

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Львівська політехніка»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Шимборська Яна Андріївна

Гриф

Прим. № _____

УДК _____ (індекс)

ДИСЕРТАЦІЯ

**Формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних
покриттів**

Спеціальність 102 Хімія

Галузь знань 10 Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Шимборська Я. А.

Науковий керівник
Стецишин Юрій Богданович,
доктор хімічних наук, професор

Львів 2024

АНОТАЦІЯ

Шимборська Я. А. Формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 102 – Хімія. – Національний університет «Львівська політехніка», Львів, 2024.

Дисертація присвячена процесу формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів та дослідженню їхніх властивостей. Методика створення таких покриттів заснована на модифікації поверхні «розумних» прищеплених полімерних щіток біологічно активними молекулами/макромолекулами з метою контрольованого впливу на біологічні об'єкти. Напрямки застосування подібних матеріалів є найрізноматніші: тканинна інженерія, медицина, біотехнології, як засоби доставки лікарських засобів, біосенсиори тощо.

У першому розділі наводиться огляд літератури, що стосується «розумних» полімерних систем, методів одержання одного з найпопулярніших представників таких систем - прищеплених (ко)полімерних щіток, чутливих до дії зовнішніх чинників, способів їх функціоналізації та модифікації біологічно активними молекулами/макромолекулами, властивостей та їх можливих застосувань.

У другому розділі представлено методики синтезу та методи дослідження прищеплених (ко)полімерних щіток та двошарових біологічно активних покриттів.

Третій розділ присвячений формуванню та дослідженню властивостей температуро- та рН-чутливих прищеплених (ко)полімерних щіток з нижньою критичною температурою розшарування LCST на основі таких мономерів: N-

ізопропілакриламід (NIPAM), метилового етеру діетиленглікольмонометакрилату (OEGMA188), акриламід (AAm), 2-гідроксиетилметакрилату (HEMA).

Синтезовано нанощари прищеплених щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm) з різним мольним співвідношенням фрагментів мономерів у складі кополімерної щітки, методом радикальної полімеризації від поверхні з перенесенням атому (ATRP). Формування (ко)полімерних щіток було підтверджено за допомогою методів часопротітної вторинної йонної мас-спектрометрії ToF-SIMS та рентгенівської фотоелектронної спектроскопії XPS. Відомо, що температуро-чутливі полімерні щітки на основі POEGMA188 виявляють LCST перехід при температурі приблизно 22 °C. Цей перехід зумовлений розриванням водневих зв'язків між атоми оксигену PEG ланок у складі молекул POEGMA188 та атомами водню у молекулах води, що існують при $T < LCST$, і формуванням слабких зв'язків за рахунок полімер-полімерних взаємодій при $T > LCST$. Проте несподіваною виявилася температурна відповідь полімерних щіток на основі PAAm з температурою переходу T_c біля $10,6 \pm 1,3$ °C, ймовірно, реалізованою частковою дегідратацією вільних амідних груп та утворенням водневих структур між цис-транс-мультимерами та транс-мультимерами. Кополімерні щітки на основі P(OEGMA188-co-AAm) із високою мольною часткою AAm (>44%) мали підсилену температуро-залежну відповідь змочуваності зі зміною контактного кута змочування у 45°, замість 17-18 ° для класичного LCST переходу. Важливо відмітити, що ці зміни не супроводжувалися змінами товщини нанощарів та їхньою морфологією. Це свідчило про те, що в області T_c утворювалися більш гідрофобні структури, реалізовані за рахунок водневих зв'язків між атомами оксигену у молекулах OEGMA188 та амідними фрагментами AAm, які змінювали, але не руйнували утворених водневих зв'язків між мономерами та молекулами води. Цей механізм можливий завдяки тому, що склад кополімерних щіток є однорідним по всій глибині нанощарів.

Крім того, покриття на основі P(OEGMA188-co-AAm) з високою мольною часткою AAm демонстрували «шизофренічну» відповідь змочуваності на зміни температури після їхнього занурення в розчини буферів з різними значеннями рН. Нами були описані переходи, що імітують LCST та верхню критичну температуру розшарування UCST для рН=3, LCST перехід для рН=5 і 7, а також блокування переходу для рН=9.

Отримані температуро- та рН-чутливі (ко)полімерні щітки можуть бути використані у біомедицині для вивільнення біологічно активних речовин, контролю кількості бактерій та адсорбція білків, адгезії та відшаровування клітинних шарів у передбачуваний для нас спосіб. Наші наношари мають принаймні три переваги:

1. Температуро-залежна відповідь змочуваності поверхні (ко)полімерних щіток є більш вираженою та помітною, ніж для наношарів на основі P(OEGMA188 та PAAm).
2. (Ко)полімерні щітки виявляють одночасно чутливість і до зміни температури, і до рН буферів.
3. Завдяки їхній «шизофренічній» відповіді на зовнішні чинники, області застосувань даних прищеплених щіток можуть бути розширені.

Окрім цього, була синтезована та охарактеризована серія з п'яти полімерних щіток на основі P(OEGMA), PNIPAM, PHEMA, P(OEGMA-co-HEMA) та P(NIPAM-co-HEMA), які потенційно можуть використовуватися у безкаркасній тканинній інженерії. Був проведений аналіз фізико-хімічних властивостей, що підтвердив успішне створення покриттів з подібною товщиною і шорсткістю. Вивчення чутливості (ко)полімерних щіток на зміни температури показало, що термочутливість нанопокриттів сильно залежить від їхнього складу і може зберігатися, зникати або змінюватися з LCST на UCST перехід для різних мольних співвідношень мономерів у полімерній щітці.

У четвертому розділі описано біосумісні властивості першого прищепленого наношару на основі (ко)полімерних щіток з використанням

дермальних фібробластів людини (HDFn) та можливість маніпулювати морфологією клітин за різних температур.

З метою оцінки цитотоксичності покриттів вони використовувалися культивування фібробластів людини. Їхній ріст та життєздатність були проаналізовані кількісно. Результати підтвердили, що жоден з видів (ко)полімерних щіток не є цитотоксичним для дослідженої клітинної лінії, але морфологія клітин в значній мірі залежить від хімічного складу покриття. (Ко)полімерні щітки на основі P(OEGMA), PNIPAM, P(NIPAM-co-HEMA) сприяють культивуванню фібробластів, утворюючи практично моношар клітин після 168 годин культивування. Для покриттів на основі PHEMA та P(OEGMA-co-HEMA) з мольною часткою HEMA у 50% клітини формують агломерати, наростаючи одна на одну. Крім того, була описана залежність життєздатності фібробластів від контактного кута змочування щіток та їхньої шорсткості для 24 та 72 год інкубування.

Ми змогли показати зміну морфології фібробластів людини та їхнє безензимне відшаровування, викликане змінами у властивостях прищеплених (ко)полімерних щіток, спричиненими зниженням температури до 10 °C.

Проведені експерименти виявили численні переваги створених термочутливих щіток. Вони продемонстрували різні механізми термочутливості, що робить їх дуже цікавими об'єктами для подальших досліджень з метою вивчення молекулярних механізмів теплової відповіді. Ми показали як можна змінювати температуру переходу покриттів, змінюючи їхній склад. Біосумісність наношарів та людських фібробластів робить створені прищеплені щітки перспективними кандидатами для тканинної інженерії. Нами були висунуті гіпотези механізмів взаємодії клітин з прищепленими полімерними щітками з UCST та LCST переходами, ефективного відшаровування клітин та суттєву зміну їхньої морфології.

У п'ятому розділі представлено спосіб формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів шляхом модифікації першого наношару, що складається з термочутливих кополімерних щіток на

основі P(OEGMA-co-HEMA) з мольною часткою HEMA 10% з реакційноздатними гідроксильними групами на поверхні, ковалентно прищепленими біологічно активними наношарами на основі 4-ArmPEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT, зшитих у полімерну матрицю з гелеподібною структурою. Проведено дослідження впливу часу модифікації на збереження температуро-чутливих властивостей двошарових полімерних покриттів, що показало, що зі збільшення часу інтенсивність LCST-подібного переходу зменшується, поки не зникає повністю. Також хімічний склад двошарових покриттів був охарактеризований за допомогою раманівської спектроскопії, а товщина методом еліпсометрії.

Для клітинних тестів були обрані ракові клітини підшлункової залози (PANC-1) завдяки їхнім властивостям, простому процесу культивування, швидкому росту. Для візуалізації життєздатності клітин проводили їхнє забарвлення флуоресцентними барвниками, що дозволяло розрізнити мертві та живі клітини. Життєздатність клітин була на рівні >96% для двох видів двошарових покриттів.

Були описані в'язкоеластичні властивості клітин, висіяних на двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT і інкубованих протягом 48 годин, а саме залежності модулів накопичення та втрат енергії в залежності від частоти осциляції наконечника атомно-силового мікроскопу. Забарвлення клітинного цитоскелету та ядер дозволило нам продемонструвати та охарактеризувати морфологію клітин та вплив фізико-хімічних та механічних властивостей двошарових покриттів на них. Двошарові полімерні покриття на основі 4-ArmPEG15K сприяли адгезії та проліферації клітин PANC-1, а покриття на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT володіли неоптимальними властивостями для культивування цієї клітинної лінії.

Майбутнє застосування двошарових покриттів пов'язане з біомедициною та безкаркасною тканинною інженерією. Їх можна використовувати як для дослідження методів боротьби з раком або у формі засобів цільової доставки

ліків, так і для культивування клітин з метою їх неінвазивного відшарування і подальшого використання у терапії пацієнтів з опіками та шкірними захворюваннями.

Ключові слова: прищеплені (ко)полімерні щітки, температуро-чутливі полімерні щітки, рН-чутливі полімерні щітки, біологічно активні макромолекули, гідрогелі, атомно-силова мікроскопія, еліпсометрія, контактний кут змочування, культивування клітин, фібробласти людини, ракові клітини підшлункової залози.

SUMMARY

Shymborska Y. A. Formation of Bilayers of Biologically Active Grafted Polymer Coatings. – Qualifying scientific work under the authority of manuscript.

Dissertation for the degree of doctor of philosophy in the field of 102 – Chemistry– Lviv Polytechnic National University, Lviv, 2024.

This dissertation is devoted to the process of forming bilayers of biologically active grafted polymer coatings and the investigation of their properties. The methodology of synthesis of such coatings is based on modifying the surface of "smart" grafted polymer brushes with biologically active molecules/macromolecules to exert controlled influence on biological objects. The applications of these materials are diverse, including tissue engineering, medicine, biotechnology, drug delivery systems, biosensors, and more.

The first section provides a literature review of current "smart" polymer systems, focusing on one of the most popular representatives—grafted (co)polymer brushes responsive to external stimuli. The chapter discusses methods of obtaining these systems, their functionalization with biologically active molecules/macromolecules, properties, and potential applications.

The second section presents synthesis methodologies and investigation methods for grafted (co)polymer brushes and bilayers of biologically active coatings.

The third section is dedicated to the formation and investigation of temperature- and pH-responsive grafted (co)polymer brushes with a lower critical solution temperature (LCST) based N-isopropylacrylamide (NIPAM), 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate (OEGMA188), acrylamide (Aam), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA).

Nanocoatings based on P(OEGMA188-co-AAm) were synthesized with varying monomer molar ratios in the copolymer brush composition using Surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP). The synthesis of (co)polymer brushes was confirmed using Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Temperature-responsive polymer brushes based on POEGMA188 exhibit a lower critical solution temperature (LCST) transition around 22 °C due to the formation of hydrogen bonds between oxygen atoms in PEG chains within POEGMA188 molecules and hydrogen atoms in water molecules below LCST. Unexpectedly, the temperature response of PAAm-based polymer brushes with a transition temperature T_c of approximately 10.6 ± 1.3 °C was observed, likely resulting from partial dehydration of free amide groups and the formation of hydrogen structures between cis-trans-multimers and trans-multimers of amide groups.

Copolymer brushes based on P(OEGMA188-co-AAm) with a high AAm content (>44%) exhibited an enhanced temperature-dependent wetting response, changing the contact angle by 45° instead of the typical 17-18° for a classical LCST transition. Importantly, these changes did not correlate with alterations in nanocoating thickness or morphology, indicating the formation of more hydrophobic structures in the T_c range due to hydrogen bonding between oxygen atoms in OEGMA188 and amide fragments in AAm, modifying but not breaking the formed hydrogen bonds between monomers and water molecules. This mechanism is

feasible due to the homogeneity of the copolymer brush composition throughout the depth.

Furthermore, P(OEGMA188-co-AAm)-based coatings with a high AAm content demonstrated a "schizophrenic" wetting response to temperature changes after immersion in buffer solutions with varying pH values. Transitions mimicking LCST and upper critical solution temperature (UCST) were described for pH = 3, LCST transition for pH = 5 and 7, and the blocking of the transition for pH = 9.

These temperature- and pH-sensitive (co)polymer brushes have potential applications in biomedicine due to their ability to release bioactive substances, control bacterial number, protein adsorption and conformation, and cell attachment/detachment in a predictable manner. The nanocoatings have three key advantages: a more pronounced temperature-dependent wetting response, simultaneous sensitivity to temperature and pH changes, and an expanded application range due to their "schizophrenic" response to external stimuli.

Additionally, a series of five polymer brushes based on POEGMA, PNIPAM, PHEMA, P(OEGMA-co-HEMA), and P(NIPAM-co-HEMA) were synthesized and characterized for potential use in scaffold-free tissue engineering. The analysis of their physicochemical properties confirmed successful coating synthesis with similar thickness and roughness. The study of the response of (co)polymer brushes to temperature changes revealed that the thermosensitivity strongly depends on their composition, with the ability to retain, lose, or change from LCST to UCST transition for different monomer molar ratios in the polymer brush. Cytotoxicity assessment using human fibroblast cultivation indicated that none of the (co)polymer brushes were cytotoxic, but cell morphology significantly depended on the coating's chemical composition. Brushes based on POEGMA, PNIPAM, and P(NIPAM-co-HEMA) promoted fibroblast growth, forming nearly monolayers after 168 hours of cultivation. However, coatings based on PHEMA and P(OEGMA-co-HEMA) with a 50% HEMA content caused cell agglomerates to form. Additionally, the dependence of fibroblast viability on the wetting contact angle and brush roughness for 24 to 72 hours of incubation was described.

The fourth section describes the biocompatible properties of the first grafted nanolayer based on (co)polymer brushes using human dermal fibroblasts (HDFn) and the ability to manipulate cell morphology at different temperatures.

In order to evaluate the cytotoxicity of the coatings, they were used to cultivate human fibroblasts. Their growth and viability were analyzed quantitatively. The results confirmed that none of the types of (co)polymer brushes are cytotoxic for the studied cell line, but the morphology of the cells largely depends on the chemical composition of the coating. (Co)polymer brushes based on POEGMA, PNIPAM, P(NIPAM-co-HEMA) promote the cultivation of fibroblasts, forming practically a monolayer of cells after 168 hours of cultivation. For coatings based on PHEMA and P(OEGMA-co-HEMA) with a molar fraction of HEMA of 50%, the cells form agglomerates, growing on top of each other. In addition, the dependence of the viability of fibroblasts on the wetting contact angle of the brushes and their roughness for 24 and 72 h of incubation was described.

We were able to show a change in the morphology of human fibroblasts and their non-enzymatic detachment caused by changes in the properties of grafted (co)polymer brushes caused by a temperature decrease to 10 °C.

The conducted experiments revealed numerous advantages of the developed thermally responsive brushes, demonstrating different mechanisms of thermosensitivity, making them intriguing subjects for further studies aimed at understanding the molecular mechanisms of thermal response. The ability to alter the transition temperature of coatings by changing their composition was demonstrated. The biocompatibility of nanocoatings and human fibroblasts makes the created grafted brushes promising candidates for tissue engineering. Hypotheses regarding the mechanisms of interaction of cells with grafted polymer brushes with UCST and LCST transitions, effective cell detachment, and significant changes in cell morphology were put forward.

The fifth section presents the method of forming bilayers of biologically active grafted polymer coatings by modifying the first nanolayer, consisting of thermosensitive copolymer brushes based on P(OEGMA-co-HEMA) with a mole

fraction of HEMA of 10% with reactive hydroxyl groups on the surface, with covalently grafted biologically active nanolayers based on 4-ArmPEG15K and 4-ArmPEG15K + PEG-3APT, cross-linked into a polymer matrix with a gel-like structure. A study of the effect of modification time on the preservation of temperature-sensitive properties of two-layer polymer coatings was carried out, which showed that with increasing time, the intensity of the LCST-like transition decreases until it disappears completely. Also, the chemical composition of two-layer coatings was characterized by Raman spectroscopy, and the thickness by ellipsometry.

Pancreatic cancer cells (PANC-1) were chosen for cell tests due to their properties, simple cultivation process, and rapid growth. To visualize the viability of cells, they were stained with fluorescent dyes, which made it possible to distinguish between dead and living cells. Cell viability was >96% for two types of bilayer coatings. The viscoelastic properties of cells seeded on bilayer coatings based on 4-ArmPEG15K and 4-ArmPEG15K + PEG-3APT and incubated for 48 hours were described, namely the dependences of the storage moduli and energy losses depending on the oscillation frequency of the atomic force microscope tip. Staining of the cellular cytoskeleton and nuclei allowed us to demonstrate and characterize the morphology of the cells and the effect of the physicochemical and mechanical properties of the bilayer coatings on them. Bilayer polymer coatings based on 4-ArmPEG15K promoted adhesion and proliferation of PANC-1 cells, while coatings based on 4-ArmPEG15K + PEG-3APT had suboptimal properties for the cultivation of this cell line.

The future application of bilayer coatings is associated with biomedicine and scaffold-free tissue engineering. They can be used to research cancer treatments or as drug delivery systems, as well as to culture cells for non-invasive separation and further use in treating patients with burns and skin diseases.

Keywords: grafted (co)polymer brushes, temperature-responsive polymer brushes, pH-responsive polymer brushes, biologically active macromolecules,

hydrogels, atomic force microscopy, ellipsometry, contact angle, cell cultivation, human dermal fibroblasts, pancreatic cancer cells.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у виданнях, що входять до наукометричних баз даних Scopus або Web of Science:

1. Tymetska S., **Shymborska Y.**, Stetsyshyn Y., Budkowski A., Bernasik A., Awsiuk K., Donchak V., Raczkowska J. Thermoresponsive Smart Copolymer Coatings Based on P (NIPAM-co-HEMA) and P (OEGMA-co-HEMA) Brushes for Regenerative Medicine. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2023. Vol. 9. No. 11. P. 6256-6272. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00917>
2. **Shymborska Y.**, Budkowski A., Raczkowska J., Donchak V., Melnyk Y., Vasiichuk V., Stetsyshyn Y. Switching it Up: The Promise of Stimuli-Responsive Polymer Systems in Biomedical Science. *The Chemical Record*. 2023. e202300217. <https://doi.org/10.1002/tcr.202300217>
3. **Shymborska Y.**, Stetsyshyn Y., Awsiuk K., Raczkowska J., Bernasik A., Janiszewska N., Dąbczyński P., Kostruba A., Budkowski, A. Temperature-and pH-Responsive Schizophrenic Copolymer Brush Coatings with Enhanced Temperature Response in Pure Water. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2023. Vol. 15. No. 6. P. 8676-8690. <https://doi.org/10.1021/acсами.2c20395>
4. Lishchynskyi O., **Shymborska Y.**, Stetsyshyn Y., Raczkowska J., Skirtach A. G., Peretiatko T., Budkowski A. Passive antifouling and active self-disinfecting antiviral surfaces. *Chemical Engineering Journal*. 2022. Vol. 446. No. 1. P. 137048. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137048>
5. **Shymborska Y.**, Stetsyshyn Y., Raczkowska J., Awsiuk K., Ohar H., Budkowski A. Impact of the various buffer solutions on the temperature-responsive properties of POEGMA-grafted brush coatings. *Colloid and Polymer Science*. 2022. Vol. 300, No 5. P. 487-495. <https://doi.org/10.1007/s00396-022-04959-1>

Тези доповідей на конференціях:

1. *Shymborska Y., Budkowski A., Stetsyshyn Y.* Tailoring Thermo- and pH Responsive Properties through Grafted Brush Coatings of Tuned Combinations of Well-Known Monomers. 14th Hellenic Polymer Society Conference 22 -25 November 2023, Thessaloniki, Greece. P. 56.
2. **Шимборська Я. А., Дончак В. А., Стецишин Ю. Б.** Створення кополімерних щіток, чутливих до дії зовнішніх чинників, з метою застосування у тканинній інженерії. Міжнародна наукова конференція «Сучасні досягнення в харчовій, органічній та полімерній хімії», присвячена світлій пам'яті професора Станіслава Воронова 24-26 жовтня 2023, Львів, Україна. P. 42.
3. **Шимборська Я., Стецишин Ю.** Модифікація скляних підкладок за допомогою нанопокриттів на основі кополімерних щіток: синтез, властивості, «шизофренічна» поведінка. Шоста Міжнародна конференція молодих учених «Харківський природничий форум». 18-19 Травня 2023, Харків, Україна. P. 454.
4. *Shymborska Y., Stetsyshyn Y., Budkowski A.* Formation and characterization of «schizophrenic» nanocoatings of grafted copolymer brushes. XXIV International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «Modern Chemistry Problems». 17-19 Травня 2023, Київ, Україна – P. 179.
5. *Lishchynskiy O., Shymborska Y., Skirtach A.G., Stetsyshyn Y.* Grafted polymer brushes with calcium carbonate nanoparticles. XV Ukrainian conference on macromolecules with international participation. 25-27 October 2022, Kyiv, Ukraine –P. 237.
6. **Шимборська Я., Ліщинський О., Стецишин Ю., Budkowski A.** Температуро-чутливі полімерні покриття: синтез, властивості та застосування у наномедицині. XV Ukrainian conference on macromolecules with international participation. 25-27 October 2022, Kyiv, Ukraine –P. 163.

7. *Shymborska Ya., Lishchynskyi O., Nastyshyn S., Stetsyshyn Yu., Budkowski A.* Prospects for temperature-responsive polymer coatings in the field of biomedicine. XXIII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні Проблеми Хімії», Київ 18-20 травня 2022 р. P. 117.
8. *Lishchynskyi O., Shymborska Ya., Nastyshyn S., Skirtach A., Stetsyshyn Yu.* Poregma based nanocomposite coatings with calcium carbonate nanoparticles. XXIII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні Проблеми Хімії», Київ 18-20 травня 2022 р. P. 111.
9. *Shymborska Y., Stetsyshyn, Y., Budkowski A.* Grafted polymer brush coatings with enhanced temperature response based on poly(di(ethylene glycol)methyl ether methacrylate-co-acrylamide). Multiscale Phenomena in Condensed Matter Online conference for young researchers Young Multis 5-7 July 2021, Krakow, Poland. P. 62.
10. *Shymborska Y.* Antifouling temperature-responsive polymer brush coatings based on poly(di(ethylene glycol)methyl ether methacrylate-co-acrylamide) for biomedical application. II International Hazar Scientific Research Conference 10-12 April 2021, Baku, Azerbaijan. P. 345.
11. *Шимборська Я., Стецишин Ю.* Температуро-чутливі прищеплені кополімерні щітки з регульованою нижньою критичною температурою розшарування у межах фізіологічного діапазону. International Scientific Online Conference "Modern Advances in Organic Synthesis, Polymer Chemistry and Food Additives" in honor of Prof. Stanislav Voronov, dedicated to the 80th anniversary of birth Lviv, Ukraine December 7-8 2021, Lviv, Ukraine. P. 107.
12. *Шимборська Я., Гнип А., Лях В., Стецишин Ю.* Формування наношарів прищеплених щіток полі(етилового етеру триетиленглікольмонометакрилату-ко-акриламиду). XXII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні проблеми хімії» 19-21 травня 2021, Київ, Україна. P. 198.

13. **Shymborska Y., Stetsyshyn Y., Lishchynskyi O., Nastyshyn S., Awsiuk K., Raczkowska J., Donchak V., Budkowski A.** `Smart` and promising antibacterial food-packaging material. Food chemistry. Modern methods for production of food, food additives and packaging materials conference 7 October 2020, Lviv, Ukraine. P. 100.
14. *Nastyshyn S., Stetsyshyn Y., Lishchynskyi O., Shymborska Y., Awsiuk K., Budkowski A., Raczkowska J.* Non-cytotoxic, thermo-switchable antibacterial coating based on metallic nanoparticles embedded in polymer brush for the classy cookware. Modern methods for production of food, food additives and packaging materials conference 7 October 2020, Lviv, Ukraine. P. 96.
15. *Lishchynskyi O., Shymborska Y., Nastyshyn S., Shevtsova T., Kostenko M., Harhay K., Stetsyshyn Y.* Temperature-responsive polymer brushes as packaging materials for food industry. Modern methods for production of food, food additives and packaging materials conference 7 October 2020, Lviv, Ukraine. P. 98.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. Температуро- та рН-чутливі полімерні системи: прищеплені полімерні щітки з критичними температурами розшарування, їхня модифікація та застосування (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД)

1.1. Сучасні уявлення про температуро- та рН-чутливі прищеплені полімерні щітки

1.2. Функціоналізація та модифікація прищеплених полімерних щіток

1.3. Застосування прищеплених полімерних щіток

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Формування температуро- та рН-чутливих прищеплених (ко)полімерних щіток

2.1.1. Формування прищепленого наношару 3-амінопропілтриетоксисилану (APTES) на поверхні скла

2.1.2. Методика формування наношару 2-бромоізобутирилброміду на поверхні амінованого скла

2.1.3. Методика формування прищеплених (ко)полімерних щіток методом ATRP

2.1.4. Методика модифікації прищеплених кополімерних щіток біологічно активними макромолекулами на основі поліетиленгліколю

2.2. Методики аналізів

2.2.1. Дослідження поверхні методом часопротіної вторинної йонної мас-спектрометрії TOF-SIMS

2.2.2. Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія XPS

2.2.3. Спектроскопія відбиття білого світла WLRS

2.2.4. Раманівська спектроскопія

2.2.5. Еліпсометричні дослідження

2.2.6. Вимірювання контактних кутів змочування води CA

2.2.7. Атомно-силова мікроскопія AFM

2.2.8. Дослідження клітинного росту фібробластів

2.2.9. МГТ калориметричний метод

2.2.10. Фарбування живих/мертвих клітин

2.2.11. Імунофлюоресцентний аналіз

2.2.12. Дослідження зміни морфології фібробластів

2.2.13. Дослідження проліферативного росту ракових клітин

2.2.14. Мікрореологічні дослідження ракових клітин, висіяних на двошарових біологічно активних прищеплених покриттях

РОЗДІЛ 3. ФОРМУВАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ТЕМПЕРАТУРО-ЧУТЛИВИХ ПРИЩЕПЛЕНИХ ПОЛІМЕРНИХ ЩІТОК З КРИТИЧНОЮ ТЕМПЕРАТУРОЮ РОЗШАРУВАННЯ

3.1. Формування, властивості та застосування наночарів температуро-чутливих прищеплених кополімерних щіток з підсиленою відповіддю змочуваності на зміну температури

3.2. Формування, властивості та застосування наночарів температуро- та рН-чутливих прищеплених кополімерних щіток з «шизофренічною» поведінкою у буферних розчинах з різним значенням рН

3.3. Формування, властивості та застосування наночарів температуро- та рН-чутливих прищеплених полімерних щіток з можливістю керувати LCST-UCST переходами

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ТЕМПЕРАТУРО- ЧУТЛИВИХ ПРИЩЕПЛЕНИХ ПОЛІМЕРНИХ ЩІТОК ТА ЇХНЬОГО ВПЛИВУ НА МОРФОЛОГІЮ ТА ПОВЕДІНКУ ФІБРОБЛАСТІВ

4.1. Дослідження цитотоксичності прищеплених (ко)полімерних щіток

4.2. Дослідження впливу температури на морфологію, адгезію та відшарування фібробластів, висіяних на температуро-чутливих прищеплених кополімерних щітках

РОЗДІЛ 5. ФОРМУВАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ДВОШАРОВИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ПРИЩЕПЛЕНИХ ПОЛІМЕРНИХ ПОКРИТТІВ

5.1. Процес модифікації «розумних» наночарів прищеплених кополімерних щіток ковалентно прищепленими біологічно активними наночарами, їхнє потенційне застосування

5.2. Характеризація двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

ToF-SIMS	Часопролітна вторинна йонна мас-спектрометрія
XPS	Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія
WLRS	Спектроскопія відбиття білого світла
CA	Контактний кут змочування
AFM	Атомно-силова мікроскопія
MTT	Калориметричний метод оцінки кількості живих клітин
ATRP	Радикальна полімеризація з перенесенням атому
APTES	3-амінопропілтриетоксисилан
LCST	Нижня критична температура розшарування
UCST	Верхня критична температура розшарування
NIPAM	N-ізопропілакриламід
OEGMA188	Метилловий етер диетиленглікольмонометакрилату
AAm	Акриламід
HEMA	2-гідроксиетилметакрилат
PEG	Поліетиленгліколь
4-Arm PEG15K	Багатофункціональний спирт на основі PEG
PEG-3APT	Багатофункціональний амін на основі PEG
DVS	Дивінілсульфон

ВСТУП

Актуальність теми. Формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів є надзвичайно актуальною та динамічною темою, яка привернула значну увагу як у наукових, так і в промислових дослідженнях. Ця багатогранна сфера перетинає хімію полімерів, матеріалознавство, біологію та медицину, пропонуючи багатообіцяючі шляхи для інновацій у різних сферах застосування. Вирішення цього завдання передбачає конструювання на неорганічних поверхнях прищеплених біологічно активних наночарів полімерних макромолекул, які здатні впливати на біологічні об'єкти, такі як білкові структури та клітини у передбачуваний для дослідника спосіб. Слід відмітити, проблема формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів вперше розглядається у нашому дослідженні. Найбільш наближені роботи розглядають тільки часткову модифікацію прищепленого наночару біологічно активними молекулами, а наявні методи і об'єкти мають кілька недоліків, визначені як:

- Обмежена кількість інформації у літературних джерелах про "прищеплені біологічно активні наночари" на плоских поверхнях та дисперсних частинках, що свідчить про необхідність більш глибокого вивчення цих структур.
- Токсичність та біонесумісність отриманих наночарів роблять їх застосування небезпечним або обмеженим в медичних та біологічних дисциплінах.
- Відсутність контролю властивостей першого наночару за допомогою температури та рН обмежує їхню універсальність.
- Низька інтенсивність відповіді наночару на дію подразників (температура та рН).
- Складності з модифікацією наночару прищепленими біологічно активними молекулами/макромолекулами.

- Висока нестабільність та руйнування першого наношару під час його модифікації.

Ці обставини вказують на необхідність подальших досліджень та розробок для подолання зазначених обмежень і вдосконалення методів формування прищеплених наношарів та їх подальшої модифікації.

Альтернативним методом створення «чутливих» наношарів може бути конструювання прищеплених кополімерних щіток, один з кономерів яких буде відповідальним за «чутливі» властивості, а інші міститимуть функційні групи, за допомогою яких можна здійснити модифікацію поверхонь прищепленими біологічно активними молекулами/макромолекулами. Ключовим питанням у цьому випадку є знаходження тонкого балансу у композиції полімерних щіток, при якому зберігаються чи навіть посилюються адаптивні властивості полімеру, а також іммобілізується достатня кількість функційних груп для прищеплення біологічно активних молекул. У нашій роботі пропонується інноваційний підхід, де нові «розумні» кополімерні прищеплені наношари, які містять у складі макроланцюги полімерних щіток з реакційноздатними групами (перший прищеплений наношар) модифікуються біологічно активним наношаром з гелеподібною структурою (другий прищеплений наношар) для вирощування клітин та контролю за їх морфологією, що є **важливою та актуальною задачею**.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана на кафедрі органічної хімії Інституту хімії і хімічних технологій Національного університету "Львівська політехніка". Тема дисертаційної роботи відповідає науковому напрямку кафедри, а саме «Створення функціональних полімерів та наноматеріалів».

Мета та завдання досліджень. Метою роботи є розроблення наукових і практичних основ для пошуку та застосування нових двошарових полімерних прищеплених наношарів на неорганічних поверхнях.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити **наступні завдання:**

- розробити наукові та практичні основи конструювання «розумних» наночарів прищеплених до поверхонь неорганічних матеріалів (перший наночар);

- розробити методи синтезу «розумних» наночарів прищеплених кополімерних щіток, один з кономерів яких буде відповідальним за чутливі властивості, а інші міститимуть функційні групи за допомогою яких можна здійснити модифікацію поверхонь прищепленими біологічно активними молекулами/макромолекулами;

- розробити оптимальний склад прищеплених кополімерних щіток при якому зберігаються чи навіть посилюються адаптивні властивості полімеру, а також іммобілізується достатня кількість функційних груп;

- розробити методи модифікації «розумних» наночарів прищеплених кополімерних щіток ковалентно прищепленими біологічно активними наночарами (другий наночар);

- дослідити змочуваність, морфологію та товщину чутливих полімерних наночарів (перший наночар);

- дослідити вплив кополімерного складу на чутливі властивості наночару;

- дослідити структуру біологічно активного наночару (другий наночар);

- дослідити вплив товщини другого наночару на чутливі властивості двошарових покриттів;

- дослідити цитосумісність сформованих наночарів, їх здатність впливати на морфологію живих клітин.

Об'єкт досліджень. Основними об'єктами дослідження є нові «розумні» прищеплені полімерні наночари на неорганічних поверхнях, які містять у складі макроланцюги полімерних щіток (перший прищеплений наночар) модифіковані біологічно активним наночаром (другий прищеплений наночар) для вирощування на них клітин та контролю за їх морфологією.

Предмет досліджень. Процеси формування нових «розумних» прищеплених полімерних наночарів на неорганічних поверхнях, які містять у

складі макроланцюги кополімерних щіток (перший прищеплений наношар), їх будова та властивості; процеси модифікації нових «розумних» кополімерних прищеплених наношарів біологічно активним наношаром (другий прищеплений наношар), їх будова та властивості; процес вирощування клітин різних клітинних ліній на досліджуваних поверхнях, їх життєздатність, та морфологія клітин.

Методи дослідження. Хімічні методи аналізу, елементний аналіз, раманівська спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, часопролітна вторинна йонна мас-спектрометрія, рентгенівська фотоелектронна спектроскопія, еліпсометрія, атомно-силова мікроскопія, визначення контактного кута змочування, калориметричний метод аналізу, фарбування живих/мертвих клітин, імунофлюоресцентний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Робота є комплексним дослідженням, яке включає пошук та застосування нових «розумних» полімерних прищеплених наношарів на неорганічних поверхнях, які містять у складі макроланцюги полімерних щіток (перший прищеплений наношар) модифіковані біологічно активним наношаром (другий прищеплений наношар) для вирощування на них клітин та контролю за їх морфологією.

1) Вперше розроблено процес формування на поверхнях амінованого скла нових «розумних» (ко)полімерних прищеплених наношарів, які складаються з макроланцюгів полімерних щіток, одержаних методом радикальної полімеризації «від поверхні» наступних мономерів:

а) метилового етеру диетиленглікольмонометакрилату та акриламідю;

б) N-ізопропілакриламідю та 2-гідроксietилметакрилату;

в) метилового етеру диетиленглікольмонометакрилату та 2-гідроксietилметакрилату;

2) Досліджено їх хімічну структуру та фізико-хімічні властивості.

3) Вперше досліджено комплексний вплив температури та рН на фізико-хімічні властивості прищеплених кополімерних наночарів у залежності від їх хімічної будови (співвідношення комономерів).

4) Вперше досліджено процес формування двошарових прищеплених біологічно активних наночарів на основі багатofункціональних спиртів/амінів на поверхні температурo-чутливих прищеплених кополімерних щіток.

5) Вперше досліджено вплив часу модифікації на товщину та термочутливі властивості двошарових полімерних покриттів.

б) Вперше створено нові двошарових прищеплені наночари для:

а) вирощування на них тканин;

б) контрольованої зміни морфології клітин;

в) контрольованого відщеплення від поверхні клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено методи синтезу «розумних» прищеплених полімерних щіток, один з комономерів яких буде відповідальним за «чутливі» властивості, а інші нести функційні групи, за допомогою яких можна модифікувати поверхню прищепленими біологічно активними молекулами/макромолекулами. Одержані двошарові полімерні наночари володіють високими цитосумісними властивостями та мають перспективи застосування для вирощування на них тканин, контрольованої зміни морфології ростучих клітин. Отримані наночари можуть бути використанні у тканинній інженерії, у тому числі для отримання неушкоджених наночарів тканинної природи, для використання у хірургії.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає у науковому обґрунтуванні мети та завдання досліджень; теоретично обґрунтованому поясненні одержаних експериментальних результатів; синтезі та дослідженні властивостей «розумних» наночарів прищеплених кополімерних щіток, а також двошарових біологічно активних поверхонь; дослідженні цитосумісності наночарів, їх здатності впливати на морфологію клітин.

Обговорення експериментального матеріалу та формування висновків автор проводив з проф. Стецишином Ю.Б. та проф. Дончаком В.А. Частина експериментального матеріалу була отримана здобувачем разом з проф. Кострубою А., аспірантами Настишином С., Ліщинським О., в Ягеллонському університеті (Польща) у групі проф. Будковського А., в Гентському університеті (Бельгія) у групі проф. Скіртача А.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи представлялися та опубліковані у матеріалах конференцій та симпозіумів:

14th Hellenic Polymer Society Conference (Thessaloniki. 2023). Міжнародна наукова конференція «Сучасні досягнення в харчовій, органічній та полімерній хімії», присвячена світлій пам'яті професора Станіслава Воронова (Львів. 2023). Шоста Міжнародна конференція молодих учених «Харківський природничий форум» (Харків. 2023). XXIV International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «MODERN CHEMISTRY PROBLEMS» (Київ. 2023). XXIII International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «Modern Chemistry Problems» (Kyiv. 2022). XV Ukrainian conference on macromolecules with international participation (Kyiv. 2022). XXIII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні Проблеми Хімії» (Київ. 2022). Multiscale Phenomena in Condensed Matter Online conference for young researchers Young Multis (Krakow. 2021). II International Hazar Scientific Research Conference (Baku. 2021). International Scientific Online Conference "Modern Advances in Organic Synthesis, Polymer Chemistry and Food Additives" in honor of Prof. Stanislav Voronov (Lviv. 2021). XXII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні проблеми хімії» (Київ. 2021). Modern methods for production of food, food additives and packaging materials conference (Lviv. 2020). X international Scientific-technical conference «Advance in Petroleum and Gas Industry and Petrochemistry» (Lviv. 2020).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи висвітлений у 20 публікаціях, зокрема, у 5 статтях у наукових періодичних виданнях інших держав та виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз; 15 тезах доповідей на вітчизняних і міжнародних конференціях та симпозиумах.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу, 4 розділів, висновків та списку використаної літератури. Основний зміст роботи викладений на 144 сторінках друкованого тексту, містить 7 таблиць та 52 рисунки. Бібліографічний список складається з 162 найменувань.

РОЗДІЛ 1. Температуро- та рН-чутливі полімерні системи: прищеплені полімерні щітки з критичними температурами розшарування, їхня модифікація та застосування (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД)

Полімерні системи, чутливі до дії зовнішніх чинників, відіграють ключову роль у розвитку біомедицини. Їх фізичні чи хімічні властивості змінюються у відповідь на зміни зовнішніх факторів, таких як температура, рН, світло або електромагнітне поле. Завдяки такій поведінці дані полімерні системи мають широкий спектр застосувань, включаючи доставку ліків, тканинну інженерію, біосенсори та діагностику [1]. Нові розробки у цій галузі спрямовані на створення полімерних систем, які не лише змінюють свої властивості, але й активно впливають на біологічні об'єкти, що відкриває нові перспективи для біомедицини.

Полімерні системи, чутливі до змін рівня рН або температури оточуючого середовища, є особливо перспективними у сфері доставки ліків, забезпечуючи цільове та контрольоване вивільнення ліків. Вони можуть бути спроектовані для більш точного вивільнення ліків у таких специфічних областях, як ракові пухлини, що призводить до ефективнішого лікування з меншими побічними ефектами. Крім того, ці полімерні системи можуть забезпечувати пролонговане вивільнення ліків протягом тривалого періоду [2–4].

Також полімерні системи, чутливі до дії зовнішніх чинників, виявляють значний потенціал у сфері тканинної інженерії. Вони можуть сприяти росту клітин і тканин, тим самим сприяючи регенерації тканин [5-6]. Пластини з покриттям на основі прищеплених полімерних щіток, що реагують на температуру, є комерційним продуктом Nunc™ Multidishes with UpCell™ Surface (може краще Multiwell Cell Culture Microplates UltraCruz®). Вони демонструють можливість контрольованого росту та відривання клітин [7–8]. Крім того, полімерні системи знаходять застосування в розробці біосенсорів для виявлення біомолекул та аналітів у зразках [9].

Створено нанобіогібридні системи, чутливі до дії зовнішніх чинників, які поєднують в собі функціональні наноматеріали з живими системами [10]. Наприклад, бактерії *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) були використані для цільової доставки *доксорубіцину*, протиракового препарату [11]. Такий підхід значно підвищив ефективність препарату та зберіг життєздатність бактерій.

У [12] вперше було описано використання для реакції на зовнішні чинники фазової поведінки макромолекулярних утворень у різних тонких структурах (таких як полімерні щітки, багат шарові плівки з різних полімерів, гібридні системи, які інтегрують полімери та частки, тонкі плівки, складені з полімерних сіток, і мембрани з каналами або порами).

Класифікація полімерних систем може ґрунтуватися на їхній здатності змінювати свої властивості під дією фізичних, хімічних або біологічних чинників (рис. 1.1). З іншого боку, їх можна поділити на одночутливі та багаточутливі системи [13].

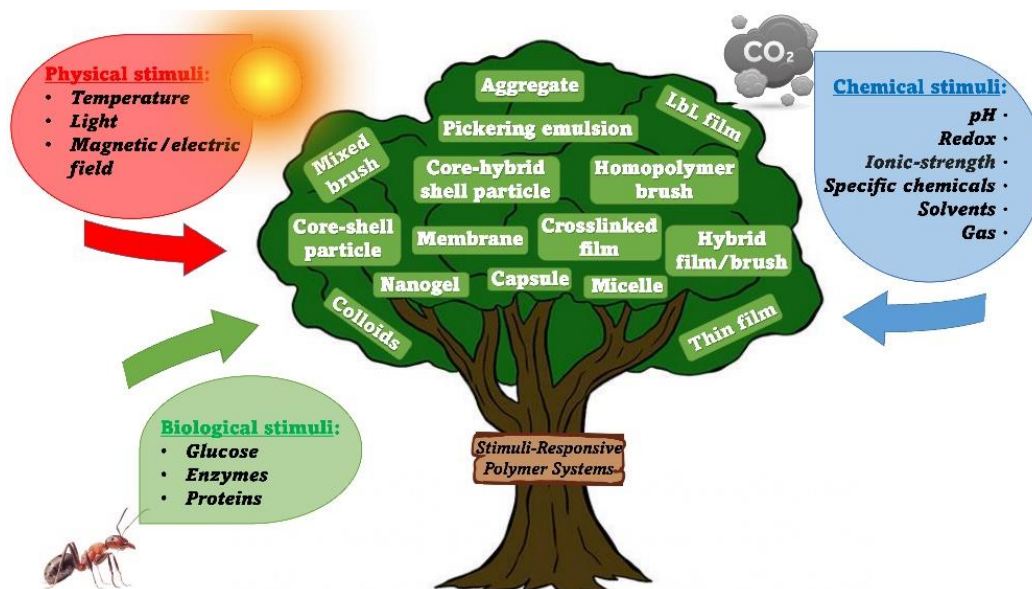


Рис. 1.1. Класифікація полімерних систем, що реагують на зовнішні чинники.

Сьогодні існують різні способи класифікація полімерних систем, чутливих до дії зовнішніх чинників.

Полімерні системи, чутливі до змін температури, привертають значну увагу в останні роки у зв'язку з їхньою незвичною поведінкою та

потенційним застосування в різних галузях. Ці системи проявляють оборотні зміни властивостей відповідно до змін температури. На сьогодні можна виділити чотири групи термочутливих полімерів на основі механізмів їхньої відповіді на температуру:

- термочутливі полімери з LCST або UCST (нижча або верхня критична температура розшарування), що проявляють перехід від гідروفільного до гідрофобного стану в водних розчинах [14–15];
- термочутливі полімери на основі T_g (температура склування) або T_m (температура плавлення), які називаються полімерами термічно-індукованої пам'яті форми (температурний перехід цих полімерів виражений як перехід від кристалічного до високоеластичного стану або від кристалічного до в'язкотекучого стану) [16–17];
- термочутливі рідкокристалічні полімери (демонструють температурно-індукований перехід від нематичного до ізотропного стану) [18–19];
- термочутливі полімери (динамери), здатні до оборотного створення міжмолекулярних ковалентних зв'язків [20–21].

Механізм дії температурочутливих полімерних систем з LCST або UCST переважно базується на гідروفільно-гідрофобному балансі ланцюгів полімерів, який визначає їхню конформацію та взаємодію з молекулами розчинника. LCST - це критична температура, нижче якої компоненти суміші є розчинними у всіх пропорціях. У водних розчинах нижче LCST ($T < LCST$) гідروفільні сегменти ланцюгів полімерів взаємодіють з молекулами води, і полімер знаходиться в розчинному стані (рис. 1.2а).

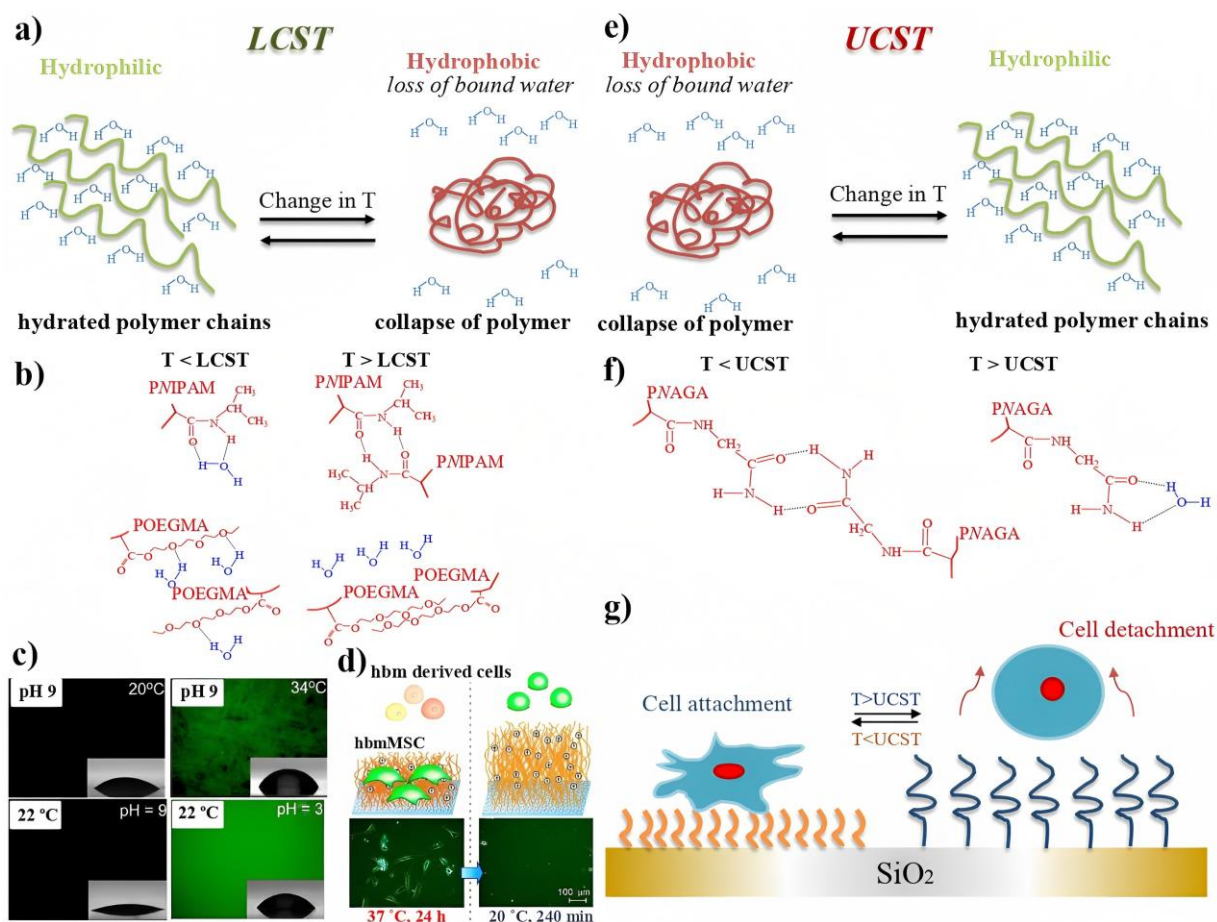


Рис. 1.2. Гідратація ланцюга нижче LCST та згорнутий полімер вище LCST (а). Механізм LCST переходу для PNIPAM та PEOGMA [5] (б). Контрольована температурою та рН адсорбція білків на полімерних щітках на основі PNIPAM [34] (с). Відокремлення клітин hbmMSC від інших клітин, отриманих з кісткового мозку людини [37] (д). Згорнутий полімер нижче UCST і гідратація ланцюга вище UCST (е). Механізм UCST переходу для PNAGA [5] (ф). Контрольована UCST поведінка клітинної адгезії/відривання (г).

Зі збільшенням температури гідрофільні взаємодії стають слабшими, що призводить до утворення міцел або агрегатів та нерозчинного стану полімерів. Найбільш широко використовувані полімерні системи, що виявляють поведінку LCST, включають N-ізопропілаакриламід (NIPAM), етиловий етер триетиленглікольмонометакрилату молекулярною масою 246 (OEGMA246), метиловий етер диетиленглікольмонометакрилату (OEGMA188) та їхні кополімери з іншими мономерами. При $T < LCST$ PNIPAM та його кополімери,

що містять сегменти NIPAM, формують водневі зв'язки між гідрофільними амідними групами NIPAM та молекулами води. Однак при перевищенні LCST ці зв'язки розриваються, і встановлюються нові водневі зв'язки між амідними групами всередині ланцюгів PNIPAM [5–6, 22] (рис. 1.2b). У випадку POEGMA при $T < LCST$ утворюються водневі зв'язки між етерним киснем фрагментів полі(етиленгліколю) та молекулами води [5–6, 23–24]. Однак вище LCST домінуючі водневі зв'язки встановлюються між етерними групами всередині ланцюгів полімера (рис. 1.2b). Значення LCST полімерних систем залежить від численних факторів, таких як молекулярна маса полімерів, наявність вбудованих частинок, органічних або неорганічних іонів, буферні розчини та інше [25–26]. Ключовим фактором таких полімерних систем є інтенсивність температурно-індукованої відповіді. Зокрема, нами було показано, що покриття з кополімерних щіток на основі полі(метилового етеру діетиленглікольметакрилату-ко-акриламід) проявляли підсилену температурно-чутливу відповідь у чистій воді та рН-чутливу "шизофренічну" поведінку у буферних розчинах [27].

З іншого боку, температурно-чутливі полімери, що проявляють UCST фазовий перехід, стають розчинними при нагріванні за рахунок зменшення гідрофобних взаємодій (рис. 1.2e). Наприклад, для полі(акрилогліцинамід) (PNAGA), спостерігається руйнування водневих зв'язків між карбонільними та аміногрупами при $T > UCST$ (рис. 1.2f), що призводить до змін у властивостях полімера [28–29]. Покриття на основі (акрилоїлгліцинамід-ко-N-фенілакриламід) кополімерних щіток з регульованими UCST температурними переходами продемонстрували здатність до контрольованої адгезії/відривання клітин у відповідь на зміну температури [30] (рис. 1.2g).

Полімери з LCST та UCST знаходять широке застосування в біосепарації та клітинній регенеративній терапії [31], також у температурно-модульованому розділенні речовин, таких як стероїди та пептиди [32]. Системи на основі PNIPAM, POEGMA чи їхніх різноманітних кополімерів із

регульованою температурою та рН-контрольованою адсорбцією білків були розроблені нашою групою (рис. 1.2с).[5–6, 23, 33–36]

Методологія тканинної інженерії без каркасу, відома як "інженерія клітинних шарів", була розроблена Т. Окано та його колегами з метою культивування клітин на температуро-чутливих поверхнях. Ця методологія дозволяє вирощувати на температуро-чутливій поверхні цілісні листи клітинної структури, подібної до тканини людини. При зниженні температури до 20 °С такий лист відділяється від поверхні і може бути трансплантований пацієнту. За допомогою температуро-чутливих полімерних щіток також можливо контролювати адгезію та відривання мезенхімальних стовбурових клітин (рис. 1.2d) [37].

рН-чутливі полімерні системи є класом матеріалів, які можуть змінювати свої фізико-хімічні властивості у відповідь на зміни рН. Реакція на рН у полімерах може реалізовуватися різними способами, включаючи рН-індуковане збільшення/зменшення розмірів макроланцюгів, взаємодію між катіонними та аніонними групами, формування та руйнування водневих зв'язків (водневе зв'язування) або рН-індуковану ізомеризацію. Такі матеріали представляють перспективу для застосування в різних галузях біомедицини, найчастіше в доставці ліків та створенні сенсорів [38–40]. Ключовим параметром для рН-чутливих полімерів для доставки ліків є значення рН, яке характерне для місця в організмі, де будуть вивільнені ліки.

У полімерних системах з рН-індукованим збільшенням/зменшенням розмірів макроланцюгів полімер може перебувати в збільшеному розмірі у зв'язку з електростатичним відштовхуванням між зарядженими групами вздовж полімерних ланцюгів. Зі зміною рН заряджені групи можуть протонуватися або депротонуватися, що призводить до зміни електростатичних взаємодій та зменшення розміру полімерних ланцюгів. Наприклад, у роботі [41] описано рН-чутливі тонкі плівки, що містять інсулін. За рН 7,4 плівки розкладаються, інсулін вивільняється і доставляється в організм у нативній формі (рис. 1.3а).

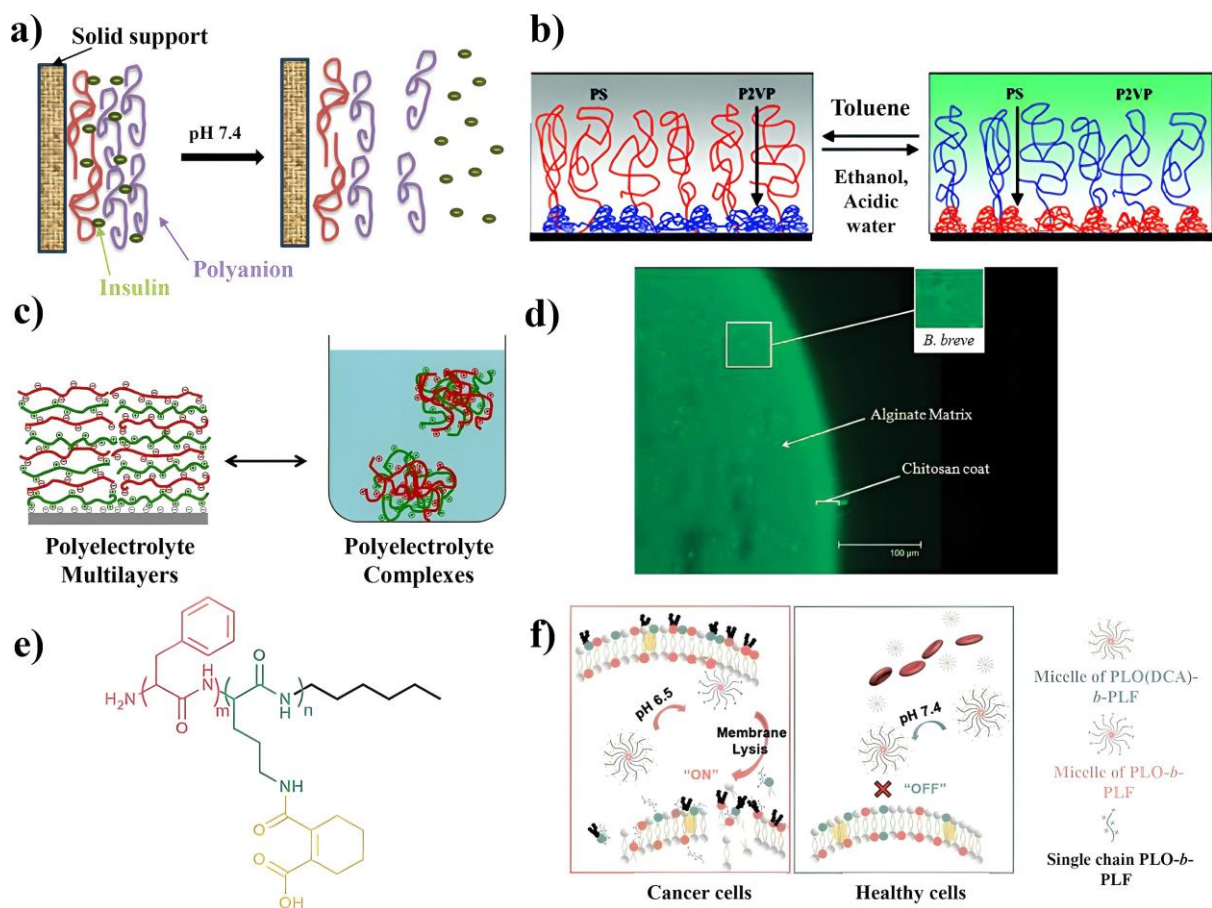


Рис. 1.3. Тонкі плівки, чутливі до зміни рН, що можуть вивільняти інсулін (а). Полімерні щітки на основі кополімеру, чутливі до рН і розчинника [42] (b). Поліелектролітні комплекси та поліелектролітні мультишари [43] (c). Альгінатно хітозанові мікрокапсули як кишковорозчинний транспортний засіб для *Bifidobacterium breve* [45] (d). Кополіпептиди PLO block-PLF, модифіковані ангідридом 1,2-дикарбонової кислоти циклогексену (PLO(DCA)-block-PLF) [46] (e). У нейтральних фізіологічних умовах PLO(DCA)-block-PLF виявляє незначний гемоліз і цитотоксичність, але у слабкокислому середовищі, характерному для пухлин, він відновлює протиракову активність [46] (f).

Дослідження [42] продемонструвало можливість зміни змочуваності та шорсткості поверхні, при зміні рівня рН та природи розчинника (рис. 1.3b). Полімерні системи, що утворюють поліелектролітні комплекси, ґрунтуються на електростатичних взаємодіях між протилежно зарядженими групами,

такими як карбоксильні, аміногрупи, амонієві фрагменти тощо (рис. 1.3с) [43-44]. Зміни у рН можуть впливати на заряд молекул полімера, його розчинність та поведінку при набуханні. Наприклад, використання альгінату та хітозану для створення мікрокапсул покращує життєздатність пробіотика (*Bifidobacterium breve*) у кишковику (рис. 1.3d) [45]. Також кополіпептиди, які формують нанорозмірні міцели, можуть взаємодіяти з раковими клітинами через електростатичні взаємодії та виявляти антиракову активність при зміні заряду в середовищі пухлини (рис. 1.3е, 1.3f) [46].

рН-Чутливі полімерні системи, що засновані на взаємодії та руйнуванні водневих зв'язків у їхній структурі, виявляють зміни у розчинності та набуханні, залежно від протонування чи депротонування іонізованих груп при різних значеннях рН. Це явище, що було вивчене групою Хуторянського [45-47], має застосування в фармацевтиці, де полімери, такі як полі(акрилова кислота) та полі(метакрилова кислота), використовуються для утворення міжполімерних або внутрішньополімерних комплексів для інкапсуляції лікарських речовин. Модуляція водневих зв'язків дозволяє контролювати вивільнення ліків у відповідь на конкретні рівні рН, відкриваючи перспективи для подальших досягнень у сфері систем доставки ліків. Крім того відомо, що ці полімери можуть утворювати комплекси з різними класами водорозчинних неіонних полімерів [47-49]:

- полімери з лактамними фрагментами, такі як полі(вінілпірролідон), полі(вінілкапролактан);
- полімери з етерними групами у основі, такі як полі(етиленоксид), полі(пропіленоксид), пенданти, полі(вінілметиловий етер);
- поліакрилати, такі як поліакриламід, полі(N-ізопропілакриламід), полі(N,N-диметилакриламід);
- полімерні спирти, такі як полівініловий спирт, полі(2-гідроксиетилакрилат), полівініловий етер етиленгліколя та полівініловий етер діетиленгліколя;

- інші синтетичні полімери, такі як поліетилоксазолін та поліацетиліміноетилен;
- полісахариди, такі як водорозчинні неіонні етери целюлози (наприклад, гідроксиетилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза).

У наших попередніх роботах [5, 23] було описано синтез температуро- та рН-чутливих полімерних щіток на основі полі(етилового етеру триетиленглікольмонометакрилату) (POEGMA246). Їхня температурозалежна відповідь контролювалася взаємодією поліетиленоксидних фрагментів з карбоксильними групами пероксидовмісного ініціатора полімеризації (рис. 1.4а (I)). Ця система здатна адсорбувати білок тільки у кислому середовищі і тому може бути використана для його контрольованої адсорбції (рис. 1.4а (II)).

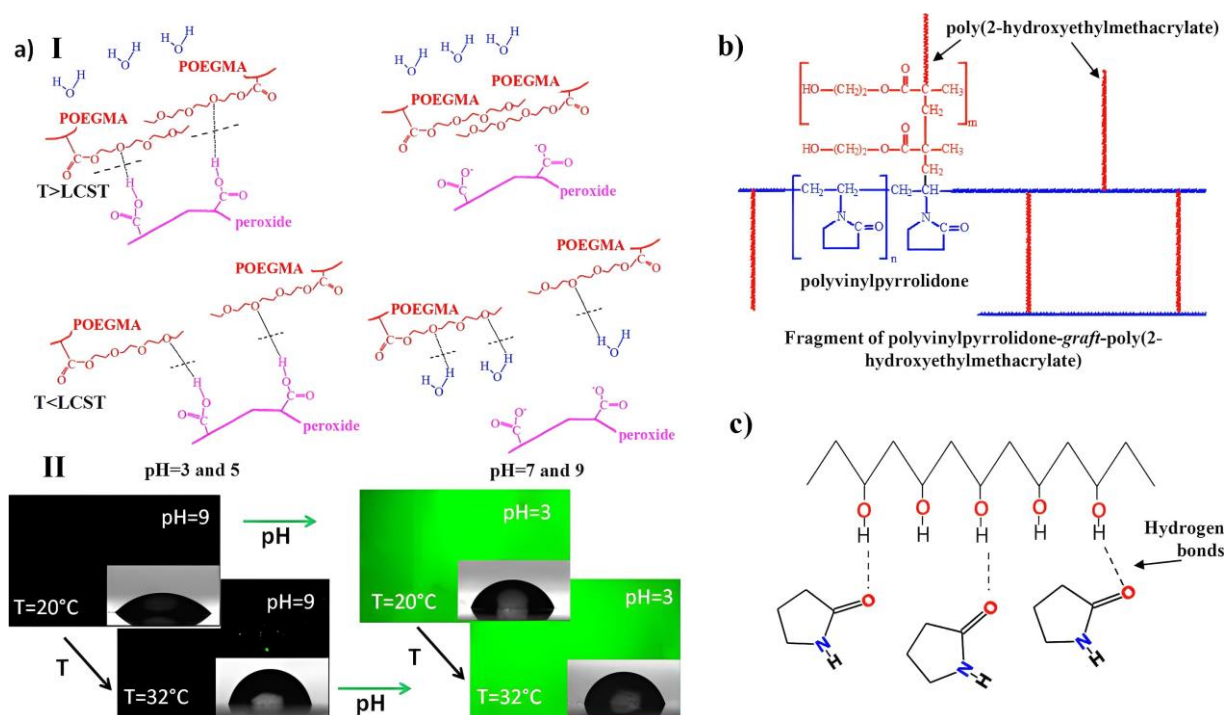


Рис. 1.4. Гіпотетичні схеми ван-дер-ваальсових взаємодій і водневих зв'язків між атомами кисню полімерних щіток на основі полі(моноетилового етеру олігоетиленглікольметакрилату), карбоксильними групами пероксиду та молекулами води за різних рН і температур (I) і контрольована адсорбція білка (II) [23] (а). Структура гідрогелевих мембран на основі полівінілпіролідон-

полі(2-гідроксиетилметакрилату) [50] (b). Водневий зв'язок між карбонільними групами піролідону та гідроксильними групами полімерів (c).

У дослідженні [50] були синтезовані гідрогелеві мембрани на основі полівінілпіролідон-полі(2-гідроксиетилметакрилату) (рис. 1.4b), які реагують на зміни рН, забезпечуючи контрольоване вивільнення лікарських речовин залежно від кислотності навколишнього середовища. Реверсивна взаємодія між гідроксильними групами полімерів та гідроксильними або карбонільними групами піролідону грає ключову роль у збільшенні здатності гідрогелю набухати при змінах рН (рис. 1.4c) [51].

Створено полімерні системи доставки ліків, у яких ковалентні зв'язки між діючою речовиною та полімером можуть розщеплюватись внаслідок зміни рН. Ці полімери можуть піддаватися гідролізу в кислому середовищі, що призводить до вивільнення лікарського препарату [52]. Чутливість до рН цих зв'язків дозволяє спрямовано доставляти ліки до конкретних місць у тілі, наприклад, у пухлини. Наприклад, у роботі [53] були синтезовані рН-чутливі кополімерні кон'югати на основі N-(2-гідроксипропіл)метакриламиду, які містили доксорубіцин, який володіє протираковими властивостями. У роботі [54] описано синтез носіїв для транспорту ліків на основі амфифільного гіперрозгалуженого блок-кополімера, Boltorn® H40-полі(L-аспартат-доксорубіцин)-блок-ПЕГ/ФА-кон'югований ПЕГ. Міцели містили препарат доксорубіцин, який був ковалентно приєднаний до гідрофобних частин амфифільних блок-кополімерних ланцюгів зв допомогою чутливого до рН зв'язку.

Системи полімерів з рН-індукованою ізомеризацією (відкриття/закриття кільця, перетворення з неіонної форми в цвітер-іони), такі як полімери на основі флуоресцеїну, виявляють рН-залежну флуоресценцію [55-56]. Наприклад, у роботі [57] були описані рН-чутливі гібридні наноматеріали на основі нанотрубок боронітриду та полі(акрилової кислоти-ко-акрилату флуоресцеїну) кополімерних щіток, що виявляють інтенсивну флуоресценцію

в нейтральних середовищах та низьку у кислих. Ці системи можуть бути використані для оцінки внутрішньоклітинного рН, що є важливим для дослідження захворювань, таких як рак [58] та хвороба Альцгеймера [59].

Незважаючи на великий прогрес у сфері створення полімерних систем, чутливих до дії зовнішніх чинників, для високотехнологічних біомедичних технологій, все ще існують деякі обмеження в їх використанні. Необхідно вирішувати фундаментальні питання, такі як біосумісність, висока селективність дії, стабільність, тривалість та багаторазове використання, багатофункціональність, а також враховувати, за яких умов відбувається перехід властивостей. Таким чином, науковцям постійно потрібні нові підходи до розробки чутливих полімерних систем для відповіді на ці питання.

1.1. Сучасні уявлення про температуро- та рН-чутливі прищеплені полімерні щітки

Температуро-чутливі полімерні щітки є тонкими полімерними покриттями, що утворені полімерними ланцюгами, прикріпленими одним кінцем до твердого матеріалу [60-62]. Вони відрізняються своєю здатністю оборотно змінювати свої фізико-хімічні властивості в обмеженому температурному діапазоні [63-65]. Конформація цих щіток, таких як млинець, гриб або щітка, залежить від щільності прищеплення полімерних ланцюгів (рис. 1.5).

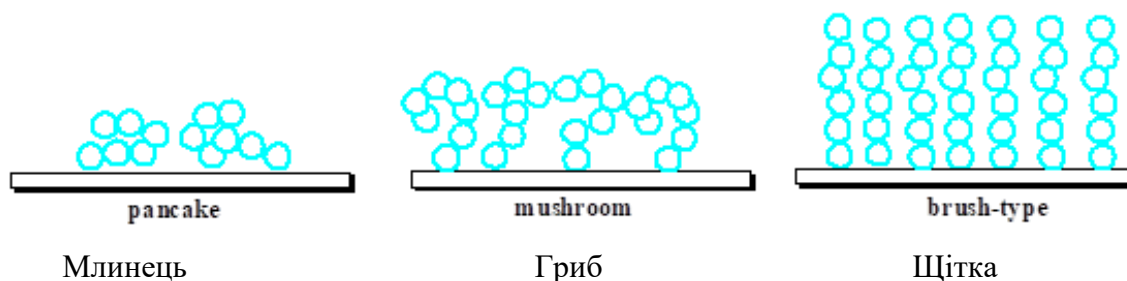


Рис. 1.5. Конформації прищеплених полімерних щіток залежно від густини прищеплення.

Для синтезу полімерних щіток використовують два методи: "прищеплення до" та "прищеплення від" [63, 66-68]. "Прищеплення до" включає реакцію між макромолекулами та поверхнею, але має обмеження в товщині і густині прищеплення. "Прищеплення від" дозволяє вирощувати полімерні щітки на поверхні, отримуючи кращий контроль над властивостями щіток. Різні техніки радикальної полімеризації (наприклад, радикальна полімеризація від поверхні з перенесенням атому SI-ATRP) дозволяють модифікувати різні поверхні прищепленими полімерними щітками, створюючи різноманітні макромолекулярні архітектури [66-72].

Термочутливі прищеплені полімерні щітки можуть демонструвати зміни у своїй фізико-хімічній структурі при зміні температури, наприклад, перехід від склоподібного до високоеластичного стану або LCST [73-77], що призводить до значних змін у змочуванні, морфології та товщині шару (рис. 1.6).

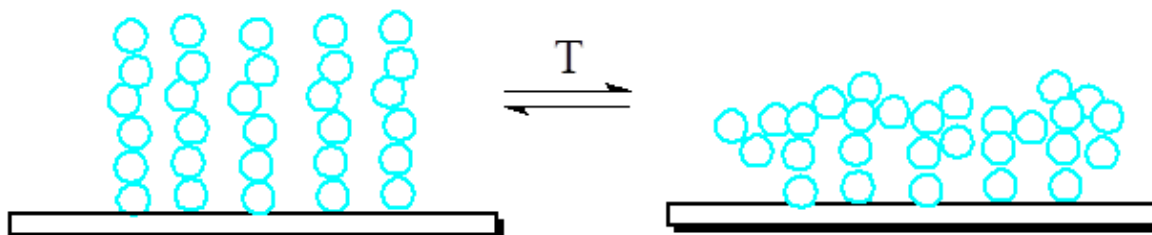


Рис. 1.6. Загальна схема температурного переходу прищеплених полімерних щіток.

Такі зміни властивостей роблять їх перспективними об'єктами для біомедичних застосувань, таких як розділення білків, культивування клітин, тканинна інженерія. Наприклад, прищеплені полімерні щітки на основі полі(N-ізопропілакриламід) широко використовуються в інженерії тканин, де їх властивості можна легко контролювати за допомогою зміни температури [78-79].

Застосування прищеплених полімерних щіток на основі PNIPAM має принаймні дві переваги:

- різкий фазовий перехід приблизно при 32 °С, що призводить до суттєвих змін у змочуванні, товщині та морфології покриття;
- можливість легко налаштувати LCST за допомогою введення інших мономерів на стадії синтезу прищеплених полімерних щіток.

Різні типи клітин, такі як епідермальні кератиноцити, епітеліальні клітини ротової порожнини, епітеліальні клітини рогівки, клітини ниркового епітелію, клітини зв'язкової тканини пародонту, клітини підшлункової залози, хондроцити, гепатоцити, клітини слизової середнього вуха та клітини щитовидної залози, успішно культивуються та показують проліферацію на температуро-чутливій поверхні щіток за 37 °С [80-88]. Зменшивши температуру до 20 °С, цілісний лист структури, подібної до тканини людини, можна збирати з поверхні культур без ензиматичної обробки.

На жаль, біосумісність прищеплених щіток на основі PNIPAM повністю не визнана. У роботах [89-90] показано, що чутливість клітин може залежати від типу клітинної лінії. Іншими недоліками, що обмежують потенційні застосування щіток, є гістерезис фазового переходу та значний вплив кінцевих груп на теплову поведінку [91].

Кополімеризація NIPAM з іншими мономерами розширює спектр потенційних застосувань покриттів. По-перше, це може позитивно впливати на сумісність PNIPAM для біомедичних застосувань [92]. По-друге, кополімеризація має великий вплив на температуро-чутливі властивості покриття та дозволяє регулювати LCST. І, нарешті, кополімери можуть набувати нових корисних властивостей, таких як чутливість до рН або використовуватися для конденсаційних реакцій з біомолекулами.

Температуро-чутливі прищеплені кополімерні щітки, такі як полі(NIPAM-ко-N-бутилметакрилат), полі(NIPAM-ко-акрилова кислота-ко-трет-бутилакриламід), полі(NIPAM-ко-N,N-диметиламінопропілакриламід-ко-N-бутилметакрилат), полі-(NIPAM-ко-N,N-диметиламінопропілакриламід-ко-N-трет-бутилакриламід), полі-(NIPAM-ко-1-адамтан-1-ілметилакрилат) і полі(NIPAM-ко-2-карбоксіпропілакриламід) були успішно синтезовані та

використовувалися для сепарації молекул або як термочутливі поверхні для вирощування клітин [93-96]. Введення полярних карбоксильних груп у температуро-чутливі щітки на основі PNIPAM може мати блокуючий ефект для температуро-чутливих властивостей, як описано в роботах [97-98] для кополімеру NIPAM та акрилової кислоти.

Ще один цікавий приклад [99] - це нові прищеплені щітки на основі блок-кополімеру NIPAM та гліцидилметакрилату, модифіковані функціоналізованими бороновими кислотами, що реагують на температуру і рН, для розділення глікопротеїнів. У наших попередніх дослідженнях були представлені полімерні щітки на основі PNIPAM, що мають подвійну відповідь і можуть використовуватися для температуро- та рН-контрольованої адсорбції білків.

Полі(олігоетиленглікольмонометакрилати) PEOGMA включають широку групу полімерів зі схожою хімічною структурою. Вони біосумісні, незаряджені, водорозчинні, нетоксичні, неімуногенні і, завдяки цьому, найбільш популярні синтетичні полімери в біомедичній сфері [100-101].

Температурні переходи в полімерних щітках на основі полі(олігоетиленглікольмонометакрилатів) та їхня властивість протидіяти адсорбції білків сильно залежать від кількості блоків етиленгліколю та природи залишку, що утворює кінцеву етерну групу (метил чи етил) у молекулі мономера. Гомополімери, такі як полі(метиловий етер диетиленглікольмонометакрилату) (PEOGMA188) та полі(етиловий етер триетиленглікольмонометакрилату) (PEOGMA246), є перспективними для біологічних застосувань, оскільки вони мають LCST близької до фізіологічної температури (26 та 24 °C, відповідно).

Ідея виготовлення температуро-чутливих прищеплених полімерних щіток на основі PEOGMA була розроблена вперше Лутцем та іншими вченими і далі розвивалася в роботах [102-103]. В експерименті [103] було виявлено, що клітини панкреатичних пухлин (PaTu8988t), прикріплені до прищеплених щіток на основі PEOGMA188, відокремлювалися при 22 °C, тоді як для

фібробластів (NIN3T3) за ідентичних умов спостерігалось лише незначне відділення. У роботі Бойєра та групи дослідників [104] створено термочутливі прищеплені щітки на золотих частинках з на основі полі(етоксидиетиленглікольакрилату) та полі(етоксидиетиленглікольакрилат-ко-олігоетиленглікольакрилату), які проявляли подвійний перехід за 8-10 °C та 25-28 °C.

У наших попередніх роботах [5, 23] також було описано синтез температуро- та рН-чутливих полімерних щіток на основі РОЕГМА246. Їхня температуро-залежна відповідь контролювалася взаємодією поліетиленоксидних фрагментів з карбоксильними групами пероксидовмісного ініціатора полімеризації (рис. 1.4а (I)). Ця система здатна адсорбувати білок тільки у кислому середовищі і тому може бути використана для його контрольованої адсорбції (рис. 1.4а (II)) [5,23].

Термочутливі прищеплені щітки на основі РОЕГМА з вбудованими срібними наночастинками можуть бути застосовані у сенсорних системах та "розумних" поверхнях з температуро-залежною антимікробною активністю [105]. Останнє було перевірено на бактеріях *Escherichia coli* (грам-негативні бактерії) та *Staphylococcus aureus* (грам-позитивні бактерії) за 4 та 37 °C. Загалом при 4 °C не спостерігалось значної різниці між кількістю бактерій на полімерних щітках та контрольному зразку. Навпаки, при 37 °C виявлено виражені температуро-залежні антимікробні властивості прищеплених щіток зі срібними наночастинками, що свідчить про їхню потенційну ефективність в біомедичних застосуваннях (рис. 1.7).

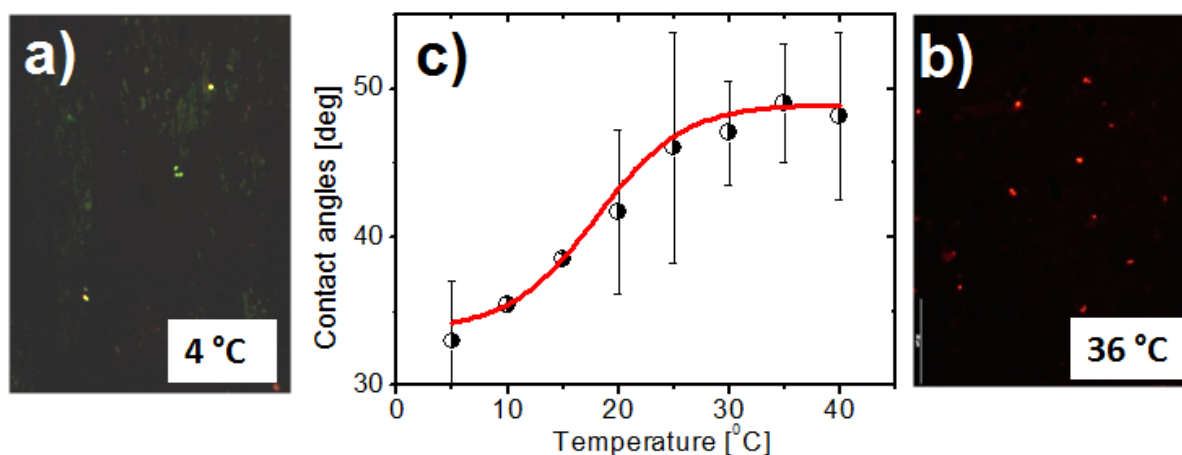


Рис. 1.7. Зображення живих (а, зелена флуоресценція) і мертвих (б, червона флуоресценція) клітин *S. aureus* на прищеплених щітках на основі РОЕГМА188 із вбудованими наночастинками срібла після інкубації протягом 12 годин за 4 і 37 °С. Температурні залежності контактних кутів змочування, визначені для прищеплених щіток на основі РОЕГМА188 із вбудованими наночастинками срібла (с) [105].

Результати роботи [106] виявили, що полімерні щітки на основі полі(4-вінілпіридин-ко-)етиловий етер триетиленглікольмонометакрилату) демонструють трьохетапний термочутливий перехід при 10 та 23 °С. Це спостереження було вперше застосовано не тільки до змочуваності, але й до морфології поверхні та адсорбції білків. Також досліджено вплив рН на термочутливість модифікованих поверхонь.

1.2. Функціоналізація та модифікація прищеплених полімерних щіток

Функціональні полімерні щітки відіграють ключову роль у розвитку біосенсорів та біотехнологій через здатність ізолювати чи, навпаки, іммобілізувати біомолекули [107]. Останні вдосконалення в методах полімеризації, зокрема радикальна полімеризація з перенесенням атома, дозволяють ефективно синтезувати функціональні полімерні щітки. Такі щітки мають різні функціональні групи, такі як епоксидні, карбоксильні, гідроксильні, альдегідні та амінні, що використовуються для іммобілізації

різноманітних біомолекул. Останні дослідження підтверджують універсальність та високий потенціал функціональних полімерних щіток для іммобілізації різних біомолекул та розширення їхніх функцій й областей застосування.

Карбоксильні групи у полімерних щітках можуть зв'язуватися з біомолекулами. Полімерні щітки на основі акрилової кислоти (АА) та метакрилової кислоти (МАА) мають велику концентрацію груп $-\text{COOH}$ і використовуються як негативно заряджені поліелектроліти, які електростатично зв'язуються з позитивно зарядженими ферментами, такими як лізоцим [108] і пектиназа [109]. Крім того, щітки на основі РАА також використовуються для ковалентного зв'язування як позитивно, так і негативно заряджених біомолекул [110-112], і можуть набрякати у водних середовищах більше, ніж у 4 рази, що, ймовірно, сприяє зв'язуванню великих біомолекул [113].

Зв'язування може відбуватись через взаємодію між групами $-\text{COOH}$ полімерних щіток та групами $-\text{NH}_2$ біомолекул. Ця реакція легко активується за м'яких умов в присутності гідрохлориду N -(3-диметиламінопропіл)- N -етилкарбодііміду та N -гідрокисукциніміду з утворенням N -естерів сукциніміду, які в свою чергу можуть самостійно реагувати з аміногрупами біомолекул (рис. 1.8) [114].

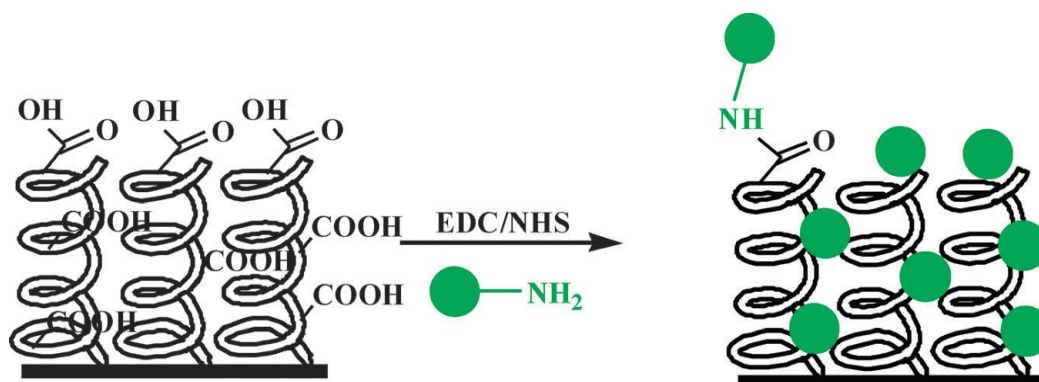
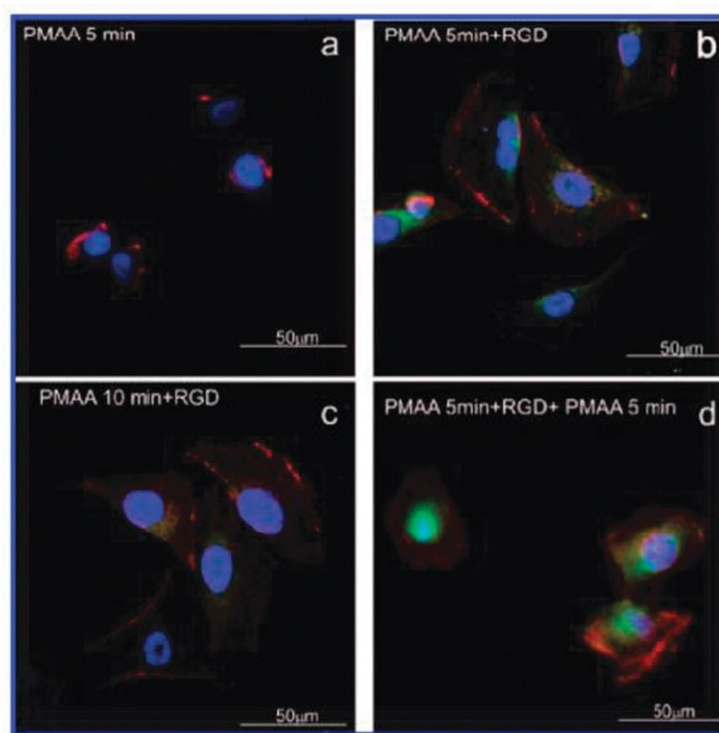


Рис. 1.8. Процес іммобілізації біомолекул на полімерних щітках, що містять карбоксильні групи [114].

Для полімерних щіток на основі поліакрилової кислоти (РАА), що були попередньо модифіковані желатином та колагеном, було виявлено агрегацію тромбоцитів, а клітини мали вищу здатність до прикріплення та проліферації завдяки більшій гідрофільності та шорсткості поверхні щіток [115]. Крім того, біомолекули, такі як RGD пептиди, були ковалентно іммобілізовані на щітках на основі полі(метакрилової кислоти) (РМАО) [116-117], що призвело до збільшення кількості та густини клітин [118]. Іммобілізація RGD на щітках на основі РМАО зробила цитотоксичну поверхню біосумісною та нецитотоксичною.



(A) PMAA

(B) PMAA-RGD

(C) PMAA-RGD-PMAA

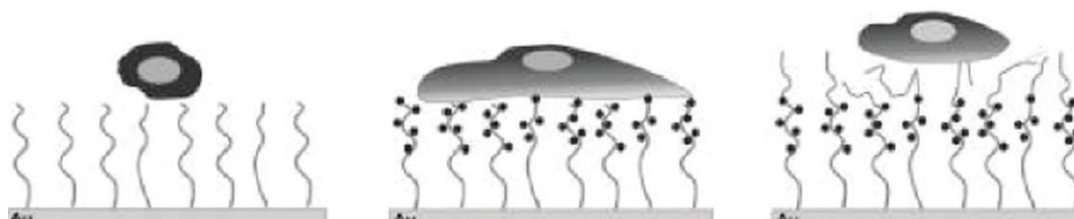


Рис. 1.9. Імунофлуоресцентні зображення (а–d) клітин MG63 на різних поверхнях і морфологічні зміни (А–С) клітин MG63 на полімерних щітках на основі РМАО, модифікованих та немодифікованих RGD пептидами [118].

Форма та морфологія клітин MG63 змінювалися в залежності від положення іммобілізованих RGD-груп, що свідчить про важливість цих груп для клітинної взаємодії на поверхнях PMAA. Зміна клітинної морфології, ймовірно, була пов'язана з тим, що клітини тягнулися до RGD-груп. Варто відзначити, що морфологія клітин не змінювалася з товщиною функціоналізованих щіток на основі PMAA.

Кополімерні щітки на основі PNIPAM, модифіковані колагеном [119] та RGD пептидами [120], демонструють покращену адгезію та проліферацію клітин за температури вище LCST без втрати температуро-чутливих властивостей та можливості відривання клітин за температури нижчої LCST. Згортання полімерних ланцюгів вище LCST дозволяє клітинам взаємодіяти з іммобілізованими біомолекулами, що виходять на поверхню, тоді як гідратація ланцюгів нижче LCST перешкоджає доступу іммобілізованих біомолекул, руйнуючи контакти між клітиною та поверхнею (рис. 1.10) [120-121].

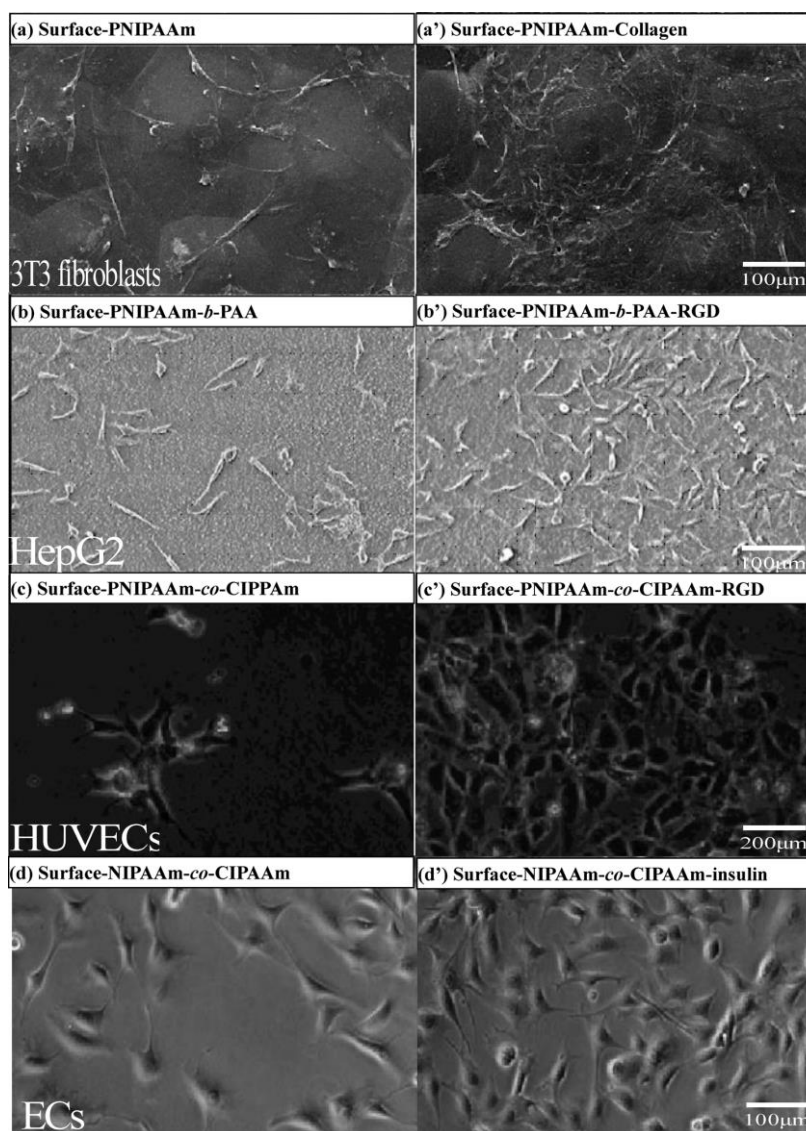


Рис. 1.10. Адгезія та проліферація клітин на кополімерних щітках на основі PNIPAM та їхніх відповідних біофункціональних поверхнях [a,a'; b,b'; c,c'; d,d'] [121].

Пероксидаза хрому (HRP) також може бути прив'язана до дисукцинімідилкарбонат-активованих (DSC-активованих) щіток на основі полі(2-гідроксиетилметакрилату) (PHEMA). Незважаючи на те, що деякі ензими втратили активність, ймовірно через неспецифічні взаємодії з DSC, загалом, пероксидаза HRP на щітках на основі PHEMA проявляла кращу стабільність, ніж незв'язана [122].

1.3. Застосування прищеплених полімерних щіток

Прищеплені полімерні щітки застосовуються у різних галузях завдяки своїм унікальним властивостям. Напрямки застосування можуть бути розділені на 8 груп:

Біомедичні застосування. Прищеплені полімерні щітки можуть бути використані для модифікації поверхонь наночастинок чи лікарських носіїв для контрольованої доставки ліків, покращуючи біосумісність та забезпечуючи цільове вивільнення лікарського препарату. Також вони використовуються для модифікації поверхонь медичних імплантатів, таких як стенти та катетери, для покращення біосумісності та зменшення ризику відторгнення чи розвитку інфекції.

Модифікація поверхні. Полімерні щітки можуть використовуватися з метою перешкоджання небажаній адгезії білків, клітин чи інших сполук. Крім того, вони використовуються для контролю змочуваності поверхонь, роблячи їх або гідрофільними, або гідрофобними. Успішно використовуються у виготовленні покриттів для морських суден, біомедичних пристроїв, чіпів та сенсорів.

Розумні поверхні. Полімерні щітки, чутливі до дії зовнішніх чинників, таких як рН, температура чи світло, використовуються як чутливі датчики, системи доставки ліків та самовідновлюючі матеріали.

Зменшення тертя. Полімерні щітки можуть бути використані для модифікації поверхонь з метою зменшення тертя та зносу, що особливо корисно у розробці передових змащувальних матеріалів та покриттів.

Електроніка. Полімерні щітки з провідними властивостями можуть бути використані в електроніці для модифікації поверхонь з метою покращення провідності, запобігання окисненню або покращення адгезії між різними матеріалами.

Стабілізація колоїдних систем. Полімерні щітки можуть стабілізувати колоїдні суспензії, запобігаючи агрегації частинок і підвищуючи стабільність дисперсій. Широко застосовуються у лакофарбовій промисловості і фармації.

Нанотехнології. Полімерні щітки можуть бути синтезовані на поверхні наночастинок, забезпечуючи точний контроль над розміром та розподілом частинок.

Мембрани. Полімерні щітки можуть бути застосовані для модифікації поверхні мембран для селективної проникливості, поліпшуючи процеси розділення та очистки води або газів.

Універсальність прищеплених полімерних щіток робить їх цінними матеріалами у різних наукових і промислових галузях, сприяючи розвитку науки, медицини, електроніки та інших галузей.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Формування температуро- та рН-чутливих прищеплених (ко)полімерних щіток

2.1.1. Формування прищепленого наночастиці 3-амінопропілтриетоксисилану (APTES) на поверхні скла

Пластинки із силікатного скла розміром 15×15 мм і товщиною 2 мм очищались етанолом у УЗ-мийці (Emmi-12HC, EMAG, Germany) протягом 15 хв., сушилося азотом. Активація поверхні скла відбувалася у атмосфері кисню у плазмодієтері (Zepto Plasma-Surface-Technology, Diener electronic, Німеччина) протягом 30 с. Далі скляні пластини занурювали в 2 %-розчин 3-амінопропілтриетоксисилану у толуені на 10 хв., ковалентно неприщеплений силан змивали толуеном у УЗ-мийці протягом 15 хв. Після промивання зразки сушили у сушильній шафі за $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв.

2.1.2. Методика формування наночастиці 2-бромоізобутирилброміду на поверхні амінованого скла

Після нагрівання зразки були модифіковані 2-бромоізобутирилбромідом – ініціатором радикальної полімеризації ATRP. Для цього зразки були занурені у суміш 2-бромоізобутирилброміду (0.26 мл, 2.10 ммоль) та безводного триетиламіну (0.30 мл, 2.10 ммоль) на 10 мл безводного тетрагідрофурану. Через 30 хв зразки промивали тетрагідрофураном у УЗ-мийці протягом 15 хв, сушили азотом.

2.1.3. Методика формування прищеплених (ко)полімерних щіток методом ATRP

Функціоналізовані ATRP ініціатором скляні пластини переносили у конічну колбу, попередньо дезоксигеновану продуванням азотом. У колбу з круглим дном поміщали метанол, воду, мономер або суміш двох мономерів з різним мольним співвідношенням (OEGMA188, AAm, NIPAM, NEMA), представлені на рисунку 2.1, і знову дезоксигенували азотом протягом 10-15 хв.

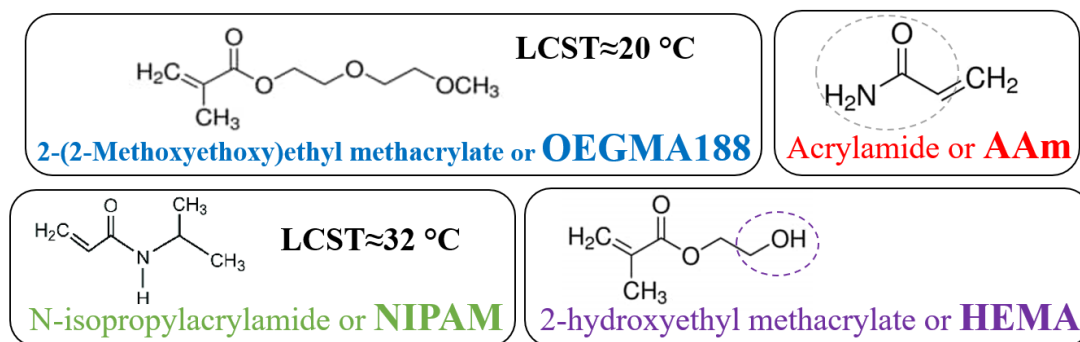


Рис. 2.1. Структурні формули мономерів, що використовуються у синтезі температуро-чутливих прищеплених (ко)полімерних щіток.

Потім додавали CuBr_2 (7.4 мг, 0,033 ммоль), 2,2'-дипіридил (51.5 мг, 0,33 ммоль) та L-аскорбат натрію (65.3 мг, 0,33 ммоль), продували азотом протягом 10-15 хв. Розчин, готовий до полімеризації, наливали в дезоксигеновану конічну колбу. Полімеризація проходила за кімнатної температури. Після 5 годин полімеризації зразки промивали метанолом і водою.

2.1.4. Методика модифікації прищеплених кополімерних щіток біологічно активними макромолекулами на основі поліетиленгліколю

Поверхня кополімерних щіток була модифікована з використанням багатофункційного розгалуженого похідного поліетиленгліколю, *4-Arm PEG15K* (рис. 2.2 а) з молекулярною масою близько 15 000 г/моль і n близько 84, або його сумішю з амінованим похідним, *PEG bis(3-aminopropyl) terminated* (рис. 2.2 б) з молекулярною масою близько 1 500 г/моль і n близько 31, у мольному співвідношенні 1:1.

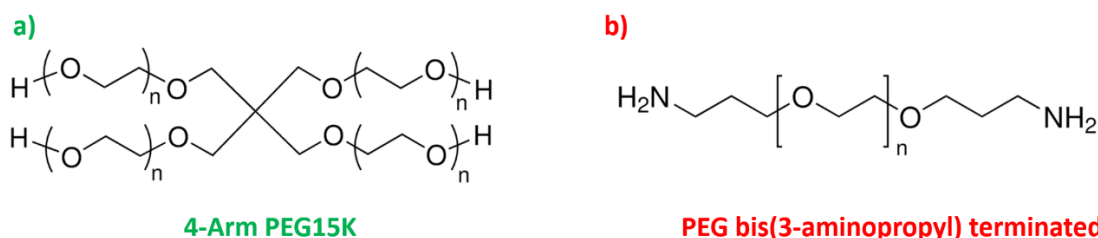


Рис. 2.2. Структурні формули похідних сполук на основі поліетиленгліколю.

Спочатку 4-Arm PEG15K чистий (40 мг, 0,0026 ммоль) або 4-Arm PEG15K (20 мг, 0,0013 ммоль) у суміші з PEG bis(3-aminopropyl) terminated (2 мг, 0,0013 ммоль) розчиняли у 0,1 М розчині NaOH до отримання 2%-розчину мас./об. Прищеплені кополімерні щітки на основі P(OEGMA-co-HEMA) з мольною часткою HEMA 10%, що містили реакційноздатні гідроксильні групи на поверхні, були занурені у цей розчин. Далі при постійному перемішуванні докапували дивінілсульфон DVS (5 мг, 0,0412 ммоль) як зшиваючий агент (рис. 2.3), який реагував з гідроксигрупами на поверхні та гідроксигрупами 4-Arm PEG15K або аміногрупами PEG bis(3-aminopropyl) terminated.

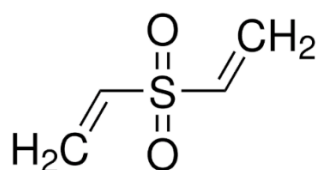


Рис. 2.3. Структурна формула дивінілсульфону DVS.

Реакцію проводили протягом 10, 20 або 30 хвилин, діставали зразки, промивали дистильованою водою і сушили азотом. Схеми хімічної модифікації поверхні прищеплених кополімерних щіток 4-Arm PEG15K або сумішю з PEG bis(3-aminopropyl) terminated за допомогою DVS як зшиваючого агента з утворенням другого прищепленого наночастиці з структурою подібною до гідрогелю представлені на рис. 2.4 та 2.5, відповідно.

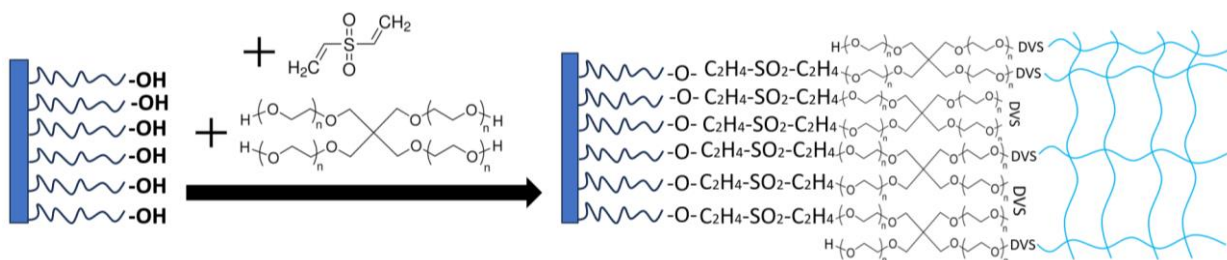


Рис. 2.4. Схема модифікації прищеплених кополімерних щіток з реакційноздатними гідроксигрупами на поверхні за допомогою 4-Arm PEG15K та DVS як зшиваючого агента з утворенням другого прищепленого наночастиці з структурою подібною до гідрогелю.

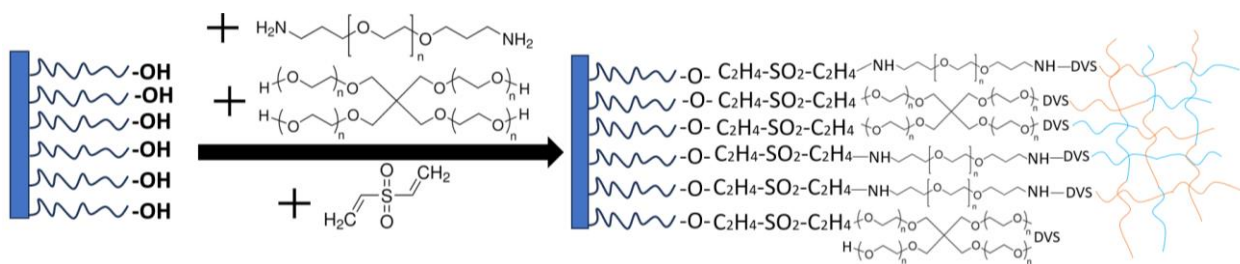


Рис. 2.5. Схема модифікації прищеплених кополімерних щіток з реакційноздатними гідроксигрупами на поверхні сумішю *4-Arm PEG15K* та *PEG bis(3-aminopropyl) terminated* за допомогою DVS як зшиваючого агента з утворенням другого прищепленого наносферу зі структурою подібною до гідрогелю.

2.2. Методики аналізів

2.2.1. Дослідження поверхні методом часопротіної вторинної йонної мас-спектрометрії TOF-SIMS

TOF-SIMS вимірювання проводились за допомогою ToF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH) з бісмутною рідкометалічною іонною гарматою, величина струму становила 30 кеВ. Для кожного типу зразків вимірювання проводили два рази з наступним усередненням отриманих даних. Маси отриманих інтермедіатів калібрували за допомогою H^+ , H_2^+ , CH^+ , C_2H_2^+ і C_4H_5^+ піків, m/z – 1, 2, 13, 26, 53, відповідно.

2.2.2. Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія XPS

Рентгенівські фотоелектронні спектри записували за допомогою апарату РНІ VersaProbe II. Для опромінення зразків використовувався фокусований монохроматичний промінь Al K α ($E = 1486.6 \text{ eV}$) з діаметром 100 мкм, який сканувався по області $400 \times 400 \text{ мкм}$. Пас-енергія аналізатора була встановлена на рівень 46,95 eV, а для уникнення ефектів заряджання використовували подвійну нейтралізацію електронами та моноатомними іонами Ar^+ з низькою енергією. Спектри були відкалібровані відносно нейтрального (C–C) піку вуглецю C 1s при енергії зв'язку 284,80 eV.

2.2.3. Спектроскопія відбиття білого світла WLRS

Спектри відбиття білого світла записували за допомогою апарату FR-pRo від фірми ThetaMetrisis SA (Греція), що поєднувався з «рідкою коміркою» (FR-Microfluidic kit). FR-pRo включав у себе джерело світла UV–VIS 250–700 нм, спектрометр (Ocean Optics Maya2000 pRo) та оптичний волоконний відбиваючий зонд (6+1 волокна) від Ocean Optics, що працював у відповідному спектральному діапазоні. Біле світло спрямовувалося на відбиваючий зонд і падало вертикально на досліджуваний зразок. Відбиваючий зонд знаходився на відстані 5 мм від зразка і мав розмір активної плями ~ 1 мм у діаметрі. Зразок поміщали у «рідку клітину» з відділенням для рідини (дистильованої води) об'ємом 20 мкл і вбудованим контролером температури (FR-Hot/Cool, точність до 0,1 °C), а також шприцевим насосом для циркуляції рідини з програмованою швидкістю. Вимірювання здійснювали в принаймні трьох різних точках кожного зразка для відстеження просторової однорідності. Експериментальні дані обробляли за допомогою методу Левенберга–Марквардта, враховуючи показники заломлення всіх шарів в багатошаровій структурі вода/полімерна щітка/кремній. Для кожного типу полімерної щітки з певним складом і структурою була обрана оптимальна модель для вимірювань між 5 і 35 °C. Для порівняння товщин полімерної щітки за різних температур величини не наводяться як абсолютні значення. Замість цього використовуються значення відносної товщини щітки по відношенню до її товщини за 35 °C.

2.2.4. Раманівська спектроскопія

Використовувався конфокальний Раманівський мікроскоп (Alpha300R, WITec, GmbH, Німеччина). Для опромінення зразків був використаний лазер з довжиною хвилі 532 нм (потужність 10,2 мВт) та решіткою 600 жолобків на 1 мм.

2.2.5. Еліпсометричні дослідження

Товщину полімерних щіток вимірювали за допомогою спектроскопічного еліпсометра (SENTECH SpectraRey/3). Кути Ψ та Δ визначали для довжин

хвилі λ в спектральному діапазоні від 320 до 800 нм. Вимірювання проводились під кутами падіння та відбиття 56° і 70° . Показник заломлення $n(\lambda)$ розраховували за рівнянням:

$$n(\lambda) = n_0 + n_1\lambda^{-2} + n_2\lambda^{-4} \quad (2.1)$$

Товщина шару d та параметри n_0 , n_1 і n_2 чисельно варіювалися для досягнення найкращого узгодження між моделлю та вимірними значеннями кутів $\Delta(\lambda)$ та $\Psi(\lambda)$. Точність оптичного елемента становила $\pm 0.01^\circ$.

2.2.6. Вимірювання контактних кутів змочування води СА

Визначення статичного кута змочування виконувалося з використанням пристрою Kruss EasyDrop (DSA15) з температурною камерою Пельтьє. Вимірювання проводилися у діапазоні від 5 до 42°C з кроком 3°C . Температуру вимірювали за допомогою термопари в контакті з поверхнею зразка. Кути змочування виражались як середнє значення десяти вимірювань в різних точках.

2.2.7. Атомно-силова мікроскопія AFM

Топографічні зображення реєструвалися у випадково обраних областях поверхні зразка. Вимірювання проводилися у повітрі з використанням комерційно доступної системи Agilent 5500 Keysight (Німеччина), що обладнана контролером температури, у безконтактному режимі. Для кожної температури були проаналізовані принаймні три зображення, був використаний зонд на основі Si_3N_4 , а розмір зображень становив 1×1 мкм.

2.2.8. Дослідження клітинного росту фібробластів

Людські фібробласти (HDFn; ATCC, PCS-201-010) були придбані у ATCC (США). Клітини вирощували в середовищі DMEM з високим вмістом глюкози (Sigma-Aldrich, D6429), яке доповнювали 10%-бичачою сироваткою BSA (Sigma-Aldrich, F9665) та 1% розчином пеніциліну-стрептоміцину-неоміцину (Sigma-Aldrich, P4083) за 37°C в інкубаторі при насиченій вологості в атмосфері CO_2 (95% кисню та 5% CO_2). Скляні пластини 15×15 мм, покриті полімерними щітками, розміщували на дні культуральних плашок

на 12 лунок. Попередньо зразки стерилізували 96% етанолом протягом 5 хвилин, потім двічі промивали стерильною дистильованою водою і залишали у воді протягом 2 годин під ламінарним потоком (Nu425, NuAire, США). Після цього клітини висіювали на всіх типах зразків концентрацією 5000 клітин/см² у 1 мл середовища для культивування. Далі їх інкубували в інкубаторі протягом 24, 72 або 168 годин. Після 24 та 96 годин дослідження замінювали середовище. Для кожного експерименту були досліджені два ідентичні зразки. Усі експерименти повторювали принаймні тричі, щоб підтвердити відтворюваність результатів.

2.2.9. МТТ калориметричний метод

Життєздатність клітин було оцінено за допомогою калориметричного тесту МТТ (Cell Proliferation Kit I, Sigma-Aldrich, 11465007001). У середовище до клітин, висіяних на зразках, додавали 100 мкл реагенту МТТ (сіль тетразолію), і клітини інкубували за 37 °С протягом 4 годин. Після інкубації до кожної лунки додавали 1 мл розчину для солубілізації, і культуральні плашки залишали на ніч у інкубаторі. Метод МТТ базується на відновленні солі тетразолію життєздатними клітинами з отриманням забарвленого продукту формазану. Утворений кольоровий розчин вимірювали за допомогою скануючого спектрофотометра (SPECTROstar Nano, BMG Labtech). Абсорбція вимірювалася у культуральній плашці на 24 лунки для кожного періоду часу при OD = 560 нм. Метод МТТ проводили принаймні тричі на кожному етапі для перевірки надійності результатів.

2.2.10. Фарбування живих/мертвих клітин

Диференціацію живих та мертвих клітин проводили за допомогою набору з двома барвниками для флуоресцентного фарбування (Sigma-Aldrich, 04511). Цей набір містив розчини Calcein-AM та пропідій йодиду, які дозволяють відрізнити живі клітини (зелена флуоресценція) від мертвих (червона флуоресценція). У експерименті тривалістю 168 годин середовище замінювали через 24 години після висівання клітин; у експерименті тривалістю 24 години середовище не змінювали. Далі після відповідного часу

культивування клітини відшаровували від зразків з використаннями трипсину, а середовище разом з клітинами збирали у пробірки типу Eppendorf. Суспензію центрифугували протягом 5 хвилин (відносне прискорення центрифуги дорівнювало 300). Потім клітинну суспензію змішували на скляній пластині у відношенні 1:1 за об'ємом з розчинами з набору для фарбування. Живі та мертві клітини характеризувалися кількісно під флуоресцентним мікроскопом Olympus IX51 (Японія).

2.2.11. Імунофлуоресцентний аналіз

Було проведено флуоресцентне забарвлення актинового цитоскелету, ядер та місць адгезії клітин до зразка. Спочатку клітини фіксували на зразку з використанням 3,7%-розчину параформальдегіду у PBS (Thermo Scientific, 169650010) протягом 15 хв за 37 °С. Пізніше клітини робили проникними для барвників за допомогою 0,1%-розчину тритону X-100 (Sigma, T8787) за кімнатної температури протягом 8 хв, далі промивали розчином PBS протягом 2 хв, блокували реакцію 4%-розчином BSA протягом 1 години, і інкубували з первинним антитілом у концентрації 5 мкг/мл протягом ночі за 4 °С (мишиний моноклональний IgG антивінкулін від Thermo Scientific, 14-9777-82). Після цього клітини промивали 3 рази по 5 хв розчином PBS з 0,01%-розчином Tween 20. Для фарбування актинового цитоскелету, ядер і місць адгезії зразки інкубували у розчині Alexa Fluor 488, зв'язаному з фаллоїдином (Alexa Fluor 488 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, A12379), також з розчином Hoechst 34580 (Thermo Fisher Scientific, H21486) концентрацією 1 мкг/мл та вторинному антитілі концентрацією 2 мкг/мл (Alexa Fluor 633 IgG, Thermo Scientific, A-21050)) протягом 60 хв. Потім клітини двічі промивали розчином PBS протягом 5 хв і двічі розчином води протягом 5 хв. Флуоресцентні зображення збирали за допомогою мікроскопа Olympus IX51 з ртутним джерелом світла потужністю 100 Вт (Olympus U-LH100HG), фільтром U-MWIG2 ($\lambda_{\text{exit}}=530\text{--}550$ нм, $\lambda_{\text{emit}}=590$ нм) та фільтром U-MNB2 ($\lambda_{\text{exit}}=470\text{--}490$ нм, $\lambda_{\text{emit}}=520$ нм). Флуоресцентні зображення місць адгезії отримували за допомогою конфокального мікроскопа ZEISS LSM 710 (версія випуску 8.1) з

об'єктивом 40× з використанням краплі спеціальної олії. Для обробки зображень використовувалася програма ImageJ FIJI. Для кожного експерименту збирали 10 флуоресцентних зображень з кожного зразка.

2.2.12. Дослідження зміни морфології клітин

Для вивчення зміни морфології фібробластів температуру зразків було зменшено до 10 °С, тобто нижче температури переходу, і клітини були візуалізовані за допомогою мікроскопу Olympus IX51.

2.2.13. Дослідження проліферативного росту ракових клітин

Клітини PANC-1 (ATCC, CRL-1469, LGC Standards, RRID: CVCL 0480) вирощували в середовищі DMEM з високим вмістом глюкози (Sigma-Aldrich, D6429), яке доповнювали 10%-бичачою сироваткою BSA (Sigma-Aldrich, F9665) та 1% розчином антибіотиків за 37 °С в інкубаторі при насиченій вологості в атмосфері CO₂ (95% кисню та 5% CO₂). Скляні пластини 15 × 15 мм, покриті двошаровими біологічно активними прищепленими покриттями, розміщували на дні культуральних плашок на 12 лунок. Попередньо зразки стерилізували під ламінарним потоком (Nu425, NuAire, США) протягом 60 хвилин. Після цього клітини висіювали на всіх типах зразків концентрацією 150 000 клітин/мл. Далі їх інкубували в інкубаторі протягом 24 та 48 годин.

2.2.14. Мікрореологічні дослідження ракових клітин, висіяних на двошарових біологічно активних прищеплених покриттях

Мікрореологічні дослідження двошарових біологічно активних прищеплених покриттів засновані на синусоподібній модуляції п'єзоелектричного сканера в напрямку Z, що постійно перебуває у контакті з клітиною, але не пробиває її. Використовувався мікроскоп Bruker – JPK System (Німеччина), що поєднувався з оптичним мікроскопом Olympus IX 71. Вимірювання проводилися з використанням комерційно доступних трикутних кантилеверів з нітриду кремнію (MLCT-D, Bruker). Вони характеризуються номінальною константою пружності 0,03 Н/м, частотою 15 кГц, шириною 20 мкм, довжиною 225 мкм і радіусом вершини 20 нм. Під час вимірювань можна застосовувати широкі частоти коливань, у нашому випадку були рівні 1, 3, 5,

8, 10, 30, 60, 90 і 120 Гц. Кожна частота була отримана з паузою 500 мс між частотами. Амплітуда була встановлена на 50 нм, швидкість наближення 3 мкм/с. Глибина вдавнення коливалася від 1 до 2,5 мкм. У середньому вимірювали 80-90 клітин для кожного типу зразку. Вимірювання проводили за кімнатної температури у середовищі (DMEM з 1%-розчином BSA) і вони тривали не більше двох годин. Мікрореологічні вимірювання проводили над ядром клітини в межах площі сканування 4 мкм² (встановлювали сітку 2 пікселі на 2 пікселі). Далі були використані оригінальна програма від фірми для обробки даних, а також OriginPro, для підгонки даних, створення графіку залежностей G' (модуль накопичення) і G'' (модуль втрат) від частоти осциляції і визначення частоти переходу, тобто перетину двох кривих. G' вимірює енергію, яка зберігається та відновлюється під час коливань, тоді як G'' враховує енергію, що розсіюється.

РОЗДІЛ 3. ФОРМУВАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ТЕМПЕРАТУРО-ЧУТЛИВИХ ПРИЩЕПЛЕНИХ ПОЛІМЕРНИХ ЩІТОК З КРИТИЧНОЮ ТЕМПЕРАТУРОЮ РОЗШАРУВАННЯ

У зв'язку з критичним дефіцитом донорів людських тканин та органів, Лангер та Ваканті запропонували альтернативний підхід, що включає тканинну інженерію з використанням температуро-чутливих полімерних покриттів. Такі покриття, як прищеплені полімерні щітки на основі PNIPAM чи POEGMA188 є біосумісними і широко застосовуються в біомедичній галузі. Однак потенціал таких полімерних щіток в тканинній інженерії може бути обмежений через їхній невластивий рівень змочуваності, слабку відповідь змочуваності на зміни температури, недостатню біосумісність та токсичність відносно різних клітинних ліній, а також проблеми з десорбцією білків та відшаруванням клітин. Наприклад, комерційно доступні покриття на основі PNIPAM вже використовуються та не є цитотоксичними для різних типів клітин, але N-ізопропілакриламід, який може десорбуватися внаслідок реакції деполімеризації, виявляє токсичність навіть при низьких концентраціях [123-124].

Однією з основних стратегій у боротьбі з цими недоліками є виготовлення прищеплених кополімерних щіток на основі різних мономерів. Наприклад, кополімерні щітки на основі полі(NIPAM-ко-2-карбоксиізопропілакриламід) можна легко функціоналізувати біомолекулами. Кополімерні щітки на основі OEGMA188 і OEGMA360 можуть бути модифіковані пептидом RGD або антимікробним пептидом, а щітки на основі полі(4-вінілпіридину-ко-OEGMA246) проявляють температуро-чутливе триступеневе перемикання змочуваності та адсорбції бичачого сироваткового альбуміну. У роботі [125] було успішно синтезовано серію кополімерних щіток на основі OEGMA188 і 4-вінілпіридину із температуро-чутливим гідрофільно-гідрофобним балансом, а також

продемонстровано, що присутність фрагментів 4-вінілпіридину сприяє адсорбції білка, нижче і вище LCST переходу.

З іншого боку, існує великий інтерес до «шизофренічних» кополімерів, що проявляють протирічні властивості під впливом зовнішніх чинників. Поняття «шизофренічні» вперше використовували Армес та його колеги для блок-кополімерів, які здатні самоорганізовуватися в розведених водних розчинах [126]. Переходи між різними структурами міцел зумовені наявними блоками кополімеру зі змінним гідрофільно-гідрофобним балансом, що змінюється під впливом температури, рН чи йонної сили. У випадку температуро-чутливих "шизофренічних" перемикань блок-кополімери можуть проявляти переходи, схожі на LCST, так і на UCST. Також було продемонстровано "шизофренічну" поведінку для чергуючих і градієнтних кополімерів [127-128]. До цього моменту "шизофренічний" характер був описаний для кополімерів, що самоорганізуються в агрегати, але ніколи – для прищеплених кополімерних (неблокових) щіток.

3.1. Формування, властивості та застосування наношарів температуро-чутливих прищеплених кополімерних щіток з підсиленою відповіддю змочуваності на зміну температури

У цьому дослідженні нами вперше успішно синтезовано і комплексно характеризувано серію температуро-чутливих кополімерних щіток на основі мономерів OEGMA188 та AAm. Синтез покриттів проводився за стандартною схемою (рис. 3.1), де поверхня скла спочатку функціоналізувалась 3-амінопропілтриетоксисиланом, потім ініціатором ATRP і, нарешті, гомополімером чи кополімером з різними співвідношеннями мономерів у реакційній суміші. Час полімеризації складав 5 годин.

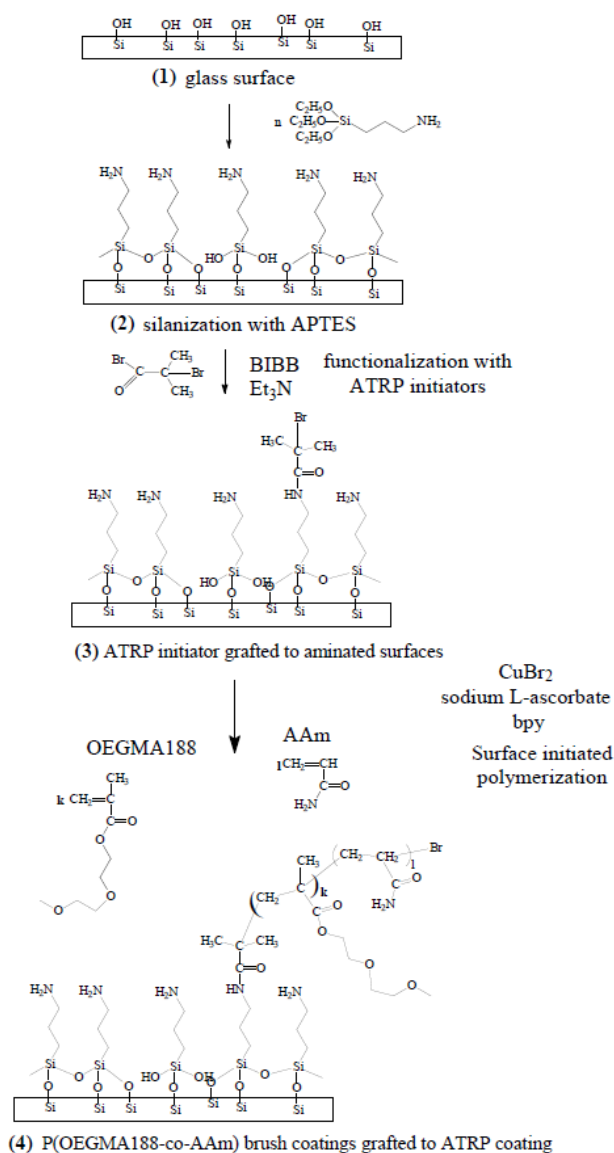


Рис. 3.1. Схема формування прищеплених щіток (4) від мультифункціонального ініціатора прищепленої полімеризації (3), імобілізованого на поверхні амінованого скла (2). Як основа використовувалося предметне скло для мікроскопії (1).

Потім зразки промивались кілька разів для очищення нанопокриттів від залишкової кількості каталізатора CuBr₂. Формування кополімерних щіток було підтверджено за допомогою рентгенівської фотоелектронної спектроскопії XPS та часопротітної вторинної йонної спектроскопії ToF-SIMS. Вплив температури на змочуваність оцінювався за допомогою вимірювання кутів змочування води, вплив температури на морфологію

поверхні у повітрі - за допомогою атомно-силової мікроскопії AFM, а на товщину щіток у воді – за допомогою спектроскопії відбиття білого світла WLRS.

Мольний склад мономерних сумішей наведений у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Мольний склад мономерних сумішей для синтезу полімерних щіток на основі OEGMA188 та AAm.

			P(OEGMA	P(OEGMA-co-AAm)1	P(OEGMA-co-AAm)2	P(OEGMA-co-AAm)3	P(OEGMA-co-AAm)4	P(OEGMA-co-AAm)5	PAAm
Мономери	OEGMA188	Кількість речовини, ммоль	60	54	48	30	12	6	0
		Маса, г	11.28	10.15	9.02	5.64	2.26	1.13	0
	AAm	Кількість речовини, ммоль	0	6	12	30	48	54	60
		Маса, г	0	0.43	0.85	2.13	3.41	3.83	4.26

Були зібрані XPS спектри для усіх покриттів на основі P(OEGMA188-co-AAm). XPS C1s спектрограми ядер представлені на рисунку 3.2.

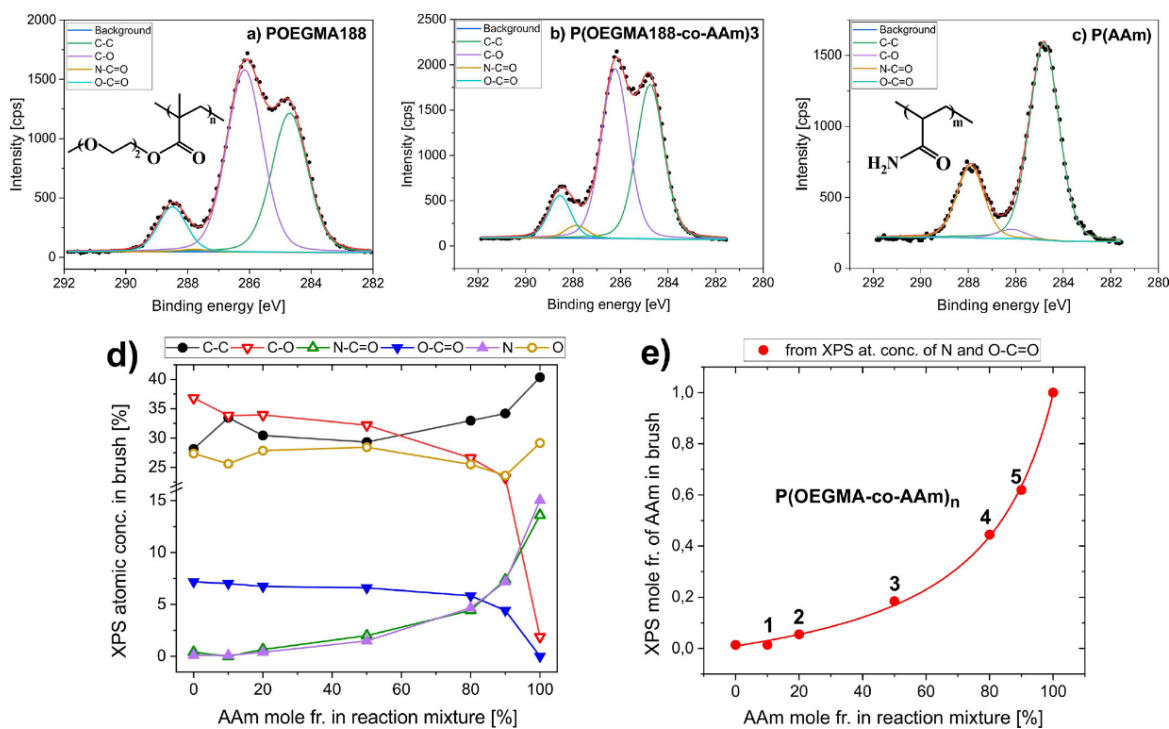


Рис. 3.2. Типові XPS спектрограми для полімерних щіток на основі POEGMA188 (a), PAAm (c) та P(OEGMA188-co-AAm)₃ (b). Залежність атомних концентрацій азоту та вуглецю відповідних зв'язків від мольної частки AAm у реакційній суміші (d); XPS мольної частки AAm у полімерній щітці від мольної частки AAm у реакційній суміші (e).

Спектр полімерних щіток на основі POEGMA188 містить сигнали, характерні для зв'язків C–C, C–O та O–C=O (рис. 3.2a), тоді як спектр наночарів на основі PAAm включає сигнали, характерні для зв'язків C–C та N–C=O, які є специфічними для AAm (рис. 3.2c). Спектр покриття на основі P(OEGMA188-co-AAm)₃ відображає сигнали, характерні для зв'язків C–C, C–O, N–C=O та O–C=O, що відповідає структурі кополімеру (рис. 3.2b).

На основі XPS даних були визначені атомні концентрації азоту та вуглецю відповідних зв'язків, характерних для фрагментів мономерів OEGMA188 та AAm у полімерних щітках (рис. 3.2d). Із зростанням мольної частки AAm у реакційній суміші спостерігалось збільшення атомної концентрації азоту та вуглецю у N–C=O зв'язку, характерному для AAm, що, у свою чергу, супроводжувалося зменшенням атомних концентрацій вуглецю

у С–О та О–С=О зв'язках, характерних для OEGMA188. Ці зміни в атомних концентраціях були виразнішими при вищих концентраціях AAm у реакційній суміші, що вказує на суттєве збільшення вмісту AAm ланок у полімерних щітках.

Для визначення мольної частки AAm у полімерних щітках використовувалися атомні концентрації азоту та вуглецю у зв'язках О–С=О (рис. 3.2e). Визначена мольна частка AAm у синтезованих щітках зростала спочатку монотонно і повільно, а потім швидше зі збільшенням мольної частки AAm у реакційній суміші. Мольний склад покриттів на основі P(OEGMA188-co-AAm) наведений у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Мольний склад покриттів на основі P(OEGMA188-co-AAm).

Полімерна щітка	Співвідношення моль мономерів у реакційній суміші	Мольне співвідношення мономерних ланок у полімерній щітці	
		OEGMA	AAm
POEGMA188	100/0	1	0
P(OEGMA188-co-AAm)1	90/10	0,98	0,02
P(OEGMA188-co-AAm)2	80/20	0,94	0,06
P(OEGMA188-co-AAm)3	50/50	0,81	0,19
P(OEGMA188-co-AAm)4	20/80	0,55	0,45
P(OEGMA188-co-AAm)5	10/90	0,38	0,62
PAAm	0/100	0	1

Додатково склад полімерних наночарів на основі P(OEGMA188-co-AAm) було підтверджено за допомогою ToF-SIMS методу (рис. 3.3a).

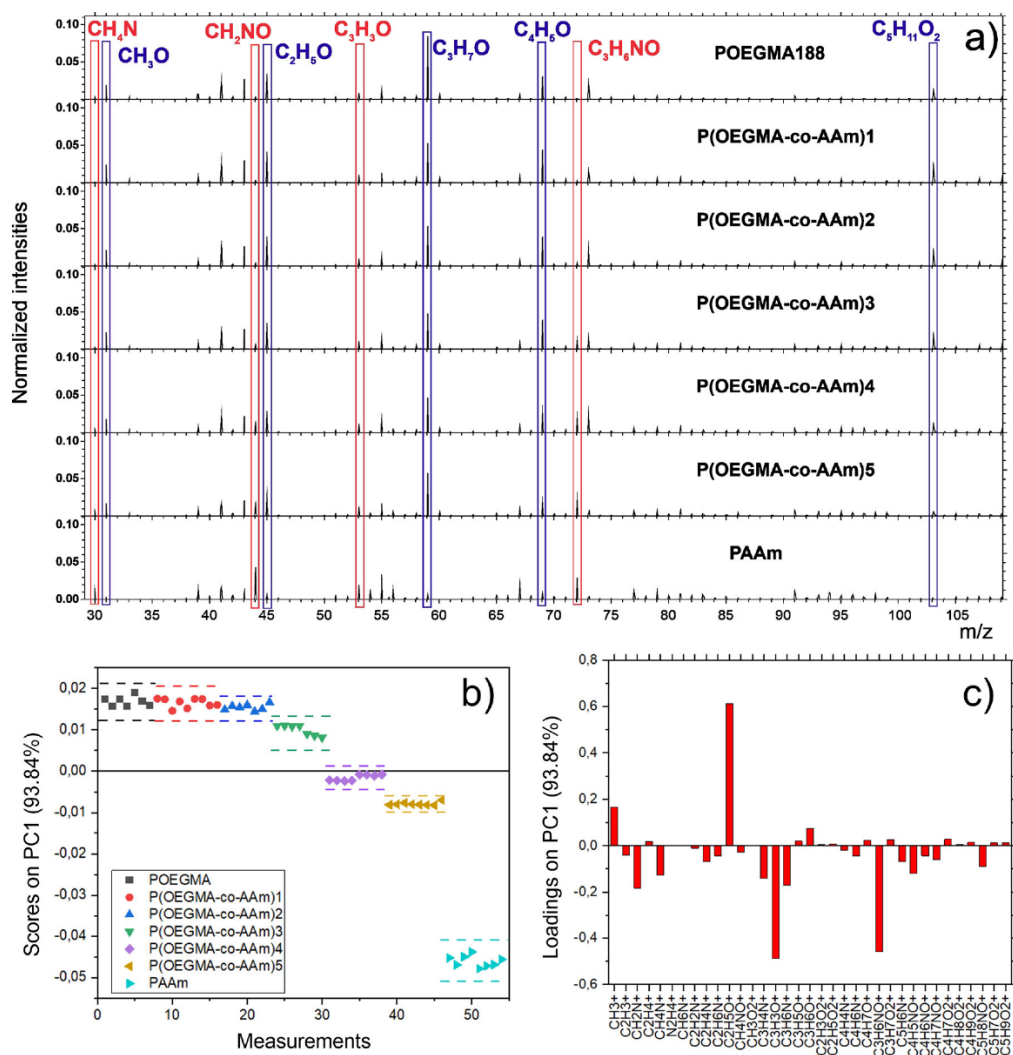


Рис. 3.3. ToF-SIMS спектри полімерних щіток на основі POEGMA188, PAAm, та P(OEGMA188-co-AAm) з різним мольним співвідношенням мономерів (а). PCA аналіз ToF-SIMS спектрів полімерних щіток на основі POEGMA188, PAAm, та P(OEGMA188-co-AAm) з різним мольним співвідношенням мономерів (b). Графіки навантаження, що пов'язують PC1 із ToF-SIMS сигналами (c).

ToF-SIMS спектр містить серію сигналів CH_3O^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$, $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}^+$, $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$ та $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2^+$, позначених синім кольором, що є характерними для мономеру OEGMA188. Нормалізовані інтенсивності цих піків зменшувалися зі збільшенням вмісту AAm у реакційній суміші, що підтверджує менший відсоток блоків OEGMA188. З іншого боку, для серії сигналів, специфічних для AAm, а саме CH_4N^+ , CH_2NO^+ , $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$ та $\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}^+$, позначених червоним

кольором, нормалізовані інтенсивності збільшуються із зростанням вмісту ААм під час синтезу.

Для підвищення чутливості ToF-SIMS методу, було виконано багатофакторний аналіз головних компонентів PCA (рис. 3.3b). Напрямки основних некорельованих варіацій у наборі ToF-SIMS даних, так звані головні компоненти (PC), визначалися у межах аналізу PCA. Перший головний компонент (PC1) охоплював більшість загальної варіації у наборі даних (93,84%). PC1 зміг розділити склад полімерних щіток з більшим вмістом OEGMA188 або Аам мономеру. Графік для PC1 показав, що PC1, визначена для полімерних щіток на основі POEGMA188, мала позитивні оцінки, а для PAAm - негативні оцінки, тоді як дані для щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm) були розташовані між цими групами даних (рис. 3.3c). Відбувалося зниження PC1 зі збільшенням вмісту ААм.

Цікаво було порівняти кількісні результати XPS з результатами ToF-SIMS. Для синтезованих кополімерних щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm) дані, отримані ToF-SIMS методом, можна кількісно проаналізувати за допомогою однофакторного калібрування (рис. 3.4a, b) та багатофакторного PCA аналізу (рис. 3.4c, d) відносно мольної частки ААм, визначеної за допомогою XPS.

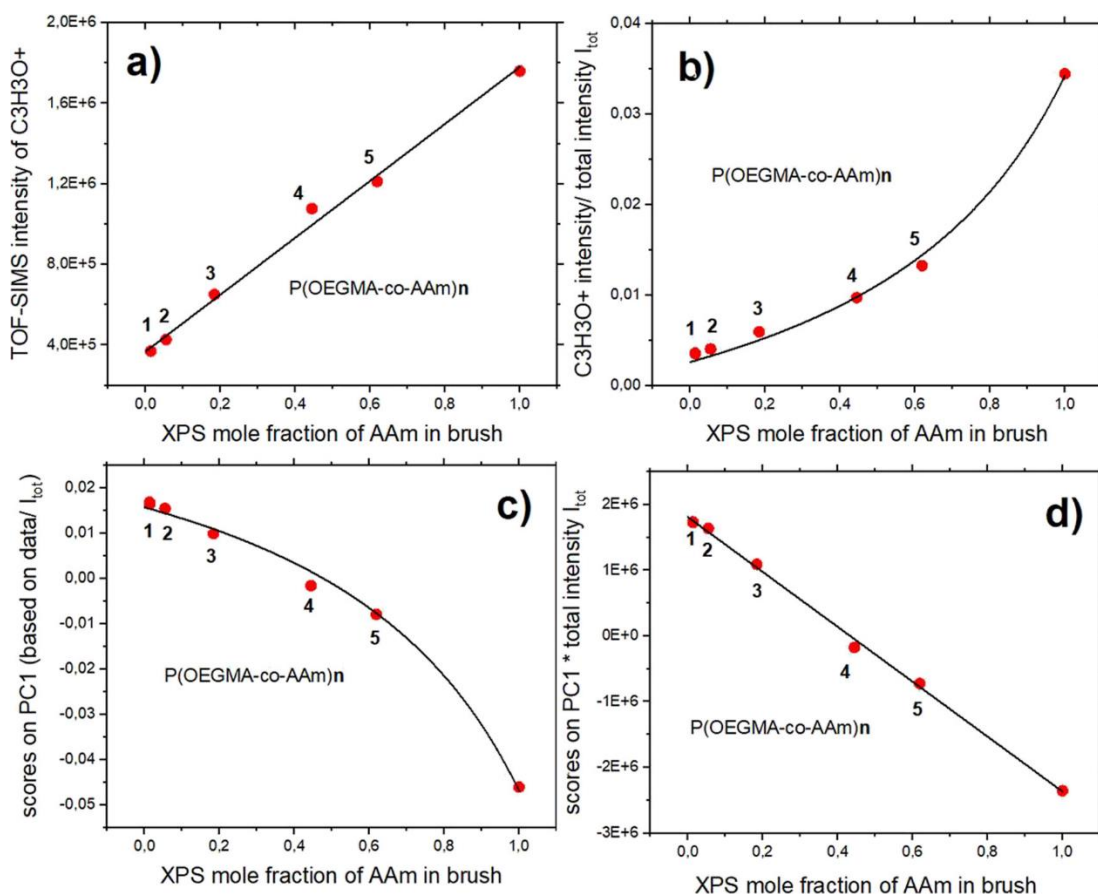


Рис. 3.4. Порівняння ToF-SIMS та XPS даних для кополімерних щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm) з різним мольним співвідношенням мономерів. Лінійна залежність абсолютної інтенсивності сигналу C₃H₃O⁺, характерного для AAm, відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (a). Нелінійна залежність інтенсивності сигналу C₃H₃O⁺, нормованого до загальної інтенсивності іонів I_{tot}, відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (b). Нелінійна залежність PC1 відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (c). Лінійна залежність добутку PC1 та загальної інтенсивності іонів I_{tot} відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (d).

Лінійна залежність між абсолютною інтенсивністю ToF-SIMS іонного фрагменту та XPS складом полімерної щітки спостерігалася для сигналу C₃H₃O⁺, характерного для AAm (рис. 3.4a), що вказує на незначний вплив матриці на формування іонів. Абсолютні інтенсивності мас-сигналів нормалізувалися загальною інтенсивністю іонів I_{tot}. Нормалізована

інтенсивність нелінійно змінювалася відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (рис. 3.4b), як відношення двох лінійних виразів. Це відношення також відображається у результатах PC1, поданих відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (рис. 3.4c). Причиною цього є нормалізовані інтенсивності ToF-SIMS, які були використані як основа для багатofакторного аналізу PCA. Відповідно оцінки PC1, помножені на загальну інтенсивність іонів I_{tot} , лінійно змінювалися відносно мольної частки AAm, визначеної за допомогою XPS (рис. 3.4d). Загалом результати свідчать, що ToF-SIMS дані добре корелюються з XPS даними, незважаючи на різноманітні ефекти, які впливають на результати обох технік. Також ця кореляція може вказувати на однорідність складу кополімерних щіток, враховуючи різну глибину детектування обох поверхневих методик (<3 нм для ToF-SIMS та <10 нм для XPS).

Середню товщину та показники заломлення у сухому стані полімерних щіток визначали за допомогою еліпсометрії за кімнатної температури. Результати вимірів еліпсометрії наведено у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3.

Середня товщина та показники заломлення полімерних щіток у сухому стані за кімнатної температури.

Полімерна щітка	Показник заломлення	Товщина, нм
POEGMA188	$1,509 \pm 0,004$	$36,9 \pm 1,2$
P(OEGMA188-co-AAm)1	$1,493 \pm 0,007$	$33,7 \pm 1,3$
P(OEGMA188-co-AAm)2	$1,500 \pm 0,002$	$34,4 \pm 1,1$
P(OEGMA188-co-AAm)3	$1,498 \pm 0,002$	$33,6 \pm 0,8$
P(OEGMA188-co-AAm)4	$1,495 \pm 0,003$	$33,1 \pm 1,0$
P(OEGMA188-co-AAm)5	$1,515 \pm 0,002$	$34,9 \pm 0,9$
PAAm	$1,517 \pm 0,001$	$34,1 \pm 1,4$

Для визначення температурно-чутливих властивостей прищеплених полімерних щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm), ми виміряли контактний кут змочування (CA) крапель води на покриттях, визначили товщину покриттів, занурених у воду, використовуючи спектроскопію відбивання білого світла WLRS, і відобразили морфологію покриттів з використанням атомно-силової мікроскопії AFM. Контактні кути змочування води на покриттях вимірювали за температур від 5 до 36 °C. Температурні залежності контактних кутів змочування для полімерних щіток показані на рисунку 3.5.

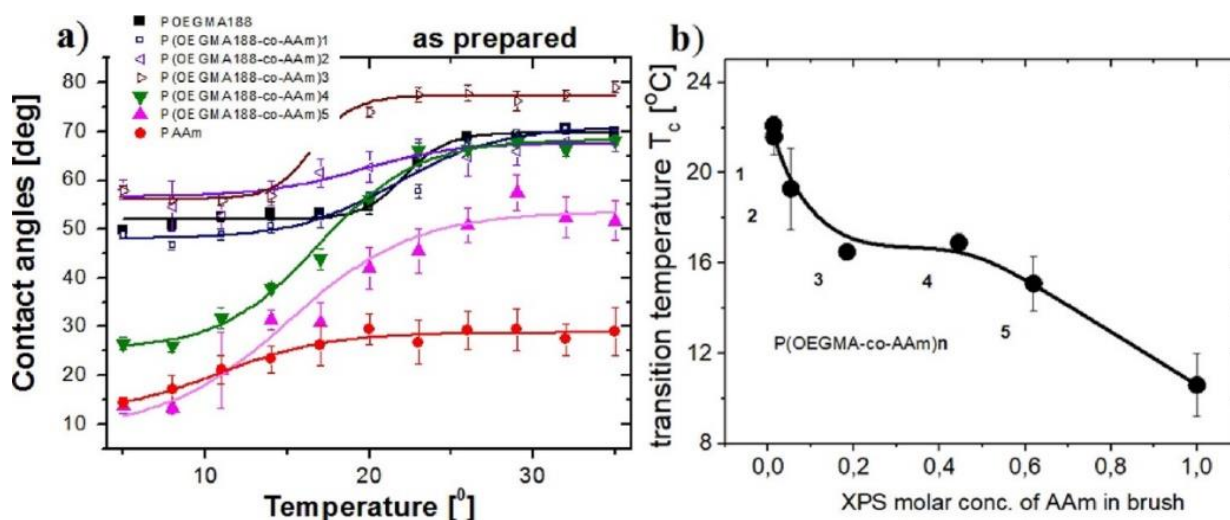


Рис. 3.5. Температурні залежності контактних кутів змочування для полімерних щіток на основі POEGMA188, PAAm та P(OEGMA188-co-AAm) з різним мольним співвідношенням мономерів (а). Залежність температури переходу полімерних щіток від молярної концентрації AAm у щітці, визначеної за допомогою XPS (б).

Температурно-чутливі зміни змочуваності, від гідрофільного стану до гідрофобного, імітують LCST перехід, і можуть бути наближено описані сигмоїдальною функцією Больцмана. Неочікувано ми виявили температурно-чутливі властивості для гомополімерних покриттів на основі PAAm з LCST-подібною поведінкою та температурою переходу $T_c = 10,6 \pm 1,3$ °C. Раніше повідомлялося, що гідрогелі на основі акриламиду проявляють LCST при температурах близьких до температури тіла людини [129]. Полімерні щітки на основі гомополімеру POEGMA188 характеризувалися різким переходом при

22,1 ± 0,4 °С, подібно до наших попередніх результатів. Кополімерні щітки на основі P(OEGMA188-co-AAm)1, з хімічним складом практично рівним POEGMA188, показували подібну поведінку із дещо нижчою температурою переходу T_c. Навпаки, кополімерні щітки на основі P(OEGMA188-co-AAm)2 і P(OEGMA188-co-AAm)3, з мольними частками AAm, рівними відповідно 5,5% і 18,4%, більш гідрофобні та проявляють знижені значення T_c. Покриття на основі P(OEGMA188-co-AAm)4 і P(OEGMA188-co-AAm)5, з мольними частками AAm, рівними відповідно 44,5% і 61,9%, проявляють підвищену температуро-чутливу відповідь на підвищення температури, з T_c = 15,1 ± 1,2 та 16,9 ± 0,4 °С, відповідно.

Значення нижніх і верхніх СА, їх різниці (Δ) та температури переходу T_c, визначені для полімерних щіток на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm) та PAAm узагальнені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4.

Значення нижніх і верхніх СА, їх різниці (Δ) та температури переходу T_c, визначені для полімерних щіток на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm) та PAAm з різним мольним співвідношенням мономерів.

Покриття	Значення нижнього СА, °	Значення верхнього СА, °	Δ, °	T _c , °С
POEGMA188	52,0 ± 0,5	69,7 ± 0,7	17,7	22,1 ± 0,4
P(OEGMA188-co-AAm)1	47,9 ± 1,0	70,9 ± 1,5	23,0	21,6 ± 0,8
P(OEGMA188-co-AAm)2	56,6 ± 1,3	67,6 ± 1,0	11,0	19,3 ± 1,7
P(OEGMA188-co-AAm)3	56,1 ± 0,7	77,2 ± 0,8	21,1	16,5 ± 0,3
P(OEGMA188-co-AAm)4	25,2 ± 1,4	68,3 ± 0,8	43,1	16,9 ± 0,4

P(OEGMA188-co-AAm) ⁵	8,8 ± 4,7	53,5 ± 3,1	44,7	15,1 ± 1,2
PAAm	11,7 ± 2,5	28,7 ± 0,6	17,0	10,6 ± 1,3

Найбільш виразні зміни у змочуваності спостерігалися для покриттів кополімерних наночарів на основі P(OEGMA188-co-AAm)⁴ і P(OEGMA188-co-AAm)⁵, де різниці між нижніми і верхніми кутами змочування були практично 44°. Ці температуро-чутливі зміни сильно зменшуються для покриттів на основі гомополімерів і кополімерів, багатих на OEGMA188. Крім того, можна зауважити, що покриття на основі P(OEGMA188-co-AAm)² і P(OEGMA188-co-AAm)³ є більш гідрофобними, ніж покриття на основі P(OEGMA188).

Значення температурних переходів T_c покриттів, у залежності від мольної частки AAm в щітці, представлені на рисунку 3.5b. Ця залежність не є лінійною. Температурні переходи різко зменшуються для мольної частки AAm в кополімерних щітках менше 19%, залишаються практично сталими для мольної частки AAm від 19% до приблизно 50%, і знову зменшуються для ще вищих концентрацій AAm.

Для аналізу температурної відповіді синтезованих полімерних щіток у воді ми вперше застосували WLRS (рис. 3.6), досліджуючи за допомогою волоконно-оптичного зонда спектр білого світла, яке відбивалося від покриття, розміщеного в «рідкій клітині» із контрольованою температурою.

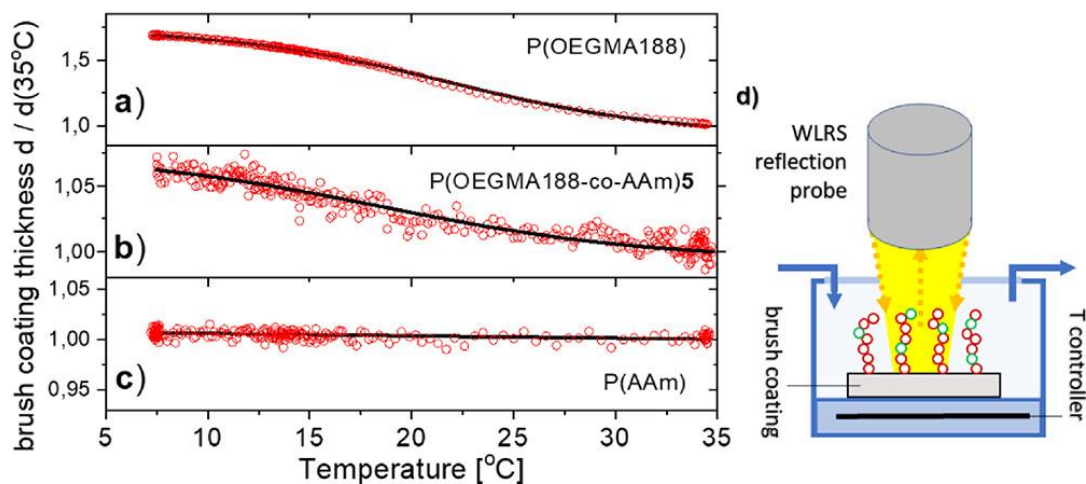


Рис. 3.6. Температурна залежність відносної товщини полімерних щіток, визначена *in situ* для покриттів на основі P(OEGMA188) (a), P(OEGMA188-co-AAm)5 (b) та P(AAm) (c), занурених у воду. Принцип роботи WLSR методу (d).

Результати таких вимірювань, виконаних між 5 та 35 °C для гомополімерних щіток на основі P(OEGMA188) та P(AAm) та кополімерних на основі P(OEGMA188-co-AAm)5, представлені на рисунку 3.6a,b,c. Відносна товщина наночарів в порівнянні з товщиною при 35 °C побудована як функція температури, і кожна точка представляє середнє значення вимірювань принаймні в трьох різних точках кожного зразка. Очікувано, що покриття на основі P(OEGMA188) продемонструвало добре виражений перехід при $21,8 \pm 0,1$ °C (рис. 3.6a). Таке ж значення LCST переходу визначено за допомогою вимірювання контактних кутів змочування ($22,1 \pm 0,4$ °C). Відношення товщини покриття в стані набухання та згортання дорівнює 1,67 і подібне до раніше опублікованих результатів [130]. Неочікувано, покриття на основі P(AAm) не виявляли жодних змін у товщині при зміні температури. Тут відношення товщини покриття між більш гідрофільним та більш гідрофобним станом близьке до 1. Нарешті, покриття на основі P(OEGMA188-co-AAm)5 виявляли слабку температурну реакцію товщини з відношенням товщини стану нижче і вище T_c приблизно 1,07. Значення температурного переходу T_c , визначене за допомогою WLSR становить $18,4 \pm 0,5$ °C і є дещо вищим, ніж визначене на основі контактних кутів змочування ($15,1 \pm 1,2$ °C). Порівняння результатів

вимірювань контактних кутів змочування і результатів WLRS вказують на різні механізми температурної відповіді для різних покриттів. Для наночарів на основі POEGMA188 відбувається виражений «класичний» перехід між гідратованим станом з розкрученим полімерним ланцюгом та гідрофобним станом зі згорнутими ланцюгами. Для полімерних щіток на основі P(OEGMA188-co-AAm)₅ та PAAm характерні зміни в гідрофільно-гідрофобному балансі без утворення згорнутих полімерних ланцюгів.

Морфологія полімерних щіток вивчалася за допомогою AFM за 10 і 30 °C у сухому стані для наночарів на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm)₂ та P(OEGMA188-co-AAm)₅, а також за 8 і 30 °C для PAAm. AFM зображення показані на рисунку 3.7.

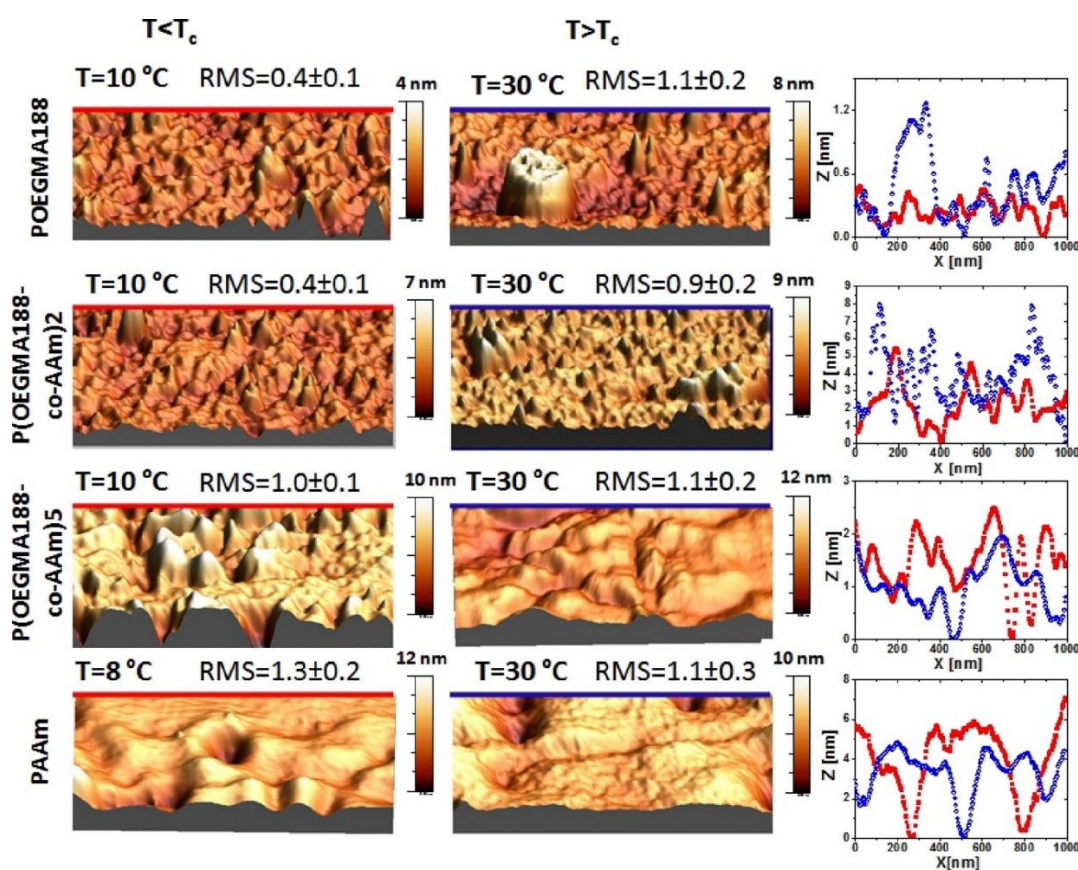


Рис. 3.7. AFM зображення та перерізи покриттів на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm)₂, P(OEGMA188-co-AAm)₅ і PAAm, записані при температурах нижчих та вищих за T_c . Середньоквадратичні значення шорсткості (в нанометрах) характеризують морфологію поверхонь.

Крім того, параметри розподілу висоти топографічних AFM-даних представлені на рисунку 3.8.

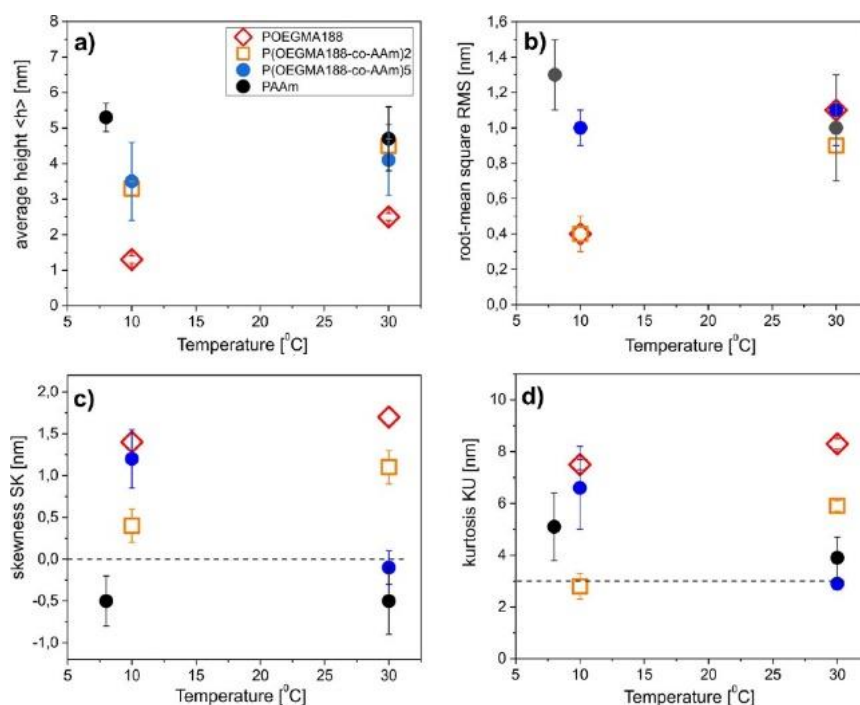


Рис. 3.8. Параметри розподілу висоти топографічних AFM-даних, записаних при температурах нижчих та вищих за T_c для покриттів на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm)2, P(OEGMA188-co-AAm)5 та PAAm: середня висота $\langle h \rangle$ (a), середньоквадратична шорсткість RMS (b), асиметрія SK (c) і ексцес KU (d).

Ці параметри відображають різні характеристики розподілу висот, тобто середнє значення ($\langle h \rangle$), розкид (квадратний корінь з середньоквадратичної висоти RMS), асиметрію (SK) та ексцес (KU). Усі поверхні виявляють **позитивні** значення ексцесу (KU) в межах від 3 до 8 (рис. 3.8d), що вказує на наявність надзвичайно високих піків або глибоких долин. З іншого боку, позитивні та негативні значення асиметрії (SK) характерні для поверхонь, що переважають піками або долинами, відповідно (рис. 3.8c). При обох температурах, $T < T_c$ та $T > T_c$, піки ($SK > 0$) переважали в топографії полімерних щіток на основі POEGMA188 та P(OEGMA188-co-AAm)2, а долини ($SK < 0$) переважали у випадку PAAm. Навпаки, домінуючі особливості поверхні

змінювалися з піків ($SK > 0$) нижче T_c на долини ($SK \leq 0$) вище T_c для щіток на основі $P(\text{OEGMA188-co-AAm})_5$. Нарешті, винятково низьке значення шорсткості ($RMS \sim 0,4$ нм, рис. 3.8b) вказувало на гладку морфологію наношарів на основі POEGMA188 та $P(\text{OEGMA188-co-AAm})_2$, записану при $T < T_c$. Обидві морфології схожі між собою, але вертикальний розмах більший для $P(\text{OEGMA188-co-AAm})_2$, що вказувало на більше значення середньої висоти $\langle h \rangle$ (рис. 3.8a). Крім того, обидва покриття на основі POEGMA188 та $P(\text{OEGMA188-co-AAm})_2$ демонстрували температуро-чутливий перехід від гладкої до шорсткої топографії поверхні, відображений значеннями RMS (рис. 3.8b). Ані покриття на основі PAAm , ані $P(\text{OEGMA188-co-AAm})_5$ не виявляли такого переходу з суттєвими змінами значень RMS за T_c , що вказувало на те, що механізми термічної відповіді відмінні від класичних, які є характерними для POEGMA188 . Аналогічні значення RMS за $T < T_c$ і $T > T_c$ вказують на слабку дегідратацію, яка може змінювати морфологію покриттів.

Поведінка покриттів на основі POEGMA добре відома і вже була описана в численних роботах. Типова теплова відповідь змочуваності та морфології з вираженим LCST головним чином приписується водневим зв'язкам між атомами кисню у поліетиленгліколі та атомами водню молекул води за $T < T_c$ (рис. 3.9a).

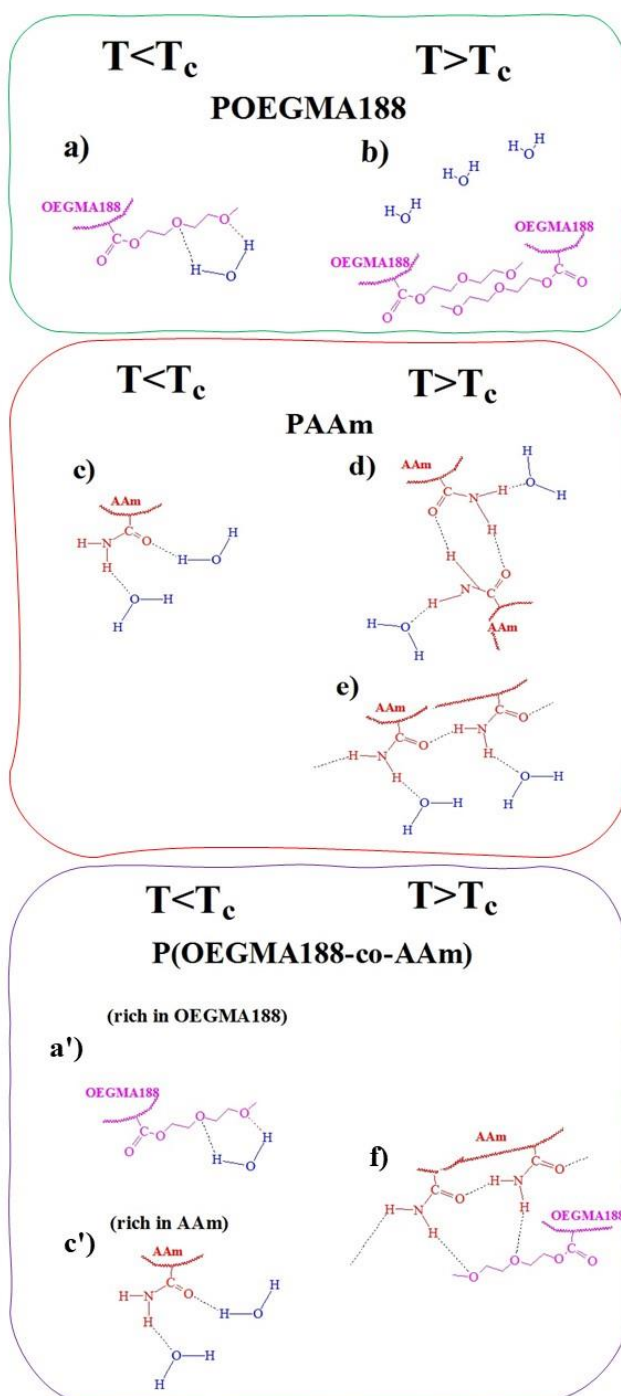


Рис. 3.9. Гіпотетичні конформації домінуючих водневих зв'язків між водою, амідними групами та етерними фрагментами для покриттів на основі POEGMA188 (a, b), PAAm (c, d, e) та P(OEGMA188-co-AAm) (a', c', f) нижче (ліві стовпці) і вище температури переходу T_c (праві стовпці), що найкраще охарактеризовують поведінку та властивості покриттів.

Цей баланс руйнується при підвищених температурах $T > T_c$, де взаємодії полімер-полімер термодинамічно більш вигідні порівняно з взаємодіями

полімер-вода (рис. 3.9b). У результаті відбувається різкий перехід від стану набухання до стану згортання, що призводить до змін гідрофобності та товщини покриттів на основі POEGMA188 (рис. 3.10).

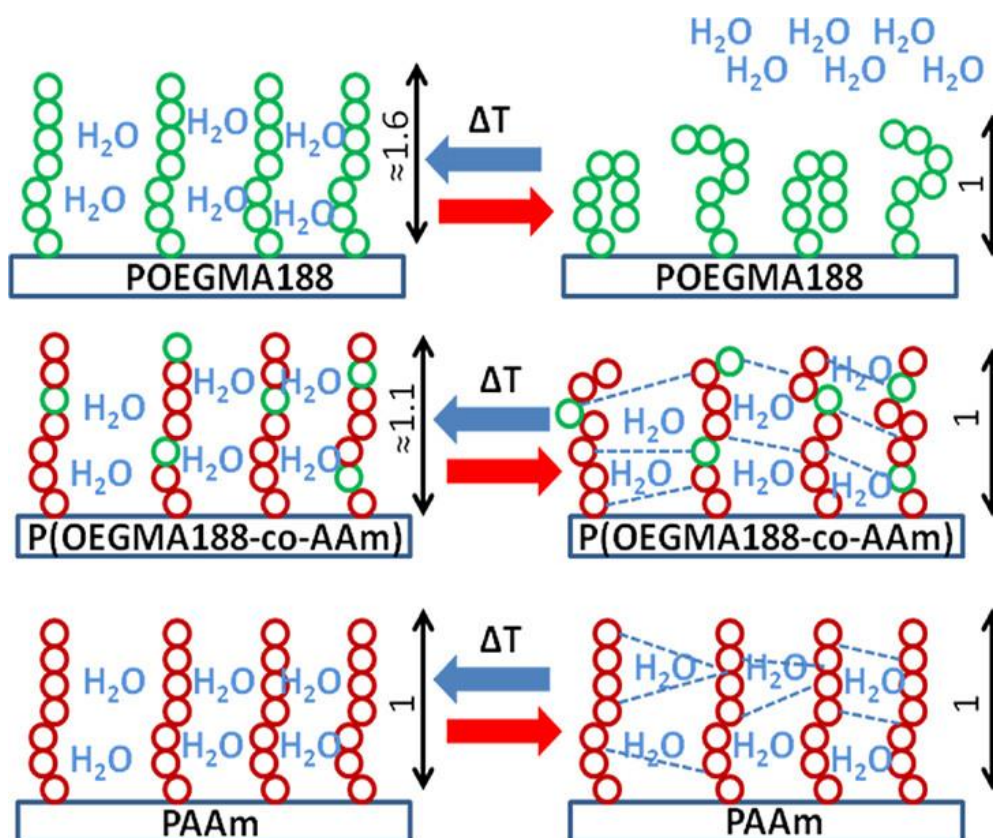


Рис. 3.10. Гіпотетична поведінка покриттів на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm) і PAAm при $T < T_c$ (лівий стовпчик) і $T > T_c$ (правий стовпчик). Сегменти AAm позначені червоним кольором, сегменти OEGMA188 – зеленим. Пунктирними лініями позначені водневі зв'язки між відповідними сегментами, що домінують за $T > T_c$ після руйнування водневих зв'язків між молекулами полімеру та води.

У свою чергу, полімерні щітки на основі PAAm у воді зі кімнатної температури, тобто вище критичної температури (T_c), формують різні структури водневого зв'язку, як показано на рисунку 3.9. До цих структур входять амідні групи, що утворюють водневі зв'язки лише з молекулами води (рис.3.9c), цис-транс-мультимери (рис. 3.9d) та транс-мультимери (рис. 3.9e) амідних груп. Однак кількість цис-транс-асоціатів, а також транс-асоціатів амідних груп в PAAm значно менша, ніж у амідних груп, що утворюють

водневі зв'язки лише з молекулами води. На основі експериментальних результатів та попередніх досліджень ми припускаємо механізм термічної відповіді PAAm, відмінний від «класичних» переходів на основі LCST, показаних раніше для PNIPAM, POEGMA та багатьох інших полімерів. Ми очікуємо, що ця поведінка в основному пов'язана з конформаціями водневих зв'язків між гідрофільними амідними групами сегментів PAAm та водою (рис. 3.9с), які переважають при низьких температурах (як у випадку PNIPAM та подібних полімерів), але трохи змінюються за рахунок водневих зв'язків між амідними групами у ланцюгах PAAm (рис. 3.9d та e) вище температури переходу, імітуючи LCST. Мабуть, термічно індукована дегідратація амідних груп (рис. 3.9с) може призвести до формування водневих зв'язків між амідними фрагментами (рис. 3.9d та e), які все ще можуть бути гідратованими. Така поведінка відрізняється від поведінки PNIPAM, де при LCST водневі зв'язки з водою майже повністю заміщені водневими зв'язками між амідними групами в ланцюгах PNIPAM. Для PAAm співвідношення амідних груп, які утворюють водневі зв'язки з водою, та амідних груп, які утворюють такі зв'язки між собою, термодинамічно збалансоване і змінюється лише незначно при переході. Існує суттєвий вплив температури на змочуваність, але майже нульовий вплив на морфологію поверхні та товщину покриттів на основі PAAm. Це свідчить про те, що молекули води залишаються в наночастицях на основі PAAm, і зміна змочуваності, викликана зміною температури, реалізується лише за рахунок змін конформацій водневих зв'язків в полімерному покритті, де молекули води ніби заблоковані у щітках.

Навпаки, в порівнянні з відносно простими механізмами переходу для покриттів на основі PAAm та POEGMA188, механізм переходу для кополімеру на основі P(OEGMA188-co-AAm) є дуже складним, включаючи водневі зв'язки між етерними фрагментами OEGMA188 та амідними групами AAm, а також конкуруючі взаємодії між сегментами кополімеру та водою. Цей механізм залежить від співвідношення мономерів у складі кополімеру. Раніше Т. Желтоножська та ін. [131-135] продемонстрували участь транс-мультимерів

амідних груп триблок-кополімерів у формуванні системи водневих зв'язків між сегментами поліетиленоксиду та PAAm (рис. 3.9f). Підвищена температуро-чутлива відповідь змочуваності для кополімерів на основі P(OEGMA188-co-AAm) з великим мольним відсотком гідрофільного AAm, що не супроводжується значними змінами в товщині покриття, свідчить про формування за температури переходу (T_c) більш гідрофобних структур, за рахунок утворення водневих зв'язків між етерними атомами кисню OEGMA188 та амідними фрагментами AAm (рис. 3.9f), а молекули води лишаються "заблокованими всередині". Ми вважаємо, що кількість амідних груп, що утворюють водневі зв'язки лише з водою, є відносно невеликою за температури нижче T_c , і підвищення температури стимулює їх дегідратацію та формування нових водневих зв'язків між AAm та OEGMA188 (рис. 3.9f). Крім того, ця гіпотеза пояснює, чому покриття на основі P(OEGMA188-co-AAm) з великим мольним відсотком OEGMA188 за $T < T_c$ є більш гідрофобними, ніж "чисті" щітки на основі POEGMA188. У цьому випадку більшість амідних груп утворюють водневі зв'язки з етерними фрагментами OEGMA188, і температуро-індукований перехід може бути реалізований лише дегідратацією молекул OEGMA188, які все ще утворюють водневі зв'язки з водою.

3.2. Формування, властивості та застосування наночарів температуро- та рН-чутливих прищеплених кополімерних щіток з «шизофренічною» поведінкою у буферних розчинах з різним значенням рН

У цьому підрозділі описано рН-чутливі властивості полімерних щіток на основі POEGMA188, P(OEGMA188-co-AAm) та PAAm, зокрема виявлено "шизофренічну" поведінку покриттів на основі P(OEGMA188-co-AAm)⁵.

Буферні розчини з різними значеннями рН відомі своїм сильним впливом на стабільність білків та життєздатність клітин. Таким чином, поведінка покриттів у буферних розчинах за різних температур відіграє ключову роль у їх застосуванні в біомедицині. Температурна залежність кутів

змочування визначалася для гомополімерних щіток на основі POEGMA188 та PAAm, а також кополімерних щіток на основі P(OEGMA188-ко-AAm)2 та P(OEGMA188-ко-AAm)5, після їх занурення у фосфатно-цитратні буферні розчини з рН = 3, 5 та 7, а також у боратний буфер з рН = 9, як показано на рисунку 3.11 та в таблиці 3.5. Виміри контактних кутів змочування виконувалися при температурі від 5 до 32 °С. Загалом, температурна відповідь змочуваності є меншою для покриттів після занурення в розчини буферів, ніж для «чистих» покриттів.

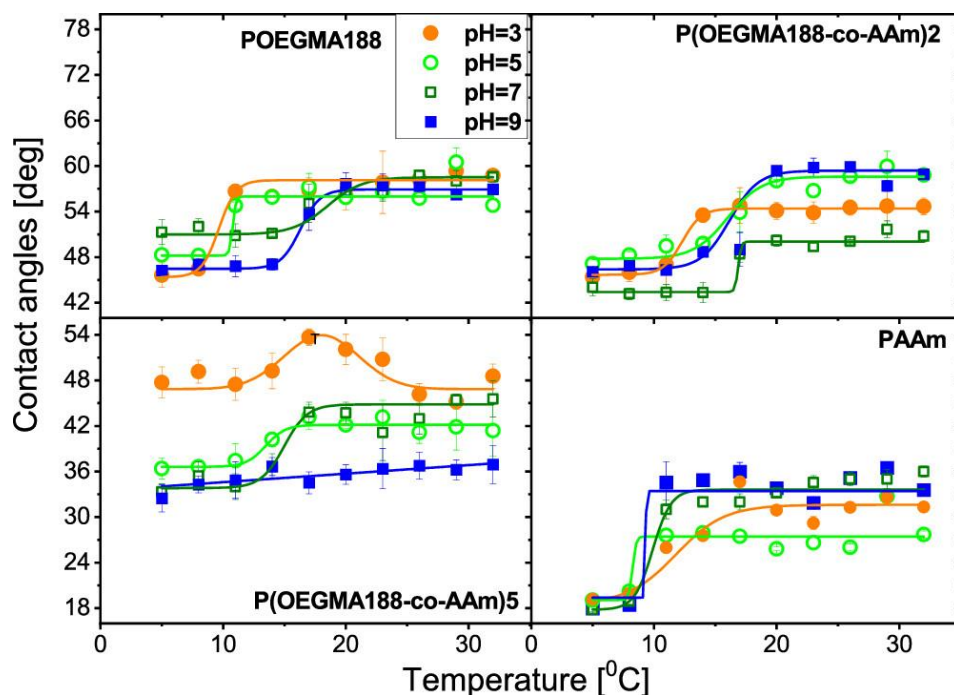


Рис. 3.11. Температурна залежність контактних кутів змочування, визначена для покриттів на основі POEGMA188, PAAm, P(OEGMA188-ко-AAm)2 і P(OEGMA188-ко-AAm)5 після занурення в буферні розчини з різними значеннями рН.

Таблиця 3.5.

Значення нижніх і верхніх СА, їх різниці (Δ) та температури переходу T_c , визначені для полімерних щіток на основі P(ОЕГМА188), P(ОЕГМА188-со-ААм)2, P(ОЕГМА188-со-ААм)5 та PAAm після занурення в буферні розчини з різними значеннями рН.

Покриття	рН	Значення нижнього СА, °	Значення верхнього СА, °	Δ , °	T_c , °C
P(ОЕГМА188)	вода	$52,0 \pm 0,5$	$69,7 \pm 0,7$	17,7	$22,1 \pm 0,4$
	3	$45,4 \pm 2,7$	$58,1 \pm 0,5$	12,7	$9,6 \pm 1,0$
	5	$48,2 \pm 2,2$	$56,0 \pm 0,4$	7,8	$10,7 \pm 1,0$
	7	$51,0 \pm 0,6$	$58,5 \pm 0,3$	7,5	$17,5 \pm 0,9$
	9	$46,5 \pm 0,3$	$56,9 \pm 0,7$	10,4	$16,3 \pm 0,5$
P(ОЕГМА188-со-ААм)2	вода	$56,6 \pm 1,3$	$67,6 \pm 1,0$	11,0	$19,3 \pm 1,7$
	3	$45,7 \pm 0,3$	$54,4 \pm 0,2$	8,7	$12,3 \pm 0,3$
	5	$47,8 \pm 0,4$	$58,6 \pm 0,4$	10,8	$16,0 \pm 0,6$
	7	$43,4 \pm 0,5$	$50,1 \pm 0,3$	6,7	$16,9 \pm 0,7$
	9	$46,4 \pm 0,5$	$59,4 \pm 0,5$	13,0	$16,2 \pm 0,9$
P(ОЕГМА188-со-ААм)5	вода	$8,8 \pm 4,7$	$53,5 \pm 3,1$	44,7	$15,1 \pm 1,2$
	3	LCST-подібний перехід при 14,2 °C та UCST-подібний перехід при 23,0 °C			
	5	$36,6 \pm 0,3$	$42,1 \pm 0,2$	5,5	$13,5 \pm 0,7$
	7	$33,8 \pm 0,7$	$44,8 \pm 0,5$	11,0	$15,0 \pm 0,6$
	9	нема переходу			
PAAm	вода	$11,7 \pm 2,5$	$28,7 \pm 0,6$	17,0	$10,6 \pm 1,3$
	3	$18,5 \pm 1,7$	$31,6 \pm 0,6$	13,1	$11,8 \pm 1,2$
	5	$19,1 \pm 2,8$	$27,4 \pm 0,7$	8,3	$8,2 \pm 2,5$
	7	$17,7 \pm 0,6$	$33,6 \pm 0,5$	15,9	$9,9 \pm 0,6$
	9	$19,4 \pm 1,1$	$33,4 \pm 0,7$	14,0	$9,3 \pm 0,7$

У всіх випадках занурення покриттів на основі P(OEGMA188 у розчині буферів викликає зсув точки T_c з $22\text{ }^\circ\text{C}$, визначеної для чистих зразків, до $9\text{--}11\text{ }^\circ\text{C}$ та $16\text{--}17\text{ }^\circ\text{C}$ для кислих та нейтральних/основних буферів, відповідно (рис. 3.11 та таблиця 3.4). Зовсім інша поведінка була зафіксована для покриттів на основі PAAm, де температурна точка переходу T_c дорівнює $10\text{ }^\circ\text{C}$, і немає суттєвого впливу різних буферів на T_c (рис. 3.11 та таблиця 3.4). Аналіз результатів, отриманих для кополімерних щіток на основі P(OEGMA188-ко-AAm)₂ показує зниження значень T_c після занурення покриттів в усі буферні розчини, з найсильнішим впливом після інкубації покриттів в фосфатно-цитратних буферах з $\text{pH} = 3$ (рис. 3.11 та таблиця 3.4). Особливу увагу слід звернути на кополімерні щітки на основі P(OEGMA188-ко-AAm)₅. Для цих зразків занурення у буферні розчини з різними pH призводить до «шизофренічної» поведінки змочуваності, яка до цього часу не була зафіксована і залежить від pH буфера: для $\text{pH} = 3$ характер температурної залежності кута змочування (рис. 3.11) вказує на перехід від гідрофільного до гідрофобного стану поверхні при $T_c = 14,2\text{ }^\circ\text{C}$, схожого на LCST, за яким слідує зворотна зміна (від гідрофобного до гідрофільного) при $T_c = 23,0\text{ }^\circ\text{C}$, що імітує UCST поведінку. З іншого боку, для $\text{pH} = 5$ та 7 зберігається перехід, схожий на LCST, але зміна змочуваності навколо переходу, що виражена різницею Δ між верхнім і нижнім CA, значно зменшується ($\Delta = 6^\circ$ для $\text{pH} = 5$ і 11° для $\text{pH} = 7$) порівняно з зануренням у «чисту» воду ($\Delta = 45^\circ$). Нарешті, для $\text{pH} = 9$ температуро-чутлива відповідь змочуваності блокується.

Для більш повного характеризування покриттів на основі P(OEGMA188-ко-AAm)₅, які є найбільш цікавими та перспективними для біомедичних застосувань, були записані AFM зображення у повітрі за $10, 20$ і $30\text{ }^\circ\text{C}$ після занурення їх у розчини буферів з pH , що дорівнює $3, 5, 7$ і 9 . Отримані результати представлені на рисунку 3.12.

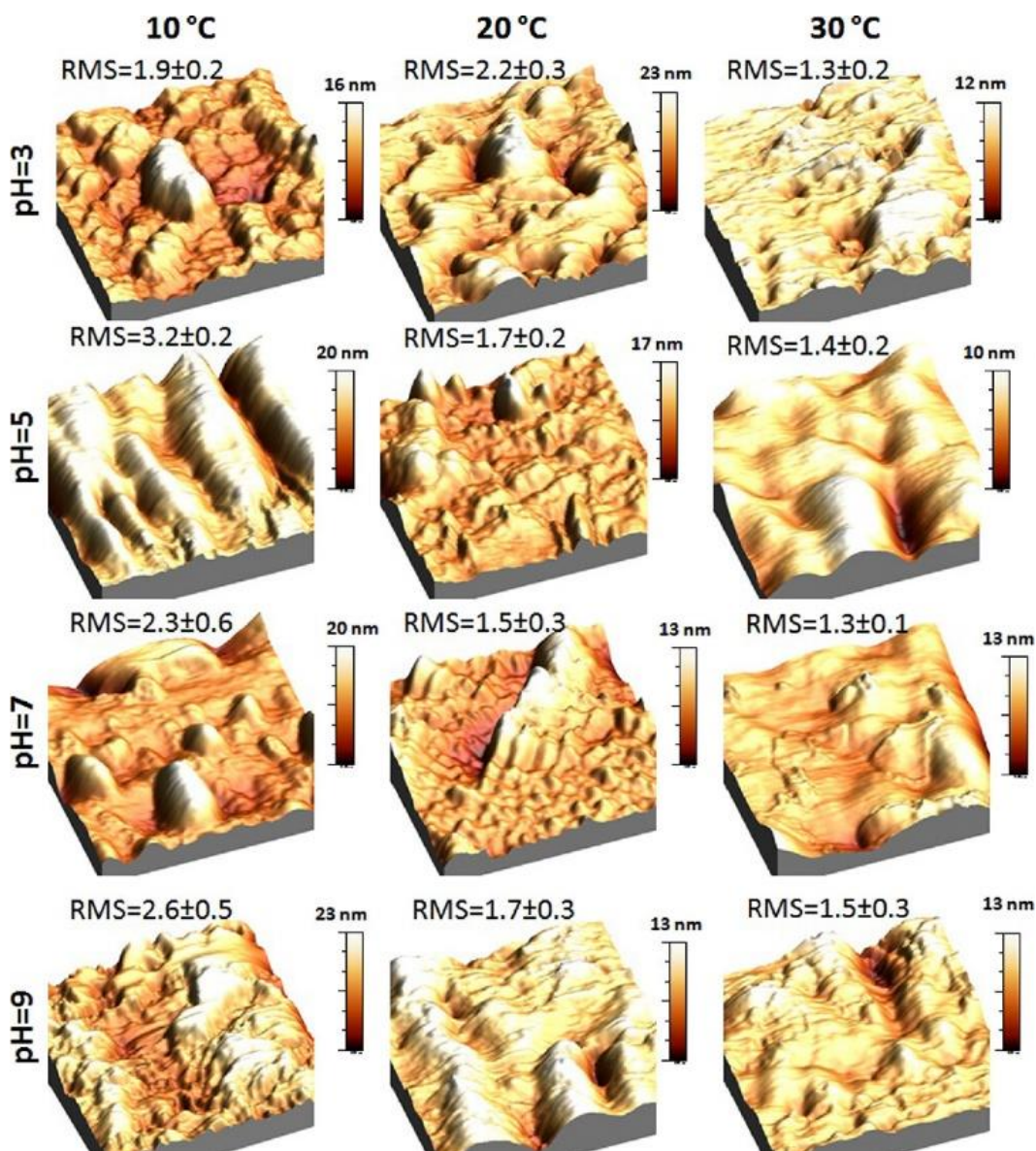


Рис. 3.12. Топографія покриттів на основі P(OEGMA188-co-AAm)₅, виміряна методом AFM за 10, 20 та 30 °C (рядки) після занурення зразків у буферні розчини із рН, рівним 3, 5, 7 та 9 (стовпці).

На відміну від покриттів на основі P(OEGMA188-co-AAm)₅ до занурення у буфери, де порівняно однакові значення RMS шорсткості фіксувалися за 10 і 30 °C, тут значення RMS вищі при 10 °C, ніж при 30 °C. Хоча зображення AFM, записані для рН 3, 5, 7 і 9, були отримані для різних типів буферних розчинів (фосфатні та боратні буфери), отримані топографії при 10 °C ($T < T_c$) є дуже схожими. Вони представляють відносно великі структури у формі витягнутих острівців для рН = 5. З іншого боку, AFM

зображення, отримані для рН 3, 5 і 7 за 20 і 30 °С ($T > T_c$), демонстрували значно вузчі і нижчі структури. Хоч щітки на основі P(OEGMA188-ко-AAm)5 після занурення в буферний розчин з рН = 9 не проявляли жодних змін змочуваності при всіх температурах, вони проявляли чітко виражені зміни морфології, подібні до тих, що зафіксовані для покриттів після занурення у буферні розчини з рН 5 і 7.

Температуро- і рН-чутливі зміни як змочуваності, так і морфології покриттів суттєво відрізняються від тих, що були зафіксовані у чистій воді, і вказують на більш складні механізми переходу. Ймовірно, іони солей буферних розчинів відіграють не останню роль у регулюванні поведінки покриттів. Блокування переходу при рН = 9 може бути пов'язане з гідролізом амідних груп у лужних буферах, як це було описано в роботі 137, де спостерігалася висока швидкість гідролізу полімерів на основі акриламідів у умовах лужного середовища. Існування переходу для рН = 3 при $T_c = 14,2$ °С, що нагадує LCST, за яким йде перехід при $T_c = 23,0$ °С, який імітує поведінку, типову для UCST, було неочікуваним і не може бути пояснено на даний момент. Ймовірно, додаткові зв'язки утворюються за участю різних компонентів буферів.

3.3. Формування, властивості та застосування наночарів температуро- та рН-чутливих прищеплених полімерних щіток з можливістю керувати LCST-UCST переходами

Синтез прищеплених кополімерних щіток з визначеним мольним співвідношенням мономерів потребує ретельного розрахунку, оскільки їхні константи кополімеризації можуть значно відрізнятися, що призведе до того, що мольні частки у синтезованому покритті будуть значно відрізняються від масових часток мономерів, використаних у процесі синтезу. Для статистичних кополімерів на основі P(OEGMA-со-HEMA) були розраховані константи кополімеризації, які рівні $r(\text{OEGMA})=1,18$ та $r(\text{HEMA})=0,95$ [136]. Навпаки, для кополімеризації NIPAM з HEMA обчислені константи кополімеризації

відрізняються значно і дорівнюють $r(\text{NIPAM})=0,0034$ та $r(\text{HEMA})=0,114$ [137]. Ці значення свідчать про чітку альтернативність фрагментів мономера NIPAM відносно мономера HEMA і випадкову поведінку HEMA відносно NIPAM.

Мольний склад покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) та P(NIPAM-co-HEMA) (таблиця 3.6) можна контролювати шляхом зміни співвідношення мономерів у реакційній суміші та обчислювати за рівняннями 3.1 і 3.2:

$$F_1 = \frac{r_1 \times f_1^2 + f_1 \times f_2}{r_1 \times f_1^2 + 2f_1 \times f_2 + r_2 \times f_2^2} \quad (3.1)$$

$$F_2 = 1 - F_1 \quad (3.2)$$

де F_1 та F_2 - мольні частки HEMA та OEGMA або NIPAM у кополімері, відповідно; r - реактивне співвідношення для OEGMA/HEMA, $r_1 = 1,18$ та $r_2 = 0,95$, і для NIPAM/HEMA, $r_1 = 0,0034$ та $r_2 = 0,114$; f_1 та f_2 - концентрації HEMA та OEGMA або HEMA та NIPAM у реакційній суміші, відповідно.

Хоча рівняння 3.1 і 3.2 в основному використовуються для розрахунку миттєвого складу кополімеру за низьких швидкостей конверсії (<15%), їх також можна використовувати для оцінки загальних тенденцій у структурі прищеплених полімерних щіток.

Таблиця 3.6.

Мольний склад покриттів на основі P(OEGMA-co- HEMA) та P(NIPAM-co-HEMA).

Покриття	Кількість моль мономерів у реакційній суміші	Мольне співвідношення мономерних ланок у полімерній щітці	
		HEMA	OEGMA або NIPAM
P(OEGMA-co-HEMA) 50/50	0,0285/0,0315	0,50	0,50

P(OEGMA-co-HEMA) 70/30	0,04020/0,01980	0,30	0,70
P(OEGMA-co-HEMA) 80/20	0,04650/0,01350	0,20	0,80
P(OEGMA-co-HEMA) 90/10	0,05400/0,00600	0,09	0,91
P(NIPAM-co-HEMA) 50/50	0,05400/0,00600	0,50	0,50
P(NIPAM-co-HEMA) 70/30	0,05980/0,00020	0,33	0,67
P(NIPAM-co-HEMA) 80/20	0,05993/0,00007	0,20	0,80
P(NIPAM-co-HEMA) 90/10	0,05997/0,00003	0,11	0,89

Склад покриттів спочатку визначали за допомогою ToF-SIMS. Позитивні іонні спектри, зареєстровані для покриттів на основі PNIPAM (рис. 3.13a), показують серію сигналів для значень m/z , рівних 58, 72 та 114, які відповідають позитивним іонам $C_3H_8N^+$, $C_3H_6NO^+$ та $C_6H_{12}NO^+$, характерним для PNIPAM, тоді як на спектрах щіток на основі PHEMA (рис. 3.13c), можна спостерігати серію кисневмісних катіонів, таких як $C_2H_5O^+$, $C_4H_5O^+$ та $C_6H_9O_2^+$, типових для PHEMA. Для кополімерних щіток на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (рис. 3.13b) видно сигнали, що вказують на наявність фрагментів обох мономерів NIPAM і HEMA, що підтверджує успішний синтез. Також були записані спектри у негативному режимі для щіток P(OEGMA), PHEMA і P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 (рис. 3.13d). Результати, представлені на рисунках 3.13d–f, показують сигнал $C_3H_7O_2^-$, характерний для P(OEGMA) (рис. 3.13d), сигнал $C_7H_{11}O_2^-$, що є характерним для PHEMA (рис. 3.13f), та обидва згадані сигнали у спектрі кополімерної щітки (рис. 3.13e).

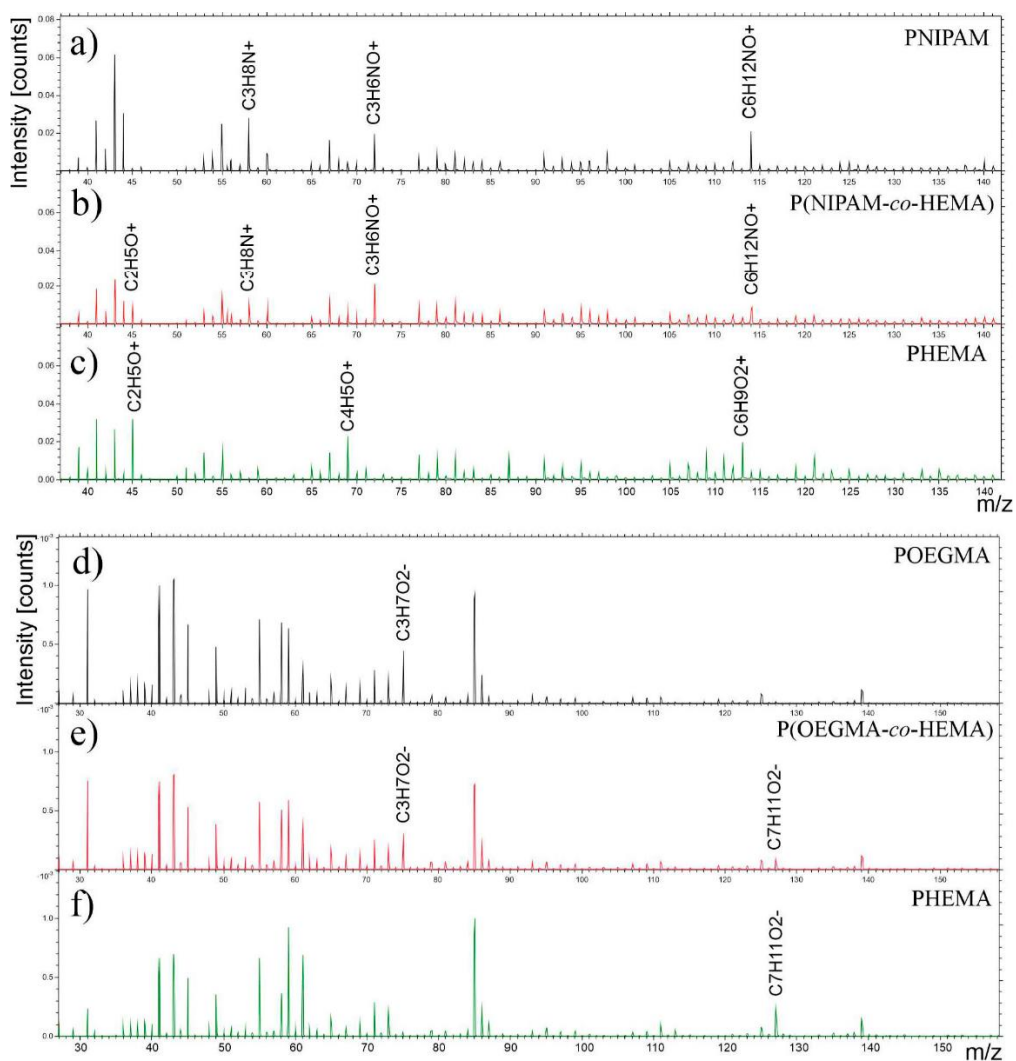


Рис. 3.13. ToF-SIMS спектри іонів у позитивному (a–c) та негативному (d–f) режимах для полімерних щіток на основі PNIPAM (a), P(NIPAM-co-HEMA) (b), PHEMA (c), POEGMA (d), та P(OEGMA-co-HEMA) (e), і PHEMA (f).

Крім ToF-SIMS вимірювань, покриття також досліджували за допомогою XPS методу, який надає кількісну інформацію про їх хімічний склад. Спочатку отримували XPS $C1s$ спектри ядер для всіх покриттів, які потім розкладали на декілька внесків, характерних для OEGMA, HEMA або NIPAM (рис. 3.14).

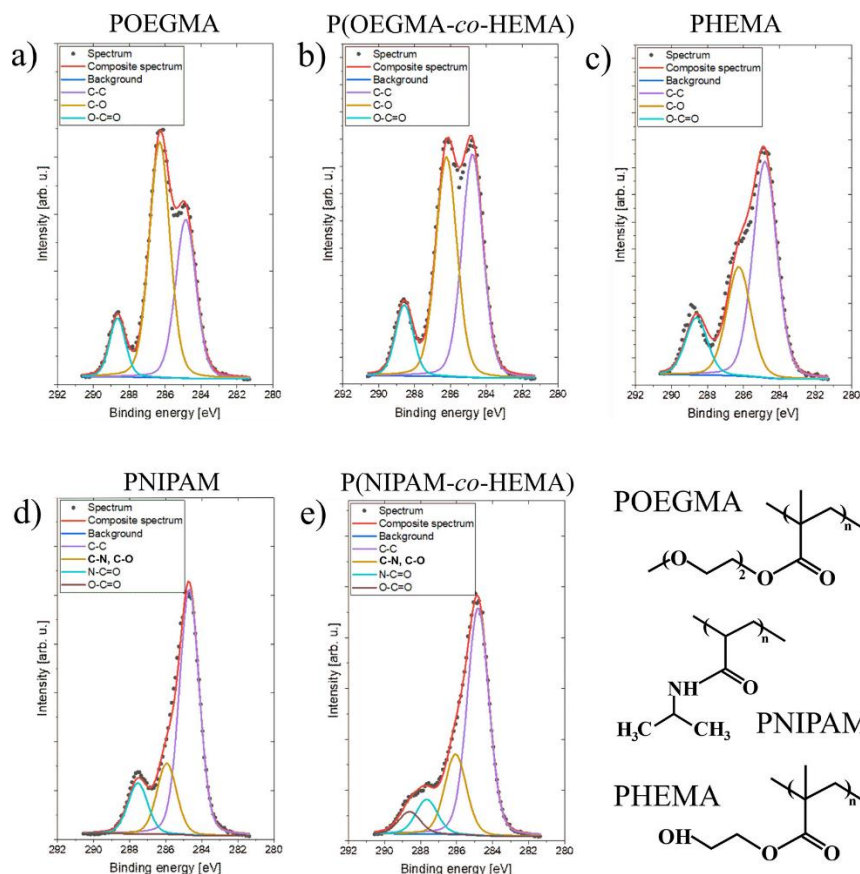


Рис. 3.14. Спектри ядер C1s, отримані методом XPS, для покриттів на основі РОЕГМА (а), РНЕМА (с), РНІПАМ (д), та кополімерів на основі Р(ОЕГМА-со-НЕМА) 50/50 (б) і Р(НІПАМ-со-НЕМА) 50/50 (е).

Спектр C1s для щіток на основі РОЕГМА (рис. 3.14а) складається з трьох сигналів, які відповідають нейтральному вуглецевому зв'язку С–С (фіолетова лінія, 284,8 еВ) та двом електронодонорними зв'язкам, характерним для ОЕГМА: С–О (помаранчева лінія, 286,3 еВ) та О–С=О (блакитна лінія, 288,6 еВ), при найменшій інтенсивності для піка О–С=О та найвищій для С–О. Спектр покриттів на основі РНЕМА (рис. 3.14с), складається з тієї ж послідовності піків; проте відношення між їх густинами відрізняється значно. У випадку покриттів на основі Р(ОЕГМА-со-НЕМА) 50/50 (рис. 3.14б) інтенсивності сигналів зв'язків С–О та С–С є схожими, що підтверджує кополімерний склад. Для щіток на основі РНІПАМ (рис. 3.14д) спостерігається також сигнал від зв'язку N–С=О (блакитна лінія, 287,9 еВ), який є характерним для НІПАМ. Додатково спостерігається сильний сигнал при 286,3 еВ, що

відповідає зв'язку C–N. Спектр, записаний для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (рис. 3.14e), складається з чотирьох піків, які відповідають зв'язкам C–C, C–O (співпадає з C–N), N–C=O та –C=O, як і очікувалося для цього кополімера.

На основі даних XPS були визначені відносні інтенсивності сигналів зв'язків, характерних для досліджуваних полімерних щіток (рис. 3.15).

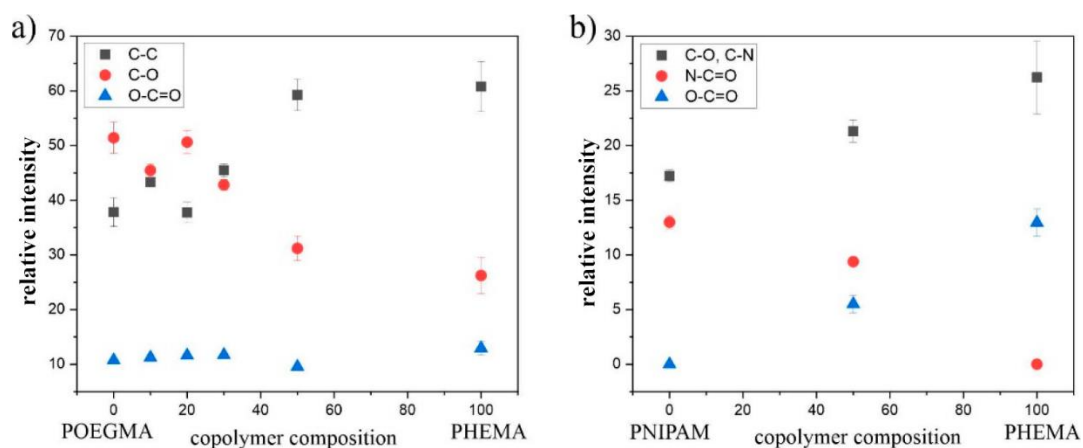


Рис. 3.15. Відносні інтенсивності (у відсотках) сигналів, що відповідають зв'язкам C–C (чорні квадрати), C–O (червоні круги) і O–C=O (сині трикутники) у спектрах C1s ядра, отриманих методом XPS, для покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 (а), а також сигналів, що відповідають зв'язкам C–O, C–N (чорні квадрати), N–C=O (червоні круги) і O–C=O (сині трикутники) для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (б).

Для покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 (рис. 3.15а) можна спостерігати монотонне збільшення інтенсивності сигналу C–O, більш характерного для POEGMA, що супроводжується монотонним зменшенням інтенсивності сигналу C–C, більш специфічного для PHEMA, при зростанні вмісту OEGMA в покритті. Ці результати підтверджують успішне виготовлення полімерних покриттів із наперед розрахованим складом. Для щіток на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (рис. 3.15b) інтенсивність сигналу N–C=O, пов'язаного із PNIPAM, збільшується, в той час як інтенсивність піку O–C=O, характерного для PHEMA, зменшується при збільшенні вмісту PNIPAM в покритті.

Далі було записано топографії покриттів за допомогою атомно-силової мікроскопії, що зображує подібні структури, схожі на острівці, для всіх типів покриттів (рис. 3.16).

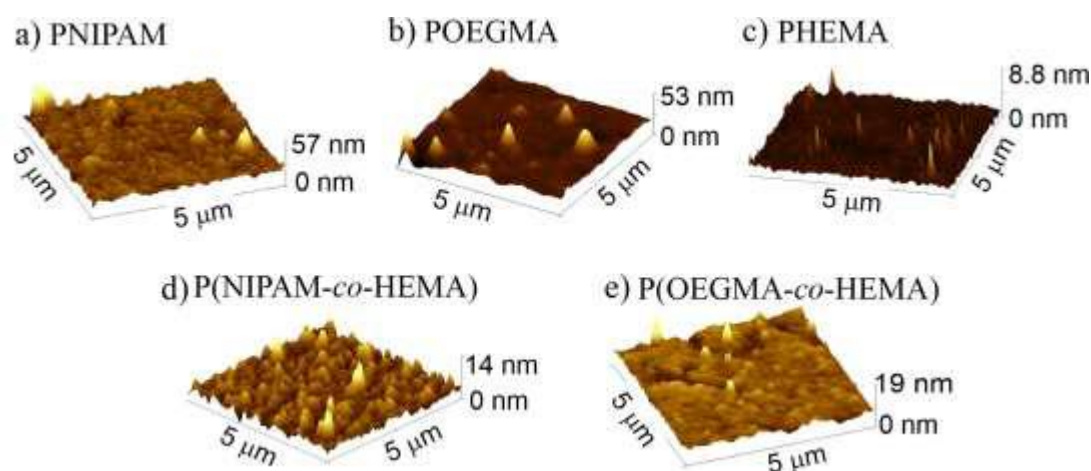


Рис. 3.16. Топографія прищеплених полімерних щіток на основі PNIPAM (а), POEGMA (b), PHEMA (c), P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (d) та P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 (e).

Кількісний аналіз RMS шорсткості цих поверхонь (таблиця 3.6) вказує, що покриття на основі PNIPAM та POEGMA досить шорсткі (приблизно 2,5 нм), а покриття на основі PHEMA відносно гладкі, зі значенням RMS менше половини нанометра, тоді як їхні кополімери мають проміжну шорсткість приблизно 1–1,5 нм. Середню товщину покриттів у сухому стані визначали за допомогою еліпсометрії за кімнатної температури. Результати цих вимірів наведено у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7.

Значення RMS шорсткості та середніх товщин прищеплених полімерних щіток.

Покриття	RMS шорсткість, нм	Товщина, нм
PNIPAM	$2,58 \pm 0,10$	$42,2 \pm 2,3$
POEGMA	$2,73 \pm 0,11$	$46,2 \pm 1,9$
PHEMA	$0,48 \pm 0,02$	$44,2 \pm 2,0$
P(NIPAM-co-HEMA)	$1,45 \pm 0,05$	$43,9 \pm 2,5$
P(OEGMA-co-HEMA)	$1,09 \pm 0,04$	$45,8 \pm 1,7$

Для перевірки термочутливості покриттів вивчали їхню змочуваність за допомогою вимірювань контактного кута змочування (СА) в залежності від температури (рис. 3.17).

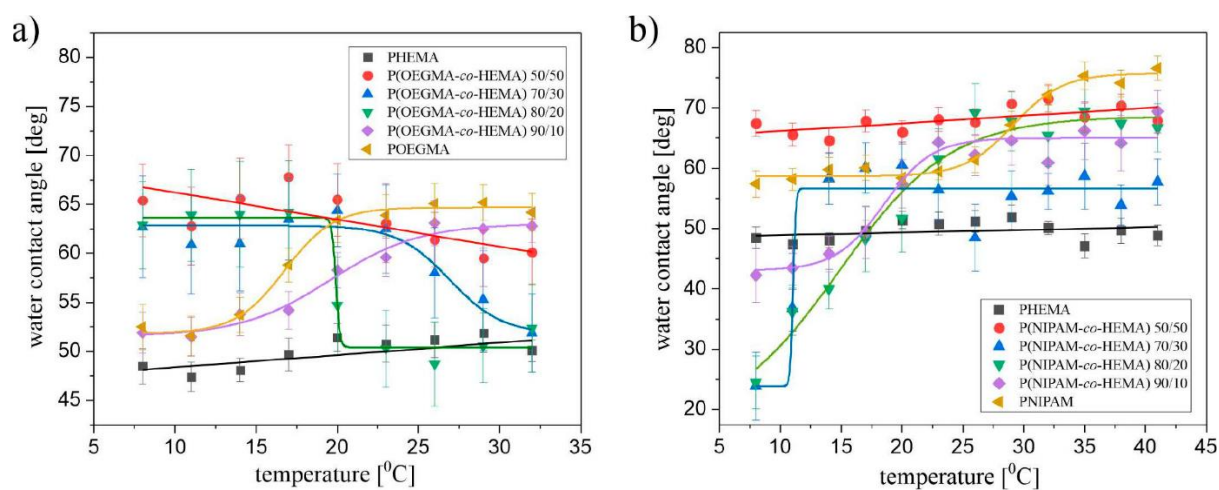


Рис. 3.17. Графіки залежності контактних кутів змочування водою від температури для полімерних щіток на основі POEGMA, P(OEGMA-co-HEMA) та PHEMA (a) та PNIPAM, P(NIPAM-co-HEMA) та PHEMA (b).

Отримані результати показують, що обидва покриття на основі PNIPAM і POEGMA (зображені як помаранчеві трикутники на рисунку 3.17a та 3.17b, відповідно) піддаються температурно-чутливому переходу змочуваності. Для обох наночарів зміна змочуваності зумовлена LCST переходом за 29 °C і 17 °C для PNIPAM і POEGMA, відповідно. Навпаки, покриття на основі PHEMA не проявляють жодного переходу змочуваності, зберігаючи значення контактного кута змочування приблизно на рівні 50° у всьому вимірюваному температурному діапазоні.

Аналіз результатів вказує на те, що кополімеризація OEGMA з HEMA призводить до створення покриттів, чутливих до температурного впливу, причому ця чутливість значно залежить від їхнього складу. Для кополімерних щіток на основі P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 відповідь змочуваності на зміну температури дуже слабка і перехід непомітний, тоді як для полімерних щіток з меншою кількістю HEMA він чітко виражений. Однак механізми переходу відрізняються значно. Для наночарів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10, з

дуже низьким вмістом НЕМА, спостерігається перехід LCST зі зсувом температури переходу на 19,6 °C порівняно з РОЕГМА. Навпаки, для кополімерів з вищою кількістю НЕМА, а саме покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 80/20 і 70/30, відбувається чітко виражений перехід UCST. Щоб пояснити відмінності у відповіді змочуваності на зміни температури, слід розглядати взаємодії між РОЕГМА, РНЕМА та молекулами води. Для РОЕГМА водневі зв'язки між етерними фрагментами ОЕГМА і атомами водню води утворюються нижче LCST і руйнуються вище LCST. При високому вмісті НЕМА у кополімері (більше 50%) кополімерні шітки, так само як і РНЕМА, стають розчинними у всьому температурному діапазоні. Для зразків на основі P(OEGMA-co-HEMA) 80/20 і 70/30, які виявляють UCST, спостерігається конкурентне формування водневих зв'язків між етерними фрагментами ОЕГМА та гідроксильними групами НЕМА, що блокує взаємодію з молекулами води. Вище UCST ці водневі зв'язки руйнуються, і відновлюється взаємодія гідроксильних груп НЕМА з молекулами води. Тим часом фрагменти ОЕГМА залишаються відносно ізольованими і, отже, не можуть взаємодіяти один з одним, що призводить до втрати LCST властивостей. Також температура переходу залежить від складу покриття і зменшується зі зменшенням кількості НЕМА. Ці результати узгоджуються з літературними даними, де повідомляється про можливість налаштування температури переходу P(OEGMA-co-HEMA) в широкому діапазоні за допомогою простої зміни вмісту РНЕМА.

Також для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) температурна відповідь залежить від складу. Для наночарів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 жодного температурного переходу не спостерігається, а кут контакту з водою, виміряний для цього покриття, дорівнює 68°. Однак для покриттів з меншою кількістю НЕМА видно LCST перехід.

Крім того, зміни в складі покриття також призводять до модифікації температурного переходу (рис. 3.18). Для покриттів на основі P(OEGMA-co-

HEMA) розрахована температура переходу зменшується зі зменшенням кількості HEMA, незалежно від механізму переходу.

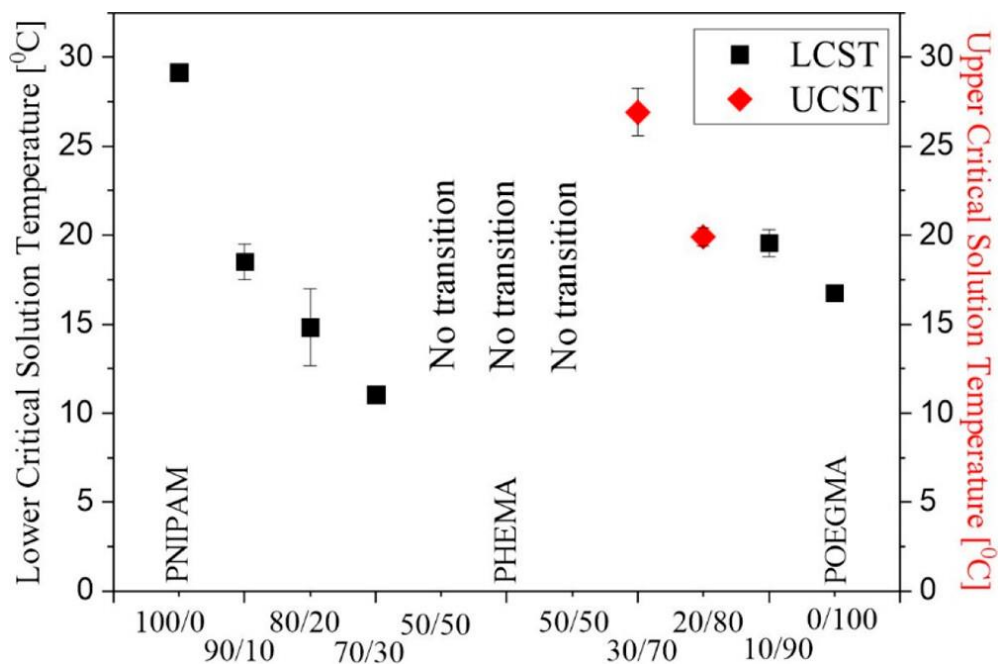


Рис. 3.18. Температури переходу для описаних видів полімерних щіток.

І навпаки, для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) спостерігається протилежний ефект, і температура переходу збільшується зі зменшенням вмісту HEMA. Такий ефект пов'язаний зі збільшенням гідрофобності покриттів.

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ТЕМПЕРАТУРО-ЧУТЛИВИХ ПРИЩЕПЛЕНИХ ПОЛІМЕРНИХ ЩІТОК ТА ЇХНЬОГО ВПЛИВУ НА МОРФОЛОГІЮ ТА ПОВЕДІНКУ ФІБРОБЛАСТІВ

Біосумісність та вплив природи і властивостей полімерних щіток на культивування та поведінку клітин мають вирішальне значення у потенційному використанні таких покриттів у біомедицині і тканинній інженерії. Ключову роль відіграє не лише відсутність токсичності покриттів, але й можливість маніпулювати морфологією та процесом адгезії/відшаровування клітин або цілих клітинних шарів. У цьому розділі представлені результати висіювання дермальних фібробластів на температуро-чутливих прищеплених (ко)полімерних щітках та проведення біологічних тестів, характеристика їхньої відповіді на зменшення температури поверхні покриттів як одного з методів неінвазивного впливу на морфологію та відшаровування фібробластів.

4.1. Дослідження цитотоксичності прищеплених (ко)полімерних щіток

Для оцінки можливої цитотоксичності одержаних наночарів ми культивували на них фібробласти людини. Щоб виключити вплив специфічної поведінки термочутливих покриттів при різних температурах, ми використовували лише покриття, де температуро-чутливий перехід не спостерігався.

На рисунку 4.1 представлені репрезентативні флуоресцентні мікрофотографії фібробластів людини, висіяні на склі та полімерних щітках на основі PNIPAM, POEGMA, PHEMA, P(NIPAM-co-PHEMA) 50/50, P(OEGMA-co-PHEMA) 50/50 після 24, 72 та 168 годин культивування.

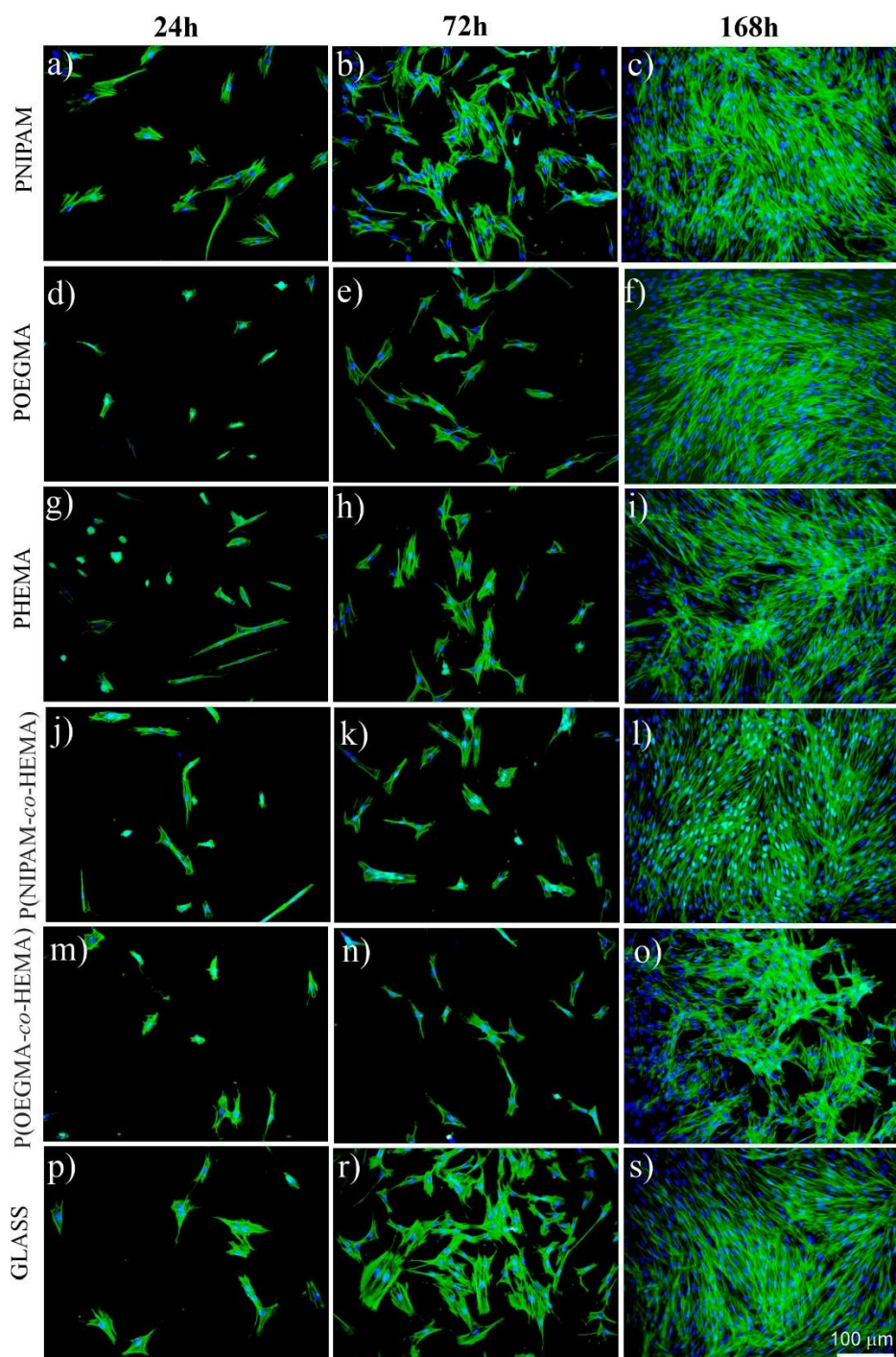


Рис. 4.1. Репрезентативні флуоресцентні мікрофотографії фіброblastів людини, висіяні на склі (р, г, s) та полімерних щітках на основі PNIPAM (а, b, с), P(PEGMA) (d, e, f), P(HEMA) (g, h, i), P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (j, k, l), P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 (m, n, o) після 24, 72 та 168 годин культивування.

Після 24 годин культивування видно поодинокі і добре розпластані фіброblastи на склі (рис. 4.1р). Після 72 годин кількість фіброblastів та їхня площа контакту з поверхнею значно зростає, що свідчить про хороші умови

культивування (рис. 4.1r). Після 168 годин інкубації кількість фібробластів помітно збільшується і утворює конфлюентний моношар (рис. 4.1s). Схожу поведінку клітин можна спостерігати на покриттях на основі PNIPAM (рис. 4.1 a–c), але тут площа контакту фібробластів та полімерних щіток дещо менша.

Навпаки, для фібробластів, вирощених на покриттях на основі POEGMA (рис. 4.1d–f) після 24 годин кількість клітин несуттєво менша, ніж для PNIPAM, а площа контакту значно менша. Проте ситуація змінюється протягом тривалішого інкубаційного періоду, і після 72 годин морфологія фібробластів стає подібна до тої, що характерна для покриттів на основі PNIPAM, але їхня площа контакту залишається меншою. Така зміна може бути пов'язана з тим, що протягом довшого часу клітини розвивають позаклітинний матрикс, збільшуючи тим самим їхню здатність до адгезії. Після 168 годин культивування утворюється конфлюентний шар клітин. У випадку покриттів на основі PHEMA (рис. 4.1g–i) кількість клітин після 24 годин приблизно така ж, як для покриттів на основі POEGMA, однак деякі з них утворюють круглі форми, що може свідчити про неоптимальні умови культивування. Схожі результати були описані в інших дослідженнях [138-139], де повідомляли про змінену форму клітин та утворення агрегатів меланомних клітин під час їхнього культивування на покриттях на основі PHEMA. Після 168 годин утворений шар фібробластів не є конфлюентним, а клітини мають тенденцію утворювати агрегати. Морфологія фібробластів, вирощених на кополімерних щітках на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (рис. 4.1j–l), нагадує ту, що була визначена для PNIPAM; однак тут як кількість клітин, так і їхня розпластована область дещо менші. Навпаки, після 24 і 72 годин культивування на полімерній щітці P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 кількість фібробластів значно менша, ніж на інших покриттях, і їхня розпластована область дуже мала (рис. 4.1m-n), що свідчить про негативний вплив цього матеріалу на ріст клітин. Опісля 168 годин культивування клітини утворюють агрегати, що ростуть один на одному (рис. 4.1o), замість того, щоб прилипати до полімерного субстрату, і цей ефект значно сильніший, ніж для чистого покриття PHEMA. Схожий розподіл

фіброblastів було описано для клітин, вирощених в несприятливому середовищі, де взаємодія клітин з клітинами переважає над взаємодією клітин з полімерною щіткою [140].

Флуоресцентні мікрофотографії були проаналізовані для визначення кількості клітин на одиницю поверхні для кожного покриття (рис. 4.2a).

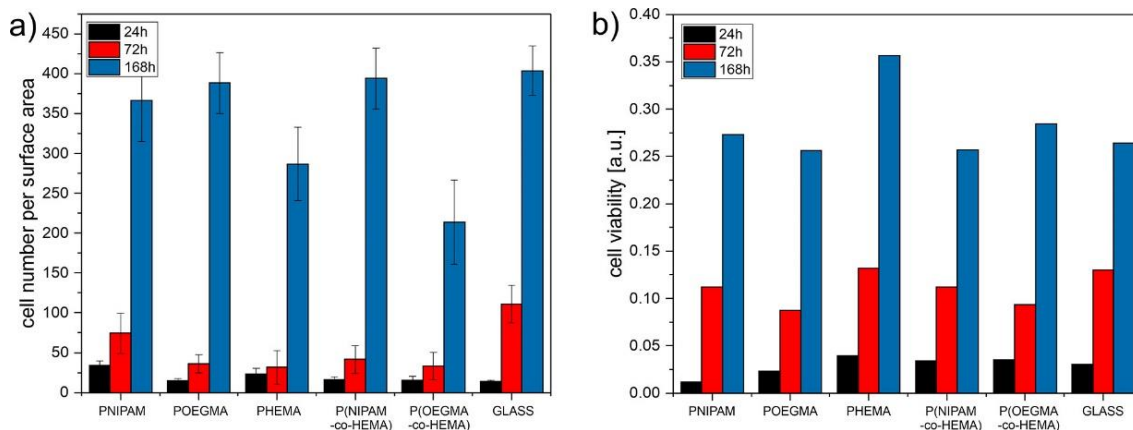


Рис. 4.2. Кількість (a) та життєздатність (b) фіброblastів людини, висіяних на склі та полімерних щітках на основі PNIPAM, POEGMA, PHEMA, P(NIPAM-co-HEMA) 50/50, P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 після 24, 72 та 168 годин культивування.

Отримані результати підтверджують наші попередні спостереження. Після 24 годин культивування кількість клітин найвища для полімерних щіток на основі PNIPAM і помітно менша для всіх інших покриттів, і ця тенденція залишається практично такою ж і для 72 годин. Для найбільшого періоду інкубації кількість клітин є найбільшою для скла та полімерних щіток на основі PNIPAM, POEGMA, P(NIPAM-co-HEMA) 50/50, де утворювався конфлюентний шар. З іншого боку, кількість клітин є найменшою для наночарів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 50/50, для яких утворення агрегатів є найбільш характерним. Проте слід зауважити, що результати кількісного аналізу для клітин, які ростуть одна на одній, можуть бути неточні через накладання клітин, і визначені значення можуть бути занижені.

Також було проведено аналіз життєздатності фіброblastів за допомогою МТТ-калориметричного методу оцінки кількості живих клітин за активністю

мітохондріальних дегідрогеназ клітин (рис. 4.2b). Отримані результати показують, що після 24 годин культивування життєздатність клітин найвища для покриттів на основі PHEMA і найнижча для PNIPAM. Після 72 годин культивування життєздатність клітин є подібною для всіх покриттів. Схожі результати спостерігаються і для 168 годин культивування, за винятком наношарів на основі PHEMA, де життєздатність фібробластів людини значно вища, ніж для інших. Крім того, життєздатність клітин, які культивувалися на покриттях на основі P(OEGMA-co-HEMA) 50/50, не є найменшою порівняно з іншими. Ці результати свідчать про те, що морфологія та площа контакту фібробластів не корелюють з їхньою життєздатністю; отже, цитотоксичний ефект покриттів на основі PHEMA та P(OEGMA-co-HEMA) 50/50, не підтверджується результатами МТТ методу.

Додатково було проведено флуоресцентне фарбування живих (зелені) та мертвих (червоні) клітин для вивчення цитотоксичності виготовлених покриттів (рис. 4.3).

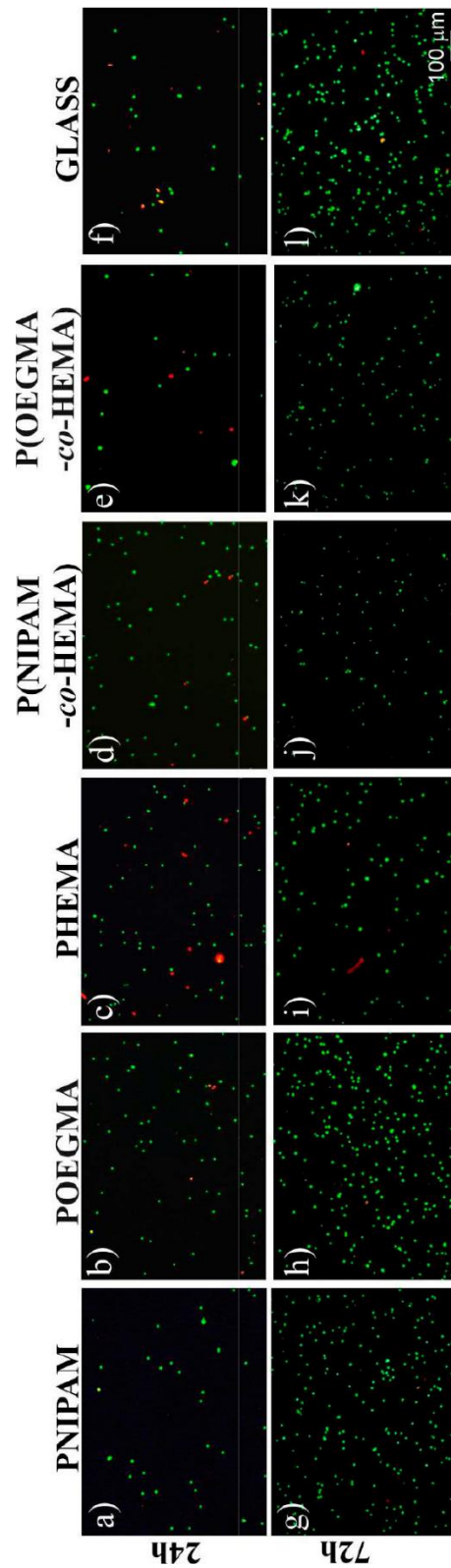


Рис. 4.3. Зображення живих (зелена флуоресценція) та мертвих (червона флуоресценція) клітин фібробластів людини, висіяних на склі та полімерних щітках на основі PNIPAM, P(OEGMA), PHEMA, P(NIPAM-co-HEMA) 50/50, P(OEGMA-co-HEMA) 50/50 після 24 та 72 годин культивування.

Отримані флуоресцентні мікрофотографії показують, що після 24 годин культивування більшість клітин є живими; проте мертві клітини також спостерігаються і їхня кількість залежить від типу покриття. Кількість мертвих клітин найвища для наночарів на основі PHEMA (рис. 4.3с), середня для POEGMA (рис. 4.3b) та P(OEGMA-co-HEMA)50/50 (рис. 4.3e), найнижча для PNIPAM (рис. 4.3a) та P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (рис. 4.3d). З іншого боку, після 72 годин культивування на всіх покриттях видно практично лише живі клітини. Ці результати свідчать про те, що жодне з покриттів не є цитотоксичним для фібробластів людини, і наявність мертвих клітин для найкоротшого часу культивування може бути скоріше пов'язана з проблемою адгезії клітин, ніж з цитотоксичністю покриттів. Оскільки адгезія клітин в основному визначається змочуваністю поверхні, була побудована залежність життєздатності клітин після 24 і 72 годин культивування відносно контактного кута змочування, виміряного для кожного покриття при 37 °C (рис. 4.4a).

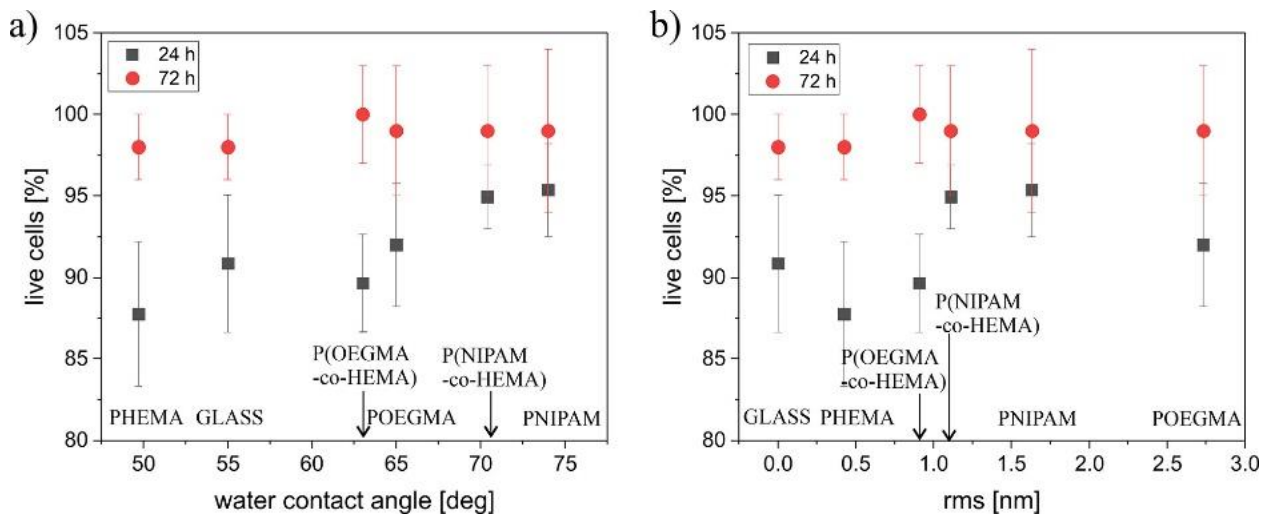


Рис. 4.4. Залежність життєздатності фібробластів від змочуваності (a) та RMS шорсткості (b) полімерних щіток, використаних для культивування клітин після 24 та 72 годин інкубування.

Отримані результати свідчать про тісну кореляцію між життєздатністю клітин на даній полімерній щітці та її змочуваністю протягом меншого часу культивування (рисунок 4.4a). Чим гідрофобніше покриття, тим більше живих клітин спостерігається на ньому. Дермальні фібробласти належать до клітин,

які прилипають, що означає, що вони ростуть і розмножуються лише тоді, коли прилипли до полімерної основи. Таким чином, це спостереження підтверджує гіпотезу, що відмінності у життєздатності клітин, спостережувані для різних покриттів, можуть корелювати з різними адгезивними потенціалами одержаних полімерних щіток. Однак слід враховувати, що зміни в змочуваності також пов'язані з хімічним складом полімерної щітки та наявністю різних функціональних груп, що також може впливати на клітинну адгезію до покриттів. З іншого боку, після 72 годин культивування більше 98% клітин є живими, і не спостерігається відмінностей для клітин, що ростуть на різних покриттях. Цей ефект може бути пов'язаний з тим, що протягом більш тривалого часу клітини зазвичай розвивають позаклітинну матрицю, тим самим збільшуючи їхню здатність до прилипання.

Однак і інші властивості поверхні також можуть впливати на поведінку клітин, що розглядається в багатьох роботах. Це показує велику різноманітність клітинних відповідей в залежності від конкретного топографічного малюнка. Помічено, що окрім прямого впливу на поведінку клітин в цілому також слід враховувати вплив топографії поверхонь на підклітинні механізми та адсорбцію білків позаклітинної матриці. У загальному, збільшення шорсткості поверхні матеріалів може поліпшити адгезію клітин, однак вплив топографії залежить від типу клітини. Більшість досліджень стосується впливу нанотопографій розміром більше 10 нм, але також проводилися дослідження для менших структур. Для вивчення цього питання аналізували життєздатність клітин як функцію шорсткості щітки від 0,4 до 3 нм (рисунок 4.4b). Отримані результати показують, що для коротких часів культивування, клітини, культивовані на підложках зі значеннями RMS менше 1 нм, тобто на склі, РНЕСМА та Р(ОЕГМА-со-НЕСМА), проявляють меншу життєздатність порівняно з більш шорсткими покриттями. Проте для більших часів інкубації, тобто 72 годин, не спостерігається кореляції між RMS покриттям і життєздатністю клітин. Оскільки збільшення шорсткості матеріалу поліпшує адгезію клітин, представлений аналіз вказує на те, що для

коротких часів інкубації життєздатність клітин пов'язана з їхньою здатністю прилипати до досліджуваних полімерних щіток, що підсилює висновки, запропоновані для впливу змочуваності на життєздатність клітин (рисунок 4.4а). Прилипання клітин координується багатьма білками, які відповідають за взаємодію клітина-матриця, так звану «фокальну адгезію». Одним із найкраще охарактеризованих є вінкулін - цитоплазматичний білок. Таким чином, для перевірки гіпотези, що відмінності у життєздатності клітин можуть бути пов'язані з різними адгезивними потенціалами виготовлених полімерних щіток, формування фокальних адгезій на ранніх етапах адгезії було досліджено за допомогою фарбування субстратів вінкуліном (рис. 4.5).

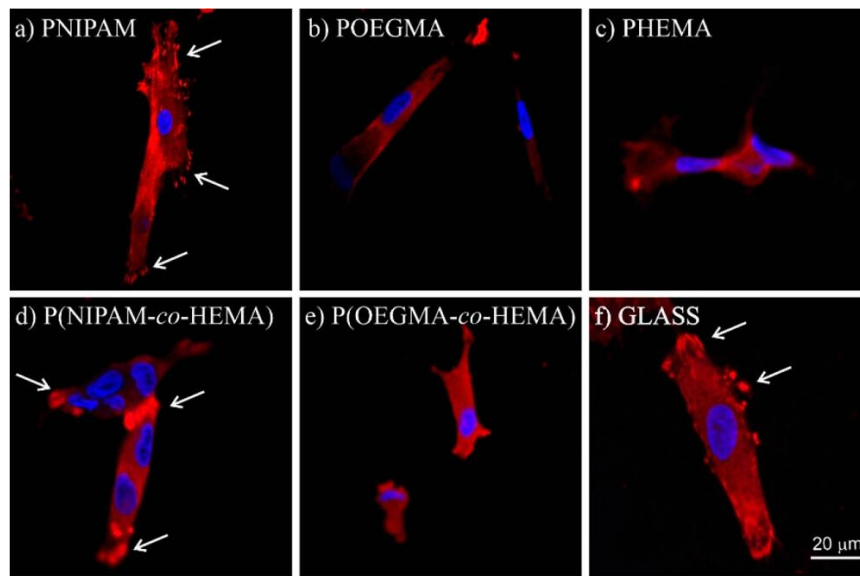


Рис. 4.5. Фокальні адгезії, сформовані на виготовлених полімерних щітках і відстежені фарбуванням вінкуліном (червоний).

Отримані флуоресцентні мікрофотографії, що представляють вінкулін (червоний) та ядра (сині), показують, що після 24 годин культивування фокальні адгезії добре розвиваються лише для фібробластів, культивованих на щітках PNIPAM та P(NIPAM-co-HEMA), в той час як їх не можна помітити на інших полімерних покриттях. Ці результати дозволяють пов'язати життєздатність клітин, культивованих на полімерних щітках, з їхнім адгезивним потенціалом, оскільки найбільша кількість живих клітин була

помічена на покриттях з PNIPAM та P(NIPAM-co-HEMA), де формування фокальних адгезій є найефективнішим. З іншого боку, для чистої поверхні скла слід розглядати інші фактори, такі як еластичність чи хімічний склад, для пояснення зменшеної життєздатності клітин, незважаючи на хороші адгезивні властивості.

4.2. Дослідження впливу температури на морфологію, адгезію та відшаровування фібробластів, висіяних на температуро-чутливих прищеплених кополімерних щітках

Добре відомо, що зміни у властивостях поверхні та, як результат, у морфології клітин, що адгезовані до поверхні, визначають їхню подальшу долю. Для вивчення цього явища температура наших покриттів знижувалася до 10 °C, тобто нижче температури переходу, і клітини візуалізувалися *in situ* за допомогою оптичного мікроскопу. Відповідь та поведінка клітин на зниження температури протягом 20, 40 і 80 хв (рис. 4.6) сильно залежала від виду полімерного наношару, використаного для клітинного культивування.

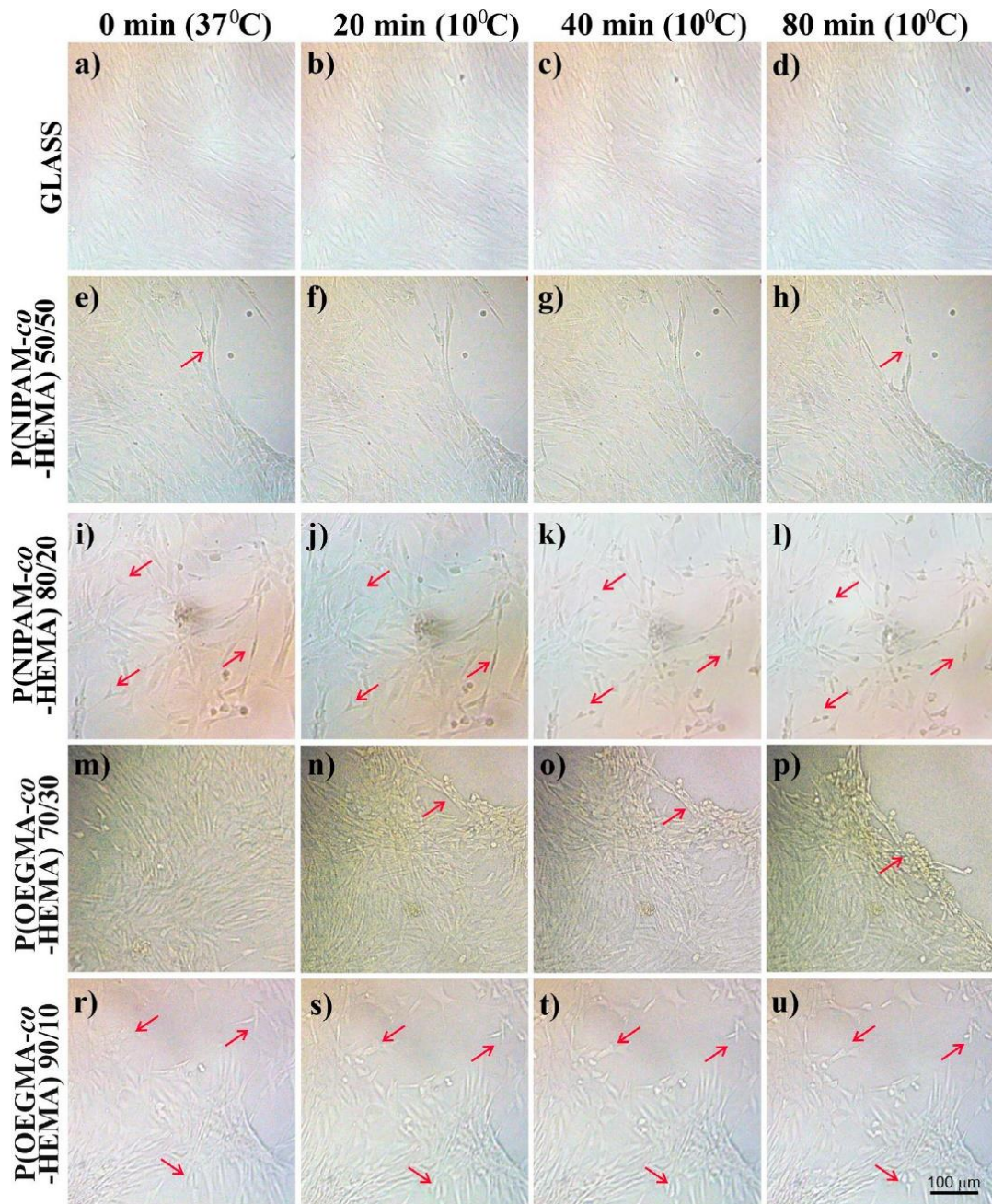


Рис. 4.6. Оптичні зображення фіброblastів, висіяних на склі (a–d), P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (e–h), P(NIPAM-co-HEMA) 80/20 (i–l), P(OEGMA-co-HEMA) 70/30 (m–p), і P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 (r–u) після 0 (a, e, i, m, r), 20 (b, f, j, n, s), 40 (c, g, k, o, t), and 80 (d, h, l, p, u) хвилин інкубації при 10 °C.

Для скла (рис. 4.6a–d) не спостерігалось жодного впливу охолодження ні на кількість клітин, ні на їхню морфологію. Так само для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 (рис. 4.6e–h), що не мають температуро-чутливого переходу, шар клітин практично не змінився навіть під час найтривалішого

охолодження. Для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 80/20 (рис. 4.6i–l), які мають перехід LCST при температурі приблизно 14 °C, спостерігався слабкий вплив зниження температури: клітини значно змінювали свою морфологію з витягнутих, сплюснених структур у круглі, особливо зі збільшенням часу охолодження що свідчить про зменшення адгезії між клітинами і наночастиною. Ймовірно, цей ефект може призвести до відокремлення клітин при більш тривалому часі інкубації. Ці результати узгоджуються з літературними даними, які повідомляють про дуже повільне відокремлення клітинних шарів з поверхонь на основі PNIPAM (~75 хв), що відбувається поступово від периферії аркуша до його внутрішньої частини [141]. Схожа ситуація спостерігається для покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 (рис. 4.6r–u), які мають LCST перехід при температурі 20 °C, де відповідь клітин стає більш помітною. Фібробласти змінюють свою морфологію та починають відшаровуватися від поверхні вже через 20 хвилин після початку охолодження. Проте, відшаровування клітин найвиразніше для покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 70/30 (рис. 4.6 m–p), для яких фіксувався UCST перехід з температурою переходу приблизно 27 °C. Вже через 20 хвилин інкубації при зниженій температурі відбувається відшаровування значної частини клітинного шару, і цей процес продовжується зі збільшенням часу охолодження, що призводить до повного відокремлення приблизно половини спостереженого клітинного шару після 80 хв (рис. 4.6r). Відшаровування клітин було описане також для кополімерів на основі полі(N-акрилогліцинамід-ко-N-фенілаакриламід), що мали UCST перехід, і використовувались для культивування NIH-3T3 клітинної лінії [142]. Клітини відшаровувалися за температури, вище UCST переходу. У випадку покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 70/30 спостерігався протилежний ефект, і клітини інкубувалися при 37 °C (вище за поріг UCST) і відшаровувалися після зниження температури до 10 °C. Адгезія клітин сильно залежить від змочуваності поверхні, однак ця залежність не лінійна для всіх типів клітин. Таким чином, відшаровування клітин від наночастинок на основі P(OEGMA-co-

HEMA) 70/30 може бути пов'язано із зміною в змочуваності поверхні, що призводить до швидкого погіршення умов культивування клітин.

Для кількісного аналізу впливу охолодження на клітини, культивовані на різних кополімерних щітках, було розраховано частку клітин, які змінили морфологію внаслідок зниження температури (рис. 4.7).

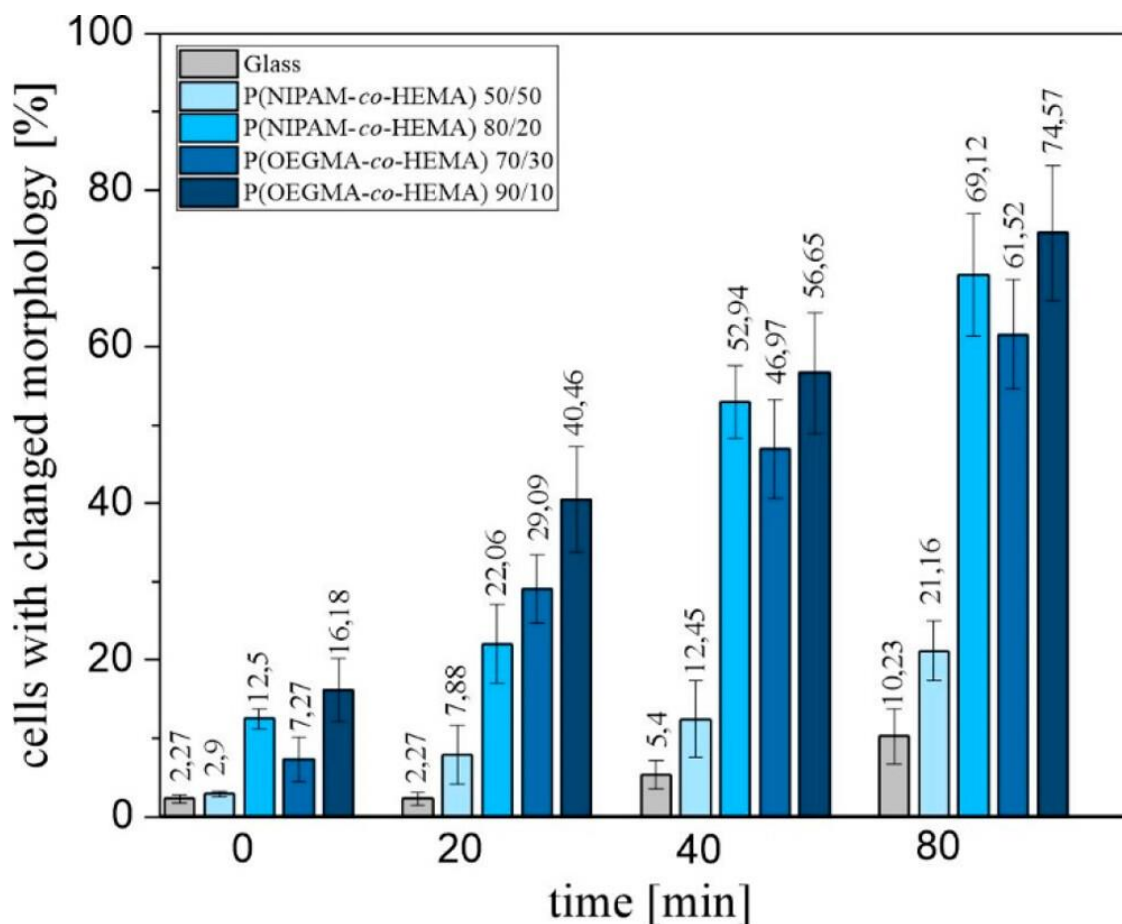


Рис. 4.7. Частка клітин, які мають змінену морфологію внаслідок зниження температури, для скла та покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50, P(NIPAM-co-HEMA) 80/20, P(OEGMA-co-HEMA) 70/30, and P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 після 0, 20, 40, і 80 хвилин інкубації за 10 °С.

Перед зниженням температури було розраховано кількість клітин із зміненою морфологією внаслідок властивостей кополімерних щіток (рис. 4.7, час 0 хв), показуючи, що для скла і покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50 майже всі клітини сплюснені, тоді як для інших покриттів також видно клітини круглої форми, причому їх частка дорівнює 7% для P(OEGMA-co-

HEMA) 70/30, 12,5% для P(NIPAM-co-HEMA) 80/20 і 16% для P(OEGMA-co-HEMA) 90/10. Збільшення часу інкубації при 10 °C призводить до лінійного зростання кількості модифікованих клітин для всіх покриттів. Цей ефект найслабший для скла, де частка модифікованих клітин не перевищує 10%, навіть для найтривалішого часу інкубації. Так само для покриттів на основі P(NIPAM-co-HEMA) 50/50, які не є термочутливими, кількість клітин із зміненою морфологією є відносно низькою, досягаючи приблизно 20% від загальної кількості клітин після 80 хв охолодження. З іншого боку, для кополімерних щіток, які мають LCST або UCST перехід, вплив зниження температури є значним. Навіть при найкоротшому часі охолодження (20 хв), спостерігається помітна різниця в частці змінених клітин для кожного типу наночастиці, яка становить 20% для P(NIPAM-co-HEMA) 80/20, майже 30% для P(OEGMA-co-HEMA) 70/30 та 40% для P(OEGMA-co-HEMA) 90/10. Зі збільшенням часу охолодження різниця в кількості трансформованих клітин, культивованих на покриттях із LCST переходом, тобто для P(NIPAM-co-HEMA) 80/20 та P(OEGMA-co-HEMA) 90/10, зникає, наближаючись до 55% та 70% для часу інкубації 40 і 80 хв, відповідно. З іншого боку, частка клітин із зміненою морфологією, культивованих на покриттях із UCST переходом, а саме P(OEGMA-co-HEMA) 70/30, трошки менша і дорівнює 47% та 61% після охолодження протягом 40 і 80 хв, відповідно. Зміни у морфології клітин та їхнє відшарування від поверхні температуро-чутливих кополімерних щіток підтверджують можливість їхнього використання для неінвазивного отримання клітинних шарів, викликаного лише зниженням температури.

РОЗДІЛ 5. ФОРМУВАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ДВОШАРОВИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ПРИЩЕПЛЕНИХ ПОЛІМЕРНИХ ПОКРИТТІВ

Після того, як були синтезовані та охарактеризовані «розумні» кополімерні щітки на основі чотирьох різних мономерів, описані залежності температурної відповіді щіток від їхнього хімічного складу, а також підтверджено нецитотоксичний ефект першого наночару, наступним кроком була модифікація поверхні біологічно активним другим наночаром для вирощування клітин. Для цього використовувалися молекули багатофункціональних спиртів та амінів на основі PEG, які зшивалися між собою, утворюючи полімерну матрицю зі структурою поверхневих наногелів, та прищеплювалися з використанням дивінілсульфону до першого наночару, що містив поверхневі гідроксильні групи.

Гідрогелі - це тривимірні, зшиті полімерні матеріали, біологічно схожі на тканинні структури людини. Вони можуть поглинати та утримувати велику кількість води/біологічних рідин у набряклому стані. Протягом двох останніх десятиліть відзначався значний прогрес у розробці та застосуванні матеріалів на основі гідрогелів у різних високотехнологічних сферах [143–146]. Гідрогелі формуються з гідрофільних полімерів шляхом зшивання полімерних ланцюгів між собою, а вода/біологічні рідини проникають та утримуються в них завдяки осмотичним силам, водневим та донорно-акцепторним зв'язкам, спричиняючи набряканню гелю [147]. Рівноважний стан набряклого гідрогелю залежить від багатьох факторів, що визначають його властивості, такі як внутрішньо транспортні та дифузійні характеристики, механічна міцність тощо [148].

Було успішно продемонстровано, що на стадії синтезу та зшивання гідрогелів можна успішно контролювати та налаштовувати їхній склад, модуль пружності, ступінь набрякання, поверхневу морфологію, чутливість до зовнішніх чинників, біосумісність та можливість транспортування різних молекул всередині гідрогелів. Завдяки цим особливостям гідрогелі слід

розглядати як перспективні матеріали для використання у тканинній інженерії [149-154].

Термін "гідрогель" був вперше згаданий у 1894 році Ван Беммеленом [155] у роботі з колоїдним кремнієм, а синтез гідрогелю на основі РНЕСМА вперше було здійснено компанією DuPont у 1936 році [156]. У кінці 1960-х років застосування гідрогелів на основі РНЕСМА в якості контактних лінз було продемонстровано Віхтерле та Лімом [157]. Гідрогелі можуть бути класифіковані за різними параметрами: за джерелом походження, способом синтезу та сшивання, йонною зарядженістю, чутливістю до зовнішніх чинників та застосуваннями (рис. 5.1) [158].

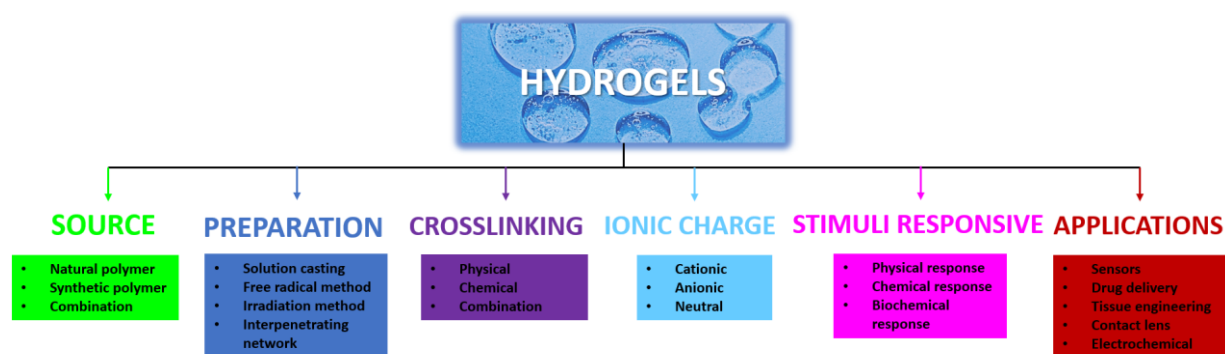


Рис. 5.1. Класифікація гідрогелів за різними параметрами.

Крім того, за фізичним станом гідрогелі класифікуються як тверді, напівтверді та рідкі гідрогелі. Тверді гідрогелі широко визнані і використовуються у біомедицині як контактні лінзи, штучні нерви, в сільському господарстві як гуміфікатори ґрунту, що транспортують поживні речовини, а також як фільтри для очищення води. Напівтверді гідрогелі більш популярні завдяки своїй сильній адгезивній природі, тому їх називають біоадгезивними гідрогелями. Ці гідрогелі є більш привабливими для біомедичних цілей. Рідкі гідрогелі визнані завдяки таким властивостями, як нецитоксичність, гідрофільність. У рідкі гідрогелі, що імплантуються у людський організм, можуть бути вбудовані клітини, які потім вивільнюються і потрапляють до цільового місця в організмі. Завдяки цьому, вони широко використовуються у регенеративній медицині. Окрім наведених застосувань,

в останні роки зріс інтерес до електропровідних гідрогелів, які виготовляються за допомогою поєднання провідних матеріалів та гідрогелів, і вони є потенційними матеріалами для створення біосенсорів, засобів для зберігання енергії, чуйників вимірювальних приладів, наприклад для визначення вологи, рН середовища, мікрокількостей аміаку і етилового спирту тощо [159].

Ще в 1970-х роках поліетиленгліколь був затверджений Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (США) як безпечна фармацевтична та харчова добавка завдяки його високій безпечності та біосумісності. З того часу PEG широко використовується у медицині та харчовій промисловості. На сьогодні стали популярними і знайшли своє застосування похідні PEG розгалуженої структури, що містять у своєму складі декілька бічних ланцюгів однакової довжини з однаковими функціональними групами на кінцях (рис. 5.2) [160].

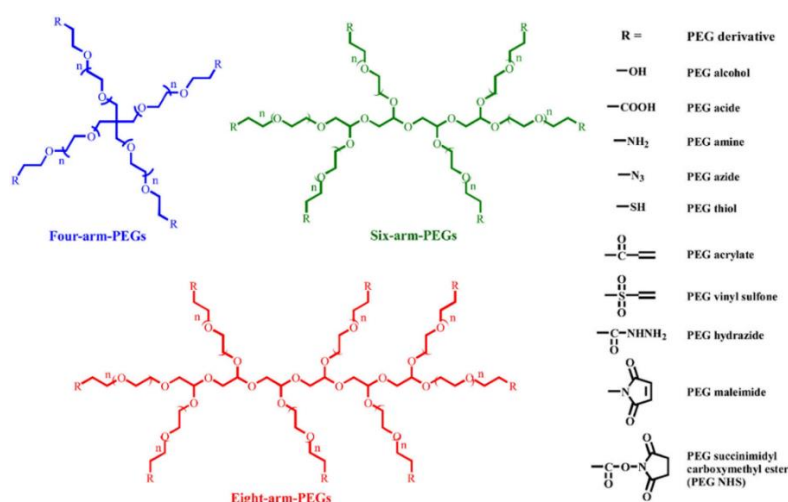


Рис. 5.2. Похідні PEG, що містять у своєму складі декілька бічних ланцюгів [160].

У порівнянні з лінійними PEG, розгалужені мають значну перевагу при формуванні гідрогелів. Так, молекули розгалуженого PEG у певній мірі нагадують гелеподібні структури, і при взаємодії з зшиваючими агентами легко формують біосумісні гідрогелі. Такі гідрогелі отримали значну увагу в регенеративній медицині, тканинній інженерії та інших застосуваннях.

5.1. Процес модифікації «розумних» наночарів прищеплених кополімерних щіток ковалентно прищепленими біологічно активними наночарами, їхнє потенційне застосування

З метою покращення характеристик вже створених та охарактеризованих «розумних» прищеплених кополімерних щіток, а саме, модулю пружності, біосумісності, проникності, ми запропонували новий метод формування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів шляхом модифікації першого наночару, що складається з термочутливих кополімерних щіток на основі P(OEGMA-co-HEMA) з мольною часткою HEMA 10% з реакційноздатними гідроксильними групами. Нагадаю, що мономер OEGMA відповідав за температуро-чутливу поведінку щіток, а HEMA містив вільні гідроксильні групи. Кінцева прищеплена кополімерна щітка виявляла LCST за температури близько 20 °C. Для модифікації в якості гелеутворювачів були обрані: тетрафункціональний розгалужений спирт 4-Arm PEG15K та діамін лінійної будови PEG-3APT (рис. 2.2a та b, відповідно). Зшиваючим агентом виступав дивінілсульфон, який здатний взаємодіяти як з гідроксильними групами прищеплених кополімерних щіток так і з гідроксильними та/або аміногрупами гелеутворювача (рис. 2.3). Вінілові групи дивінілсульфону проявляють електрофільні властивості і можуть брати участь в реакціях нуклеофільного приєднання, включаючи приєднання до амінів та спиртів.

Методика модифікації була описана у Розділі 2, пункт 2.1.4. Синтезований другий прищеплений наночар на основі 4-Arm PEG15K (рис. 5.3a) та на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT (рис. 5.3b) за своєю структурою є гідрогелем.

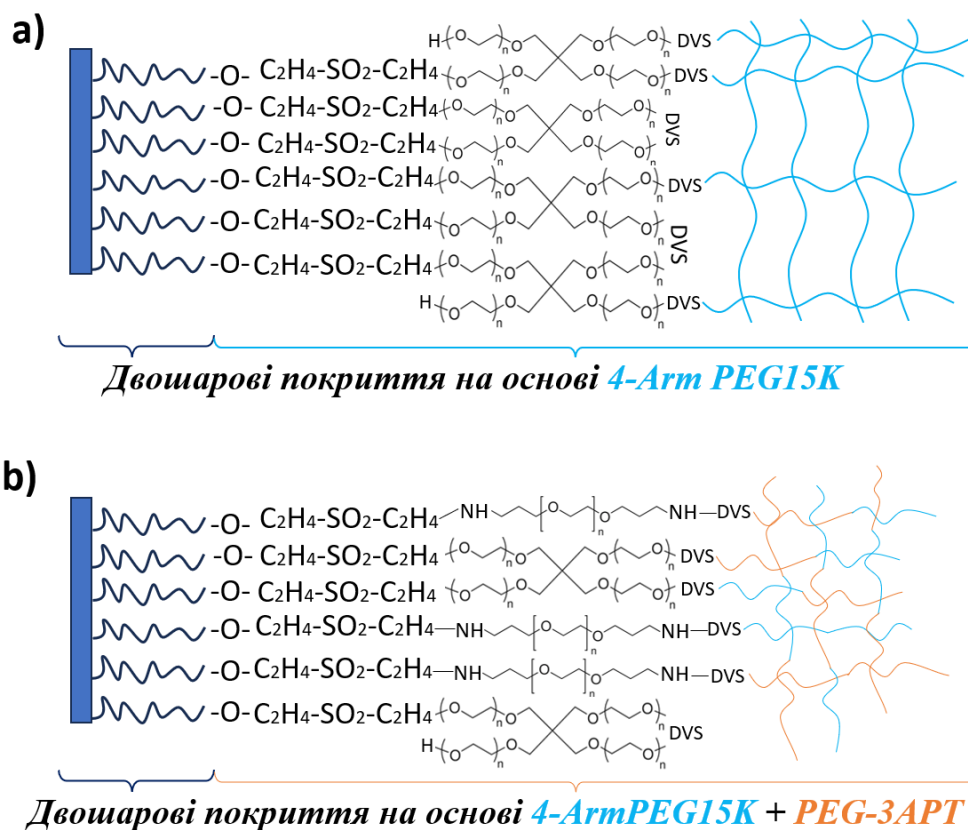


Рис. 5.3. Структури утворених двошарових біологічно активних полімерних покриттів на основі 4-ArmPEG15K (a) та на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT (b).

Основна ідея та потенційне застосування двошарових покриттів були натхненні існуючими полімерними покриттями-субстратами, що використовуються для культивування клітин і одержання тканинно-подібних листів у безкаркасній тканинній інженерії, проте з впровадженням деяких змін. Сформовані двошарові біологічно активні полімерні покриття будуть виявляти температуро-чутливі властивості завдяки першому прищепленому наношару. Після їхнього формування клітини будуть висіюватися і культивуватися на них протягом певного часу (рис. 5.4).

Після інкубації буде утворюватися монолист тканинно-подібної природи з наявним позаклітинним матриксом. Далі зміна температури покриття призведе до конформаційних змін полімерних ланцюгів щіток,

змінюючи їхню змочуваність та шорсткість і дозволяючи монолисту тканинно-подібної природи відшаруватися.

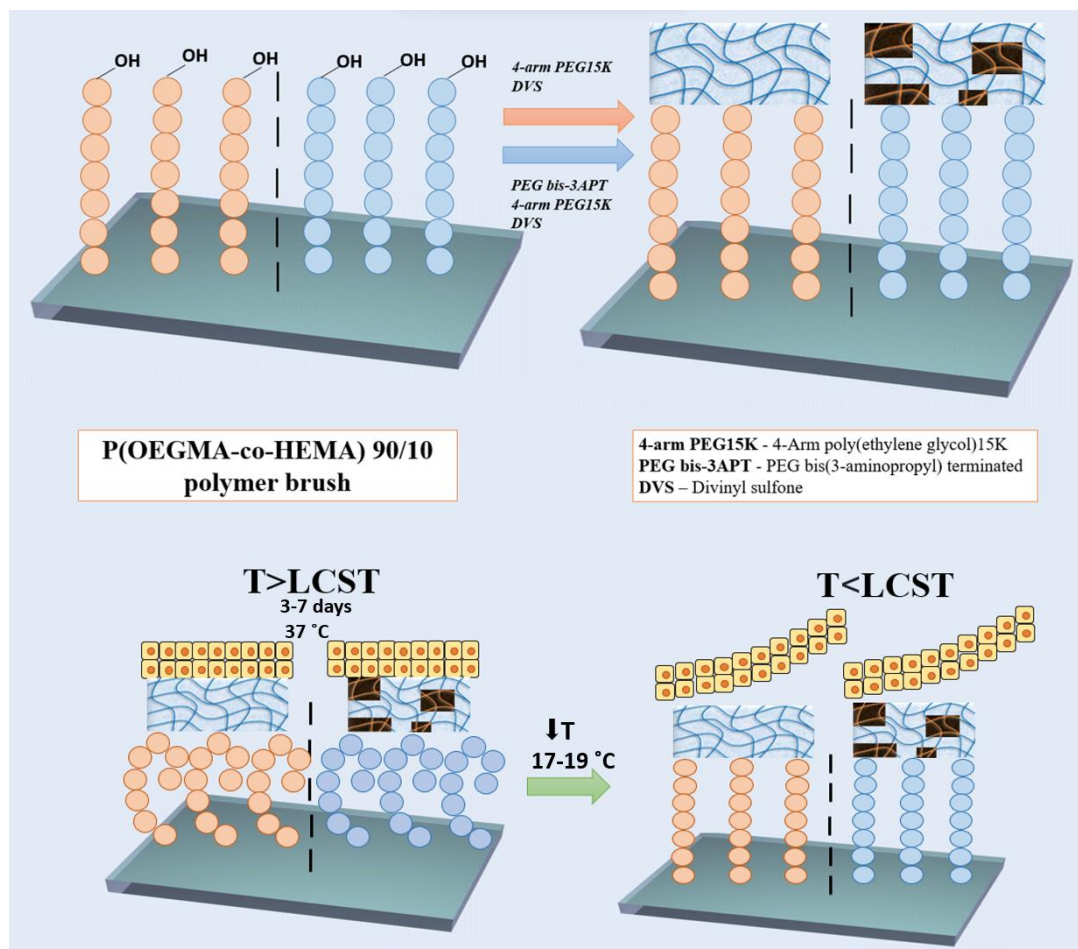


Рис. 5.4. Принцип формування та потенційного застосування двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів для культивування клітин та одержання тканинно-подібних листів.

5.2. Характеризація двошарових біологічно активних прищеплених полімерних покриттів

Формування двошарових покриттів було підтверджено за допомогою раманівської спектроскопії (рис.5.5).

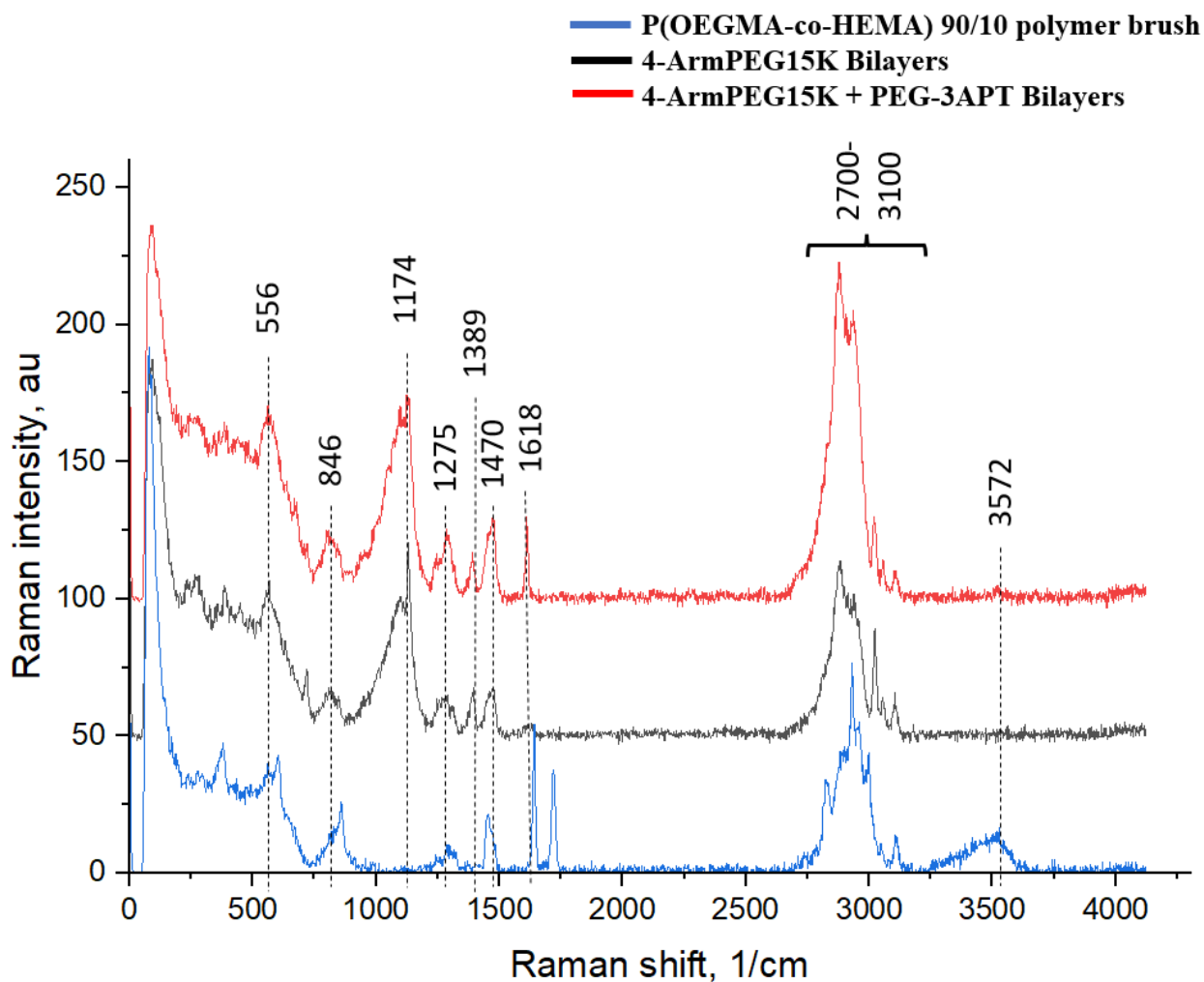


Рис. 5.5. Раман-спектр прищеплених кополімерних щіток на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 (синій колір), двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K (чорний колір) та покриттів на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT (червоний колір).

Симетричні та асиметричні валентні коливання метиленової групи PEG спостерігаються у діапазоні 2700-3100 cm^{-1} [161]. Рамана-зсув при 1470 cm^{-1} зумовлений деформаційними коливаннями групи $\text{CH}_2\text{-CH}_2$. Зсув при 1275 cm^{-1} відповідає крутильним коливанням CH_2 . Коливання ланцюга PEG відбуваються при 846 cm^{-1} . Згинальні коливання C-C-O виникають при 556 cm^{-1} . Характерний зсув при 1618 cm^{-1} відповідає деформаційним коливанням N-H зв'язку для покриттів на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT. Він відсутній у спектрі двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K. Симетричні та

асиметричні валентні коливання SO_2 спостерігаються при 1174 cm^{-1} і 1389 cm^{-1} , відповідно, і є характерними для дивініл сульфону [162]. Валентні коливання ОН групи при 3572 cm^{-1} характерні лише для прищеплених кополімерних щіток на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10, що мають вільні гідроксильні групи.

Головною метою цієї роботи було створення двошарових прищеплених покриттів, що зберігають термочутливі властивості, оскільки без цієї важливої характеристики їхнє використання було б обмежене. Ключову роль у цій задачі відіграють властивості та товщина другого шару на основі наногелю. Вони мають бути так підібрані, щоб не відбувалося блокування конформаційних змін першого прищепленого шару на основі кополімерних щіток, але, при цьому, змінювалися змочуваність та шорсткість двошарових покриттів, вводилися функціональні групи або специфічні сполуки, що в кінцевому рахунку покращували б адгезію та проліферацію клітин. Товщину ми контролювали шляхом проведення процесу модифікації за різного часу, а саме, 10, 20 або 30 хвилин. Властивості другого нанощару гелеподібної структури залежать від хімічної природи і будови полімерів, що зшиваються, зшивачів, їхнього співвідношення. Саме тому, ми обрали один полімер на основі PEG розгалуженої будови, інший – лінійної; один містив гідроксигрупи, інший – аміногрупи.

Температуро-чутливі властивості аналізувалися шляхом вимірювання контактного кута змочування за різних температур, а товщина методом еліпсометрії. Результати температур переходів покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 кополімерних щіток, двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT після 10, 20 або 30 хвилин модифікації, а також різниці верхнього та нижнього кута змочування і товщини представлені у таблиці 5.1. Рисунок 5.6 містить графіки залежностей контактних кутів змочування досліджуваних покриттів від температури у діапазоні від 8 до 32 °C.

Таблиця 5.1.

Значення температур переходу T_c , різниці верхніх і нижніх СА(Δ) та товщини покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 кополімерних щіток, двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K і 4-ArmPEG15K + PEG-3APT після 10, 20 або 30 хвилин модифікації. Товщини вимірювалися за кімнатної температури у повітрі.

Тип покриття	T_c , °C	Δ , °	Товщина, нм
P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 polymer brush	$19,6 \pm 1,1$	11,2	$45,8 \pm 1,5$
4-ArmPEG15K Bilayers 10 min	$15,7 \pm 0,7$	10,6	$50,2 \pm 1,4$
4-ArmPEG15K Bilayers 20 min	$15,3 \pm 0,9$	6,5	$57,8 \pm 1,3$
4-ArmPEG15K Bilayers 30 min	-	-	$64,1 \pm 1,7$
4-ArmPEG15K + PEG-3APT Bilayers 10 min	$16,5 \pm 1,5$	8,4	$51,6 \pm 1,5$
4-ArmPEG15K + PEG-3APT Bilayers 20 min	$15,7 \pm 2,0$	5,6	$56,0 \pm 1,4$
4-ArmPEG15K + PEG-3APT Bilayers 30 min	-	-	$65,2 \pm 1,9$

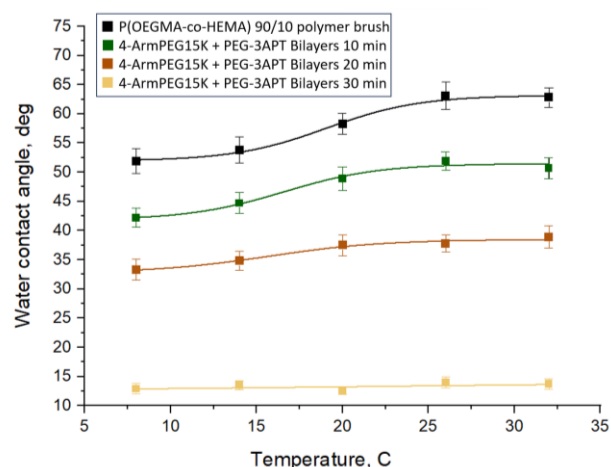
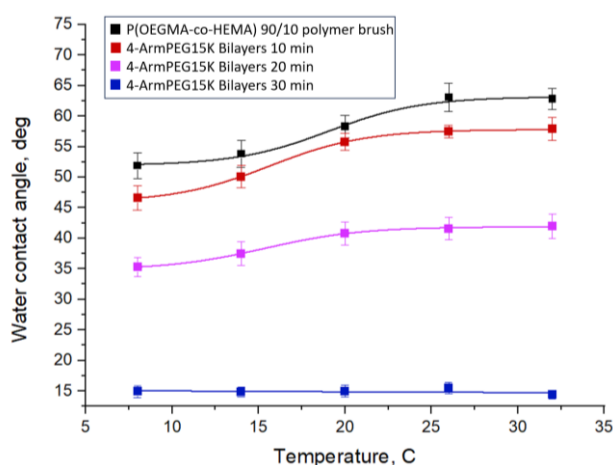


Рис. 5.6. Графіки залежностей контактних кутів змочування покриттів на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 кополімерних щіток, двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K (зліва) та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT (справа) після 10, 20 або 30 хвилин модифікації від температури.

Отже, зі збільшення часу модифікації інтенсивність LCST-подібного переходу для двошарових покриттів спадала, поки не блокувалася повністю для часу модифікації в 30 хвилин. Для двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K 10 min температура переходу зменшувалася до близько 16 °С, а Δ складала 10,6 °. Аналогічно, для двошарових покриттів на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT 10 min температура переходу була близько 16-17 °С, а Δ складала 8,4 °. Для двошарових покриттів з часом модифікації 20 хвилин зміна змочуваності була слабо помітна, а різниця між верхнім та нижнім кутами змочування дорівнювала не більше 6,5 °.

Як видно з результатів товщин двошарових покриттів, найбільш оптимальна товщина другого шару на основі наногелів повинна складати не більше 4-5 нм задля збереження термочутливих властивостей, тобто час модифікації не повинен перевищувати 10 хвилин. Подальші дослідження виконувалися саме для цього типу зразків.

Для клітинних тестів були обрані ракові клітини підшлункової залози (PANC-1) завдяки легкому процесу культивування і швидкому росту. Візуалізувалися клітини за допомогою оптичного мікроскопу після 48 годин інкубування і представлені на рисунку 5.7.

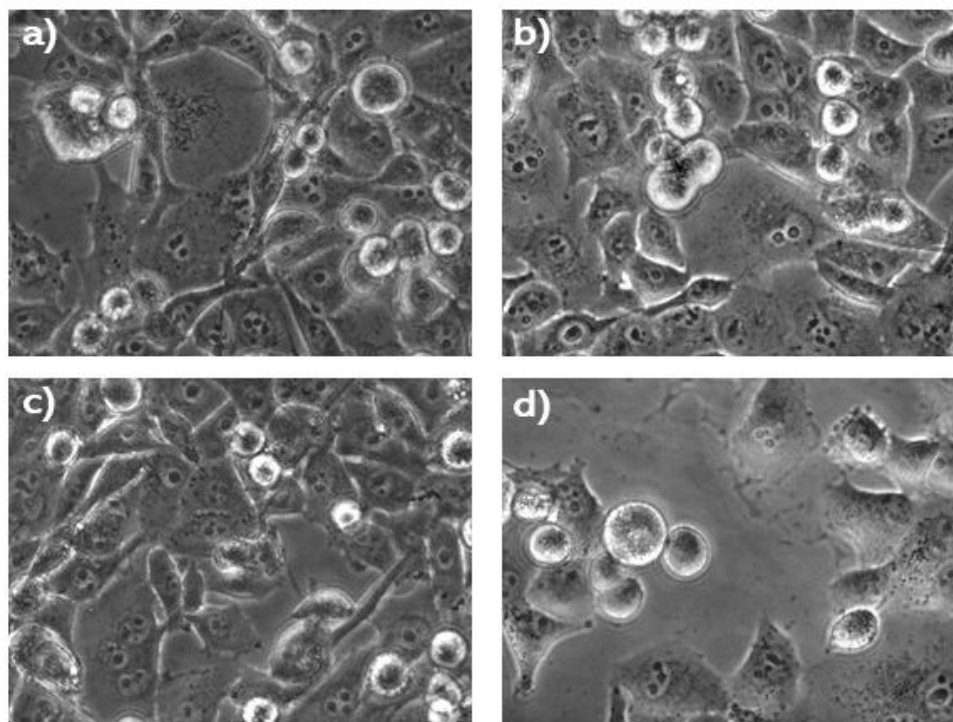


Рис. 5.7. Зображення оптичного мікроскопу ракових клітин на склі (а), прищеплених кополімерних щітках на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10 (b), двошарових покриттях на основі 4-Arm PEG15K (c) та двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT (d) після 48 годин інкубації.

На усіх типах субстратів для культивування можна побачити добре розпластані ракові клітини, що говорить про те, що клітини прикріпилися до покриттів, зберігають свої основні функції та здатні ділитися. Помітно, що кількість клітин є візуально різною: для скла, кополімерних щіток вона подібна, для двошарових покриттів на основі 4-Arm PEG15K більша і на ній клітини застиляють практично всю видиму частину поверхні. Для двошарових покриттів на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT кількість клітин різко знижується. Це свідчить про неоптимальний рівень змочуваності, ймовірно поверхня є занадто гідрофільною. Також не можна виключати впливу морфології поверхні та механічних властивостей другого шару. На всіх зображеннях присутні неприкріплені клітини круглої форми, що не змогли прикріпитися до субстратів протягом перших 24 годин.

Наступним кроком був імунофлуоресцентний аналіз. Забарвлення клітинного цитоскелету та ядер ракових клітин PANC-1 дозволило нам продемонструвати та охарактеризувати морфологію клітини та вплив двошарових покриттів на адгезію даного типу клітинної лінії. Репрезентативні флуоресцентні мікрофотографії ракових клітин, висіяних на склі, прищеплених кополімерних щітках на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10, двошарових покриттях на основі 4-Arm PEG15K та двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT після 48 годин інкубування представлені на рисунку 5.8.

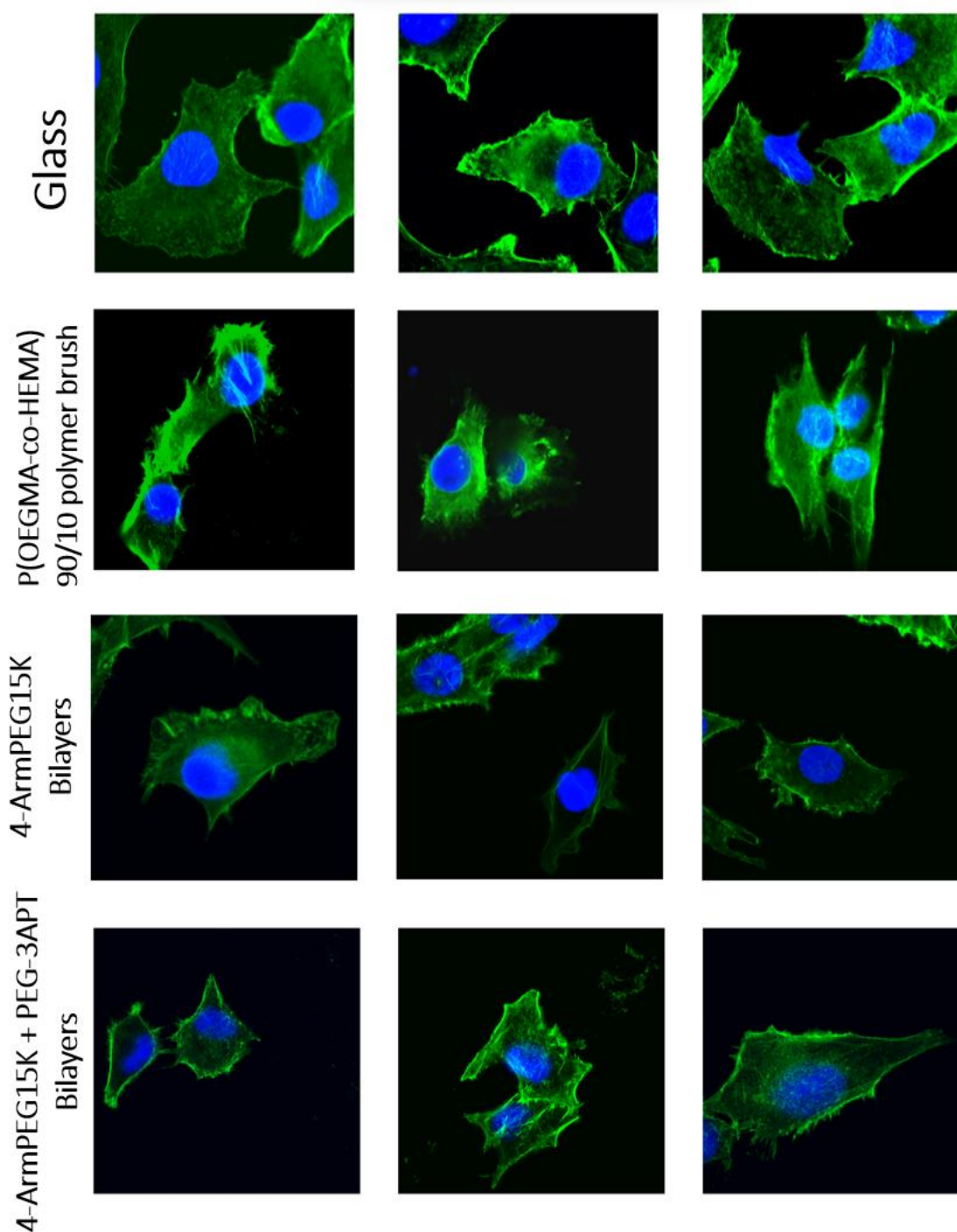


Рис. 5.8. Репрезентативні флуоресцентні мікрофотографії ракових клітин, висіяних на склі, прищеплених кополімерних щітках на основі P(OEGMA-co-HEMA) 90/10, двошарових покриттях на основі 4-Arm PEG15K та двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT після 48 годин інкубування. Актиновий цитоскелет є зеленого кольору, ядра – синього.

Помітно, що усі клітини розпластані на поверхні, ядра сформовані. Проте для двошарових покриттів на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3АРТ було активніше видно стресові волокна, що схожі на зелені ниточки, які пронизують усю поверхню клітини. Стресові волокна — це цитоскелетні структури вищого порядку, що складаються з перехресно зшитих ниток актину, і в багатьох випадках — моторних білків міозину. Стресові волокна мають вирішальне значення для механотрансдукції. Вони дозволяють клітинам підтримувати напругу всередині клітини, протидіють механічному стресу, беруть участь у міграції клітини. Але велика кількість цих волокон говорить, що клітини піддаються стресу, який пов'язаний з неоптимальними властивостями субстрату, такими як змочуваність, морфологія, модуль пружності.

Для візуалізації життєздатності клітин проводили їхнє флуоресцентне забарвлення барвниками, що дозволяють розрізнити мертві та живі клітини. Репрезентативні флуоресцентні мікрофотографії ракових клітин після 48 годин культивування на склі (рис. 5.9a), прищеплених кополімерних щітках на основі P(OEGMA + НЕМА) 90/10 (рис. 5.9b), двошарових покриттях на основі 4-Arm PEG15K (рис. 5.9c) та двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3АР (рис. 5.9d) вказують, що життєздатність клітин була на рівні >96% для двох видів двошарових покриттів (рис. 5.10). Кількість мертвих (червоних) клітин є мінімальною. Такий високий показник підтверджує відмінну біосумісність двошарових наношарів з цим типом клітин.

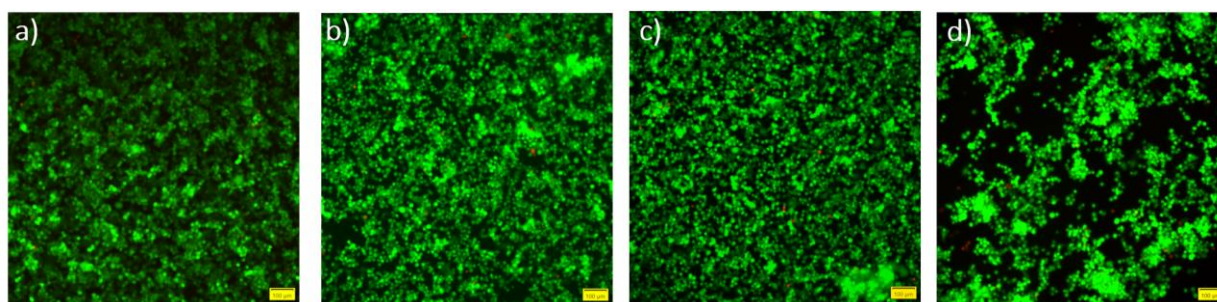


Рис. 5.9. Репрезентативні флуоресцентні мікрофотографії ракових клітин, висіяних на склі (a), кополімерній щітці (b), двошарових покриттях на основі

4-Arm PEG15K (c) та двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3АРТ (d).

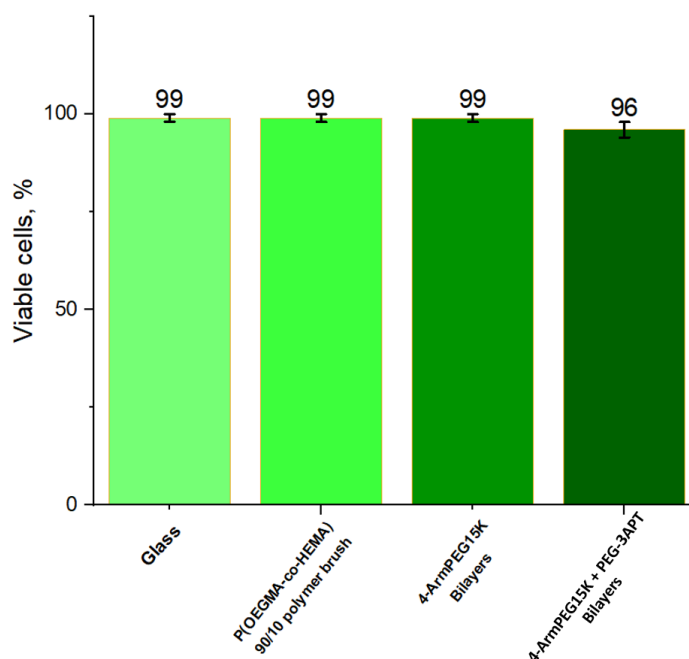


Рис. 5.10. Залежність життєздатності ракових клітин від типу покриття, на яких вони були висіяні (час культивування 48 годин).

Проте знову можна помітити, що кількість клітин, висіяних на двошарових покриттях на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3АРТ, є значно меншою, як і площа їхнього контакту з поверхнею. Ймовірно, такі покриття є занадто м'якими та гідрофільними для цього типу ракових клітин.

З метою характеристикації впливу механічних властивостей двошарових прищеплених полімерних покриттів на клітини були проведені мікрореологічні дослідження. Основна ідея полягає в дослідженні в'язкопружної системи, якою є клітина, під дією механічної напруги. Коли система пружна, напруга пропорційна деформації (тобто відносному подовженню), тоді як в'язкий матеріал під дією прикладеної сили буде текти, і створена напруга буде пропорційна вже швидкості деформації. Мікрореологічні дослідження дозволяють проаналізувати як в'язку, так і пружну реакції клітини на прикладену напругу на конкретному субстраті.

Мікрореологічні властивості клітин раку були проведені за допомогою атомно-силового мікроскопу в діапазоні осциляцій від 1 до 120 Гц, що давало інформацію про локальні зміни мікроструктури цитоскелета, зокрема актинових волокон. Досліджувалися параметри G' (модуль накопичення), що характеризує еластичні властивості клітини, і G'' (модуль втрат), що описує в'язкі властивості, та залежності модулів від частоти осциляції (рис. 5.11). G' вимірює енергію, яка зберігається та відновлюється під час коливань, тоді як G'' враховує енергію, що розсіюється.

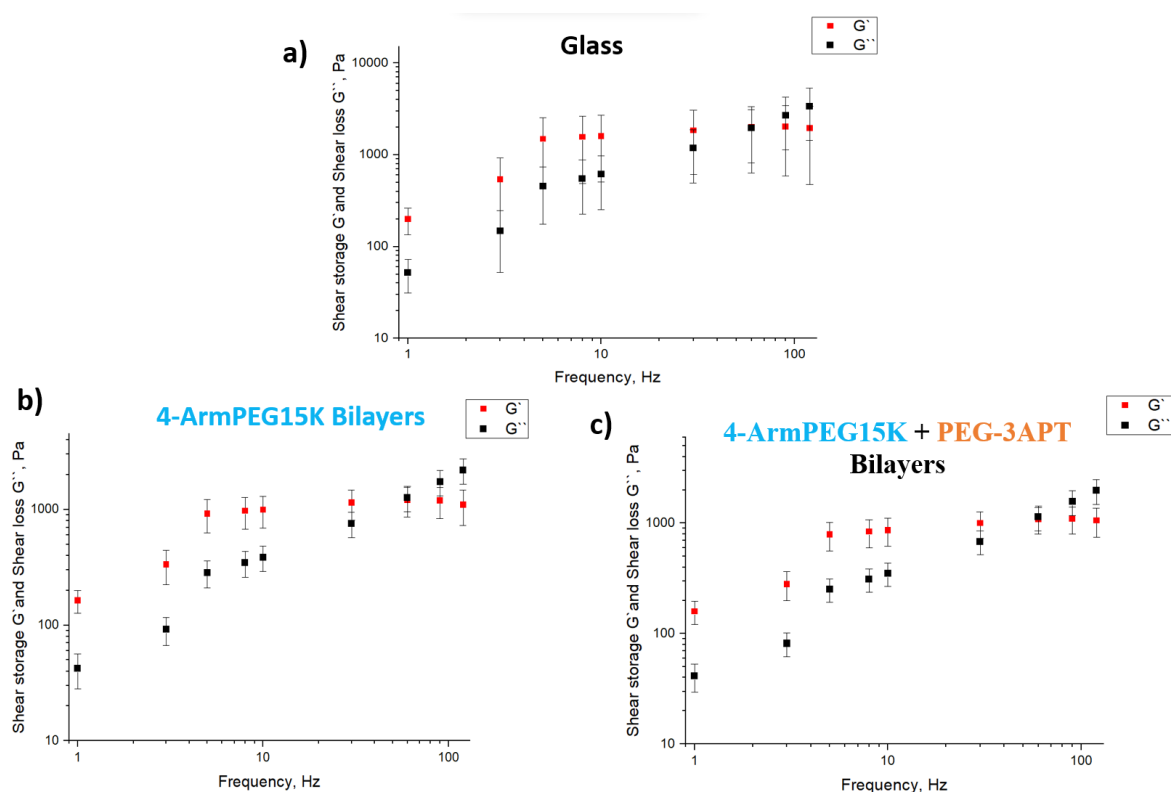


Рис. 5.11. Залежності модулів накопичення G' та втрат G'' від частоти осциляції для ракових клітин, висіяних на склі (a), на основі 4-Arm PEG15K (b), двошарових покриттях на основі 4-Arm PEG15K + PEG-3APT (c). Вимірювання проводилися над ядром поодиноких клітин, щоб виключити вплив сусідніх клітин.

Характер залежностей модулів від частоти для трьох видів зразків є подібним. Модуль накопичення є більшим за значенням, ніж модуль втрат, аж до частоти 60 Гц. Це означає, що нижче цієї частоти пружні властивості

клітини переважають над в'язкими. Нижче частоти 5 Гц G' зростає, а потім виходив на плато при значеннях G' у 1485, 921 та 787 Па для скла, двошарових покриттів на основі 4-ArmPEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-3APT, відповідно. Однак G'' демонстрував більш виражену частотну залежність на всіх частотах і перетинав G' при 61 Гц для скла та 55 Гц для двох типів двошарових покриттів. Механічна напруга в точках перетину дорівнювала 1992 Па, 1202 та 1075 Па, відповідно. Зменшення значень механічної напруги говорить, що клітини ставали більш «м'якшими», а це в свою чергу прямопропорційно залежало від пружності субстратів. Це знову підтверджує той факт, що двошарові покриття на основі 4-ArmPEG15K поєднують в собі оптимальні фізико-хімічні, механічні і біосумісні властивості, підтримуючи і покращуючи ріст клітин, що не підтверджувалося для двошарових покриттів на основі 4-ArmPEG15K + PEG-3APT, які виявилися занадто м'якими для культивування клітин даного типу. Хоча таке покриття не виявляло цитотоксичності, воно не сприяло адгезії ракових клітин.

ВИСНОВКИ

1. Вперше розроблену стратегію формування двошарових полімерних наноструктур на поверхні скла, які складаються з температуро- та рН-чутливого наношару, та прищепленого до нього біологічно активного наношару гелеподібної структури для різноманітних застосувань у сфері тканинної інженерії.
2. Вперше розроблено методи синтезу «розумних» наношарів прищеплених (ко)полімерних щіток, один з комономерів яких є відповідальним за чутливі властивості прищепленого наношару, а інші несуть функційні групи за допомогою яких можна здійснити модифікацію поверхонь прищепленими біологічно активними молекулами/макромолекулами.
3. Розроблено оптимальний склад прищеплених кополімерних щіток на основі OEGMA, NIPAM, AAm, НЕМА, при якому зберігалися чи навіть посилювалися адаптивні властивості полімеру, а також іммобілізується необхідна кількість функціональних груп для прищеплення біологічно активних молекул; досліджено їхні властивості з застосуванням AFM, ToF-SIMS, XPS, еліпсометрії та інших методів. Кополімерні щітки на основі P(OEGMA188-co-AAm) із високою мольною часткою AAm (>44%) мали підсилену температуро-залежну відповідь змочуваності зі зміною контактного кута змочування у 45°, замість 10-15 ° для класичного LCST переходу. Вони також демонстрували «шизофренічну» відповідь змочуваності на зміни температури після їхнього занурення в розчини буферів з різними значеннями рН. Кополімерні щітки на основі P(OEGMA-co-HEMA) та P(NIPAM-co-HEMA) показали, що термочутливість нанопокриттів сильно залежить від їхнього складу і може зберігатися, зникати або змінюватися з LCST на UCST перехід для різних мольних співвідношень мономерів у полімерній щітці.
4. Вперше розроблено метод модифікації «розумних» наношарів прищеплених кополімерних щіток ковалентно прищепленими біологічно

активними наносферами на основі 4-ArmPEG15K та 4-ArmPEG15K + PEG-ЗАРТ, зшитих у полімерну матрицю з гелеподібною структурою. Показано вплив часу модифікації на товщину та збереження температуро-чутливих властивостей двошарових покриттів, який має складати не більше 10 хвилин; досліджено їхні властивості.

5. Досліджено та показано біосумісні властивості першого прищепленого наносферу на основі (ко)полімерних щіток з використанням дермальних фібробластів людини (HDFn) та можливість маніпулювати морфологією клітин за різних температур. Показано вплив різної пружності двошарових біологічно активних наносферів на ракові клітини лінії PANC-1. Двошарові полімерні покриття на основі 4-ArmPEG15K сприяють адгезії та проліферації клітин PANC-1, а покриття на основі 4-ArmPEG15K + PEG-ЗАРТ володіють неоптимальними властивостями для культивування цієї клітинної лінії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mano, Joao F. "Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications." *Advanced Engineering Materials* 10.6 (2008): 515-527.
2. Alsuraifi, Ali, et al. "Stimuli responsive polymeric systems for cancer therapy." *Pharmaceutics* 10.3 (2018): 136.
3. Nayak, Amit Kumar, and Md Saquib Hasnain, eds. *Advanced biopolymeric systems for drug delivery*. Cham, Switzerland: Springer, 2020.
4. Rawat, Pradeep Singh, et al. "Design, Characterization and Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Evaluation of Poloxamer and Kappa-Carrageenan-Based Dual-Responsive In Situ Gel of Nebivolol for Treatment of Open-Angle Glaucoma." *Pharmaceutics* 15.2 (2023): 405.
5. Nastyshyn, Svyatoslav, et al. "Temperature-responsive polymer brush coatings for advanced biomedical applications." *Polymers* 14.19 (2022): 4245.
6. Tymetska, Svitlana, et al. "Thermoresponsive Smart Copolymer Coatings Based on P (NIPAM-co-HEMA) and P (OEGMA-co-HEMA) Brushes for Regenerative Medicine." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 9.11 (2023): 6256-6272.
7. Nakayama, M., T. Okano, and F. M. Winnik. "Poly (N-isopropylacrylamide)-based smart surfaces for cell sheet tissue engineering." *Mater. Matters* 5.5 (2010).
8. Kano, Kyoko, Masayuki Yamato, and Teruo Okano. "Ectopic transplantation of hepatocyte sheets fabricated with temperature-responsive culture dishes." *Hepatology Research* 38.11 (2008): 1140-1147.
9. Zhang, Qiang, et al. "Stimuli-responsive polymers for sensing and reacting to environmental conditions." *Progress in Polymer Science* 116 (2021): 101386.
10. Stuart, Martien A. Cohen, et al. "Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials." *Nature materials* 9.2 (2010): 101-113.
11. Ganesh, V. Anand, Avinash Baji, and Seeram Ramakrishna. "Smart functional polymers—a new route towards creating a sustainable environment." *Rsc Advances* 4.95 (2014): 53352-53364.

12. Roy, Debashish, William LA Brooks, and Brent S. Sumerlin. "New directions in thermoresponsive polymers." *Chemical Society Reviews* 42.17 (2013): 7214-7243.
13. V. Aseyev, S. Belegriou, N. A. M. Besseling, I. Botiz, M. A. C. Stuart, T. Hellweg, M. Junginger, A. de Keizer, K. Kita-Tokarczyk, G. Reiter, H. Schlaad, A. Taubert, H. Tenhu, F. M. Winnik, Y. Yan in *Self Organized Nanostructures of Amphiphilic Block Copolymers II* (Eds.: A.H. E. Müller, O. Borisov), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010): 29-89.
14. Li, Junning, et al. "Synthesis and characterization of imidazole-functionalized SBA-15 as an adsorbent of hexavalent chromium." *Materials Letters* 61.14-15 (2007): 3197-3200.
15. Lendlein, Andreas, and Steffen Kelch. "Shape-memory polymers." *Angewandte Chemie International Edition* 41.12 (2002): 2034-2057.
16. H. Stegemeyer in *Liquid crystals* (Eds.: H. Baumgartel, E. U. Franck, W. Griinbein), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1994): 103-141.
17. Gordon, Manfred, ed. *Advances in polymer science: Liquid crystal polymers: II/III/ed.: M. Gordon. Guest ed.: NA Platé. With contributions by MG Dobb.* Springer, 1984.
18. Folmer-Andersen, J. Frantz, and Jean-Marie Lehn. "Thermoresponsive dynamers: thermally induced, reversible chain elongation of amphiphilic poly (acylhydrazones)." *Journal of the American Chemical Society* 133.28 (2011): 10966-10973.
19. Roy, Nabarun, Bernd Bruchmann, and Jean-Marie Lehn. "DYNAMERS: dynamic polymers as self-healing materials." *Chemical Society Reviews* 44.11 (2015): 3786-3807.
20. Chen, Guohua, and Allan S. Hoffman. "Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH." *Nature* 373.6509 (1995): 49-52.

21. Stetsyshyn, Yuriy, et al. "Temperature and pH dual-responsive POEGMA-based coatings for protein adsorption." *Journal of colloid and interface science* 411 (2013): 247-256.
22. Lutz, Jean-François, et al. "About the phase transitions in aqueous solutions of thermoresponsive copolymers and hydrogels based on 2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate and oligo (ethylene glycol) methacrylate." *Macromolecules* 40.7 (2007): 2503-2508.
23. Shevtsova, Tetiana, et al. "Temperature-responsive hybrid nanomaterials based on modified halloysite nanotubes uploaded with silver nanoparticles." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 641 (2022): 128525.
24. Shymborska, Yana, et al. "Impact of the various buffer solutions on the temperature-responsive properties of POEGMA-grafted brush coatings." *Colloid and Polymer Science* 300.5 (2022): 487-495.
25. Shymborska, Yana, et al. "Temperature-and pH-Responsive Schizophrenic Copolymer Brush Coatings with Enhanced Temperature Response in Pure Water." *ACS Applied Materials & Interfaces* 15.6 (2023): 8676-8690.
26. Seuring, Jan, and Seema Agarwal. "Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution: Unexpected properties from known building blocks." (2013): 597-600.
27. Seuring, Jan, et al. "Upper critical solution temperature of poly (N-acryloyl glycinamide) in water: a concealed property." *Macromolecules* 45.1 (2012): 374-384.
28. Z. Tang, T. Okano, *Regen. Biomater.* 1 (2014): 91-102.
29. Wischerhoff, Erik, et al. "Smart bioactive surfaces." *Soft Matter* 6.4 (2010): 705-713.
30. Nagase, Kenichi, et al. "Interfacial property modulation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with biomolecules." *Langmuir* 23.18 (2007): 9409-9415.

31. Kanazawa, Hideko, et al. "Aqueous chromatographic system for separation of biomolecules using thermoresponsive polymer modified stationary phase." *Journal of Chromatography A* 1191.1-2 (2008): 157-161.
32. Stetsyshyn, Yuriy, et al. "Temperature and pH dual-responsive coatings of oligoperoxide-graft-poly (N-isopropylacrylamide): Wettability, morphology, and protein adsorption." *Journal of colloid and interface science* 387.1 (2012): 95-105.
33. Lishchynskiy, Ostep, et al. "Passive antifouling and active self-disinfecting antiviral surfaces." *Chemical Engineering Journal* 446 (2022): 137048.
34. Kostruba, Andriy, et al. "Composition, thickness and properties of grafted copolymer brush coatings determined by ellipsometry: Calculation and prediction." *Soft Matter* 14.6 (2018): 1016-1025.
35. Stetsyshyn, Yuriy, et al. "Temperature-controlled three-stage switching of wetting, morphology, and protein adsorption." *ACS Applied Materials & Interfaces* 9.13 (2017): 12035-12045.
36. Dong, Zhixin, et al. "Synthesis and responsive behavior of poly (N, N-dimethylaminoethyl methacrylate) brushes grafted on silica nanoparticles and their quaternized derivatives." *Polymer* 53.10 (2012): 2074-2084.
37. Wischerhoff, Erik, et al. "Tuning the thickness of polymer brushes grafted from nonlinearly growing multilayer assemblies." *Langmuir* 25.10 (2009): 5949-5956.
38. K. M. Huh, H. C. Kang, Y. J. Lee, Y. H. Bae, *Macromol. Res.* 2012, 20, 224-233; K. H. Min, J. H. Kim, S. M. Bae, H. Shin, M. S. Kim, S. Park, I.-S. Kim, K. Kwangmeyung, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, D. S. Lee, *J. Control. Release* 2010, 144, 259-266.
39. Yoshida, Kentaro, et al. "Preparation of layer-by-layer thin films containing insulin and its pH-sensitive decomposition." *Polymer journal* 40.2 (2008): 90-91.
40. Vyas, Mukesh Kumar, et al. "Switching of friction by binary polymer brushes." *Soft Matter* 4.5 (2008): 1024-1032.

41. Das, Biswa P., and Marina Tsianou. "From polyelectrolyte complexes to polyelectrolyte multilayers: Electrostatic assembly, nanostructure, dynamics, and functional properties." *Advances in Colloid and Interface Science* 244 (2017): 71-89.
42. Sukhishvili, Svetlana A., Eugenia Kharlampieva, and Vladimir Izumrudov. "Where polyelectrolyte multilayers and polyelectrolyte complexes meet." *Macromolecules* 39.26 (2006): 8873-8881.
43. Cook, Michael T., et al. "Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria." *Biomacromolecules* 12.7 (2011): 2834-2840.
44. Pan, Miao, et al. "Poly (l-Ornithine)-Based Polymeric Micelles as pH-Responsive Macromolecular Anticancer Agents." *Pharmaceutics* 15.4 (2023): 1307.
45. Khutoryanskiy, Vitaliy V. "Hydrogen-bonded interpolymer complexes as materials for pharmaceutical applications." *International Journal of Pharmaceutics* 334.1-2 (2007): 15-26.
46. Dubolazov, Artem V., et al. "Design of mucoadhesive polymeric films based on blends of poly (acrylic acid) and (hydroxypropyl) cellulose." *Biomacromolecules* 7.5 (2006): 1637-1643.
47. Khutoryanskiy, Vitaliy V., et al. "pH effects in the complex formation and blending of poly (acrylic acid) with poly (ethylene oxide)." *Langmuir* 20.9 (2004): 3785-3790.
48. Melnyk, Yuriy, et al. "Polyvinylpyrrolidone-graft-poly (2-hydroxyethylmethacrylate) hydrogel membranes for encapsulated forms of drugs." *Journal of Polymer Research* 27 (2020): 1-11.
49. N. Roy, N. Saha in *Hydrogels: Synthesis, Characterization and Applications* (Eds.: F. V. Câmara, L. J. Ferreira), Nova Science, Hauppauge, 2012, 227-252.
50. Kocak, G., C. A. N. S. E. L. Tuncer, and V. J. P. C. Bütün. "pH-Responsive polymers." *Polymer Chemistry* 8.1 (2017): 144-176.

51. Etrych, Tomáš, et al. "Polymer conjugates of doxorubicin bound through an amide and hydrazone bond: Impact of the carrier structure onto synergistic action in the treatment of solid tumours." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 58 (2014): 1-12.
52. Kocak, G., C. A. N. S. E. L. Tuncer, and V. J. P. C. Bütün. "pH-Responsive polymers." *Polymer Chemistry* 8.1 (2017): 144-176.
53. Yakoviv, M. V., et al. "Study of physical interactions of fluorescein-containing amphiphilic copolyesters with albumin in aqueous dispersions." *Applied Nanoscience* 10 (2020): 2655-2663.
54. Prabakaran, Mani, et al. "Amphiphilic multi-arm-block copolymer conjugated with doxorubicin via pH-sensitive hydrazone bond for tumor-targeted drug delivery." *Biomaterials* 30.29 (2009): 5757-5766.
55. Kalay, Saban, et al. "pH-Controlled fluorescence switching in water-dispersed polymer brushes grafted to modified boron nitride nanotubes for cellular imaging." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 10.1 (2019): 2428-2439.
56. Martin, Monique M., and Lars Lindqvist. "The pH dependence of fluorescein fluorescence." *Journal of Luminescence* 10.6 (1975): 381-390.
57. Govindaiah, Patakamuri, et al. "Synthesis and characterization of poly (styrene-co-fluorescein O-methacrylate)/poly (N-isopropylacrylamide)-Fe₃O₄ core/shell composite particles." *Polymer* 52.22 (2011): 5058-5064.
58. Reifarth, Martin, et al. "A Dual pH-and Light-Responsive Spiropyran-Based Surfactant: Investigations on Its Switching Behavior and Remote Control over Emulsion Stability." *Angewandte Chemie International Edition* 61.21 (2022): e202114687.
59. El-Mohtadi, Farah, Richard d'Arcy, and Nicola Tirelli. "Oxidation-Responsive Materials: Biological Rationale, State of the Art, Multiple Responsiveness, and Open Issues." *Macromolecular rapid communications* 40.1 (2019): 1800699.
60. Kieviet, Bernard D., Peter M. Schön, and G. Julius Vancso. "Stimulus-responsive polymers and other functional polymer surfaces as components in glass microfluidic channels." *Lab on a Chip* 14.21 (2014): 4159-4170.

61. Peng, Shunjin, and Bharat Bhushan. "Smart polymer brushes and their emerging applications." *RSC advances* 2.23 (2012): 8557-8578.
62. Budkowski, Andrzej, Jacob Klein, and Lewis J. Fetters. "Brush formation by symmetric and by highly asymmetric diblock copolymers at homopolymer interfaces." *Macromolecules* 28.25 (1995): 8571-8578.
63. Zhao, Bin, and William J. Brittain. "Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules." *Progress in Polymer Science* 25.5 (2000): 677-710.
64. Stuart, Martien A. Cohen, et al. "Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials." *Nature materials* 9.2 (2010): 101-113.
65. Zhou, Feng, and Wilhelm TS Huck. "Surface grafted polymer brushes as ideal building blocks for "smart" surfaces." *Physical Chemistry Chemical Physics* 8.33 (2006): 3815-3823.
66. Zoppe, Justin O., et al. "Surface-initiated controlled radical polymerization: state-of-the-art, opportunities, and challenges in surface and interface engineering with polymer brushes." *Chemical reviews* 117.3 (2017): 1105-1318.
67. Barbey, Raphael, et al. "Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications." *Chemical reviews* 109.11 (2009): 5437-5527.
68. Edmondson, Steve, Vicky L. Osborne, and Wilhelm TS Huck. "Polymer brushes via surface-initiated polymerizations." *Chemical society reviews* 33.1 (2004): 14-22.
69. Ohno, Kohji, et al. "Synthesis of monodisperse silica particles coated with well-defined, high-density polymer brushes by surface-initiated atom transfer radical polymerization." *Macromolecules* 38.6 (2005): 2137-2142.
70. Moraes, John, et al. "The synthesis of well-defined poly (vinylbenzyl chloride)-grafted nanoparticles via RAFT polymerization." *Beilstein journal of organic chemistry* 9.1 (2013): 1226-1234.
71. Heeb, Raphael, et al. "Room-temperature, aqueous-phase fabrication of poly (methacrylic acid) brushes by UV-LED-induced, controlled radical

- polymerization with high selectivity for surface-bound species." *Macromolecules* 42.22 (2009): 9124-9132.
72. Ladmiral, Vincent, et al. "Synthesis of monodisperse zinc sulfide particles grafted with concentrated polystyrene brush by surface-initiated nitroxide-mediated polymerization." *European polymer journal* 45.10 (2009): 2788-2796.
73. Awsiuik, Kamil, et al. "Temperature-controlled orientation of proteins on temperature-responsive grafted polymer brushes: poly (butyl methacrylate) vs poly (butyl acrylate): morphology, wetting, and protein adsorption." *Biomacromolecules* 20.6 (2019): 2185-2197.
74. Stetsyshyn, Yuriy, et al. "Glass transition in temperature-responsive poly (butyl methacrylate) grafted polymer brushes. Impact of thickness and temperature on wetting, morphology, and cell growth." *Journal of Materials Chemistry B* 6.11 (2018): 1613-1621.
75. Stetsyshyn, Yuriy, et al. "Cholesterol-based grafted polymer brushes as alignment coating with temperature-tuned anchoring for nematic liquid crystals." *Langmuir* 32.42 (2016): 11029-11038.
76. Raczowska, Joanna, et al. "Temperature-responsive grafted polymer brushes obtained from renewable sources with potential application as substrates for tissue engineering." *Applied Surface Science* 407 (2017): 546-554.
77. Roy, Debashish, William LA Brooks, and Brent S. Sumerlin. "New directions in thermoresponsive polymers." *Chemical Society Reviews* 42.17 (2013): 7214-7243.
78. Nakayama, M., T. Okano, and F. M. Winnik. "Poly (N-isopropylacrylamide)-based smart surfaces for cell sheet tissue engineering." *Mater. Matters* 5.5 (2010): 56-58.
79. Kano, Kyoko, Masayuki Yamato, and Teruo Okano. "Ectopic transplantation of hepatocyte sheets fabricated with temperature-responsive culture dishes." *Hepatology Research* 38.11 (2008): 1140-1147.

80. Shimizu, H., et al. "Topographical arrangement of α - and β -cells within neo-islet tissues engineered by islet cell sheet transplantation in mice." *Transplantation Proceedings*. Vol. 45. No. 5. Elsevier, 2013.
81. Ohashi, K., et al. "Production of islet cell sheets using cryopreserved islet cells." *Transplantation proceedings*. Vol. 43. No. 9. Elsevier, 2011.
82. Matsuzaka, Naoki, et al. "Terminal-functionality effect of poly (N-isopropylacrylamide) brush surfaces on temperature-controlled cell adhesion/detachment." *Biomacromolecules* 14.9 (2013): 3164-3171.
83. Arauchi, Ayumi, et al. "Tissue-engineered thyroid cell sheet rescued hypothyroidism in rat models after receiving total thyroidectomy comparing with nontransplantation models." *Tissue Engineering Part A* 15.12 (2009): 3943-3949.
84. Nagase, Kenichi, et al. "Preparation of thermoresponsive cationic copolymer brush surfaces and application of the surface to separation of biomolecules." *Biomacromolecules* 9.4 (2008): 1340-1347.
85. Cooperstein, Marta A., and Heather E. Canavan. "Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly (N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces." *Biointerphases* 8.1 (2013).
86. Lutz, Jean-François, Özgür Akdemir, and Ann Hoth. "Point by point comparison of two thermosensitive polymers exhibiting a similar LCST: is the age of poly (NIPAM) over?." *Journal of the American Chemical Society* 128.40 (2006): 13046-13047.
87. LeMieux, M. C., et al. "Adaptive nanomechanical response of stratified polymer brush structures." *Langmuir* 23.1 (2007): 265-273.
88. Shiddiky, Muhammad JA, et al. "An electrochemical immunosensor to minimize the nonspecific adsorption and to improve sensitivity of protein assays in human serum." *Biosensors and Bioelectronics* 38.1 (2012): 132-137.
89. Lisuzzo, Lorenzo, et al. "Stability of halloysite, imogolite, and boron nitride nanotubes in solvent media." *Applied Sciences* 8.7 (2018): 1068.

90. Durkut, Serap, and Yaşar Murat Elçin. "Synthesis and characterization of thermosensitive poly (N-vinylcaprolactam)-g-collagen." *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 45.8 (2017): 1665-1674.
91. Tsuda, Yukiko, et al. "The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets." *Biomaterials* 26.14 (2005): 1885-1893.
92. Xia, Fan, et al. "Dual-responsive surfaces that switch between superhydrophilicity and superhydrophobicity." *Advanced Materials* 18.4 (2006): 432-436.
93. Stenzel, Martina H., Ling Zhang, and Wilhelm TS Huck. "Temperature-responsive glycopolymer brushes synthesized via RAFT polymerization using the Z-group approach." *Macromolecular rapid communications* 27.14 (2006): 1121-1126.
94. Kumar, Surjith, et al. "Surface-grafted stimuli-responsive block copolymer brushes for the thermo-, photo-and pH-sensitive release of dye molecules." *Macromolecules* 44.18 (2011): 7385-7393.
95. Nagase, Kenichi, et al. "Mixed polymer brush as a functional ligand of silica beads for temperature-modulated hydrophobic and electrostatic interactions." *Analytica Chimica Acta* 1095 (2020): 1-13.
96. Frysalı, Melani A., and Spiros H. Anastasiadis. "Temperature-and/or pH-responsive surfaces with controllable wettability: From parahydrophobicity to superhydrophilicity." *Langmuir* 33.36 (2017): 9106-9114.
97. Kurisawa, Motoichi, Masayuki Yokoyama, and Teruo Okano. "Gene expression control by temperature with thermo-responsive polymeric gene carriers." *Journal of Controlled Release* 69.1 (2000): 127-137.
98. Takeda, Naoya, et al. "Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses." *Journal of controlled release* 95.2 (2004): 343-355.

99. Chilkoti, Ashutosh, et al. "Site-specific conjugation of a temperature-sensitive polymer to a genetically engineered protein." *Bioconjugate Chemistry* 5.6 (1994): 504-507.
100. Lutz, Jean-François. "Polymerization of oligo (ethylene glycol)(meth) acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 46.11 (2008): 3459-3470.
101. Duncan, Ruth. "The dawning era of polymer therapeutics." *Nature reviews Drug discovery* 2.5 (2003): 347-360.
102. Dworak, Andrzej, et al. "Poly [tri (ethylene glycol) ethyl ether methacrylate]-coated surfaces for controlled fibroblasts culturing." *ACS applied materials & interfaces* 5.6 (2013): 2197-2207.
103. Jiang, Siyu, Mareike Müller, and Holger Schönherr. "Toward label-free selective cell separation of different eukaryotic cell lines using thermoresponsive homopolymer layers." *ACS Applied Bio Materials* 2.6 (2019): 2557-2566.
104. Laloyaux, Xavier, et al. "Bidimensional response maps of adaptive thermo- and pH-responsive polymer brushes." *Macromolecules* 43.18 (2010): 7744-7751.
105. Medel, Sandra, et al. "Thermo- and pH-responsive gradient and block copolymers based on 2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate synthesized via atom transfer radical polymerization and the formation of thermoresponsive surfaces." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49.3 (2011): 690-700.
106. Synytska, Alla, et al. "Biocompatible polymeric materials with switchable adhesion properties." *Soft Matter* 6.23 (2010): 5907-5914.
107. Goddard, Julie Melissa, and J. H. Hotchkiss. "Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds." *Progress in polymer science* 32.7 (2007): 698-725.
108. Kusumo, Andy, et al. "High capacity, charge-selective protein uptake by polyelectrolyte brushes." *Langmuir* 23.8 (2007): 4448-4454.

109. Lei, Zhongli, and Shuxian Bi. "Preparation and properties of immobilized pectinase onto the amphiphilic PS-b-PAA diblock copolymers." *Journal of biotechnology* 128.1 (2007): 112-119.
110. Cullen, Sean P., et al. "Polymeric brushes as functional templates for immobilizing ribonuclease A: study of binding kinetics and activity." *Langmuir* 24.3 (2008): 913-920.
111. Ying, Lei, et al. "Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly (ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture." *Biomacromolecules* 4.1 (2003): 157-165.
112. Uhlmann, Petra, et al. "In-situ investigation of the adsorption of globular model proteins on stimuli-responsive binary polyelectrolyte brushes." *Langmuir* 23.1 (2007): 57-64.
113. Dai, Jinhua, et al. "High-capacity binding of proteins by poly (acrylic acid) brushes and their derivatives." *Langmuir* 22.9 (2006): 4274-4281.
114. Harris, Bradley P., et al. "Photopatterned polymer brushes promoting cell adhesion gradients." *Langmuir* 22.10 (2006): 4467-4471.
115. Cheng, Ziyuan, and Swee-Hin Teoh. "Surface modification of ultra thin poly (ϵ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen." *Biomaterials* 25.11 (2004): 1991-2001.
116. Harris, Bradley P., et al. "Photopatterned polymer brushes promoting cell adhesion gradients." *Langmuir* 22.10 (2006): 4467-4471.
117. Navarro, Melba, et al. "Buried, covalently attached RGD peptide motifs in poly (methacrylic acid) brush layers: the effect of brush structure on cell adhesion." *Langmuir* 24.19 (2008): 10996-11002.
118. Higashi, J., et al. "High-spatioresolved microarchitectural surface prepared by photograft copolymerization using dithiocarbamate: surface preparation and cellular responses." *Langmuir* 15.6 (1999): 2080-2088.
119. Tugulu, Stefano, et al. "Protein-functionalized polymer brushes." *Biomacromolecules* 6.3 (2005): 1602-1607.

120. Ebara, Mitsuhiro, et al. "Temperature-responsive cell culture surfaces enable "on-off" affinity control between cell integrins and RGDS ligands." *Biomacromolecules* 5.2 (2004): 505-510.
121. Xu, F. J., et al. "Thermoresponsive poly (N-isopropyl acrylamide)-grafted polycaprolactone films with surface immobilization of collagen." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85.1 (2011): 40-47.
122. Harris, Carolyn A., et al. "Reduction of protein adsorption and macrophage and astrocyte adhesion on ventricular catheters by polyethylene glycol and N-acetyl-L-cysteine." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 98.3 (2011): 425-433.
123. Cooperstein, Marta A., and Heather E. Canavan. "Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly (N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces." *Biointerphases* 8.1 (2013).
124. Wadajkar, Aniket S., et al. "Cytotoxic evaluation of N-isopropylacrylamide monomers and temperature-sensitive poly (N-isopropylacrylamide) nanoparticles." *Journal of Nanoparticle Research* 11 (2009): 1375-1382.
125. Nastyshyn, Svyatoslav, et al. "Protein corona of SiO₂ nanoparticles with grafted thermoresponsive copolymers: Calorimetric insights on factors affecting entropy vs. enthalpy-driven associations." *Applied Surface Science* 601 (2022): 154201.
126. Bütün, V. U. R. A. L., et al. "A brief review of 'schizophrenic' block copolymers." *Reactive and Functional Polymers* 66.1 (2006): 157-165.
127. Sar, Pintu, et al. "pH-induced amphiphilicity-reversing schizophrenic aggregation by alternating copolymers." *Macromolecules* 52.21 (2019): 8346-8358.
128. Hoogenboom, Richard, et al. "A schizophrenic gradient copolymer: switching and reversing poly (2-oxazoline) micelles based on UCST and subtle solvent changes." *Soft Matter* 5.19 (2009): 3590-3592.

129. Neamtu, I., A. P. Chiriac, and L. E. Nita. "Characterization of poly (acrylamide) as temperature-sensitive hydrogel." *J Optoelectron Adv Mater* 8.5 (2006): 1939-1943.
130. Stetsyshyn, Yuriy, et al. "Temperature-responsive and multi-responsive grafted polymer brushes with transitions based on critical solution temperature: Synthesis, properties, and applications." *Colloid and Polymer Science* 299 (2021): 363-383.
131. Permyakova, N. M., et al. "Temperature effect on hydrogen bonds in triblock copolymers of poly (ethylene oxide) and polyacrylamide." *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 468.1 (2007): 53-405.
132. Zheltonozhskaya, Tatyana, et al. "Micellar nanocontainers based on PAAm-b-PEO-b-PAAm triblock copolymers for poorly soluble drugs." *European polymer journal* 49.2 (2013): 405-418.
133. Fedorchuk, S. V., et al. "Structural peculiarities of triblock copolymers containing poly (ethylene oxide) and polyacrylamide." *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 497.1 (2008): 268-600.
134. Momot, Lesya, et al. "Peculiarities of Formation of Intermolecular Polycomplexes Based on Polyacrylamide, Poly (vinyl alcohol) and Poly (ethylene oxide)." *Macromolecular Symposia*. Vol. 222. No. 1. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2005.
135. Permyakova, N. M., et al. "Structure of triblock-copolymers based on poly (ethylene oxide) and poly (acrylamide) with central blocks of varying lengths." *Theoretical and Experimental Chemistry* 41 (2005): 382-388.
136. Kasprów, Maciej, et al. "Thermoresponsive P (HEMA-co-OEGMA) copolymers: Synthesis, characteristics and solution behavior." *RSC advances* 9.70 (2019): 40966-40974.
137. Fares, Mohammad M., and Ali A. Othman. "Lower critical solution temperature determination of smart, thermosensitive N-isopropylacrylamide-alt-2-hydroxyethyl methacrylate copolymers: Kinetics and physical properties." *Journal of applied polymer science* 110.5 (2008): 2815-2825.

138. Von Mayersbach, Heinz, and Irene Höpfel-Kreiner. "UV versus chemical polymerization of glycol methacrylate (GMA) in enzyme histochemistry." *Acta Histochemica* 63.2 (1978): 246-IN9.
139. Klein, Paul A., Jianhua Xiang, and Arthur K. Kimura. "Melanoma cells growing in aggregates on a non-adhesive poly (HEMA) substrate exhibit polykaryocytosis but do not develop an increased metastatic capability." *Clinical & Experimental Metastasis* 2 (1984): 287-295.
140. Liu, Yongqing, et al. "Mouse fibroblasts lacking RB1 function form spheres and undergo reprogramming to a cancer stem cell phenotype." *Cell stem cell* 4.4 (2009): 336-347.
141. Thummarati, Parichut, et al. "Recent Advances in Cell Sheet Engineering: From Fabrication to Clinical Translation." *Bioengineering* 10.2 (2023): 211.
142. Xue, X., Thiagarajan, L., Braim, S., Saunders, B. R., Shakesheff, K. M., & Alexander, C. (2017). Upper critical solution temperature thermo-responsive polymer brushes and a mechanism for controlled cell attachment. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(25), 4926-4933.
143. Zhao, Xin, et al. "Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering." *Advanced healthcare materials* 5.1 (2016): 108-118.
144. Lin, Shaoting, et al. "Stretchable hydrogel electronics and devices." *Advanced Materials* 28.22 (2016): 4497-4505.
145. Klotz, Barbara J., et al. "Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair." *Trends in biotechnology* 34.5 (2016): 394-407.
146. Dong, Ruonan, et al. "Self-healing conductive injectable hydrogels with antibacterial activity as cell delivery carrier for cardiac cell therapy." *ACS applied materials & interfaces* 8.27 (2016): 17138-17150.
147. Roorda, W. E., et al. "Synthetic hydrogels as drug delivery systems." *Pharmaceutisch Weekblad* 8 (1986): 165-189.
148. Buwalda, Sytze J., et al. "Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials." *Journal of controlled release* 190 (2014): 254-273.

149. Melke, Johanna, et al. "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering." *Acta biomaterialia* 31 (2016): 1-16.
150. Xing, Ruirui, et al. "An injectable self-assembling collagen–gold hybrid hydrogel for combinatorial antitumor photothermal/photodynamic therapy." *Advanced materials* 28.19 (2016): 3669-3676.
151. Chaudhuri, Ovijit, et al. "Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity." *Nature materials* 15.3 (2016): 326-334.
152. Taylor, Danielle Lynne, and Marc in het Panhuis. "Self-healing hydrogels." *Advanced Materials* 28.41 (2016): 9060-9093.
153. Zhao, Xin, et al. "Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing." *Biomaterials* 122 (2017): 34-47.
154. Yesilyurt, Volkan, et al. "Injectable self-healing glucose-responsive hydrogels with pH-regulated mechanical properties." *Advanced materials* 28.1 (2016): 86-91.
155. Van Bemmelen, J. M. "Das hydrogel und das krystallinische hydrat des kupferoxyds." *Zeitschrift für anorganische Chemie* 5.1 (1894): 466-483.
156. Strain, D. E., R. Grice Kennelly, and H. R. Dittmar. "Methacrylate resins." *Industrial & Engineering Chemistry* 31.4 (1939): 382-387.
157. Wichterle, Otto, and Drahoslav Lim. "Hydrophilic gels for biological use." *Nature* 185.4706 (1960): 117-118.
158. Ahmed, Enas M. "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review." *Journal of advanced research* 6.2 (2015): 105-121.
159. Гіщак Х. Я., Гриценко О. М., Глушик А. С. "Сорбційні та електропровідні властивості композиційних металогідрогелів полівінілпіролідону залежно від умов набрякання." *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування.* 761 (2013): 369-373.

160. Zhao, Xiaobao, et al. "Application of star poly (ethylene glycol) derivatives in drug delivery and controlled release." *Journal of Controlled Release* 323 (2020): 565-577.
161. Yamini, D., et al. "Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 117 (2014): 299-303.
162. Arivazhagan, M., S. Prabhakaran, and R. Gayathri. "Molecular structure, vibrational spectroscopic, first hyperpolarizability, NBO and HOMO, LUMO studies of P-Iodobenzene sulfonyl chloride." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 82 (2011): 332-339.