.

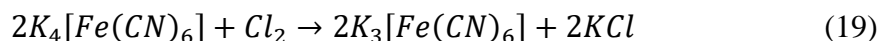
11.4. Określanie stopnia pokrycia powierzchni nośnika przy pomocy QCM

Dodatkowo w celu określenia efektywności przenoszenia monowarstw Langmuira na rezonator QCM z napyłoną elektrodą złotą (Rysunek 16) wykonano eksperymenty stosując mikrowagę kwarcową (*Quartz Crystal Microbalance*, QCM, Stanford Research Systems). W trakcie eksperymentu prowadzono pomiar częstotliwości czystego

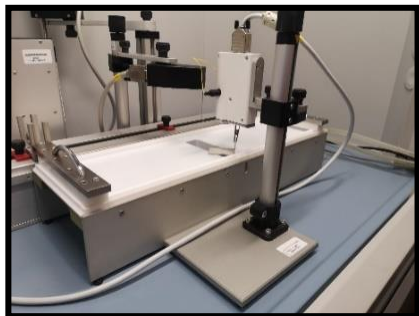
rezonatora QCM (bez osadzonej monowarstwy LB) oraz nośnika z osadzoną monowarstwą, różnicę częstotliwości wykorzystano do obliczenia stopnia pokrycia powierzchni przy użyciu równania Sauerbrea (Równanie 18).

11.5. Określanie jakości pokrycia przy pomocy CV

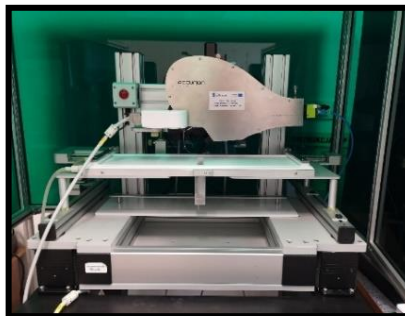
Dodatkowo do oceny jakości monowarstw LB otrzymanych na szkle pokrytym warstwą złota wykorzystano voltamperometrię cykliczną (CV). Pomiary prowadzono w ogniwie trójelektrodowym (Rysunek 17), gdzie elektrodę odniesienia stanowiła elektroda chlorosrebrowa $Ag|AgCl||KCl$, przeciwelektrodę drucik platynowy, zaś elektrodę pracującą Au(111). Jako elektrolit zastosowano 0,1 M roztwór KCl zawierający heksacyjanożelazian(III) potasu $K_3[Fe(CN)_6]$. Zmiany potencjału wynikające z przeniesienia elektronu między parą redoks (Równanie 19) w elektrolicie a elektrodą złotą rejestrowano przy użyciu potencjostatu Autolab firmy Eco Chemie w zakresie od 0,8 do -0,2 V mierzonego względem elektrody odniesienia z prędkością skanowania 100 mV s^{-1} .



Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej



Wanna Langmuira-Blodgett KSV 2000 Standard sprzężona z miernikiem potencjału powierzchniowego SPOT



Wanna Langmuira-Blodgett KSV NIMA sprzężona z mikroskopem kąta Brewstera nanofilm_ultrabam (Accurion GmbH)

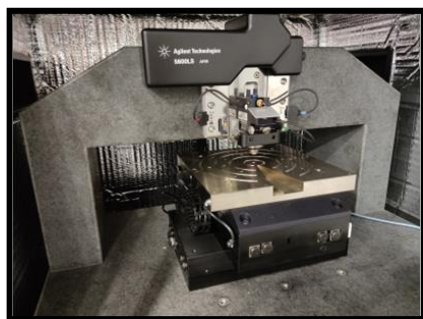


Generator plazmy Pico, Diener Electronic



Aparat do pomiaru kąta zwilżania DGD ADR, GBX S.A.R.L

Laboratorium Optyki Rentgenowskiej, Wydział Medyczny, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II



Mikroskop sił atomowych 5600LS AFM, Agilent Technologies



Spektrometr mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu, TOF SIMS 5-100, ION-TOF GmbH

Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Nauk, Uniwersytet w Saragossie, Hiszpania



Tensjometr optyczny, Attension Theta Lite



Potencjostat AUTOLAB 302N (Eco Chemie, Holandia) oraz standardowy układ trójelektrodowy stosowane do pomiarów metodą CV

Rysunek 18 Wybrane urządzenia pomiarowe zastosowane w eksperymentach objętych rozprawą doktorską.

Opis oraz dyskusja wyników

12. Charakterystyka monowarstw (filmów) Langmuira jedno- i wieloskładnikowych (DOPC, CsA, i/lub LG) otrzymanych na różnych subfazach (woda, AA, Ch)

Naturalna organizacja błon opiera się na właściwościach samoasocjacji tworzących je cząsteczek, między innymi fosfolipidów. W warunkach *in vitro* proces ten prowadzi do uzyskania struktury dwuwarstwowej. Technika Langmuira umożliwia utworzenie jednowarstwowego modelu błon biologicznych – monowarstwy, której właściwości, takie jak upakowanie cząsteczek, ściśliwość i stan fizyczny, są podobne do dwuwarstwy o takim samym składzie [218-220]. Dlatego technika Langmuira umożliwia modelowanie błon biologicznych oraz ich oddziaływań z innymi związkami.

W ramach badań realizowanych w pracy doktorskiej do uformowania modelowej błony biologicznej zastosowano nienasycony fosfolipid DOPC jako podstawowy element jej budowy. Lipidy, które w swojej strukturze zawierają grupę cholinową są najbardziej rozpowszechnione w komórkach eukariotycznych [221]. Ponadto fosfatydylocholina z nienasyconymi wiązaniami w łańcuchach węglowodorowych stanowią jeden z głównych składników większości błon, co determinuje ich płynny charakter. Użycie DOPC umożliwia także uzyskanie informacji o oddziaływaniu białek z błonami, jakie może mieć miejsce w organizmie ludzkim.

W dalszej kolejności sukcesywnie zwiększano złożoność układu przez stopniowe wprowadzanie innych składników. Z przeglądu literatury wynika, że słabo rozpuszczalna w wodzie cyklosporyna ma zdolność do przenikania przez błony lipidowe zmieniając upakowanie łańcuchów acylowych, szczególnie w pobliżu ugrupowań polarnych [222, 223]. Ze względu na odpychający charakter oddziaływań pomiędzy CsA a fosfolipidami, takimi jak 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC), 1-palmitoilo-2-oleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (POPC), 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoseryna (DPPS) oraz 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG), mieszalność tych związków jest tylko częściowa lub znikoma [125, 224-227]. Dlatego też wprowadzenie kolejnej substancji, która wykazuje zdolność do oddziaływania zarówno z fosfolipidem, jak i CsA, może zwiększyć wzajemną mieszalność tych składników, a także poprawić stabilność monowarstwy. Odpowiednim dodatkiem wydaje się galusan laurylu, którego cząsteczki są amfifilowe, i podobnie jak cząsteczki fosfolipidów i cyklosporyny mogą tworzyć monowarstwy Langmuira. Stwarza to możliwość badania ich właściwości na granicy faz ciecz/gaz. Dodatkową zaletę LG stanowi

skłonność do wychwytywania wolnych rodników [18], co zabezpiecza fosfolipidy przed niekorzystnym procesem utleniania, i jednocześnie przeciwdziała skutkom ubocznym nadmiernej ich produkcji w efekcie aktywności CsA.

W pierwszym etapie badań objętych rozprawą scharakteryzowano monowarstwy Langmuira: jedno- (DOPC, CsA, LG), dwu- (DOPC-CsA) oraz trójskładnikowe (DOPC-CsA-LG) na granicy faz ciecz/powietrze. W układach trójskładnikowych zachowano stały stosunek molowy DOPC-CsA 1:1, zaś zawartość trzeciego składnika (LG) odpowiadała następującym ułamkom molowym: $\chi = 0,25; 0,50; 0,75$. Jako subfazę dla monowarstw zastosowano wodę z systemu Milli-Q, roztwór kwasu octowego (AA) lub roztwór chitozanu (Ch). Określono wpływ rodzaju subfazy na mieszalność składników i stabilność termodynamiczną monowarstw trójskładnikowych, co umożliwiło osiągnięcie jednego z celów dysertacji Zbadanie wpływu kwasu octowego na właściwości monowarstw Langmuira było konieczne ze względu na to, że jest on stosowany jako rozpuszczalnik dla chitozanu. Dlatego też, to roztwór kwasu octowego stanowił układ odniesienia dla układów z polisacharydem. Ponadto określenie rodzaju i siły oddziaływań badanych związków (DOPC, CsA i/lub LG) z polisacharydem jest kluczowe w projektowaniu stabilnych monowarstw o pożądanych właściwościach (biokompatybilnych, immunosupresyjnych, przeciwutleniających, a także przeciwdrobnoustrojowych), które z powodzeniem można stosować do pokrywania powierzchni stałych w inżynierii tkankowej, w tym powierzchni implantów.

12.1. Izotermy $\pi - A$

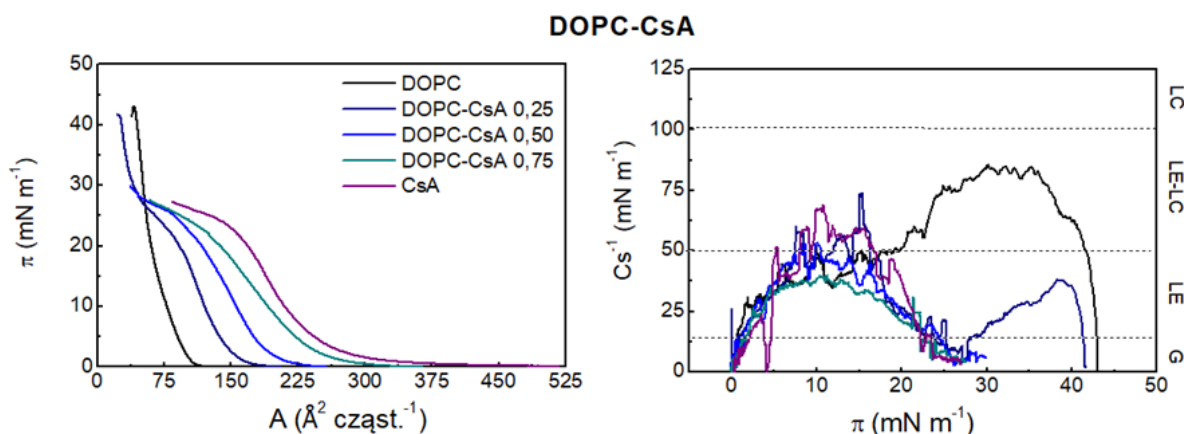
Każdy z badanych związków (DOPC, CsA i LG) tworzy monowarstwę Langmuira na granicy faz ciecz/powietrze. Oznacza to, że cząsteczki są praktycznie nierozpuszczalne w ciekłej fazie nośnej i wykazują zdolność do organizowania się w błonę dwuwymiarową na cieczy podczas procesu sprężania. Otrzymane izotermy $\pi - A$ dla monowarstw jednoskładnikowych (Rysunek 19) są zgodne z wcześniej opublikowanymi [227-230]. Natomiast scharakteryzowanie monowarstw wieloskładnikowych stanowiło jeden z celów rozprawy doktorskiej.

Realizując postawiony cel badawczy na podstawie izoterm $\pi - A$ wyznaczono parametry, takie jak powierzchnia A_0 oraz ciśnienie załamania (π_c). A_0 odpowiada powierzchni przypadającej na cząsteczkę, przy której zauważalny jest wzrost ciśnienia powierzchniowego podczas sprężania, to jest $\pi \cong 0,5 \text{ mN m}^{-1}$. Ponadto jej wartość można

przypisać przejściu monowarstwy z fazy gazowej w ciecz rozprężoną (G-LE). π_c określono poprzez rzutowanie na oś rzędnych punktu przecięcia dwóch linii będących przedłużeniem izotermy poniżej oraz powyżej jej przebiegu. Tabele 4 i 5 zawierają zestawienie wartości parametrów wyznaczonych z izoterm $\pi - A$ dla wszystkich badanych monowarstw na subfazie ciekłej. Jak można zauważyć, A_0 przyjmuje różne wartości w zależności od składu monowarstwy. Rozważając subfazę wodną otrzymano następujące wartości: $A_{0,CsA} = 380,4 \text{ \AA}^2$, $A_{0,DOPC} = 115,2 \text{ \AA}^2$ oraz $A_{0,LG} = 60,3 \text{ \AA}^2$. Powierzchnia $A_{0,CsA}$ wyznaczona dla monowarstwy CsA jest odpowiednio 3 i 6 razy większa niż dla DOPC oraz LG. Z kolei wartość ciśnienia załamania monowarstwy CsA jest około dwukrotnie mniejsza niż monowarstw DOPC i LG ($\pi_{c,CsA} = 23,1 \text{ mN m}^{-1}$, $\pi_{c,DOPC} = 43,3 \text{ mN m}^{-1}$, $\pi_{c,LG} = 45,9 \text{ mN m}^{-1}$) [231]. Uzyskane zależności mogą świadczyć o mniejszej stabilności monowarstwy CsA.

Kolejnym krokiem badawczym doktoratu było wyznaczenie izoterm $\pi - A$ dla monowarstw DOPC-CsA o różnych ułamkach molowych $\chi_{CsA} = 0,25; 0,50; 0,75$. Na podstawie ich analizy termodynamicznej dobrano odpowiednią proporcję składników DOPC-CsA 1:1, która została zachowana w układach trójskładnikowych DOPC-CsA-LG o zmiennej zawartości LG $\chi_{LG} = 0,25; 0,50; 0,75$. Jednakże ze względu na podział dysertacji i związaną z nim kolejność omawiania poszczególnych zależności analiza termodynamiczna oddziaływań dla wszystkich badanych monowarstw została przedstawiona w Rozdziale 12.3.

Jak można zaobserwować na Rysunku 19 izotermy $\pi - A$ zarejestrowane dla monowarstw DOPC-CsA na subfazie wodnej znajdują się pomiędzy izotermami monowarstw pojedynczych składników, a wyznaczone parametry A_0 również wykazują wartości pośrednie (Tabela 4). Analogiczną zależność uzyskano dla izoterm monowarstw DOPC-CsA-LG, przy czym efekt dodania różnych ilości trzeciego składnika (LG) analizowano w odniesieniu do monowarstwy dwuskładnikowej DOPC-CsA o stałym stosunku molowym pozostałych dwóch składników (1:1). Przy takiej proporcji występują bowiem najsilniejsze oddziaływania przyciągające między cząsteczkami DOPC i CsA (analizę oddziaływań przedstawiono w Rozdziale 12.3) [231].



Rysunek 19 Izotermi ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę ($\pi - A$) oraz wartości modułu ściśliwości (Cs^{-1}) w funkcji ciśnienia powierzchniowego wyznaczone dla badanych monowarstw otrzymanych na subfazie wodnej.

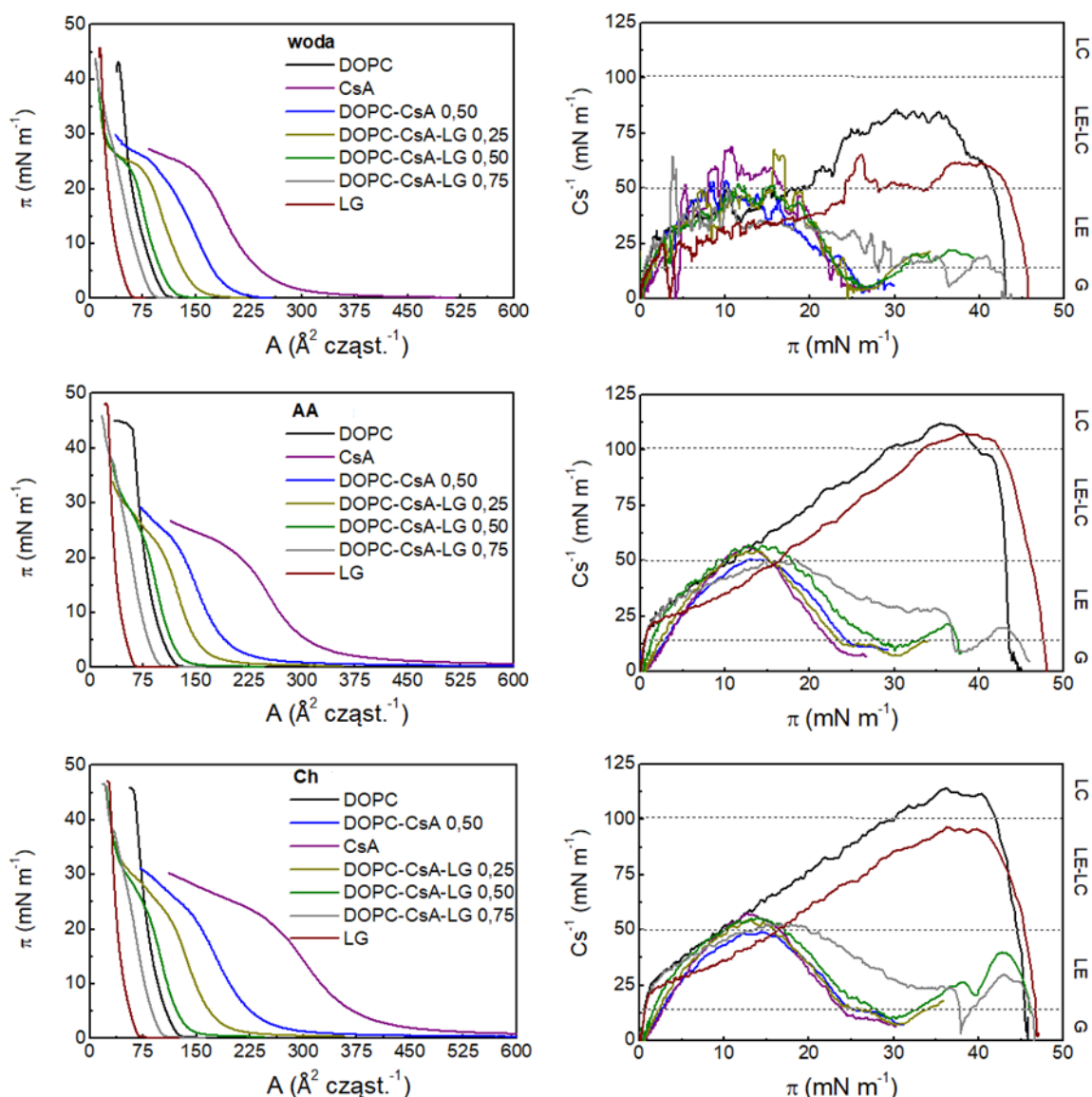
W przypadku monowarstw DOPC-CsA wraz ze wzrostem zawartości CsA ($\chi_{CsA} = 0,50$ i $0,75$) ciśnienie załamania zbliża się do wartości charakterystycznej dla monowarstwy CsA. Podobna zależność występuje dla monowarstw DOPC-CsA-LG. Wraz ze wzrostem ułamka molowego LG ciśnienie załamania jest porównywalne do wartości określonej dla monowarstwy LG (Tabela 4). Ponadto w przypadku DOPC-CsA 0,25 na izotermie $\pi - A$ widoczne są dwa przegięcia świadczące o załamaniu monowarstwy (Rysunek 19). Niższa wartość π_c odpowiada ciśnieniu załamania CsA, a wyższa DOPC (Tabela 4). Jednak przy wyższych ułamkach molowych CsA (DOPC-CsA 0,50; DOPC-CsA 0,75) lub LG (DOPC-CsA-LG 0,25 oraz DOPC-CsA-LG 0,50) nie obserwuje się drugiego załamania dla wspomnianych monowarstw mieszanych ze względu na utrudnienia techniczne. Powierzchnia wanny Langmuira jest ograniczona, co powoduje, że przy niskiej zawartości DOPC lub LG w monowarstwie nie można zarejestrować pełnej izotermi $\pi - A$, nawet gdy barierki osiągną pozycję całkowicie zamkniętą. Podobne obserwacje odnotowano również dla monowarstw mieszanych CsA z innymi lipidami [125].

Tabela 4 Parametry charakteryzujące izotermy $\pi - A$: A_0 oraz π_c wyznaczone dla badanych monowarstw otrzymanych na granicy faz woda/powietrze.

Monowarstwa	A_0 (\AA^2)	π_c (mN m^{-1})
DOPC	115,2 \pm 1,3	43,3 \pm 2,1
DOPC-CsA 0,25	173,8 \pm 1,2	22,7 \pm 3,1
		41,9 \pm 1,9
DOPC-CsA 0,50	223,7 \pm 1,7	22,8 \pm 2,4
DOPC-CsA 0,75	299,1 \pm 2,7	22,5 \pm 1,8
CsA	380,4 \pm 1,9	22,1 \pm 2,1
<hr/>		
DOPC-CsA-LG 0,25	176,5 \pm 2,3	23,0 \pm 1,6
DOPC-CsA-LG 0,50	127,9 \pm 3,9	23,0 \pm 2,8
DOPC-CsA-LG 0,75	91,8 \pm 3,4	43,6 \pm 1,0
LG	60,3 \pm 1,1	45,9 \pm 0,9

Na Rysunku 20 przedstawiono izotermy $\pi - A$ badanych monowarstw trójskładnikowych otrzymanych na subfazach wodnej, AA oraz Ch. Wyznaczone parametry A_0 oraz π_c zestawiono w Tabeli 5. Wartości powierzchni A_0 odpowiadające przejściu fazowemu G-LE dla wszystkich monowarstw jednoskładnikowych otrzymanych na subfazie AA są zbliżone do tych uzyskanych dla monowarstw na wodzie ($A_{0,DOPC} = 123,1 \text{ \AA}^2$ i $A_{0,LG} = 62,5 \text{ \AA}^2$), wyłączając $A_{0,CsA}$, która jest większa o $31,5 \text{ \AA}^2$ w stosunku do użytej subfazy wodnej ($A_{0,CsA} = 411,5 \text{ \AA}^2$). Podobnie ciśnienie powierzchniowe załamania monowarstw DOPC i LG jest dwukrotnie większe ($\pi_{c,DOPC} = 43,9 \text{ mN m}^{-1}$ i $\pi_{c,LG} = 48,1 \text{ mN m}^{-1}$) niż wyznaczone dla monowarstwy CsA ($\pi_{c,CsA} = 21,5 \text{ mN m}^{-1}$). Izoterma $\pi - A$ monowarstwy DOPC-CsA 0,50 znajduje się pomiędzy izotermami monowarstw DOPC i CsA, charakteryzując się również pośrednimi wartościami A_0 (Tabela 5).

DOPC-CsA-LG



Rysunek 20 Izotermy ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę ($\pi - A$) oraz wartości modułu ściśliwości (C_s^{-1}) w funkcji ciśnienia powierzchniowego wyznaczone dla badanych monowarstw otrzymanych na subfazach wodnej, AA oraz Ch.

W przypadku monowarstw trójskładnikowych na subfazie AA wraz ze wzrostem zawartości LG A_0 maleje (od $251,1 \text{ \AA}^2$ dla $\chi_{LG} = 0,25$, przez $150,8 \text{ \AA}^2$ dla $\chi_{LG} = 0,50$, do $98,8 \text{ \AA}^2$ dla $\chi_{LG} = 0,75$). Z kolei dla parametru π_c obserwuje się tendencję odwrotną. Wzrastająca zawartość LG w monowarstwie zwiększa wartości ciśnienia powierzchniowego odpowiadającego pierwszemu załamaniu się monowarstwy od $21,0 \text{ mN m}^{-1}$ dla $\chi_{LG} = 0,25$ do $24,3 \text{ mN m}^{-1}$ dla $\chi_{LG} = 0,75$. Dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,75 odnotowano trzy wartości ciśnienia załamania. Pierwsze przy $\pi = 24,3 \text{ mN m}^{-1}$ można powiązać z desorpcją pojedynczych cząsteczek CsA lub fazy

wzbogaconej w CsA z monowarstwy do subfazy. Ciśnienie drugiego załamania wynoszące $37,2 \text{ mN m}^{-1}$ może świadczyć o usuwaniu fazy wieloskładnikowej a nie pojedynczego składnika, ponieważ wspomniana powyżej wartość ciśnienia nie odpowiada załamaniu monowarstwy jednoskładnikowej. Wartość ciśnienia trzeciego załamania równa $46,6 \text{ mN m}^{-1}$ (Rysunek 20, Tabela 5) koreluje z tworzeniem się struktur wielowarstwowych. Dla pozostałych monowarstw mieszanych uzyskanie pełnych izoterm $\pi - A$ z uwzględnieniem dwóch/trzech ciśnień załamania, tak jak w przypadku subfazy wodnej, nie było możliwe ze względów technicznych związanych z ograniczoną powierzchnią wanny Langmuira [230].

Tabela 5 Parametry charakteryzujące izotermy $\pi - A$: A_0 oraz π_c wyznaczone dla badanych monowarstw otrzymanych na granicy faz AA/powietrze oraz Ch/powietrze.

Monowarstwa	Ciekła faza nośna			
	AA		Ch	
	A_0 (\AA^2)	π_c (mN m^{-1})	A_0 (\AA^2)	π_c (mN m^{-1})
DOPC	$123,1 \pm 1,8$	$43,9 \pm 2,4$	$127,3 \pm 2,8$	$45,8 \pm 2,5$
CsA	$390,0 \pm 2,3$	$22,6 \pm 1,6$	$446,6 \pm 2,7$	$23,3 \pm 2,2$
DOPC-CsA 0,50	$411,5 \pm 1,9$	$21,5 \pm 1,1$	$463,7 \pm 2,4$	$21,7 \pm 3,1$
DOPC-CsA-LG 0,25	$251,1 \pm 2,9$	$21,0 \pm 1,4$	$289,7 \pm 3,3$	$22,7 \pm 3,9$
DOPC-CsA-LG 0,50	$150,8 \pm 3,8$	$23,8 \pm 3,2$	$181,6 \pm 2,7$	$22,7 \pm 2,3$
		$24,3 \pm 2,7$		$24,6 \pm 3,7$
DOPC-CsA-LG 0,75	$98,8 \pm 3,8$	$37,2 \pm 3,8$	$104,7 \pm 0,8$	$38,3 \pm 0,1$
		$46,6 \pm 0,8^*$		$47,4 \pm 1,7^*$
LG	$62,5 \pm 0,9$	$48,1 \pm 0,8$	$69,3 \pm 1,5$	$46,9 \pm 0,5$

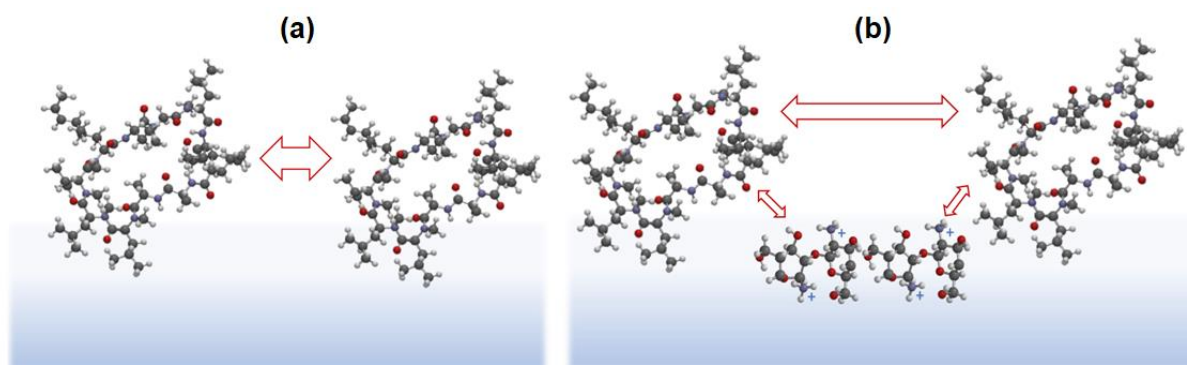
* ciśnienie powierzchniowe odpowiadające pierwszemu/drugiemu/trzeciemu załamaniu się danej monowarstwy.

W obecności cząsteczek chitozanu w subfazie omówiony wcześniej trend zmian parametrów charakteryzujących izotermy $\pi - A$ od składu monowarstw jest zachowany, przy czym wszystkie otrzymane izotermy $\pi - A$ badanych monowarstw są przesunięte w kierunku większych powierzchni przypadających na cząsteczkę. Wartość A_0 wyznaczona dla monowarstwy CsA jest większa o $52,2 \text{ \AA}^2$ w porównaniu z wartością określoną dla tej monowarstwy na subfazie AA (Tabela 5). Dla monowarstw DOPC i LG wartości parametru A_0 są również większe, odpowiednio o $4,2 \text{ \AA}^2$ i $5,9 \text{ \AA}^2$. W przypadku monowarstwy DOPC-CsA 0,50 wartość A_0 ($A_0 = 446,6 \text{ \AA}^2$) mieści się pomiędzy wartościami A_0 dla monowarstw

DOPC i CsA ($A_{0,DOPC} = 127,3 \text{ \AA}^2$ i $A_{0,CsA} = 463,7 \text{ \AA}^2$). Przesunięcie izoterm $\pi - A$ w kierunku większych powierzchni może wskazywać na penetrację monowarstwy przez cząsteczki chitozanu. W związku z tym odległość między cząsteczkami tworzącymi monowarstwę zwiększa się, a tym samym osłabiają się oddziaływania pomiędzy nimi [230]. Podobne zachowanie się monowarstw lipidów oraz kwasów tłuszczowych otrzymanych na subfazie chitozanowej opisali inni autorzy [232, 233]. Ponadto może to również świadczyć o silniejszych oddziaływaniach między cząsteczkami Ch a składnikami monowarstwy.

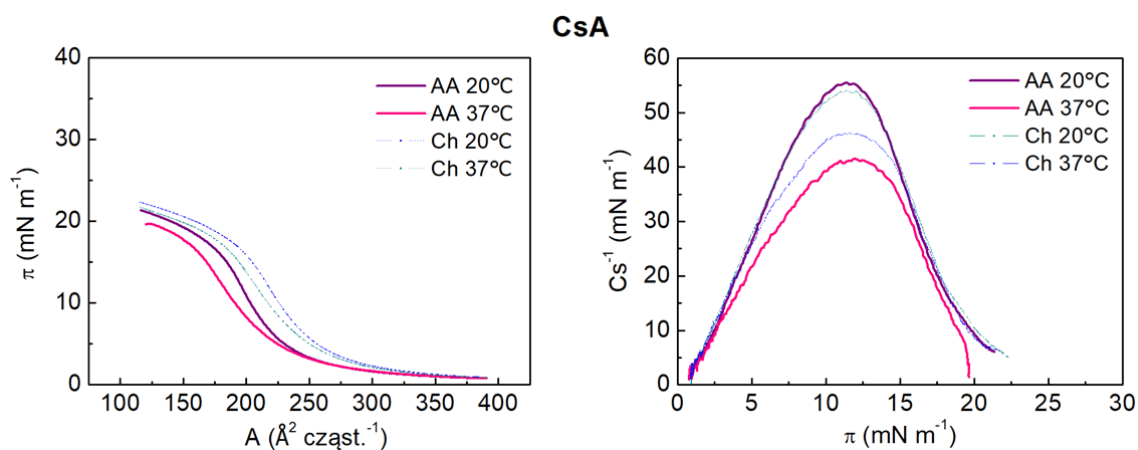
W przypadku ciśnień powierzchniowych odpowiadających załamaniu monowarstw jednoskładnikowych uzyskano niewiele większe wartości w obecności Ch, za wyjątkiem LG, gdzie π_c jest mniejsze o $1,2 \text{ \AA}^2$. Wyższe wartości π_c sugerują, że monowarstwy utworzone na subfazie Ch są bardziej stabilne niż na AA. Powierzchnia A_0 wyznaczona dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,25 wynosi $289,7 \text{ \AA}^2$ i wraz ze wzrostem ilości LG maleje do wartości $104,7 \text{ \AA}^2$ przy $\chi_{LG} = 0,75$. W przeciwieństwie do A_0 , π_c nieznacznie wzrasta o $1,9 \text{ mN m}^{-1}$ wraz ze wzrostem zawartości LG w monowarstwie od 0,25 do 0,75 (odpowiednio $\pi_c = 22,7 \text{ mN m}^{-1}$ oraz $\pi_c = 24,6 \text{ mN m}^{-1}$) [230].

Powyższe zależności wskazują, że chitozan w największym stopniu zmienia właściwości monowarstwy CsA oraz DOPC-CsA 0,50 [230]. Wpływ chitozanu na zachowanie monowarstwy CsA przedstawiono schematycznie na Rysunku 21. Cząsteczki Ch powodują rozluźnienie monowarstwy CsA poprzez zwiększenie odległości między cząsteczkami i osłabienie oddziaływań przyciągających CsA-CsA. Znaczny udział w tym procesie biorą oddziaływania Ch z CsA poprzez mostki wodorowe i/lub siły elektrostatyczne [229]. Ponadto obecność cząsteczek Ch może wpływać na zmiany konformacji polipeptydu. W przypadku DOPC-CsA występowanie oddziaływań odpychających pomiędzy cząsteczkami oraz obecność wolnych przestrzeni spowodowanych niedopasowaniem kształtu cząsteczek dodatkowo sprzyjają penetracji monowarstwy przez cząsteczki chitozanu. Natomiast, w grupie monowarstw trójskładnikowych najslabszy wpływ chitozanu obserwuje się dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50. LG może wypełniać wolne przestrzenie działając jako łącznik pomiędzy cząsteczkami DOPC i CsA, zmieniając w ten sposób charakter oddziaływań. W związku z tym cząsteczki polisacharydu nie mogą penetrować monowarstwy w tak dużym stopniu, jak wnikają do monowarstwy DOPC-CsA 0,50. Tworzenie bardziej zwartych filmów może być korzystne w aspekcie ich przenoszenia na nośnik stały.



Rysunek 21 Schematyczne ułożenie cząsteczek CsA w monowarstwie jednoskładnikowej (a) na subfazie AA w przypadku braku cząsteczek Ch (b) lub w ich obecności, jak również możliwe oddziaływania pomiędzy cząsteczkami Ch-CsA.

Dodatkowo, w ramach dysertacji określono przebieg izoterm $\pi - A$ dla monowarstwy CsA na subfazie AA i Ch w temperaturze 37°C (Rysunek 22), która odpowiada warunkom panującym w organizmie ludzkim. Stwierdzono, że w wyższej temperaturze izotermy monowarstw CsA są przesunięte w kierunku mniejszych powierzchni, a wartość ciśnienia załamania ulega obniżeniu [229]. Ponadto izotermy są bardziej nachylone, co może wskazywać na zwiększoną elastyczność monowarstwy. Natomiast w obecności chitozanu obserwuje się wzrost powierzchni przypadającej na cząsteczkę, co świadczy o wnikaniu polisacharydu pomiędzy cząsteczki CsA, ale efekt jest mniejszy niż w temperaturze 20°C.



Rysunek 22 Izotermy ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę ($\pi - A$) oraz wartości modułu ściśliwości (C_s^{-1}) w funkcji ciśnienia powierzchniowego wyznaczone dla monowarstwy CsA otrzymanej na subfazach AA oraz Ch w temperaturze 20°C i 37°C.

Przebieg izoterm $\pi - A$ wskazuje, że wszystkie badane monowarstwy znajdują się w fazie ciekłej w całym zakresie ciśnienia powierzchniowego. Nie obserwuje się *plateau*

typowego dla przejścia fazowego pierwszego rzędu ciecz rozprężona-ciecz skondensowana (LE-LC). Tę obserwację dodatkowo potwierdzają wartości modułu ściśliwości, które zostały opisane w następnym rozdziale. Faza ciekła filmów pozwala na zachowanie właściwości zbliżonych do błon biologicznych, w tym naturalnej płynności, która zapewnia ich prawidłowe funkcjonowanie. Może to przełożyć się bezpośrednio na wzrost biokompatybilności pokrycia.

12.2. Moduł ściśliwości

Kolejny cel cząstkowy pracy doktorskiej obejmował określenie stanu fizycznego, w jakim występują badane monowarstwy w zależności od ich składu i/lub obecności cząsteczek chitozanu w ciekłej fazie nośnej. Aby go osiągnąć obliczono wartości modułu ściśliwości (C_s^{-1}) korzystając z Równania 2.

Na Rysunkach 19 i 20 pokazano wartości C_s^{-1} uzyskane dla badanych monowarstw w funkcji ciśnienia powierzchniowego oraz zaznaczono zakresy występowania danego stanu fizycznego zgodnie z kryterium Daviesa and Rideala [160]. Dla przejrzystości w Tabelach 6 i 7 zestawiono wartości modułu ściśliwości przy wybranych ciśnieniach powierzchniowych. Maksymalne wartości C_s^{-1} odpowiadają monowarstwie najbardziej upakowanej. Na ich podstawie można stwierdzić, że wszystkie monowarstwy znajdują się w stanie ciekłym rozprężonym (LE) lub pośrednim pomiędzy ciekłym rozprężonym a skondensowanym (LE-LC). Większość badanych monowarstw nie występuje w stanie ciekłym skondensowanym (LC), gdyż wartości C_s^{-1} nie przekraczają 100 mN m^{-1} (Tabele 6 i 7) za wyjątkiem filmów DOPC i LG otrzymanych na subfazach AA i Ch. Wykazują one wartości modułu odpowiednie dla fazy LC przy wysokich wartościach ciśnienia powierzchniowego ($36\text{-}38 \text{ mN m}^{-1}$).

W zakresie ciśnień powierzchniowych $5\text{-}15 \text{ mN m}^{-1}$, w grupie monowarstw jednoskładnikowych na subfazie wodnej, CsA charakteryzuje się najwyższymi wartościami C_s^{-1} ($47,2\text{-}66,4 \text{ mN m}^{-1}$). Natomiast, dla monowarstw DOPC oraz LG wartości te są niższe i wynoszą odpowiednio od $32,8$ do $49,0 \text{ mN m}^{-1}$ oraz od $24,4$ do $34,2 \text{ mN m}^{-1}$ [231]. Na tej podstawie można wnioskować, że CsA tworzy bardziej upakowane, a więc mniej elastyczne monowarstwy, co koreluje z najniższą wartością ciśnienia załamania uzyskaną dla tej monowarstwy. Obserwację tę można wytłumaczyć tworzeniem wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, dzięki obecności w strukturze CsA grup amidowych, co przyczynia się do sztywności szkieletu cyklicznego [124, 234].

Tabela 6 Wartości modułu ściśliwości C_s^{-1} wyznaczone przy ciśnieniu powierzchniowym 5, 10 lub 15 $mN m^{-1}$ oraz wartość maksymalna z odpowiadającym jej ciśnieniem powierzchniowym, $C_{s,maks}^{-1}/\pi$ dla badanych monowarstw otrzymanych na granicy faz woda/powietrze.

π ($mN m^{-1}$)	5	10	15	$C_{s,maks}^{-1}/\pi$
Monowarstwa	C_s^{-1} ($mN m^{-1}$) dla monowarstw dwuskładnikowych			
DOPC	32,8±0,4	47,9±2,8	49,0±1,7	85,1±0,8/30
DOPC-CsA 0,25	32,6±1,4	46,8±0,4	63,8±2,4	74,3±0,7/15
DOPC-CsA 0,50	36,5±0,9	52,6±1,0	36,2±1,9	52,6±1,0/10
DOPC-CsA 0,75	33,1±0,7	38,1±1,2	32,5±0,4	40,0±0,4/10
CsA	47,2±1,4	66,4±1,6	58,4±0,9	69,3±1,5/11
	C_s^{-1} ($mN m^{-1}$) dla monowarstw trójskładnikowych			
DOPC-CsA-LG 0,25	32,6±1,9	41,4±1,9	48,0±1,4	68,3±1,8/16
DOPC-CsA-LG 0,50	31,8±1,2	45,2±2,1	50,2±0,5	51,8±1,1/12
DOPC-CsA-LG 0,75	35,6±0,9	41,4±1,4	34,3±0,8	65,4±2,4/4
LG	24,4±1,0	30,4±0,9	34,2±0,4	65,1±1,2/26

Wśród badanych monowarstw najluźniej upakowana jest monowarstwa LG. Warto wspomnieć, że LG (Rysunek 6) jest polifenolem posiadającym trzy grupy hydroksylowe zdolne do tworzenia międzycząsteczkowej sieci wiązań wodorowych. Ponadto cząsteczki LG zawierają pierścienie aromatyczne, które umożliwiają występowanie oddziaływań międzycząsteczkowych typu $\pi - \pi$ [235]. Mogą one wywołać uporządkowanie dalekiego zasięgu w obszarze grup funkcyjnych, gdzie przypuszczalnie jeden pierścień arylowy może oddziaływać z czterema sąsiednimi pierścieniami aryłowymi poprzez oddziaływania typu krawędź do frontu (z ang. *edge-to-face*) [236]. Niemniej jednak stosunkowo duże polarne grupy pirogalolowe mogą prowokować nachylenie łańcuchów hydrofobowych, aby skompensować niedopasowanie przestrzenne tych dwóch fragmentów. W związku z tym łańcuchy mogą być nachylone w stosunku do powierzchni subfazy warunkując oddziaływania Lifshitz-van der Waalsa oraz powodując wzrost elastyczności monowarstwy. Z kolei w strukturze fosfolipidu DOPC znajdują się wiązania nienasycone z podstawnikami ułożonymi w konfiguracji *cis*, które powodują rozluźnienie w upakowaniu łańcuchów i powstawanie struktury o stopniu skondensowania pośrednim pomiędzy monowarstwami jednoskładnikowymi CsA i LG [231].

Ze względu na fakt, że wszystkie monowarstwy jednoskładnikowe na subfazie wodnej znajdują się w fazie LE, monowarstwy mieszane również zachowują ten sam stan

fizyczny, pomimo zróżnicowanego stopnia upakowania wyrażonego różnymi wartościami modułu ściśliwości (Tabela 6). Dla monowarstw mieszanych DOPC-CsA wartości C_s^{-1} wahają się od 32,5 do 63,8 mN m⁻¹. Najwyższą wartość ($C_s^{-1} = 63,8$ mN m⁻¹) uzyskano dla dwuskładnikowej monowarstwy DOPC-CsA 0,25 przy ciśnieniu powierzchniowym równym 15 mN m⁻¹. Ponadto moduł ściśliwości monowarstw trójskładnikowych osiąga niższe wartości w porównaniu z dwuskładnikowymi. W związku z tym można stwierdzić, że pomimo wzrostu liczby składników tworzących monowarstwę ich ściśle określony stosunek molowy może przyczynić się do osiągnięcia filmu o strukturze charakteryzującej się mniejszą elastycznością z powodu specyficznego ułożenia cząsteczek oraz ich wzajemnych oddziaływań [231].

Monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50 na wodzie w zakresie ciśnień 5-15 mN m⁻¹ wykazuje najwyższą wartość modułu ściśliwości ($C_s^{-1} = 50,2$ mN m⁻¹, $\pi = 15$ mN m⁻¹) spośród monowarstw trójskładnikowych. Wyższe wartości C_s^{-1} wskazują na zwiększone upakowanie cząsteczek w stosunku do pozostałych monowarstw, co świadczy o silniejszych oddziaływaniach przyciągających między nimi. Optymalna organizacja cząsteczkowa może przekładać się na większą stabilność filmów istotną przy ich przenoszeniu na podłoże stałe oraz w aspekcie ich późniejszych zastosowań. Stabilność może ulec dalszemu wzmocnieniu w obecności chitozanu.

Na Rysunku 20 umieszczono zależności modułu ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego $C_s^{-1} = f(\pi)$ dla monowarstw uzyskanych na subfazie AA oraz Ch. Dodatkowo w Tabeli 7 zestawiono wartości C_s^{-1} dla wybranych ciśnień powierzchniowych równych 5, 10, 15 mN m⁻¹ oraz jego wartości maksymalne ($C_{s,maks}^{-1}$) z odpowiadającym π . Jak można zauważyć monowarstwy DOPC ($C_{s,maks,DOPC}^{-1} = 111,9$ mN m⁻¹) i LG ($C_{s,maks,LG}^{-1} = 107,4$ mN m⁻¹) są bardziej sztywne niż CsA ($C_{s,maks,CsA}^{-1} = 56,2$ mN m⁻¹). Brak minimum przy zerowym ciśnieniu powierzchniowym na wykresie $C_s^{-1} = f(\pi)$ świadczy o braku przejścia fazowego LE-LC. Dla monowarstw mieszanych (DOPC-CsA 0,50; DOPC-CsA-LG 0,25; 0,50 i 0,75) obserwuje się gwałtowny spadek wartości modułu przy ciśnieniu powierzchniowym odpowiadającym załamaniu się monowarstwy CsA (20-25 mN m⁻¹, Rysunek 20 oraz Tabela 7). Może to być spowodowane usuwaniem cząsteczek CsA lub fazy wzbogaconej w CsA z monowarstw wieloskładnikowych.

Biorąc pod uwagę wartości modułu ściśliwości w zakresie ciśnień powierzchniowych od 5 do 15 mN m⁻¹ dla grupy monowarstw jednoskładnikowych na subfazie AA, LG charakteryzuje się najmniejszymi wartościami C_s^{-1} mieszczącymi się

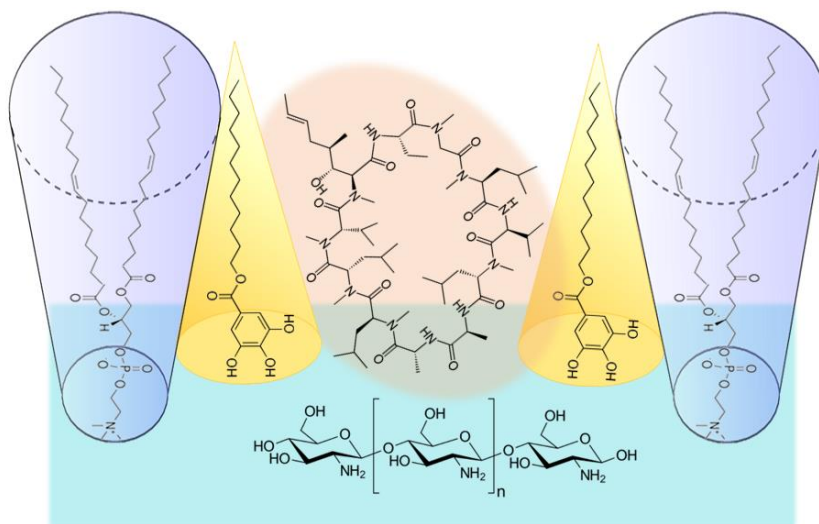
w przedziale 27,6-47,0 mN m⁻¹. Niewątpliwie jest to związane z omówioną powyżej strukturą tego związku, która utrudnia tworzenie gęsto upakowanej monowarstwy. Z kolei, jednoskładnikowe monowarstwy CsA (26,0 < C_s⁻¹ < 49,9 mN m⁻¹) i DOPC (34,5 < C_s⁻¹ < 61,9 mN m⁻¹) są bardziej upakowane [230]. W przypadku cyklosporyny może to być spowodowane jej sztywnym szkieletem cyklicznym (Rysunek 4), w którym mogą tworzyć się wiązania wewnątrzcząsteczkowe [124]. Biorąc pod uwagę budowę DOPC, można przypuszczać, że podczas kompresji łańcuchy tworzą bardziej zwartą strukturę monowarstwy niż LG. Jednakże, obecność wiązania nienasyconego w łańcuchach hydrofobowych ułożonych w konfiguracji *cis* również utrudnia uzyskanie wysokiego stopnia skondensowania.

Tabela 7 Wartości modułu ściśliwości C_s⁻¹ wyznaczone przy ciśnieniu powierzchniowym 5, 10 lub 15 mN m⁻¹ oraz wartość maksymalna z odpowiadającym jej ciśnieniem powierzchniowym, C_{s,maxs}⁻¹/π dla badanych monowarstw otrzymanych na granicy faz AA/powietrze oraz Ch/powietrze.

π (mN m ⁻¹)	C _s ⁻¹ (mN m ⁻¹)			C _{s,maxs} ⁻¹ /π
	5	10	15	
Subfaza		AA		
DOPC	34,5±1,2	47,8±0,9	61,9±1,3	111,9±0,5/36
CsA	26,0±1,3	44,0±1,1	49,9±0,5	50,6±0,2/13
DOPC-CsA 0,50	25,3±1,3	51,1±1,3	51,4±1,5	56,2±1,0/12
DOPC-CsA-LG 0,25	29,8±1,6	49,8±0,9	51,3±1,2	54,2±0,3/14
DOPC-CsA-LG 0,50	35,0±1,0	50,1±0,7	54,9±0,7	56,9±0,4/13
DOPC-CsA-LG 0,75	33,9±0,4	41,7±0,5	47,7±1,4	50,7±0,9/18
LG	27,6±0,6	35,2±0,4	47,0±0,5	107,4±0,9/38
Subfaza		Ch		
DOPC	37,0±1,3	51,8±1,1	63,4±1,2	113,8±0,8/36
CsA	27,1±1,7	43,1±0,4	48,6±0,7	49,3±0,8/14
DOPC-CsA 0,50	27,7±1,7	50,2±1,4	53,9±0,7	57,4±0,4/13
DOPC-CsA-LG 0,25	30,5±1,8	47,9±1,0	52,2±0,6	54,4±0,3/13
DOPC-CsA-LG 0,50	34,8±1,4	50,1±0,7	54,5±0,4	55,7±0,4/14
DOPC-CsA-LG 0,75	35,3±1,2	45,1±0,5	52,3±0,4	52,8±0,4/17
LG	28,8±0,5	36,1±0,2	46,6±1,2	96,8±1,0/36

Wartości modułu ściśliwości, zarówno w zakresie ciśnień 5-15 mN m⁻¹, jak i maksymalne C_{s,maxs}⁻¹, obliczone dla wszystkich monowarstw mieszanych na subfazie AA i Ch mieszczą

się w granicach wartości uzyskanych dla monowarstw pojedynczych składników. Jednak w przypadku monowarstwy DOPC-CsA 0,50 otrzymanej na AA wartość modułu ściśliwości przy $\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$ jest nieznacznie mniejsza niż dla monowarstwy CsA, co może być efektem odpychającego charakteru oddziaływań między cząsteczkami DOPC i CsA. Ponadto cząsteczki nie są dopasowane pod względem kształtu. DOPC przybiera formę odwróconego ściętego stożka, a kształt cząsteczki CsA najlepiej opisać za pomocą okręgu (Rysunek 23).



Rysunek 23 Schematyczne ułożenie cząsteczek DOPC, CsA, LG i Ch na powierzchni międzyfazowej z uwzględnieniem ich potencjalnego kształtu (DOPC-odwrócony ścięty stożek, CsA-okrąg, LG-stożek). Opracowanie własne.

Takie niedopasowanie kształtu cząsteczek przejawia się obecnością wolnych przestrzeni. Dlatego monowarstwy są luźno upakowane w fazie ciekłej. Trzeci składnik - LG (cząsteczka w kształcie stożka) po wprowadzeniu może pełnić funkcję łącznika pomiędzy cząsteczkami DOPC i CsA (Rysunek 23) wypełniając przestrzeń i powodując wzrost wartości C_s^{-1} . Obecność LG w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,50 na subfazie AA skutkuje największą wartością $C_{s,maxs}^{-1} = 56,9 \text{ mN m}^{-1}$ wskazując jednocześnie na najściślejse upakowanie cząsteczek wśród badanych monowarstw wieloskładnikowych [230].

W przypadku monowarstwy DOPC-CsA 0,50, obecność cząsteczek Ch w subfazie powoduje jej rozluźnienie w porównaniu z monowarstwami jednoskładnikowymi, ale jednocześnie prowadzi do ściślejzego upakowania monowarstw trójskładnikowych DOPC-CsA-LG (Rysunek 20 i Tabela 7). Największą wartość modułu ściśliwości uzyskano dla monowarstwy mieszanej DOPC-CsA-LG 0,50 ($C_{s,maxs}^{-1} = 55,7 \text{ mN m}^{-1}$). Natomiast, gdy ilość LG w monowarstwie wzrasta, zmiany w wartości C_s^{-1} są bardzo małe [230].

Wartości modułu ściśliwości dla monowarstwy CsA w temperaturze 37°C (Rysunek 22) zarówno dla subfazy AA ($C_{s,maks}^{-1} = 41,6 \text{ mN m}^{-1}$), jak i Ch ($C_{s,maks}^{-1} = 46,3 \text{ mN m}^{-1}$) są mniejsze w odniesieniu do temperatury 20°C, gdyż wraz ze wzrostem temperatury rośnie nieuporządkowanie monowarstwy. Jest to związane ze zmianami konformacji cząsteczek CsA i wzrostem elastyczności łańcuchów Ch. W wyższej temperaturze zmniejsza się rozpuszczalność CsA w wodzie na skutek tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [127, 128]. Dlatego cząsteczki przyjmują bardziej zwartą konformację zamkniętą i wykazują mniejszą zdolność do tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z Ch, a dominującą rolę zaczynają odgrywać słabsze oddziaływania hydrofobowe. Dzięki temu zachodzi wnikanie cząsteczek Ch pomiędzy CsA, co z jednej strony przejawia się w zwiększeniu powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie polipeptydu, a z drugiej strony powoduje wzrost sztywności filmu uwidocznionej w większej wartości modułu ściśliwości dla układu CsA/Ch w porównaniu do CsA/AA w 37°C (Rysunek 22). Otrzymane zależności dobrze rokują w aspekcie uwalniania CsA z filmu chitozanu, ponieważ oddziaływania hydrofobowe pełnią znaczącą rolę w transporcie biernym tego leku [128].

Oddziaływanie chitozanu z cząsteczkami składników monowarstw znacząco wpływa na ich organizację, m.in. nachylenie ugrupowań polarnych i łańcuchów węglowodorowych, co może sprzyjać silniejszym wzajemnym oddziaływaniom, mieszalności składników i stabilności [230]. Największe zmiany w upakowaniu monowarstw w obecności cząsteczek chitozanu odnotowano dla monowarstw DOPC i LG. Świadczy to o najsilniejszych oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami tworzącymi filmy a Ch. Z kolei w przypadku monowarstwy CsA obecność Ch w fazie ciekłej powoduje obniżenie jej upakowania w 20°C, a wzrost temperatury osłabia ten proces. Spośród monowarstw mieszanych znaczący wzrost wartości $C_{s,maks}^{-1}$ uzyskano dla DOPC-CsA 0,50. Prawdopodobnie jest to związane z wypełnianiem przez chitozan wolnych przestrzeni wynikających z niedopasowania strukturalnego cząsteczek DOPC i CsA. Z kolei w grupie monowarstw trójskładnikowych Ch spowodował nieznaczny wzrost upakowania filmu DOPC-CsA-LG 0,50.

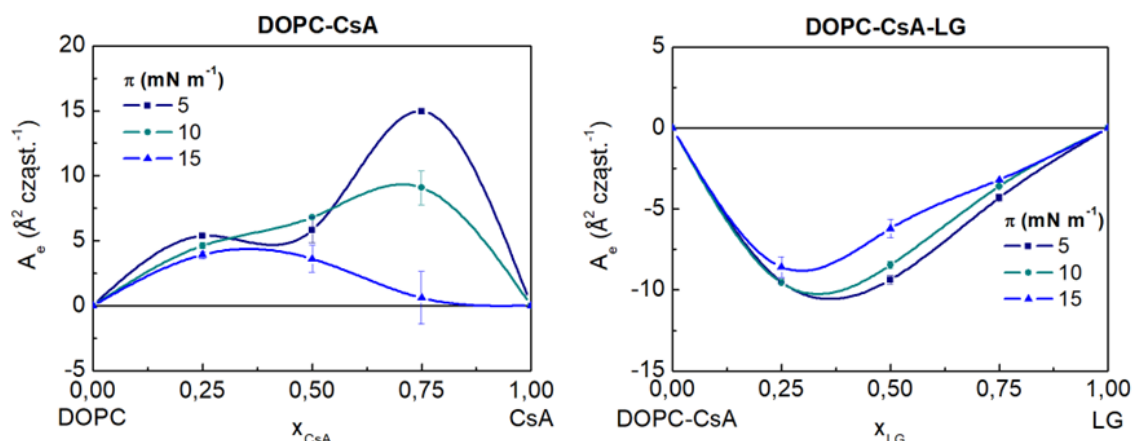
W celu potwierdzenia wpływu Ch na właściwości fizykochemiczne w dalszej części badań wchodzących w skład dysertacji przeprowadzono analizę jakościową oraz ilościową oddziaływań opartą na wyznaczeniu funkcji termodynamicznych.

12.3. Analiza termodynamiczna mieszalności składników

Jak wcześniej wspomniano, monowarstwy DOPC i LG załamują się przy wyższych wartościach ciśnienia powierzchniowego niż monowarstwa CsA (Rysunki 19 i 20 oraz Tabele 4 i 5). W oparciu o wartości ciśnienia załamania monowarstw można uzyskać wstępne informacje na temat mieszalności składników. Niezależne wartości π_c monowarstw mieszanych, które pojawiają się przy takim samym ciśnieniu powierzchniowym, co załamanie monowarstw jednoskładnikowych, wskazują na niemieszalność komponentów oraz ich tendencję do separacji faz, przy czym składnik o niższym ciśnieniu powierzchniowym załamania jest usuwany z monowarstwy. Natomiast, gdy składniki są częściowo mieszalne mogą tworzyć domeny wzbogacone w jeden lub drugi składnik. Po osiągnięciu ciśnienia powierzchniowego odpowiadającego załamaniu się monowarstwy CsA, domeny o zwiększonej zawartości CsA w monowarstwach mieszanych również ulegają załamaniu. Inną możliwością jest to, że składniki mogą mieszać się i oddziaływać poniżej pierwszego ciśnienia załamania, a dopiero powyżej tego ciśnienia stają się niemieszalne i cząsteczki CsA są usuwane z monowarstwy [164, 231].

Dlatego też, aby osiągnąć następny cel cząstkowy doktoratu, którym było określenie rodzaju i wielkości oddziaływań pomiędzy CsA a DOPC i/lub LG przy ciśnieniach powierzchniowych poniżej wartości ciśnienia pierwszego załamania, dokonano dalszej analizy w oparciu o średnią powierzchnię cząsteczkową w mieszanych monowarstwach dwu- (A_{12}) lub trójskładnikowych (A_{123}), nadmiarową powierzchnię (A_e), nadmiarową energię Gibbsa (ΔG_e) oraz całkowitą energię mieszania Gibbsa (ΔG_m) zgodnie z Równaniami 3-10. Ich ujemne odchylenia od stanu idealnego świadczą o oddziaływaniach przyciągających między cząsteczkami, które prowadzą do wzrostu stabilności monowarstwy, natomiast odchylenia dodatnie mogą wskazywać na odpychanie i związaną z nim częściową mieszalność lub całkowitą separację faz w monowarstwie [158, 164]. Analizę przeprowadzono dla ciśnień powierzchniowych poniżej ciśnienia załamania monowarstwy CsA w celu zapewnienia obecności w niej wszystkich trzech składników ($\pi = 5, 10, 15 \text{ mN m}^{-1}$).

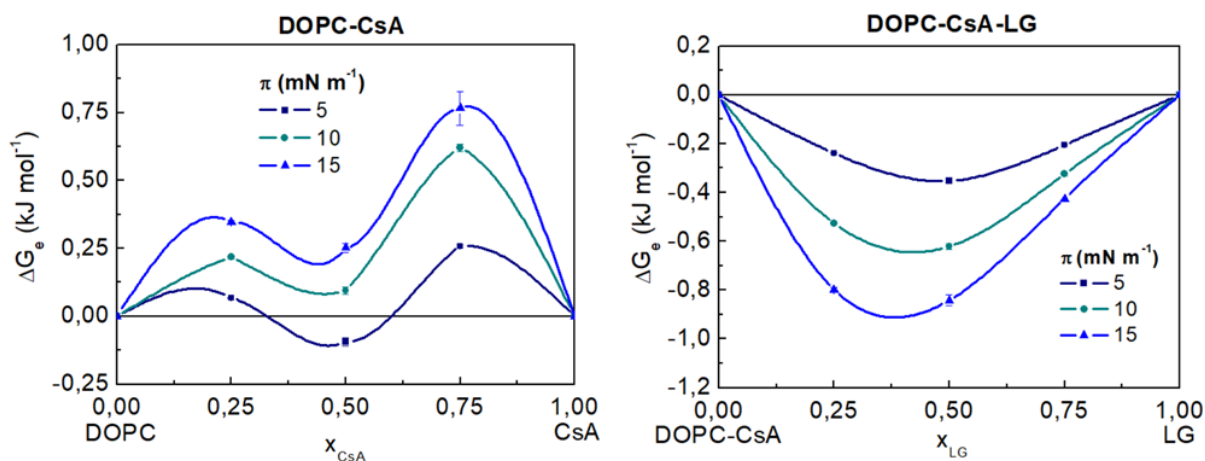
Analiza termodynamiczna oddziaływań w aspekcie jakościowym dowodzi, że pomiędzy cząsteczkami monowarstw DOPC-CsA dominują oddziaływania odpychające, zwłaszcza przy wysokiej zawartości CsA, na co wskazują dodatnie wartości A_e (Rysunek 24).



Rysunek 24 Powierzchnia nadmiarowa (A_e) w funkcji składu monowarstw otrzymanych na subfazie wodnej.

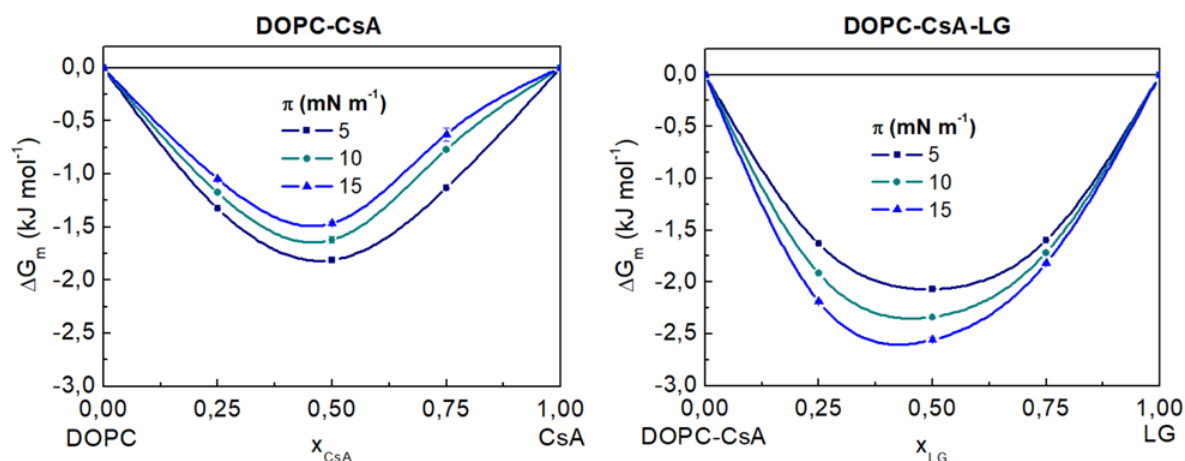
Wielkość tych oddziaływań wzrasta wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego osiągając maksimum $\Delta G_e = 0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ dla $\chi_{CsA} = 0,75$ przy $\pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$ (Rysunek 25). Obecność dwóch maksimów oddzielonych minimum zarówno w przebiegu A_e , jak i ΔG_e w funkcji składu monowarstwy może świadczyć o powstawaniu domen bogatych w jeden lub drugi składnik, co ujawnia częściową mieszalność związków [231, 237, 238]. Ponadto całkowita energia mieszania Gibbsa, ΔG_m , przyjmuje wartości ujemne (min. $\Delta G_m \sim -(0,8-1,8) \text{ kJ mol}^{-1}$) dla wszystkich monowarstw dwuskładnikowych, co potwierdza ich stabilność termodynamiczną (Rysunek 26). Z uwagi na fakt, iż w grupie monowarstw mieszanych DOPC-CsA najsilniejsze oddziaływania przyciągające występują w monowarstwie DOPC-CsA o stosunku molowym 1:1 ($\chi = 0,50$) (Rysunki 25 i 26), monowarstwy trójskładnikowe analizowano w odniesieniu do tej monowarstwy. Zbadano wpływ różnych ilości trzeciego składnika (LG) na zmiany oddziaływań oraz ogólną stabilność monowarstw DOPC-CsA-LG.

Dodanie LG jako trzeciego składnika monowarstwy mieszanej DOPC-CsA-LG powoduje zmianę wartości zarówno A_e , jak i ΔG_e , z dodatnich na ujemne (Rysunki 24 i 25). Wynik ten wskazuje na większą mieszalność składników ze względu na pojawienie się oddziaływań przyciągających między cząsteczkami, których wielkość wzrasta wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego, osiągając maksimum ($\Delta G_e = -0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$) dla $\chi_{LG} = 0,50$ przy $\pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$.



Rysunek 25 Energia nadmiarowa Gibbsa (ΔG_e) w funkcji składu monowarstw otrzymanych na subfazie wodnej.

Ponadto wartości ΔG_m wyznaczone dla monowarstw trójskładnikowych świadczą o wzroście ich stabilności po dodaniu LG (Rysunek 26). Wartości ΔG_m stają się bardziej ujemne wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego ($\Delta G_m = -2,6$ kJ mol⁻¹ przy $\pi = 15$ mN m⁻¹). Natomiast dla monowarstw DOPC-CsA tendencja jest odwrotna, tj. mniej ujemne wartości ΔG_m , a tym samym mniejszą stabilność, uzyskuje się wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego ($\Delta G_m = -1,5$ kJ mol⁻¹ przy $\pi = 15$ mN m⁻¹) [231].

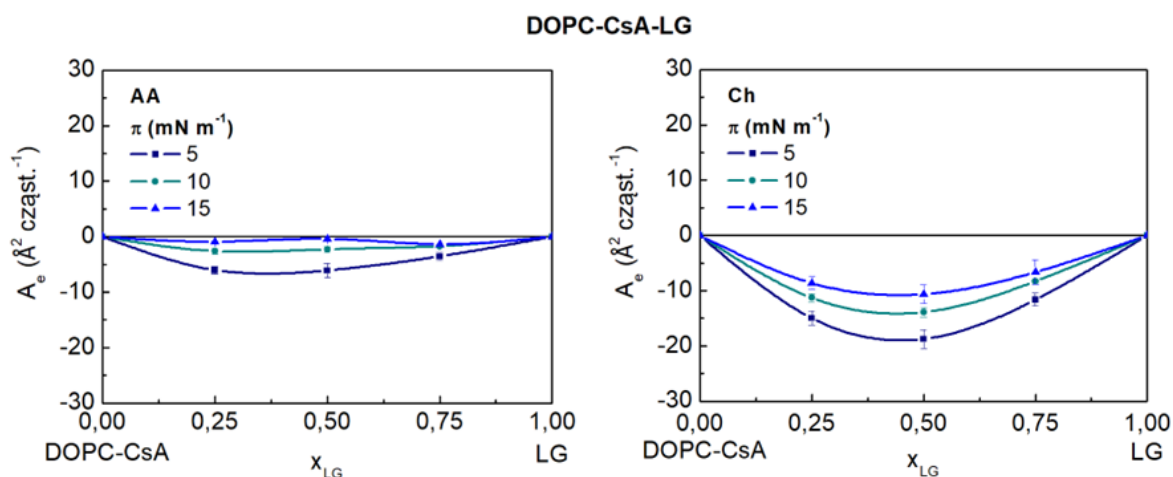


Rysunek 26 Całkowita energia mieszania Gibbsa (ΔG_m) w funkcji składu monowarstw otrzymanych na subfazie wodnej.

W monowarstwach mieszanych DOPC-CsA-LG, zarówno DOPC, jak i CsA, ze względu na dominację oddziaływań odpychających, mogą występować w postaci wolnej, co ułatwia ich oddziaływanie z cząsteczkami LG. LG ma powinowactwo do obu związków, dlatego można oczekiwać, że będzie wchodzić w oddziaływania konkurencyjne

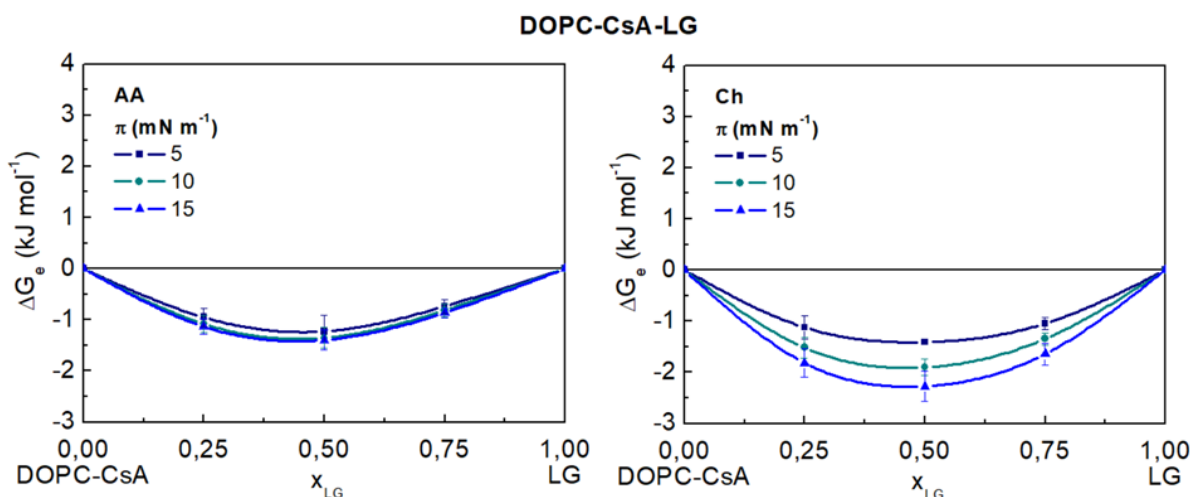
z obydwoma (DOPC i CsA). Dodatkowo w wyniku odpychania pomiędzy cząsteczkami DOPC i CsA, monowarstwa może zawierać wolne przestrzenie, które mogą zostać wypełnione przez cząsteczki LG. W ten sposób LG staje się łącznikiem między cząsteczkami fosfolipidu i cyklosporyny A. Poza tym, w wyniku wzrostu upakowania podczas sprężania, CsA przyjmuje bardziej pionową orientację, co sprzyja oddziaływaniom między cząsteczkami poprzez wiązania wodorowe i siły Lifshitz-van der Waalsa. Jurak i współ. dowiedli, że w monowarstwach DOPC-LG polarne grupy pirogalolowe LG znajdują się w pobliżu wiązań nienasyconych łańcuchów oleinowych DOPC [195]. Wynika to z przeciwutleniających właściwości LG. Podsumowując, oddziaływania CsA z DOPC zależą od obecności LG i zmieniają się wraz z jego zawartością w monowarstwach mieszanych.

Po zmianie subfazy wodnej na kwas octowy, najmniejszą wartość, zarówno A_e , jak i ΔG_e uzyskano dla filmu DOPC-CsA-LG 0,50. Jak można zauważyć na Rysunku 27 minimum powierzchni nadmiarowej występuje przy ciśnieniu powierzchniowym równym 5 mN m^{-1} ($-6,1 \text{ \AA}^2 \text{ cząst.}^{-1}$), a dla energii nadmiarowej Gibbsa przy $\pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$ ($-1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, Rysunek 28). Wraz ze wzrostem zawartości LG w monowarstwach mieszanych obserwuje się zmiany A_e oraz ΔG_e . Najslabsze oddziaływania przyciągające uwidaczniają się w monowarstwie, w której ułamek molowy LG wynosi 0,75 ($\Delta G_e = -0,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$). Dodatkowo ujemne wartości całkowitej energii mieszania Gibbsa (ΔG_m) obliczone dla monowarstw mieszanych potwierdzają ich stabilność termodynamiczną. Najmniejszą wartość ΔG_m uzyskano dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 (Rysunek 29). Ponadto wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego wartości ΔG_m stają się coraz bardziej ujemne, co świadczy o wzroście stabilności monowarstw [230].



Rysunek 27 Powierzchnia nadmiarowa (A_e) przypadająca na cząsteczkę w funkcji składu monowarstw otrzymanych na subfazach AA i Ch.

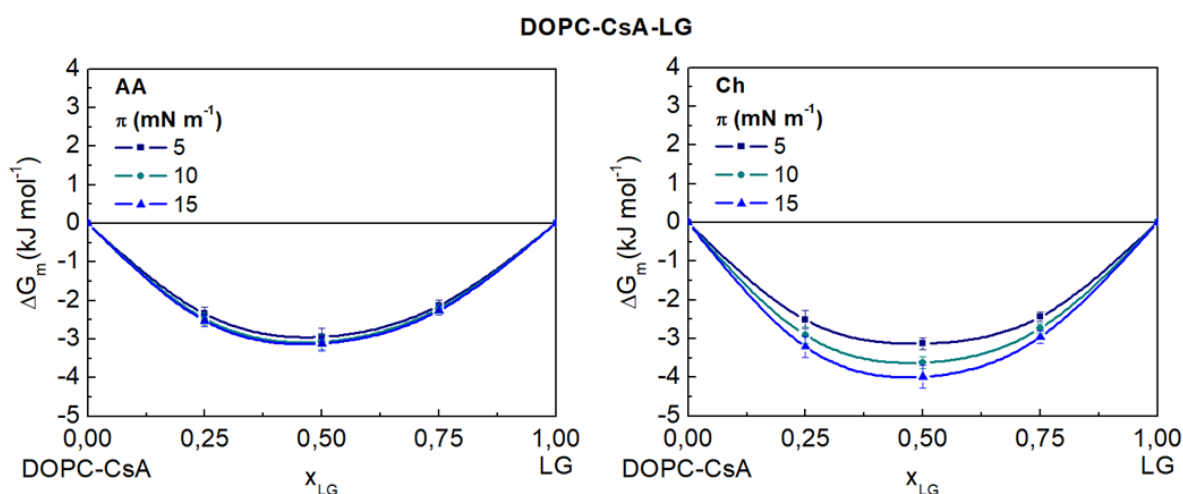
Obliczone wartości ΔG_e wskazują, że dodatek kwasu octowego do ciekłej fazy nośnej wzmacnia oddziaływania przyciągające w monowarstwach DOPC-CsA-LG w porównaniu do subfazy wodnej (Rysunek 28) [230, 231]. Największą zmianę zarejestrowano dla DOPC-CsA-LG 0,25 przy ciśnieniu powierzchniowym równym 15 mN m^{-1} . Ponadto zawartość LG w monowarstwach wpływa zarówno na mieszalność jej składników, jak i stabilność termodynamiczną. Największą stabilnością charakteryzuje się monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50. Wprowadzenie cząsteczek kwasu octowego do fazy nośnej nie zmienia charakteru oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tworzącymi monowarstwę, ale powoduje ich wzmocnienie.



Rysunek 28 Energia nadmiarowa Gibbsa (ΔG_e) w funkcji składu monowarstw otrzymanych na subfazach AA i Ch.

Wprowadzenie cząsteczek chitozanu do subfazy wpływa na wielkość oddziaływań występujących pomiędzy cząsteczkami DOPC, CsA i LG (Rysunek 28). Maksymalna

wartość ΔG_e obliczona dla DOPC-CsA-LG 0,75 ($\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$) jest bardziej ujemna o około $0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ w porównaniu do analogicznej monowarstwy na subfazie AA. Minimum na krzywych przedstawiających zależność ΔG_e otrzymano dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 ($-2,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$). Obecność cząsteczek chitozanu także obniża wartości ΔG_m (stają się bardziej ujemne) w porównaniu do obliczonych dla monowarstw na granicy faz AA/powietrze (Rysunek 29). W tym przypadku minimalną wartość uzyskano również dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 ($-4,0 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$). Ta wartość ΔG_m świadczy o największej stabilności tej monowarstwy [230].



Rysunek 29 Całkowita energia mieszania Gibbsa (ΔG_m) w funkcji składu monowarstw otrzymanych na subfazach AA i Ch.

Jak wykazano powyżej, obecność LG w monowarstwach DOPC-CsA-LG wpływa na mieszalność składników. Ponadto różnice w strukturze badanych związków determinują wartości ΔG_m . W efekcie oddziaływań DOPC-LG konformacja łańcuchów węglowodorowych fosfolipidu może ulec zmianie. Dzięki temu są możliwe silniejsze oddziaływania z pozostałymi składnikami tworzącymi monowarstwę [230]. Podobne zależności podali Drabik i współ. [239]. Jak zostało wcześniej wspomniane grupy polarne LG lokalizują się w pobliżu nienasyconych wiązań w łańcuchach acylowych fosfolipidu, co wynika z właściwości przeciwutleniających galusanu [195]. W związku z tym można stwierdzić, że LG odgrywa ważną rolę w uporządkowaniu cząsteczek DOPC w monowarstwie. Podobne właściwości zostały opisane przez innych naukowców dla różnorodnych fosfolipidów i cholesterolu [239]. Ponadto obecność cząsteczek CsA w monowarstwie także wpływa na zmianę konformacji łańcuchów acylowych DOPC, zmniejszając ich uporządkowanie i w efekcie zmieniając oddziaływania

międzycząsteczkowe [230]. Wiedmann i współ. przedstawili analogiczny mechanizm oddziaływań CsA z fosfolipidem DPPC [240].

Zależność między uporządkowaniem monowarstw a ilością CsA potwierdzają również wartości modułu ściśliwości (Tabele 6 i 7). Dla monowarstw mieszanych (dwu- i trójskładnikowych) zawierających ten polipeptyd otrzymanych na subfazie wodnej wartości C_s^{-1} są mniejsze niż dla CsA (Rysunki 19 i 20). Ponadto otrzymane wyniki dowodzą, że chitozan obecny w ciekłej fazie nośnej poprawia mieszalność składników monowarstw oraz ich stabilność [230]. Można więc przypuszczać, że w wyniku oddziaływań dodatnio naładowanych grup aminowych polisacharydu z cząsteczkami DOPC tworzą się kompleksy. Tworzenie tego typu kompleksów między chitozaniem a fosfolipidem 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfoglicerolem (DPPG) stwierdzili także inni badacze [241]. Potwierdzeniem oddziaływań pomiędzy DOPC i Ch są wyższe wartości A_0 w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla monowarstw na subfazie wodnej [231] oraz AA (Tabele 6 i 7, [230]). Ekspansja monowarstw ma miejsce w obecności cząsteczek chitozanu, która jest związana ze zmianą organizacji cząsteczkowej [230]. Podobne zachowanie monowarstw na subfazie chitozanowej opublikowali Wydro i współ. [232]. Co więcej, w związku z możliwymi oddziaływaniami DOPC-Ch może dojść do utraty cząsteczek fosfolipidu z granicy faz do ciekłej fazy nośnej [230]. Występowanie takiego zjawiska odnotowali także inni naukowcy badając cząsteczki 1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfoglicerolu (DSPG) lub kwasu 1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydowego (DSPA) [233]. Ponadto możliwe jest formowanie kompleksów Ch-lipid na granicy faz ciecz/powietrze w wyniku oddziaływań hydrofobowych oraz elektrostatycznych między cząsteczkami.

Za tworzenie się struktur złożonych LG z chitozaniem odpowiada zarówno struktura chemiczna związku, jak i długość łańcucha węglowodorowego. Pomimo, że w warunkach eksperymentu LG nie posiada ładunku, obecność grup hydroksylowych sprzyja oddziaływaniom z chitozaniem poprzez wiązania wodorowe [230]. W efekcie mogą powstawać trwałe struktury, podobnie jak opisano w literaturze dla układu chitozanu z niejonowym środkiem powierzchniowo czynnym [242].

Obecność cząsteczek chitozanu powoduje rozluźnienie monowarstwy LG, podobnie jak DOPC, na skutek oddziaływań poprzez wiązania wodorowe i siły Lifshitz-van der Waalsa (łańcuchy LG i szkielet chitozanu) [230]. Świadczy o tym obniżenie wartości $C_{s,max}^{-1}$ w stosunku do wartości uzyskanej dla monowarstwy na subfazie AA. Przemiana fazowa G-LE zachodzi przy większych powierzchniach przypadających na cząsteczkę

(parametr A_0) w stosunku do monowarstwy na subfazie niezawierającej cząsteczek Ch (Rysunek 20 i Tabela 5).

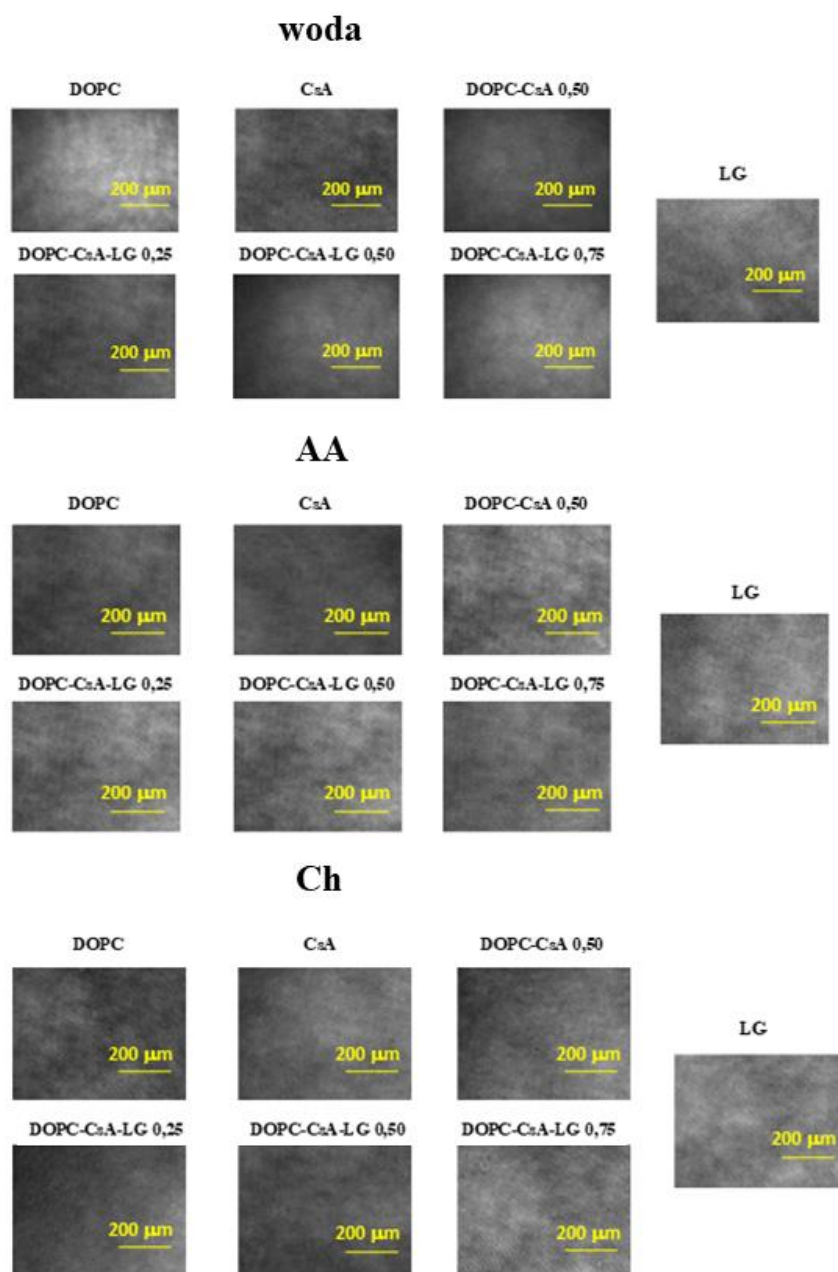
W badaniach przedstawionych w dysertacji po wprowadzeniu chitozanu do ciekłej fazy nośnej, monowarstwa CsA ulega ekspansji (rozszerzeniu). Parametr A_0 jest wyższy w obecności cząsteczek Ch (Tabela 5). Maksymalna wartość modułu ściśliwości maleje w stosunku do wartości uzyskanej dla monowarstwy na subfazie wodnej i AA. Przedstawione zależności potwierdzają istnienie oddziaływań między CsA i Ch, które pomimo hydrofobowego charakteru CsA mogą zachodzić pomiędzy jej grupami amidowymi a grupami polarnymi chitozanu. W artykule [132] naukowcy opisali silną asocjację cząsteczek CsA dzięki takim oddziaływaniom. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość uzyskania systemu kontrolowanego uwalniania tego leku, co jest jednym z celów doktoratu.

Można również stwierdzić, że obecność chitozanu w subfazie wzmacnia oddziaływanie przyciągające między cząsteczkami DOPC, CsA i LG, prowadząc do utworzenia stabilnych monowarstw. Świadczą o tym ujemne wartości powierzchni nadmiarowej oraz nadmiarowej i całkowitej energii mieszania Gibbsa (Rysunki 27-29). Wśród monowarstw trójskładnikowych największą stabilnością termodynamiczną charakteryzuje się monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50. Na podstawie omówionych wyników badań można wnioskować, że monowarstwy trójskładnikowe mogą być z powodzeniem przenoszone na nośnik stały w celu utworzenia powłoki biokompatybilnej. Ze względu na skład może ona pełnić nie tylko funkcję ochronną dla powierzchni polimeru, ale także zapewnić możliwość uwalniania leku oraz zabezpieczyć przed szkodliwymi efektami ubocznymi jego działania.

12.4. Morfologia monowarstw

Kolejnym krokiem badawczym doktoratu było wykonanie zdjęć morfologii monowarstw jedno- (DOPC, CsA, LG), dwu- (DOPC-CsA 0,50) oraz trójskładnikowych (DOPC-CsA-LG $\chi_{LG} = 0,25; 0,50; 0,75$) przy zastosowaniu mikroskopu kąta Brewstera. Eksperyment miał na celu potwierdzenie mieszalności związków tworzących monowarstwy wieloskładnikowe. Rysunek 30 przedstawia wybrane obrazy uzyskane przy $\pi = 10 \text{ mN m}^{-1}$ na subfazach wodnej, AA i Ch. Dla badanych monowarstw otrzymanych na wszystkich subfazach podczas kompresji nie zaobserwowano domen w szerokim zakresie wartości ciśnienia powierzchniowego. Przy niskim ciśnieniu powierzchniowym ($\sim 1 \text{ mN m}^{-1}$) zauważalne są jedynie niewielkie domeny fazy LE otoczone przez domeny fazy G, które zanikają podczas dalszego ściskania, oraz niewielkie agregaty po załamaniu się monowarstw [173, 230]. Potwierdza to tworzenie monowarstw homogenicznych i pozostaje w zgodzie z mieszalnością składników określoną poprzez ujemne wartości nadmiarowej oraz całkowitej energii mieszania Gibbsa (Rysunki 25, 26, 28, 29).

Co zaskakujące, nawet w przypadku filmu DOPC-CsA, gdzie stwierdzono odpychający charakter oddziaływań między cząsteczkami (Rysunek 30), nie obserwuje się żadnych heterogeniczności, które mogłyby wskazywać na częściową mieszalność. Może to być związane ze zbyt niską rozdzielczością mikroskopu.



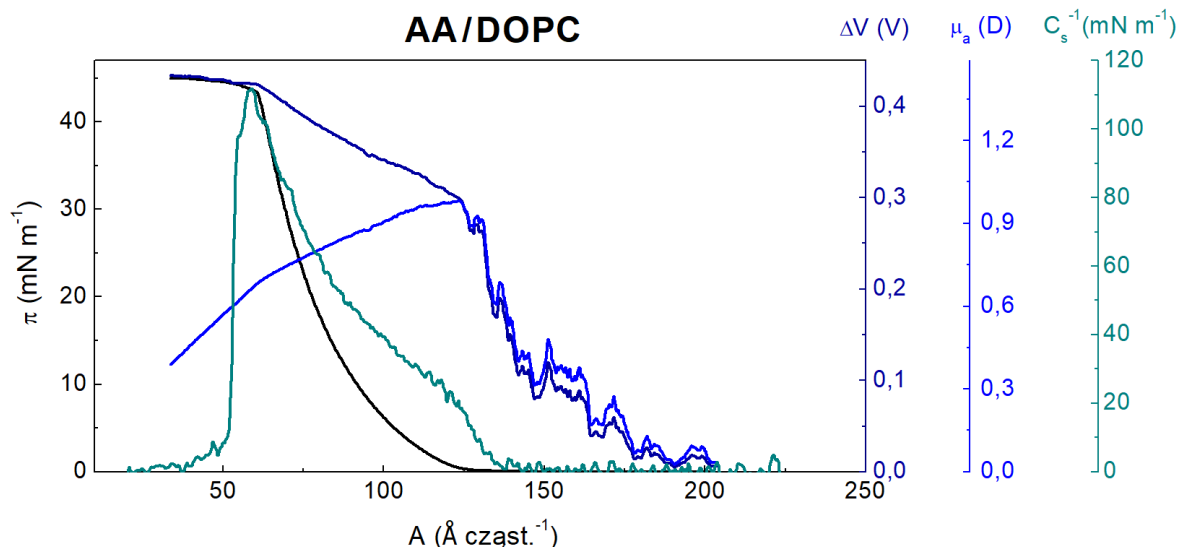
Rysunek 30 Obrazy BAM otrzymane dla badanych monowarstw na granicy faz ciecz/powietrze przy ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m^{-1} .

12.5. Izotermy $\Delta V - A$ oraz zależności $\mu_a - A$

Kolejnym do zrealizowania celem cząstkowym doktoratu było określenie zmian potencjału powierzchniowego monowarstw w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę. Jak zostało wspomniane wcześniej wszystkie badane monowarstwy występują w fazie ciekłej (Tabele 6 i 7). Ich potencjał powierzchniowy ściśle zależy od składników, które je tworzą oraz ich stosunków molowych, a także od rodzaju subfazy (Rysunki 31-33) [230, 231]. Gdy monowarstwa jest poddana sprężaniu, potencjał powierzchniowy zmienia się (ΔV) z powodu zmian orientacji grup polarnych i/lub niepolarnych wywołanych zmianami ciśnienia powierzchniowego. Wartość ΔV zaczyna rosnąć w obszarze związanym z tworzeniem się sieci wiązań wodorowych między wodą a polarnymi grupami cząsteczek tworzących monowarstwę [166].

Dla wszystkich monowarstw nachylenie krzywej ΔV zmienia się wraz ze zmniejszaniem się pola powierzchni subfazy, co świadczy o zmianach w orientacji cząsteczek. Dlatego także ułożenie grup potencjałotwórczych ulega zmianie w taki sposób, że mogą być bardziej wyeksponowane lub też ustawione pod kątem do powierzchni międzyfazowej albo nawet ukryte przez grupy innych cząsteczek. Przy niskim ciśnieniu powierzchniowym, czyli przy dużej powierzchni przypadającej na cząsteczkę, potencjał przyjmuje wartości minimalne odpowiadające ułożeniu cząsteczek w fazie gazowej (G). Niektóre charakterystyczne przegięcia występują w obszarach bliskich A_0 , ujawniając przejście fazowe z gazu do cieczy rozprężonej (G-LE) spowodowane zmianami gęstości monowarstwy, gdy orientacja łańcuchów węglowodorowych staje się bardziej pionowa w stosunku do powierzchni. Następnie w miarę zmniejszania się powierzchni potencjał rośnie liniowo, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, która odpowiada maksymalnemu upakowaniu monowarstwy ($C_{s,maks}^{-1}$) [230, 231].

Dodatkowo przekształcenie danych $\Delta V - A$ na $\mu_a - A$ według Równania 12 uwydatnia maksimum w wartościach momentu dipolowego, które odpowiada przejściu fazowemu G-LE. Następnie μ_a maleje podczas kompresji, gdy monowarstwy znajdują się w fazie cieczy rozprężonej (Rysunki 32 i 33). Ten spadek jest jeszcze ostrzejszy, gdy monowarstwy zawierają CsA. Jedynie w przypadku LG μ_a stopniowo rośnie aż do załamania się monowarstwy. Rysunek 31 przedstawia zestawienie zależności $\pi - A$, $\Delta V - A$, $\mu_a - A$ oraz C_s^{-1} dla monowarstwy DOPC otrzymanej na granicy faz AA/powietrze. Analogiczne wykresy dla pozostałych monowarstw można znaleźć w pracach [230, 231].

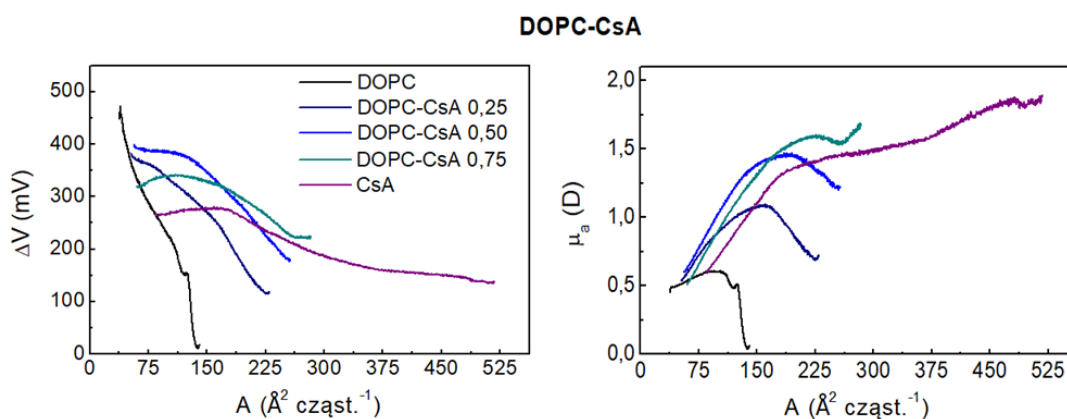


Rysunek 31 Zależności ciśnienia powierzchniowego, π , zmian potencjału powierzchniowego, ΔV , pozornego momentu dipolowego, μ_a , oraz modułu ściśliwości, C_s^{-1} , w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę, A , dla monowarstwy DOPC otrzymanej na subfazie AA.

Wartości pozornego momentu dipolowego zależą ściśle od składu monowarstwy (Rysunki 32 i 33). Dla monowarstw DOPC-CsA otrzymanych na subfazie wodnej, μ_a rośnie wraz ze wzrostem ilości CsA (Rysunek 32). Z kolei obecność LG w monowarstwach DOPC-CsA-LG utworzonych na granicy faz ciecz/powietrze powoduje spadek μ_a . Powyższe zmiany wskazują na zależność wartości μ_a od potencjału dodawanego składnika. DOPC i CsA wykazują dodatnie wartości potencjału powierzchniowego. Natomiast LG przyjmuje ujemne wartości przy niskim stopniu skompresowania monowarstwy (przy dużych powierzchniach przypadających na cząsteczkę) oraz wartości dodatnie przy wysokiej kompresji. Stanowi to dowód na występowanie silnych oddziaływań tego związku z cząsteczkami subfazy i/lub kompensacji momentów dipolowych w wyniku specyficznego ułożenia cząsteczek [230]. Ponadto potencjał powierzchniowy filmu DOPC-CsA-LG 0,75 otrzymanego na AA i Ch także wykazuje wartości mniejsze od zera. Jednak minimalne wartości potencjału powierzchniowego w obecności Ch w ciekłej fazie nośnej są większe niż dla AA (Rysunek 33).

Jak wspomniano wcześniej, zależności $\mu_a - A$ posiadają maksima przypisane przejściu fazowemu G-LE (Rysunki 32 i 33), których położenie zależy od składu monowarstwy. Zgodnie z izotermami $\pi - A$, maksima przesuwają się w kierunku większych lub mniejszych powierzchni wraz ze wzrostem ułamka molowego odpowiednio CsA lub LG w układach dwu- lub trójskładnikowych.

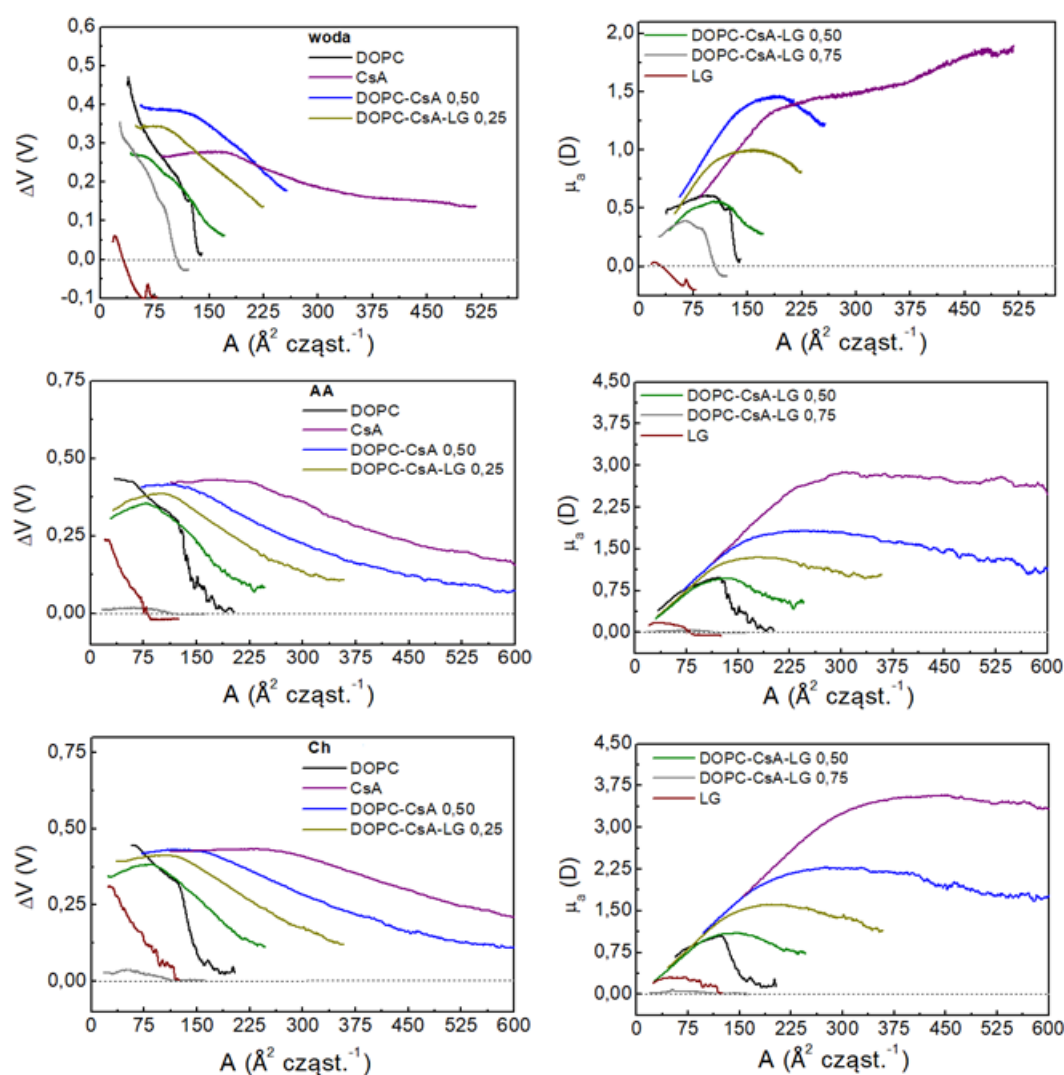
Na uwagę zasługuje fakt, że cząsteczki DOPC, LG i CsA można traktować jako układ wielu dipoli, z których każdy zawiera składową prostopadłą do granicy faz ciec/powietrze, co przyczynia się do powstawania sił elektrostatycznych o większym zasięgu. W przypadku monowarstwy DOPC główny udział w kreowaniu potencjału powierzchniowego oraz momentu dipolowego biorą dipole grup karbonylowych ($>C=O$) zlokalizowane w łańcuchu acylowym C18 [243, 244].



Rysunek 32 Izotermy zmian potencjału powierzchniowego (ΔV) oraz zależności pozornego momentu dipolowego (μ_a) w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A) dla monowarstw DOPC-CsA otrzymanych na subfazie wodnej.

Przejście fazowe G-LE ujawnia się poprzez przegięcie na izotermach $\Delta V - A$ i $\mu_a - A$ (Rysunek 31). Po przejściu G-LE potencjał powierzchniowy rośnie w sposób ciągły wraz ze wzrostem ciśnienia na skutek wzrostu gęstości cząsteczkowej, natomiast pozorny moment dipolowy maleje w wyniku reorganizacji w rejonie ugrupowań polarnych [230, 231]. Podobne zależności podali także inni naukowcy [243]. W przypadku monowarstwy LG przejściu fazowemu towarzyszy gwałtowna zmiana potencjału i momentu dipolowego, po której następuje stopniowy wzrost gęstości fazy rozprężonej, aż do załamania się monowarstwy. To przejście można przypisać zmianom w położeniu grup $>C=O$ przy nasyconym łańcuchu węglowodorowym C12, a także reorientacji pierścienia aromatycznego z grupami hydroksylowymi ($-OH$) do pozycji bardziej pionowej względem powierzchni międzyfazowej ciec/powietrze, przy czym grupy hydroksylowe są zanurzone w fazie nośnej [185].

DOPC-CsA-LG



Rysunek 33 Izotermy zmian potencjału powierzchniowego (ΔV) oraz zależności pozornego momentu dipolowego (μ_a) w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A) dla monowarstw otrzymanych na subfazach wodnej, AA i Ch.

Jak wykazano powyżej, podczas gdy DOPC ma dodatni potencjał powierzchniowy, LG wykazuje wartości ujemne przy dużych, a dodatnie przy małych powierzchniach przypadających na cząsteczkę. Różne znaki w wartościach potencjału powierzchniowego wskazują na przeciwny kierunek sił w polu elektrycznym [244]. Polaryzacja grup karbonylowych w ugrupowaniu fosfocholinowym DOPC wnosi wkład do potencjału powierzchniowego. Natomiast inne grupy funkcyjne polarnej części PC mają mniejsze znaczenie, ponieważ są zanurzone w wodzie, a w wyniku tego są silniej ekranowane ze względu na jej wysoką stałą dielektryczną i przewodnictwo [244]. W związku z tym grupy $>C=0$ znajdujące się w obszarze łańcucha hydrofobowego są grupami potencjałotwórczymi. Ujmując bardziej precyzyjnie, dipole $>C=0$ zmieniają swoje

nachylenie względem granicy faz ciecz/powietrze podczas procesu kompresji wpływając na zmiany momentów dipolowych grup pozostałych cząsteczek. W konsekwencji następuje depolaryzacja monowarstwy.

Ponadto zarówno DOPC, jak i LG są związkami o charakterze amfifilowym, których cząsteczki zawierają odpowiednio dwa nienasycone łańcuchy węglowodorowe C18 lub jeden nasycony łańcuch węglowodorowy C12. Podczas kompresji symetrycznej łańcuchy te orientują się bardziej pionowo w stosunku do powierzchni międzyfazowej, co wpływa na potencjał powierzchniowy, ale jednocześnie powoduje zmiany orientacji grup karbonylowych. W przypadku cząsteczki CsA liczne wiązania peptydowe tworzą swoistą sieć dipoli. Gdy cząsteczka CsA leży na powierzchni wody wartość pozornego momentu dipolowego oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych rosną w wyniku zróżnicowania ładunku na atomie azotu (cząstkowy ładunek dodatni) oraz tlenu (cząstkowy ładunek ujemny). W trakcie procesu kompresji cząsteczki zmieniają swoją orientację i/lub konformację, tak że momenty dipolowe są sukcesywnie kompensowane. W konsekwencji obserwuje się mniej lub bardziej liniowy spadek pozornego momentu dipolowego monowarstwy wraz ze wzrostem ciśnienia spowodowany reorientacją grup determinujących potencjał [230, 231]. Analogiczne zależności można odnaleźć w pracy innych naukowców [166]. Kolejną przyczyną tego spadku mogą być otaczające dipole wody, które są zdolne do ekranowania sił pochodzących od ugrupowań polarnych [244]. Tę samą interpretację można zastosować do mieszanin, w których dodatkowo oddziaływania między cząsteczkami mogą również wpływać na zmiany pozornego momentu dipolowego monowarstwy.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że trend zmian potencjału powierzchniowego oraz pozornego momentu dipolowego badanych monowarstw jest zachowany dla zastosowanych subfaz o różnym składzie. Obecność cząsteczek Ch powoduje wzrost wartości ΔV oraz μ_a . Takie zachowanie potwierdza występowanie oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tworzącymi monowarstwy a fazą nośną. W efekcie czego zmienia się ułożenie cząsteczek, a więc i grup potencjałotwórczych podczas procesu sprężania. Powyższe rezultaty mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu oddziaływań, jakie zachodzą w złożonych układach biologicznych oraz pomiędzy powierzchnią biomateriału a otaczającym środowiskiem w aspekcie uwalniania i transportu leku przez błony biologiczne. Szczegółowy mechanizm oddziaływań opisano w następnym rozdziale.

12.6. Mechanizm oddziaływań cząsteczek monowarstwy i ciekłej fazy nośnej

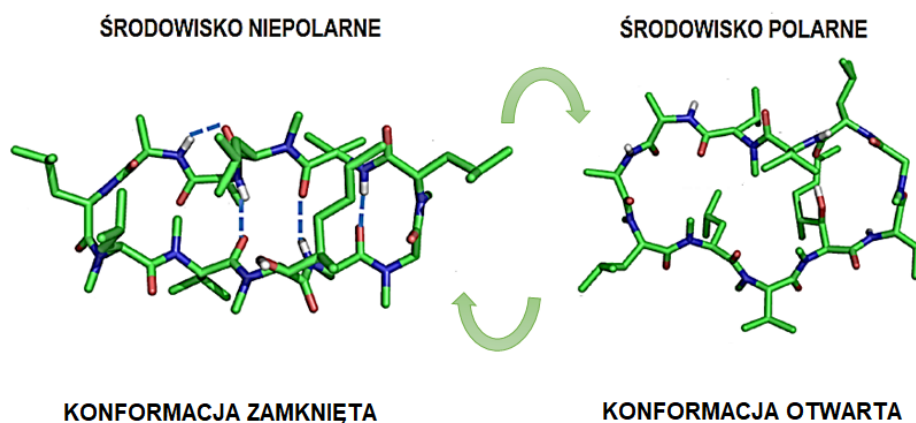
Bazując na danych literaturowych oraz przeprowadzonych w ramach doktoratu eksperymentach podjęto próbę przedstawienia prawdopodobnego mechanizmu oddziaływań między cząsteczkami tworzącymi monowarstwę mieszaną DOPC-CsA-LG oraz składnikami subfazy, co stanowiło kolejny cel główny dysertacji.

Jak wcześniej wspomniano zmiany potencjału powierzchniowego i pozornego momentu dipolowego w monowarstwach są ściśle związane ze strukturą cząsteczek i stałą dielektryczną danej subfazy. W przypadku DOPC grupami potencjałotwórczymi są grupy karbonylowe ($>C=O$) w obszarze łańcucha acylowego C18. Polaryzacja tych grup i reorganizacja w obrębie części polarnych cząsteczek wpływają na wartości ΔV i μ_a [243, 244]. W przypadku LG zmiany potencjału powierzchniowego i momentu dipolowego są związane z orientacją fragmentów polarnych (pierścienia z grupami funkcyjnymi $-OH$) do pozycji bardziej pionowej w stosunku do płaszczyzny subfazy. CsA, jako cykliczny polipeptyd złożony z 11 aminokwasów, posiada wiele grup peptydowych $O=C-N$ będących dipolami. Z drugiej strony, słabo rozpuszcza się w wodzie. Lipofilowy charakter cyklosporyny jest determinowany poprzez metylację grup aminokwasowych (7 N-metylowanych) [124, 234].

W monowarstwie znajdującej się w fazie gazowej (G), cząsteczki CsA leżą płasko na powierzchni fazy nośnej, i tworzą wiązania wodorowe z jej cząsteczkami. W trakcie kompresji, gdy powierzchnia przypadająca na cząsteczkę ulega zmniejszeniu, CsA zmienia swoją orientację i/lub konformację, czemu towarzyszy kompensacja momentów dipolowych [230, 231]. Zmiany te prowadzą również do zmian w położeniu grup $-N-H$, które jak podali Oliveira i Bonardi mają silny wpływ na fluktuacje momentu dipolowego [245].

W celu przeniknięcia przez błonę biologiczną cząsteczki CsA wykazują zdolność do zmiany konformacji [246], która zależy od stałej dielektrycznej ośrodka [127]. Na przykład za konformację dominującą w środowisku niepolarnym, takim jak chloroform odpowiadają wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe stabilizujące strukturę drugorzędową. Natomiast w rozpuszczalnikach polarnych cząsteczka eksponuje grupy o wyższym powinowactwie do cząsteczek wody, zdolne do tworzenia z nią wiązań wodorowych, tracąc strukturę drugorzędową (Rysunek 34, [124]). Kwas octowy o niewielkim stężeniu 0,1% zastosowany w badaniach jako subfaza zachowuje się podobnie do wody i wykazuje względną stałą dielektryczną praktycznie równą wodzie ($\epsilon = 79,99$, $T = 25^\circ\text{C}$ [247]).

Dlatego dipole wody, które odgrywają tu kluczową rolę, mogą ekranować siły pochodzące od grup polarnych zanurzonych w ciekłej fazie nośnej [244]. W związku z tym zmiany potencjału powierzchniowego oraz momentu dipolowego uzyskane na subfazie wodnej oraz AA są zbliżone [230, 231].



Rysunek 34 Konformacje cząsteczki CsA: „zamknięta” w środowisku niepolarnym oraz „otwarta” w otoczeniu polarnym. Opracowanie własne na podstawie [128].

Zdolność do zmiany konformacji CsA oznacza, że może ona zachodzić dynamicznie podczas przechodzenia cząsteczek między środowiskami o wysokiej i niskiej stałej dielektrycznej [127, 128, 248]. Jest to związane z możliwością tworzenia wewnątrz- lub międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. W wodzie i na granicy faz woda/membrana CsA występuje w optymalnej, tak zwanej „otwartej” konformacji (Rysunek 34) charakteryzującej się najniższą energią solwatacji. Wtedy cząsteczka CsA przyjmuje kształt okręgu i może tworzyć tylko jedno wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe [248] lub nie tworzy ich w ogóle [128]. Dlatego pozostałe grupy amidowe cząsteczek CsA mogą swobodnie oddziaływać z wodą poprzez międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. W tego typu oddziaływania zaangażowana jest również grupa $-OH$ najbardziej elastycznej części CsA, czyli aminokwasu (4R)-4-[(E)-butenylo]-4,N-dimetylo-L-treoniny (MeBmt-1) [223].

Natomiast, w środowisku hydrofobowym o niskiej stałej dielektrycznej, takim jak łańcuchy węglowodorowe (DOPC i/lub LG), zakłada się, że cząsteczka CsA ma strukturę krystaliczną [249, 250]. Co więcej, aminokwas MeBmt-1 jest eksponowany ponad pozostałą częścią cząsteczki CsA, i może penetrować błonę w głąb [223]. Dlatego też w monowarstwach mieszanych (DOPC-CsA i/lub DOPC-CsA-LG) tak zwana konformacja „zamknięta” cząsteczki CsA jest konformacją preferowaną energetycznie w rdzeniu hydrofobowym błony biologicznej, którą stabilizują trzy lub cztery wewnątrzcząsteczkowe

wiązania wodorowe (Rysunek 34) [127, 128, 248]. Zatem przejście cząsteczki CsA w konformację „zamkniętą” skutkuje zmniejszeniem efektywnej powierzchni polarnej CsA [246].

Można przypuszczać, że przed kompresją monowarstwy CsA, jej cykliczny pierścień aminokwasowy leży w płaszczyźnie powierzchni wody z hydrofobowymi łańcuchami bocznymi wystającymi w stronę powietrza. Taki stan odpowiada konformacji „otwartej”, w której grupy $-OH$, $>C=O$ i $>N-H$ uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych zarówno z cząsteczkami wody, jak i grupami polarnymi innych cząsteczek. Podczas sprężania monowarstwy pierścienie zbliżają się do siebie, tworząc sztywną monowarstwę, na co wskazuje zwiększony moduł ściśliwości (Rysunek 19, Tabela 6 [231]). Podobne zależności zostały zaobserwowane przez innych naukowców [251]. Sztywność monowarstwy jest związana z występowaniem silnych wiązań *cis*-amidowych i wodorowych w pierścieniu aminokwasowym, podczas gdy łańcuchy boczne są elastyczne [249]. Jednocześnie pierścienie mogą zmieniać swoją orientację z równoległej na bardziej pionową w stosunku do powierzchni międzyfazowej. Zachowanie to objawia się wzrostem potencjału powierzchniowego przy jednoczesnym spadku pozornego momentu dipolowego (Rysunek 32) [231]. Co ciekawe, spadek ten jest jeszcze ostrzejszy, gdy *plateau* potencjału powierzchniowego pojawia się w obszarze załamania monowarstwy.

W celu potwierdzenia zmiany orientacji cząsteczek CsA oszacowano kąt ich nachylenia względem granicy faz woda/powietrze [231]. W związku z tym wyznaczono powierzchnię graniczną A_{lim} , poprzez ekstrapolację liniowego fragmentu izotermy $\pi - A$, która jest równa $260,9 \text{ \AA}^2$ i większa niż wartość przekroju poprzecznego dla pierścienia cząsteczki ułożonego pionowo w stosunku do powierzchni (182 \AA^2 [252]), ale mniejsza niż powierzchnia przypadająca na cząsteczkę znajdującą się w orientacji płaskiej (374 \AA^2 zakładając, że powierzchnia CsA przypomina kształtem koło). Biorąc pod uwagę wskazane powyżej wartości pola powierzchni w danym ułożeniu, średni kąt nachylenia cząsteczki CsA względem płaszczyzny powierzchni można oszacować na około 50° [231].

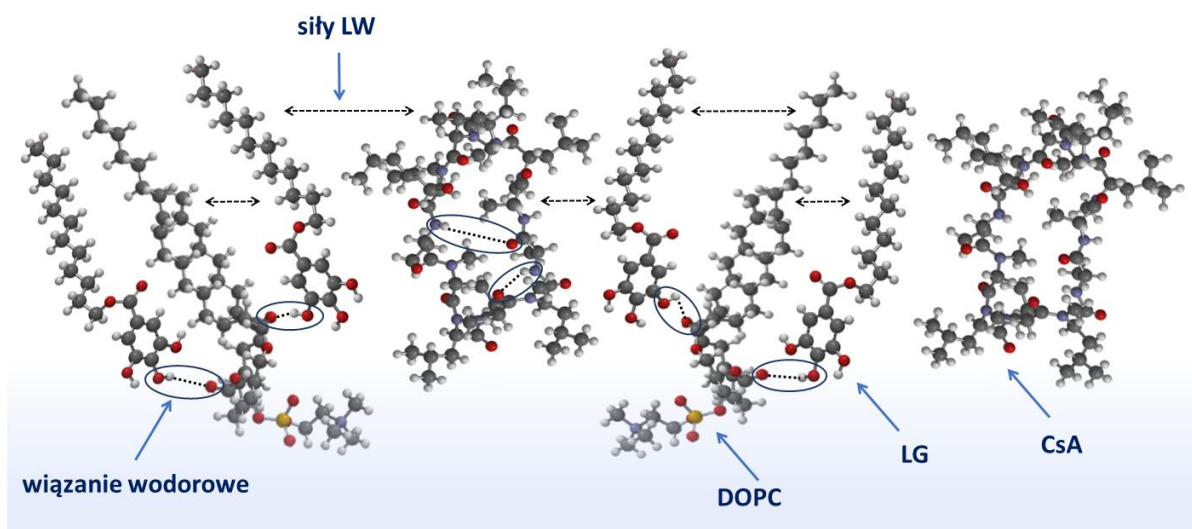
Powyższe procesy stanowią podstawę dyskusji dotyczącej zachowania się cząsteczek CsA na granicy faz ciecz/powietrze i jej adaptacji w monowarstwach DOPC i/lub LG, w tym oddziaływań pomiędzy składnikami tworzącymi monowarstwę, jak również wchodzącymi w skład ciekłej fazy nośnej.

W obecności DOPC i/lub LG (monowarstwy mieszane), w trakcie procesu kompresji, pojawiają się oddziaływania międzycząsteczkowe poprzez wiązania wodorowe

między grupami amidowymi pierścienia i/lub grupami hydroksylowymi CsA a atomami tlenu lipidu (będącymi akceptorami wodoru) i/lub grupami $-OH$ w strukturze LG (będącymi donorami wodoru). W takim przypadku korzystna jest struktura „otwarta” CsA. Zatem położenie grup cholinowych DOPC i pirogalolowych LG może być zaburzone przez cząsteczki CsA na granicy faz woda/powietrze w monowarstwach mieszanych [223]. Zupełnie inne zachowanie ma miejsce, gdy podczas kompresji cząsteczka CsA ulega zmianie orientacji. Łańcuchy węglowodorowe DOPC i/lub LG stanowią środowisko hydrofobowe (co odpowiada środowisku o niskiej stałej dielektrycznej) dla CsA, sprzyjając zmianie konformacji CsA z „otwartej” na „zamkniętą”. Wówczas grupy polarne polipeptydu są zaangażowane w wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, podczas gdy reszty hydrofobowe oddziałują z obszarem łańcuchów węglowodorowych poprzez oddziaływanie hydrofobowe. Zarówno zmiany konformacji, jak i orientacji cząsteczek tworzących monowarstwę oraz ich wzajemne oddziaływanie wpływają na przebieg izoterm $\pi - A$, $\Delta V - A$ oraz $\mu_a - A$ [231].

Charakterystycznymi cechami izoterm $\Delta V - A$ i zależności $\mu_a - A$ są przegięcia występujące przy powierzchniach odpowiadających początkowi przejścia fazowego G-LE, na co wskazują niemal poziome, początkowe odcinki izoterm $\pi - A$. Specyficzne przegięcie izoterm $\Delta V - A$ odpowiada maksymalnemu pozornemu momentowi dipolowemu (Rysunek 32). Wznoszącą się gałąź wykresu, która obrazuje wzrost momentu dipolowego, można przypisać procesowi zajmowania bardziej pionowej pozycji przez cząsteczki. Efekt ten jest prawdopodobnie związany ze wzmocnioną wzajemną polaryzacją dipoli, gdy monowarstwa staje się bardziej upakowana, a także z powodu reorganizacji strukturalnej w obszarze grup polarnych. Dalsza kompresja powoduje stopniową depolaryzację monowarstwy, co przedstawia opadająca gałąź wykresu [230, 231].

Gdy stosunek molowy składników monowarstwy DOPC-CsA-LG wynosi 1:1:2 ($\chi_{LG} = 0,50$), zwiększona zawartość LG może spowodować lepsze dopasowanie cząsteczek w monowarstwie, w której DOPC i CsA mogą być przedzielone cząsteczkami LG, jak pokazano na Rysunku 35. Ten schematyczny model wizualizuje możliwy rozkład cząsteczek w najbardziej upakowanym stanie monowarstwy DOPC-CsA-LG 1:1:2, poniżej jej ciśnienia załamania [231]. Optymalną konformację każdej pojedynczej cząsteczki symulowano przy użyciu programu *Spartan*. Należy jednak podkreślić, że poszczególne konformacje odpowiadają wolnym cząsteczkom, a nie ich mieszaninie, i służą jedynie do zobrazowania ułożenia cząsteczek w monowarstwie mieszanej.



Rysunek 35 *Możliwe ułożenie cząsteczek tworzących monowarstwę mieszaną DOPC-CsA-LG 1:1:2 w najbardziej upakowanym stanie na subfazie wodnej. Siły LW to oddziaływania Lifshitz'a-van der Waalsa.*

Powyższy model ilustruje występowanie między składnikami wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych oraz sił Lifshitz'a-van der Waalsa (LW, w tym Londona, Keesoma i Debye'a), które determinują właściwości monowarstwy. W cząsteczce DOPC, atomy tlenu, które mogą być akceptorami wodoru znajdują się w grupie fosforanowej ($-OPO_3^-$) i dwóch grupach karbonylowych ($>C=O$). Natomiast donorowe grupy hydroksylowe w LG, wykazują powinowactwo do grup karbonylowych DOPC [195]. Dlatego też grupa polarna LG preferuje lokalizację w pobliżu obszaru hydrofobowego monowarstwy, wówczas łańcuchy węglowodorowe LG znajdują się w strefie łańcuchów nienasyconych DOPC. W środowisku łańcuchów węglowodorowych CsA preferencyjnie występuje w konformacji zamkniętej z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi, oddziałując z DOPC i LG głównie siłami LW [231].

Ze względu na liofilowość, CsA może lokalizować się we wnętrzu błony DOPC zaburzając region łańcuchów acylowych, które znajdują się blisko grup polarnych [223, 253]. Ponadto ten sam obszar DOPC może być zajęty przez cząsteczki LG. W związku z tym dochodzi do rywalizacji o te same miejsca wiązania, co jednocześnie ogranicza elastyczność łańcuchów acylowych DOPC w wyniku zmniejszonej swobody konformacyjnej [223, 254]. Taki proces ułatwia wzajemne oddziaływania, w rezultacie prowadząc do wzrostu stabilności (bardziej ujemna energia Gibbsa, Rysunki 25 i 26, [231]). Przy innych proporcjach składników tworzących monowarstwę nie uzyskuje się tak silnych oddziaływań przyciągających, przypuszczalnie ze względu na brak optymalnego dopasowania przestrzennego cząsteczek oddziałujących ze sobą. Może to utrudniać specyficzne

oddziaływania między nimi, a nawet prowadzić do rozdzielenia faz. Ten mechanizm jest prawdopodobny dla monowarstw mieszanych wykazujących dodatnie wartości nadmiarowej energii mieszania Gibbsa (Rysunek 25).

Ze względu na powinowactwo LG do DOPC jego włączenie do monowarstwy powoduje zmniejszenie wolnej objętości w monowarstwie dwuskładnikowej DOPC-CsA, a tym samym zwiększenie gęstości upakowania wyrażonej przez C_5^{-1} [231]. W związku z tym dostęp CsA do grup karbonylowych DOPC zostaje utrudniony i prawdopodobnie cząsteczki CsA układają się równolegle wzdłuż długiej osi cząsteczek LG i/lub DOPC [240]. Specyficzne oddziaływania DOPC-CsA mogą przejawiać się jako zmiany orientacji i/lub konformacji wywołane wzrostem ciśnienia powierzchniowego, które dodatkowo są wrażliwe na zawartość LG, przyczyniając się w ten sposób do stabilności membrany.

Mechanizm stabilizacji monowarstwy DOPC-CsA przez LG można również wiązać z aktywnością przeciwutleniającą galusanu laurylu. LG oddziałuje preferencyjnie z fosfolipidami nienasyconymi i lokuje się bliżej wiązań podwójnych, tj. LG jest głębiej zanurzony w monowarstwie DOPC w kierunku powietrza, tak że jego grupa pirogalolowa (PG) znajduje się w pobliżu grup estrowych DOPC, podczas gdy łańcuchy laurylowe przyjmują lokalizację pośród łańcuchów oleinowych (Rysunek 35). W związku z tym grupy karbonylowe DOPC i ogólnie obszar łańcucha acylowego są mniej wrażliwe na obecność CsA, której zdolność do przyjmowania zamkniętej konformacji wzrasta. CsA jest w stanie penetrować rdzeń hydrofobowy i oddziaływać z łańcuchami węglowodorowymi cząsteczek DOPC i LG, głównie przez siły Lifshitz-van der Waalsa (Rysunek 35), osłaniając swoje grupy polarne przed środowiskiem niepolarnym, poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Z aplikacyjnego punktu widzenia proces ten wydaje się być korzystny dla oddziaływań błona komórkowa/lek [246]. LG raczej nie penetruje obszaru węglowodorowego, ale będąc na granicy faz woda/lipid, w pobliżu nienasyconych wiązań DOPC, zapewnia barierę ochronną przed utlenianiem ze względu na ograniczenie dostępu wolnych rodników do monowarstwy.

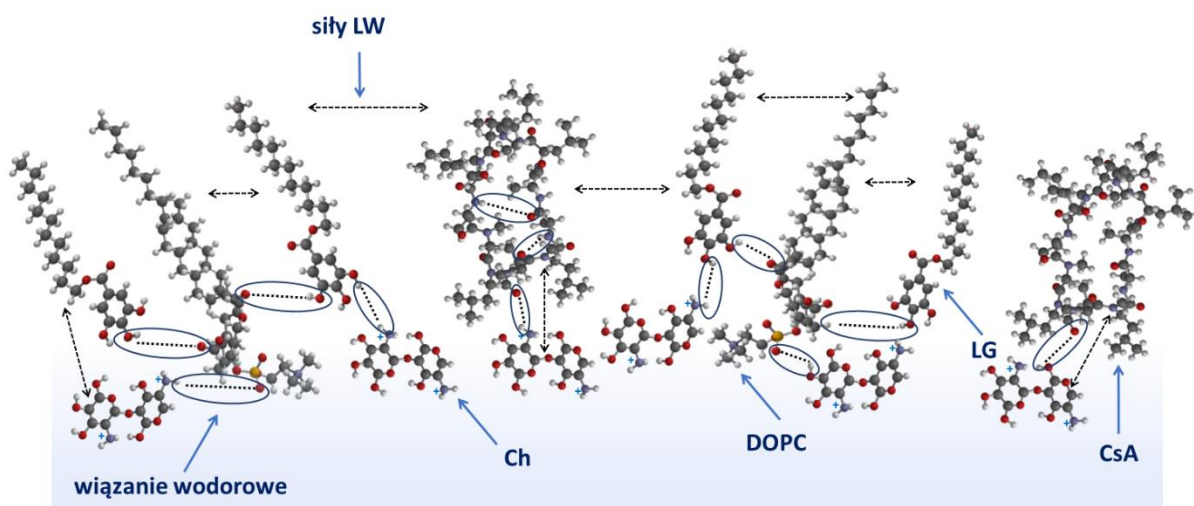
Dodatek chitozanu do fazy nośnej zmienia znacząco jej stałą dielektryczną. Bonardd i współ. podali, że zastosowanie chitozanu o niskiej masie cząsteczkowej skutkowało uzyskaniem wartości stałej dielektrycznej (ϵ) równej 5,5 ($T = 25^\circ\text{C}$ [255]). Zmiana ta związana jest z obecnością licznych grup $-\text{NH}_3^+$ i $-\text{OH}$ w strukturze chitozanu, które poprzez wiązania N-acetylowe mogą tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami ciekłej fazy nośnej [256]. Rysunek 36 przedstawia możliwe oddziaływania występujące pomiędzy

cząsteczkami tworzącymi monowarstwę DOPC-CsA-LG 1:1:2 oraz cząsteczkami Ch obecnymi w subfazie. Przy niskich wartościach ciśnienia powierzchniowego cząsteczki Ch mogą penetrować monowarstwę, co wpływa na zmianę oddziaływań wewnątrz filmu. Skutkuje to przesunięciem izoterm $\pi - A$ w kierunku większych wartości powierzchni przypadających na cząsteczkę (Rysunek 20). Ponadto w wyniku oddziaływań pomiędzy cząsteczkami Ch a polarną częścią DOPC możliwe jest gromadzenie się chitozanu poniżej polarnego regionu cząsteczek fosfolipidu w monowarstwie i/lub tworzenie kompleksów Ch-DOPC, poprzez oddziaływania między polarną grupą fosfocholinową a naładowanymi grupami chitozanu. Analogiczny mechanizm został przedstawiony przez Cámarę i współl. [257] oraz Pavinatto i współl. [258], którzy badali fosfolipidy o podobnej budowie do DOPC, różniące się między innymi długością łańcucha lub jego nasyceniem.

W związku z tym, że LG ma budowę amfifilową (polarna grupa pirogalolowa: pierścień benzenowy z grupami $-OH$ i niepolarny łańcuch węglowodorowy) może wchodzić w oddziaływania z chitozaniem w wyniku tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupami $-OH$ i chitozanowymi $-NH_3^+$ oraz oddziaływania dyspersyjne poprzez łańcuch hydrofobowy (Rysunek 36). Dzięki takim oddziaływaniom monowarstwa może być bardziej stabilna. Analogiczne zależności oddziaływań pomiędzy cząsteczkami Ch a cholesterolu, który posiada podobną budowę amfifilową jak LG opisali inni naukowcy [259].

W przypadku polipeptydu CsA oddziaływania pomiędzy jej cząsteczkami a Ch mogą zachodzić poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i/lub elektrostatyczne. Oddziaływania dyspersyjne mogą występować pomiędzy hydrofobowym szkieletem Ch a łańcuchami węglowodorowymi CsA w wyniku oddziaływań Lifshitz- van der Waalsa [229]. W efekcie takich oddziaływań możliwe jest utworzenie kompleksów i stabilizacja monowarstwy. Jak podali De Campos i współl. dzięki takim oddziaływaniom otrzymano nanocząstki składające się z chitozanu i cyklosporyny A, które mają potencjalnie duże zastosowanie w okulistyce [132].

Obecność cząsteczek chitozanu zwiększa zarówno potencjał powierzchniowy, jak i pozorny moment dipolowy wszystkich badanych monowarstw (Rysunek 33). Jest to skutkiem ekspozycji dipoli w wyniku oddziaływań między cząsteczkami monowarstwy oraz cząsteczkami monowarstwy i ciekłej fazy nośnej. Otrzymane zależności są związane z charakterystyczną budową cząsteczek tworzących monowarstwę, zmianą ich orientacji i/lub konformacji oraz odmiennym charakterem oddziaływań między cząsteczkami (wiązaniami wodorowymi i/lub hydrofobowymi).



Rysunek 36 Możliwe ułożenie cząsteczek tworzących monowarstwę mieszaną DOPC-CsA-LG 1:1:2 w najbardziej upakowanym stanie na subfazie Ch. Siły LW to oddziaływania Lifshitz-van der Waalsa.

W oparciu o omówione powyżej mechanizmy oddziaływań oraz uzyskane wyniki eksperymentów prowadzonych w ramach dysertacji można stwierdzić, że monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50 posiada najbardziej optymalny skład i ułożenie cząsteczek, które gwarantują jej największą stabilność wśród filmów trójskładnikowych. Ponadto dowiedziono, że w wyniku oddziaływań dyspersyjnych oraz polarnych (m.in. wodorowych) LG może lokować się w pobliżu cząsteczek DOPC, co sprzyja ochronie wiązań nienasyconych fosfolipidu przed utlenianiem wolnorodnikowym. Dodatkowo obecność łańcuchów węglowodorowych DOPC i LG zapewnia środowisko hydrofobowe dla cząsteczek CsA, które zmieniają swoją konformację z otwartej na zamkniętą. Taki proces może umożliwić przejście leku przez błony komórkowe. Co więcej, chitozan może tworzyć kompleksy ze składnikami monowarstwy i/lub gromadząc się pod monowarstwą poprawiać jej stabilność. Dlatego też można wysnuć wniosek, że monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50, jak i pozostałe monowarstwy trójskładnikowe na granicy faz ciecż/powietrze są odpowiednie do otrzymania biokompatybilnej powłoki dla biomateriału, która jednocześnie zapewni dostarczenie leku oraz ochronę błon przed negatywnymi skutkami terapii. Uzyskanie stabilnych filmów na fazie ciekłej stanowiło jeden z głównych celów dysertacji, który został zrealizowany. Dlatego też kolejnym etapem badań było przeniesienie monowarstw z ciecży na nośnik stały oraz scharakteryzowanie ich właściwości fizykochemicznych w aspekcie poprawy biokompatybilności biomateriału.

13. Dobór optymalnych warunków przenoszenia i określenie efektywności przenoszenia monowarstw (filmów) Langmuira z granicy faz ciecz/powietrze na nośnik stały

Kolejny etap badań wykonanych w ramach dysertacji obejmował przeniesienie monowarstw Langmuira badanych związków oraz ich mieszanin z fazy ciekłej na nośnik stały przy użyciu techniki Langmuira-Blodgett. Aby osiągnąć założone cele konieczne było zrealizowanie celów cząstkowych, które stanowiły pomiary relaksacji monowarstw przy różnych wartościach początkowych ciśnienia powierzchniowego, określenie stabilności oraz zdolności składników subfazy do penetracji monowarstw przy wybranym ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m^{-1} , a także wyznaczenie izoterm sprężania-rozprężania w celu określenia odwracalności procesu. Po ustaleniu optymalnych warunków przenoszenia filmów na podłoże stałe wyznaczono współczynnik przeniesienia w celu oceny ilościowej efektywności tego procesu. Za stały nośnik posłużyły: PET, mika, mika pokryta złotem oraz szkło pokryte złotem. Wybór PET jest związany z jego stosowaniem w inżynierii tkankowej, jako pokrycia dla stentów naczyń krwionośnych. Dlatego pojawiła się konieczność zbadania jego właściwości zarówno przed, jak i po modyfikacji. Ponadto zastosowanie miki oraz miki pokrytej złotem było warunkowane potrzebą określenia wpływu właściwości powierzchniowych podłoża na charakterystykę osadzonych na nim monowarstw. Użycie miki, która cechuje się wysoką gładkością powierzchni pozwoliło na wyeliminowanie wpływu jej chropowatości na właściwości osadzonych filmów. Z kolei złoto zostało wybrane ze względu na potencjał aplikacyjny do modyfikacji stentów metalicznych. W tym aspekcie wykorzystano rezonator kwarcowy QCM z elektrodami wykonanymi ze złota do określenia pokrycia powierzchni monowarstwą. Jednocześnie preparatyka filmów LB na szkle pokrytym złotem poszerzyła zakres technik badawczych o woltamperometrię cykliczną (CV), której zastosowanie jest niemożliwe w przypadku materiałów nieprzewodzących, takich jak polimer, szkło czy mika.

W kolejnym etapie badań, po otrzymaniu filmów LB określono stopień pokrycia badanych powierzchni elektrod złotych przy użyciu mikrowagi kryształu kwarcu (QCM) oraz ich jakość po osadzeniu na płytkach szklanych pokrytych warstwą złota (CV). Następnie zbadano właściwości fizykochemiczne warstw na wybranych nośnikach, takie jak topografia (AFM), organizacja cząsteczkowa (TOF-SIMS) oraz zwilżalność powierzchni (CA), które są ściśle związane z odpowiedzią organizmu ludzkiego na wszczepione ciało obce.

W celu określenia odpowiedniego ciśnienia powierzchniowego do przeniesienia badanych monowarstw Langmuira z granicy faz ciecz/powietrze na nośnik stały przeprowadzono pomiary:

- a) zmian ciśnienia powierzchniowego w czasie po zatrzymaniu ruchu barierek (relaksacja, π_t/π_0),
- b) zmian ciśnienia powierzchniowego (π) w czasie oraz powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A/A_0) przy stałej szybkości oscylacji barierek utrzymujących ciśnienie powierzchniowe wokół zadanej wartości,
- c) izoterm sprężania-rozprężania (odwracalność procesu).

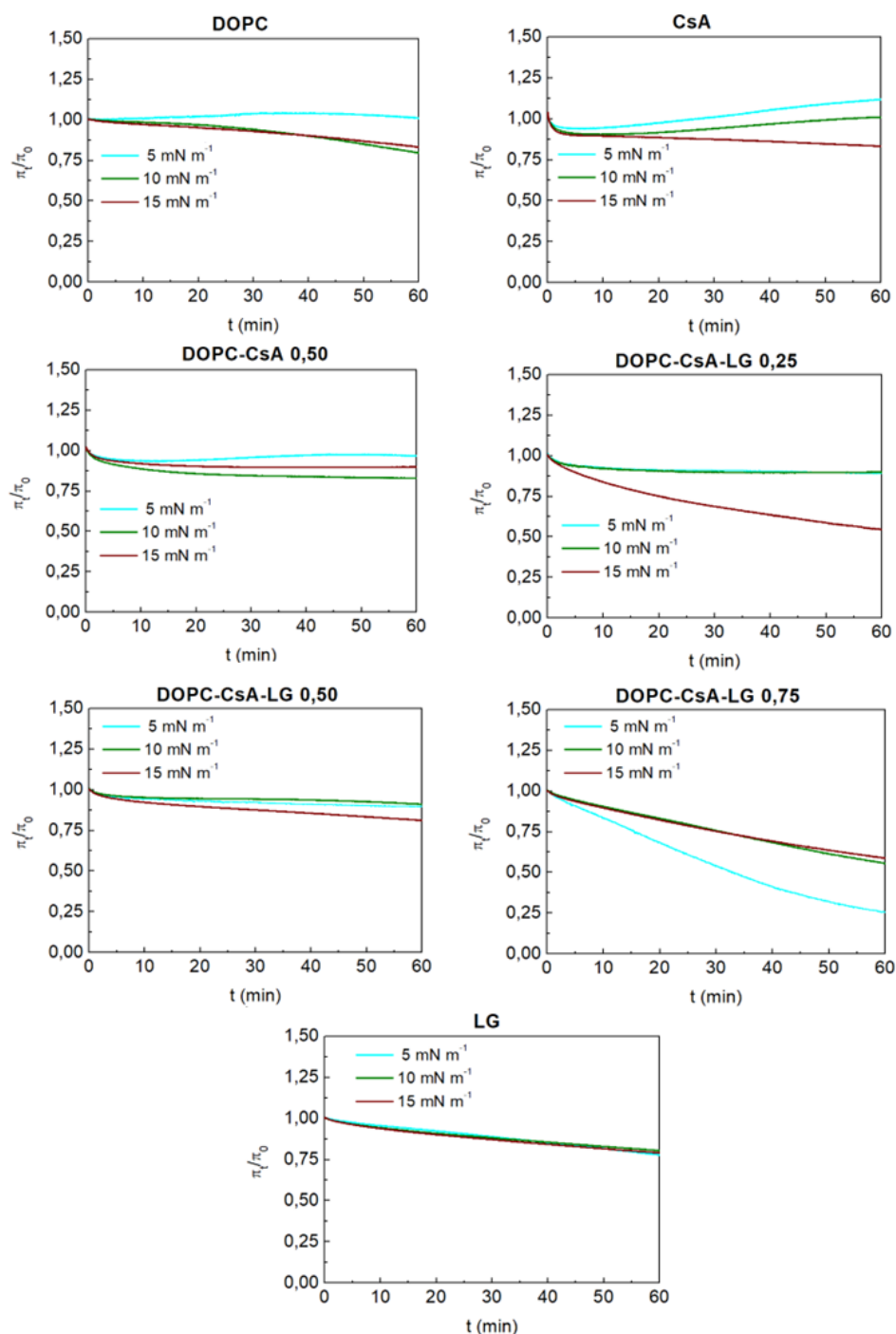
Ustalenie optymalnych warunków przenoszenia monowarstw pozwoliło na zrealizowanie kolejnego celu rozprawy doktorskiej.

13.1. Stabilność monowarstw w czasie (izotermi $\pi - t$)

W celu określenia stabilności monowarstw w czasie, zarejestrowano zmiany ciśnienia powierzchniowego podczas 60 minutowej relaksacji. Pomiary relaksacji rozpoczęto po uprzedniej kompresji monowarstwy do ciśnienia powierzchniowego $\pi_0 = 5, 10, 15 \text{ mN m}^{-1}$. Wyznaczono stosunek π_t/π_0 i wyniki przedstawiono w funkcji czasu na Rysunku 37.

Jak można zauważyć, pomimo utrzymywania barierek w stałej pozycji ciśnienie powierzchniowe zmienia swoją wartość, rośnie lub maleje. Zmiany ciśnienia powierzchniowego są zależne zarówno od składu monowarstw, jak i wartości początkowej π_0 (Rysunek 37). Dla wszystkich badanych monowarstw obserwuje się spadek w wartościach π_t/π_0 , za wyjątkiem monowarstwy CsA skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego równego 5 mN m^{-1} . Wśród monowarstw jednoskładnikowych otrzymanych na subfazie wodnej, LG charakteryzuje się największymi odchyleniami ujemnymi. W czasie godziny relaksacji ciśnienie powierzchniowe zmniejszyło się o 20-23% zależnie od π_0 . Świadczy to o silnych oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami LG a wodą. Polarne grupy hydroksylowe oddziałują z cząsteczkami subfazy poprzez wiązania wodorowe, dlatego cząsteczki LG ulegają desorpcji z powierzchni międzyfazowej do fazy objętościowej, czemu towarzyszy obniżenie ciśnienia. Ponadto nachylenie łańcuchów węglowodorowych względem granicy faz zmienia się podczas procesu kompresji. Cząsteczki się pionizują i zmniejsza się obszar, jaki zajmują, co sprzyja

przyciąganiu. Natomiast, w trakcie relaksacji oddziaływania przyciągające LG-LG są osłabiane.



Rysunek 37 Zmiany względnego ciśnienia powierzchniowego (π_t/π_0) w funkcji czasu wyznaczone dla badanych monowarstw otrzymanych na subfazie wodnej po zatrzymaniu ruchu barierek.

Odmienny trend można zauważyć dla monowarstwy CsA, która wśród monowarstw jednoskładnikowych jest najbardziej stabilna w czasie. W tym przypadku redukcja ciśnienia powierzchniowego wynosi 6-17%. Ma to związek z ułożeniem cząsteczek polipeptydu.

Przed kompresją cykliczne cząsteczki CsA leżą płasko na granicy faz woda/powietrze, zaś łańcuchy boczne skierowane są w stronę powietrza. Podczas zmniejszania powierzchni przypadającej na cząsteczkę, CsA może zmienić swoją orientację na bardziej pionową i/lub fragmenty pierścienia mogą głębiej zanurzać się w subfazie. W rezultacie następuje obniżenie π_t/π_0 . Wzrost π_t/π_0 występujący po ściśnięciu monowarstwy do ciśnienia powierzchniowego równego 5 mN m^{-1} może być również związany z procesem odwrotnym, w którym w trakcie relaksacji łańcuchy boczne mogą powracać do ułożenia początkowego i ponownie zajmować konformację bardziej rozprężoną [227, 251].

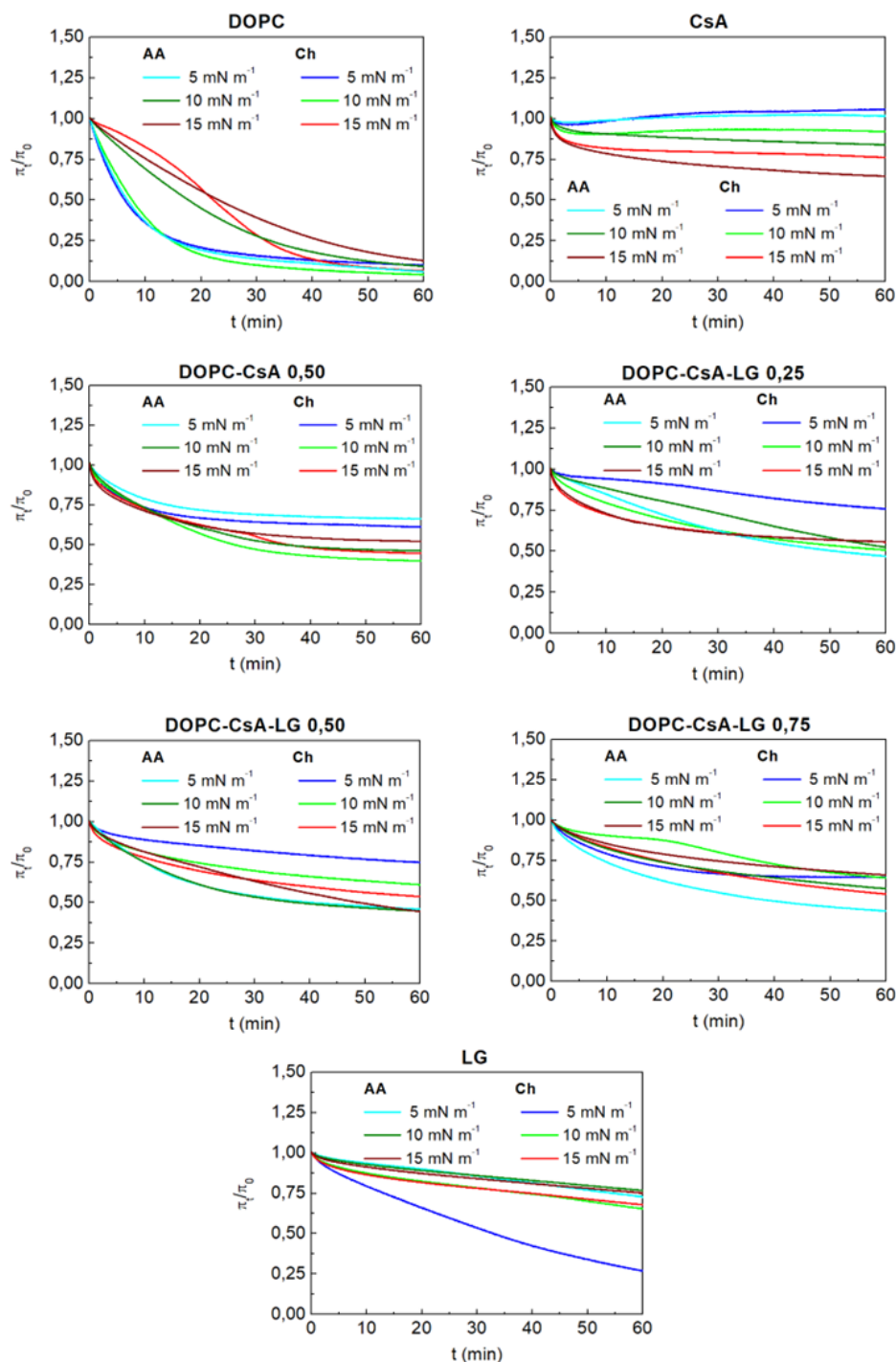
Monowarstwa DOPC-CsA 0,50 charakteryzuje się zmianami π_t/π_0 pośrednimi (7-17%) pomiędzy monowarstwami DOPC i CsA. Jednak w porównaniu do DOPC, monowarstwa mieszana wykazuje większą stabilność w czasie. Obecność trzeciego składnika - LG w monowarstwach mieszanych zmienia ich stabilność. W grupie monowarstw trójskładnikowych najmniejsze ujemne odchylenia zarejestrowano dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 (9-20%). Takie zachowanie można powiązać z najsilniejszymi oddziaływaniami przyciągającymi pomiędzy cząsteczkami (Rysunek 25). Znacząco większe obniżenie wartości ciśnienia powierzchniowego uzyskano dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,75. Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w monowarstwie o takim składzie są słabsze w porównaniu do DOPC-CsA-LG 0,50, jak i DOPC-CsA-LG 0,25 (Rysunek 25). W związku z tym oddziaływania pomiędzy cząsteczkami subfazy wodnej a tworzącymi monowarstwę mogą być silniejsze niż pomiędzy samymi cząsteczkami DOPC-CsA-LG, przez co monowarstwa jest mniej stabilna.

Na Rysunku 38 pokazano zmiany względnego ciśnienia powierzchniowego π_t/π_0 wyznaczone podczas jednogodzinnej relaksacji przy wartości $\pi_0 = 5, 10$ i 15 mN m^{-1} , dla wszystkich badanych monowarstw na subfazie AA oraz Ch. Największe ujemne odchylenia charakteryzują monowarstwę DOPC, dla której wartość ciśnienia ulega redukcji o 90 i 94%, odpowiednio dla subfazy Ch oraz AA. Takie zachowanie może być związane z silnymi oddziaływaniami pomiędzy cząsteczkami ciekłej fazy nośnej a DOPC. Chitozan penetrując monowarstwę zwiększa odległości pomiędzy cząsteczkami DOPC i jednocześnie osłabia oddziaływania przyciągające DOPC-DOPC [173]. Ponadto procesowi temu może sprzyjać występowanie monowarstwy w stanie ciekłym rozprężonym LE i związane z tym nieuporządkowanie łańcuchów węglowodorowych. Poza tym, chitozan w środowisku kwasowym jest polikationem ($pK_a \approx 6,5$ [232]). Dzięki obecności grup $-NH_3^+$ wykazuje

zdolność do oddziaływań z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DOPC. W konsekwencji cząsteczki DOPC mogą ulegać desorpcji z powierzchni międzyfazowej do fazy objętościowej [230], powodując zmniejszenie wartości ciśnienia powierzchniowego. Podobny mechanizm utraty cząsteczek tworzących monowarstwę w wyniku oddziaływań z chitozanem opisano w pracy [257]. W przypadku fosfolipidu DPPC zarejestrowano mniejsze ujemne odchylenia (około 20%). Świadczy to o większej stabilności monowarstwy na subfazie Ch [260].

Dodatkowo, dla monowarstwy CsA zarejestrowano najmniejsze ujemne odchylenia (2-35%) w zależności od zadanej wartości początkowej ciśnienia powierzchniowego. W tym przypadku możliwa jest zmiana orientacji pierścienia cząsteczki CsA i/lub jej fragmentów, podobnie jak miało to miejsce na subfazie wodnej. Analogiczne wyniki opisano w pracy [260]. Dodatkowo odchylenia dla pomiarów przy $\pi_0 = 5 \text{ mN m}^{-1}$ mogą być związane ze zmianą konformacji łańcuchów bocznych [230], co zostało potwierdzone także przez innych autorów [227, 251].

Silne oddziaływania LG-AA powodują również gwałtowne obniżenie ciśnienia powierzchniowego podczas procesu relaksacji przy $\pi_0 = 5 \text{ mN m}^{-1}$. Obecność cząsteczek chitozanu wzmacnia ujemne odchylenia. Podczas ściskania monowarstwy do ciśnienia powierzchniowego równego 5 mN m^{-1} cząsteczki LG są luźno upakowane. Dlatego też łańcuchy węglowodorowe mogą być nachylone względem powierzchni międzyfazowej. Ponadto mogą one oddziaływać z hydrofobowym szkieletem chitozanu poprzez siły Lifshitz-van der Waalsa, podczas gdy grupy pirogalolowe LG oddziałują poprzez wiązania wodorowe z grupami polarnymi Ch. W związku z powyższym możliwa jest desorpcja cząsteczek tworzących monowarstwę do ciekłej fazy nośnej [230].

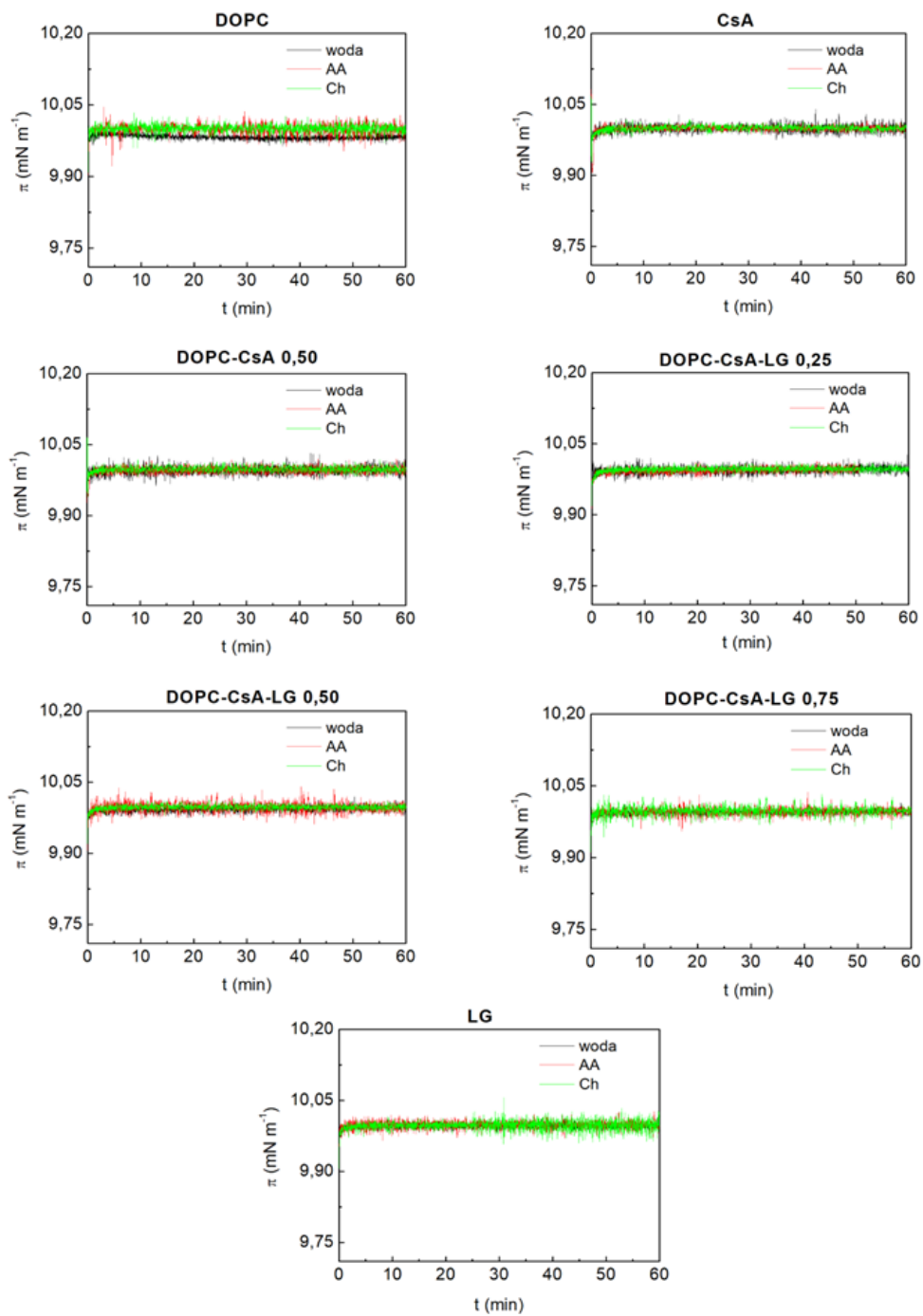


Rysunek 38 Zmiany względnego ciśnienia powierzchniowego (π_t/π_0) w funkcji czasu wyznaczone dla badanych monowarstw otrzymanych na subfazach AA i Ch po zatrzymaniu ruchu barierek.

W grupie monowarstw mieszanych, DOPC-CsA 0,50 charakteryzuje się największą redukcją ciśnienia powierzchniowego (około 25-56%) w trakcie godzinowego pomiaru. Pomimo odpychającego charakteru oddziaływań pomiędzy cząsteczkami DOPC a CsA monowarstwa mieszana jest bardziej stabilna w porównaniu z jednoskładnikową DOPC. Ponadto w obecności chitozanu redukcja wartości ciśnienia powierzchniowego jest większa

niż w przypadku subfazy AA. Cząsteczki Ch powodują zwiększenie odległości pomiędzy cząsteczkami tworzącymi monowarstwę jednocześnie ją destabilizując (Rysunek 38). Natomiast dodatek trzeciego składnika LG poprawia stabilność monowarstw trójskładnikowych, w szczególności wobec chitozanu. Wszystkie monowarstwy mieszane DOPC-CsA-LG charakteryzują się mniejszymi zmianami wartości ciśnienia powierzchniowego podczas godzinnej relaksacji. Najbardziej stabilne są monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 oraz DOPC-CsA-LG 0,75 (Rysunek 38 [230]). Biorąc pod uwagę stabilność monowarstw przy ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m^{-1} , a także największe upakowanie cząsteczek monowarstwy otrzymanej na subfazie wodnej, zastosowano tę wartość podczas przenoszenia badanych monowarstw na nośnik stały.

Kolejny cząstkowy cel dysertacji realizowano poprzez rejestrowanie zmian ciśnienia powierzchniowego w czasie godziny przy ruchu oscylacyjnym barierek ze stałą szybkością równą 5 mm min^{-1} , co zapewniło utrzymanie stałego ciśnienia powierzchniowego wynoszącego 10 mN m^{-1} . Uzyskane wyniki przedstawia Rysunek 39. Fluktuacje ciśnienia powierzchniowego w czasie godziny można uznać za nieistotne. Nie przekraczają wartości $0,1 \text{ mN m}^{-1}$, co świadczy o tym, że zastosowana szybkość ruchu barierek jest odpowiednia do utrzymania ciśnienia powierzchniowego na stałym poziomie podczas przenoszenia badanych monowarstw na nośnik stały.

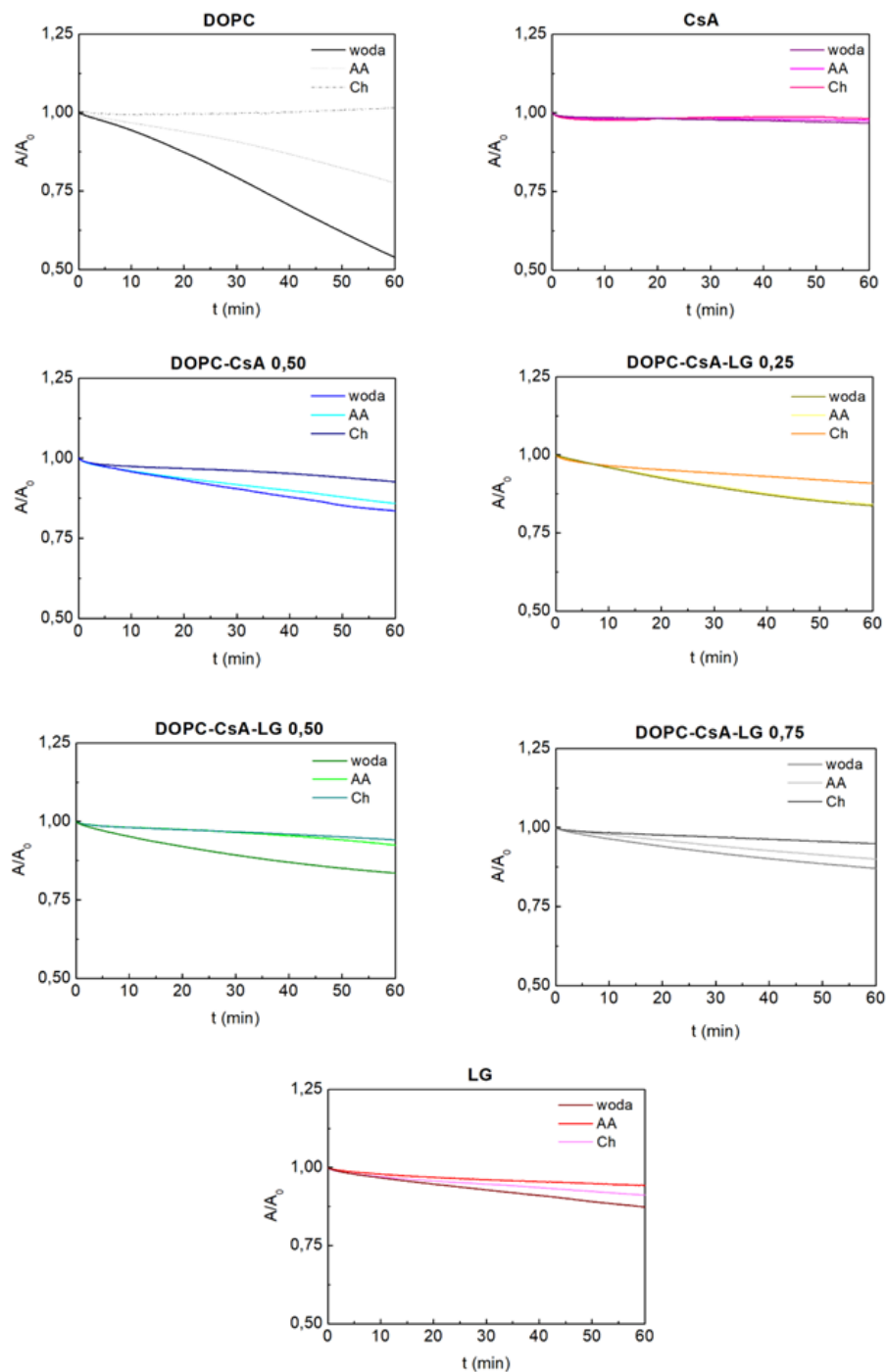


Rysunek 39 Zmiany ciśnienia powierzchniowego w funkcji czasu ($\pi-t$) podczas jednogodzinnej stabilizacji badanych monowarstw na subfazach wodnej, AA i Ch przy ciśnieniu powierzchniowym 10 mN m^{-1} i stałej szybkości oscylacyjnego ruchu barierki 5 mm min^{-1} .

Kolejny etap badawczy rozprawy doktorskiej obejmował wyznaczenie zmian powierzchni przypadającej na cząsteczkę w funkcji czasu w celu określenia stabilności monowarstw oraz zdolności cząsteczek subfazy do ich penetracji. Przy obliczaniu współczynnika przeniesienia uwzględniono wszelkie straty cząsteczek spowodowane ich desorpcją z powierzchni międzyfazowej.

Na Rysunku 40 przedstawiono względne zmiany powierzchni przypadającej na cząsteczkę po kompresji monowarstw do ciśnienia powierzchniowego równego 10 mN m^{-1} i jego utrzymywaniu przez okres 1 godziny przy pomocy barierok poruszających się ze stałą szybkością wynoszącą 5 mm min^{-1} . Jak można zauważyć, monowarstwa DOPC wykazuje największą zmianę w wartościach powierzchni przypadającej na cząsteczkę, osiągającą 46 %, wskazując na desorpcję cząsteczek fosfolipidu do subfazy. W konsekwencji prowadzi to do małej stabilności filmu. Zahamowanie procesu desorpcji można osiągnąć przez wprowadzenie do monowarstwy innych związków (CsA i/lub LG). Dlatego monowarstwy mieszane zawierające DOPC (DOPC-CsA 0,50 oraz DOPC-CsA-LG) charakteryzuje znacznie mniejsza zmiana powierzchni, w zakresie 13-17 %, potwierdzając mniejszą desorpcję cząsteczek z granicy faz woda/powietrze. Natomiast monowarstwa CsA wykazuje największą stabilność na subfazie wodnej. Ubytek powierzchni związany z utratą cząsteczek z granicy międzyfazowej w tym przypadku wynosi jedynie 3%. Z kolei dla monowarstwy LG redukcja powierzchni sięga poziomu 13%. W odniesieniu do monowarstwy DOPC jest ona bardziej stabilna [185].

Powierzchnia przypadająca na cząsteczkę w monowarstwie DOPC na granicy faz AA/powietrze ulega redukcji o 23% (Rysunek 40). Jednak, w porównaniu do monowarstwy fosfolipidu otrzymanej na subfazie wodnej, desorpcja zachodzi w mniejszym stopniu (Rysunek 40). Świadczy to o tym, że wprowadzone do subfazy cząsteczki AA poprawiają stabilność monowarstwy DOPC. Z kolei monowarstwy CsA i LG są znacznie bardziej stabilne. W ich przypadku zmniejszenie powierzchni wynosi odpowiednio tylko 2% i 6%. Monowarstwy mieszane DOPC-CsA i DOPC-CsA-LG wykazują spadek A/A_0 o 8-16%. Obecność cząsteczek Ch w subfazie skutkuje lepszą stabilnością badanych monowarstw (Rysunek 40) z wyjątkiem monowarstwy LG. Co zaskakujące, najmniejsze obniżenie powierzchni (o 1%) obserwuje się dla monowarstwy DOPC. Dowodzi to istnienia silnych oddziaływań między cząsteczkami fosfolipidu i chitozanu poprzez siły Lifshitz-van der Waalsa i oddziaływania kulombowskie [186].



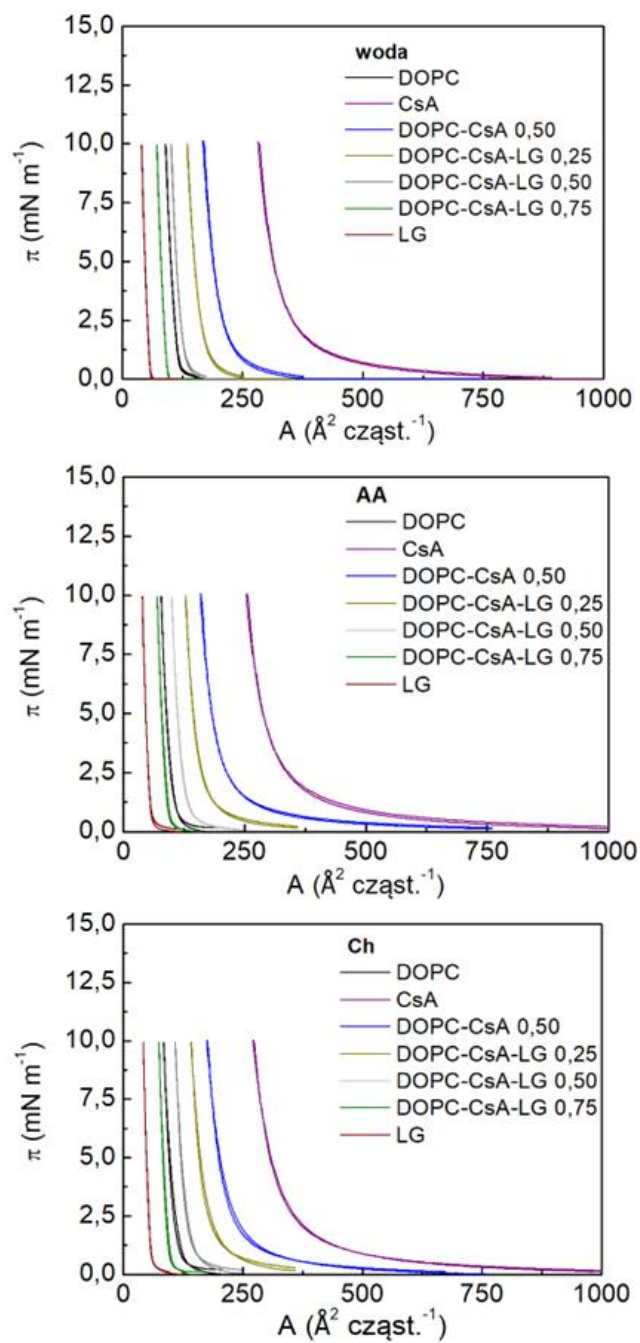
Rysunek 40 Zmiany względnej powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A/A_0) podczas jednogodzinnej stabilizacji badanych monowarstw na subfazach wodnej, AA i Ch przy ciśnieniu powierzchniowym 10 mN m^{-1} i stałej szybkości oscylacyjnego ruchu barierki 5 mm min^{-1} .

Można więc wysnuć wniosek, że cząsteczki chitozanu tworzą z DOPC kompleksy w efekcie oddziaływań elektrostatycznych i/lub wnikają do monowarstwy dzięki oddziaływaniom hydrofobowym [186]. Takie zachowanie chitozanu względem lipidów zostało opisane także przez innych badaczy [232].

Dla monowarstwy CsA utworzonej na subfazie chitozanowej zarejestrowano 2% spadek względnej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w czasie (Rysunek 40). Może to świadczyć o tym, że oddziaływania między CsA a cząsteczkami chitozanu są słabsze niż między DOPC a chitozanem. Niemniej jednak oba związki mogą oddziaływać zarówno dyspersyjnie, jak i poprzez wiązania wodorowe (dzięki obecności grup hydroksylowych i aminowych w cząsteczkach chitozanu oraz grup amidowych w cząsteczkach cyklosporyny). W przypadku monowarstwy LG oddziaływania z chitozanem zachodzą między łańcuchem hydrofobowym a szkieletem polisacharydowym poprzez siły Lifshitzavander Waalsa. Natomiast grupy hydroksylowe LG mogą oddziaływać z polarnymi grupami chitozanu. Dla monowarstw mieszanych (dwu- i trójskładnikowych) w obecności cząsteczek chitozanu występuje mniejsza redukcja powierzchni (5-9%, Rysunek 40) w porównaniu do monowarstw pojedynczych składników DOPC i LG, przy czym najniższą obserwuje się dla monowarstw DOPC-CsA-LG 0,50 i 0,75. Jest to związane z silnymi oddziaływaniami przyciągającymi między cząsteczkami tworzącymi te monowarstwy (Rysunek 28) [186].

13.2. Odwracalność procesu sprężania (izotermy sprężania-rozprężania)

Dla większości badanych monowarstw najmniejsze ujemne odchylenia zarejestrowano podczas relaksacji po ściśnięciu do ciśnienia powierzchniowego równego 10 mN m^{-1} . Jednak, pojawiają się także dodatnie odchylenia w przypadku monowarstwy CsA. Można zatem wnioskować, że monowarstwy „reagują” w różny sposób na ściskanie mechaniczne i po zaprzestaniu działania siły nie znajdują się w stanie równowagi. Dlatego też w celu potwierdzenia stabilności monowarstw oraz odwracalności procesu wyznaczono izotermy sprężania-rozprężania do tej wartości ciśnienia. Ponadto proces rozprężania monowarstwy prowadzono bezpośrednio po osiągnięciu zadanej wartości ciśnienia powierzchniowego (Rysunek 41). Przy $\pi_0 = 10 \text{ mN m}^{-1}$, które jest mniejsze niż ciśnienie załamania monowarstwy CsA, wszystkie trzy składniki powinny być obecne w monowarstwie trójskładnikowej.



Rysunek 41 Izotermy $\pi - A$ sprężania-rozprężania po ściśnięciu badanych monowarstw otrzymanych na subfazach wodnej, AA oraz Ch do $\pi_0 = 10 \text{ mN m}^{-1}$.

Izotermy sprężania i rozprężania przy wartości $\pi_0 = 10 \text{ mN m}^{-1}$ wszystkich badanych monowarstw otrzymanych na granicy faz ciecz/powietrze pokrywają się praktycznie całkowicie. Zarejestrowana gałąź rozprężania jest przesunięta w niewielkim stopniu w kierunku mniejszych powierzchni przypadających na cząsteczkę [173, 230]. Dla fosfolipidu DPPC gałęzie sprężania i rozprężania także niemal całkowicie się pokrywały [260].

Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają stabilność badanych monowarstw oraz odwracalność procesu kompresji.

Na podstawie przeprowadzonych badań dobrano optymalne warunki przenoszenia monowarstw na nośnik stały, co pozwoliło na osiągnięcie kolejnego celu cząstkowego. Dlatego też w dalszym etapie eksperymentów monowarstwy sprężano do ciśnienia powierzchniowego równego 10 mN m^{-1} , a następnie przenoszono je na nośnik przy stałej szybkości ruchu barierki wynoszącej 5 mm min^{-1} . Ponadto wynurzanie nośnika prowadzono bezpośrednio po osiągnięciu zadanego ciśnienia powierzchniowego, aby zminimalizować efekty związane z brakiem stabilności filmów i/lub utratą cząsteczek tworzących monowarstwy do ciekłej fazy nośnej.

13.3. Współczynnik przeniesienia

W celu uzyskania informacji o skuteczności osadzania monowarstw na podłożu PET aktywowanym plazmą wyznaczono wartości współczynnika przeniesienia (TR) zgodnie z Równaniem 20.

Biorąc pod uwagę fakt, że powierzchnia przypadająca na cząsteczkę zmniejsza się, gdy monowarstwa jest utrzymywana pod stałym ciśnieniem, przy wyznaczaniu współczynnika (stopnia) przeniesienia wprowadzono wartość powierzchni skorygowaną o desorpcję cząsteczek z monowarstwy do fazy nośnej (ΔA_m). Odpowiada ona redukcji powierzchni monowarstwy na subfazie związanej z jej przeniesieniem na ciało stałe, podczas gdy A_s stanowi powierzchnię nośnika pokrytą monowarstwą.

$$TR = \frac{\Delta A_m}{A_s} \quad (20)$$

Obliczona skorygowana wartość współczynnika przeniesienia (TR) odzwierciedla rzeczywisty stopień pokrycia monowarstwą. Bez uwzględnienia poprawki wartości TR byłyby zawyżone. Dzieje się tak, ponieważ w celu zminimalizowania desorpcji cząsteczek generowana jest dalsza kompresja, aby utrzymać stałe ciśnienie powierzchniowe podczas przenoszenia. W konsekwencji obserwuje się większą redukcję powierzchni monowarstwy na subfazie niż faktycznie towarzyszy procesowi jej przenoszenia na podłoże stałe [185]. Zastosowanie poprawki minimalizuje ten problem.

Wartość TR równa 1 potwierdza, że na podłoże stałe została przeniesiona tylko jedna warstwa cząsteczek (monowarstwa) [261]. Wartości TR wyznaczone dla większości badanych monowarstw są bliskie 1 (Tabela 8), co świadczy o ich ilościowym przeniesieniu

na aktywowaną powierzchnię PET i uzyskaniu wysokiej jakości monowarstw LB. Wyjątek stanowi monowarstwa DOPC, która charakteryzuje się największą wartością współczynnika transferu ($TR = 1,6$). Może to być związane z dostosowywaniem konformacji cząsteczek monowarstwy DOPC do chropowatej powierzchni PET_p [173]. Adsorpcja cząsteczek DOPC na wypukłościach i w zagłębieniach prowadzi do większego ich ubytku z monowarstwy, a tym samym zwiększenia się powierzchni (ΔA_m) w stosunku do powierzchni geometrycznej substratu (A_s). Inną przyczyną może być zmiana organizacji cząsteczek spowodowana zróżnicowaniem oddziaływań podczas przenoszenia monowarstwy z fazy ciekłej na ciało stałe [185].

Nieco niższą wartość otrzymano dla monowarstwy DOPC-CsA 0,50. Do przeniesienia mniejszej ilości cząsteczek na podłoże polimerowe mogą przyczyniać się oddziaływania odpychające występujące między DOPC i CsA (Rysunek 25). Obecność LG w monowarstwach mieszanych DOPC-CsA-LG prowadzi do zmiany rodzaju oddziaływań z odpychających na przyciągające (Rysunek 25). W związku z tym uzyskano większe wartości TR (Tabela 8). W dodatku silne oddziaływania przyciągające mogą sprzyjać przeniesieniu większej ilości cząsteczek na PET_p , niż wynikałoby to z transferu jednostkowego.

Tabela 8 Wartości współczynnika przeniesienia (TR) uzyskane podczas osadzania badanych monowarstw na powierzchni PET aktywowanej plazmą oraz miki.

Monowarstwa	TR			
	PET _p /woda	PET _p /AA	PET _p /Ch	Mika/woda
DOPC	1,6±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	0,8±0,3
CsA	0,9±0,1	1,0±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1
DOPC-CsA 0,50	0,8±0,2	1,1±0,3	1,0±0,2	1,0±0,2
DOPC-CsA-LG 0,25	1,0±0,2	1,0±0,1	0,9±0,1	0,9±0,3
DOPC-CsA-LG 0,50	1,0±0,3	1,2±0,1	0,9±0,2	1,1±0,3
DOPC-CsA-LG 0,75	1,0±0,3	1,2±0,2	0,8±0,1	0,9±0,3
LG	0,9±0,1	1,5±0,1	0,9±0,2	0,9±0,2

Wśród monowarstw jednoskładnikowych przenoszonych z granicy faz AA/powietrze oraz Ch/powietrze największe wartości TR odnotowano dla monowarstwy DOPC ($TR = 1,2$ i $1,3$ odpowiednio dla subfazy AA i Ch). Współczynniki przeniesienia są niższe niż te uzyskane podczas osadzania monowarstw z subfazy wodnej (Tabela 8) [173, 185]. Dla

monowarstwy CsA otrzymano podobne wartości TR niezależnie od typu subfazy. W przypadku monowarstwy DOPC-CsA 0,50 uzyskano niższe wartości TR w odniesieniu do filmu DOPC. Wynika to z oddziaływań odpychających między cząsteczkami tworzącymi monowarstwę [231]. Dodanie trzeciego związku - LG zmienia charakter oddziaływań na przyciągający ze względu na lepsze dopasowanie strukturalne i mieszalność składników. Co więcej, składniki ciekłej fazy nośnej także mogą adsorbować się na powierzchni PET_p , co może mieć wpływ na efektywność przeniesienia monowarstw mieszanych DOPC-CsA-LG. Wartości TR uzyskane podczas osadzania monowarstwy z granicy faz AA/powietrze są wyższe niż w obecności Ch [173, 186].

Ponadto wyznaczono wartości współczynnika przeniesienia monowarstw z granicy faz woda/powietrze na mikę oraz złoto. Było to niezbędne ze względu na fakt, że atomowa gładkość powierzchni miki pozwoliła wykluczyć wpływ chropowatości podłoża na właściwości osadzonych filmów i porównać je z analogicznymi układami na bardziej chropowatej powierzchni polimeru. Natomiast użycie rezonatora kwarcowego QCM z napyłoną warstwą złota umożliwiło określenie stopnia pokrycia powierzchni monowarstwą [185].

W eksperymentach, w których zastosowano mikę jako nośnik stały, wartości współczynnika przeniesienia (TR) wyznaczono, podobnie jak w przypadku PET_p , jako stosunek zmniejszenia pola powierzchni monowarstwy na subfazie wodnej do powierzchni miki pokrytej monowarstwą. Analogicznie przy obliczaniu wartości TR uwzględniono desorpcję cząsteczek tworzących monowarstwę. Zgodnie z oczekiwaniem wartości TR uzyskane podczas przenoszenia badanych monowarstw na mikę są bliskie jedności (Tabela 8) [185]. Atomowa gładkość powierzchni miki oraz jej duża gęstość ładunku powierzchniowego [262] umożliwia silną adhezję osadzanych cząsteczek prowadząc do tworzenia zwartej monowarstwy. Ze względu na fakt, że powierzchnia miki w kontakcie z wodą posiada ładunek ujemny, adsorpcja cząsteczek jest uwarunkowana siłami elektrostatycznymi i/lub tworzeniem wiązań wodorowych między polarnymi grupami cząsteczek monowarstwy a powierzchnią ciała stałego.

Jak wspomniano w Rozdziale 12.5, jedynie monowarstwa LG charakteryzuje się ujemnymi wartościami potencjału powierzchniowego (ΔV), co może utrudniać przenoszenie cząsteczek na ujemnie naładowaną powierzchnię miki (Rysunek 32). Jednakże uzyskana wartość TR zbliżona do jedności dowodzi, że wartość ΔV monowarstwy LG nie wywiera wpływu na proces jej osadzania na micy. Sugeruje to, że adhezja cząsteczek LG do

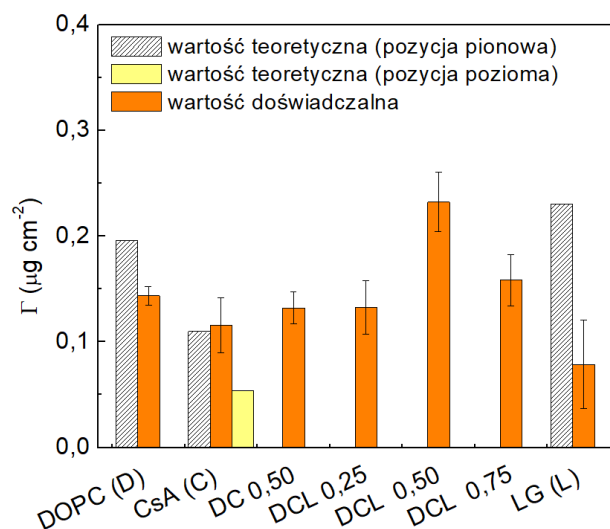
powierzchni podłoża wynika głównie z udziału grup hydroksylowych, które przed przeniesieniem są zanurzone w wodnej fazie nośnej. Z tego względu nie determinują ujemnego potencjału powierzchniowego LG, który jest głównie efektem polaryzacji grup karbonylowych (dipoli karbonylowych) w pobliżu obszaru hydrofobowego monowarstwy [231]. Dlatego też udział polarnych grup pirogalolowych, z częściowym ładunkiem dodatnim zgromadzonym na atomach wodoru, w oddziaływaniach z ujemnie naładowaną minką decyduje o efektywności przenoszenia, czemu może sprzyjać również zdolność LG do tworzenia międzycząsteczkowej sieci wiązań wodorowych [185].

13.4. Stopień pokrycia powierzchni

Następnym cząstkowym celem doktoratu było wykorzystanie mikrowagi kwarcowej do scharakteryzowania monowarstw osadzonych na nośniku stałym. Rysunek 42 przedstawia wyznaczone pokrycie powierzchni elektrod ze złota badanymi monowarstwami (Γ) wyrażone w jednostkach $\mu\text{g cm}^{-2}$. Dodatkowo, dla monowarstw jednoskładnikowych porównano wartości pokrycia powierzchni otrzymane doświadczalnie z obliczonymi teoretycznie na podstawie powierzchni granicznej przypadającej na cząsteczkę. Przyjęto, że dla cząsteczki DOPC ułożonej w pozycji pionowej powierzchnia graniczna wynosi $67 \text{ \AA}^2 \text{ cząst.}^{-1}$ [263, 264], dla CsA w pozycji pionowej $182 \text{ \AA}^2 \text{ cząst.}^{-1}$, a w poziomej $374 \text{ \AA}^2 \text{ cząst.}^{-1}$ [252], zaś dla LG w pozycji pionowej $24 \text{ \AA}^2 \text{ cząst.}^{-1}$, zgodnie z modelem określonym za pomocą programu *Spartan* [185]. Znając pokrycie powierzchni obliczone przy zastosowaniu QCM oraz wartość powierzchni granicznej danego związku możliwe było wyznaczenie wartości TR . Wartości powierzchni przypadającej na cząsteczkę określone eksperymentalnie (A_e) oraz teoretycznie (A_t) zestawiono w Tabeli 9.

Jak można zauważyć na Rysunku 42, doświadczalna wartość pokrycia powierzchni monowarstwą DOPC i LG jest mniejsza niż obliczona dla cząsteczek ułożonych w najbardziej pionowej orientacji, jaką mogą osiągnąć względem powierzchni podłoża. Różnica ta może wynikać z wielu czynników. Jeden z nich to tylko częściowo ilościowe przenoszenie monowarstw, kolejny to obecność obszarów bez warstwy pokrywającej. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, biorąc pod uwagę współczynniki przeniesienia (Tabela 9). Innym czynnikiem może być stan fizyczny, w którym występują monowarstwy na granicy faz woda/powietrze (faza LE, Tabela 6). Ze względu na fakt, że wszystkie monowarstwy zostały przeniesione w fazie ciekłej rozprężonej LE (przy ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m^{-1} , Rysunek 20, Tabela 6) [231], cząsteczki

w osadzonych filmach nie są ciasno upakowane i/lub są nachylone względem powierzchni podłoża.



Rysunek 42 Pokrycie powierzchni elektrod złotych badanymi monowarstwami oraz jego wartość teoretyczna z uwzględnieniem pionowego ułożenia cząsteczek, w przypadku CsA także orientacji poziomej.

Jak wcześniej wspomniano, obecność wiązań podwójnych w łańcuchach oleinowych DOPC o konfiguracji *cis* oraz stosunkowo dużych polarnych grup pirogalolowych LG uniemożliwia całkiem pionową orientację tych cząsteczek podczas kompresji. Co zaskakujące, dla powierzchni substratu pokrytej monowarstwą CsA uzyskano większą wartość eksperymentalną pokrycia niż określona teoretycznie dla cząsteczek w pozycji pionowej. Wskazuje to, że na powierzchni podłoża osadziło się więcej cząsteczek CsA niż można oczekiwać przy przenoszeniu monowarstwy. Wniosek ten dodatkowo potwierdzają przedstawione poniżej wartości współczynnika przeniesienia (Tabela 9). Na tej podstawie można przypuszczać, że omówione zachowanie cząsteczek CsA będzie korzystne w kontekście projektowania powierzchni z możliwością kontrolowanego uwalniania tego leku lub o podobnej strukturze, co jest jednym z celów dysertacji.

Wyznaczona eksperymentalnie wartość pokrycia powierzchni elektrod monowarstwą DOPC-CsA 0,50 jest pośrednia między wartościami określonymi dla DOPC i CsA (Rysunek 42). Natomiast wprowadzenie do układu LG zwiększa pokrycie powierzchni nośnika. Taki wzrost Γ w porównaniu z wartością dla DOPC-CsA może być przypisany oddziaływaniom przyciągającym między cząsteczkami monowarstwy DOPC-CsA-LG (Rysunki 24-26), co skutkuje ich ściślejszym upakowaniem. Największe pokrycie powierzchni uzyskano dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50, dla której stwierdzono najsilniejsze przyciąganie między cząsteczkami oraz ich najściślejsze upakowanie na

granicy faz woda/powietrze [231]. Jest to niezwykle ważne w projektowaniu powłok dla implantów pokrytych złotem, które zapewnią warstwę ochronną przed uwalnianiem złota do organizmu, co może prowadzić do niepożądanych skutków ubocznych, a w efekcie do odrzucenia biomateriału.

Tabela 9 Powierzchnia przypadająca na cząsteczkę wyznaczona eksperymentalnie przy pomocy QCM (A_e), powierzchnia graniczna przypadająca na cząsteczkę (A_t) oraz wyznaczona z izotermy $\pi - A$ przy ciśnieniu 10 mN m^{-1} (A_i) dla badanych monowarstw.

Monowarstwa	A_{eks} (\AA^2)	A_t (\AA^2)	A_i (\AA^2)	TR złoto**
DOPC	90,9	67,0	78,4	$0,8 \pm 0,1$
CsA	172,4	182,0 (\uparrow)* 374,0 (\rightarrow)*	210,1	$1,1 \pm 0,2$
DOPC-CsA 0,50	125,0		156,2	$1,3 \pm 0,1$
DOPC-CsA-LG 0,25	104,2		116,9	$1,2 \pm 0,2$
DOPC-CsA-LG 0,50	47,6		88,2	$1,8 \pm 0,2$
DOPC-CsA-LG 0,75	52,6		63,3	$1,1 \pm 0,2$
LG	71,4	24,0	37,5	$0,9 \pm 0,1$

* symbole \uparrow oraz \rightarrow oznaczają odpowiednio ułożenie pionowe oraz poziome cząsteczek CsA względem podłoża;

** wartości TR wyznaczone na podstawie danych eksperymentalnych bez wprowadzenia korekty.

Na podstawie eksperymentalnej wartości pokrycia powierzchni oszacowano współczynnik przeniesienia monowarstw na elektrodę wykonaną ze złota. W tym celu dla danej próbki wyznaczono powierzchnię przypadającą na cząsteczkę na podstawie wyników QCM (A_{eks}) i porównano z powierzchnią przy ciśnieniu przenoszenia (A_i) określoną w oparciu o izotermę $\pi - A$. Wartości A_{eks} różnią się od A_i zależnie od składu monowarstw. Dla monowarstw DOPC i LG wartość A_{eks} (po przeniesieniu na stały nośnik) jest większa, natomiast dla pozostałych monowarstw mniejsza niż A_i (przed osadzeniem). Otrzymane wyniki można wytłumaczyć zmianą orientacji (kąta nachylenia) cząsteczek w procesie przenoszenia z granicy faz woda/powietrze na powierzchnię złota (Rysunek 42) z powodu słabszego oddziaływania z podłożem. Co ważne, pomimo luźnego upakowania filmów występujących w fazie ciekłej rozprężonej (LE) na subfazie wodnej, wybrane ciśnienie powierzchniowe przenoszenia jest wystarczająco wysokie, aby zapewnić dostateczną spójność monowarstw podczas ich osadzania. Skuteczność tego procesu potwierdzają wyniki AFM, CV oraz pomiary kąta zwilżania zaprezentowane w dalszej części pracy.

Ponadto uzyskane wartości TR , większe od jedności, wskazują, że więcej cząsteczek ulega przenoszeniu na podłoże stałe niż zajmuje obszar międzyfazowy woda/powietrze w przeliczeniu na jednostkę powierzchni. Ten proces jest szczególnie widoczny dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 ($TR = 1,8$). Chociaż zwiększone wartości współczynnika przeniesienia można by tłumaczyć obecnością dużej liczby agregatów lub nawet tworzeniem się wielowarstw, mikrografie AFM (Rozdział 14.1) nie potwierdzają ich istnienia. Dlatego też wartości TR większe niż 1 można przypisać efektowi kondensacji monowarstwy w trakcie lub po jej osadzeniu na nośniku stałym, z powodu różnej siły oddziaływań między cząsteczkami w zależności od rodzaju fazy nośnej [185].

Osadzanie bardziej zwartych monowarstw może wynikać z silniejszego oddziaływania cząsteczek z podłożem niż z wodą, jak również ze wzrostu oddziaływań przyciągających między cząsteczkami tworzącymi monowarstwy mieszane poprzez wiązania wodorowe oraz siły Lifshitz-van der Waalsa. W związku z tym, można stwierdzić, że rodzaj nośnika indukuje specyficzne oddziaływania, które determinują orientację i/lub nachylenie cząsteczek.

Jak pokazują Tabele 8 i 9 występują niewielkie różnice w wartościach TR uzyskanych przy osadzaniu na miedzi i na złocie. Wynikają one z faktu, że wartości TR wyznaczone metodą QCM nie obejmują strat powierzchni z powodu desorpcji cząsteczek, a jedynie opierają się na danych z izoterm $\pi - A$, czyli powierzchni przypadającej na cząsteczkę tuż przed rozpoczęciem procesu przenoszenia przy ciśnieniu powierzchniowym 10 mN m^{-1} , oraz powierzchni uzyskanej na podstawie osadzonej masy substancji przypadającej na jednostkę powierzchni nośnika (złota na podłożu kwarcowym). Wyjaśnia to różnice w wartościach TR wyznaczonych obiema metodami.

13.5. Jakość pokrycia powierzchni

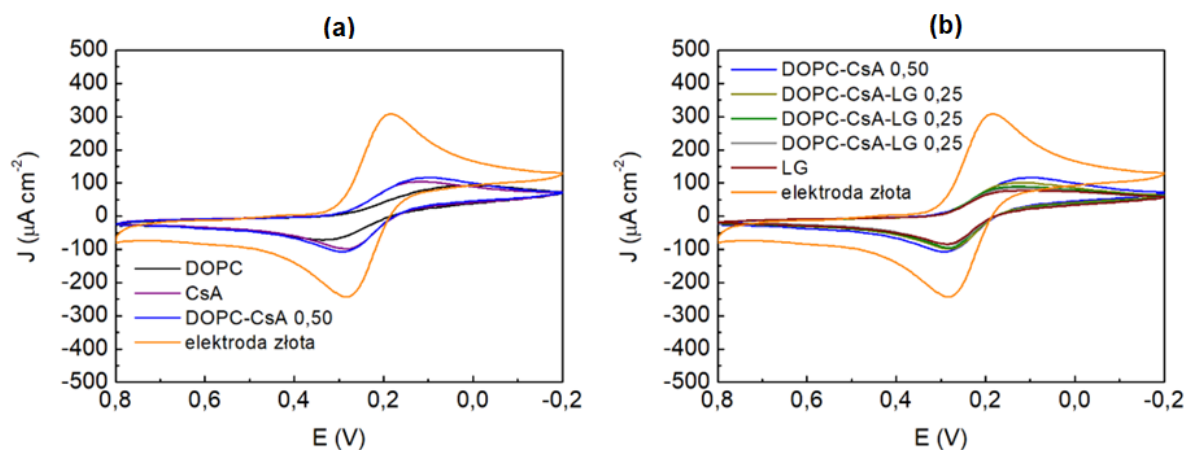
W celu określenia, czy w monowarstwach osadzonych na podłożu ze złota występują defekty przeprowadzono również eksperymenty z użyciem woltamperometrii cyklicznej. W Tabeli 10 zestawiono wartości gęstości prądu katodowego ($J_{p,c}$) i anodowego ($J_{p,a}$) oraz potencjału katodowego ($E_{p,c}$) i anodowego ($E_{p,a}$) wyznaczone dla procesu redukcji jonów $Fe(CN)_6^{3-}$ i utleniania $Fe(CN)_6^{4-}$. Odpowiedź elektrochemiczna niemodyfikowanej elektrody złotej charakteryzuje się wyraźnym pikiem woltamperometrycznym żelazocyjanku (Rysunek 43) świadcząc o swobodnym przepływie jonów pomiędzy roztworem a elektrodą pracującą. W przeciwieństwie do tego, elektrody złote

modyfikowane naniesionymi monowarstwami wykazują znaczne jego tłumienie, któremu towarzyszy przesunięcie piku katodowego, sugerując częściowe zablokowanie odpowiedzi elektrody metalowej przez film LB wskutek zmniejszenia dostępności powierzchni elektrody dla jonów [185].

Tabela 10 Parametry procesów katodowych (c) i anodowych (a) modyfikowanych elektrod złotych poprzez osadzenie badanych monowarstw.

Monowarstwa	$J_{p,c}$ ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$E_{p,c}$ (V)	$J_{p,a}$ ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$E_{p,a}$ (V)
Elektroda złota	292	0,181	290	0,282
DOPC	88	0,003	76	0,340
CsA	109	0,115	113	0,283
DOPC-CsA 0,50	115	0,099	129	0,290
DOPC-CsA-LG 0,25	100	0,145	118	0,282
DOPC-CsA-LG 0,50	88	0,130	108	0,283
DOPC-CsA-LG 0,75	85	0,125	92	0,282
LG	75	0,106	89	0,285

Monowarstwa DOPC osadzona na złocie (Rysunek 43a) powoduje duży spadek gęstości prądu katodowego ($J_{p,c}$), co dowodzi, że obecność cząsteczek fosfolipidu na powierzchni znacznie utrudnia dostęp $Fe(CN)_6^{3-}$ do elektrody. Ponadto pozycja piku katodowego jest przesunięta w kierunku potencjałów bardziej ujemnych, co dodatkowo potwierdza utrudniony dostęp jonów do powierzchni elektrody. Świadczy to o obecności niewielkich defektów w strukturze osadzonej monowarstwy, gdyż dotarcie jonów do powierzchni elektrody jest możliwe, ale bardziej skomplikowane niż w przypadku niemodyfikowanej powierzchni złota. Poza tym pik utleniania anionów $Fe(CN)_6^{4-}$ również potwierdza znaczne zmniejszenie gęstości prądu w porównaniu z elektrodą niemodyfikowaną. Opisane zjawiska sugerują, że powierzchnię elektrody pokrywa stosunkowo gęsto upakowana monowarstwa, która znacznie hamuje przenoszenie elektronów między układem redoks a elektrodą złotą. Osadzone monowarstwy CsA (Rysunek 43a) i LG (Rysunek 43b) również powodują zmniejszenie aktywności układu redoks. Zarówno wartości $J_{p,c}$, jak i $E_{p,c}$ wskazują na trudności w dotarciu jonów do powierzchni elektrody, przy czym spośród badanych monowarstw jednoskładnikowych, monowarstwa DOPC blokuje powierzchnię złota w największym stopniu [185].



Rysunek 43 Woltamperogramy cykliczne otrzymane dla elektrody złotej (a) niemodyfikowanej i (b) modyfikowanej badanymi monowarstwami.

Struktura chemiczna cząsteczek CsA, które mogą być preferencyjnie upakowane w pozycji pionowej w stosunku do podłoża, prawdopodobnie sprzyja dostępowi elektronów do powierzchni złota w porównaniu z bardziej zwartymi filmami DOPC lub LG. Ponadto wartość $E_{p,c}$ po osadzeniu na elektrodzie monowarstwy LG (Tabela 10) jest mniej przesunięta niż w przypadku monowarstwy DOPC. Wskazuje to, że wielkość porów (defektów) w monowarstwie LG lub niepokrytych obszarów elektrody jest większa. Dodatkowo częściowe zablokowanie powierzchni elektrody można wytłumaczyć ciekłym stanem fizycznym osadzonych monowarstw, w których cząsteczki nie są ściśle upakowane [231].

Ponadto spośród monowarstw mieszanych dwu- (DOPC-CsA 0,50) i trójskładnikowych (DOPC-CsA-LG 0,25, 0,50 i 0,75), najwyższe wartości gęstości prądu uzyskano po osadzeniu monowarstwy DOPC-CsA 0,50 (Rysunek 43b, Tabela 10). Wynik ten koreluje z istnieniem oddziaływań odpychających między cząsteczkami DOPC i CsA, których efektem są monowarstwy luźniej upakowane [231]. Obecność trzeciego składnika LG prowadzi do obniżenia $J_{p,c}$ i $J_{p,a}$ w porównaniu z monowarstwą DOPC-CsA. Chociaż spadek ten nie jest drastyczny, może sugerować mniejszą ilość defektów lub porów w osadzonych monowarstwach, co pozostaje w zgodzie z mikrografiami AFM omówionymi w dalszej części pracy.

Na podstawie przedstawionych wyników można wywnioskować, że monowarstwa DOPC jest najściślej upakowana w grupie monowarstw jednoskładnikowych. Daje to możliwość tworzenia powłoki biokompatybilnej do błon komórkowych, która jednocześnie będzie stanowić doskonałą bazę dla przenoszenia leku CsA oraz przeciwutleniacza LG oraz

ich kontrolowanego uwalniania. Natomiast, dla monowarstw trójskładnikowych DOPC-CsA-LG najsilniejsze blokowanie przepływu jonów pomiędzy roztworem a elektrodą pracującą (najmniejsze piki woltamperometryczne) uzyskano dla monowarstw o ułamkach molowych LG równych 0,50 i 0,75. Wyniki te ponownie potwierdzają wysoki potencjał aplikacyjny monowarstw trójskładnikowych w inżynierii tkankowej, jako kompatybilnych powłok zapewniających szerokie spektrum zastosowań, w tym stopniowego uwalniania leków i/lub substancji biologicznych z poszczególnych warstw oraz ochrony błon biologicznych (komórek) przed ich potencjalnym działaniem negatywnym.

14. Charakterystyka monowarstw (filmów) Langmuira-Blodgett jedno- i wieloskładnikowych (DOPC, CsA i/lub LG) otrzymanych na różnych nośnikach

14.1. Topografia i chropowatość powierzchni

Topografia powierzchni implantu (lub innego biomateriału) znacząco wpływa na wzrost i namnażanie się komórek [31, 41, 265]. Dlatego też modyfikując jedynie powierzchnię można zmienić właściwości fizyczne i chemiczne, jednocześnie poprawiając odpowiedź tkanek na implantację, przykładowo stentu [266]. Ponadto chropowatość powierzchni określa obszar kontaktu biomateriału z otaczającymi go tkankami, a także decyduje o ilości zaadsorbowanych białek [31, 267]. Z tego względu kolejnym celem cząstkowym badań wchodzących w skład doktoratu było określenie topografii i chropowatości powierzchni monowarstw jedno- (DOPC, CsA, LG), dwu- (DOPC-CsA 0,50) i trójskładnikowych (DOPC-CsA-LG 0,25; 0,50; 0,75) osadzonych na polimerze PET aktywowanym plazmą powietrzną. Do realizacji tego zadania wykorzystano mikroskop sił atomowych (AFM) pracujący w trybie kontaktu przerywanego (z ang. *tapping mode*). Dodatkowo, w celu zbadania, w jaki sposób właściwości powierzchniowe nośnika wpływają na charakterystykę osadzonych monowarstw, jako podłoże dla filmów zastosowano mikę oraz mikę pokrytą złotem [173, 185].

Rysunki 44-49 przedstawiają mikrografie AFM uzyskane dla skanowanej powierzchni PET ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$) z zaznaczonym obszarem powiększonym oraz wyodrębnioną strefę w powiększeniu (lewa kolumna), a także profile odpowiadające zaznaczonym liniom (prawa kolumna). Wartości średniej kwadratowej odchylenia profilu (z ang. *root mean square*, S_q) wyznaczono zgodnie z Równaniem 13.

Do analizy chropowatości powierzchni wybrano parametr S_q , ponieważ jest bardziej wrażliwy na nierówności powierzchni, takie jak wypukłości i zagłębienia [173], niż średnia arytmetyczna odchylenia profilu chropowatości (z ang. *roughness average*, S_a). S_a nie określa dokładnie topografii badanej powierzchni, ponieważ profile o różnych kształtach, ale o tej samej arytmetycznej wysokości wypukłości i zagłębień, cechuje taka sama wartość [268].

Chociaż obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera (Rysunek 30) nie ujawniły domen w morfologii monowarstw otrzymanych na granicy faz woda/powietrze, mikrografie AFM świadczą o ich obecności (Rysunki 44, 46 i 48). Jest to związane z różnicą w rozdzielczości. Rozdzielczość boczna mikroskopu kąta Brewstera wynosi $2 \mu\text{m}$, podczas gdy mikroskop sił atomowych dostarcza informacji w skali nanometrów (promień igły

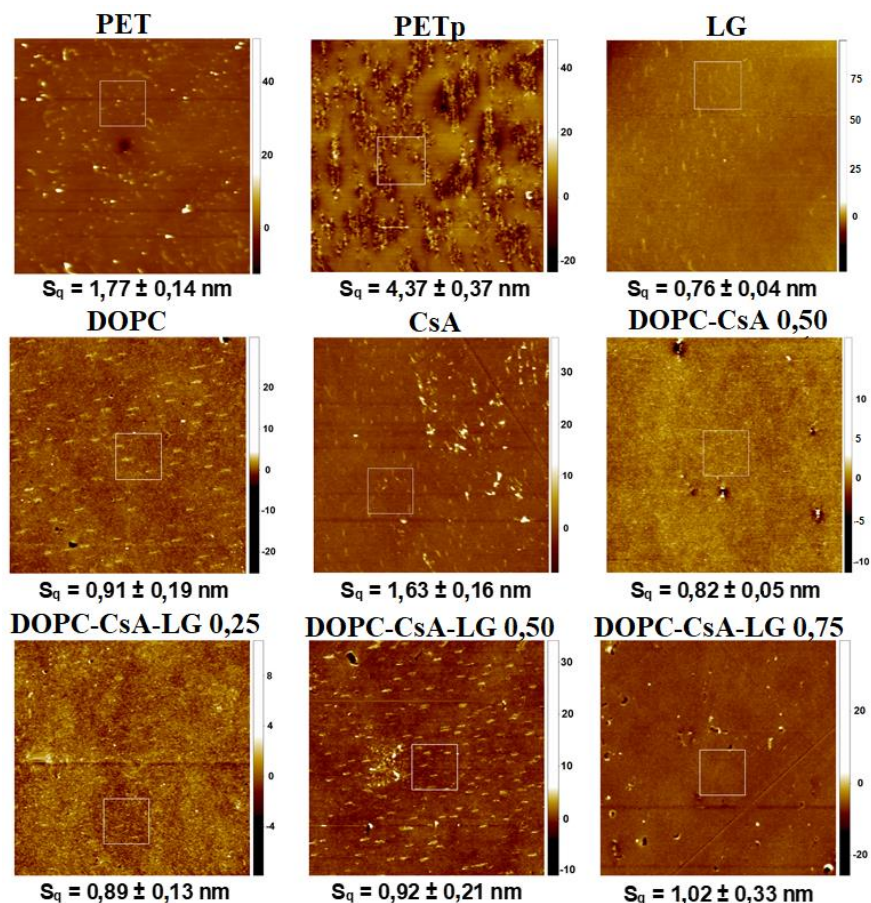
7 nm). Powstawanie takich struktur może wynikać także z reorganizacji cząsteczek, podczas ich osadzania z fazy ciekłej na podłoże stałe, i może być indukowane chropowatością powierzchni podłoża.

Parametr S_q dla podłoża PET niemodyfikowanego wynosi średnio 2 nm (Rysunek 44), co świadczy o tym, że powierzchnia jest gładka. Ta wartość pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi [269, 270]. Powierzchnia polimeru charakteryzuje się obecnością licznych okrągłych wypukłości o wysokości około 2,3 nm i średnicy prawie 380 nm (Rysunek 45).

Badania opisywane w dysertacji mają szeroki aspekt aplikacyjny. Jak już było wspomniane we wstępie PET znajduje zastosowanie głównie w chirurgii rekonstrukcyjnej. Okazało się jednak, że mimo niskiej chropowatości powierzchni PET, po wszczepieniu do organizmu zwierzęcego stentów naczyniowych pokrytych tym polimerem, wystąpiła niekorzystna odpowiedź immunologiczna z powodu namnażania się komórek mięśni gładkich [73]. Bazując na tych wynikach można wnioskować, że podobne mechanizmy mogą zachodzić w organizmie ludzkim. Istnieje zatem konieczność modyfikacji właściwości powierzchniowych PET. Jedną z metod jest aktywacja PET plazmą niskotemperaturową (PET_p), która ponad dwukrotnie zwiększa chropowatość jego powierzchni ($S_q \sim 4$ nm, Rysunek 44) w porównaniu z polimerem niemodyfikowanym. PET_p cechuje się licznymi nierównościami, ale jego znaczna część pozostaje stosunkowo gładka [173]. Podobne wyniki uzyskali inni naukowcy [59, 60, 271]. Działanie plazmy powietrznej powoduje powstanie na powierzchni PET nowych grup funkcyjnych zawierających tlen i azot ($-OH$, $-C-O$, $O=C-O-$, $-C=O$, $N-$, $-CO-N-$) [26]. Ponadto procesowi plazmowania towarzyszy rozrywanie łańcuchów polimeru i wprowadzanie atomów tlenu [60, 177, 268]. Dzięki nowo powstałym grupom funkcyjnym osadzenie monowarstw przebiega bardziej efektywnie. Świadczą o tym liczne badania powierzchni metodą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (z ang. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) [59, 60, 174-177].

Trudno jest określić chropowatość powierzchni PET świeżo aktywowanej plazmą, ze względu na jej kontakt z powietrzem w trakcie prowadzenia pomiarów AFM. Po umieszczeniu polimeru PET_p na powietrzu w najbardziej zewnętrznej warstwie powierzchniowej zachodzą procesy chemiczne, które mogą wywołać znaczące zmiany morfologiczne (Rysunek 44). Z uwagi na fakt, że wszystkie badane monowarstwy nanoszono na PET bezpośrednio po jego aktywacji plazmą, w ten sposób podłoże było

chronione przed działaniem powietrza i w konsekwencji także przed zmianami chropowatości zachodzącymi pod jego wpływem [173].



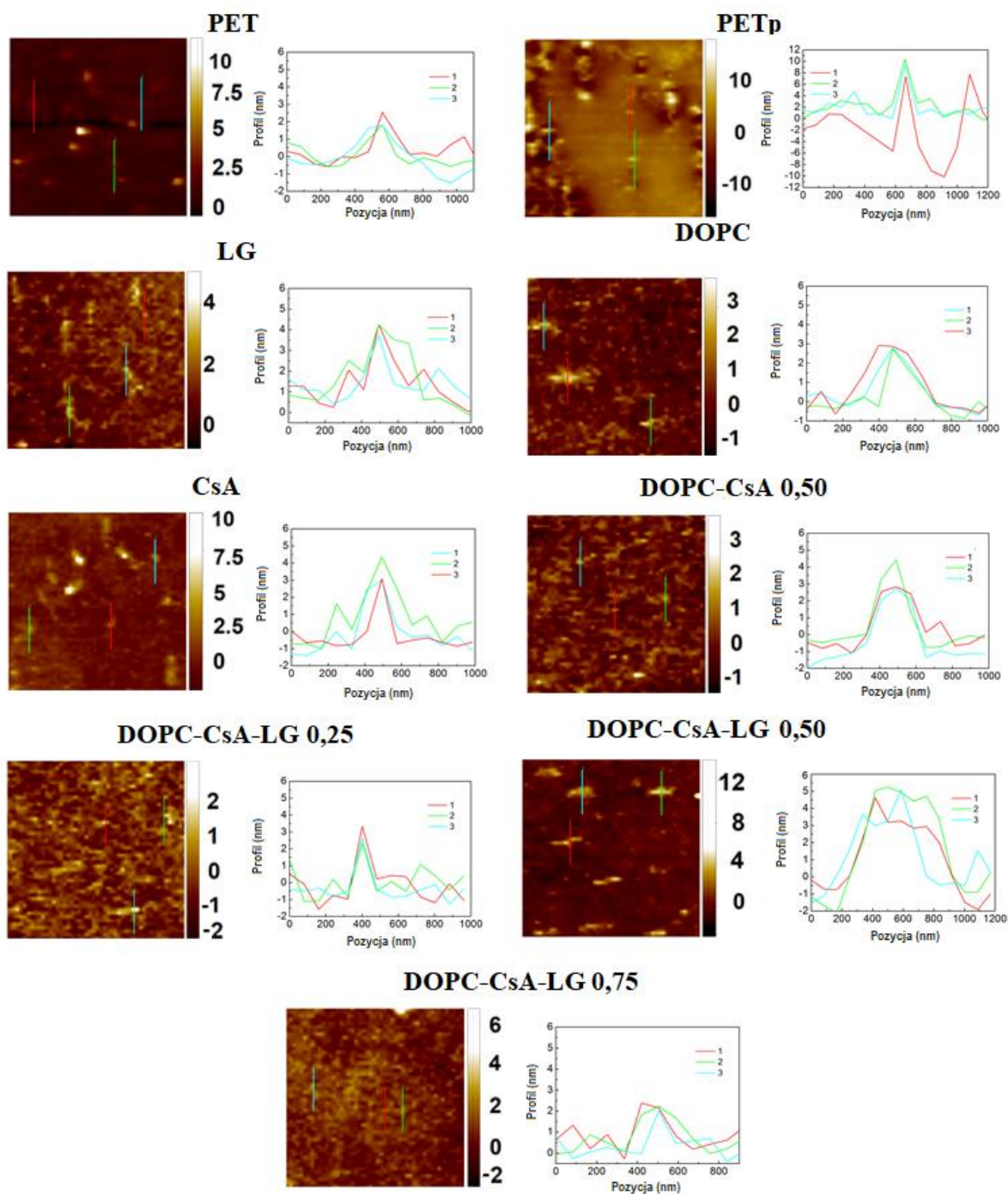
Rysunek 44 Mikrografie AFM otrzymane podczas skanowania obszarów $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz woda/powietrze. Skala z: nm.

Po nałożeniu monowarstw na aktywowane podłoże PET uzyskuje się wygładzenie powierzchni (Rysunek 44). Najmniejszą chropowatością spośród badanych ($S_q \sim 0,8 \text{ nm}$) cechuje się PET_p z osadzoną monowarstwą LG (PET_p/LG) (Rysunek 44). Mimo to, również na tych powierzchniach można zauważyć nierównomierne rozłożenie materiału osadzonej monowarstwy oraz nieco większy rozmiar domen w porównaniu z podłożem PET niemodyfikowanym. Widoczne są niewielkie i podłużne domeny o wysokości równej około 2,7 nm i szerokości prawie 170 nm, położone równoległe do kierunku wyciągania polimeru podczas procesu osadzania (Rysunek 45). Reorganizacja struktury wskazuje na słabe oddziaływania LG z podłożem. Mniejsze wymiary wypukłości powierzchni PET_p/LG w odniesieniu do PET niemodyfikowanego świadczą o efektywnym osadzeniu filmu LG na powierzchni polimeru. Wyniki potwierdzają zatem możliwość wprowadzenia na powierzchnię biomateriału związku przeciwutleniającego, który może pełnić funkcję

ochronną błon komórkowych i w efekcie komórek pacjenta przed uszkodzeniem w wyniku działania leku CsA.

Nieco większą chropowatość powierzchni uzyskuje się dla PET_p modyfikowanego monowarstwą DOPC ($S_q \sim 1$ nm, Rysunek 44). Badana powierzchnia cechuje się domenami o wymiarach: wysokość 3,0 nm, szerokość prawie 450 nm, ułożonymi prostopadle do kierunku wyciągania nośnika PET podczas procesu przenoszenia monowarstwy (Rysunek 45). Ta obserwacja ściśle koreluje ze współczynnikiem przeniesienia, którego wartość jest znacznie większa od jedności ($TR = 1,6$, Tabela 8). Oznacza to, że więcej cząsteczek DOPC jest przenoszonych na powierzchnię PET_p niż powinna zawierać monowarstwa. Taki wynik eksperymentu wskazuje na możliwość wprowadzenia innych związków do powłok w celu uzyskania pokrycia o ściśle zdefiniowanych właściwościach, jak również konieczność stosowania w procesie osadzania dokładnie określonych proporcji wszystkich składników [173].

Przeniesienie monowarstwy CsA także powoduje wygładzenie powierzchni PET_p (Rysunek 44), jednak w mniejszym stopniu niż DOPC. Powierzchnia charakteryzuje się obecnością domen o wysokości większej o około 2 nm w stosunku do PET, przy niezmięnionej średnicy [173]. Tworzenie domen może być spowodowane specyficznymi oddziaływaniami cząsteczek CsA z grupami funkcyjnymi aktywowanego podłoża PET ($-C = O$, $-C - N$), które determinują organizację cząsteczkową w obrębie monowarstwy. Wokół wypukłości formuje się upakowana monowarstwa CsA, której sztywność jest określana skondensowaniem cząsteczek cyklicznych. Świadczy o tym stosunkowo wysoka wartość modułu ściśliwości (66 mN m^{-1}) w porównaniu do DOPC (48 mN m^{-1}) i LG (30 mN m^{-1}) przy tym samym ciśnieniu przenoszenia równym 10 mN m^{-1} [231]. Poza tym, otrzymana wartość współczynnika przeniesienia ($0,9 \pm 0,1$) potwierdza powstanie monowarstwy CsA na podłożu polimerowym. Ponadto widoczne są wysokie wypukłości po prawej stronie mikrografii (Rysunek 45), które sugerują znaczne zagęszczenie cząsteczek CsA. Potwierdzeniem tego zjawiska jest wysokość (23 nm) i szerokość (500 nm) wypukłości w tym rejonie. Te znacznie większe wartości dowodzą jednoznacznie, że lokalnie osadza się większa liczba cząsteczek CsA [173].



Rysunek 45 Powiększone obszary skanowania monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz woda/powietrze, wraz z zaznaczonymi kolorem liniami, wzdłuż których wyznaczono profile wysokościowe (zamieszczone obok).

Chropowatość powierzchni $PET_p/DOPC-CsA$ 0,50 charakteryzuje się wartością pośrednią ($S_q \sim 0,8$ nm, Rysunek 44) między chropowatością monowarstw DOPC i CsA, co wynika z mniejszego skondensowania filmu w stosunku do CsA ($C_s^{-1} \approx 53$ mN m⁻¹, Tabela 6) i większego niż DOPC ($C_s^{-1} \approx 48$ mN m⁻¹) [231]. Osadzenie monowarstwy mieszanej powoduje większe wygładzenie powierzchni w porównaniu do PET_p/CsA [173].

Biorąc pod uwagę odpychający charakter oddziaływań pomiędzy cząsteczkami obu związków, wyrażony dodatnimi wartościami nadmiarowej energii mieszania Gibbsa (Rysunek 25) [231], można stwierdzić, że cząsteczki CsA są otoczone cząsteczkami DOPC i tworzą na powierzchni PET_p bardziej jednorodny film. Obecność cząsteczek DOPC i CsA w monowarstwie utrudnia tworzenie domen DOPC oraz agregację CsA (Rysunek 44). Jest to bardzo istotny proces pozwalający na utworzenie biokompatybilnego pokrycia dla powierzchni implantu, które zapewni równomierne uwalnianie i rozprowadzanie leku w organizmie pacjenta. Wyniki te potwierdzają nowatorski charakter przeprowadzonych badań i osiągnięcie jednego z zaplanowanych celów doktoratu.

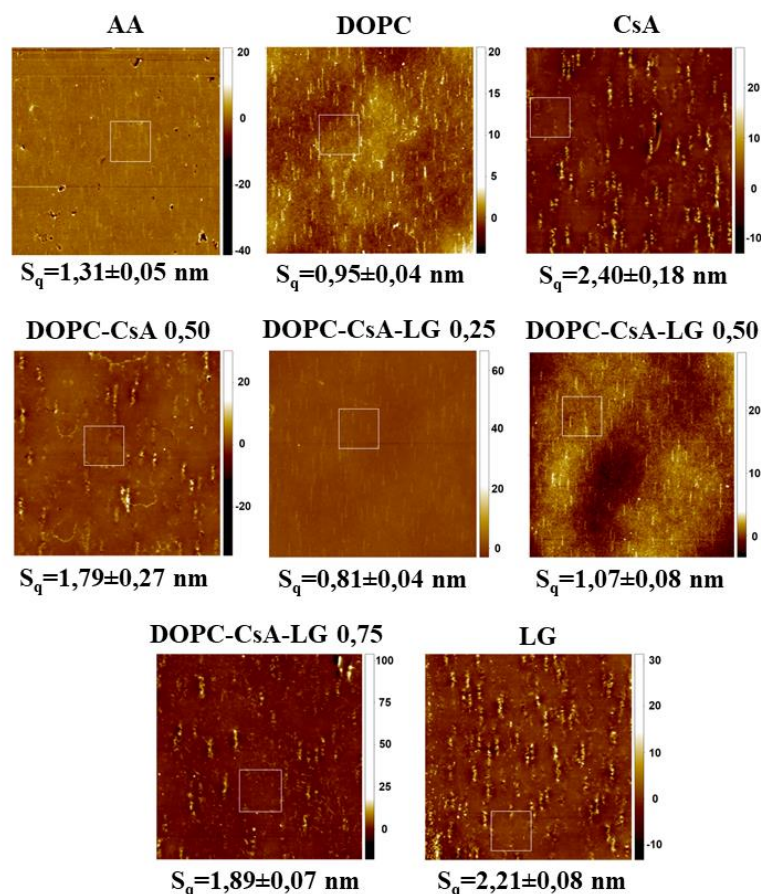
Na skanowanej powierzchni monowarstwy występują dwa rodzaje obszarów: jaśniejsze o ściślejszym upakowaniu i ciemniejsze o mniejszym skondensowaniu. Ponadto wypukłości na powierzchni są prawie całkowicie wyeliminowane (Rysunek 44). Efekt wygładzający może być determinowany przez preferencyjne osadzanie DOPC-CsA na powierzchni płaskiej, a nie na wypukłościach podłoża PET_p [173].

Obecność LG w monowarstwie nie wpływa znacząco na chropowatość powierzchni (Rysunek 44). W grupie monowarstw trójskładnikowych uzyskano porównywalne wartości parametru chropowatości powierzchni S_q . Fakt ten można przypisać występowaniu filmów w ciekłym stanie fizycznym, o czym świadczą wartości modułu ściśliwości (Tabela 6) [231], oraz zbliżonym wartościom współczynnika przeniesienia TR (Tabela 8) [173]. Po osadzeniu monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,25 topografia powierzchni (Rysunek 44) różni się w niewielkim stopniu od określonej dla filmu DOPC-CsA 0,50. Natomiast, niejednorodność rozkładu profilu wysokości (falistość) jest nieco większa, sięgając 1,5 nm dla DOPC-CsA-LG 0,25 oraz 1,2 nm dla DOPC-CsA 0,50 [173]. Znaczące zmiany w topografii obserwuje się po przeniesieniu filmu DOPC-CsA-LG 0,50 (Rysunek 44). Widoczne są charakterystyczne domeny o wysokości 4 nm i szerokości około 340 nm. Domeny te wykazują największe podobieństwo do domen obecnych po osadzeniu filmu DOPC. Co więcej, w środkowej części tej mikrografii, widoczne jest nagromadzenie cząsteczek. Podobne zjawisko występuje w przypadku monowarstwy CsA (Rysunek 44).

Po zwiększeniu ułamka molowego LG do 0,75 wszystkie domeny zanikają i tworzy się warstwa bardziej gładka (Rysunek 44). Można zauważyć także nieznaczne zróżnicowanie pokrycia powierzchni oraz występowanie obszarów niepokrytych w rezultacie reorganizacji cząsteczek monowarstwy na podłożu PET_p w trakcie lub po jej osadzeniu [173]. Dodatkowo cząsteczki LG mogą być nachylone względem podłoża stałego

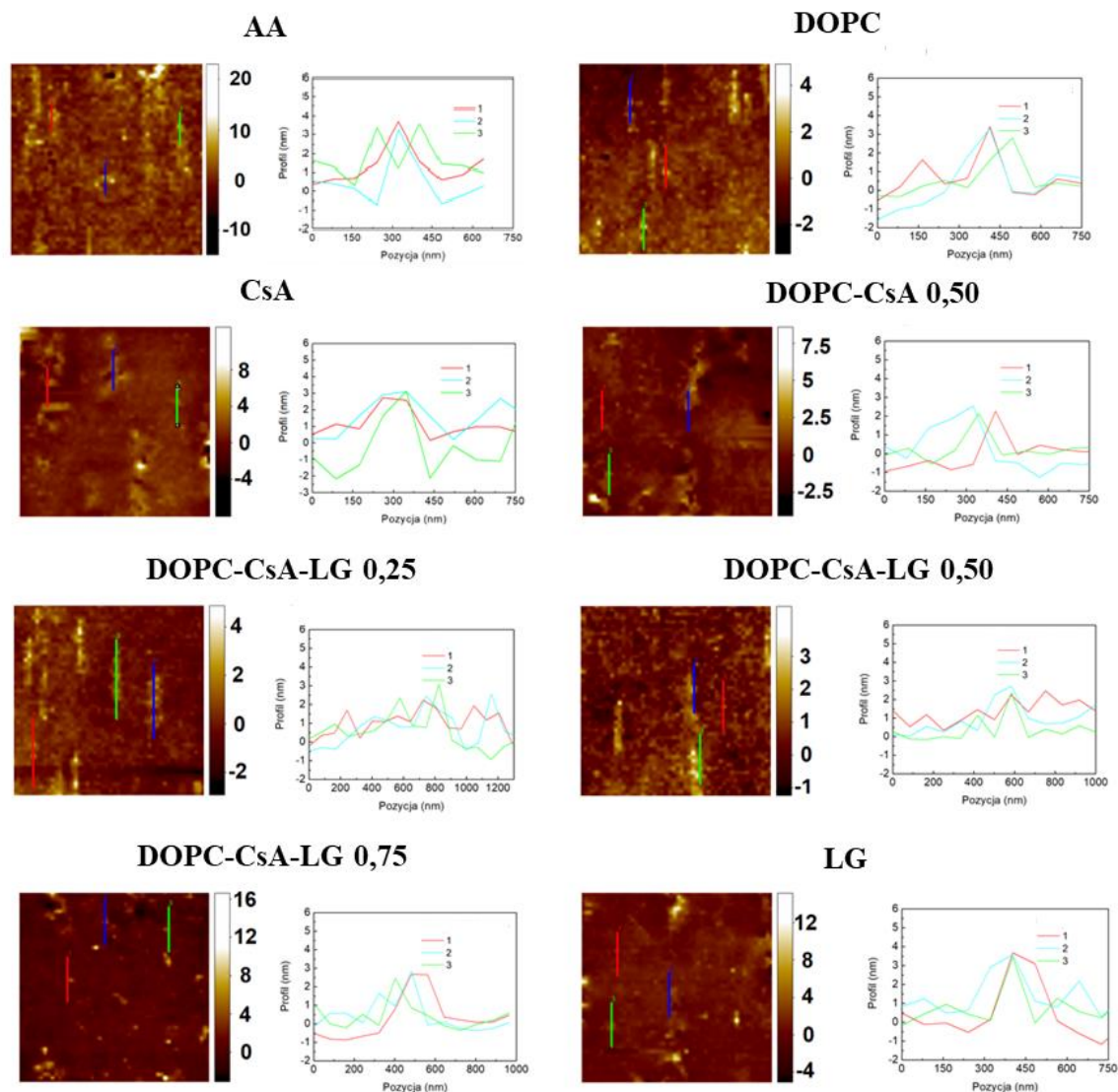
z powodu dużej dysproporcji między wielkością ugrupowania polarnego a łańcucha węglowodorowego. W związku z tym monowarstwa nie może być ściśle upakowana w taki sposób, że cząsteczki są ułożone prostopadle do powierzchni podłoża. Dlatego też łatwiej może dojść do fragmentacji takiej monowarstwy podczas analizy TOF-SIMS (Rozdział 14.2).

Wśród monowarstw jednoskładnikowych, przeniesienie fosfolipidu DOPC z subfazy AA na polimer PET_p prowadzi do największego wygładzenia powierzchni [186] (Rysunek 46), podobnie jak miało to miejsce w przypadku subfazy wodnej (Rysunek 44) [173]. Wskazuje to, że kwas octowy nie ma większego wpływu na chropowatość powierzchni PET modyfikowanej monowarstwą fosfolipidu. Jednakże, są widoczne pionowe domeny ułożone równoległe do kierunku wyciągania PET_p. Ich wymiary osiągają wysokość ok. 3 nm i szerokość 247 nm (Rysunek 47). Obecność domen może być spowodowana przeniesieniem większej ilości cząsteczek niż ta odpowiadająca monowarstwie, o czym świadczy większa od jedności wartość współczynnika TR ($TR = 1,2$). Jest to prawdopodobnie związane ze zmianami oddziaływań między cząsteczkami na granicy faz AA/powietrze oraz po przeniesieniu filmu na stały nośnik polimerowy. Powyższe oddziaływania są kluczowe dla osiągnięcia cząstkowego celu doktoratu, ponieważ determinują upakowanie i organizację monowarstwy na polimerze PET, a to z kolei prowadzi do otrzymania optymalnej powierzchni biokompatybilnej.



Rysunek 46 Mikrografie AFM otrzymane podczas skanowania obszarów $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz AA/powietrze. Skala z: nm.

Bardziej niejednorodne i chropowate powierzchnie uzyskano po osadzeniu monowarstw CsA i LG (Rysunek 46) w odniesieniu do PET_p/DOPC [186]. Wysokość wypukłości, które charakteryzują monowarstwę CsA mieści się w przedziale od ok. 2,5 nm do nawet 5 nm (Rysunek 47), przy czym ich szerokość jest zbliżona do szerokości wzniesień obecnych na powierzchni PET niemodyfikowanej (380 nm) (Rysunek 45) [173]. Sugeruje to, że cząsteczki CsA są bardziej upakowane wokół wypukłości, podobnie jak obserwowano dla monowarstwy CsA przeniesionej z subfazy wodnej [173]. Wynika to z największej wartości modułu ściśliwości CsA wśród monowarstw pojedynczych składników przy ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m^{-1} ($C_s^{-1} = 51,1 \text{ mN m}^{-1}$, Tabela 7 [230]). Wartość TR jest równa 1,0 (Tabela 8), co potwierdza ilościowe przeniesienie monowarstwy na podłoże PET_p [173].



Rysunek 47 Powiększone obszary skanowania monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz AA/powietrze, wraz z zaznaczonymi kolorem liniami, wzdłuż których wyznaczono profile wysokościowe (zamieszczone obok).

Po nałożeniu monowarstwy LG uzyskano najwyższą wartość parametru S_q ($2,21 \pm 0,08$ nm) w grupie monowarstw jednoskładnikowych (Rysunek 46). Odwrotnie, niż w przypadku chropowatości powierzchni otrzymanej po przeniesieniu monowarstwy LG z granicy faz woda/powietrze (Rysunek 44), która była najmniejsza ($0,76 \pm 0,04$ nm) [173], pomimo większego upakowania cząsteczek ją tworzących [230]. Można zatem stwierdzić, że cząsteczki kwasu octowego wpływają na nachylenie i/lub organizację cząsteczek tworzących monowarstwę. Ponadto monowarstwa LG nie jest ściśle upakowana z powodu struktury związku.

Po osadzeniu monowarstwy DOPC-CsA na podłożu polimerowym uzyskuje się gładszą powierzchnię niż PET_p/AA/CsA ($S_q = 1,79$ nm, Rysunek 46), ale bardziej chropowatą niż PET_p/AA/DOPC. Pośrednia wartość chropowatości może wynikać z pośredniego stopnia upakowania cząsteczek monowarstwy mieszanej w porównaniu z monowarstwami pojedynczych składników [230]. Wysokość wypukłości obecnych na powierzchni PET_p/AA/DOPC-CsA 0,50 sięga 2,6 nm (Rysunek 47), i jest porównywalna do wysokości uzyskanych dla powierzchni monowarstw DOPC i CsA. Ponadto wartość TR jest zbliżona do jedności ($TR = 1,1$) [186].

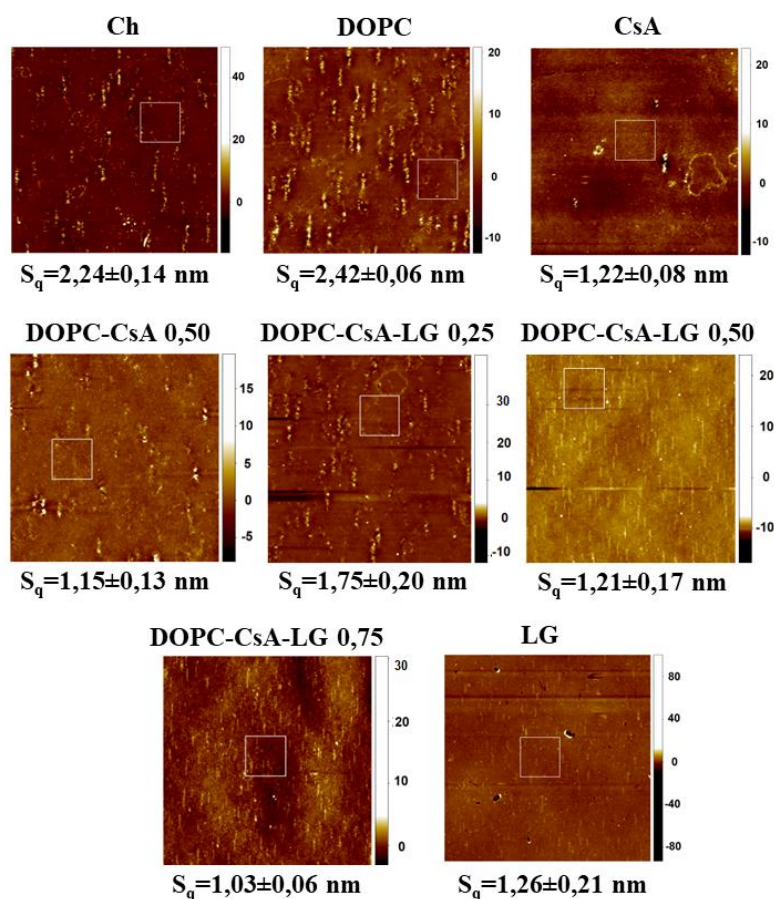
Osadzenie monowarstw DOPC-CsA-LG 0,25 i 0,50 skutkuje większym wygładzeniem powierzchni w porównaniu do DOPC-CsA (Rysunek 46) [186]. Zmiany wielkości wypukłości w zależności od ilości LG w monowarstwach trójskładnikowych są przyczyną zmian parametru chropowatości powierzchni. Ze wzrostem ułamka molowego LG z $\chi_{LG} = 0,25$ do $\chi_{LG} = 0,75$ wartość parametru S_q rośnie. Co zaskakujące, jeszcze wyższy ułamek molowy LG ($\chi_{LG} = 0,75$) nie powoduje największego wygładzenia powierzchni. Chropowatość powierzchni PET_p/AA/DOPC-CsA-LG 0,75 jest podobna do PET_p/AA/DOPC-CsA 0,50 (Rysunek 46). Przyczyną może być mniejsze upakowanie cząsteczek tworzących monowarstwę na granicy AA/powietrze ($C_s^{-1} = 41,7$ mN m⁻¹) niż dla monowarstwy DOPC-CsA ($C_s^{-1} = 44$ mN m⁻¹, Tabela 7, Rysunek 20). Ponadto oddziaływania przyciągające między cząsteczkami monowarstwy DOPC-CsA-LG są słabsze przy $\chi_{LG} = 0,75$ niż przy 0,25 i 0,50 (Rysunek 28) [230].

Obecność filmu chitozanu na powierzchni PET aktywowanej plazmą powietrzną mogą potwierdzać niższe wartości parametru S_q ($S_q = 2,24$ nm, Rysunek 48) [186]. Proces adhezji jest możliwy dzięki oddziaływaniom między grupami funkcyjnymi na aktywowanej powierzchni polimeru oraz hydroksylowymi i aminowymi chitozanu. Na mikrografiach AFM widoczne są lokalne agregaty, co jest cechą charakterystyczną wielu polisacharydów [270, 272]. Dodatkowo, stopień deacetylacji (DD) chitozanu odgrywa kluczową rolę w chropowatości powierzchni, biodegradowalności oraz sztywności powłok biomateriałów [272].

Chitozan stosowany w badaniach objętych doktoratem posiada wartość DD równą 82% [273]. Dlatego wyróżnia się w jego strukturze zarówno grupy acetylowane, jak i deacetylowane, przy czym liczniejszą grupę stanowią grupy deacetylowane. Polarne grupy funkcyjne podłoża zawierające tlen mogą tworzyć wiązania estrowe z grupami hydroksylowymi chitozanu. Ten proces zachodzi znacznie łatwiej w środowisku o pH kwasowym. Dodatkowo, możliwe jest utworzenie międzycząsteczkowych wiązań

wodorowych między grupami funkcyjnymi obecnymi na powierzchni PET_p i grupami –OH oraz –NH₂ chitozanu [176]. W związku z tym warstwa chitozanu może być mocno związana z polimerem aktywowanym. Silna adhezja jest niezbędna w celu osiągnięcia celu dysertacji, czyli uzyskania powierzchni kompatybilnej, która jednocześnie mogłaby pełnić rolę systemu kontrolowanego uwalniania leku.

Osadzanie monowarstw Langmuira z subfazy Ch prowadzi do uzyskania gładziej powierzchni nośnika PET_p (parametr S_q , Rysunki 44 i 48). Niemniej jednak niektóre domeny są widoczne na obrazach AFM, chociaż podobnie jak w przypadku filmów otrzymanych na subfazie wodnej mikroskopia kąta Brewstera nie ujawniła ich w mikroskali (Rysunek 30) [230]. Dowodzi to, że cząsteczki tworzące monowarstwy ulegają reorganizacji podczas procesu przenoszenia z fazy ciekłej (Ch) na powierzchnię PET modyfikowaną plazmą (nośnik stały).



Rysunek 48 Mikrografie AFM otrzymane podczas skanowania obszarów $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ monowarstw przeniesionych PET_p z granicy faz Ch/powietrze.

Chropowatość powierzchni po przeniesieniu monowarstwy DOPC z granicy faz Ch/powietrze na podłoże PET_p jest większa (Rysunek 48) niż w przypadku przeniesienia

z granicy faz AA/powietrze (Rysunek 46). Można więc stwierdzić, że obecność cząsteczek Ch wpływa na organizację monowarstwy DOPC poprzez wzajemne oddziaływania [186].

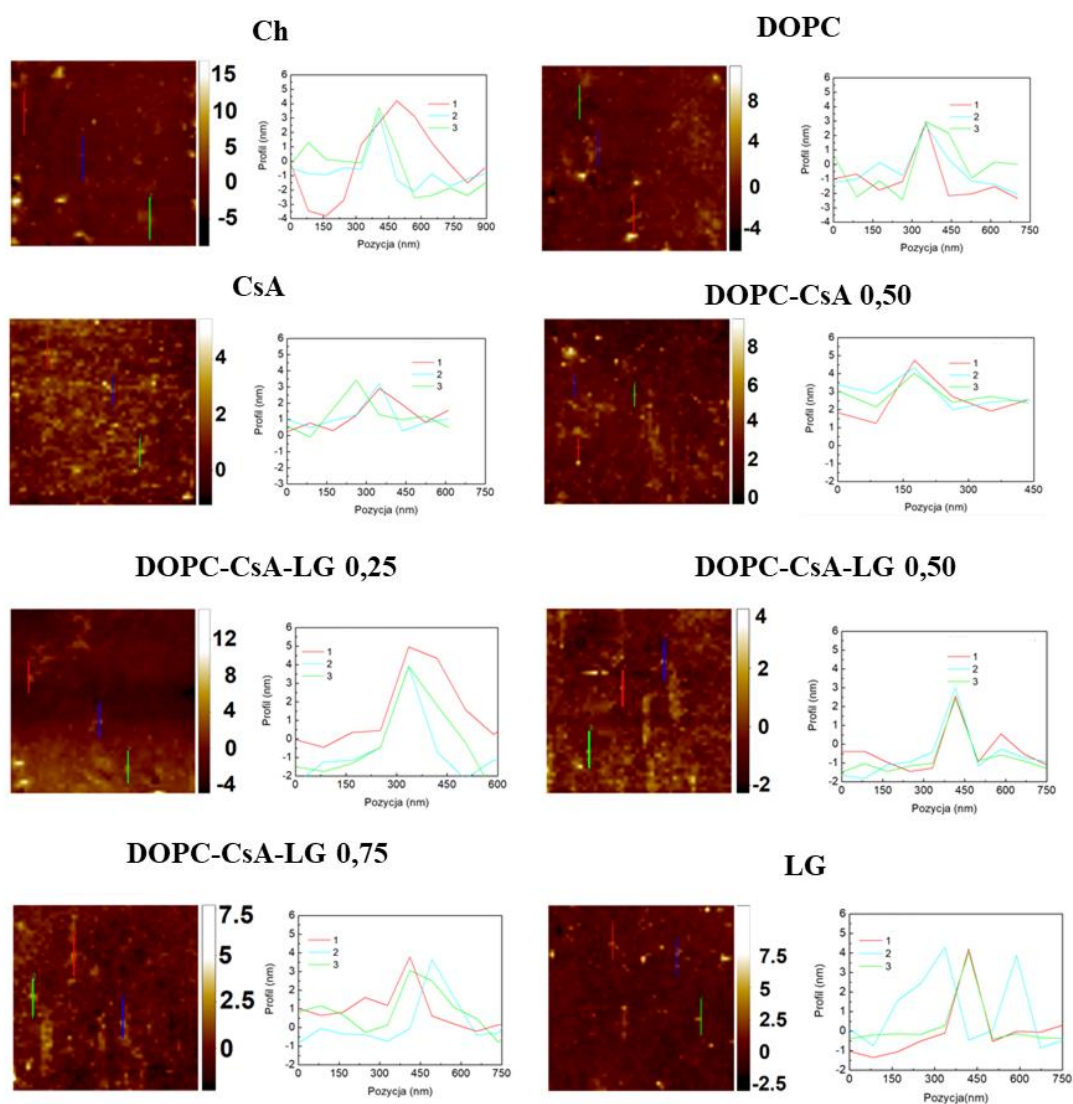
Największe wygładzenie uzyskuje się dla podłoża PET_p/Ch z osadzoną monowarstwą CsA (Rysunek 48). Widoczne na powierzchni wypukłości mają wysokość 2,3 nm i szerokość ok. 300 nm. Wielkości te są bardzo podobne do uzyskanych dla PET niemodyfikowanego (Rysunek 45) [173]. Może to być wynikiem niemalże największego upakowania cząsteczek tworzących monowarstwę CsA otrzymaną na granicy faz Ch/powietrze spośród wszystkich badanych monowarstw Langmuira (Tabela 7, Rysunek 20) [230]. Wartość *TR* jest bliska 1,0, co wskazuje na osadzanie się warstwy monomolekularnej (Tabela 8). Uzyskany wynik ponownie potwierdza możliwość zastosowania chitozanu, jako potencjalnego nośnika leku CsA.

Po osadzeniu monowarstwy LG z subfazy Ch chropowatość powierzchni PET_p/Ch/LG wynosi $S_q = 1,26$ nm (Rysunek 48). Wypukłości o wysokości około 4 nm widoczne na mikrografii (Rysunek 49) można powiązać ze zmianami orientacji LG wywołanymi oddziaływaniami LG z chitozaniem poprzez mostki wodorowe oraz siły LW, a także luźniejszym upakowaniem cząsteczek tworzących monowarstwę [230].

Obecność filmu Ch skutkuje dwukrotnie niższą wartością parametru S_q wyznaczonego dla podłoża PET_p/Ch/DOPC-CsA 0,50 (Rysunek 48), które charakteryzuje się wypukłościami o mniejszych wymiarach (wysokość ~2,1 nm, Rysunek 49) niż dla PET_p/AA/DOPC. Potwierdza to, że chitozan wpływa na oddziaływania między cząsteczkami DOPC i CsA. Ponadto Ch może wypełniać wolne luki powstałe w wyniku strukturalnego niedopasowania cząsteczek, co doskonale wpisuje się w osiągnięcie jednego z zakładanych celów dysertacji, jakim jest uzyskanie pokrycia o ściśle określonym składzie, zapewniającym naturalne połączenie z błonami komórkowymi oraz dostarczenie CsA w pożądane miejsce.

Osadzanie monowarstw DOPC-CsA-LG zmienia chropowatość powierzchni podłoża PET_p/Ch (Rysunek 48). Jej wartość dla powierzchni PET_p/Ch/DOPC-CsA-LG 0,25 wzrasta w stosunku do PET_p/Ch/DOPC-CsA, pomimo większego upakowania cząsteczek (Tabela 7, Rysunek 20) [230]. Jest to widoczne w opisie wypukłości o wysokości 4,4 nm i szerokości 255 nm. Powodem tego jest specyficzna reorganizacja cząsteczek tworzących monowarstwę po ich przeniesieniu na podłoże PET_p z granicy faz Ch/powietrze [186]. Wygładzenie powierzchni uzyskuje się po osadzeniu monowarstw DOPC-CsA-LG 0,50 i 0,75 z subfazy Ch (Rysunek 48). Jest to związane z silnymi oddziaływaniami

przyciągającymi między cząsteczkami DOPC, CsA i LG oraz ich większym upakowaniem na granicy faz Ch/powietrze w stosunku do monowarstwy DOPC-CsA 0,50 [230]. Wielkość wypukłości powierzchni PET_p/Ch/DOPC-CsA-LG 0,50 i PET_p/Ch/DOPC-CsA-LG 0,75 jest podobna. Wysokość i szerokość wynoszą odpowiednio 3,4 nm i 166 nm oraz 2,9 nm i 220 nm przy $\chi_{LG} = 0,50$ i 0,75.

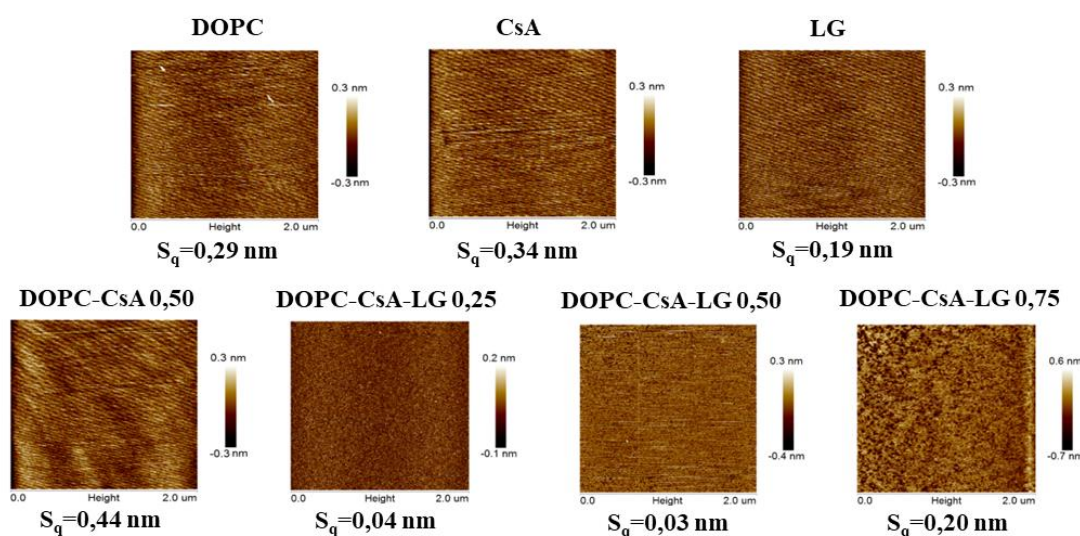


Rysunek 49 Powiększone obszary skanowania z zaznaczonymi miejscami wyznaczania profili monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz Ch/powietrze, wraz z zaznaczonymi kolorem liniami, wzdłuż których wyznaczono profile wysokościowe (zamieszczone obok).

W kolejnym etapie badań wchodzących w skład dysertacji, w celu określenia wpływu rodzaju podłoża na chropowatość filmów, badane monowarstwy Langmuira przeniesiono na mikę ($S_q = 0,06$ nm) oraz mikę pokrytą złotem ($S_q = 1$ nm). Wybór miki

był uwarunkowany faktem, że jest powszechnie stosowanym nośnikiem w obrazowaniu AFM. Ponadto ze względu na swoją atomowo gładką powierzchnię i hydrofilowy charakter jest doskonałym materiałem do przenoszenia filmów LB, który zapewnia, że struktura filmu otrzymanego na granicy faz woda/powietrze pozostaje praktycznie nienaruszona pomimo zastosowanej procedury transferu [185].

Rysunek 50 przedstawia mikrografie AFM reprezentatywne dla badanych monowarstw przeniesionych z granicy faz woda/powietrze na mikę przy ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m^{-1} . Związki DOPC, CsA i LG tworzą na micy jednorodne filmy, co potwierdzają niskie wartości uzyskane dla parametru chropowatości S_q , odpowiednio 0,29, 0,34 i 0,19 nm. Monowarstwa DOPC-CsA 0,50 wykazuje obecność pewnych obszarów o zróżnicowanej wysokości, co można przypisać odmiennemu nachyleniu cząsteczek względem podłoża, dając wartość $S_q = 0,44 \text{ nm}$. Wynik ten może potwierdzać istnienie oddziaływań odpychających (częściowej mieszalności) między cząsteczkami DOPC i CsA, co wcześniej obserwowano w filmach Langmuira [231].

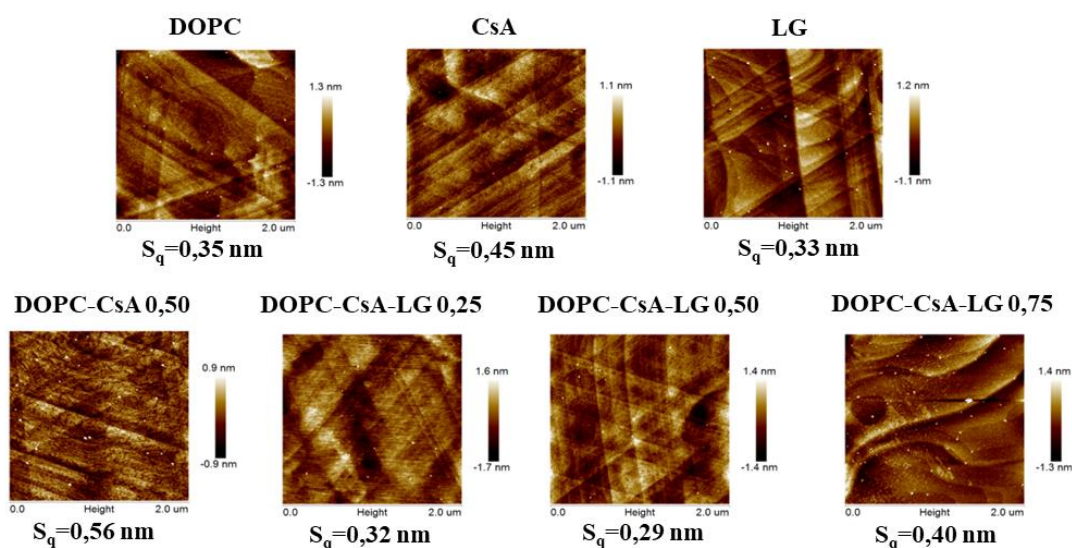


Rysunek 50 Mikrografie AFM otrzymane podczas skanowania obszarów $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ monowarstw przeniesionych na mikę z granicy faz woda/powietrze.

Dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,25 otrzymuje się film jednorodny ($S_q = 0,04 \text{ nm}$). Jest to prawdopodobnie związane z powinowactwem cząsteczek LG zarówno do DOPC, jak i CsA [185]. LG zmienia charakter oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tworzącymi monowarstwę (Rysunek 25) sprzyjając ich wzajemnej mieszalności poprzez wiązania wodorowe i siły Lifshitz-van der Waalsa [231]. Wraz ze wzrostem ilości LG (DOPC-CsA-LG 0,50), uzyskuje się monowarstwę bardziej homogeniczną ($S_q = 0,03 \text{ nm}$), co wskazuje na lepszą mieszalność składników [231].

Niemniej jednak film DOPC-CsA-LG 0,75 wykazuje większą niejednorodność z wyraźniej zaznaczonymi domenami, $S_q = 0,20$ nm. Analogiczne wyniki zostały uzyskane po przeniesieniu tej monowarstwy na PET_p (Rysunek 44). Prawdopodobnie przy takim stosunku molowym składników monowarstwy nie jest zapewniony odpowiedni układ strukturalny umożliwiający dopasowanie przestrzenne. Dlatego różna siła oddziaływań DOPC-LG i CsA-LG może prowadzić do powstawania domen [231].

Rysunek 51 przedstawia mikrografie filmów osadzonych na micy z naniesioną warstwą złota. Topografia monowarstw LB przeniesionych na taki nośnik jest podobna do obserwowanej dla monowarstw na micy (Rysunek 50). Jednak można zauważyć cechy charakterystyczne jedynie dla złota, takie jak uskoki (z ang. *steps*) i tarasy (z ang. *terraces*) [185]. Ponadto chropowatość filmów osadzonych na micy pokrytej złotem jest nieco większa niż w przypadku monowarstw LB przeniesionych na mikę, ponieważ wpływa na to struktura złota, która jest widoczna nawet w obecności filmów LB. Otrzymane wartości parametru chropowatości S_q dla monowarstw DOPC, CsA i LG to 0,35; 0,45; 0,33 nm.



Rysunek 51 Mikrografie AFM otrzymane podczas skanowania obszarów $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ monowarstw przeniesionych na mikę pokrytą warstwą złota z granicy fazy woda/powietrze.

Z kolei dla filmów mieszanych $S_q = 0,56$; 0,32; 0,29 i 0,40 nm, odpowiednio dla DOPC-CsA 0,50 oraz DOPC-CsA-LG 0,25, 0,50 i 0,75. Wyniki te pokazują, że właściwości fizykochemiczne powierzchni podłoża mogą odgrywać ważną rolę w procesie tworzenia filmu monomolekularnego i jego właściwościach. Inny nośnik może powodować odmienne upakowanie osadzonych cząsteczek. W związku z tym, można stwierdzić, że rodzaj podłoża ma bardzo istotny wpływ na chropowatość osadzanego filmu [173, 185, 261]. Co ciekawe,

dla obu omawianych rodzajów podłoża monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50 jest najbardziej homogeniczna [185].

W badaniach prowadzonych w ramach doktoratu wykazano, że monowarstwy osadzone na różnych nośnikach stałych cechują się małą chropowatością, co otwiera drogę do ich zastosowania w pokrywaniu powierzchni implantów. Największy potencjał aplikacyjny wykazują monowarstwy DOPC-CsA-LG, które charakteryzują się najmniejszą chropowatością, co jest skorelowane z ich największym upakowaniem i uporządkowaniem. Ponadto obecność trzech lub czterech składników w monowarstwie o odpowiedniej biokompatybilności zapewnia naturalne połączenie powierzchni biomateriału z żywymi tkankami (DOPC), dostarczenie leku immunosupresyjnego bezpośrednio w implantowane miejsce (Ch, CsA) oraz ochronę błon komórkowych przed ich zniszczeniem (LG) w wyniku działania wolnych rodników powstałych w efekcie zastosowania cyklosporyny. W tym aspekcie główne cele doktoratu zostały osiągnięte.

14.2. Organizacja cząsteczkowa

Kolejnym celem cząstkowym rozprawy doktorskiej było określenie wzajemnego ułożenia cząsteczek tworzących monowarstwę oraz lepsze zrozumienie oddziaływań zachodzących między nimi. W tym celu zastosowano spektrometrię mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu. Technika ta pozwala na określenie struktury chemicznej i szlaków fragmentacji cząsteczek [274] DOPC, CsA i LG na podstawie wartości stosunku m/z powstałych podczas jonizacji fragmentów cząsteczek. W związku z tym, że w trakcie jonizacji z użyciem źródła bizmutowego w komorze spektrometru TOF-SIMS powstają jedynie fragmenty masowe jednoładunkowe (dodatnie oraz ujemne), wartość m/z odpowiada w praktyce masie powstałego jonu. Fragmenty analizowanych cząsteczek wraz z przypisanymi wartościami m/z zostały opisane w poprzednich pracach zespołu [195, 196, 227].

Najbardziej charakterystyczne fragmenty zidentyfikowane w widmach masowych TOF-SIMS dla mierzonych próbek zestawiono w Tabeli 11. Rysunek 52 przedstawia średnie wartości intensywności względnej (I_w) z odchyleniami standardowymi reprezentującymi błąd eksperymentalny dla monowarstw DOPC, CsA, LG, DOPC-CsA ($\chi_{CsA} = 0,50$) i DOPC-CsA-LG ($\chi_{LG} = 0,25, 0,50$ i $0,75$) o różnych proporcjach molowych.

Podstawowym jonem identyfikującym dany składnik monowarstwy oraz służącym jako wskaźnik jej uporządkowania, ściśle związany z ułożeniem i/lub nachyleniem cząsteczek, jest jon cząsteczkowy. Definiuje się go jako naładowaną cząsteczkę, która powstaje w wyniku jonizacji poprzez oddanie jednego elektronu (jon cząsteczkowy dodatni) lub znacznie rzadziej poprzez pobranie jednego elektronu (jon cząsteczkowy ujemny). Jego masa jest równa masie cząsteczkowej badanego związku. Natomiast jon pseudocząsteczkowy powstaje poprzez usunięcie dwóch atomów tlenu lub wodoru z jonu cząsteczkowego, a także przyłączenie metalu obcego z otoczenia.

Analiza widm TOF-SIMS nie wykazała obecności jonów cząsteczkowych w monowarstwach DOPC i LG [173, 186]. Brak tych jonów może wynikać z kilku przyczyn. Pierwszym aspektem wartym rozważenia jest możliwe nieuporządkowanie cząsteczek monowarstw związane z ich występowaniem na granicy międzyfazowej w stanie ciekłym rozprężonym (faza LE, Tabele 6 i 7). Konfiguracja łańcuchów w strukturze cząsteczek fosfolipidu DOPC utrudnia tworzenie ściśle upakowanych i wysoce uporządkowanych monowarstw, co sprzyja fragmentacji cząsteczek pod wpływem strumienia jonów Bi^+ . Jak wykazali inni naukowcy obecność wiązań nasyconych w łańcuchach węglowodorowych, na przykład fosfolipidu DPPC, pozwala na większe spionizowanie cząsteczek i utworzenie monowarstw bardziej uporządkowanych [195]. W wyniku oddziaływania z wiązką jonów pierwotnych (Bi^+ lub Bi^{3+}) cząsteczki w takiej warstwie podlegają znacznie mniejszej fragmentacji, co sprzyja wysokiej wydajności jonu cząsteczkowego [195].

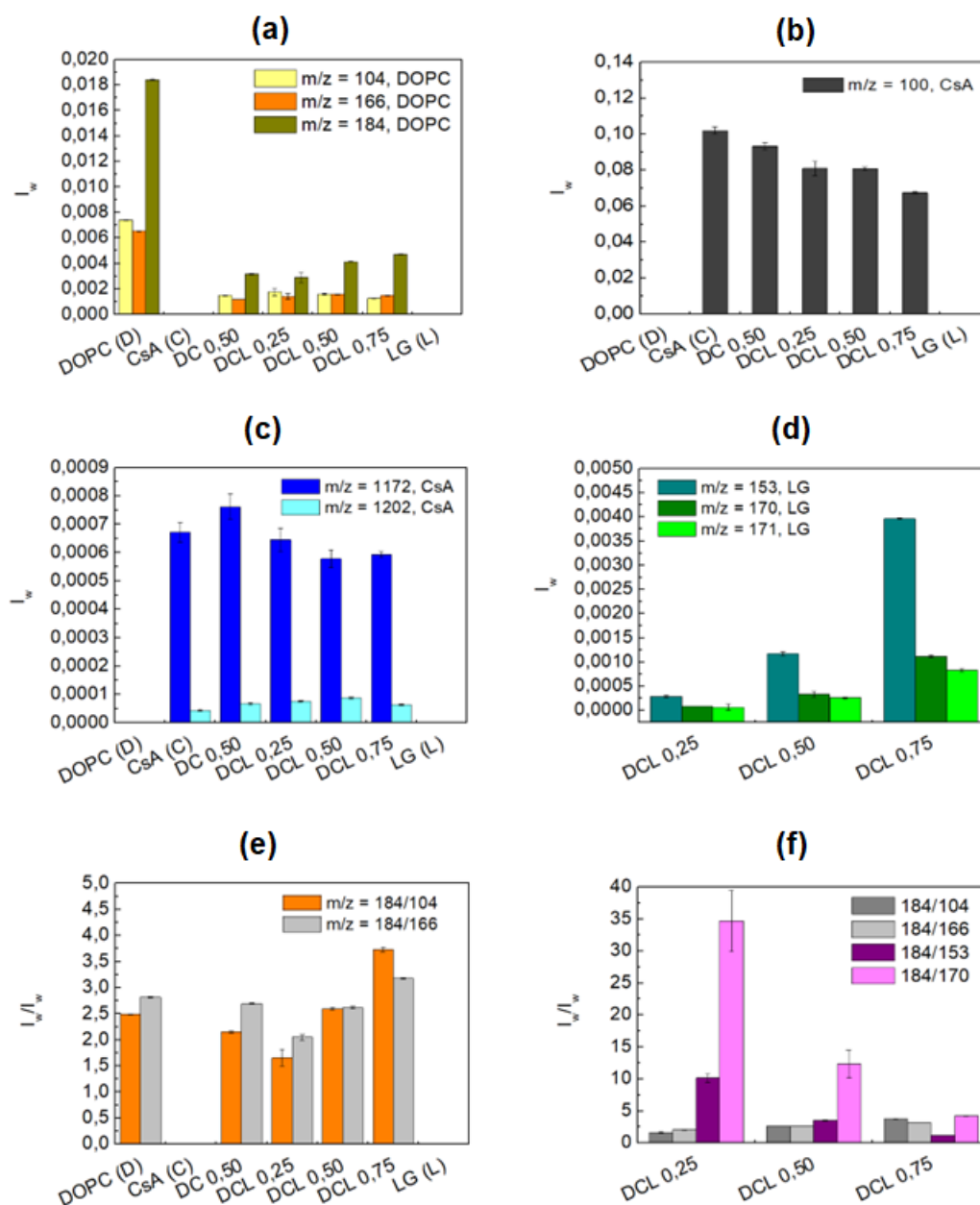
Można więc przypuszczać, że po aktywacji podłoża PET plazmą powietrzną, pomimo że grupy fosfocholinowe oddziałują z podłożem polimerowym, to struktura łańcuchów węglowodorowych blokuje utworzenie ściśle upakowanej monowarstwy DOPC [173], takiej jaką uzyskano dla DPPC.

Tabela 11 Najbardziej charakterystyczne dodatnie fragmenty DOPC, LG i CsA w widmach masowych TOF-SIMS.

Wzór identyfikowanego jonu	<i>m/z</i>	Związek
(C ₅ H ₁₄ NO) ⁺	104	DOPC
(C ₅ H ₁₃ PO ₃ N) ⁺	166	DOPC
(C ₅ H ₁₅ NPO ₄) ⁺	184	DOPC
(C ₇ H ₅ O ₄) ⁺	153	LG
(C ₇ H ₆ O ₅) ⁺	170	LG
(C ₇ H ₇ O ₅) ⁺	171	LG
(C ₆ H ₁₄ N) ⁺	100	CsA
(C ₆₁ H ₁₀₇ N ₁₀ O ₁₂) ⁺	1172	CsA jon pseudocząsteczkowy
(C ₆₂ H ₁₁₂ N ₁₁ O ₁₂) ⁺	1202	CsA jon cząsteczkowy
(CsA + H) ⁺		
(C ₂ H ₄ NO) ⁺	58	chitozan
(C ₂ H ₅ NO) ⁺	59	chitozan
(C ₂ H ₆ NO) ⁺	60	chitozan

Ponadto Jurak i współ. zidentyfikowali jon cząsteczkowy DOPC dla monowarstwy tego fosfolipidu osadzonej na mice [196]. Zastosowanie miki o gładkości atomowej, która charakteryzuje się wysoką jednorodnością energetyczną i dużą liczbą miejsc aktywnych, pozwala na uzyskanie bardziej upakowanej monowarstwy o zmniejszonej odległości pomiędzy grupami fosfocholinowymi, niż ma to miejsce dla PET_p/DOPC. Poza tym, naukowcy stwierdzili również obecność jonu cząsteczkowego dla monowarstwy LG na mice [195] jednocześnie potwierdzając, że rodzaj podłoża ma decydujący wpływ na strukturę monowarstwy. Jest to zgodne z przeprowadzonymi w ramach doktoratu eksperymentami przy użyciu AFM. Z tego powodu identyfikacja jonu cząsteczkowego może być akceptowalnym wskaźnikiem ściśle określonej organizacji cząsteczkowej monowarstwy.

Kolejnym ważnym parametrem, który należy wziąć pod uwagę, jest ciśnienie powierzchniowe przenoszenia monowarstw na podłoże stałe. W badaniach objętych rozprawą doktorską osadzanie prowadzono przy ciśnieniu 10 mN m⁻¹ [173, 186], które determinuje mniejszy stopień kondensacji monowarstw niż ciśnienie 35 mN m⁻¹ zastosowane przez badaczy przy przenoszeniu na mikę [195]. Stąd nasuwa się wniosek, że za brak jonów cząsteczkowych w filmach DOPC i LG może odpowiadać mniejsze ich skondensowanie, a tym samym większe nachylenie cząsteczek w stosunku do podłoża stałego [173, 186].



Rysunek 52 Rozkład fragmentów (a) DOPC $m/z = 104, 166$ i 184 (fosfocholiny), (b) CsA $m/z = 100$, (c) $m/z = 1172, 1202$, (d) LG $m/z = 153, 170, 171$ oraz (e) stosunek intensywności fragmentów DOPC do DOPC oraz (f) DOPC do DOPC i DOPC do LG dla badanych monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz woda/powietrze.

W widmie masowym uzyskanym dla monowarstwy DOPC zidentyfikowano najbardziej intensywne sygnały pochodzące od fragmentów grupy polarnej fosfolipidu: $m/z = 104$ ($C_5H_{14}NO$)⁺, $m/z = 166$ ($C_5H_{13}PO_3N$)⁺, $m/z = 184$ ($C_5H_{15}PO_4N$)⁺ (Rysunek 52a) [173]. Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi [187, 190, 192, 196]. Dla monowarstwy CsA najbardziej charakterystyczne fragmenty pojawiają się przy $m/z = 100$ ($C_6H_{14}N$)⁺ (Rysunek 52b), $m/z = 1172$ - jon pseudocząsteczkowy

$(C_{61}H_{107}N_{10}O_{12})^+$ oraz $m/z = 1202$ - jon cząsteczkowy $(C_{62}H_{112}N_{11}O_{12})^+$ (Rysunek 52c). Identyfikacja jonu cząsteczkowego CsA może stanowić dowód na tworzenie względnie upakowanej monowarstwy. Ponadto jon pseudocząsteczkowy CsA wykazuje znacznie większą wydajność niż jon cząsteczkowy (Rysunek 52c).

Po osadzeniu monowarstwy mieszanej DOPC-CsA 0,50 na PET_p intensywność ugrupowań charakterystycznych dla DOPC i CsA zmienia się. Obserwuje się większą intensywność jonu pseudocząsteczkowego ($m/z = 1172$) w porównaniu z monowarstwą CsA (Rysunek 52c). To sugeruje, że obecność cząsteczek DOPC zmienia orientację cząsteczek CsA na bardziej prostopadłą, a w konsekwencji zwiększa intensywność jonu pseudocząsteczkowego. Podobną zależność podali badacze dla monowarstw fosfolipidów, dla których zidentyfikowano jon cząsteczkowy [195].

Ponadto ilość CsA w monowarstwie DOPC-CsA jest mniejsza w porównaniu z filmem CsA, w związku z tym maleje intensywność najbardziej reprezentatywnego jonu CsA $(C_6H_{14}N)^+$. Ze względu na jego największą intensywność spośród wszystkich zidentyfikowanych jonów CsA, jest on bardzo użyteczny w ocenie statystycznej zawartości leku w monowarstwie (Rysunek 52b). Intensywność wszystkich charakterystycznych fragmentów grupy fosfocholinowej zmniejsza się około 6-krotnie w monowarstwie DOPC-CsA (Rysunek 52a), podczas gdy intensywność fragmentu cyklosporyny $(C_6H_{14}N)^+$ tylko o ok. 10% (Rysunek 52b). Powyższe wyniki jednoznacznie potwierdzają obecność cząsteczek obu składników w filmie LB. Z drugiej strony, tak znaczna redukcja intensywności nie jest typowym wynikiem.

W warunkach doświadczalnych, przy stosunkowo niskim ciśnieniu powierzchniowym (10 mN m^{-1}) CsA wykazuje znacznie większe powinowactwo do podłoża PET_p niż DOPC [173]. Takie zachowanie cząsteczek CsA w obecności fosfolipidu jest pożądane w aspekcie osiągnięcia celu doktoratu, jakim jest zaprojektowanie powierzchni biomateriału o właściwościach pozwalających na dostarczenie leku bezpośrednio w miejsce wszczepienia implantu. Dodatkowo, aby ochronić komórki przed uszkodzeniem powstałym w wyniku skutków ubocznych CsA, w następnym etapie badań do monowarstwy wprowadzono kolejny składnik, LG.

Obecność trzeciego składnika, LG, również znacząco wpływa na intensywność charakterystycznych fragmentów DOPC (Rysunek 52a) i CsA (Rysunek 52b, c) wśród monowarstw DOPC-CsA-LG. Jego występowanie w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,25 zmniejsza intensywność sygnałów pochodzących zarówno od fragmentów CsA:

$m/z = 100$ ($C_6H_{14}N$)⁺ (Rysunek 52b), jak i jonu pseudocząsteczkowego (Rysunek 52c). Ta zależność koreluje ze zmniejszoną zawartością CsA w monowarstwie mieszanej. Ponadto sugeruje to również, że orientacja CsA jest zachowana, ponieważ intensywność jonu ($C_6H_{14}N$)⁺, oraz jonów pseudocząsteczkowych, ulega redukcji [173].

Odmierna sytuacja występuje w przypadku filmu DOPC-CsA-LG 0,50. Intensywność jonu ($C_6H_{14}N$)⁺ jest porównywalna z obserwowaną dla DOPC-CsA-LG 0,25 (Rysunek 52b), co wskazuje na podobną ilość cząsteczek CsA, podczas gdy intensywność jonu pseudocząsteczkowego jest mniejsza (Rysunek 52c). Ilość cyklosporyny A w monowarstwach trójskładnikowych jest inna, dlatego wydaje się prawdopodobne, że przy mniejszej ilości CsA w monowarstwie (DOPC-CsA-LG 0,50), cząsteczki są bardziej nachylone względem powierzchni polimeru. Takie zachowanie sprzyja uzyskaniu większej wydajności jonu ($C_6H_{14}N$)⁺, ale jest niekorzystne dla wydajności jonu pseudocząsteczkowego [173]. Z punktu widzenia założonych celów doktoratu jest to wynik zadowalający, gdyż potwierdza dobre pokrycie powierzchni cząsteczkami CsA, które może zapewnić stosunkowo łatwe dostarczenie leku immunosupresyjnego do żywych komórek bezpośrednio z powierzchni implantu.

Przy większym nachyleniu, cząsteczki CsA są zorientowane bardziej prostopadle do pierwotnej wiązki Bi^+ . W związku z tym szybkość rozpylania jest większa prowadząc do większej fragmentacji cząsteczek CsA i wyższej wydajności jonu ($C_6H_{14}N$)⁺. Natomiast dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,75, intensywność jonu ($C_6H_{14}N$)⁺ jest mniejsza, zaś jonu pseudocząsteczkowego - podobna do uzyskanej dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50. Na tej podstawie można stwierdzić, że cząsteczki CsA są nachylone w mniejszym stopniu przy większej zawartości LG ($\chi_{LG} = 0,75$) niż w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,50, pomimo mniejszej ilości cząsteczek CsA w monowarstwie LB. Intensywność jonu pseudocząsteczkowego jest zbliżona do obserwowanej dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 (Rysunek 52c). Ponadto brak jonów cząsteczkowych dla DOPC i LG w monowarstwach mieszanych może potwierdzać istnienie silniejszych oddziaływań przyciągających między cząsteczkami tworzącymi monowarstwy wieloskładnikowe niż jednoskładnikowe [173]. Powyższe stwierdzenie jest zgodne z wielkością oddziaływań przejawiających się w ujemnych wartościach energii mieszania Gibbsa na granicy faz ciecz/powietrze [231]. Zatem im większa odległość między cząsteczkami tego samego rodzaju DOPC lub LG w monowarstwach, tym silniejsze jest obniżenie wydajności jonów

cząsteczkowych. Na tej podstawie można powiedzieć, że możliwe jest uzyskanie biokompatybilnych i stabilnych pokryć dla implantów o ściśle określonym składzie.

Dodatkowo można stwierdzić, że CsA nie tworzy typowych wiązań chemicznych z cząsteczkami DOPC ani LG w monowarstwach trójskładnikowych. Oddziaływania zachodzące między tymi cząsteczkami mają charakter wiązań wodorowych i sił Lifshitzavander Waalsa. Ponadto nie można wykluczyć, że CsA występuje w konformacji zamkniętej związanej z powstawaniem wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [127], z powodu otaczającego środowiska hydrofobowego zapewnionego przez łańcuchy węglowodorowe DOPC (C18) i LG (C12). Zdolność CsA do zmiany konformacji z otwartej na zamkniętą w zależności od charakteru środowiska umożliwia jej transport przez dwuwarstwę lipidową zgodnie z mechanizmem dyfuzji biernej [128, 248]. Dlatego zaprojektowanie monowarstw trójskładnikowych, jako powłok dla implantów i/lub stentów może ułatwić transport pasywny cyklosporyny, eliminując problem jej niskiej biodostępności. Jest to kolejny wniosek umożliwiający osiągnięcie założonego celu dysertacji.

Rysunek 52d przedstawia rozkład najbardziej reprezentatywnych fragmentów LG, $m/z = 153, 170$ i 171 , dla monowarstw DOPC-CsA-LG. W przypadku monowarstwy LG nie obserwuje się fragmentów charakterystycznych dla tego związku. Oznacza to, że cząsteczki DOPC i CsA odgrywają główną rolę w osadzaniu LG, stabilizacji i ułożeniu cząsteczkowym na powierzchni PET_p . W ultrawysokiej próżni panującej wewnątrz komory aparatu TOF-SIMS, naniesiona monowarstwa LG może zostać usunięta z aktywowanej powierzchni polimeru. Stanowi to podstawę do stwierdzenia, że monowarstwa LG, której obecność została potwierdzona przez AFM (Rysunek 44), słabo wiąże się z powierzchnią nośnika [173]. Natomiast widoczny jest 4-krotny wzrost intensywności fragmentu LG $m/z = 153$ wraz ze wzrostem zawartości LG w filmach DOPC-CsA-LG (od χ_{LG} 0,25 do 0,50 i od 0,50 do 0,75). Jest to niezwykle istotny wniosek potwierdzający osiągnięcie celu cząstkowego rozprawy dotyczącego projektowania i charakteryzowania nowoczesnych powłok dla biomateriałów. Dobór składu monowarstw umożliwia kontrolowanie oddziaływań pomiędzy ich cząsteczkami, ale także siły wiązania poszczególnych warstw do podłoża implantu (stentu) i/lub ich stabilności w czasie w otoczeniu komórek pacjenta.

Podobna tendencja występuje dla pozostałych fragmentów LG ($m/z = 170$ i 171). Wskazuje to, że rosnąca intensywność najbardziej charakterystycznego jonu LG ($m/z = 153$) zidentyfikowanego w filmach LB osadzonych na podłożu PET_p , nie jest

proporcjonalna do wzrostu ułamka molowego LG w monowarstwach mieszanych na granicy faz woda/powietrze. Stąd też nasuwa się wniosek, że wydajność jonów LG w tym procesie jest ściśle zależna od otaczających heterocząsteczek [173]. Powyższa zależność potwierdza poprawność zastosowania wybranego w ramach badań wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej składu monowarstw w celu uzyskania pokryć o właściwościach biokompatybilnych, leczniczych a jednocześnie przeciwtleniających.

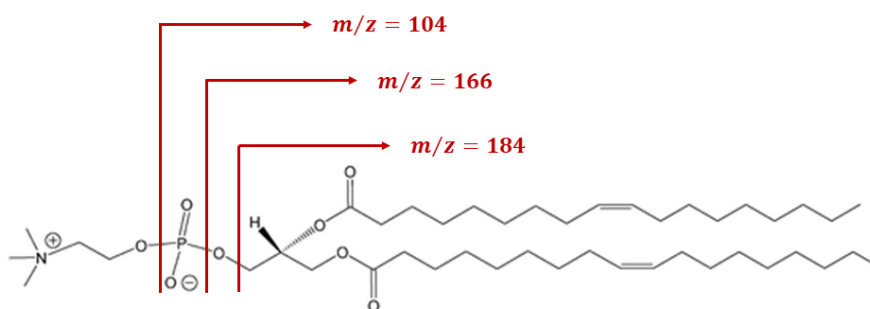
Podobny efekt obserwuje się dla monowarstwy DOPC (Rysunek 52a), gdzie mniejsza intensywność fragmentów DOPC powinna być związana z malejącym stosunkiem molowym fosfolipidu (0,375, 0,25 i 0,125) w monowarstwach mieszanych. Jednak intensywność fragmentów $m/z = 104$ i $m/z = 166$ jest tylko nieznacznie obniżona, podczas gdy intensywność fragmentu $m/z = 184$ znacznie wzrasta. Wskazuje to na podobny wpływ oddziaływań DOPC-LG na intensywność wszystkich fragmentów pochodzących od LG. Większa intensywność jonu $m/z = 184$ determinowana jest specyficznym położeniem cząsteczki LG względem DOPC, co pozwala na łatwiejsze przenoszenie dwóch rodników wodorowych od cząsteczki LG do DOPC [173]. W zależności od lokalizacji LG względem cząsteczki DOPC zmienia się intensywność fragmentów części polarnej. Jurak i współ. wykazali, że intensywność fragmentu $m/z = 184$ nie wzrasta w obecności LG w monowarstwie mieszanej, ze względu na brak bezpośrednich oddziaływań między grupami hydroksylowymi LG i fosforanowymi DOPC [196].

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono wzrost intensywności fragmentu $m/z = 184$ dla monowarstw DOPC-CsA-LG 0,50 i DOPC-CsA-LG 0,75, natomiast dla DOPC-CsA-LG 0,25 jest ona nieco mniejsza niż dla DOPC-CsA 0,50 (Rysunek 52a). Świadczy to o oddziaływaniach między grupami $-OH$ LG i grupami $>C=O$ DOPC w monowarstwie trójskładnikowej o najmniejszej zawartości LG ($\chi_{LG} = 0,25$), podobnie jak w przypadku monowarstwy DOPC-LG badanej przez innych naukowców [195]. Z kolei, wraz ze wzrostem ułamka molowego LG (DOPC-CsA-LG 0,50 oraz DOPC-CsA-LG 0,75), bezpośrednie oddziaływania pomiędzy grupami hydroksylowymi i fosforanowymi powodują wzrost intensywności jonu $m/z = 184$. Możliwe jest to dzięki rosnącemu stosunkowi LG do DOPC w monowarstwie, w której cząsteczki DOPC mogą być otoczone cząsteczkami LG.

Bardziej szczegółowe informacje o położeniu grup hydroksylowych LG względem grup fosfocholinowych DOPC można uzyskać z rozkładu stosunku intensywności jonów 184/104 i 184/166 przedstawionego na Rysunku 52e. W monowarstwie DOPC-CsA-LG

o najmniejszej zawartości LG rozkład stosunku 184/104 w porównaniu do 184/166 jest podobny do monowarstwy DOPC i DOPC-CsA. Przy większym ułamku molowym LG w monowarstwach mieszanych stosunek 184/104 stopniowo wzrasta. Na tej podstawie możliwe jest określenie prawdopodobnego położenia cząsteczki LG względem DOPC. Grupy hydroksylowe LG mogą znajdować się bliżej atomu tlenu związanego z atomem fosforu od strony łańcuchów węglowodorowych (część jonu 184) niż atomu tlenu w grupie cholinowej (włączonego w jon 104), dając większą wydajność fragmentów 184 i 166 (Rysunek 53) [173].

Powyższy wniosek potwierdza, że zastosowana technika jest efektywna i umożliwia szczegółową charakterystykę badanych w ramach doktoratu monowarstw pojedynczych i mieszanych oraz prognozowanie oddziaływań występujących pomiędzy cząsteczkami substancji biologicznie czynnych w badanych filmach w otoczeniu komórek/tkanek pacjenta.



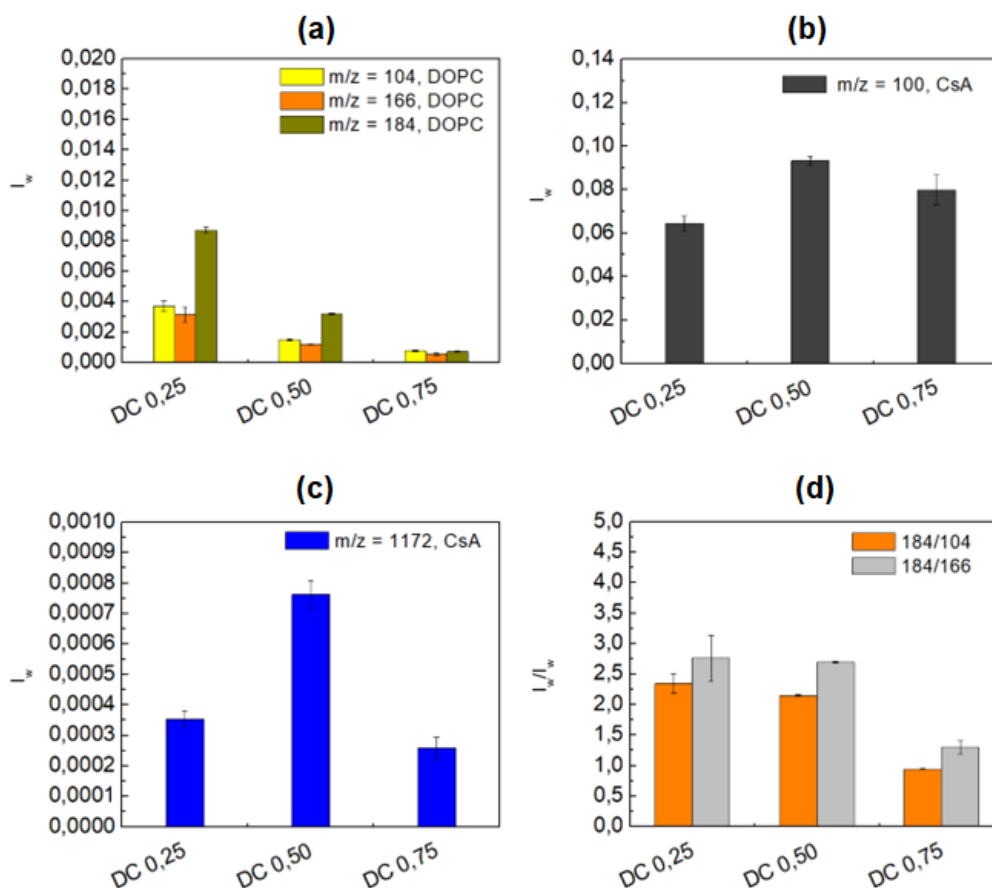
Rysunek 53 Struktura i charakterystyczne fragmenty DOPC. Opracowanie własne na podstawie [195].

Ponadto w monowarstwach DOPC-CsA-LG na granicy faz woda/powietrze, gdy ułamek molowy LG wzrasta od 0,25 do 0,75, to stosunek molowy DOPC do LG wynosi odpowiednio: 1,50, 0,50 i 0,167. Oznacza to, że stosunek molowy DOPC do LG zmniejsza się 3-krotnie, gdy ułamek molowy LG wzrasta od 0,25 do 0,50 oraz od 0,50 do 0,75. Podobne zależności obserwuje się dla stosunku molowego DOPC do LG w monowarstwach DOPC-CsA-LG po ich przeniesieniu na podłoże PET_p (Rysunek 52f) [173]. Jest to związane z tym, że stosunek intensywności $m/z = 184$ (DOPC) do $m/z = 170$ (LG) oraz $m/z = 184$ (DOPC) do $m/z = 153$ (LG) także zmniejsza się 3-krotnie wraz ze wzrostem zawartości LG w monowarstwie. Tak wysoka zgodność dowodzi, że analogiczne układy cząsteczek DOPC i LG występują na granicy faz woda/powietrze oraz w warstwie LB.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że cel cząstkowy doktoratu, zakładający zaprojektowanie monowarstw stabilnych zarówno na fazie nośnej, jak i po przeniesieniu na PET_p został zrealizowany, co widoczne jest w zachowaniu stałego stosunku molowego LG do DOPC na obu badanych podłożach o odmiennym charakterze. Powyższe badania pokazują także, że technika TOF-SIMS może być użytecznym narzędziem w analizie chemicznej powierzchni monowarstw nie tylko jakościowej, ale także ilościowej. Jest to niezwykle istotne w projektowaniu biokompatybilnych pokryć dla materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej i implantologii, a w szczególności wówczas, gdy mają one także pełnić rolę w procesie uwalniania leków, np. immunosupresyjnych. Ten dwutorowy aspekt badań był jednym z zaprojektowanych celów badawczych dysertacji.

Kolejnym celem badawczym była ocena potencjalnych oddziaływań między cząsteczkami DOPC i CsA w monowarstwach DOPC-CsA o różnych ułamkach molowych CsA ($\chi_{CsA} = 0,25, 0,50, 0,75$) przeniesionych na aktywowany nośnik polimerowy. Rysunek 54 przedstawia rozkład intensywności najbardziej charakterystycznych fragmentów zidentyfikowanych w widmach TOF-SIMS.

Intensywność wszystkich fragmentów pochodzących od DOPC zmniejsza się około 3-krotnie, gdy ułamek molowy CsA wzrasta od 0,25 do 0,50, a następnie od 0,50 do 0,75 (Rysunek 54a). Takie zachowanie różni się od obserwowanego dla monowarstw DOPC-CsA-LG (Rysunek 54a). Pokrycie powierzchni polimeru przez cząsteczki CsA (fragment $(C_6H_{14}N)^+$, Rysunek 54b) i uporządkowanie (jon pseudocząsteczkowy, Rysunek 54c) są największe dla filmu DOPC-CsA 0,50 [173].



Rysunek 54 Rozkład fragmentów (a) DOPC $m/z = 104, 166$ i 184 (fosfocholiny), (b) CsA $m/z = 100$, (c) $m/z = 1172$ oraz (d) stosunek intensywności fragmentów DOPC do DOPC dla badanych monowarstw DOPC-CsA przeniesionych na PET_p z granicy faz woda/powietrze.

Potwierdzają to najwyższe intensywności jonów $m/z = 100$ ($C_6H_{14}N^+$) (Rysunek 54b) oraz pseudocząsteczkowego (Rysunek 54c). Dowodzi to, że w tego typu monowarstwie mieszanej cząsteczki CsA są zorientowane najbardziej pionowo w odniesieniu do podłoża. Jest to związane z odpychającym charakterem oddziaływań pomiędzy cząsteczkami DOPC i CsA, co w konsekwencji zmienia orientację/nachylenie cząsteczek cyklosporyny [173]. Powyższe wyniki dowodzą poprawności zastosowania stosunku molowego DOPC:CsA równego 1:1 w monowarstwach trójskładnikowych, w których zmienia się zawartość LG. Dzięki takiemu składowi dostarczenie leku CsA w organizmie człowieka może zachodzić w sposób efektywny ze względu na zdolność cząsteczek CsA ulokowanych bardziej pionowo w monowarstwie do oddziaływań z błonami komórkowymi.

Ponadto przy największej zawartości CsA w monowarstwie dwuskładnikowej ($\chi_{CsA} = 0,75$) mniejsza intensywność fragmentu ($C_6H_{14}N^+$) może sugerować mniejsze pokrycie powierzchni polimeru przez jej cząsteczki w stosunku do monowarstwy DOPC-

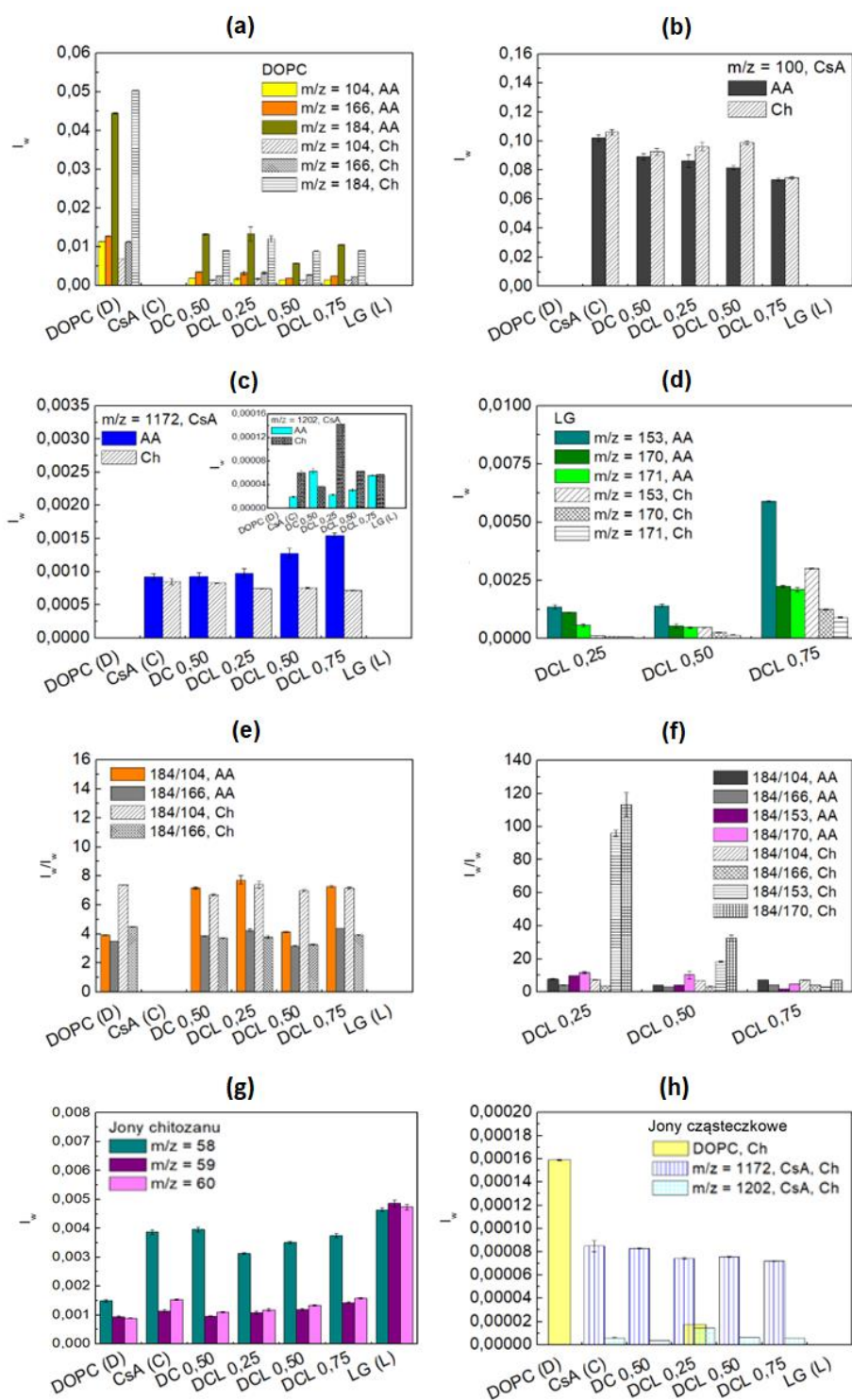
CsA 0,50. Znacznie mniejsza intensywność jonu pseudocząsteczkowego CsA (Rysunek 54c) niż $(C_6H_{14}N)^+$ (Rysunek 54b) wskazuje, że cząsteczki CsA są bardziej nachylone w monowarstwie DOPC-CsA 0,75 niż w przypadku DOPC-CsA 0,50. Może to świadczyć o braku ilościowego przeniesienia cząsteczek monowarstwy na powierzchnię PET_p. Powyższe wyniki również pokazują, że cząsteczki DOPC odgrywają ważną rolę podczas osadzania CsA. Dla optymalnego składu (DOPC-CsA 0,50), cechującego się największym uporządkowaniem oraz ilościowym przeniesieniem na nośnik stały, cząsteczki DOPC mogą skutecznie wypełniać luki na zewnątrz i wewnątrz cząsteczek CsA, co w konsekwencji prowadzi do uzyskania największego pokrycia i uporządkowania powierzchni. Przy minimalnej ilości DOPC (DOPC-CsA 0,75) cząsteczki CsA prawdopodobnie odpychają się, zmniejszając pokrycie powierzchni polimeru, o czym świadczy mniejsza intensywność jonów pseudocząsteczkowych (Rysunek 54c). Ponadto rozkład stosunku intensywności fragmentów DOPC (Rysunek 54d) sugeruje, że transfer rodników wodorowych z CsA do cząsteczek DOPC nie występuje, zaś ma miejsce w przypadku oddziaływań zachodzących między cząsteczkami DOPC i LG [173]. Stosunki intensywności 184/104 i 184/166 wykazują zbliżone wartości dla monowarstw DOPC-CsA 0,25 i DOPC-CsA 0,50. Można więc stwierdzić, że przy mniejszym pokryciu powierzchni polimeru przez cząsteczki DOPC (DOPC-CsA 0,50) rodniki wodorowe mogą być dostarczane przez otaczające cząsteczki DOPC ze względu na ich bliskość. W monowarstwie DOPC-CsA 0,75 odległość między cząsteczkami jest większa, co zmniejsza liczbę dostępnych rodników wodorowych i zwiększa wydajność fragmentu $m/z = 184$. Powyższe wyniki pokazują, że siła odpychania między cząsteczkami CsA i DOPC znacząco wpływa na orientację CsA.

W oparciu o powyższe badania można stwierdzić, że w pierwszej kolejności zachodzi adhezja cząsteczek CsA z monowarstwy DOPC-CsA 0,50 na aktywowanym polimerze PET, co determinuje jej właściwości powierzchniowe, przejawiające się również w wartościach kątów zwilżania (Rozdział 14.3).

Po przeniesieniu monowarstw DOPC i LG z granicy faz AA/powietrze na podłoże PET_p, podobnie jak z woda/powietrze, nie zidentyfikowano jonów cząsteczkowych tych związków, co jest związane z nieuporządkowaniem i nachyleniem cząsteczek [230] i/lub chropowatością powierzchni plazmowanego polimeru PET [173].

Na Rysunku 55a przedstawiono najbardziej reprezentatywne fragmenty ugrupowania fosfocholinowego o stosunku $m/z = 104, 166, 184$. Intensywność jonu $m/z = 184$ dominuje nad intensywnością fragmentów $m/z = 166$ i $m/z = 104$. Jest to zgodne z danymi literaturowymi [187, 190, 192, 275, 276]. Porównywalny rozkład fragmentów części fosfocholinowej uzyskano dla monowarstwy DOPC naniesionej na PET_p z subfazy wodnej (Rysunek 52a) [173]. W przypadku monowarstwy CsA najbardziej charakterystycznymi fragmentami cząsteczki o największej intensywności są $m/z = 100, 1172$ i 1202 . Otrzymane widma masowe korelują z danymi opublikowanymi przez innych badaczy [277-280]. Dla powierzchni $PET_p/AA/DOPC-CsA$ 0,50 intensywność wspomnianych powyżej fragmentów DOPC ($m/z = 104, 166, 184$) zmniejsza się ok. 3-krotnie (Rysunek 55a), przy czym intensywność fragmentu CsA $m/z = 100$ jest mniejsza o około 10% (Rysunek 55b). To wskazuje na mniejsze pokrycie powierzchni PET_p cząsteczkami CsA, co jest zgodne ze zmniejszoną zawartością CsA w monowarstwie DOPC-CsA na granicy faz AA/powietrze w stosunku do monowarstwy CsA. Analogiczne intensywności fragmentów CsA zaobserwowano dla monowarstw przeniesionych z subfazy wodnej [173] (Rysunek 52b i c). Natomiast wartości intensywności fragmentów grupy cholinowej DOPC są 2-krotnie mniejsze dla monowarstwy DOPC i 5-krotnie mniejsze dla DOPC-CsA (Rysunek 55a) [186]. Sugeruje to, że mniejsza ilość cząsteczek DOPC została przeniesiona na podłoże PET_p .

Biorąc pod uwagę wyższe względne intensywności jonów można stwierdzić, że proces osadzania DOPC na PET_p jest bardziej efektywny w obecności kwasu octowego w ciekłej fazie nośnej, gdyż uzyskuje się wtedy większe pokrycie powierzchni PET_p cząsteczkami DOPC. Natomiast, mniejsza intensywność fragmentu CsA $m/z = 100$ świadczy o mniejszym pokryciu powierzchni polimeru PET_p cząsteczkami polipeptydu (Rysunek 55b). Ponadto intensywność jonu pseudocząsteczkowego ($m/z = 1172$) jest zachowana, zaś jonu cząsteczkowego ($m/z = 1202$) wzrasta w porównaniu z $PET_p/AA/CsA$ (Rysunek 55c). Może to być uwarunkowane bardziej prostopadłą orientacją cząsteczek CsA względem powierzchni polimeru [186]. Bardziej pionowa pozycja cząsteczek CsA może być konsekwencją ich odpychania przez cząsteczki DOPC, co powoduje, że cząsteczki CsA zajmują mniejszą powierzchnię w porównaniu z monowarstwą jednoskładnikową CsA.



Rysunek 55 Rozkład fragmentów: (a) DOPC $m/z = 104, 166$ i 184 (fosfocholiny), (b) CsA $m/z = 100$, (c) CsA $m/z = 1172, 1202$, (d) LG $m/z = 153, 170, 171$ oraz (e) stosunek intensywności fragmentów DOPC do DOPC, i (f) DOPC do DOPC i DOPC do LG oraz (g) fragmenty chitozanu i (h) jony cząsteczkowe dla badanych monowarstw przeniesionych na PET_p z granicy faz AA/powietrze i Ch/powietrze.

Celem dysertacji jest uzyskanie pokrycia dla zewnętrznej powierzchni biomateriału, które może zapewnić dodatkowo uwalnianie leku CsA po implantacji. W powyższych badaniach obecność kwasu octowego wspomaga proces przeniesienia fosfolipidu, który ma pełnić funkcję naturalnego łącznika pomiędzy tkanką a powierzchnią ciała stałego, ale jednocześnie osłabia osadzanie cząsteczek CsA. W związku z mniejszym pokryciem powierzchni cząsteczkami CsA można stwierdzić, że terapia lekiem immunosupresyjnym mogłaby się okazać nieefektywna w obecności AA.

Obecność LG w monowarstwach mieszanych przeniesionych na podłoże PET_p, ujawnia się poprzez występowanie fragmentów $m/z = 153, 170$ i 171 (Rysunek 55d). Ilość LG w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,25 powoduje nieznaczny wzrost intensywności jonu pseudocząsteczkowego i znaczną redukcję jonu cząsteczkowego CsA (Rysunek 55c). Ta niespójność może wynikać z niejednoznacznego mechanizmu powstawania jonu pseudocząsteczkowego, który obserwuje się po utracie dwóch atomów tlenu przez jon cząsteczkowy. Pomimo tego, przy mniejszej ilości CsA w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,25, cząsteczki CsA muszą być w mniejszym stopniu nachylone w stosunku do podłoża niż w przypadku monowarstwy CsA, ze względu na mniejszą intensywność fragmentu $m/z = 100$ (Rysunek 55b), a także większą intensywność $m/z = 1172$ i zbliżoną jonu cząsteczkowego (Rysunek 55c). Zmiany orientacji przestrzennej CsA w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,25 w porównaniu do DOPC-CsA 0,50 są trudne do oszacowania ze względu na wspomnianą rozbieżność w zmianach intensywności jonów pseudocząsteczkowych i cząsteczkowych. Dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 zaobserwowano znaczne zmniejszenie pokrycia powierzchni cząsteczkami CsA. Intensywność fragmentów CsA $m/z = 100$ maleje (Rysunek 55b), podczas gdy intensywność jonów pseudocząsteczkowego i cząsteczkowego wzrasta (Rysunek 55c). Takie zmiany potwierdzają silną reorientację cząsteczek CsA, które przyjmują najbardziej pionową pozycję w stosunku do podłoża PET_p w przypadku monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,75 (najwyższe natężenie jonów cząsteczkowych CsA, Rysunek 55c) [186].

Na podstawie pomiarów względnej intensywności można stwierdzić, że pokrycie powierzchni polimeru cząsteczkami DOPC wykazuje minimum dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50, zaś dla DOPC-CsA-LG 0,75 jest nieco niższe w porównaniu do DOPC-CsA-LG 0,25 (Rysunek 55a). Podobnie jak w przypadku fragmentów CsA, można zauważyć nietypowy rozkład intensywności najbardziej charakterystycznych fragmentów LG (Rysunek 55d). Dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 intensywność fragmentu

$m/z = 153$ pozostaje niezmienną, zaś intensywność fragmentów $m/z = 170$ i 171 jest mniejsza w odniesieniu do DOPC-CsA-LG 0,25. Jak wykazali naukowcy fragment $m/z = 153$ powstaje w wyniku rozerwania wiązania $C - O$ [195], dlatego on lepiej ilustruje pokrycie powierzchni cząsteczkami LG niż fragmenty $m/z = 170$ i 171 , do wytworzenia których potrzebne są dodatkowe jony wodorowe. Dla monowarstwy trójskładnikowej z największą zawartością LG ($\chi_{LG} = 0,75$) zauważalny jest znaczny wzrost intensywności wszystkich fragmentów LG (Rysunek 55d).

Co zaskakujące, w przypadku monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 osadzonej na podłożu PET_p z subfazy AA zaobserwowano mniejszą intensywność jonów pochodzących od DOPC oraz LG, która może wskazywać na ich mniejszą ilość niż dla monowarstwy przeniesionej z wodnej fazy nośnej. Trudno określić przyczynę takiego zachowania. Zupełnie inne zależności występują podczas osadzania monowarstwy DOPC-CsA-LG z subfazy wodnej (Rysunek 52) [173].

Intensywność wszystkich fragmentów pochodzących od cząsteczki DOPC w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,75 jest mniejsza niż w przypadku DOPC-CsA-LG 0,25. Sugeruje to, że nie ma bezpośrednich oddziaływań między grupami hydroksylowymi LG i grupą fosforanową DOPC, które znacząco wpływałyby na wzrost intensywności wszystkich fragmentów DOPC poprzez przenoszenie jonów pochodzących od rodników wodorowych. Podobne obserwacje przedstawiono w pracy [195]. Powyższy wniosek może być dodatkowo poparty rozkładem stosunku intensywności fragmentów 184/104 i 184/166 (Rysunek 55e). Przedstawione badania potwierdzają konieczność dalszej modyfikacji pokrycia powierzchni polimeru, aby otrzymać monowarstwę, która umożliwi zarówno ochronę błon komórkowych przed uszkodzeniem, jak i dostarczenie odpowiedniej ilości leku CsA.

W filmach mieszanych DOPC-CsA-LG obserwuje się tylko nieznaczny wzrost stosunków intensywności fragmentów 184/104 i 184/166, co sugeruje raczej słabe bezpośrednie oddziaływania między cząsteczkami DOPC i LG. Podobnie dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,75 nie widać istotnych zmian stosunków 184/104 i 184/166. Natomiast, występuje znaczny wzrost stosunku intensywności 184/104 w monowarstwie DOPC-CsA 0,50 w porównaniu do monowarstwy DOPC (Rysunek 55e). Wskazuje to, że oddziaływania między cząsteczkami CsA i DOPC determinują przenoszenie jonów wodoru z cząsteczek CsA na atom tlenu związany z atomem fosforu grupy fosforanowej DOPC od

strony łańcuchów węglowodorowych (Rysunek 53). W ten sposób zwiększa się wydajność fragmentu $m/z = 184$ (Rysunek 55a).

Opisany mechanizm jest uwarunkowany obecnością kwasu octowego, ponieważ na subfazie wodnej obserwowano bezpośrednie oddziaływania między grupami hydroksylowymi LG i grupą fosforanową DOPC [173], a nie między cząsteczkami DOPC i CsA. Dlatego w kolejnym etapie badań wprowadzono cząsteczki chitozanu oraz określono ich wpływ na właściwości monowarstw osadzonych na podłożu PET_p . Wybór tego polisacharydu do badań wchodzących w zakres dysertacji był podyktowany możliwością zaprojektowania nośnika leku CsA oraz zwiększenia biokompatybilności powłoki, która dodatkowo zapewni właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Rozkład intensywności najbardziej charakterystycznych fragmentów chitozanu przedstawiono na Rysunku 55g. Również inni naukowcy zidentyfikowali fragmenty tego polisacharydu o takich samych stosunkach masy do ładunku [193, 194, 281]. Najniższa intensywność najbardziej reprezentatywnego fragmentu chitozanu $(C_2H_4NO)^+ m/z = 58$ odpowiada największemu pokryciu powierzchni jego filmem i odwrotnie, najwyższa intensywność oznacza najmniejsze pokrycie powierzchni warstwą chitozanu. Intensywności zidentyfikowanych jonów cząsteczkowych dla monowarstwy DOPC oraz jonów cząsteczkowych i pseudocząsteczkowych dla monowarstwy CsA są również pokazane na Rysunku 55 (odpowiednio b, c i h). Dla monowarstwy DOPC przeniesionej na PET_p z subfazy Ch pojawia się jon cząsteczkowy $m/z = 786$, który nie był obecny w przypadku przenoszenia monowarstw z subfazy wodnej [173] oraz AA. Występowanie jonu cząsteczkowego jest determinowane gęstością upakowania monowarstwy DOPC i wskazuje na wysokie powinowactwo cząsteczek DOPC do chitozanu (Rysunek 55h) [186]. Podobne zależności opisano już w literaturze dla fosfolipidu nasyconego DPPC osadzonego na mice [195]. Potwierdzenie wpływu dodatku Ch na organizację monowarstwy umożliwia uzyskanie biokompatybilnej powierzchni biomateriału.

Dla monowarstwy DOPC-CsA 0,50 jon cząsteczkowy DOPC zanika. Niską intensywność tego jonu zaobserwowano także dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,25. Rozkład intensywności fragmentów o mniejszej masie dla monowarstwy DOPC (Rysunek 55a) odpowiada pokryciu powierzchni PET_p/Ch cząsteczkami DOPC. Duża intensywność jonu cząsteczkowego może świadczyć o znacznie większym pokryciu powierzchni polimeru monowarstwą fosfolipidową. Jego obecność w monowarstwie trójskładnikowej DOPC-CsA-LG 0,25 wskazuje na jej ścisłe upakowanie. (Rysunek 55h).

Sugeruje to, że LG wspomaga powstawanie bardziej uporządkowanej monowarstwy. W rezultacie większe ilości DOPC są przenoszone z monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,25 niż z DOPC-CsA 0,50, pomimo większej ilości fosfolipidu w monowarstwie dwu- niż w trójskładnikowej na subfazie ciekłej.

Przy wyższej zawartości LG w monowarstwie DOPC-CsA-LG, ilość DOPC jest mniejsza, jednakże intensywności jonów wskazują na przenoszenie podobnej liczby cząsteczek DOPC, zarówno w przypadku monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50, jak i DOPC-CsA-LG 0,75, w porównaniu do monowarstwy DOPC-CsA 0,50. Oznacza to, że LG wspomaga proces osadzania cząsteczek fosfolipidu. Zjawisko to jest uwarunkowane bezpośrednimi oddziaływaniami pomiędzy cząsteczkami DOPC i LG [195].

Wzajemne położenie grup polarnych DOPC i LG można oszacować na podstawie rozkładu stosunku intensywności fragmentów 184/104 i 184/166 (Rysunek 55f). Jednak uzyskane wyniki nie pokazują istotnych zmian. Oznacza to, że cząsteczki LG osadzone na warstwie chitozanu mogą otaczać i penetrować cząsteczki DOPC w różnych miejscach polarnej części cholinowej fosfolipidu. W rezultacie żaden spośród charakterystycznych fragmentów DOPC o $m/z = 104, 166, 184$ (Rysunek 55a) nie wykazuje znacząco większej intensywności [186]. Jest to niezwykle istotny wniosek dla osiągnięcia celu doktoratu, który potwierdza, że wprowadzenie kolejnego składnika, jakim jest chitozan, nie zaburza właściwości przeciwutleniających LG. W ten sposób może być zapewniona ochrona błon komórkowych (komórek) w organizmie pacjenta przed negatywnymi skutkami terapii lekiem CsA.

Pokrycie powierzchni PET_p/Ch cząsteczkami cyklosporyny można oszacować na podstawie rozkładu intensywności fragmentu $(C_6H_{14}N)^+$ (Rysunek 55b). Zgodnie z oczekiwaniami największą wartość obserwuje się po osadzeniu monowarstwy CsA. W obecności cząsteczek DOPC dla monowarstwy DOPC-CsA intensywność tego fragmentu, a więc i pokrycie powierzchni cząsteczkami CsA, spada o 15%. Natomiast skoro intensywność jonów cząsteczkowych (Rysunek 55c, h) zmniejsza się o około 50%, można założyć, że orientacja CsA zmienia się na bardziej poziomą względem podłoża PET_p/Ch . Z drugiej jednak strony, intensywność jonu pseudocząsteczkowego maleje nieznacznie, co może sugerować brak zmian w ułożeniu cząsteczki CsA. Dlatego też mechanizm powstawania jonu pseudocząsteczkowego wciąż nie jest ściśle określony. Wiadomo, że większe prawdopodobieństwo daje szacowanie orientacji geometrycznej cząsteczki CsA na podstawie intensywności jonu cząsteczkowego [186].

Wprowadzenie LG, jako kolejnego składnika monowarstwy (DOPC-CsA-LG) prowadzi do znacznego wzrostu intensywności jonów cząsteczkowych CsA (Rysunek 55b i c). Z tego wynika, że cząsteczki CsA są najbardziej upakowane i wykazują najbardziej prostopadłą orientację w stosunku do PET_p/Ch w monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,25. Jak opisano powyżej podobne zachowanie obserwuje się w przypadku cząsteczek DOPC, co sugeruje, że LG przy ułamku molowym równym 0,25 w monowarstwie trójskładnikowej pełni rolę substancji wiążącej cząsteczki DOPC i CsA z warstwą chitozanu. Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że kolejny z założonych celów badawczych doktoratu został osiągnięty.

Jednak, intensywność charakterystycznych fragmentów LG jest bardzo niska (Rysunek 55d), co może być związane z adhezją preferencyjną cząsteczek monowarstwy do podłoża stałego PET_p/Ch i/lub zmianą orientacji cząsteczek. Ponadto cząsteczki LG mogą być usuwane z podłoża polimeru w wyniku działania wysokiej próżni w komorze pomiarowej aparatu. W przypadku monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 intensywność jonu $m/z = 100$ wzrasta (Rysunek 55b), gdy cząsteczki CsA są bardziej nachylone, o czym świadczy spadek intensywności jonów cząsteczkowych (Rysunek 55c). Takie zachowanie jest możliwe dzięki mniejszej ilości cząsteczek DOPC w monowarstwie, a co za tym idzie większej liczbie dostępnych miejsc na filmie chitozanu [186]. Dlatego też, zastosowanie Ch jako nośnika substancji bioaktywnych jest uzasadnione, pozwala na uzyskanie nowatorskiej powłoki o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, dostarczającej lek immunosupresyjny przeciwdziałający odrzuceniu biomateriału oraz chroniącej komórki i/lub narządy pacjenta przed uszkodzeniem.

Przy największym ułamku molowym LG (DOPC-CsA-LG 0,75) intensywność fragmentu $(C_6H_{14}N)^+$ zmniejsza się w odniesieniu do DOPC-CsA-LG 0,50, a orientacja cząsteczek zmienia się na bardziej pionową (Rysunek 55c). Ponadto intensywność jonu cząsteczkowego jest podobna w przypadku monowarstw DOPC-CsA-LG 0,50 i 0,75 (Rysunek 55c). Analiza wyników pokazuje, że upakowanie cząsteczek tworzących monowarstwy i w konsekwencji ich orientacja jest ściśle determinowana ilością cząsteczek LG w osadzonej monowarstwie (Rysunek 55c i d) [186].

Analiza TOF-SIMS umożliwiła określenie ułożenia cząsteczek tworzących monowarstwy mieszane. Przeprowadzone w ramach dysertacji eksperymenty wykazały, jak cząsteczki DOPC, CsA i LG oddziałują ze sobą po osadzeniu monowarstwy na PET_p oraz jak ich ułożenie względem siebie zmienia się w zależności od składu filmu. Takie badania

wydają się być bardzo pomocne w projektowaniu biokompatybilnych powłok, które mogą mieć zastosowanie w medycynie rekonstrukcyjnej, ale także pełnić rolę przekaźników leków.

Kolejnym cząstkowym celem badawczym była charakterystyka zwilżalności otrzymanych monowarstw i wybór tych optymalnych do zastosowań przykładowo w chirurgii rekonstrukcyjnej. W celu zbadania wpływu składu monowarstwy i/lub obecności filmu chitozanu na zwilżalność powierzchni modyfikowanych PET wykonano pomiary kąta zwilżania.

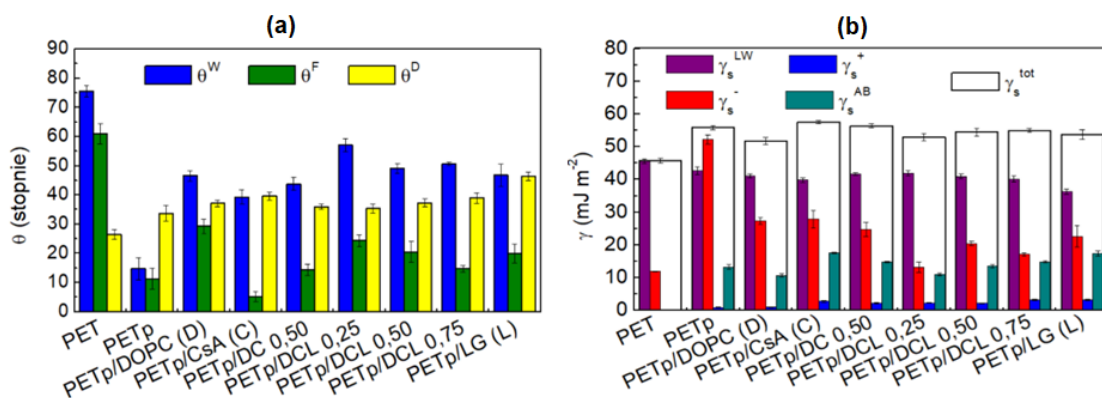
14.3. Zwilżalność i swobodna energia powierzchniowa

Materiały biokompatybilne stosowane między innymi do tworzenia stentów to takie, które w kontakcie z tkanką nie powodują niekorzystnej reakcji organizmu. Zwilżalność powierzchni jest ściśle związana z taką biozgodnością [203]. Jest ona zazwyczaj określana poprzez pomiary kąta zwilżania (CA) cieczy testowych, najczęściej wody, na powierzchni materiału. Duży kąt zwilżania wody wskazuje na małą zwilżalność lub dużą hydrofobowość powierzchni. Ponadto w pomiarach bardziej zaawansowanych stosowane są także zestawy składające się z trzech cieczy testowych, dwóch polarnych i jednej niepolarnych w celu określenia wartości swobodnej energii powierzchniowej. Jej znajomość pogłębia analizę właściwości powierzchniowych ciała stałego.

Kolejnym celem cząstkowym dysertacji było określenie zwilżalności powierzchni polimeru PET, niemodyfikowanej i modyfikowanej. Dlatego w następnym etapie badań przeprowadzono pomiary kąta zwilżania (CA) wody, formamidu i diiodometanu dla PET nieaktywowanego oraz aktywowanego plazmą niskotemperaturową z monowarstwami jedno- (DOPC, CsA, LG), dwu- (DOPC-CsA 0,50) i trójskładnikowymi (DOPC-CsA-LG) przeniesionymi z subfazy wodnej, AA lub Ch, i na podstawie wartości CA oszacowano swobodną energię powierzchniową i jej składowe, stosując model LWAB (Równania 15-17).

Badania właściwości zwilżających powierzchni PET po modyfikacji wchodzące w skład dysertacji pozwalają lepiej zrozumieć rodzaj i wielkość oddziaływań występujących między cząsteczkami cieczy testowych imitujących środowiska o różnorodnym charakterze, a powierzchnią polimeru, a także określić zmiany tych oddziaływań w zależności od składu filmów. Jest to istotne w aspekcie biokompatybilności materiałów do zastosowań w medycynie. Odpowiedź organizmu na poziomie komórkowym, która jest związana z adhezją różnych typów komórek zależy między innymi od zwilżalności powierzchni użytego ciała obcego [41].

Rysunek 56 przedstawia wartości średnie wstępującego kąta zwilżania trzech cieczy badanych (Rysunek 56a), oraz zmian całkowitej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych (Rysunek 56b). Powierzchnia handlowa PET ma charakter hydrofobowy, co znajduje odzwierciedlenie w wysokiej wartości kąta zwilżania wody (θ^W), który wynosi $75,6^\circ \pm 1,9^\circ$ [173, 282, 283] i jest zgodny z danymi literaturowymi [268, 284, 285]. Kąt zwilżania drugiej cieczy polarnej formamidu (θ^F) przyjmuje wartość $61,0^\circ \pm 3,5^\circ$, zaś apolarnego diiodometanu (θ^D) $26,4^\circ \pm 1,7^\circ$ (Rysunek 56a). Powyższe wartości kątów zwilżania prowadzą do wyznaczenia niskiej wartości całkowitej swobodnej energii powierzchniowej, $\gamma_s^{tot} = 45,6 \text{ mJ m}^{-2}$. Całkowita wartość γ_s^{tot} w tym przypadku jest równa składowej określającej oddziaływania Lifshitza-van der Waalsa (γ_s^{LW}). Działanie plazmy powietrznej znacząco zmienia właściwości zwilżające powierzchni PET. Zarówno wartości θ^W , jak i θ^F maleją, podczas gdy θ^D wzrasta (Rysunek 56a). W konsekwencji obserwuje się wzrost $\gamma_s^{tot} = 55,8 \text{ mJ m}^{-2}$, co można powiązać ze zwiększonymi oddziaływaniami kwasowo-zasadowymi ($\gamma_s^{AB} = 13,2 \text{ mJ m}^{-2}$). Te zmiany oraz wzrost parametru chropowatości powierzchni (Rysunek 44) potwierdzają, że działanie plazmą prowadzi do powstania nowych grup funkcyjnych na powierzchni PET (między innymi $-OH$, $-C-O$, $O=C-O-$, $-C=O$, $-N-CO-N-$). Ich obecność została potwierdzona przez innych naukowców [59, 60, 174-177]. Dzięki temu oddziaływania między powierzchnią modyfikowaną a cząsteczkami cieczy odbywają się głównie za pomocą wiązań wodorowych oraz elektronów π w pierścieniach aromatycznych PET_p. Świadczy o tym zwiększona wartość parametru elektrono-donorowego γ_s^- oraz odnotowana wartość parametru elektrono-akceptorowego γ_s^+ , która wynosiła 0 mJ m^{-2} przed aktywacją powierzchni plazmą. Dzięki wzrostowi polarności powierzchni PET proces osadzania filmów z granicy faz ciecz/powietrze może zachodzić bardziej efektywnie prowadząc do uzyskania pokrycia jednorodnego, zwartego i stabilnego [173, 186]. Fakt ten został udowodniony także przez innych autorów [26]. Jest to bardzo istotne w realizacji jednego z głównych celów dysertacji, dotyczącego efektywnego przenoszenia filmów na nośnik polimerowy.



Rysunek 56 Średnie wartości (a) wstępujących kątów zwilżania wody θ^W , formamidu θ^F i diiodometanu θ^D , oraz (b) całkowitej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych, dla powierzchni PET niemodyfikowanej i modyfikowanej monowarstwami przeniesionymi z granicy faz woda/powietrze.

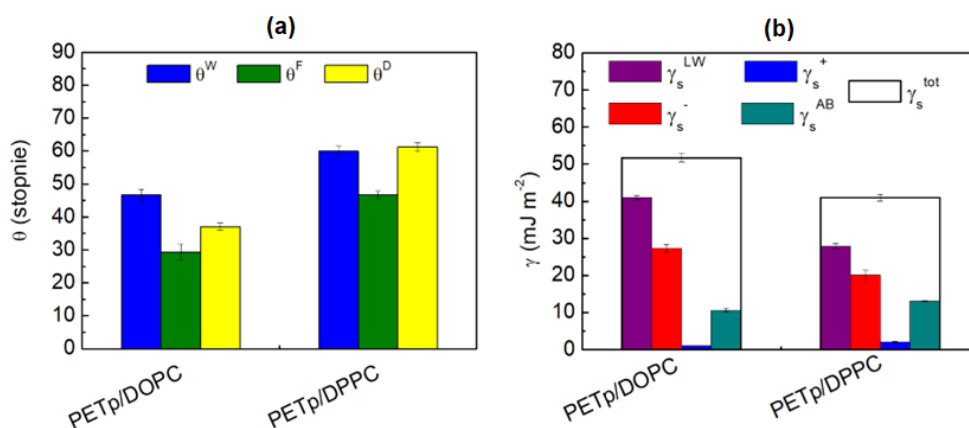
W celu określenia, w jaki sposób czas kontaktu warstwy z cieczą wpływa na wartość mierzonego kąta zwilżania, przeprowadzono pomiary kątów w ciągu 60 s od postawienia kropli. Eksperyment wykonano dla powierzchni PET_p po przeniesieniu monowarstwy fosfolipidu DOPC z granicy faz ciecz(woda/AA/Ch)/powietrze. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 12. Jak można zauważyć wartości kąta zwilżania są praktycznie stałe podczas pierwszych 10 s kontaktu [173]. Najmniejsze różnice występują w przypadku kąta zwilżania diiodometanu po osadzeniu monowarstwy z granicy faz woda/powietrze oraz AA/powietrze [186]. Jest to związane z oddziaływaniami dyspersyjnymi między cząsteczkami tworzącymi warstwę LB z tą cieczą niepolarną. Dla cieczy polarnych (wody i formamidu) widoczne są większe wahania wartości kąta zwilżania, w zakresie 0,7-3,9°. Jednak, ich najmniejsze odchylenia uzyskano w obecności cząsteczek Ch. Może to dowodzić, że chitozan zwiększa stabilność monowarstwy DOPC [186]. Z powyższych obserwacji wynika, że struktura monowarstwy DOPC nie zmienia się znacząco podczas pomiarów kąta zwilżania dokonywanych bezpośrednio po umieszczeniu kropli cieczy testowej na powierzchni analizowanej. W związku z tym, wartości prezentowane w dalszej części dysertacji również będą odnosiły się do pomiarów wykonanych bezpośrednio, w ciągu pierwszych kilku sekund. W ten sposób zmierzona wartość kąta zwilżania określa rzeczywisty stan energetyczny warstwy, który odzwierciedla jej strukturę pierwotną. Dzięki temu cel cząstkowy doktoratu dotyczący określenia zwilżalności powierzchni PET z osadzonymi monowarstwami był możliwy do zrealizowania.

Tabela 12 Średnie wartości wstępującego kąta zwilżania cieczy testowych zmierzone w czasie 60 s na monowarstwie DOPC naniesionej na PET_p z granicy faz ciecz/powietrze.

Czas (s)	Średni wstępujący kąt zwilżania		
	θ^W	θ^F	θ^D
	Subfaza wodna		
1	49,3 ± 0,5	31,3 ± 2,1	40,4 ± 0,6
2	49,2 ± 0,4	31,0 ± 1,9	40,4 ± 0,7
3	49,1 ± 0,4	30,9 ± 1,9	40,2 ± 1,0
4	49,3 ± 0,4	30,9 ± 2,0	40,4 ± 0,7
5	49,4 ± 0,4	30,7 ± 2,2	40,2 ± 1,0
6	49,2 ± 0,2	30,5 ± 2,4	40,2 ± 1,0
7	49,1 ± 0,5	30,4 ± 2,4	40,2 ± 1,0
8	49,0 ± 0,4	30,3 ± 2,3	40,2 ± 1,0
9	49,2 ± 0,7	30,2 ± 2,5	40,2 ± 1,0
10	49,1 ± 0,5	30,2 ± 2,4	40,2 ± 1,0
20	48,8 ± 0,5	29,5 ± 2,6	40,2 ± 1,0
30	48,1 ± 0,8	29,2 ± 2,7	40,2 ± 0,9
40	47,9 ± 0,4	29,1 ± 2,7	40,0 ± 1,0
50	47,1 ± 0,2	29,1 ± 2,8	40,0 ± 1,0
60	47,1 ± 0,1	29,1 ± 2,8	40,0 ± 1,0
	Subfaza AA		
1	50,4 ± 2,2	33,4 ± 0,6	39,9 ± 2,8
2	50,4 ± 2,2	33,1 ± 0,3	39,6 ± 2,6
3	50,3 ± 2,1	32,6 ± 0,7	39,6 ± 2,6
4	50,1 ± 2,5	32,4 ± 0,6	39,6 ± 2,7
5	50,0 ± 2,6	32,1 ± 0,2	39,6 ± 2,7
6	50,0 ± 2,6	31,7 ± 0,6	39,6 ± 2,6
7	49,9 ± 2,5	31,7 ± 0,5	39,8 ± 2,4
8	49,6 ± 2,2	31,6 ± 0,5	39,6 ± 2,6
9	49,3 ± 2,7	31,6 ± 0,5	39,6 ± 2,6
10	49,2 ± 2,6	31,7 ± 0,5	39,7 ± 2,7
20	48,3 ± 2,5	31,6 ± 0,4	39,7 ± 2,8
30	47,9 ± 2,8	31,6 ± 0,4	39,8 ± 2,9
40	47,4 ± 2,5	31,6 ± 0,4	38,8 ± 2,7
50	47,1 ± 2,8	31,6 ± 0,4	38,7 ± 2,9
60	46,5 ± 2,8	31,6 ± 0,4	38,8 ± 2,8
	Subfaza Ch		
1	45,4 ± 2,8	35,1 ± 2,0	38,1 ± 1,8
2	45,5 ± 2,9	34,9 ± 1,6	37,9 ± 1,5
3	45,3 ± 3,1	36,1 ± 2,7	38,0 ± 1,4
4	45,2 ± 2,8	36,2 ± 2,6	37,7 ± 1,4
5	45,3 ± 3,1	36,1 ± 2,5	37,8 ± 1,9
6	45,0 ± 3,1	34,4 ± 1,3	37,5 ± 1,6
7	44,6 ± 2,9	34,5 ± 1,2	37,6 ± 2,1
8	44,6 ± 3,2	34,0 ± 1,4	37,4 ± 1,9
9	44,6 ± 3,1	34,1 ± 1,4	37,2 ± 2,1
10	44,8 ± 3,4	34,3 ± 1,1	37,3 ± 1,6
20	44,6 ± 3,6	34,2 ± 0,9	36,3 ± 2,3
30	44,6 ± 3,6	34,2 ± 0,6	35,8 ± 2,6
40	44,6 ± 3,6	34,2 ± 0,5	35,6 ± 2,5
50	44,6 ± 3,6	34,4 ± 0,7	35,4 ± 2,7
60	44,7 ± 3,5	33,9 ± 1,0	34,9 ± 2,6

Obecność monowarstwy DOPC na powierzchni PET_p skutkuje zwiększeniem kąta zwilżania wszystkich trzech cieczy testowych (Rysunek 56a: θ^W o 31,9°, θ^F o 18,0° oraz θ^D o 3,4°). Dlatego też całkowita wartość swobodnej energii powierzchniowej ($\gamma_s^{tot} = 51,7 \text{ mJ m}^{-2}$, Rysunek 56b) i jej składowych maleje. Po osadzeniu DOPC udział γ_s^- w oddziaływaniach między cząsteczkami cieczy a monowarstwą jest prawie dwukrotnie mniejszy, natomiast γ_s^{AB} nieznacznie maleje. Większy kąt zwilżania i mniejsza całkowita wartość swobodnej energii powierzchniowej wskazują, że powierzchnia z monowarstwą ma słabszy charakter polarny, w odniesieniu do PET_p [173]. Można to powiązać ze specyficzną organizacją cząsteczek DOPC, gdzie polarne grupy fosfocholinowe są zlokalizowane bezpośrednio na podłożu PET po aktywacji, a łańcuchy węglowodorowe są skierowane w stronę powietrza i nachylone w stosunku do podłoża stałego. Dlatego też grupy polarne są mniej dostępne dla cząsteczek cieczy testowych. Nachylenie cząsteczek DOPC zostało potwierdzone także badaniami z wykorzystaniem TOF-SIMS, które wykazały brak jonu cząsteczkowego w widmach masowych (Rozdział 14.2) [173].

W celu sprawdzenia wpływu nasycenia wiązań w łańcuchu węglowodorowym na zwilżalność powierzchni naniesiono monowarstwę DPPC na PET_p. Po osadzeniu fosfolipidu DPPC uzyskano większe wartości kąta zwilżania wszystkich trzech cieczy testowych w porównaniu do PET_p/DOPC (Rysunek 57a). Największą różnicę odnotowano dla diiodometanu, którego kąt zwilżania jest większy o ponad 20°. Składowa γ_s^{LW} jest mniejsza (29,7 mJ m^{-2}), a γ_s^{AB} większa (13,1 mJ m^{-2}) dla monowarstwy DPPC (Rysunek 57b) [282, 283]. Świadczy to o tym, że większy udział w oddziaływaniach zachodzących pomiędzy cząsteczkami cieczy testowych a tworzącymi monowarstwę mają oddziaływania polarne kwasowo-zasadowe niż niepolarne Lifshitz van-der Waalsa. Wyższe wartości kątów zwilżania przekładają się także na niższą wartość γ_s^{tot} (41,0 mJ m^{-2}) [282]. Większe wartości θ^W i θ^F oraz mniejsza wartość γ_s^{tot} i jej składowych świadczą o tym, że monowarstwa DPPC jest ściślej upakowana, a jej cząsteczki są ustawione bardziej pionowo w stosunku do podłoża PET_p. Dlatego cząsteczki cieczy testowych nie mogą z łatwością penetrować monowarstwy i nie wchodzą w kontakt z podłożem plazmowanym. Ponadto inni naukowcy stwierdzili obecność jonu cząsteczkowego w badaniach fosfolipidu DPPC, który nie zawiera wiązań nienasyconych w łańcuchu węglowodorowym [195], świadcząc o bardziej pionowym ułożeniu cząsteczek w monowarstwie. Jest to więc dowód, że nasycenie łańcuchów wpływa na organizację cząsteczek w monowarstwie osadzonej na nośniku stałym, która w znaczący sposób warunkuje zwilżalność powierzchni.



Rysunek 57 Średnie wartości (a) wstępującego kąta zwilżania wody θ^W , formamidu θ^F i diiodometanu θ^D , oraz (b) całkowitej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych, dla powierzchni PET_p z monowarstwą DPPC lub DOPC przeniesioną z granicy faz woda/powietrze.

Monowarstwa CsA osadzona na PET_p także zmienia jego polarność. Uzyskano najmniejsze wartości kąta zwilżania cieczy testowych wśród badanych filmów, co świadczy o największej polarności tej powierzchni. Redukcja oddziaływań elektrono-donorowych (γ_s^-) potwierdza, że grupy funkcyjne obecne na powierzchni PET_p biorą udział w oddziaływaniach z grupami polarnymi CsA, zaś ugrupowania skierowane na zewnątrz mogą oddziaływać z cząsteczkami cieczy. Dodatkowo, struktura cykliczna cząsteczki CsA powoduje powstawanie wolnych przestrzeni, w które mogą wnikać cząsteczki cieczy testowych, wchodząc w kontakt z modyfikowanym podłożem PET_p [173]. Ponadto jak wspomniano powyżej, konformacja cząsteczek CsA ściśle zależy od polarności otoczenia, w którym one się znajdują [128, 248]. W związku z tym, przeniesienie monowarstwy CsA z subfazy wodnej na PET aktywowany plazmą o właściwościach innych niż woda, a w efekcie o innych oddziaływaniach, może powodować zmiany w konformacji cząsteczek polipeptydu oraz organizacji jego monowarstwy, które prawdopodobnie stanowią przyczynę tworzenia agregatów obserwowanych na mikrografiach AFM (Rysunek 44).

Monowarstwa LG osadzona na PET_p charakteryzuje się zbliżoną wartością swobodnej energii powierzchniowej do uzyskanych dla monowarstw trójskładnikowych DOPC-CsA-LG ($\gamma_s^{tot} = 53,6 \text{ mJ m}^{-2}$), natomiast wartości γ_s^- oraz γ_s^{AB} są większe ($\gamma_s^- = 22,6 \text{ mJ m}^{-2}$ i $\gamma_s^{AB} = 17,4 \text{ mJ m}^{-2}$) [173]. Ponadto oddziaływania $\pi - \pi$ wpływające na wielkość oddziaływań kwasowo-zasadowych mogą determinować charakterystyczne uporządkowanie monowarstwy, w którym pierścień arylowy jest zdolny do oddziaływań z czterema innymi sąsiednimi grupami aryłowymi [236]. Do podobnych wniosków doszli

Huang i współ. twierdząc, że zarówno oddziaływania $\pi - \pi$, jak i wodorowe miały znaczący wpływ na organizację monowarstwy polidopaminy, która podobnie jak LG posiada w swojej strukturze aromatyczny pierścień z grupami hydroksylowymi [284].

Jak wskazują doniesienia literaturowe powierzchnie silnie hydrofilowe, charakteryzujące się niskim kątem zwilżania wody, mogą utrudniać oddziaływania z komórkami otaczającymi implant i pomiędzy komórkami [287, 288], które mają kluczowe znaczenie w inżynierii tkankowej. Zatem można przypuszczać, że uwalnianie leku z powierzchni implantu modyfikowanego omawianą monowarstwą, a także jego transport do sąsiadujących komórek nie byłyby efektywne. Uzyskanie takich informacji jest ważne dla osiągnięcia celu, jakim jest charakterystyka właściwości fizykochemicznych monowarstw przeniesionych na PET, które mogą stanowić nowoczesne biokompatybilne powłoki dla implantów oraz pełnić rolę systemów kontrolowanego uwalniania leków. Dlatego kolejnym etapem przybliżającym do osiągnięcia celów dysertacji było zbadanie zwilżalności monowarstw mieszanych osadzonych na PET_p.

Osadzenie monowarstwy DOPC-CsA 0,50 powoduje lepszą zwilżalność ($\theta^W = 39,3^\circ \pm 2,5$) przejawiającą się w większej wartości γ_s^{tot} (Rysunek 56b) (o około 5 mJ m^{-2}) w stosunku do PET_p/DOPC. Największa zmiana w wartości kąta zwilżania obserwowana jest dla formamidu (mniejszy o ponad 20°), podczas gdy kąty zwilżania wody i diiodometanu są praktycznie takie same (Rysunek 56a). Zmiana γ_s^{tot} jest związana z niewielkim zmniejszeniem parametru elektrono-donorowego (γ_s^-), rekompensowanym przez wzrost parametru elektrono-akceptorowego (γ_s^+), co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia oddziaływań kwasowo-zasadowych (γ_s^{AB}) [173]. Jak wykazała analiza powierzchni przy wykorzystaniu spektrometrii mas, odpychanie pomiędzy cząsteczkami DOPC i CsA powoduje zmianę orientacji CsA na bardziej pionową (największa intensywność jonów cząsteczkowych, Rysunek 52c). W rezultacie ciecze testowe mogą mieć łatwiejszy dostęp do określonych fragmentów cząsteczek i/lub podłoża. Jest to szczególnie widoczne w przypadku formamidu, który w swojej strukturze posiada grupy aminową i karbonylową, zdolne do oddziaływania z cząsteczkami CsA i DOPC poprzez wiązania wodorowe [173].

Wprowadzenie LG, jako trzeciego składnika monowarstwy powoduje znaczne zmiany w zwilżalności powierzchni. Dla wszystkich monowarstw trójskładnikowych wartości γ_s^{LW} i γ_s^- maleją, przy czym γ_s^+ pozostaje praktycznie niezmiennym w odniesieniu do PET_p/DOPC-CsA 0,50 (Rysunek 56b). Sugeruje to, że obecność cząsteczek LG

w monowarstwach trójskładnikowych osłabia oddziaływania kwasowo-zasadowe między składnikami monowarstwy a cząsteczkami cieczy testowych, co przejawia się mniejszą wartością parametru elektrono-donorowego. Jednakże w miarę zwiększania ułamka molowego LG w monowarstwach oddziaływania kwasowo-zasadowe (γ_s^{AB}) ulegają wzmocnieniu [173]. Jest to związane ze strukturą przeciwutleniacza, który posiada grupy zdolne do oddziaływań zarówno przez mostki wodorowe, jak i elektrony π [235]. Dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,25 (Rysunek 56a) uzyskano największą wartość kąta zwilżania wody ($\theta^W = 57,1^\circ \pm 2,2^\circ$), formamidu ($\theta^F = 24,4^\circ \pm 2,0^\circ$), a najmniejszą diiodometanu ($\theta^D = 35,3^\circ \pm 1,6^\circ$). Ze wzrostem zawartości LG w monowarstwie, maleją kąty zwilżania cieczy polarnych, a rosną dla niepolarnego diiodometanu. Zmierzona wartość θ^D dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 wynosi $37,3^\circ \pm 1,4^\circ$. Może to być związane z najsilniejszymi oddziaływaniami i ścisłym upakowaniem cząsteczek w monowarstwie, w której łańcuchy węglowodorowe kontaktują się bezpośrednio z cieciami testowymi, podczas gdy grupy polarne przy powierzchni ciała stałego są ekranowane i niedostępne dla cząsteczek cieczy. Ponadto kąt zwilżania wody zmierzony na monowarstwie DOPC-CsA-LG 0,75 jest nieco mniejszy ($50,6^\circ \pm 0,6^\circ$) niż dla PET_p/DOPC-CsA-LG 0,50, zaś θ^D ($39,0^\circ \pm 1,8^\circ$) osiąga najwyższą wartość [173]. Zmiany wartości kąta zwilżania mają bezpośredni wpływ na wartość swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowych (Rysunek 56b). Bardzo zbliżoną wartość γ_s^{tot} obserwuje się dla monowarstw DOPC-CsA-LG 0,50 i DOPC-CsA-LG 0,75, (odpowiednio $54,4 \text{ mJ m}^{-2}$ i $54,9 \text{ mJ m}^{-2}$). Główne różnice w rodzaju oddziaływań między tymi filmami a cząsteczkami cieczy testowych przejawiają się poprzez zmiany γ_s^- i γ_s^+ . Dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 parametr elektrono-donorowy (γ_s^-) jest nieco wyższy (o ok. $3,0 \text{ mJ m}^{-2}$), natomiast parametr elektrono-akceptorowy (γ_s^+) jest niższy (o $1,0 \text{ mJ m}^{-2}$, Rysunek 56b) [173]. Obecność trzech składników (DOPC, CsA, LG) w monowarstwie wpływa na jej większe upakowanie oraz uporządkowanie, czego dowodem są większe wartości kątów zwilżania cieczy testowych w odniesieniu do monowarstw jednoskładnikowych. Pomimo, że filmy DOPC-CsA-LG są bardziej hydrofobowe niż monowarstwy jednoskładnikowe, wartość kąta zwilżania wody wynoszącą około 60° uznaje się za najbardziej pożądaną dla powierzchni kontaktujących się z krwią [67, 69, 289]. Dlatego można stwierdzić, że uzyskane monowarstwy trójskładnikowe wykazują korzystne właściwości zwilżające, które mogą zapewnić prawidłową odpowiedź organizmu. Ponadto nowatorskie połączenie fosfolipidu, immunosupresantu oraz przeciwutleniacza daje zarówno możliwość dostarczenia leku

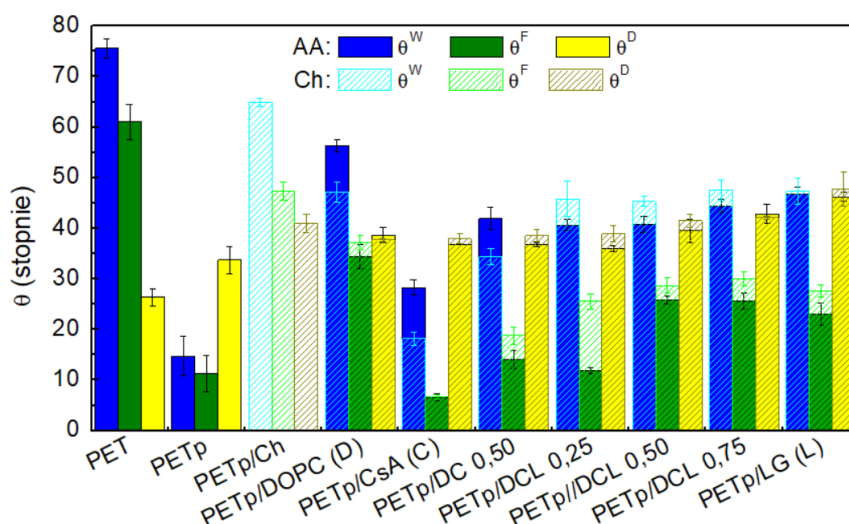
w pożądane miejsce, jak również ochronę komórek i/lub tkanek pacjenta przed wolnymi rodnikami, które powstają na skutek niepożądanych efektów ubocznych aktywności biologicznej CsA. Przedstawione wyniki pozwoliły osiągnąć jeden z celów doktoratu, który dotyczył określenia właściwości hydrofilowo-hydrofobowych powierzchni PET modyfikowanych monowarstwami wieloskładnikowymi.

Wartości kąta zwilżania zmierzone na powierzchni PET_p z monowarstwami naniesionymi z granicy faz AA/powietrze są zbliżone do uzyskanych dla filmów przenoszonych z granicy faz woda/powietrze (Rysunki 56 i 58) [173, 186]. Jest to istotne w badaniu oddziaływań zachodzących między powierzchnią implantu a znajdującymi się obok komórkami pacjenta, które są determinowane głównie przez środowisko wodne. Jednak ze względu na fakt, że 0,1% roztwór AA jest rozpuszczalnikiem dla Ch konieczne jest zbadanie wpływu również cząsteczek kwasu na zwilżalność powierzchni PET_p z osadzonymi monowarstwami. Największą wartość θ^W w grupie monowarstw jednoskładnikowych (DOPC, CsA, LG) odnotowano dla monowarstwy DOPC ($56,4^\circ \pm 1,2^\circ$, Rysunek 58). Przekłada się to na niższe wartości całkowitej swobodnej energii powierzchniowej i parametru elektrono-donorowego ($\gamma_s^- = 17,9 \text{ mJ m}^{-2}$) (Rysunek 59). Ten parametr jest mniejszy prawie o $10,0 \text{ mJ m}^{-2}$ w odniesieniu do monowarstwy fosfolipidu przeniesionej z granicy faz woda/powietrze, co może wskazywać, że cząsteczki kwasu octowego wpływają na większe upakowanie łańcuchów węglowodorowych DOPC, dzięki czemu mogą być one ustawione bardziej pionowo względem podłoża. Dlatego ciecze polarne warunkujące wartość γ_s^- mają mniejszy dostęp do polarnych ugrupowań badanych związków i/lub podłoża PET_p . Jednak zmiana nachylenia cząsteczek DOPC względem PET_p/AA nie jest w tym przypadku znacząca, ponieważ spektrometria mas nie wykazała jonu cząsteczkowego, który identyfikuje się dla cząsteczek spionizowanych względem podłoża (Rozdział 14.2) [186].

Podobnie do monowarstw przeniesionych z subfazy wodnej, największą zwilżalność stwierdzono dla powierzchni $PET_p/AA/CsA$, $\gamma_s^{tot} = 57,2 \text{ mJ m}^{-1}$, przy czym θ^W jest mniejszy o ponad $10,0^\circ$ w odniesieniu do PET_p/CsA . W tym przypadku zachodzą najsilniejsze oddziaływania kwasowo-zasadowe pomiędzy monowarstwą CsA a cząsteczkami cieczy polarnych (wody i formamidu), co przejawia się we wzroście parametru γ_s^- i w konsekwencji składowej γ_s^{AB} [186]. Taka zmiana w wartości θ^W może być spowodowana luźniejszym upakowaniem monowarstwy otrzymanej na subfazie AA (Tabela 7) [230].

Powierzchnia PET_p/AA/LG charakteryzuje się niemal identycznymi wartościami kąta zwilżania wody ($\theta^W = 46,8^\circ \pm 1,4^\circ$) i dijdometanu ($\theta^D = 46,2^\circ \pm 0,9^\circ$), co PET_p/LG [173,186]. W związku z tym uzyskano także podobne wartości γ_s^{tot} oraz jej składowych. Dowodzi to, że niewielka ilość cząsteczek kwasu octowego wprowadzona do subfazy wodnej nie wpływa na zwilżalność osadzonego filmu LG. W przypadku PET_p/AA/LG można także stwierdzić, że cząsteczki LG są nachylone względem powierzchni polimeru aktywowanego plazmą będąc bardziej dostępnymi dla cząsteczek cieczy polarnych. Dodatkowo, nachylenie cząsteczek LG potwierdza spektrometria mas, w której nie obserwuje się jonu cząsteczkowego dla monowarstwy LG osadzonej zarówno z subfazy AA, jak i wodnej [186].

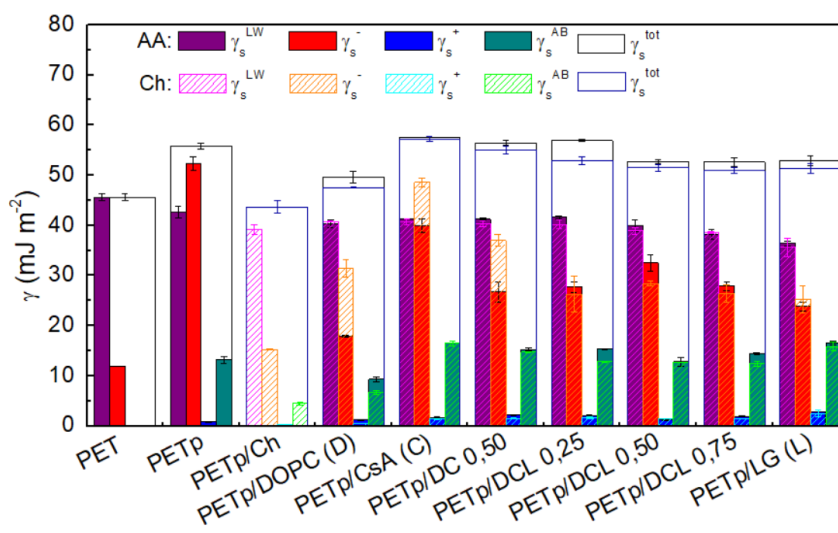
Występowanie cząsteczek DOPC i CsA w monowarstwie (DOPC-CsA 0,50) powoduje zmniejszenie wartości kąta zwilżania w stosunku do monowarstwy DOPC (Rysunek 58), a tym samym wzrost γ_s^{tot} ($56,4 \text{ mJ m}^{-2}$). Największe zmiany obserwuje się dla formamidu θ^F ($\theta^F = 14,0^\circ$), który jak wcześniej wspomniano, może z łatwością oddziaływać z cząsteczkami CsA w wyniku obecności grup aminowych i karbonylowych. Można zatem stwierdzić, że za wzrost oddziaływań kwasowo-zasadowych (γ_s^{AB}) w odniesieniu do PET_p/DOPC odpowiadają głównie cząsteczki CsA, które mogą oddziaływać poprzez wiązania wodorowe z cieciami polarnymi. W związku z podobnym upakowaniem cząsteczek (Tabele 6 i 7) oraz stabilnością (Rysunki 37 i 38) monowarstwy dwuskładnikowej otrzymanej na subfazie wodnej i AA, swobodna energia powierzchniowa oraz jej składowe w przypadku jej przenoszenia z obu ciekłych faz nośnych na PET_p są praktycznie takie same. W tym aspekcie rezultaty badań wchodzących w skład doktoratu są zadowalające, gdyż potwierdzają, że użycie kwasu octowego nie wywiera znaczącego wpływu na zwilżalność powierzchni, która jest kluczowym parametrem odpowiadającym za procesy zachodzące w organizmie po wprowadzeniu implantu.



Rysunek 58 Średnie wartości wstępującego kąta zwilżania wody, θ^W , formamidu, θ^F i diiodometanu, θ^D dla powierzchni PET niemodyfikowanej i modyfikowanej monowarstwami przeniesionymi z granicy faz AA/powietrze i Ch/powietrze.

Obecność LG w monowarstwie DOPC-CsA-LG powoduje zmniejszenie wartości γ_s^{LW} . Ponadto maleją także γ_s^+ i γ_s^{AB} , przy jednoczesnym wzroście wartości γ_s^- w odniesieniu do DOPC-CsA (Rysunek 59). Sugeruje to, że LG osłabia oddziaływania dyspersyjne w stosunku do monowarstwy DOPC-CsA. Natomiast za powyższe zmiany γ_s^- odpowiadają oddziaływania grup polarnych związanych z pierścieniem aromatycznym (Rysunek 6). Tym samym wzrost wartości parametru γ_s^- dowodzi, że oddziaływania powierzchni PET_p/AA/DOPC-CsA-LG z polarnymi cieczami testowymi poprzez grupy elektrono-donorowe są silniejsze niż dla PET_p/DOPC-CsA-LG. Wśród monowarstw trójskładnikowych DOPC-CsA-LG największe wartości kąta zwilżania polarnych cieczy testowych uzyskuje się dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 ($\theta^W = 40,8^\circ \pm 1,6^\circ$, $\theta^F = 25,8^\circ \pm 0,8^\circ$) i 0,75 ($\theta^W = 44,4^\circ \pm 1,3^\circ$, $\theta^F = 25,7^\circ \pm 1,6^\circ$, Rysunek 58). Wiąże się to z silnymi oddziaływaniami przyciągającymi między cząsteczkami tworzącymi monowarstwę, przy czym najsilniejsze przyciąganie (Rysunek 28) oraz największe upakowanie ($C_s^{-1} = 50,1 \text{ mN m}^{-1}$, Tabela 7) występuje dla DOPC-CsA-LG 0,50 [230]. Jak pokazano powyżej, całkowita swobodna energia powierzchniowa dla monowarstw DOPC-CsA-LG o ułamkach molowych LG 0,50 i 0,75 jest bardzo podobna niezależnie od typu subfazy (woda i AA), z której zostały przeniesione. Niewielkie różnice w oddziaływaniach kwasowo-zasadowych (Rysunek 59) można przypisać upakowaniu monowarstw, którego stopień wpływa na chropowatość powierzchni [173, 186].

Kolejnym krokiem w badaniach wchodzących w zakres dysertacji było określenie zwilżalności powierzchni polimeru modyfikowanego monowarstwami w obecności filmu Ch. Ze względu na to, że powierzchnia PET aktywowana plazmą powietrzną posiada grupy funkcyjne ($-OH$, $-C-O$, $O=C-O-$, $-C=O$, $-N-CO-N-$) oraz pierścienie aromatyczne, które są źródłem elektronów π , może oddziaływać z grupami hydroksylowymi ($-OH$) i aminowymi ($-NH_2/-NH_3^+$) chitozanu poprzez oddziaływania kwasowo-zasadowe prowadząc do silnej adhezji polisacharydu i utworzenia stabilnego filmu. Ponadto nie można wykluczyć także powstawania wiązań chemicznych. Analogiczne wnioski podali inni naukowcy [176, 270]. Możliwe jest utworzenie wiązania estrowego pomiędzy grupami funkcyjnymi poli(tereftalanu etylenu) wprowadzonymi w wyniku działania plazmą a chitozanem. Gonzalez i Hick zaproponowali podobny rodzaj wiązania polimeru z warstwą Ch [290].



Rysunek 59 Średnie wartości całkowitej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych dla powierzchni PET niemodyfikowanej i modyfikowanej monowarstwami przeniesionymi z granicy faz AA/powietrze i Ch/powietrze.

Film chitozanu na powierzchni PET_p powoduje wzrost wartości kąta zwilżania cieczy polarnych (θ^W i θ^F) o prawie $20,0^\circ$, podczas gdy θ^D jest tylko nieznacznie większy w stosunku do PET_p (Rysunek 58). Wskazuje to, że Ch prowadzi do osłabienia siły oddziaływań PET_p z badanymi cieczami [186]. Wyższe wartości kąta zwilżania korelują ze zmniejszoną wartością γ_s^{tot} , podobną do γ_s^{tot} podłoża PET niemodyfikowanego (Rysunek 59). Podstawowa różnica polega na tym, że film Ch wykazuje zdolność

oddziaływania z cieciami nie tylko siłami dyspersyjnymi, ale także poprzez oddziaływania kwasowo-zasadowe ($\gamma_s^{AB} = 4,5 \text{ mJ m}^{-2}$).

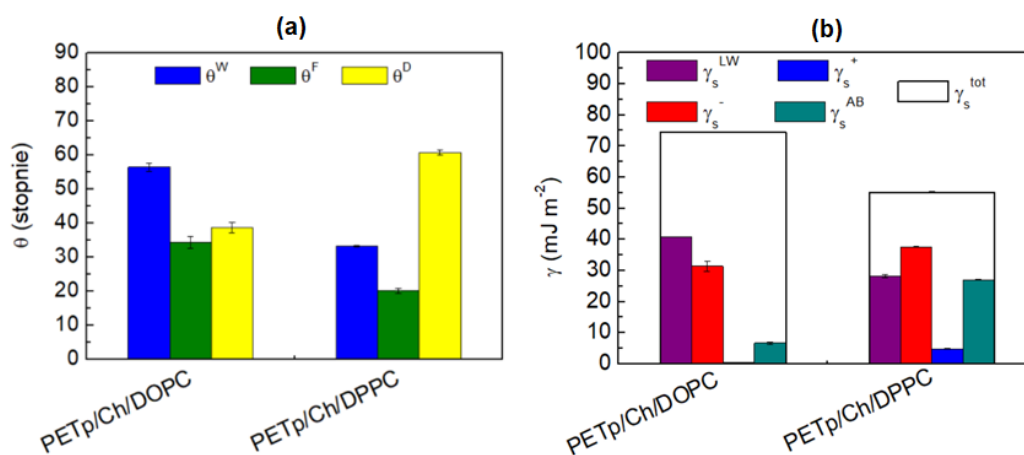
Osadzanie badanych monowarstw na powierzchni PET_p z subfazy Ch powoduje wzrost polarności powierzchni w stosunku do PET_p/Ch (Rysunki 58 i 59). Wśród monowarstw jednoskładnikowych najniższy kąt zwilżania polarnych cieczy testowych, a tym samym największa swobodna energia powierzchniowa ($\gamma_s^{tot} = 57,2 \text{ mJ m}^{-2}$) charakteryzuje powierzchnię PET_p/Ch/CsA. Dodatkowo θ^W jest niższy niż ten uzyskany dla PET_p/AA/CsA (Rysunek 58). Przyczyną tego zjawiska są prawdopodobnie zmiany orientacji i/lub konformacji cząsteczek polipeptydu w obecności Ch. Potwierdza to spektrometria mas. Jony pseudocząsteczkowe i cząsteczkowe mają wyższą intensywność względną (Rysunek 55c). Ponadto intensywność najbardziej reprezentatywnego fragmentu ($m/z = 100$) wskazuje na większe pokrycie powierzchni PET_p/Ch cząsteczkami CsA [186]. Co zaskakujące, takiego zachowania nie można uzasadnić wartością modułu ściśliwości, która jest prawie taka sama w obecności lub bez warstwy chitozanu (Tabele 6 i 7) [230]. Uzyskanie zwiększonego pokrycia powierzchni cząsteczkami polipeptydu w obecności Ch jest obiecujące w kontekście zastosowań medycznych, gdyż utworzenie filmu o ściśle zdefiniowanych właściwościach może przyczynić się do opracowania kontrolowanego systemu dostarczania i uwalniania cyklosporyny A bezpośrednio z powierzchni biomateriału.

Przeniesienie monowarstwy DOPC również prowadzi do mniejszych wartości kąta zwilżania wody i formamidu w stosunku do PET_p/Ch (Rysunek 58). Niższe wartości θ^D uzyskuje się także dla powierzchni PET_p/Ch/DOPC ($\theta^D = 37,7 \pm 0,3^\circ$) w odniesieniu do PET_p/Ch. Odmienną zależność kątów zwilżania diiodometanu obserwuje się dla monowarstwy LG. θ^D po osadzeniu LG wzrasta o około $7,0^\circ$. Zatem, przeniesienie monowarstwy LG zmienia znacząco udział γ_s^{AB} w całkowitej swobodnej energii powierzchniowej. Z kolei po osadzeniu monowarstwy DOPC największe zmiany γ_s^{tot} są związane ze wzrostem wartości parametru elektrono-donorowego (γ_s^-) w porównaniu z PET_p/Ch (Rysunek 59) [186]. Wskazuje to, że cząsteczki cieczy polarnych mogą mieć kontakt z grupami funkcyjnymi cząsteczek tworzących film ($-OH$, $-NH_2/-NH_3^+$, $-OPO_3$, $-N^+(CH_3)_3$ – oraz $>C=O$). Natomiast, zwiększenie γ_s^{tot} powierzchni PET_p/Ch/DOPC w porównaniu z PET_p/AA/DOPC dowodzi, że cząsteczki chitozanu powodują rozluźnienie upakowania monowarstwy fosfolipidu, co koreluje ze zmniejszonymi wartościami modułu ściśliwości (Tabela 7, [230]). Zwiększona wartość swobodnej energii powierzchniowej

biomateriału może przyczynić się do wzrostu oddziaływań implant-komórka i uzyskania lepszej biokompatybilności, co stanowi jeden z celów doktoratu.

W kolejnym etapie badań określono zwilżalność powierzchni po osadzeniu monowarstwy DPPC w obecności filmu Ch. Uzyskano niższe wartości kąta zwilżania cieczy polarnych ($\theta^W = 33,2^\circ$, $\theta^F = 20,0^\circ$) i wyższe niepolarnego diiodometanu ($\theta^D = 60,7^\circ$) w porównaniu do PET_p/Ch/DOPC (Rysunek 60a). Obliczona składowa γ_s^{LW} jest mniejsza ($28,2 \text{ mJ m}^{-2}$), a γ_s^{AB} większa ($27,0 \text{ mJ m}^{-2}$) dla PET_p/Ch/DPPC (Rysunek 60b). Pomimo dużej wartości θ^D oddziaływania Lifshitz van-der Waalsa są mniejsze niż w przypadku powierzchni PET_p/Ch/DOPC. Większy udział oddziaływań kwasowo-zasadowych zachodzących pomiędzy cząsteczkami cieczy testowych a powierzchnią PET_p/Ch/DPPC świadczy o tym, że cząsteczki Ch powodują reorganizację cząsteczek DPPC w filmie Ch lub na tej powierzchni tak, że polarne części nie są silnie ekranowane przez łańcuchy węglowodorowe. Dlatego, cząsteczki cieczy polarnych mogą łatwiej oddziaływać z tymi ugrupowaniami poprzez wiązania wodorowe. Wyniki te wskazują, że monowarstwa fosfolipidu może poprawić właściwości hemostatyczne chitozanu. Dodatni ładunek Ch w pH krwi stymuluje przyciąganie ujemnie naładowanych komórek krwi. Może to prowadzić do działań niepożądanych, w tym tworzenia się skrzepów. Dla badanego układu PET_p/Ch/DPPC obserwuje się wzrost parametru elektrono-donorowego, co świadczy o wzmocnieniu oddziaływań zasadowych. W efekcie może to skutkować zmniejszeniem gęstości ładunku dodatniego Ch i minimalizacją procesu krzepnięcia, zwiększając w ten sposób prawdopodobieństwo przyjęcia ciała obcego przez organizm [283]. Układy o takich właściwościach ściśle wpisują się w osiągnięcie kolejnego z celów badawczych doktoratu, tj. wzrostu biokompatybilności a jednocześnie poprawy właściwości hemostatycznych warstw osadzonych na implantach/stentach.

Przeniesienie monowarstwy DOPC-CsA 0,50 na powierzchnię PET_p z granicy faz Ch/powietrze zwiększa jej polarność w stosunku do PET_p/Ch/DOPC (θ^W niższy o prawie $13,0^\circ$, a θ^F obniżony o ponad $18,0^\circ$, Rysunek 58). Mniejsze wartości kąta zwilżania cieczy polarnych powodują wzrost parametru elektrono-donorowego (37 mJ m^{-2} , Rysunek 59). Parametr γ_s^- ma znacząco większy udział w odniesieniu do PET_p/DOPC także stanowiąc dowód na istnienie silniejszych oddziaływań pomiędzy monowarstwą i Ch.



Rysunek 60 Średnie wartości (a) wstępującego kąta zwilżania wody θ^W , formamidu θ^F i diiodometanu θ^D , oraz (b) całkowitej swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych, dla powierzchni PET_p z monowarstwą DPPC lub DOPC przeniesioną z granicy faz Ch/powietrze.

W przypadku monowarstw trójskładnikowych DOPC-CsA-LG uzyskano większe wartości kątów zwilżania wszystkich trzech cieczy testowych (Rysunek 58). Im wyższy jest ułamek molowy LG w monowarstwie, tym charakter powierzchni jest bardziej hydrofobowy w porównaniu do monowarstwy DOPC-CsA. Jednak zmiany zwilżalności monowarstw trójskładnikowych DOPC-CsA-LG nie są znaczące. Prawdopodobnie jest to związane z podobnym upakowaniem monowarstw na granicy faz Ch/powietrze (Tabela 7) [230]. Dowodem tego są także zbliżone wartości γ_s^{tot} dla badanych monowarstw mieszanych zarówno bez filmu Ch, jak i w jego obecności. Na tej podstawie można stwierdzić, że wszystkie monowarstwy trójskładnikowe osadzone na PET_p/Ch mogą mieć wysoki potencjał aplikacyjny w chirurgii rekonstrukcyjnej. Modyfikowana powierzchnia PET będzie cechowała się lepszą biokompatybilnością, jednocześnie nie powodując silnej adhezji płytek krwi, które mogą prowadzić do negatywnej odpowiedzi gospodarza po implantacji.

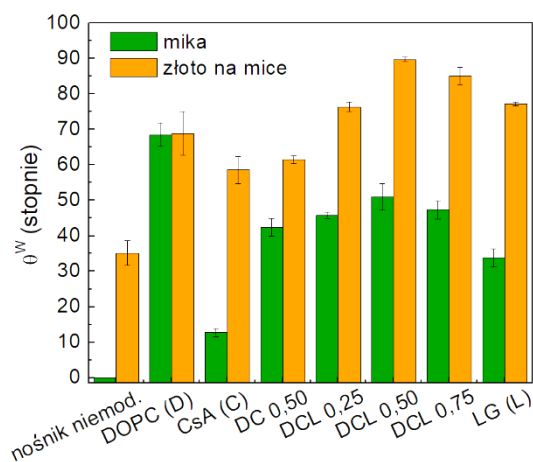
Podsumowując, przeniesienie monowarstw na polimer aktywowany plazmą powietrzną zmienia charakter jego powierzchni na bardziej hydrofobowy w stosunku do PET_p i bardziej hydrofilowy w stosunku do podłoża PET niemodyfikowanego (Rysunek 56). Zmiany charakteru hydrofilowo-hydrofobowego powierzchni można skorelować ze strukturą powierzchni po przeniesieniu monowarstw [173, 186].

Przeprowadzone w ramach doktoratu badania zwilżalności dowiodły, że zarówno cząsteczki DOPC, jak i LG nie mogą tworzyć ściśle upakowanych monowarstw, ponieważ są nachylone w stosunku do aktywowanej powierzchni polimeru. Ze względu na mniejsze

upakowanie monowarstw [231], determinowane strukturą tworzących je cząsteczek, ciecze testowe mogą oddziaływać zarówno z poszczególnymi grupami funkcyjnymi składników filmu, jak i bezpośrednio z podłożem stałym. Z kolei cząsteczki CsA mogą być znacznie bardziej pionowo zorientowane w stosunku do podłoża PET_p, dzięki czemu jej grupy polarne z łatwością oddziałują z cieczami. Ponadto ze względu na cykliczną strukturę cząsteczki leku immunosupresyjnego ciecze mogą oddziaływać z podłożem. Dlatego monowarstwa cyklosporyny A osadzona na polimerze PET_p z ciekłych faz nośnych o różnym składzie charakteryzuje się największą polarnością. Po osadzeniu filmów mieszanych DOPC-CsA-LG z granicy faz ciecz/powietrze powierzchnia PET_p jest bardziej hydrofobowa, co jest związane ze strukturą cząsteczek tworzących monowarstwę. Za mniejszą hydrofilowość odpowiadają większe siły przyciągania między cząsteczkami, czego rezultatem jest ich bardziej zwarta struktura. W efekcie cząsteczki cieczy nie kontaktują się z podłożem PET_p prowadząc do uzyskania wyższych wartości kątów zwilżania. Obecność filmu chitozanu wpływa na orientację i upakowanie cząsteczek w monowarstwach powodując zmiany w charakterze hydrofilowo-hydrofobowym modyfikowanych powierzchni PET. Zmierzone kąty zwilżania wszystkich cieczy testowych na PET_p/Ch są większe w porównaniu z PET_p/AA (za wyjątkiem filmu CsA). Wydaje się, że monowarstwy trójskładnikowe DOPC-CsA-LG osadzone na PET_p/Ch mają odpowiednie parametry fizykochemiczne i duży potencjał aplikacyjny w procesie projektowania powłok implantów. Ich właściwości zwilżające są najbardziej optymalne do zastosowań w dziedzinie inżynierii tkankowej ($30^\circ < \theta^W < 50^\circ$) [289]. Modyfikacja powierzchni PET takimi filmami pozwoliła na osiągnięcie celu dysertacji, który zakładał zaprojektowanie powierzchni o zwiększonej biokompatybilności. Ich użycie może umożliwić dostarczenie leku bezpośrednio do komórek otaczających implant lub innego miejsca przeznaczenia w organizmie.

Ze względu na fakt, że w literaturze przedmiotu można znaleźć opis implantów naczyń krwionośnych powlekanych złotem [24, 291], do badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej zastosowano podłoże o analogicznym charakterze, tj. mikę pokrytą warstwą złota. Określono zwilżalność monowarstw osadzonych na takiej powierzchni w odniesieniu do miki niepokrytej złotem. Eksperyment prowadzono przy użyciu wody z systemu Milli-Q, jako cieczy testowej. Rysunek 61 przedstawia θ^W zmierzone dla monowarstw osadzonych na powyższych nośnikach stałych. Kąt zwilżania dla niemodyfikowanej powierzchni miki z warstwą złota wynosi ok. $35,0^\circ$, zaś dla miki bez

warstwy metalu jest bliski 0° (woda rozplywa się całkowicie po powierzchni). Film DOPC przeniesiony na oba podłoża powoduje, że wartości kąta zwilżania są porównywalne i znacznie większe w odniesieniu do zmierzonych na nośnikach niepokrytych. Wynik ten wskazuje, że DOPC tworzy względnie zwartą warstwę wolną od defektów i dziur. Ta obserwacja jest zgodna z obrazami AFM pokazanymi na Rysunkach 50 i 51, a także ze skutecznym blokowaniem elektrody pracującej w eksperymentach CV (Rysunek 43) [185]. W przeciwieństwie do innych powierzchni modyfikowanych filmami LB, wartości kąta zwilżania są wyższe na monowarstwach osadzonych na złocie w porównaniu z warstwami osadzonymi na micy, co świadczy o wpływie podłoża na właściwości fizykochemiczne badanych filmów. Różnica w wartości θ^W pomiędzy powierzchniami złoto/DOPC-CsA 0,50 i mika/DOPC-CsA 0,50 wynosi około $19,0^\circ$, zaś dla monowarstwy CsA osadzonej na złocie i micy około $45,0^\circ$. W wyniku oddziaływań odpychających między cząsteczkami DOPC i CsA powstają luźno upakowane filmy z obszarami o zmniejszonym uporządkowaniu łańcuchów węglowodorowych fosfolipidu. Dlatego dla filmu dwuskładnikowego DOPC-CsA uwidacznia się większy wpływ podłoża na wartość mierzonego θ^W [185].



Rysunek 61 Średnie wartości wstępującego kąta zwilżania wody, θ^W , dla powierzchni miki i miki pokrytej złotem niemodyfikowanej oraz modyfikowanej monowarstwami przeniesionymi z granicy fazy woda/powietrze.

Z kolei obecność LG w monowarstwach mieszanych powoduje zwiększenie θ^W , ponieważ cząsteczki LG znajdują się między cząsteczkami DOPC i CsA, zwiększając gęstość łańcuchów acylowych, co zapobiega przenikaniu wody w głąb monowarstwy. Najbardziej hydrofobowa, w grupie monowarstw trójskładnikowych, jest DOPC-CsA-LG 0,50 ($89,7 \pm 0,6^\circ$ na złocie i $51,0 \pm 3,6^\circ$ na micy, Rysunek 61). Powyższa obserwacja koreluje z większą jednorodnością tej monowarstwy LB (niższy S_q) i najsilniejszym

efektem blokującym stwierdzonym na podstawie pomiarów CV [185]. Wynik ten można powiązać z charakterystycznym ułożeniem cząsteczek względem siebie. LG najchętniej gromadzi się obok cząsteczek DOPC, pełniąc funkcję ochronną przed utlenianiem dla wiązań nienasyconych fosfolipidu. Dzięki takiej organizacji łańcuchy węglowodorowe cząsteczek DOPC i LG tworzą środowisko hydrofobowe, w którym CsA może zmienić konformację z otwartej na zamkniętą, a następnie biernie penetrować obszar hydrofobowy. Jest to szczególnie ważne w procesie uwalniania CsA z powierzchni potencjalnego implantu [231].

Chemiczna heterogeniczność monowarstwy, oddziaływania w obrębie jej składników oraz lokalne zmiany w strukturze i/lub chropowatości odgrywają kluczową rolę we właściwościach zwilżających powierzchni. Poza tym, za różną hydrofobowość otrzymanych filmów odpowiadają różnice w topografii powierzchni nośników, ich chropowatości w skali nanometrów i zwilżalności. Powyższe parametry powierzchni wpływają na siłę adhezji i oddziaływania sąsiadujących cząsteczek, co skutkuje zmianami ich upakowania i ułożenia w filmie. Nieco bardziej chropowata powierzchnia miki pokryta złotem może generować luźniejsze upakowanie monowarstw. Takie struktury są bardziej przepuszczalne dla wody, która może mieć dostęp do podłoża. W związku z tym również jego właściwości powierzchniowe przyczyniają się do całkowitej zwilżalności monowarstwy. Ze względu na mniejszą hydrofilowość powierzchni miki pokrytej złotem ($\theta^W \approx 35^\circ$) niż miki ($\theta^W \approx 0^\circ$), zmierzone kąty zwilżania wody są wyższe dla monowarstw LB osadzonych na micy z warstwą złota. Niemniej jednak, mikrografie AFM (Rysunki 50 i 51) oraz wartości S_q wskazują, że na obu podłożach uzyskuje się monowarstwy jednorodne [185]. Biorąc pod uwagę zakres zmierzonych wartości kąta zwilżania (Rysunek 61), monowarstwy DOPC-CsA-LG przeniesione na mikę pokrytą złotem można sklasyfikować, jako słabo hydrofobowe ($90^\circ > \theta^W > 56-65^\circ$), natomiast monowarstwy DOPC-CsA-LG przeniesione na mikę, jako słabo hydrofilowe ($56-65^\circ > \theta^W > 0^\circ$) [292]. Niezależnie od podłoża omawiana polarność powierzchni jest pośrednia między wysoce hydrofilową a wysoce hydrofobową. Dlatego też, wyniki badań otrzymane w ramach doktoratu dotyczące mieszanych monowarstw DOPC-CsA-LG osadzonych na nośnikach stałych wskazują, że tego typu pokrycia mogą być odpowiednie do opracowania biomateriałów hemokompatybilnych o różnych zastosowaniach biomedycznych oraz pomocne w planowaniu i prowadzeniu dalszych eksperymentów *in vitro*.

15. Podsumowanie i wnioski

Ze względu na rosnące znaczenie biomateriałów w medycynie regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej istnieje potrzeba modyfikowania ich powierzchni w taki sposób, aby zwiększyć biokompatybilność. Dlatego też celem dysertacji było opracowanie nowatorskich powłok dla poli(tereftalanu etylenu), polimeru szeroko stosowanego do produkcji między innymi stentów i/lub ich powłok, w aspekcie poprawy jego biogodności. Dodatkowo zaplanowano, aby modyfikowana powierzchnia PET spełniała rolę kontrolowanego systemu uwalniania leku (CsA) z matrycy chitozanej (Ch) oraz chroniła fosfolipidy błon komórkowych, reprezentowane w pracy przez DPPC i DOPC, przed negatywnymi skutkami terapii farmakologicznej, poprzez zastosowanie przeciwutleniacza (LG).

Chcąc osiągnąć zamierzone cele konieczne było zbadanie właściwości monowarstw uzyskanych na ciekłej fazie nośnej (pierwszy etap badań) tak, aby wybrać te, które charakteryzują się najlepszą stabilnością oraz homogenicznością. Dodatkowo niezbędne było także określenie wpływu rodzaju subfazy na ich właściwości. Następne badania zaprojektowano w taki sposób, aby wybrać najbardziej odpowiednie parametry procesu przeniesienia monowarstw na podłoże stałe (drugi etap badań). Kolejny krok stanowiło osadzenie monowarstw na różnych nośnikach stałych (PET, mika, mika pokryta złotem i/lub szkło pokryte złotem) oraz scharakteryzowanie topografii i zwilżalności powierzchni, a także organizacji cząsteczkowej, które ściśle determinują biokompatybilność biomateriałów (trzeci etap badań).

Pierwszy etap badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej pozwolił na uzyskanie poniższych wniosków:

- parametry A_0 oraz π_c charakteryzujące izotermy $\pi - A$ badanych monowarstw ściśle zależą zarówno od ich składu, jak i rodzaju zastosowanej fazy nośnej,
- obecność cząsteczek chitozanu w subfazie powoduje przesunięcie izoterm w kierunku większych powierzchni przypadających na cząsteczkę, co wskazuje na penetrację monowarstwy przez Ch,
- wartości modułu ściśliwości świadczą o tym, że wszystkie badane monowarstwy znajdują się w stanie ciekłym rozprężonym lub pośrednim LE-LC, niezależnie od rodzaju zastosowanej fazy nośnej. Ciekła faza filmów koreluje z naturalną płynnością błon biologicznych, co stanowi istotny czynnik w aspekcie wzrostu biokompatybilności powłoki,

- wprowadzenie Ch do fazy nośnej wywołuje zmiany upakowania w zależności od składu monowarstw,
- wyższa temperatura eksperymentu (37°C) powoduje zmniejszenie stopnia upakowania monowarstwy CsA oraz jej penetracji przez cząsteczki Ch, co może wynikać ze zmian w elastyczności łańcuchów Ch oraz konformacji cząsteczek CsA i jej ograniczonej zdolności do tworzenia wiązań wodorowych w temperaturze fizjologicznej, ze względu na mniejszą rozpuszczalność,
- spośród filmów trójskładnikowych największe wartości modułu ściśliwości uzyskano dla monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50 na każdym rodzaju subfazy przy ciśnieniu powierzchniowym równym 10 mN m⁻¹, co dowodzi tworzenia najbardziej uporządkowanego filmu,
- wprowadzenie LG jako trzeciego składnika do monowarstwy DOPC-CsA powoduje zmianę charakteru oddziaływań międzycząsteczkowych, z odpychania na przyciąganie, co uwidacznia się w zmianie znaku nadmiarowej energii Gibbsa z dodatniej na ujemną,
- rodzaj subfazy (woda, AA, Ch) nie wpływa na oddziaływania występujące między cząsteczkami monowarstw mieszanych w aspekcie jakościowym (przyciąganie/odpychanie), a jedynie na ich wielkość,
- analiza mieszalności składników w oparciu o wartości całkowitej energii mieszania Gibbsa potwierdza stabilność termodynamiczną wszystkich badanych monowarstw DOPC-CsA-LG na każdym rodzaju ciekłej fazy nośnej. Świadczą o tym ujemne wartości energii Gibbsa, które rosną ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego. LG poprawia mieszalność DOPC-CsA pełniąc funkcję łącznika pomiędzy cząsteczkami. Monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50 jest najbardziej stabilna termodynamicznie, co może wynikać z najlepszego dopasowania strukturalnego cząsteczek przy takim składzie. Dobrze to rokuje w kontekście wykorzystania filmów do modyfikacji (powlekania) materiałów stosowanych jako implanty,
- badania morfologii przy użyciu mikroskopu kąta Brewstera wskazują na jednorodność monowarstw. Nie obserwuje się struktur domenowych w skali mikrometrów, nawet w przypadku monowarstwy DOPC-CsA 0,50, w której

występują oddziaływania odpychające między cząsteczkami fosfolipidu i immunosupresantu,

- wartości potencjału powierzchniowego, pozornego momentu dipolowego oraz modułu ściśliwości są ściśle powiązane z przebiegiem izoterm $\pi - A$ badanych monowarstw. Ponadto zależą od budowy cząsteczek, zmian ich orientacji i/lub konformacji oraz charakteru oddziaływań między nimi,
- przy powierzchni A_0 pojawiają się charakterystyczne przegięcia w przebiegu krzywych $\Delta V - A$ oraz $\mu_a - A$, które odpowiadają przejściu fazowemu G-LE. Trend zmian jest zachowany w odniesieniu do wszystkich stosowanych ciekłych faz nośnych,
- obecność Ch powoduje wzrost wartości ΔV oraz μ_a potwierdzając zmiany w ułożeniu cząsteczek w monowarstwie, a więc także ich grup potencjałotwórczych,
- chitozan może oddziaływać ze składnikami monowarstw poprzez siły LW oraz mostki wodorowe, co umożliwia tworzenie kompleksów determinujących wzrost stabilności monowarstw,
- zaproponowany mechanizm oddziaływań między cząsteczkami DOPC, CsA i LG w monowarstwie mieszanej zakłada, że LG o właściwościach przeciwutleniających, oddziałując z DOPC poprzez mostki wodorowe i siły Lifshitz van der Waalsa, lokalizuje się bliżej wiązań nienasyconych chroniąc je przed utlenieniem,
- łańcuchy węglowodorowe cząsteczek DOPC i LG zapewniają środowisko hydrofobowe dla cząsteczek CsA umożliwiając im zmianę konformacji z otwartej na zamkniętą, co jest podstawą mechanizmu transportu leku przez błony komórkowe i wspomaga uwalnianie z filmu wieloskładnikowego.

Drugi etap badań umożliwił określenie optymalnych warunków przenoszenia monowarstw z subfazy ciekłej na nośnik stały. Na ich podstawie sformułowano następujące wnioski:

- monowarstwa CsA, z grupy monowarstw jednoskładnikowych, oraz DOPC-CsA-LG 0,50, z grupy monowarstw mieszanych, wykazują największą stabilność, o czym świadczą najmniejsze zmiany ciśnienia powierzchniowego w czasie 60 min relaksacji,
- pomiary relaksacji, stabilizacji i izoterm sprężania-rozprężania wskazują, że wybrane wartości ciśnienia powierzchniowego 10 mN m^{-1} oraz szybkości ruchu barierok 5 mm min^{-1} są odpowiednie do przenoszenia badanych monowarstw z subfazy ciekłej na podłoże stałe,
- wyznaczone wartości współczynnika przeniesienia (TR) bliskie jedności, skorygowane o straty cząsteczek podczas procesu, świadczą o ilościowym przeniesieniu monowarstw na różne nośniki,
- technika QCM potwierdza największe pokrycie powierzchni elektrod złotych w przypadku użycia monowarstwy DOPC-CsA-LG 0,50, oraz że ciśnienie powierzchniowe równe 10 mN m^{-1} zapewnia spójność przeniesionych monowarstw pomimo ich luźnego upakowania,
- woltamperogramy cykliczne dowodzą, że monowarstwy zostały efektywnie osadzone na powierzchni elektrody. Spośród monowarstw mieszanych najsilniejsze blokowanie przepływu jonów pomiędzy roztworem a elektrodą pracującą występuje po przeniesieniu monowarstw DOPC-CsA-LG 0,50 i 0,75. Świadczy to o ich największym upakowaniu, a w perspektywie aplikacyjnej może zabezpieczać podłoże metaliczne przed bezpośrednim kontaktem z otaczającym środowiskiem, i chronić przed negatywnymi skutkami tego kontaktu.

Trzeci etap badań umożliwił scharakteryzowanie powierzchni stałych z osadzonymi monowarstwami, prowadząc do następujących wniosków:

- chropowatość powierzchni ściśle zależy od struktury cząsteczek tworzących monowarstwę oraz jej składu,
- mikrografie AFM w odróżnieniu od techniki BAM pokazują obecność domen po przeniesieniu monowarstw na polimer. Może to wynikać zarówno z różnic w rozdzielczości obu mikroskopów, jak i ze zmian w organizacji cząsteczek tworzących monowarstwę podczas ich przeniesienia z ciekłej fazy nośnej na podłoże stałe,
- największe wygładzenie powierzchni PET występuje po przeniesieniu monowarstw z granicy faz woda/powietrze. Obecność Ch w subfazie powoduje wzrost chropowatości powierzchni osadzonego filmu, z wyjątkiem powierzchni PET_p/CsA oraz PET_p/AA. Wyznaczona chropowatość powierzchni mieści się w optymalnym zakresie określonym dla materiałów hemokompatybilnych,
- rodzaj podłoża ma zazwyczaj decydujący wpływ na chropowatość osadzonych monowarstw. Przeniesienie na mikę oraz mikę z warstwą złota prowadzi do uzyskania powierzchni filmów o mniejszej chropowatości niż dla monowarstw osadzonych na PET,
- analiza TOF-SIMS potwierdza, że cząsteczki tworzące monowarstwę są nachylone względem podłoża (brak jonów cząsteczkowych dla DOPC i LG), co wynika z ich struktury oraz wzajemnych oddziaływań determinujących stan fizyczny,
- cząsteczki LG lokują się obok cząsteczek DOPC, w pobliżu wiązań nienasyconych, co może zapewnić ochronę fosfolipidu przed szkodliwym działaniem wolnych rodników,
- analiza widm masowych wskazuje na korelację między składem jakościowym i ilościowym monowarstw na granicy faz ciecz/powietrze oraz na podłożu stałym potwierdzając efektywne przenoszenie filmów. Jednocześnie uzyskane nowatorskie wyniki dowodzą użyteczności metody w określaniu uporządkowania i upakowania układów tego typu,

- obecność filmu Ch wpływa na organizację cząsteczkową monowarstw, co przejawia się w intensywnościach charakterystycznych fragmentów $m/z = 184, 166, 104, 100, 153, 170, 171$ oraz obecności jonu cząsteczkowego dla DOPC. Wyniki wskazują, że na skutek oddziaływań Ch z fosfolipidem zmniejsza się nachylenie cząsteczek warunkując tworzenie stabilnych układów o zwiększonym upakowaniu,
- właściwości hydrofilowo-hydrofobowe powierzchni PET_p modyfikowanej zarówno filmem chitozanu, jak i monowarstwami mieszanymi mieszczą się w optymalnym zakresie zwilżalności ($30^\circ > \theta^W > 50^\circ$) powierzchni materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej,
- modyfikacja PET plazmą powietrzną i/lub filmami wieloskładnikowymi powoduje wzrost swobodnej energii powierzchniowej polimeru. Stanowi ona kluczowy czynnik determinujący oddziaływania z otaczającym środowiskiem o różnym charakterze, zarówno polarnym, jak i niepolarnym.

Na podstawie wniosków przedstawionych powyżej można stwierdzić, że monowarstwy trójskładnikowe DOPC-CsA-LG charakteryzują się największą stabilnością i homogenicznością na granicy faz ciecz/powietrze. Dzięki temu mogą być efektywnie przenoszone na polimer PET_p zapewniając obecność jednocześnie cząsteczek polisacharydu, fosfolipidu, immunosupresantu i przeciwutleniacza na powierzchni biomateriału. Unikatowy skład filmów będących kombinacją różnych związków nadaje szczególne właściwości uzyskanym biomateriałom i zwiększa ich potencjał aplikacyjny. Dlatego ich wykorzystanie jest obiecujące również w aspekcie wzrostu hemokompatybilności polimeru PET. Dodatkowo pokrycia dla implantów (w tym stentów) mogą pełnić rolę systemu kontrolowanego uwalniania i dostarczania leku bezpośrednio do miejsca przeznaczenia. Ponadto mogą zapewnić ochronę błon komórkowych przed ich uszkodzeniem w związku z niepożądanymi efektami ubocznymi terapii z użyciem CsA.

Opisane w dysertacji badania właściwości fizykochemicznych filmów o nowatorskim składzie i określonej organizacji cząsteczkowej, wykorzystanych do pokrycia polimeru PET, a także innych nośników, przybliżają otrzymanie biokompatybilnej powierzchni materiału do zastosowań medycznych, co otwiera perspektywę dalszych badań *in vitro* oraz *in vivo*.

16. Literatura

- [1] Farhatnia, Y., Tan, A., Motiwala, A., Cousins, B.G., Seifalian, A.M., 2013. Evolution of covered stents in the contemporary era: clinical application, materials and manufacturing strategies using nanotechnology. *Biotechnol. Adv.* 31, 524–542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.12.010>
- [2] Minion, D., 2015. Stent graft material factors that impact limb complication rates. *Endovasc. Today.* 31, 9-11. <https://evtoday.com/issues/2015-sept> (03.02.2023).
- [3] Li, T., Ma, K., Zhang, T., 2022. UV-curable semi-interpenetrating matrix for polyester fabric-covered stents. *Progr. Org. Coat.* 172, 107084. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107084>
- [4] Beshchasna, N., Saqib, M., Krasewicz, H., Wasyluk, Ł., Kuzmin, O., Duta, O.C., Fikai, D., Ghizdavet, Z., Marin, A., Fikai, A., Sun, Z., Pichugin, V.F., Optiz, J., Andronescu, E., 2020. Recent advances in manufacturing innovative stents. *Pharmaceutics* 12, 349. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040349>
- [5] Díaz-Montes, E., Castro-Muñoz, R., 2021. Trends in chitosan as a primary biopolymer for functional films and coatings manufacture for food and natural products. *Polymers* 13, 767. <https://doi.org/10.3390/polym13050767>
- [6] Ładniak, A., Jurak, M., Palusińska-Szyszyk, M., Wiącek, A.E., 2022. The Influence of polysaccharides/TiO₂ on the model membranes of dipalmitoylphosphatidylglycerol and bacterial lipids. *Molecules* 27, 343. <https://doi.org/10.3390/molecules27020343>
- [7] Zhang, S., Zhang, F., Feng, B., Fan, Q., Yang, F., Shang, D., Sui, J., Zhao, H., 2015. Hematopoietic stem cell capture and directional differentiation into vascular endothelial cells for metal stent-coated chitosan/hyaluronic acid loading CD133 antibody. *Tissue. Eng. Part. A* 21, 1173–1183. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0352>
- [8] Haeri, A., Sadeghian, S., Rabbani, S., Anvari, M.S., Ghassemi, S., Radfar, F., Dadashzadeh, S., 2017. Effective attenuation of vascular restenosis following local delivery of chitosan decorated sirolimus liposomes. *Carbohydr. Polym.* 157, 1461–1469. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.021>
- [9] Kersani, D., Mugin, J., Lopez, M., Degoutin, S., Tabary, N., Cazaux, F., Janus, L., Maton, M., Chai, F., Sobocinski, J., Blanchemain, N., Martel, B., 2020. Stent coating by electrospinning with chitosan/poly-cyclodextrin based nanofibers loaded with simvastatin for restenosis prevention. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 150, 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.017>

- [10] Baldrick, P., 2010. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.09.015>
- [11] Tedesco, D., Haragsim, L., 2012. Cyclosporine: A Review. *J. Transplant.* 2012, 230386. <https://doi.org/10.1155/2012/230386>
- [12] Chighizola, C.B., Ong, V.H., Meroni, P.L., 2017. The use of cyclosporine A in rheumatology: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 52, 401–423. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8582-3>
- [13] Wiącek, A.E., Jurak, M., Ładniak, A., Przykaza, K., Szafran, K., 2020. Cyclosporine CsA—The physicochemical characterization of liposomal and colloidal systems. *Colloids and Interfaces* 4, 46. <https://doi.org/10.3390/colloids4040046>
- [14] Hao, X., Zhang, H., Liu, R., Che, J., Zhang, D., Liang, J., Sun, L., 2022. Red blood cell membrane functionalized biomimetic nanoparticles for systemic lupus erythematosus treatment. *Mater. Today Adv.* 16, 100294. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100294>
- [15] Akbulut, S., Elbe, H., Eris, C., Dogan, Z., Toprak, G., Yalcin, E., Otan, E., Turkoz, Y., 2015. Effects of antioxidant agents against cyclosporine-induced hepatotoxicity. *J. Surg. Res.* 193, 658–666. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.08.042>
- [16] Chin, Y., Tu, H., Lin, C., Kuo, P., Chiu, H., Liu, S., Lee, S., Fu, E., 2021. Antioxidants protect against gingival overgrowth induced by cyclosporine A. *J. Periodont. Res.* 56, 937-407. <https://doi.org/10.1111/jre.12832>
- [17] Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F.B., Creczynski-Pasa, T.B., 2013. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 60, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.056>
- [18] Kubo, I., Masuoka, N., Xiao, P., Haraguchi, H., 2002. Antioxidant activity of dodecyl gallate. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3533–3539. <https://doi.org/10.1021/jf011250h>
- [19] Kubo, I., Xiao, P., Nihei, K., Fujita, K., Yamagiwa, Y., Kamikawa, T., 2002. Molecular design of antifungal agents, *J. Agric. Food Chem.* 50, 3992–3998. <https://doi.org/10.1021/jf020088v>
- [20] Badavi, M., Sadeghi, N., Dianat, M., Samarbafzadeh, A., 2017. Gallic acid and cyclosporine mixture and their effects on cardiac dysfunction induced by ischemia/reperfusion and eNOS/iNOS Expression. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 30, 207–218. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20170047>

- [21] Im, S.H., Im, D.H., Park, S.J., Jung, Y., Kim, D.-H., Kim, S.H., 2022. Current status and future direction of metallic and polymeric materials for advanced vascular stents. *Progr. Mater. Sci.* 126, 100922. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2022.100922>
- [22] Raval, A., Choubey, A., Engineer, C., Kothwala, D., 2004. Development and assessment of 316LVM cardiovascular stents. *Mater. Sci. Eng.: A* 386, 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2004.07.051>
- [23] Holmes, D.R., Kereiakes, D.J., Garg, S., Serruys, P.W., Dehmer, G.J., Ellis, S.G., Williams, D.O., Kimura, T., Moliterno, D.J., 2010. Stent thrombosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56, 1357–1365. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.07.016>
- [24] Navarro, L., Duffó, G., Vetcher, D., P. Moles, V., A. Luna, J., Rintoul, I., 2020. Coating induced corrosion of coronary stents – A comparative study with clinical consequences. *Trends Med.* 20. <https://doi.org/10.15761/TiM.1000220>
- [25] Tzoneva, R., Seifert, B., Albrecht, W., Richau, K., Groth, T., Lendlein, A., 2008. Hemocompatibility of poly(ether imide) membranes functionalized with carboxylic groups. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 19, 3203–3210. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3456-8>
- [26] Pandiyaraj, K.N., Selvarajan, V., Rhee, Y.H., Kim, H.W., Shah, S.I., 2009. Glow discharge plasma–induced immobilization of heparin and insulin on polyethylene terephthalate film surfaces enhances anti–thrombogenic properties. *Mater. Sci. Eng. C* 3, 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.07.013>
- [27] Bota, P.C.S., Collie, A.M.B., Puolakkainen, P., Vernon, R.B., Sage, E.H., Ratner, B.D., Stayton, P.S., 2010. Biomaterial topography alters healing in vivo and monocyte/macrophage activation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 95A, 649–657. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32893>
- [28] Chen, L., Han, D., Jiang, L., 2011. On improving blood compatibility: from bioinspired to synthetic design and fabrication of biointerfacial topography at micro/nano scales. *Coll. Surf. B Biointerf.* 85, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.034>
- [29] Anderson, J.M., 2012. Biocompatibility, w: Matyjaszewski, K., Möller, M., *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Elsevier, Amsterdam, 363–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00229-6>
- [30] Modic, M., Junkar, I., Vesel, A., Mozetic, M., 2012. Aging of plasma treated surfaces and their effects on platelet adhesion and activation. *Surf. Coat. Technol.* 213, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.10.026>
- [31] Navarro, L., Luna, J., Rintoul, I., 2017. Surface conditioning of cardiovascular 316l stainless steel stents: A review. *Surf. Rev. Lett.* 24, 1730002.

<https://doi.org/10.1142/S0218625X17300027>

- [32] Bernard, M., Jubeli, E., Pungente, M.D., Yagoubi, N., 2018. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices – regulations, in vitro screening and risk-management. *Biomater. Sci.* 6, 2025–2053. <https://doi.org/10.1039/C8BM00518D>
- [33] Vesel, A., Junkar, I., Cvelbar, U., Kovac, J., Mozetic, M., 2008. Surface modification of polyester by oxygen- and nitrogen-plasma treatment. *Surf. Inter. Anal.* 40, 1444–1453. <https://doi.org/10.1002/sia.2923>
- [34] Rodrigues, A., Figueiredo, L., Diogo, H., Bordado, J., 2018. Mechanical behavior of PET fibers and textiles for Stent-Grafts using video extensometry and image analysis. *Sci. Technol. Mater.* 30, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.stmat.2018.11.001>
- [35] Rahmati, M., Silva, E.A., Reseland, J.E., Heyward, C.A., Haugen, H.J., 2020. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chem. Soc. Rev.* 49, 5178–5224. <https://doi.org/10.1039/D0CS00103A>
- [36] Lau, K., Heu, C., Moore, M.J., Zhang, A., Akhavan, B., Wise, S.G., Bilek, N.M.M., Lord, M.S., Rnjak-Kovacina, J. 2022. Effect of plasma ion immersion implantation on physiochemical and biological properties of silk towards creating a versatile biomaterial platform. *Mater. Today Adv.* 13, 100212. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100212>
- [37] Shahmohammadi, M., Nagay, B.E., Barão, V.A.R., Sukotjo, C., Jursich, G., Takoudis, C.G., 2022. Atomic layer deposition of TiO₂, ZrO₂ and TiO₂/ZrO₂ mixed oxide nanofilms on PMMA for enhanced biomaterial functionalization. *Appl. Surf. Sci.* 578, 151891. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151891>
- [38] Song, X., Tang, Z., Liu, W., Chen, K., Liang, J., Yuan, B., Lin, H., Zhu, X., Fan, Y., Shi, X., Zhao, P., Yang, L., Zhang, K., Mikos, A.G., Zhang, X., 2022. Biomaterials and regulatory science. *J. Mater. Sci. Technol.* 128, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2022.04.018>
- [39] Williams, D.F., 1986. Proceedings of Congress Conference of the European Society of Biomaterials, England Co 4, Elsevier, Nowy York.
- [40] Ratner, B.D., 1993. New ideas in biomaterials science-a path to engineered biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 27 837–850. <https://doi.org/10.1002/jbm.820270702>.
- [41] Jurak, M., Wiącek, A.E., Ładniak, A., Przykaza, K., Szafran, K., 2021. What affects the biocompatibility of polymers? *Adv. Colloid. Interface Sci.* 294, 102451. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102451>

- [42] Gao, J., Yu, X., Wang, X., He, Y., Ding, J., 2022. Biomaterial–related cell microenvironment in tissue engineering and regenerative medicine. *Eng.* 13, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.11.025>
- [43] Ikada, Y., 2006. Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* 3, 589–601. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>
- [44] Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T., 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 20, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
- [45] Spiller, K.L., Koh, T.J., 2017. Macrophage-based therapeutic strategies in regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 122, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.010>
- [46] Metwally, S., Stachewicz, U., 2019. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Mater. Sci. Eng. C* 104, 109883. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109883>
- [47] Ullah, S., Chen, X., 2020. Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. *Appl. Mater. Today* 20, 100656. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100656>
- [48] Soni, S.S., Rodell, C.R., 2021. Polymeric materials for immune engineering: Molecular interaction to biomaterial design. *Acta Biomat.* 133, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.016>
- [49] Anselme, K., 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21, 667–681. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2)
- [50] Trepap, X., Lenormand, G., Fredberg, J.J., 2008. Universality in cell mechanics. *Soft Matter* 4, 1750–1759. <https://doi.org/10.1039/B804866E>
- [51] Khalili, A.A., Ahmad, M.R., 2015. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>
- [52] Rahman, M., Dutta, N.K., Roy Choudhury, N., 2020. Magnesium alloys with tunable interfaces as bone implant materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 564. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00564>
- [53] Seifert, B., Mihanetzis, G., Groth, T., Albrecht, W., Richau, K., Missirlis, Y., Paul, D., Von Sengbusch, G., 2002. Polyetherimide: A new membrane–forming polymer for biomedical applications. *Artif. Org.* 26, 189–199. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2002.06876.x>

- [54] Sperling, C., Schweiss, R.B., Streller, U., Werner, C., 2005. In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups. *Biomaterials* 26, 6547–6557. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.042>
- [55] Sefton, M.V., Sawyer, A., Gorbet, M., Black, J.P., Cheng, E., Gemmell, C., Pottinger-Cooper, E., 2001. Does surface chemistry affect thrombogenicity of surface modified polymers? *J. Biomed. Mater. Res.* 55, 447–459. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010615\)55:4<447::AID-JBM1036>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010615)55:4<447::AID-JBM1036>3.0.CO;2-5)
- [56] Tengvall, P., Askendal, A., Lundström, I., Elwing, H., 1992. Studies of surface activated coagulation: antisera binding onto methyl gradients on silicon incubated in human plasma in vitro. *Biomaterials* 13, 367–374. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90042-M](https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90042-M)
- [57] Grunkemeier, J.M., Tsai, W.B., Horbett, T.A., 1998. Hemocompatibility of treated polystyrene substrates: Contact activation, platelet adhesion, and procoagulant activity of adherent platelets. *J. Biomed. Mater. Res.* 41, 657–670. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980915\)41:4<657::AID-JBM18>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980915)41:4<657::AID-JBM18>3.0.CO;2-B)
- [58] Tyan, Y.-C., Liao, J.-D., Klauser, R., Wu, I.-D., Weng, C.-C., 2002. Assessment and characterization of degradation effect for the varied degrees of ultra-violet radiation onto the collagen-bonded polypropylene non-woven fabric surfaces. *Biomaterials* 23, 65–76. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00080-1)
- [59] Junkar, I., Vesel, A., Cvelbar, U., Mozetič, M., Strnad, S., 2009. Influence of oxygen and nitrogen plasma treatment on polyethylene terephthalate (PET) polymers. *Vacuum* 1, 83–85. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2009.04.011>
- [60] Bui, V.-T., Liu, X., Ko, S.H., Choi, H.-S., 2015. Super-amphiphilic surface of nano silica/polyurethane hybrid coated PET film via a plasma treatment. *J. Colloid Interface Sci.* 453, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.065>
- [61] Junkar, I., 2016. Interaction of cells and platelets with biomaterial surfaces treated with gaseous plasma, w *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*. Iglič, A., Kulkarni, C.V., Rappolt, M. (Eds.). Academic Press, 25–59. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2016.01.002>
- [62] Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., Perry, C.C., 2007. Modern biomaterials: A review—bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 18, 1263–1277. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0064-3>
- [63] Downes, S., Mishra, A.A., 2011. Tissue-biomaterial interactions, w *Advanced wound repair therapies*, Farrar, D. (Ed.). Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, 174–185.

<https://doi.org/10.1533/9780857093301.2.174>

- [64] Kongdee, A., Bechtold, T., Teufel, L., 2005. Modification of cellulose fiber with silk sericin. *J. Appl. Polymer Sci.* 96, 1421–1428. <https://doi.org/10.1002/app.21576>
- [65] Spijker, H.T., Bos, R., Busscher, H.J., van Kooten, T.G., van Oeveren, W., 2002. Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Biomaterials* 23, 757–766. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00181-8)
- [66] Rodrigues, S.N., Gonçalves, I.C., Martins, M.C.L., Barbosa, M.A., Ratner, B.D., 2006. Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl–/methyl–terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials* 27, 5357–5367. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.010>
- [67] Xu, L.-C., Siedlecki, C.A., 2007. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28, 3273–3283. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.032>
- [68] Vogler, E.A., Graper, J.C., Harper, G.R., Sugg, H.W., Lander, L.M., Brittain, W.J., 1995. Contact activation of the plasma coagulation cascade. I. Procoagulant surface chemistry and energy. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 1005–1016. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290813>
- [69] Yanagisawa, I., Sakuma, H., Shimura, M., Wakamatsu, Y., Yanagisawa, S., Sairenji, E., 1989. Effects of “wettability” of biomaterials on culture cells. *Eur. J. Oral Implantol.* 15, 168–177.
- [70] Yuan, Y., Zhang, P., Yang, Y., Wang, X., Gu, X., 2004. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 25, 4273–4278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.029>
- [71] Kafi, M.A., Aktar, K., Todo, M., Dahiya, R., 2020. Engineered chitosan for improved 3D tissue growth through Paxillin–FAK–ERK activation. *Regen. Biomater.* 7, 141–151. <https://doi.org/10.1093/rb/rbz034>
- [72] Liang, C., Ling, Y., Wei, F., Huang, L., Li, X., 2020. A novel antibacterial biomaterial mesh coated by chitosan and tigecycline for pelvic floor repair and its biological performance. *Regen. Biomater.* 7, 483–490. <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa034>
- [73] Murphy, J.G., Schwartz, R.S., Edwards, W.D., Camrud, A.R., Vlietstra, R.E., Holmes, D.R., 1992. Percutaneous polymeric stents in porcine coronary arteries. Initial experience with polyethylene terephthalate stents. *Circulation* 86, 1596–1604. <https://doi.org/10.1161/01.cir.86.5.1596>

- [74] Koromila, G., Michanetzis, G.P.A., Missirlis, Y.F., Antimisiaris, S.G., 2006. Heparin incorporating liposomes as a delivery system of heparin from PET-covered metallic stents: Effect on haemocompatibility. *Biomaterials* 27, 2525–2533. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.017>
- [75] Kastrati, A., Schömig, A., Dirschinger, J., Mehilli, J., von Welser, N., Pache, J., Schühlen, H., Schilling, T., 2000. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: Results of a randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease. *Circulation* 30, 2478–2483. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.21.2478>.
- [76] Edelman, E.R., Seifert, P., Groothuis, A., Bornstein, D., Rogers, C., 2001. Gold-coated NIR stents in porcine coronary arteries. *Circulation* 103, 429–434. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.3.429>
- [77] vom Dahl, J., Haager, P.K., Grube, E., Gross, M., Beythien, C., Kromer, E.P., Cattelaens, N., Hamm, C.W., Hoffmann, R., Reineke, T., Klues, H.G., 2002. Effects of gold coating of coronary stents on neointimal proliferation following stent implantation. *Am. J. Card.* 89, 801–805. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02188-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02188-4)
- [78] Domb, A.J., Kumar, N., Ezra, A., 2011. *Biodegradable polymers in clinical use and clinical development* John Wiley & Sons, Inc. Kanada.
- [79] Middleton, J.C., Tipton, A.J. 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21, 2335-2346. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00101-0)
- [80] Gupta, A.P., Kumar, V. 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers–polylactide: A critique. *Eur. Polym. J.* 43, 4053–4074. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.045>
- [81] Luten, J., van Nostrum, C.F., De Smedt, S.C., Hennink, W.E., 2008. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J. Control. Release* 126, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.028>
- [82] Khan, W., Hosseinkhani, H., Ickowicz, D., Hong, P.-D., Yu, D.-S., 2012. Polysaccharide gene transfection agents. *Acta Biomater.* 8, 4224–4232. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.022>
- [83] Gunatillake, P.A., Adhikari, R., 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* 5, 1–16. <https://doi.org/10.22203/eCM.v005a01>
- [84] Gunatillake, P., Mayadunne, R., Adhikari, R., 2006. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnol Annu Rev* 12, 301–347. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(06\)12009-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(06)12009-8)

- [85] Szalzyngier, W., Brzozowski, Z.K., 2012. Tworzywa sztuczne, Tom 1. Wydawnictwo Oświatowe FOSZE Rzeszów.
- [86] Kausar, A., 2019. Review of fundamentals and applications of polyester nanocomposites filled with carbonaceous nanofillers. *J. Plastic Film Sheeting* 35, 22–44. <https://doi.org/10.1177/8756087918783827>
- [87] Rabek, J.F., 2008. Współczesna wiedza o polimerach, Wybrane zagadnienia. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.
- [88] Kannan, R.Y., Salacinski, H.J., Butler, P.E., Hamilton, G., Seifalian, A.M., 2005. Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 74, 570–581. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30247>
- [89] Longo, U.G., Lamberti, A., Maffulli, N., Denaro, V., 2010. Tendon augmentation grafts: a systematic review. *Br. Med. Bull.* 94, 165–188. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldp051>
- [90] Li, H., Ge, Y., Wu, Y., Jiang, J., Gao, K., Zhang, P., Wu, L., Chen, S., 2011. Hydroxyapatite coating enhances polyethylene terephthalate artificial ligament graft osseointegration in the bone tunnel. *Int. Orthop.* 35, 1561–1567. <https://doi.org/10.1007/s00264-010-1158-6>
- [91] Klinge, U., Park, J.-K., Klosterhalfen, B., 2013. ‘The ideal mesh?’ *Pathobiology* 80, 169–175. <https://doi.org/10.1159/000348446>
- [92] Li, H., Chen, S., 2014. Biomedical coatings on polyethylene terephthalate (PET) artificial ligaments. *J. Biomed. Mater. Res. A* 103, 839–845. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35218>
- [93] Musiałek, P., Mazurek, A., 2017. Nowa generacja stentów w przezskórnym leczeniu interwencyjnym miażdżycowych zwężeń tętnic szyjnych w prewencji udaru mózgu: stenty siateczkowe redukują ryzyko śródzabiegowej i pozabiegowej zatorowości mózgowej. *Kardiologia Inwazyjna* 12, 43–48.
- [94] Çaykara, T., Sande, M.G., Azoia, N., Rodrigues, L.R., Silva, C.J., 2020. Exploring the potential of polyethylene terephthalate in the design of antibacterial surfaces. *Med. Microbiol. Immunol.* 209, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00660-8>
- [95] Safdar, R., Omar, A.A., Arunagiri, A., Regupathi, I., Thanabalan, M., 2019. Potential of chitosan and its derivatives for controlled drug release applications—A review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 49, 642–659. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.020>
- [96] Jones, L., Atkins, P., 2023. *Chemia ogólna. Cząsteczki, materia, reakcje.* Wydawnictwo Naukowe PWN.

- [97] Mucha, M., 2010. Chitozan wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych. Wydawnictwa Naukowo–Techniczne Sp. z o.o. Warszawa.
- [98] Pina, S., Oliveira, J.M., Reis, R.L., 2015. Natural–based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A Review. *Adv. Mater.* 27, 1143–1169. <https://doi.org/10.1002/adma.201403354>
- [99] Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- [100] Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., Davaran, S., 2017. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: A review. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 45, 185–192. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731>
- [101] Ahmed, S., Ikram, S., 2016. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achiev. Life Sci.* 10, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>
- [102] Lee, J.S., Baek, S.D., Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Chang, H.K., Kim, H.T., Kim, S.-K., 2014. In vivo study of chitosan–natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.053>
- [103] Ravishankar, K., Venkatesan, M., Desingh, R.P., Mahalingam, A., Sadhasivam, B., Subramaniam, R., Dhamodharan, R., 2019. Biocompatible hydrogels of chitosan–alkali lignin for potential wound healing applications. *Mater. Sci. Eng. C* 102, 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.038>
- [104] Bagher, Z., Ehterami, A., Safdel, M.H., Khastar, H., Semiari, H., Asefnejad, A., Davachi, S.M., Mirzaii, M., Salehi, M., 2020. Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55, 101379. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101379>
- [105] Vaidhyanathan, B., Vincent, P., Vadivel, S., Karuppiyah, P., AL-Dhabi, N.A., Sadhasivam, D.R., Vimalraj, S., Saravanan, S., 2021. Fabrication and investigation of the suitability of chitosan–silver composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Process Biochem.* 100, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.10.008>
- [106] Maharjan, B., Park, J., Kaliannagounder, V.K., Awasthi, G.P., Joshi, M.K., Park, C.H., Kim, C.S., 2021. Regenerated cellulose nanofiber reinforced chitosan hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* 251, 117023. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117023>

- [107] Ge, Z., Baguenard, Lim, L.Y., Wee, A., Khor, E. 2004. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials* 25, 1049–1058. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00612-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00612-4)
- [108] Li, Z., Ramay, H.R., Hauch, K.D., Xiao, D., Zhang, M., 2005. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26, 3919–3928. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.062>
- [109] Sionkowska, A., Kaczmarek-Szczepańska, B., Stalinska, J., 2013. Biological properties of chitosan/collagen composites. *Key Eng. Mater.* 587, 205–210. <https://doi.org/10.3390/10.4028/www.scientific.net/KEM.587.205>
- [110] Sarkar, S.D., Farrugia, B.L., Dargaville, T.R., Dhara, S., 2013. Chitosan–collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 101, 3482–3492. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34660>
- [111] Kumar, P., Dehiya, B.S., Sindhu, A., 2017. Comparative study of chitosan and chitosan–gelatin scaffold for tissue engineering. *Int. Nano. Lett.* 7, 285–290. <https://doi.org/10.1007/s40089-017-0222-2>
- [112] Iwasaki, N., Yamane, S.-T., Majima, T., Kasahara, Y., Minami, A., Harada, K., Nonaka, S., Maekawa, N., Tamura, H., Tokura, S., Shiono, M., Monde, K., Nishimura, S.-I., 2004. Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: Evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. *Biomacromolecules* 5, 828–833. <https://doi.org/10.1021/bm0400067>
- [113] Hsu, S., Whu, S., Hsieh, S., Tsai, C., Chen, D.C., Tan, T., 2004. Evaluation of chitosan–alginate–hyaluronate complexes modified by an RGD–containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Artif. Org.* 28, 639–703. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.00046.x>
- [114] Tanabe, T., Okitsu, N., Tachibana, A., Yamauchi, K., 2002. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials* 23, 817–825. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00187-9)
- [115] Carreira, A.S., Gonçalves, F.A.M.M., Mendonça, P.V., Gil, M.H., Coelho, J.F.J., 2010. Temperature and pH responsive polymers based on chitosan: Applications and new graft copolymerization strategies based on living radical polymerization. *Carbohydr. Polym.* 80, 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.047>
- [116] Martinez-Martinez, M., Rodriguez-Berna, G., Gonzalez Alvarez, I., Jesus Hernandez, M., Corma, A., Bermeho, M., Merino, V., Gonzalez-Alvarez, M., 2018. Ionic hydrogel based on chitosan crosslinked with 6–phosphogluconic trisodium salt as a drug delivery system. *Biomacromolecules* 19, 1294–1304. [10.1021/acs.biomac.8b00108](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00108)

- [117] Li, Jianghua, Cai, C., Li, Jiarui, Li, Jun, Li, Jia, Sun, T., Wang, L., Wu, H., Yu, G., 2018. Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. *Molecules* 23, 2661. <https://doi.org/10.3390/molecules23102661>
- [118] Jennings, J.A., Wells, C.M., McGraw, G.S., Velsquez Pulgarin, D.A., Whitaker, D., Pruitt, R.L., Bumgardner, J.D., 2015. Chitosan coatings to control release and target tissues for therapeutic delivery, *Ther. Deliv.* 6, 855–871. <https://doi.org/10.4155/tde.15.31>
- [119] Tang, J., Liu, Y., Zhu, B., Su, Y., Zhu, X., 2017. Preparation of paclitaxel/chitosan co-assembled core-shell nanofibers for drug-eluting stent. *Appl. Surf. Sci.* 393, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.10.015>
- [120] Jang, T.-S., Choen, K.-H., Ahh, J.-H., Song, E.-H., Kim, H.-E., 2019. In-vitro blood and vascular compatibility of sirolimus-eluting organic/inorganic hybrid stent coatings. *Coll. Surf. B. Biointerf.* 179, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.018>
- [121] Santos, D.I., Saraiva, J.M.A., Vicente, A.A., Moldão-Martins, M., 2019. Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients, w: Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.* 23–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0>
- [122] <https://www.britannica.com/science/drug-chemical-agent/Functional-macromolecules>
- [123] Mastalerz, P. 2016. *Chemia organiczna.* Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław.
- [124] Czogalla, A., 2008. Oral cyclosporine A - the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 14, 139–152. <https://doi.org/10.2478/s11658-008-0041-6>
- [125] Dynarowicz-Łątka, P., Wnętrzak, A., Makyła-Juzak, K., 2015. Cyclosporin A in membrane lipids environment: Implications for antimalarial activity of the drug—the Langmuir monolayer studies. *J. Membr. Biol.* 248, 1021–1032. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9814-9>
- [126] Amor, K.T., Ryan, C., Menter, A., 2010. The use of cyclosporine in dermatology: part I: *J. Am. Acad. Dermatol.* 63, 925–946. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.02.063>
- [127] Dougherty, P.G., Sahni, A., Pei, D., 2019. Understanding cell penetration of cyclic peptides. *Chem. Rev.* 119, 10241–10287. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00008>

- [128] Witek, J., Keller, B.G., Blatter, M., Meissner, A., Wagner, T., Riniker, S., 2016. Kinetic models of cyclosporin A in polar and apolar environments reveal multiple congruent conformational states. *J. Chem. Inf. Model.* 56, 1547–1562. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00251>
- [129] Busauschina, A., Schnuelle, P., van der Woude, F.J., 2004. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant. Proc.* 36, 229S–233S. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.021>
- [130] Malaekheh-Nikouei, B., Sajadi Tabassi, S.A., Jaafari, M.R., 2008. Preparation, characterization, and mucoadhesive properties of chitosan-coated microspheres encapsulated with cyclosporine A. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 492–498. <https://doi.org/10.1080/03639040701744004>
- [131] Dunn, C.J., Wagstaff, A.J., Perry, C.M., Plosker, G.L., Goa, K.L., 2001. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)¹ in organ transplantation. *Drugs* 61, 1957–2016. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161130-00006>
- [132] De Campos, A.M., Sánchez, A., Alonso, M.J., 2001. Chitosan nanoparticles: A new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 224, 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00760-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00760-8)
- [133] Gibaud, S., Attivi, D., 2012. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 9, 937–951. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.694865>
- [134] Basaran, E., Yenilmez, E., Berkman, M., Buyukkoroglu, G., Yazan, Y., 2013. Chitosan nanoparticles for ocular delivery of cyclosporine A. *J. Microencapsul.* 31, 49–57. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.805839>
- [135] Yang, T.-T., Wen, B.-F., Liu, K., Qin, M., Gao, Y.-Y., Ding, D.-J., Li, W.-T., Zhang, Y.-X., Zhang, W.-F., 2018. Cyclosporine A/porous quaternized chitosan microspheres as a novel pulmonary drug delivery system. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46, 552–564. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1463231>
- [136] Trombino, S., Curcio, F., Poerio, T., Pellegrino, M., Russo, R., Cassano, R., 2021. Chitosan membranes filled with cyclosporine A as possible devices for local administration of drugs in the treatment of breast cancer. *Molecules* 26, 1889. <https://doi.org/10.3390/molecules26071889>
- [137] Neha, K., Haider, M.R., Pathak, A., Yar, M.S., 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 178, 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>

- [138] Matkowski, A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants—A review. *Biotechnol. Adv.* 26, 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- [139] Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food. Chem. Toxicol.* 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- [140] Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch. Toxicol.* 94, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- [141] Walters, K.A., Bialik, W., Brain, K.R., 1993. The effects of surfactants on penetration across the skin*. *Int. J. Cosmet. Sci.* 15, 260–271. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1993.tb00572.x>
- [142] Kikuzaki, H., Hisanmoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Tanguchi, H., 2002. Antioxidant properties of ferric acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2161–2168. <https://doi.org/10.1021/jf011348w>
- [143] Cusola, O., Valls, C., Vidal, T., Tzanov, T., Roncero, M.B., 2015. Electrochemical insights on the hydrophobicity of cellulose substrates imparted by enzymatically oxidized gallates with increasing alkyl chain length. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 13834–13841. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01904>
- [144] Ortega, E., Sadaba, M.C., Ortiz, A.I., Cespon, C., Rocamora, A., Escolano, J.M., Roy, G., Villar, L.M., Gonzalez-Porte, P., 2003. Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. *Br. J. Cancer* 88, 940–943. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600805>
- [145] de Cordova, C.A.S., Locatelli, C., Assunção, L.S., Mattei, B., Mascarello, A., Winter, E., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Creczynski-Pasa, T.B., 2011. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. *Toxicol. In Vitro* 25, 2025–2034. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.08.003>
- [146] Calcabrini, A., García-Martínez, J.M., González, L., Tendero, M.J., Ortuño, M.T.A., Crateri, P., Lopez-Rivas, A., Arancia, G., González-Porte, P., Martín-Pérez, J., 2006. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauryl gallate. *Carcinogenesis* 27, 1699–1712. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl044>
- [147] Dobretsov, G.E., Borschevskaya, T.A., Petrov, V.A., Vladimirov, Y.A., 1977. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 84, 125–128. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)81071-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)81071-5)
- [148] Slater, T.F., 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222, 1–15. <https://doi.org/10.1042/bj2220001>

- [149] Machlin, L.J., Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb. J.* 1, 441–445.
- [150] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2005. *Podstawy biologii komórki*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [151] Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 19, 281–296.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- [152] van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 112–124.
<https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- [153] Shimizu, T., 2009. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 123–150.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145616>
- [154] Nakamura, M.T., Yudell, B.E., Loor, J.J., 2014. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 53, 124–144.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>
- [155] Saliba, A.-E., Vonkova, I., Gavin, A.-C., 2015. The systematic analysis of protein–lipid interactions comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 16, 753–761.
<https://doi.org/10.1038/nrm4080>
- [156] Chyla, A., 2004. Warstwy Langmuira-Blodgett i ich wykorzystanie w elektronice molekularnej. *Prace Naukowe Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej. Monografie nr 2*.
- [157] Oliveira Jr., O.N., Caseli, L., Ariga, K., 2022. The past and the future of Langmuir and Langmuir–Blodgett films. *Chem. Rev.* 122, 6459–6513.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00754>
- [158] Gaines, G.L., 1966. *Insoluble monolayers at liquid–gas interfaces*, Interscience monographs on physical chemistry. Interscience Publishers, New York.
- [159] Barnes, G., Gentle, J. *Interfacial science: An introduction*. University Press, USA.
- [160] Davies, J.T., Rideal, E.K., 1963. *Interfacial Phenomena*, 2. wydanie, Academic Press: Nowy York.
- [161] Dervichian, D.G., 1939. Changes of phase and transformations of higher order in monolayers. *J. Chem. Phys.* 7, 931–948. <https://doi.org/10.1063/1.1750347>

- [162] Broniatowski, M., Sandez Macho, I., Miñones, J., Dynarowicz-Łątka, P., 2004. Langmuir monolayers characteristic of (perfluorodecyl)-alkanes. *J. Phys. Chem. B* 108, 13403–13411. <https://doi.org/10.1021/jp0402481>
- [163] Kumar, B., Suresh, K.A., Gupta, S.K., Kumar, S., 2010. Stress-strain relation in the collapse of Langmuir monolayer of a dimer of disk shaped moiety. *J. Chem. Phys.* 133, 044701. <https://doi.org/10.1063/1.3465575>
- [164] Dynarowicz-Łątka, P., Kita, K., 1999. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* 79, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00064-5)
- [165] Oliveira, O.N., Taylor, D.M., Lewis, T.J., Salvagno, S., Stirling, C.J.M., 1989. Estimation of group dipole moments from surface potential measurements on Langmuir monolayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 85, 1009–1018. <https://doi.org/10.1039/F19898501009>
- [166] Dynarowicz-Łątka, P., Dhanabalan, A., Oliveira, O.N., 2001. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 91, 221–293. [https://doi.org/10.1016/s0001-8686\(99\)00034-2](https://doi.org/10.1016/s0001-8686(99)00034-2)
- [167] Helmholtz, H. *Abhandlungen zur Thermodynamik Chemischer Vorgänge*, Herausgegeben von Dr. Max Planck: Leipzi 1902.
- [168] Blodgett, K.B., 1934. Monomolecular films of fatty acids on glass. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 495–495. <https://doi.org/10.1021/ja01317a513>
- [169] Ma, R., Tang, T., 2014. Current strategies to improve the bioactivity of PEEK. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 5426–5445. <https://doi.org/10.3390/ijms15045426>
- [170] Jacobs, T., Morent, R., De Geyter, N., Dubruel, P., Leys, C., 2012. Plasma surface modification of biomedical polymers: Influence on cell–material interaction. *Plasma Chem.* 32, 1039–1073. <http://dx.doi.org/10.1007/s11090-012-9394-8>
- [171] Kasoju, N., Nguyen, L.T.B., Padalhin, A.R., Dye, J.F., Cui, Z., Ye, H., 2018. Techniques for modifying biomaterials to improve hemocompatibility, w: *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*. Siedlecki, C.A. (Ed.), Woodhead Publishing, 191–220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100497-5.00015-X>
- [172] Dumitrascu, N., Borcia, C., Borcia, G., 2008. Control of the blood–polymer interface by plasma treatment. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomat.* 87B, 364–373. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31112>
- [173] Szafran, K., Jurak, M., Mroczka, R., Wiącek, A.E., 2022. Surface properties of the polyethylene terephthalate (PET) substrate modified with the phospholipid–

- polypeptide–antioxidant films: Design of functional biocoatings. *Pharmaceutics* 14, 2815. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122815>
- [174] Vesel, A., Mozetic, M., Zalar, A., 2007. XPS study of oxygen plasma activated PET. *Vacuum*, 82, 248–251. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2007.07.021>
- [175] Vesel, A., Junkar, I., Cvelbar, U., Kovac, J., Mozetic, M., 2008. Surface modification of polyester by oxygen– and nitrogen–plasma treatment. *Surf. Interface Anal.* 40, 1444–1453. <https://doi.org/10.1002/sia.2923>
- [176] Theapsak, S., Watthanaphanit, A., Rujiravanit, R., 2012. Preparation of chitosan–coated polyethylene packaging films by DBD plasma treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 2474–2482. <https://doi.org/10.1021/am300168a>
- [177] Abdel-Fattah, E., 2022. Surface modifications of PET in argon atmospheric pressure plasma: Gas flow rate effect. *Surf. Interface Anal.* 54, 794–802. <https://doi.org/10.1002/sia.7092>
- [178] Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, Ch., 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- [179] Butt, H.-J., Berger, R., Bonaccorso, E., Chen, Y., Wang, J., 2007. Impact of atomic force microscopy on interface and colloid science. *Adv. Colloid Interface Sci.* 133, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.06.001>
- [180] Nguyen-Tri, P., Ghassemi, P., Carriere, P., Nanda, S., Assadi, A.A., Nguyen, D.D., 2020. Recent applications of advanced atomic force microscopy in polymer science: A Review. *Polymers* 12, 1142. <https://doi.org/10.3390/polym12051142>
- [181] Xia, F., Youcef-Toumi, K., 2022. Review: Advanced atomic force microscopy modes for biomedical research. *Biosensors* 12, 1116. <https://doi.org/10.3390/bios12121116>
- [182] Dufrêne, Y.F., Lee, G.U., 2000. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1509, 14–41. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00346-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00346-1)
- [183] Dufrêne, Y.F., 2002. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol.* 184, 5205–5213. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5205-5213.2002>
- [184] Galluzzi, M., Marfori, L., Asperti, S., Vita, A.D., Giannangeli, M., Caselli, A., Milani, P., Podestà, A., 2022. Interaction of imidazolium–based ionic liquids with supported phospholipid bilayers as model biomembranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 24, 27328–27342. <https://doi.org/10.1039/D2CP02866B>

- [185] Jurak, M., Szafran, K., Cea, P., Martín, S., 2022. Characteristics of phospholipid-immunosuppressant-antioxidant mixed Langmuir-Blodgett films. *J. Phys. Chem. B* 126, 6936-6947. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c03300>
- [186] Szafran, K., Jurak, M., Mroczka, R., Wiącek, A.E., 2022. Preparation and characterization of chitosan-based coatings for PET materials. *Molecules*, po recenzji.
- [187] Malmberg, P., Nygren, H., Sjövall, P., Lausmaa, J., 2004. Subcellular localisation of cholesterol and phosphocholine with pattern-recognition-imaging-TOF-SIMS. *J. Spectrosc.* 18, 928263. <https://doi.org/10.1155/2004/928263>
- [188] Debois, D., Bralet, M.-P., Le Naour, F., Brunelle, A., Laprévotte, O., 2009. In situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging. *Anal. Chem.* 81, 2823-2831. <https://doi.org/10.1021/ac900045m>
- [189] Kezutyte, T., Desbenoit, N., Brunelle, A., Briedis, V., 2013. Studying the penetration of fatty acids into human skin by ex vivo TOF-SIMS imaging. *Biointerphases* 8, 3. <https://doi.org/10.1186/1559-4106-8-3>
- [190] Gulin, A., Mochalova, M., Denisov, N., Nadtochenko, V., 2014. Secondary ion mass spectrometric signal enhancement of phosphatidylcholine dioleoyl on enlarged nanoparticles surface. *Appl. Surf. Sci.* 316, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.07.102>
- [191] Wang, D., Poologasundarampillai, G., van den Bergh, W., Chater, R.J., Kasuga, T., Jones, J.R., McPhail, D.S., 2014. Strategies for the chemical analysis of highly porous bone scaffolds using secondary ion mass spectrometry. *Biomed. Mater.* 9, 015013. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/1/015013>
- [192] Aoyagi, S., Shimanouchi, T., Kawashima, T., Iwai, H., 2015. ToF-SIMS observation for evaluating the interaction between amyloid β and lipid membranes. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2859-2863. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8527-3>
- [193] D'Almeida, M., Amalric, J., Brunon, C., Grosogeat, B., Toury, B., 2015. Relevant insight of surface characterization techniques to study covalent grafting of a biopolymer to titanium implant and its acidic resistance. *Appl. Surf. Sci.* 327, 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.11.185>
- [194] Liverani, L., Lacina, J., Roether, J.A., Boccardi, E., Killian, M.S., Schmuki, P., Schubert, D.W., Boccaccini, A.R., 2018. Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents. *Bioact. Mater.* 3, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.003>

- [195] Jurak, M., Mroczka, R., Łopucki, R., 2018. Properties of artificial phospholipid membranes containing lauryl gallate or cholesterol. *J. Membr. Biol.* 251, 277–294. <https://doi.org/10.1007/s00232-018-0025-z>
- [196] Jurak, M., Mroczka, R., Łopucki, R., Wiącek, A.E., 2019. Structure and wettability of heterogeneous monomolecular films of phospholipids with cholesterol or lauryl gallate. *Appl. Surf. Sci.* 493, 1021–1031. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.07.065>
- [197] Fearn, S., 2014. Characterisation of biological material with ToF–SIMS: A review, *Mater. Sci. Technol.* 31, 148–161. <https://doi.org/10.1179/1743284714Y.00000000668>
- [198] Massonnet, P., Heeren, R.M.A., 2019. A concise tutorial review of TOF–SIMS based molecular and cellular imaging. *J. Anal. At. Spectrom.* 34, 2217–2228. <https://doi.org/10.1039/C9JA00164F>
- [199] Prasad, A., Salim, N.V., Mozetič, M., Kailas, L., Thomas, S., 2022a. Time–of–flight secondary ion mass spectrometric analysis of polymer surfaces: A review. *J. Appl. Polym. Sci.* 139, 52286. <https://doi.org/10.1002/app.52286>
- [200] Young, T., 1805. An essay on the cohesion of fluids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 95, 65–87.
- [201] Huhtamäki, T., Tian, X., Korhonen, J.T., Ras, R.H.A., 2018. Surface–wetting characterization using contact–angle measurements. *Nat Protoc* 13, 1521–1538. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0003-z>
- [202] Kung, C.H., Sow, P.K., Zahiri, B., Mérida, W., 2019. Assessment and interpretation of surface wettability based on sessile droplet contact angle measurement: challenges and opportunities. *Adv. Mater. Interfaces* 6, 1900839. <https://doi.org/10.1002/admi.201900839>
- [203] Menzies, K.L., Jones, L., 2010. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom. Vis. Sci.* 87, 387–399. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>
- [204] van Oss, C.J., Good, R.J., Chaudhury, M.K., 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378–390. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90041-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90041-X)
- [205] van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J., 1988. Interfacial Lifshitz–van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.* 88, 927–941. <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>

- [206] van Oss, C.J., Dekk, 1994. Interfacial forces in aqueous media, Carel J. van Oss, w: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology – Wiley Online Library*. Marcel Dekker Inc., New York.
- [207] Jańczuk, B., Chibowski, E., Brique, J.M., Kerkeb, M.L., González Caballero, F., 1993. On the consistency of surface free energy components as calculated from the contact angles of different liquids: an application to the cholesterol surface. *J. Coll. Interf. Sci.* 159, 421–428. <https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1342>
- [208] Balasingam, J.A., Swaminathan, S., Nazemi, H., Love, C., Birjis, Y., Emadi, A., 2023. Chemical sensors: Acoustic gas sensors, w: *Encyclopedia of sensors and biosensors (First Edition)*. Narayan, R. (Ed.), Elsevier, Oxford, 209–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00001-7>
- [209] Songkhla, S.N., Nakamoto, T., 2021. Overview of the quartz crystal microbalance behaviour analysis and measurements. *Chemosensors* 9, 350. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120350>
- [210] Sauerbrey, G., 1959. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Physik* 155, 206–222. <https://doi.org/10.1007/BF01337937>
- [211] Wang, H.-W., Bringans, C., Hickey, A.J.R., Windsor, J.A., Kilmartin, P.A., Phillips, A.R.J., 2021. Cyclic voltammetry in biological samples: A systematic review of methods and techniques applicable to clinical settings. *Signals* 2, 138–158. <https://doi.org/10.3390/signals2010012>
- [212] Ibrahim, M.S., 2001. Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA. *Anal. Chim. Acta* 443, 63–72. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01184-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01184-9)
- [213] Jain, R., Sharma, R., 2012. Voltammetric quantification of anti-hepatitis drug adefovir in biological matrix and pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Anal.* 2, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.10.002>
- [214] Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L., 2001. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1957–1965. <https://doi.org/10.1021/jf001044u>
- [215] Aydemir, N., McArdle, H., Patel, S., Whitford, W., Evans, C.W., Travas-Sejdic, J., Williams, D.E., 2015. A Label-Free, Sensitive, real-time, semiquantitative electrochemical measurement method for DNA polymerase amplification (ePCR). *Anal. Chem.* 87, 5189–5197. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00079B>
- [216] Villares, A., Lydon, D.P., Low, P.J., Robinson, B.J., Ashwell, G.J., Royo, F.M., Cea, P., 2008. Characterization and conductivity of Langmuir–Blodgett films

- prepared from an amine-substituted oligo(phenylene ethynylene). *Chem. Mater.* 20, 258–264. <https://doi.org/10.1021/cm702532m>
- [217] Escorihuela, E., Concellón, A., Marín, I., Kumar, V.J., Herrer, L., Moggach, S.A., Vezzoli, A., Nichols, R.J., Low, P.J., Cea, P., Serrano, J.L., Martín, S., 2022. Building large-scale unimolecular scaffolding for electronic devices. *Mater. Today Chem.* 26, 101067. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101067>
- [218] Marsh, D., 1996. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 183–223. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(96)00009-3)
- [219] Girard-Ergot, A.P., Marquette, C.A., Blum, L.J., 2010. Biomimetic membranes and biomolecule immobilization strategies for nanobiotechnology, applications. *Int. J. Nanotechnol.* 7, 753. <http://dx.doi.org/10.1504/IJNT.2010.031743>
- [220] Botet-Carreras, A., Montero, M.T., Sot, J., Domènech, Ò., Borrell, J.H., 2020. Characterization of monolayers and liposomes that mimic lipid composition of HeLa cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 196, 111288. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111288>
- [221] Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y., 2015. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- [222] Söderlund, T., Lehtonen J.Y.A., Kinnunen, P.K.J., 1998. Interactions of cyclosporin A with phospholipid membranes: Effect of cholesterol. *Mol. Pharmacol.* 55, 32-8. <https://doi.org/10.1124/mol.55.1.32>.
- [223] Lambros, M.P., Rahman, Y.E., 2004. Effects of cyclosporin A on model lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* 131, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.002>
- [224] Fahr, A., Reiter, G., 1999. Biophysical characterisation of liposomal delivery systems for lipophilic drugs: cyclosporin A as an example. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 04. 611–623.
- [225] Sánchez, I., Suárez, A., Gil González, A., Arístegui, I., Trillo, J., 1999, Pressure-area isotherms: The behaviour of cyclosporin/pyrene-labelled phospholipid systems. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 112, 34-39.
- [226] Sánchez Macho, M.I., Gil González, A., Suárez Varela, A., 2001. Mixed monolayers of cyclosporin-A and phospholipids at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 235, 241-246. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7354>
- [227] Przykaza, K., Woźniak, K., Jurak, M., Wiącek, A.E., 2019. Characteristics of polypeptide/phospholipid monolayers on water and the plasma-activated

- polyetheretherketone support. *J. Surfactants Deterg.* 22, 1213–1228. <https://doi.org/10.1002/jsde.12323>
- [228] Jurak, M., Miñones, J., 2016. Interactions of lauryl gallate with phospholipid components of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* 1858, 1821–1832. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.04.012>
- [229] Jurak, M., Wiącek, A.E., Przykaza, K., Ładniak, A., Woźniak, K., 2019. Temperature-dependent interactions in the chitosan/cyclosporine A system at liquid–air interface. *J. Therm. Anal. Calorim.* 138, 4513–4521. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08197-6>
- [230] Szafran, K., Jurak, M., Wiącek, A.E., 2022b. Effect of chitosan on the interactions between phospholipid DOPC, cyclosporine A and lauryl gallate in the Langmuir monolayers. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 652, 129843. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129843>
- [231] Jurak, M., Szafran, K., Cea, P., Martín, S., 2021. Analysis of molecular interactions between components in phospholipid–immunosuppressant–antioxidant mixed Langmuir films. *Langmuir* 37, 5601–5616. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00434>
- [232] Wydro, P., Krajewska, B., Hąc-Wydro, K., 2007. Chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan–lipid interactions. *Biomacromolecules* 8, 2611–2617. <https://doi.org/10.1021/bm700453x>
- [233] Cámara, C.I., Riva, J.S., Juárez, A.V., Yudi, L.M., 2016. Interaction of chitosan and self-assembled distearoylphosphatidic acid molecules at liquid/liquid and air/water interfaces. Effect of temperature. *J. Phys. Org. Chem.* 29, 672–681. <https://doi.org/10.1002/poc.3642>
- [234] Survase, S.A., Kagliwal, L.D., Annapure, U.S., Rekha, R.S., 2011. Cyclosporin A–A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnol. Adv.* 29, 418–435. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.004>
- [235] Miclette Lamarche, R., DeWolf, C., 2019. Strong headgroup interactions drive highly directional growth and unusual phase co-existence in self-assembled phenolic films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 45354–45363. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b16958>
- [236] Peikert, M., Chen, X., Chi, L., Brezesinski, G., Janich, S., Würthwein, E.-U., Schäfer, H.J., 2014. Phase behavior and molecular packing of octadecyl phenols and their methyl ethers at the air/water interface. *Langmuir* 30, 5780–5789. <https://doi.org/10.1021/la404340h>

- [237] Haro, M., Giner, B., Lafuente, C., López, M.C., Royo, F.M., Cea, P., 2005 Proton sponge and fatty acid interactions at the air–water interface. Thermodynamic, spectroscopic, and microscopic study. *Langmuir* 25, 2796–2803. <https://doi.org/10.1021/la047171s>
- [238] Villares, A., Martín S., Giner, I., Díaz, J., Lydon, D.P., Low, P.J. Cea, P., 2008. The use of scanning polarization force microscopy to study the miscibility of a molecular wire candidate and an insulating fatty acid in mixed LB films. *Soft Matter* 7, 1508–1514. <http://dx.doi.org/10.1039/B716798A>
- [239] Drabik, D., Czogalla, A., 2021. Simple does not mean trivial: Behavior of phosphatidic acid in lipid mono– and bilayers. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11523. <https://doi.org/10.3390/ijms222111523>
- [240] Wiedmann, T.S., Trouard, T., Shekar, S.C., Polikandritou, M., Rahman, Y.-E., 1990. Interaction of cyclosporin A with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes* 1023, 12–18. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90003-7)
- [241] Mertins, O., Dimova, R., 2011. Binding of chitosan to phospholipid vesicles studied with isothermal titration calorimetry, *Langmuir* 27, 5506–5515. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21466162>
- [242] Grant, J., Cho, J., Allen, C., 2006. Self–Assembly and physicochemical and rheological properties of a polysaccharide–surfactant system formed from the cationic biopolymer chitosan and nonionic sorbitan esters. *Langmuir* 22, 4327–4335. <https://doi.org/10.1021/la060017g>
- [243] Paltauf, F., Hauser, H., Phillips, M.C., 1971. Monolayer characteristics of some 1,2–diacyl, 1–alkyl–2–acyl and 1,2–dialkyl phospholipids at the air–water interface. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes* 249, 539–547. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(71\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(71)90129-5)
- [244] Miller, A., Helm, C.A., Möhwald, H., 1987. The colloidal nature of phospholipid monolayers. *J. Phys. France* 48, 693–701. <https://doi.org/10.1051/jphys:01987004804069300>
- [245] Oliveira, Osvaldo N. Jr., Bonardi, C., 1997. The surface potential of Langmuir monolayers revisited. *Langmuir* 13, 5920–5924. <https://doi.org/10.1021/la970272o>
- [246] Riniker, S., 2019. Toward the elucidation of the mechanism for passive membrane permeability of cyclic peptides. *Future Med. Chem.* 11, 637–639. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0429>
- [247] Mohsen-Nia, M., Amiri, H., 2013. Measurement and modelling of static dielectric constants of aqueous solutions of methanol, ethanol and acetic acid at T = 293.15 K and 91.3 kPa. *J. Chem. Thermodynamics* 57, 67–70.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2012.08.009>

- [248] Lomize, A.L., Pogozheva, I.D., 2019. Physics-based method for modeling passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules. *J. Chem. Inf. Model.* 59, 3198–3213. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00224>
- [249] Loosli, H-R., Kessler, H., Oschkinar, H., Weber, H-P., Petcher, T.J., Widmer, A., 1985. The conformation of cyclosporin A in the crystal and in solution. *Helv. Chim. Acta* 68, 682-704.
- [250] O’Leary, T.J., Ross, P.D., Lieber, M.R., Levin, I.W., 1986. Effects of cyclosporine A on biomembranes. Vibrational spectroscopic, calorimetric and hemolysis studies. *Biophys. J.* 49, 795–801. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83707-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83707-9)
- [251] Miñones, J., Yebra-Pimentel, E., Iribarnegaray, E., Conde, O., Casas, M., 1993. Compression—expansion curves of cyclosporin A monolayers on substrates of various ionic strengths. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 76, 227–232. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(93\)80082-P](https://doi.org/10.1016/0927-7757(93)80082-P)
- [252] Wiedmann, T.S., Jordan, K.R., 1991. Interaction of cyclosporin A with dipalmitoylphosphatidylcholine at the air/water interface. *Langmuir* 7, 318-322.
- [253] Söderlund, T., Lehtonen, J.Y., Kinnunen, P.K., 1999. Interactions of cyclosporin A with phospholipid membranes: effect of cholesterol. *Mol. Pharmacol.* 55, 32–38. <https://doi.org/10.1124/mol.55.1.32>
- [254] Schote, U., Ganz, P., Fahr, A., Seelig, J., 2002. Interactions of cyclosporines with lipid membranes as studied by solid–state nuclear Magnetic resonance spectroscopy and high–sensitivity titration calorimetry. *J. Pharm. Sci.* 91, 856–867. <https://doi.org/10.1002/jps.10071>
- [255] Bonardd, S., Robles, E., Barandiaran, I., Saldías, C., Leiva, Á., Kortaberria, G., 2018. Biocomposites with increased dielectric constant based on chitosan and nitrile–modified cellulose nanocrystals. *Carbohydr. Polym.* 199, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.088>
- [256] Wu, D., Zhu, L., Li, Y., Zhang, X., Xu, S., Yang, G. Delair, T., 2020. Chitosan–based colloidal polyelectrolyte complexes for drug delivery: A Review. *Carbohydr. Polym.* 238, 116126. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116126>
- [257] Cámara, C.I., Quiroga, M.V.C., Wilke, N., Jimenez-Kairuz, A., Yudi, L.M., 2013. Effect of chitosan on distearoylphosphatidylglycerol films at air/water and liquid/liquid interfaces. *Electrochim. Acta* 94, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.137>
- [258] Pavinatto, F.J., Caseli, L., Pavinatto, A., dos Santos, David S., Nobre, T.M., Zaniquelli, M.E.D., Silva, H.S., Miranda, P.B., de Oliveira, O.N., 2007. Probing

- Chitosan and phospholipid interactions using Langmuir and Langmuir–Blodgett films as cell membrane models. *Langmuir* 23, 7666–7671. <https://doi.org/10.1021/la700856a>
- [259] Pavinatto, F.J., Pacholatti, C.P., Montanha, E.A., Caseli, L., Silva, H.S., Miranda, P.B., Vitala, T., Oliveira Jr, O.N., 2009. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir–Blodgett films. *Langmuir* 25, 10051–10061. <https://doi.org/10.1021/la901019p>
- [260] Woźniak, K., Jurak, M., Wiącek, A.E., 2020. Characterization of mixed Langmuir monolayers of cyclosporine A with the phospholipid DPPC at the chitosan subphase. *Progr. Chem. Appl. Chitin Deriv.* 25, 227–235. <https://doi.org/10.15259/PCACD.25.018>
- [261] Kurniawan, J., Ventrici de Souza, J.F., Dang, A.T., Liu, G., Kuhl, T.L., 2018. Preparation and characterization of solid-supported lipid bilayers formed by Langmuir–Blodgett Deposition: A tutorial. *Langmuir* 34, 15622–15639. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03504>
- [262] Qi, G., Yang, Y., Yan, H., Guan, L., Li, Y., Qiu, X., Wang, C., 2009. Quantifying surface charge density by using an electric force microscope with a referential structure. *J. Phys. Chem. C* 113, 204–207. <https://doi.org/10.1021/jp806667h>
- [263] Andrade, C.A.S., Baszkin, A., Santos-Magalhães, N.S., Coelho, L.C.B.B., de Melo, C.P., 2005. Mixed monolayers of Bauhinia monandra and concanavalin A lectins with phospholipids, part II. *J. Colloid Interface Sci.* 289, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.05.063>
- [264] Kotecka, K., Krysinski, P., 2015. Effect of tetracycline antibiotic on the monolayers of phosphatidylcholines at the air–water interface. *Coll. Surf. A.*: 482, 678–686. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.055>
- [265] Kumbar, S.G., Kofron, M.D., Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Cell behavior toward nanostructured surfaces, w: *Biomedical Nanostructures*. John Wiley and Sons, Ltd, 261–295. <https://doi.org/10.1002/9780470185834.ch10>
- [266] Nazneen, F., Schmidt, M., McLoughlin, E., Petkov, N., Herzog, G., Arrigan, D.W.M., Galvin, P., 2013. Impact of surface nano-textured stainless steel prepared by focused ion beam on endothelial cell growth. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 5283–5290. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7476>
- [267] Rimondini, L., Farè, S., Brambilla, E., Felloni, A., Consonni, C., Brossa, F., Carrassi, A., 1997. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J. Periodontol.* 68, 556–562. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.6.556>

- [268] Mandolino, C., Lertora, E., Gambaro, C., 2014. Effect of cold plasma treatment on surface roughness and bonding strength of polymeric substrates. *Key Eng. Mater.* 611–612, 1484–1493. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.611-612.1484>
- [269] Yang, L., Chen, J., Guo, Y., Zhang, Z., 2009. Surface modification of a biomedical polyethylene terephthalate (PET) by air plasma. *Appl. Surf. Sci.* 255, 4446–4451. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.11.048>
- [270] Jurak, M., Wiącek, A.E., Mroczka, R., Łopucki, R., 2017. Chitosan/phospholipid coated polyethylene terephthalate (PET) polymer surfaces activated by air plasma. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 532, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.061>
- [271] Wiącek, A.E., Jurak, M., Gozdecka, A., Worzakowska, M., 2017. Interfacial properties of PET and PET/starch polymers developed by air plasma processing. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 532, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.074>
- [272] Cho, Y-W., Jang, J., Park C.R., Ko, S-W., 2000. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* 1, 609–614. <https://doi.org/10.1021/bm000036j>
- [273] Wiącek, A.E., Terpiłowski, K., Jurak, M., Worzakowska, M., 2016. Low-temperature air plasma modification of chitosan-coated PEEK biomaterials. *Polym. Test.* 50, 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2016.01.020>
- [274] McQuaw, C.M., Sostarecz, A.G., Zheng, L., Ewing, A.G., Winograd, N., 2005. Lateral heterogeneity of dipalmitoylphosphatidylethanolamine-cholesterol Langmuir-Blodgett films investigated with imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry and atomic force microscopy. *Langmuir* 21, 807–813. <https://doi.org/10.1021/la0479455>
- [275] Vaezian, B., Anderton, C.R., Kraft, M.L., 2010. Discriminating and imaging different phosphatidylcholine species within phase-separated model membranes by principal component analysis of TOF-secondary ion mass spectrometry images. *Anal. Chem.* 82, 10006–10014. <https://doi.org/10.1021/ac101640c>
- [276] Lanekoff, I., Sjövall, P., Ewing, A.G., 2011. Relative quantification of phospholipid accumulation in the PC12 cell plasma membrane following phospholipid incubation using TOF-SIMS imaging. *Anal. Chem.* 83, 5337–5343. <https://doi.org/10.1021/ac200771g>
- [277] Muddiman, D.C., Gusev, A.I., Proctor, A., Hercules, D.M., Venkataramanan, R., Diven, W., 1994. Quantitative measurement of cyclosporin A in blood by time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66, 2362–2368.

<https://doi.org/10.1021/ac00086a023>

- [278] Jegorov, A., Havlíček, V., 2001. Spontaneous N → O acyl shift in the [M + H]⁺ ions of [MeBmt1] –cyclosporins in an ion trap. *J. Mass Spectrom.* 36, 633–640. <https://doi.org/10.1002/jms.163>
- [279] Bąchor, R., Kluczyk, A., Stefanowicz, P., Szewczuk, Z., 2017. Preparation of novel deuterated cyclosporin A standards for quantitative LC–MS analysis. *J. Mass Spectrom.* 52, 817–822. <https://doi.org/10.1002/jms.4025>
- [280] Przykaza, K., Jurak, M., Wiącek, A.E., Mroczka, R., 2021. Characteristics of hybrid chitosan/phospholipid–sterol, peptide coatings on plasma activated PEEK polymer. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 120, 111658. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111658>
- [281] D’Almeida, M., Attik, N., Amalric, J., Brunon, C., Renaud, F., Abouelleil, H., Toury, B., Grosogeat, B., 2017. Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications. *PLoS One* 12, e0189537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189537>
- [282] Woźniak, K., Jurak, M., Wiącek, A.E., 2020. Wetting properties of phospholipid–polypeptide monolayers deposited onto polyethylene terephthalate. *Annales Universitatis Mariae Curie–Skłodowska, sectio AA – Chemia* 74, 69–88. <https://doi.org/10.17951/aa.2019.74.2.69-88>
- [283] Szafran, K., Jurak, M., Wiącek, A.E., 2021. Effect of chitosan and lipid layers deposited onto polyethylene terephthalate (PET) on its wetting properties. *Progr. Chem. Appl. Chitin Deriv.* 26, 210–221. <https://doi.org/10.15259/PCACD.26.019>
- [284] Huang, C., Chang, Y., Wu, S., 2010. Contact angle analysis of low–temperature cyclonic atmospheric pressure plasma modified polyethylene terephthalate. *Thin Solid Films* 518, 3575–3580. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.11.046>
- [285] Fang, Z., Yang, J., Liu, Y., Shao, T., Zhang, C., 2013. Surface treatment of polyethylene terephthalate to improving hydrophilicity using atmospheric pressure plasma jet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 41, 1627–1634. <https://doi.org/10.1109/TPS.2013.2259508>
- [286] Huang, Z-H., Peng, S-W., Hsieh, S-L., Kirkankumar, R., Huang, P-F., Chang, T-M., Dwivedi, A.K., Chen, N-F., Wu, H-M., Hsieh, S., 2021. Polydopamine ultrathin film growth on mica via in–situ polymerization of dopamine with applications for silver-based antimicrobial coatings. *Materials* 14, 671. <https://doi.org/10.3390/ma14030671>
- [287] Tzoneva, R., Growth, T., Altankov, G., Paul, D., 2002. Remodeling of fibrinogen by endothelial cells in dependence on fibronectin matrix assembly. Effect of substratum wettability. *J. Mater. Sci. Med.* 13, 1235–1244.

<https://doi.org/10.1023/a:1021131113711>

- [288] Faucheux, N., Schweiss, R., Lützow, K., Werner, C., Growth, T., 2004. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* 25, 2721–2730. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.069>
- [289] Groth, T., Altankov, G., 1996. Studies on cell–biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. *Biomaterials* 17, 1227–1234. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)84943-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)84943-X)
- [290] Gonzalez, E.I., Hicks, R.F., 2010. Surface analysis of polymers treated by remote atmospheric pressure plasma. *Langmuir* 26, 3710–3719. <https://doi.org/10.1021/la9032018>
- [291] Nolan, B.W., Schermerhorn, M.L., Powell, R.J., Rowell, E., Fillinger, M.F., Rzucidlo, E.M., Wyers, M.C., Whittaker, D., Zwolak, R.M., Walsh, D.B., Cronenwett, J.L., 2005. Restenosis in gold-coated renal artery stents. *J. Vasc. Surg.* 42, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.03.038>
- [292] Drelich, J., Chibowski, E., Meng, D.D., Terpiłowski, K., 2011. Hydrophilic and superhydrophilic surfaces and materials. *Soft Matter* 7, 9804–9828. <https://doi.org/10.1039/C1SM05849E>

17. Dorobek naukowy

17.1. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

1. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, Effect of chitosan on the interactions between DOPC, cyclosporine A and lauryl gallate in the Langmuir monolayers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2022, 652, 129843.

IF₂₀₂₁/IF_{5-letni}: 5,518/4,746

MEiN₂₀₂₂/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./70 pkt.

2. M. Jurak, **K. Szafran**, P. Cea, S. Martín, Characteristics of phospholipid-immunosuppressant-antioxidant mixed Langmuir-Blodgett films, *The Journal of Physical Chemistry B* 2022, 126, 6936-6947.

IF₂₀₂₁/IF_{5-letni}: 3,466/2,981

MEiN₂₀₂₂/MEiN₂₀₂₃: 140 pkt./140 pkt.

3. **K. Szafran**, M. Jurak, R. Mroczka, A.E. Wiącek, Surface properties of the polyethylene terephthalate (PET) substrate modified with the phospholipid-polypeptide-antioxidant films: Design of functional biocoatings, *Pharmaceutics* 2022, 14, 2815

IF₂₀₂₁/IF_{5-letni}: 6,525/7,277

MEiN₂₀₂₂/MEiN₂₀₂₃: 100 pkt./100 pkt.

4. M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza, **K. Szafran**, What affects the biocompatibility of polymers? *Advances in Colloid and Interface Science* 2021, 294, 102451.

IF₂₀₂₁/IF_{5-letni}: 15,19/14,578

MEiN₂₀₂₁/MEiN₂₀₂₃: 200 pkt./200 pkt.

5. M. Jurak, **K. Szafran**, P. Cea, S. Martín, Analysis of molecular interactions between components in phospholipid-immunosuppressant-antioxidant mixed Langmuir films, *Langmuir* 2021, 37, 5601-5616.

IF₂₀₂₁/IF_{5-letni}: 4,331/3,825

MEiN₂₀₂₁/MEiN₂₀₂₃: 100 pkt./100 pkt.

6. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, Effect of chitosan and lipid layers deposited onto polyethylene terephthalate (PET) on its wetting properties, Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives 2021, 26, 210-221.

MEiN₂₀₂₁/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./70 pkt.

7. A.E. Wiącek, M. Jurak, A. Ładniak, **K. Szafran**, K. Przykaza, Cyclosporin CsA – the physicochemical characterization of liposomal and colloidal systems, Colloids and Interfaces 2020, 4, 46.

MNiSW₂₀₂₀/MEiN₂₀₂₃: 20 pkt./20 pkt.

8. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, Characterization of mixed Langmuir monolayers of cyclosporine A with the phospholipid DPPC at the chitosan subphase, Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives 2020, 25, 227-235.

MNiSW₂₀₂₀/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./70 pkt.

9. M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak, **K. Woźniak**, Temperature-dependent interactions in the chitosan/cyclosporine A system at liquid-air-interface, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2019, 138, 4513-4521.

IF₂₀₁₉/IF_{5-letni}: 4,331/3,641

MNiSW₂₀₁₉/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./100 pkt.

10. K. Woźniak, M. Jurak, A.E. Wiącek, Wetting properties of phospholipid-polypeptide monolayers deposited onto polyethylene terephthalate, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, section AA 2019, 74, 69-88.

MNiSW₂₀₁₉/MEiN₂₀₂₃: 20 pkt./20 pkt.

11. **K. Szafran**, M. Jurak, R. Mroccka, A.E. Wiącek, Preparation and characterization of chitosan-based coatings for PET materials, Molecules 2023, po recenzji

IF₂₀₂₂/IF_{5-letni}: 4,927/5,110

MEiN₂₀₂₂/MEiN₂₀₂₃: 140 pkt./140 pkt.

17.2. Pozostałe publikacje i monografie nieobjęte rozprawą doktorską

Poza publikacjami wchodzącymi w skład dysertacji jestem współautorem 2 prac w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz 2 z listy ministerialnej, a także 5 rozdziałów w recenzowanych monografiach naukowych:

1. K. Przykaza, **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, Characteristics of polypeptide/phospholipid monolayers on water and the plasma-activated polyetheretherketone support, *Journal of Surfactants and Detergents* 2019, 22, 1213-1228.

IF₂₀₁₉/IF_{5-letni}: 1,654/1,822

MEiN₂₀₁₉/MEiN₂₀₂₃: 40 pkt./40 pkt.

2. K. Przykaza, **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, R. Mroczka, Properties of the Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayers of the cholesterol-cyclosporine A on water and polymer support, *Adsorption* 2019, 25, 923-936.

IF₂₀₁₉/IF_{5-letni}: 1,949/2,836

MEiN₂₀₁₉/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./70 pkt.

3. K. Przykaza, **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, Wettability of chitosan-modified and lipid/polypeptide-coated PEEK surfaces, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 2019, 24, 172-182.

MEiN₂₀₁₉/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./70 pkt.

4. K. Przykaza, **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, Wetting properties of polyetheretherketone plasma activated and biocoated surfaces, *Colloids and Interfaces* 2019, 3, 40.

MEiN₂₀₂₀/MEiN₂₀₂₃: 70 pkt./70 pkt.

Monografie naukowe:

1. **K. Woźniak**, K. Przykaza, M. Jurak, A.E. Wiącek, Właściwości PEEK i PEEK po modyfikacji plazmą, *Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie*, Praca zbiorowa pod redakcją dr hab. Doroty Kołodyńskiej, prof. UMCS, ISBN 978-83-945225-5-1.
2. **K. Woźniak**, Chitozan-polisacharyd wykorzystywany w medycynie, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki medyczne i nauki o zdrowiu*,

część V, Młodzi Naukowcy, 2019, 148-153, ISBN 978-83-66392-21-2 (wydanie online). MNiSW=5 pkt.

3. **K. Woźniak**, Antyutleniacze, ich rola w życiu człowieka, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki przyrodnicze, Część I, Młodzi Naukowcy*, 2020, 113-117, ISBN 978-83-66392-85-4 (wydanie on-line).

MNiSW=5 pkt.

4. **K. Szafran**, Cyklosporyna A (CsA) – cykliczny polipeptyd szeroko stosowany w medycynie, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki medyczne i nauki o zdrowiu, Część III, Młodzi Naukowcy*, 2021, 99-103, ISBN 978-83-66743-45-8 (wydanie on-line).

5. **K. Szafran**, Mikroskopia sił atomowych (AFM) i jej zastosowanie, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki techniczne i inżynieryjne, Młodzi Naukowcy*, 2021, 87-92, ISBN 978-83-66743-60-1 (wydanie on-line).

17.3. Konferencje naukowe

W trakcie studiów doktoranckich (od 01.10.2018r.) do dnia złożenia dysertacji uczestniczyłam w 20 konferencjach (11 międzynarodowych i 9 krajowych), podczas których byłam autorem 14 wystąpień ustnych oraz 14 plakatowych. Ponadto byłam współautorem prezentacji na 6 konferencjach międzynarodowych i 8 krajowych.

Wystąpienia ustne:

Konferencje międzynarodowe:

- 17th Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, 5-7.12.2018, Belgrad, Serbia. "Studies on properties of lipid peptide films on a polimer support". **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza. (wystąpienie ustne)
- 17th European Student Colloid Conference ESC, 18-22.06.2019, Warna, Bułgaria. "Wettability of PET based biomaterials". **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (wystąpienie ustne)

- 17th European Student Colloid Conference ESC, 18-22.06.2019, Warna, Bułgaria. “Preparation and characteristics of biomembranes on polymers”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (poster)
- 18th Young Researchers’ Conference Materials Science and Engineering, 4-6.12.2019, Belgrad, Serbia. “Properties of the Langmuir monolayers of phospholipid polypeptide on a liquid subphase”. **K. Woźniak**, A. Ładniak, K. Przykaza, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 9th European Young Engineers Conference, 19-21.04.2021, Warszawa, Polska (on-line). „Studies on properties of CsA-LG monolayers on water subphase”, **K. Szafran**, M. Jurak, S. Martín, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (wystąpienie ustne)
- 9th European Young Engineers Conference, 19-21.04.2021, Warszawa, Polska (on-line) „Studying the Langmuir-Blodgett monolayers deposited onto solid support”. **K. Szafran**, M. Jurak, S. Martín, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (poster)
- 23rd International Conference-School Advanced Materials and Technologies 23-27.08.2021, Palanga, Litwa (on-line) „How the presence of chitosan influences the properties of polyethylene terephthalate in terms of its biocompatibility”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak. (poster)
- 35th Conference of the European Colloid & Interface Society, 5-10.09.2021, Ateny, Grecja. „Designing and characterization of modern implant coatings”, **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (poster)
- 19th Young Researchers’ Conference Materials Science and Engineering, 1-3.12.2021, Belgrad, Serbia. “Characteristics of thin films of biological substances deposited on polyethylene terephthalate (PET) in terms of biomedical application”. **K. Szafran**, M. Jurak, R. Mroczka, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- Modern Research Techniques for Physicochemical Characterization of the Potential Application System, 18-20.05.2022, Lublin, Polska „Surface analysis of polymer-made implants”. **K. Szafran**, M. Jurak, R. Mroczka, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)

- Modern Research Techniques for Physicochemical Characterization of the Potential Application System, 18-20.05.2022, Lublin, Polska. „Characteristics of multi-component stent coatings”. **K. Szafran**, M. Jurak, S. Martín, A.E. Wiącek. (poster)
- Polymers 2022: New Trends in Polymer Science: Health of the Planet, Health of the People, 25-27.05.2022, Turyn, Włochy. „Langmuir-Blodgett technique – a research method helpful in the design of biocompatible coatings for implants”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
- 23rd International Symposium on Surfactants in Solution, 11-16.09.2022, Lublin, Polska. „Langmuir monolayer study of phospholipid-polypeptide-antioxidant on the chitosan subphase” **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
- 23rd International Symposium on Surfactants in Solution, 11-16.09.2022, Lublin, Polska. „TOF-SIMS - powerful technique used in studies of biocompatible coatings for implants”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
- 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials, 19-21.10.2022, Barcelona, Hiszpania. “Characterization of biocompatible coatings for polymer-made implants”. **K. Szafran**, M. Jurak, A. E. Wiącek, R. Mroccka. (poster)
- 17th Young Researchers’ Conference Materials Science and Engineering, 5-7.12.2018, Belgrad, Serbia. “Wetting properties of plasma activated and biocoated PEEK surfaces”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Gozdecka, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 17th European Student Colloid Conference ESC, 18-22.06.2019, Warna, Bułgaria. “Properties of lipid polypeptide monolayers at air water interface”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
- 17th European Student Colloid Conference ESC, 18-22.06.2019, Warna, Bułgaria. “Properties of lipid polypeptide monolayers deposited on plasma activated PEEK support”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
- 7th Conference Nanotechnologies and Nanomaterials NANO 2019, 27-30.08.2019, Lwów, Ukraina. “Effect of plasma activation and thin film deposition on the PEEK

- polymer surfaces”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 7th Conference Nanotechnologies and Nanomaterials NANO 2019, 27-30.08.2019, Lwów, Ukraina. “Wetting properties of plasma activated and chitosan coated PEEK surfaces”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
 - 18th Young Researchers’ Conference Materials Science and Engineering, 5-7.12.2019, Belgrad, Serbia. “Effect of chitosan on the behavior of biological membranes”. A. Ładniak, M. Jurak, **K. Woźniak**, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
 - 1st Virtual Festival of Life and Earth Science, 20-26.07.2020 (on line). “Modification of PEEK polymer in the aspect of biomedical applications”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
 - 1st Virtual Festival of Life and Earth Science, 20-26.07.2020 (on line). “The effect of naproxen and/or chitosan on model biomembrane behavior study of Langmuir monolayers”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
 - 1st Virtual Festival of Life and Earth Science, 20-26.07.2020 (on-line). “Temperature influence on interactions in the chitosan cyclosporine A system at the liquid/air interface”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
 - NanoTech Polska 2021, 9-11.06.2021, Poznań, Polska. „Characteristics of self-organizing biocoatings deposited on plasma activated PEEK polymer”. K. Przykaza, **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
 - 35th Conference of the European Colloid & Interface Science Society, 5-10.09.2021, Ateny, Grecja. „Self-organizing biocoatings deposited on plasma PEEK polymer – preparation and characteristics”. K. Przykaza, **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (poster)
 - International Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 20-21.09.2021 (on-line). „Immuno-suppressive cyclosporine CsA. The physicochemical characterization of liposomal and colloidal systems”. A.E. Wiącek, M. Jurak, A. Ładniak, K. Przykaza, **K. Szafran**. (wystąpienie ustne)

- 12th International Congress on Skin Ageing & Challenges, 10-12.11.2021, Lizbona, Portugalia (on-line). „Hybrid layer of chitosan-TiO₂-hyaluronic acid as a potential wound dressing/skin substitute”. A.E. Wiącek, M. Jurak, A. Ładniak, K. Przykaza, **K. Szafran**. (wystąpienie ustne)
- 19th Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, 1-3.12.2021, Belgrad, Serbia. „The use of Langmuir's technique to assess the antibacterial properties of chemical substances”. A. Ładniak, M. Jurak, M. Palusińska-Szys, **K. Woźniak**, K. Przykaza, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 23rd International Symposium on Surfactant in Solution, 11-16.09.2022, Lublin, Polska. „Langmuir-Blodgett films as a drug delivery platform”. M. Jurak, **K. Szafran**, A. E. Wiącek, K. Przykaza. (poster)
- International Conference on Polymer Science and Engineering (Polymers-2022), 17-21.10.2022, Los Angeles, USA (on-line). “Mixed chitosan-bioglass coating on plasma activated PEEK polymer”. A.E. Wiącek, M. Jurak, K. Przykaza, **K. Szafran**. (wystąpienie ustne)

Ogólnopolskie:

- 9. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 05.04.2019, Lublin, Polska. „Charakterystyka powierzchni politereftalanu etylenu z naniesionym filmem substancji aktywnych biologicznie”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak. (wystąpienie ustne)
- 3. Konferencja Doktorantów Nauk Przyrodniczych, 25-28.06.2019, Gdańsk, Polska. „Zwilżalność wieloskładnikowych filmów Langmuira Blodgett na politereftalanie etylenu”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak (wystąpienie ustne)
- Fizykochemia Granicy Faz - Metody Instrumentalne, 13-17.05.2019 Lublin, Polska. „Badanie monowarstw lipidowo peptydowych w układach hybrydowych z chitozanem na podłożu polimerowym”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak. (wystąpienie ustne)

- Fizykochemia Granicy Faz - Metody Instrumentalne, 13-17.05.2019 Lublin, Polska. „Właściwości powierzchni PET po modyfikacji fizykochemicznej”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak. (poster)
- 62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 2-6.09.2019, Warszawa, Polska. „Morfologia monowarstw lipidowych z cyklosporyną A na subfazie ciekłej”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (poster)
- 62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 2-6.09.2019, Warszawa, Polska. „Badanie właściwości mieszanych monowarstw DPPC-CsA w obecności chitozanu”. **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek, A. Ładniak, K. Przykaza. (poster)
- 9. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 22.11.2019, Lublin, Polska. „Charakterystyka monowarstw Langmuira DPPC-CsA na subfazie ciekłej”. **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza. (wystąpienie ustne)
- 11. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 03.04.2020 (on-line). „Zastosowanie antyutleniaczy w medycynie”. **K. Woźniak**. (wystąpienie ustne)
- 12. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój. 16.11.2020, Lublin, Polska. „Wpływ chitozan na właściwości politereftalan etylenu w aspekcie biokompatybilności”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak.
- 13. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 22.03.2021, Lublin, Polska. „Wpływ chitozanu na właściwości politereftalan etylenu w aspekcie biokompatybilności”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak. (wystąpienie ustne)
- 13. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 22.03.2021, Lublin, Polska. „Zwilżalność monowarstw Langmuira-Blodgett osadzonych na PET”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, A. Ładniak. (poster)

- Fizykochemia Granic Faz - Metody Instrumentalne, 22-26.08.2021, Lublin, Polska. „Charakterystyka powierzchni PET modyfikowanej cienkimi filmami substancji biologicznych w aspekcie zastosowań biomedycznych”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, R. Mrocza K. Przykaza. (wystąpienie ustne)
- Fizykochemia Granic Faz - Metody Instrumentalne, 22-26.08.2021, Lublin, Polska. Projektowanie i charakterystyka nowoczesnych powłok dla implantów”. **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek, R. Mrocza, S. Martín, K. Przykaza. (poster)
- 6. Konferencja naukowa Innowacje w Praktyce, 4-5.04.2019, Lublin, Polska. „Zachowanie modelowej błony *Eukaryota* w kontakcie z układem biopolimer/TiO₂ . A. Ładniak, A.E. Wiącek, M. Jurak, K. Przykaza, **K. Woźniak**. (wystąpienie ustne)
- 9. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce Badania i Rozwój, 05.04.2019, Lublin, Polska. „Wpływ biopolimerów i TiO₂ na modelową błonę bakteryjną. A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, **K. Woźniak**. (wystąpienie ustne)
- 9. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce Badania i Rozwój, 05.04.2019, Lublin, Polska. „Ocena zwilżalności wybranych powierzchni polimerowych w aspekcie zastosowań biomedycznych”. K. Przykaza, A.E. Wiącek, M. Jurak, **K. Woźniak**, A. Ładniak. (wystąpienie ustne)
- Fizykochemia Granicy Faz - Metody Instrumentalne, 1-17.05.2019, Lublin, Polska. „Wpływ chitozanu, TiO₂ i kwasu hialuronowego na właściwości modelowej błony bakteryjnej”. A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, **K. Woźniak**. (wystąpienie ustne)
- Fizykochemia Granicy Faz - Metody Instrumentalne, 13-17.05.2019, Lublin, Polska. Wpływ obecności chitozanu, TiO₂ i kwasu hialuronowego w ciekłej fazie nośnej na strukturę osadzonych filmów lipidowych. A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek, K. Przykaza, **K. Woźniak**. (poster)
- Fizykochemia Granicy Faz - Metody Instrumentalne, 13-17.05.2019 Lublin, Polska. „Charakterystyka fizykochemiczna leku cyklosporyny A w układach dyspersyjnych”. A.E. Wiącek, M. Jurak, A. Gozdecka, K. Przykaza, **K. Woźniak**. (poster)

- Fizykochemia Granicy Faz - Metody Instrumentalne, 13-17.05.2019, Lublin, Polska. „Charakterystyka oddziaływań w lipidowych układach biomimetycznych z antyutleniaczem”. M. Jurak, A.E. Wiącek, **K. Woźniak**, K. Przykaza, A. Gozdecka. (poster)
- 62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 2-6.09.2019, Warszawa, Polska. „Charakterystyka monowarstwy Langmuira utworzonej z 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny w obecności chitozanu, kwasu hialuronowego i/lub ditlenku tytanu”. A. Ładniak, A.E. Wiącek, M. Jurak, **K. Woźniak**, K. Przykaza. (poster)
- 62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 2-6.09.2019, Warszawa, Polska. „Charakterystyka materiału polisacharydowo tlenkowego osadzonego na powierzchni miki”. A. Ładniak, A. E. Wiącek, M. Jurak, **K. Woźniak**, K. Przykaza. (poster)
- Ogólnopolska szkoła letnia: 9. Szkoła Analizy Termicznej, 22-25.09.2019, Zakopane, Polska. „Wpływ temperatury na oddziaływania w układzie chitozan/cyklosporyna A na granicy faz ciecz/powietrze”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 9. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 22.11.2019, Lublin, Polska. „Otrzymywanie i charakterystyka hybrydowych filmów na podłożu polimerowym”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, A.E. Wiącek, M. Jurak. (wystąpienie ustne)
- 9. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 22.11.2019, Lublin, Polska. „Architektura monowarstw Langmuira w obecności układu polisacharyd/TiO₂”. A. Ładniak, M. Jurak, **K. Woźniak**, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 11. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 03.04.2020 (on-line). „Wpływ naproksenu i/lub chitozanu na właściwości modelowej błony biologicznej”. K. Przykaza, A.E. Wiącek, M. Jurak, **K. Woźniak**, A. Ładniak. (wystąpienie ustne)
- 11. Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój, 03.04.2020 (on-line). „Wpływ obecności biopolimerów i TiO₂ na

zachowanie monowarstw zbudowanych z lipidów wydzielonych z bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*”. A. Ładniak, M. Jurak, **K. Woźniak**, K. Przykaza, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)

- Nauki przyrodnicze na rzecz człowieka i środowiska, 26.06.2020 (on-line). „Modyfikacje syntetycznych materiałów kościozastępczych na przykładzie polieteroeteroketonu”. K. Przykaza, A. Ładniak, **K. Woźniak**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- Ogólnopolska konferencja naukowa: Biopolimery źródło nowych materiałów, 03.09.2020 (on-line). „Biodruk technologia przyszłości”. K. Przykaza, **K. Woźniak**, A. Ładniak, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 12. Ogólnokrajowa konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój. 16.11.2020, Lublin, Polska. „Wykorzystanie techniki Langmuira do przewidywania oddziaływań z błonami komórkowymi” A. Ładniak, M. Jurak, A. E. Wiącek, M. Palusińska-Szysz, **K. Szafran**, K. Przykaza. (wystąpienie ustne)
- Innowacje w praktyce, 20.11.2020. Lublin, Polska. „Technika monowarstw Langmuira – metoda badawcza pomocna w ocenie właściwości antybakteryjnych”. A. Ładniak, M. Jurak, A. E. Wiącek, M. Palusińska-Szysz, **K. Szafran**, K. Przykaza. (wystąpienie ustne)
- 2. Sympozjum Biomateriały w medycynie i kosmetologii, 28.01.2021, Toruń, Polska. „Charakterystyka wieloskładnikowych powłok naniesionych na aktywowaną powierzchnię PEEK w aspekcie zastosowań biomedycznych” K. Przykaza, A.E. Wiącek, M. Jurak, **K. Szafran**. (wystąpienie ustne)
- Fizykochemia Granic Faz - Metody Instrumentalne, 22-26.08.2021, Lublin, Polska. „Charakterystyka cienkich filmów substancji biologicznie aktywnych osadzonych na modyfikowanej powierzchni PEEK”, K. Przykaza, **K. Szafran**, M. Jurak, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)
- 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 13-17.09.2021, Łódź, Polska (on-line). „Charakterystyka mieszanych filmów Langmuira tworzonych przez związki o znaczeniu biologicznym” M. Jurak, **K. Szafran**, A.E. Wiącek, K. Przykaza, (wystąpienie ustne)

- 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 13-17.09.2021, Łódź, Polska (on-line). „Charakterystyka mieszanych filmów Langmuira-Blodgett tworzonych przez związki o znaczeniu biologicznym”. M. Jurak, **K. Szafran**, A.E. Wiącek, K. Przykaza. (poster)
- 5. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej, Biologia-Medycyna-Terapia, 15-17.09.2022, Lublin, Polska. „Wpływ dyspersji chitozan/kwas hialuronowy/TiO₂ na strukturę błon DOPC”. A. Ładniak, M. Jurak, **K. Szafran**, K. Przykaza, A.E. Wiącek. (wystąpienie ustne)

17.4. Szkoły letnie

- międzynarodowa szkoła letnia: Supramolecular and Colloid Chemistry and Physics for the Life Sciences, On-line Summer School and Workshop, 27-29.07.2020, Rijeka, Chorwacja,
- międzynarodowa szkoła letnia: 23rd International Conference-School Advanced Materials and Technologies, 23-27.08.2021, on-line, Połąga, Litwa,
- międzynarodowa szkoła letnia: Modern Research Techniques for Physicochemical Characterization of the Potential Application Systems, 18-20.05.2022, Lublin, Polska.

17.5. Współpraca naukowo-badawcza

- Uniwersytet w Saragossie, Wydział Nauk, Katedra Chemii Fizycznej, Hiszpania półroczny naukowy staż zagraniczny (01.09.2020 r. - 28.02.2021 r.) w ramach projektu „Międzynarodowe Studia Doktoranckie z Chemii” nr projektu POWR. 03.02.00-00-I005/16
- Instytut Nanonauki i Materiałów, Saragossa, Aragonia, Hiszpania. Współpraca rozpoczęła się w dn. 01.09.2020r.
- Katolicki Uniwersytet Lubelski, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Chemii, Pracownia Optyki Rentgenowskiej. Współpraca rozpoczęła się w 2019r.

17.6. Nagrody i wyróżnienia

- stypendium Rektora UMCS dla najlepszych doktorantów w latach 2019/2020, 2021/2022 oraz 2022/2023,

- stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w latach 2019/2020, 2021/2022,
- stypendium Prezydenta Miasta Lublin dla wybitnie uzdolnionych studentów oraz doktorantów w ramach Miejskiego programu stypendialnego dla studentów i doktorantów, w roku akademickim 2020/2021,
- stypendium z Własnego Funduszu Stypendialnego (2020),
- dyplom za najlepsze wystąpienie ustne "Charakterystyka powierzchni PET modyfikowanej cienkimi filmami substancji biologicznych w aspekcie zastosowań biomedycznych" wygłoszone na konferencji „Fizykochemia granic faz - metody instrumentalne”, która odbyła się w dniach 22-26.08.2021 roku w Lublinie,

17.7. Dodatkowa aktywność organizacyjna i członkostwo naukowe

- członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego od 2019 r.,
- członek Koła Naukowego Alkahest (2018/2019),
- członek Wydziałowej Komisji Socjalnej (2021/2022),
- członek Wydziałowej Komisji Stypendialnej (2021/2022 oraz 2022/2023),
- członek Rady Wydziałowej Samorządu Doktorantów Wydziału Chemii UMCS (2018-2021),
- przedstawiciel doktorantów do Rady Wydziału Chemii UMCS (2018/2019),
- sekretarz Wydziałowej Rady Samorządu Doktorantów Wydziału Chemii UMCS (2021-2022),
- starosta roku Międzynarodowych Studiów Doktoranckich z Chemii (2018-2023),
- organizacja Drzwi Otwartych na Wydziale Chemii UMCS i Wydziale Medycznym KUL,
- organizacja warsztatów dla dzieci i młodzieży dotyczących techniki miareczkowania,
- organizacja warsztatów w ramach Nocy Biologów oraz XVII Lubelskiego Festiwalu Nauki (2021)

17.8. Prowadzenie zajęć dydaktycznych

- zajęcia laboratoryjne z chemii fizycznej,
- zajęcia laboratoryjne z fizykochemii granic faz,
- zajęcia laboratoryjne z fizykochemii granic faz w układach biologicznych,
- zajęcia konwersatoryjne z klasycznej chemii analitycznej (ilościowej),
- pracownia dyplomowa.

18. Streszczenie

Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat biomateriały zyskały ogromne znaczenie zarówno w medycynie, jak i w inżynierii tkankowej. Podstawową właściwością, która musi cechować każdy biomateriał jest biokompatybilność, co oznacza, że obecność ciała stałego po wprowadzeniu do organizmu pacjenta nie będzie powodować niepożądanych efektów ubocznych. Na biogodność wpływa wiele parametrów powierzchniowych materiału. Najważniejsze z nich to skład chemiczny, topografia oraz zwilżalność. Niezwykle istotne jest, aby prowadząc badania podstawowe odpowiednio zaprojektować układy, które pozwolą uzyskać kontrolę nad właściwościami fizykochemicznymi powierzchni biomateriału, a tym samym zapewnią pozytywną odpowiedź pacjenta.

Jednym z często stosowanych polimerów do wytwarzania biomateriałów w inżynierii tkankowej jest poli(tereftalan etylenu), PET. PET służy między innymi do produkcji stentów naczyń krwionośnych i/lub ich pokryć. Jednak jego niska swobodna energia powierzchniowa ogranicza biokompatybilność, a w konsekwencji wykorzystanie medyczne. Dlatego też, konieczna jest modyfikacja jego powierzchni poprzez aktywację plazmą i/lub pokrycie filmem substancji przyjaznych dla organizmu. W tym aspekcie na uwagę zasługuje naturalny polisacharyd, chitozan (Ch), który charakteryzuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością oraz właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Jednakże, w kontakcie z krwią Ch przyjmuje ładunek dodatni, co może powodować powstawanie skrzepu w wyniku adhezji ujemnie naładowanych elementów morfotycznych krwi. Taki proces poza zwężeniem stentu może prowadzić do odrzucenia wszczepu. W celu przeciwdziałania konieczne jest wprowadzenie dodatkowych substancji biologicznych, które modyfikując ładunek powierzchniowy filmu chitozanu, mogą uczynić go mniej trombogennym. Jedną z nich jest 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC), która reprezentuje fosfolipidy. Stanowią one podstawowy składnik budulcowy błon komórkowych, dlatego DOPC może pełnić rolę naturalnego łącznika między sztucznym biomateriałem a tkankami pacjenta. Ponadto wprowadzenie leku immunosupresyjnego cyklosporyny A (CsA), stosowanego w medycynie głównie w celu zapobiegania odrzuceniu przeszczepu, zapewni jego dostarczenie bezpośrednio do odpowiedniej tkanki, jednocześnie eliminując problem niskiej biodostępności CsA podczas przyjmowania doustnego. Jednakże terapia z udziałem CsA powoduje wiele skutków ubocznych związanych z powstawaniem wolnych rodników, które mogą uszkadzać tkanki. Dlatego też, dodanie kolejnej substancji, posiadającej właściwości przeciwutleniające, przykładowo galusanu laurylu (LG) wydaje

się być niezbędne. LG jest pochodną kwasu galusowego, która wykazuje znaczną aktywność przeciwutleniającą. Dzięki temu może efektywnie wychwytywać wolne rodniki chroniąc błony komórkowe przed utlenieniem.

Celem pracy było zaprojektowanie i scharakteryzowanie nowoczesnych powłok dla implantów/stentów o szerokim potencjale aplikacyjnym w inżynierii tkankowej. Realizując zamierzony cel w pierwszym etapie scharakteryzowano właściwości monowarstw badanych związków (DOPC, CsA i/lub LG) uzyskanych na ciekłej fazie nośnej, którą stanowiła woda, roztwór kwasu octowego lub roztwór chitozanu. Określono organizację cząsteczek podczas procesu sprężania, ich wzajemne oddziaływania pod względem jakościowym i ilościowym, oraz wpływ rodzaju subfazy na właściwości filmów, szczególnie w aspekcie stabilności termodynamicznej.

W kolejnym etapie dokonano wyboru optymalnych warunków przenoszenia monowarstw na podłoże stałe w oparciu o badania stabilności i relaksacji w funkcji czasu oraz proces sprężania-rozprężania określony zadaniem ciśnieniem powierzchniowym. Następnie monowarstwy odpowiednio sprężone przenoszono na nośnik PET aktywowany plazmą, a także inne podłoża (mikę, mikę pokrytą złotem i/lub szkło pokryte złotem, kryształ kwarcu z napyłonymi elektrodami złotymi) w zależności od zastosowanej techniki badawczej. Monowarstwy przenoszono z subfazy ciekłej na nośnik stały bezpośrednio po osiągnięciu zadanej wartości ciśnienia powierzchniowego uzyskując zadowalające wartości współczynnika przeniesienia. Opisano efektywność przenoszenia, stopień i jakość pokrycia powierzchni. W ostatnim etapie scharakteryzowano topografię powierzchni oraz jej organizację cząsteczkową i zwilżalność, które ściśle determinują biokompatybilność biomateriałów.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wszystkie monowarstwy znajdują się w stanie ciekłym rozprężonym i/lub stanie pośrednim ciecz rozprężona-ciecz skondensowana, co doskonale odwzorowuje warunki panujące w naturalnych błonach biologicznych. Wprowadzenie chitozanu do fazy nośnej zwiększa upakowanie monowarstw. Dodanie LG jako kolejnego składnika monowarstw DOPC-CsA zmienia charakter oddziaływań z odpychającego na przyciągający poprzez lepsze dopasowanie strukturalne, co także wpływa na zwiększenie stabilności termodynamicznej badanych filmów.

Przedstawiony w pracy mechanizm oddziaływań pomiędzy DOPC, CsA i LG zakłada, że LG lokuje się blisko wiązań nienasyconych fosfolipidu, aby chronić je przed utlenianiem. Ponadto łańcuchy węglowodorowe DOPC i LG zapewniają hydrofobowe środowisko dla leku cyklosporyny A, przez co może ona zmieniać swoją konformację z „otwartej” na „zamkniętą”. Taki proces ma miejsce w dyfuzji biernej podczas przechodzenia leku przez błony.

Mikroskopia sił atomowych (AFM) pozwoliła na wyznaczenie chropowatości osadzonych monowarstw oraz wykazała, że rodzaj podłoża znacząco wpływa na ten parametr. Spektrometria masowa jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS) potwierdziła, że cząsteczki LG lokują się blisko DOPC. Co więcej, wykazała, że obecność Ch poprawia organizację cząsteczkową monowarstw. Pomiary kąta zwilżania wody, formamidu i diiodometanu dowiodły, że modyfikacja PET plazmą oraz monowarstwami powoduje wzrost swobodnej energii powierzchniowej polimeru. Zapewnia to lepsze właściwości hydrofilowo-hydrofobowe materiału stosowanego w inżynierii tkankowej, co pozwala na oddziaływania z substancjami o różnej polarności.

Badania wskazują, że otrzymane filmy wieloskładnikowe są odpowiednie do uzyskania powierzchni biokompatybilnej o szerokim spektrum zastosowań biomedycznych. Ponadto mogą być pomocne w dalszych etapach badań *in vitro* oraz *in vivo*.

19. Summary

Over the last few decades, biomaterials have gained great importance in both medicine and tissue engineering. Biocompatibility is a basic property that characterizes each biomaterial. This means that the presence of a solid after its introduction into the patient's body will not cause undesirable side effects. Biocompatibility is influenced by many material surface parameters. Among them chemical composition, topography and wettability are the most important. It is crucial that carrying out the basic research the system which will allow to control physicochemical properties of biomaterial surface, and then allow to attain patient's positive response should be properly designed.

One of the frequently applied polymers for biomaterial production in the tissue engineering is poly(ethylene terephthalate) PET. It is used, among others, for production of blood vessel stents and/or their covers. However, its low surface free energy limits its biocompatibility and in consequence, its medical use. Therefore, it is necessary to modify the PET surface by plasma activation and/or covering it with a film of substances more favourable for the body. In this aspect, the natural polysaccharide chitosan (Ch) characterized by biocompatibility, biodegradability, and antimicrobial properties deserves a great attention. However, in contact with blood, Ch assumes a positive charge which results in clot formation due to adhesion of negatively charged blood morphic elements. Besides narrowing of the stent, such a process can lead to implant rejection. In order to counteract it, it is necessary to introduce additional biological substances able to modify the surface charge of Ch film to make it less thrombogenic. One of them can be a phospholipid as a main building component of cell membranes. The representative of phospholipids is 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) which can act as a natural link between the artificial biomaterial and the patient's tissues. Moreover, the introduction of the immunosuppressive drug cyclosporine A (CsA), used mainly in medicine to prevent transplant rejection, will ensure its delivery directly to the appropriate tissue, while eliminating the problem of low oral bioavailability of CsA. However, the CsA therapy causes many side effects related to the formation of free radicals that can damage tissues. Therefore, the addition of another substance with antioxidant properties, for example lauryl gallate (LG), seems to be necessary. LG is a derivative of gallic acid characterized by a significant antioxidant activity. Owing to this property, it can capture free radicals effectively, protecting the cell membranes against oxidation.

The aim of the thesis was to design and characterize modern coatings for the implants/stents with a wide potential application in the tissue engineering. In order to achieve the intended goal, in the first stage of the experiments, the properties of the tested monolayers (DOPC, CsA and/or LG) obtained on the liquid subphase (water, acetic acid or chitosan solution) were characterized. The arrangement of molecules during the compression process, their interactions in qualitative and quantitative terms, and the influence of the type of the subphase on the properties of the monolayers, especially in terms of thermodynamic stability, were determined.

In the next stage, the optimal conditions for transferring monolayers to the solid support were selected based on stability and relaxation measurements as a function of time, and the compression-decompression process determined by the given surface pressure. Then, the properly compressed monolayers were transferred onto the plasma-activated PET support as well as other the substrates (mica, gold-coated mica and/or gold-coated glass, quartz crystal with sputtered gold electrodes) depending on the research technique. The monolayers were transferred from the liquid subphase to the solid support immediately after reaching the desired surface pressure, obtaining satisfactory values of the transfer ratio. The transfer efficiency, degree and quality of the surface coverage were described. In the last stage, the surface topography and its molecular arrangement as well as wettability, which strictly determine the biocompatibility of biomaterials, were characterized.

On the basis of the experiments, it was found that all monolayers are in the liquid expanded state and/or in the intermediate liquid expanded - liquid condensed states which mimic the conditions occurring in the natural biological membranes perfectly. The addition of chitosan into the liquid phase influences the monolayers packing. The addition of LG as another component of DOPC-CsA monolayers changes the character of interactions from repulsive to attractive ones through a better structural fit, which also increases the thermodynamic stability of the tested films.

The mechanism of interactions between DOPC, CsA and LG presented in the thesis assumes that LG is located close to the unsaturated bonds of the phospholipid to protect them against oxidation. Furthermore, the DOPC and LG hydrocarbon chains provide a hydrophobic environment for the cyclosporine A, which can change its conformation from "open" to "closed". Such a process takes place in passive diffusion as the drug passes through the membranes.

Atomic force microscopy (AFM) made it possible to determine the roughness of the deposited monolayers and showed that the type of substrate affects this parameter significantly. The time of flight secondary ion mass spectroscopy (TOF-SIMS) confirmed that the LG molecules localize near the DOPC. Moreover, it showed that the presence of Ch improves the molecular arrangement of the monolayers. The contact angle measurements of water, formamide and diiodomethane proved that the modification of PET by the air plasma treatment and the film deposition increased its surface free energy. This guarantees better hydrophilic-hydrophobic properties of the material used in the tissue engineering which allows interactions with the substances of different polarity.

The results prove that the obtained multi-component films are suitable for preparation of a biocompatible surface with a wide range of potential biomedical applications. In addition, they can be helpful in further stages of *in vitro* and *in vivo* studies.