

## WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE

### NOWE TERMOWRAŻLIWE POWIERZCHNIE POLIMEROWE DO HODOWLI I UWALNIANIA KOMÓREK SKÓRY

NEW THERMORESPONSIVE POLYMER LAYERS  
FOR SKIN CELL CULTURE AND DETACHMENT

**Natalia Oleszko-Torbus\***, Alicja Utrata-Wesołek,  
**Wojciech Wałach, Andrzej Dworak, Barbara Trzebicka**

*Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk,  
ul. M. Curie-Skłodowskiej 34 41-819 Zabrze  
\*e-mail: noleszko@cmpw-pan.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Cel rozprawy doktorskiej

2. Opis uzyskanych wyników

2.1. Synteza i charakterystyka termowrażliwych polimerów

2.2. Synteza i charakterystyka termowrażliwych warstw polimerowych na podłożach

2.3. Oddziaływanie polimerów i warstw polimerowych z komórkami skóry

Wnioski

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Natalia Oleszko-Torbis** w roku 2009 ukończyła studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W tym samym roku podjęła pracę w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej „Nowe termowrażliwe powierzchnie polimerowe do hodowli i uwalniania komórek skóry” uzyskała stopień doktora nauk chemicznych nadany uchwałą Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego, z dnia 16 kwietnia 2015 roku. Promotorem przewodu doktorskiego była prof. dr hab. Barbara Trzebicka, a promotorem pomocniczym dr Alicja Utrata-Wesołek. Recenzentami pracy doktorskiej byli dr hab. inż. Paweł Parzuchowski, prof. Politechniki Warszawskiej oraz dr hab. inż. Piotr Ulański, prof. Politechniki Łódzkiej.

**Dr Alicja Utrata-Wesołek** w roku 2001 ukończyła studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W 2006 roku uzyskała stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej.

**Dr hab. Wojciech Wałach** w 1998 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. W 2015 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego.

**Prof. dr hab. Andrzej Dworak** otrzymał doktorat w dziedzinie chemii polimerów na Politechnice Śląskiej, a habilitował się na Politechnice Warszawskiej. W roku 2007 otrzymał tytuł profesora nauk chemicznych. Jest dyrektorem Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze i kierownikiem Pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych w tym instytucie.

**Prof. dr hab. Barbara Trzebicka** W 1987 roku uzyskała stopień doktora nauk technicznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. W 2011 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W 2016 roku otrzymała tytuł profesora w dziedzinie nauk chemicznych. Od roku 2012 pełni obowiązki kierownika Pracowni Materiałów Węglowych i Polimero-Węglowych w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk.

## ABSTRACT

Covalent attachment of a thermoresponsive polymer to solid support leads to layers exhibiting temperature-dependent properties. Below the cloud point temperature ( $T_{CP}$ ) of the thermoresponsive polymer the layer is hydrophilic – it is hydrated and polymer chains adopt an expanded conformation. Above  $T_{CP}$  the polymer chains collapse due to dehydration and the surface becomes hydrophobic. This is a reversible process, lowering the temperature cause hydration and swelling of the layer. Such thermoresponsive layers can be obtained via reactions of entities present on the surface (e.g. functional groups, radicals etc.) with complementary functionalities in the polymer chains (grafting to) or with monomer subjected to polymerization (grafting from). Thermoresponsive layers may be used in many biomedical applications such as separation of molecules or cell sheet engineering.

In this work, well-defined thermoresponsive (co)polymers of glycidol and ethyl glycidyl carbamate (mPGL), 2-ethyl and 2-nonyl-2-oxazoline (PENOX) as well as homopolymers of 2-isopropyl-2-oxazoline (PIPOx) were grafted to functionalized glass and silica substrates with the aim to obtain thermoresponsive layers for potential application in cell sheet engineering. Presence of polymers covalently bonded to substrates was confirmed by FT-IR and XPS studies. The polymer layers were 5-50 nm thick, depending on the molar mass and polymer concentration. Microscopic techniques indicated a smooth surface of mPGL layers, slightly rough texture of PENOX layers and fibrille-like fibers surface of PIPOx layers. Ellipsometry and contact angle studies revealed the response of layers to temperature changes. Biocompatibility of layers with dermal fibroblasts was confirmed by toxicity tests. Thermoresponsive surfaces were employed as substrates for skin cell culture and harvesting. Fibroblasts adhesion and proliferation on investigated surfaces was comparable with control sample. A confluent cell sheet was formed after 24 hours of culture. The influence of surface properties on cell adhesion and proliferation was examined. Detachment of cells from surfaces was controlled by variation of the temperature. An intact monolayer of cultured dermal fibroblasts was detached. No mechanical or enzymatic methods were required to harvest the cell sheets. Skin cell sheets, detached from thermoresponsive polymer layers may be applied in the cell sheet engineering that is highly desirable in tissue regeneration.

Keywords: thermoresponsive polymer surfaces, biomaterials, cell sheet engineering, intelligent polymers

Słowa kluczowe: termowrażliwe powierzchnie polimerowe, biomateriały, inżynieria warstw komórkowych, inteligentne polimery

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

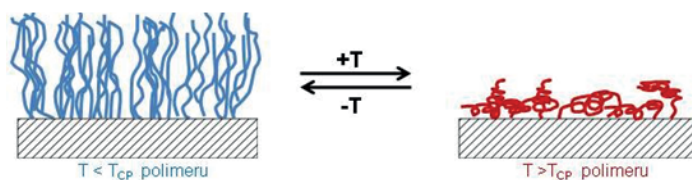
AFM	– mikroskopia sił atomowych
ECM	– macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i> )
EOx	– 2-etylo-2-oksazolina
FT-IR	– spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
IPOx	– 2-izopropyl-2-oksazolina
LCST	– dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności (ang. <i>lower critical solution temperature</i> )
mPGL	– poliglicydol modyfikowany izocyjanianem etylu
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy
NOx	– 2-nonylo-2-oksazolina
PE-MA	– poli(etylen- <i>alt</i> -bezwodnik maleinowy)
PENox	– poli[(2-etylo-2-oksazolina)- <i>co</i> -(2-nonylo-2-oksazolina)]
PIPOx	– poli(2-izopropyl-2-oksazolina)
PNIPAM	– poli( <i>N</i> -izopropylakrylamid)
T <sub>CP</sub>	– temperatura zmętnienia (ang. <i>cloud point temperature</i> )
TCPS	– naczynie hodowlane z polistyrenu (ang. <i>tissue culture polystyrene</i> )
XPS	– spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X

## WPROWADZENIE

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają polimery wrażliwe na bodźce środowiska, tak zwane polimery inteligentne. Wśród nich szczególnie interesującą grupę stanowią polimery termowrażliwe, ponieważ ich właściwości fizykochemiczne mogą być kontrolowane jedynie poprzez zmiany temperatury.

Termowrażliwe polimery rozpuszczone w wodzie wraz ze wzrostem temperatury przestają się rozpuszczać i ulegają wytrąceniu. Obserwowana separacja fazowa między termowrażliwym polimerem a rozpuszczalnikiem jest odwracalna – po obniżeniu temperatury polimer powraca do stanu początkowego. Temperatura, w której następuje separacja fazowa określana jest jako punkt zmętnienia (ang. *the cloud point temperature*,  $T_{CP}$ ). Zaobserwowano, że  $T_{CP}$  polimerów termowrażliwych jest zależne od ich stężenia. Na wykresie przedstawiającym zależność temperatury od stężenia polimeru, najniższa temperatura, w której następuje separacja fazowa między polimerem a rozpuszczalnikiem, określona jako dolna krytyczna temperatura rozpuszczania (ang. *the lower critical solution temperature*, LCST) stanowi minimum krzywej [1].

Termowrażliwy polimer naniesiony na podłoże stałe tworzy warstwę, której właściwości fizykochemiczne takie jak zwilżalność i grubość można kontrolować wykorzystując zmiany temperatury otoczenia [2]. Takie warstwy umieszczone w wodzie o temperaturze poniżej  $T_{CP}$  polimeru pęcznią i wykazują właściwości hydrofilowe. Zmiana konformacji łańcuchów na podłożu, spowodowana podwyższeniem temperatury, prowadzi do odwracalnej dehydratacji łańcuchów i ich kurczenia się, warstwa polimerowa staje się hydrofobowa, zmniejsza swoją zwilżalność i przylega do podłoża (Rys. 1).



Rysunek 1. Pęcznienie i kurczenie łańcuchów polimerowych na podłożu indukowane zmianami temperatury  
Figure 1. Swelling and shrinking of polymer chains on the surface induced by temperature changes

Szczególne zainteresowanie wzbudzają stabilne warstwy polimerowe przyczepione do podłoża za pomocą wiązań kowalencyjnych. Mogą być one otrzymane na drodze polimeryzacji monomeru inicjowanej grupą funkcyjną, która znajduje się na podłożu (tak zwana metoda „szczępienia od”) lub poprzez immobilizację na podłożu wcześniej zsyntetyzowanych łańcuchów polimerowych (metoda „szczępienia do”). W zależności od metody, możliwe jest otrzymanie warstw o grubości od nano- do mikrometrów, o określonej gęstości szczępienia.

Termowrażliwe, biokompatybilne warstwy polimerowe mogą być wykorzystane w medycynie i biotechnologii, na przykład jako elementy bioreaktorów. Od 1990 roku

termowrażliwe warstwy polimerowe na podłożach stałych badane są jako rusztowania do hodowli komórkowych i bezinwazyjnego odczepiania komórek w postaci arkusza [3]. Do otrzymania takich powierzchni wykorzystano dotychczas tylko poli(*N*-izopropylakrylamid) (PNIPAM) i jego pochodne [4, 5]. Warstwy PNIPAM używano głównie poprzez radiacyjne szczepienie tego polimeru na powierzchniach modyfikowanego polistyrenu.

Hodowla komórkowa na termoczulych warstwach polimerowych prowadzona jest powyżej temperatury przejścia fazowego polimeru, kiedy podłoże jest hydrofobowe. Komórki ulegają wtedy adhezji, dzielą się i namnażają tworząc integralną monowarstwę spojoną przez tak zwaną macierz zewnątrzkomórkową, wypełniającą przestrzeń między komórkami. Obniżenie temperatury poniżej  $T_{CP}$  dzięki zmianie charakteru warstwy na hydrofilowy, prowadzi do odczepienia komórek w postaci arkusza. Zbędne jest stosowanie mechanicznych czy enzymatycznych technik oddzielania komórek od podłoża i pozwala uniknąć uszkodzenia wyhodowanego arkusza. Arkusze komórek wyhodowane na termowrażliwym podłożu mogą znaleźć zastosowanie w hodowli tkanek koniecznych w terapii narządów.

Niniejszy artykuł oparty jest na wyróżnionej pracy doktorskiej, w której otrzymano i badano właściwości termowrażliwych warstw (ko)polimerów glicydołu i oksazolin na szklanych i krzemowych podłożach stałych. Warstwy polimerowe na podłożach uzyskano stosując technikę „szczepienia do” podłoża, w której wykorzystano reakcje chemiczne pomiędzy grupami funkcyjnymi wprowadzonymi na podłoże a komplementarnymi grupami obecnymi w łańcuchu polimerowym. Istotne dla potrzeb pracy było sprawdzenie, czy poprzez kontrolę warunków syntezy polimerów i ich szczepienia do podłoża można wpływać na właściwości warstw, zwłaszcza na termowrażliwość. Na otrzymanych warstwach hodowano modelowe komórki skóry. Termowrażliwość podłoży wykorzystano do bezinwazyjnego odczepiania wyhodowanego arkusza komórek. Zbadano, które właściwości warstwy polimerowej i w jaki sposób wpływają na adhezję i odczepianie fibroblastów w postaci arkusza. Taka analiza pozwoliła na weryfikację otrzymanych warstw pod kątem ich przydatności w medycynie w stosunku do powierzchni stosowanych dotychczas.

## 1. CEL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Celem badań było opracowanie nowych, osadzonych na stałym podłożu termoczulych warstw polimerowych do hodowli komórek skóry i bezinwazyjnego ich odczepiania w postaci arkusza.

Do otrzymania warstw wybrano termowrażliwe (ko)polimery glicydołu i kopolimery oksazolin ze względu na ich nietoksyczność względem komórek skóry, łatwość sterowania właściwościami i łatwość immobilizacji do podłoża. Postanowiono, że warstwy tych polimerów na podłożu stałym zostaną otrzymane techniką „szczepienia do”, która pozwala na uzyskanie warstwy o dobrze zdefiniowanych właściwościach.

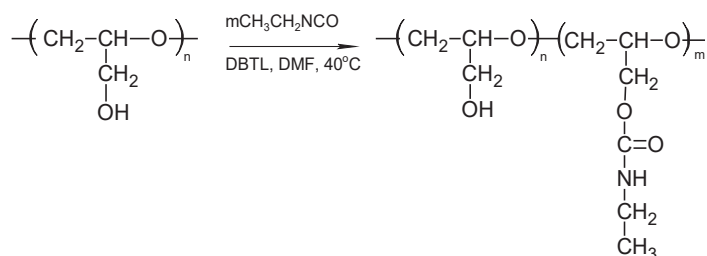
## 2. OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

Praca była podzielona na następujące etapy:

- synteza, charakterystyka i zbadanie cytotoksyczności wrażliwych na temperaturę polimerów opartych na glicydolu i 2-podstawionych-2-oksazolinach,
- immobilizacja termowrażliwych polimerów na funkcjonalizowanym podłożu stałym (szklanym i krzemowym),
- charakterystyka warstwy polimerowej (badanie morfologii, powinowactwa do wody, grubości, reakcji na zmiany temperatury),
- hodowla fibroblastów na otrzymanych powierzchniach oraz próby ich odcepienia w postaci arkusza pod wpływem obniżonej temperatury,
- określenie wpływu właściwości podłoża na adhezję, proliferację i odcepienie komórek skóry.

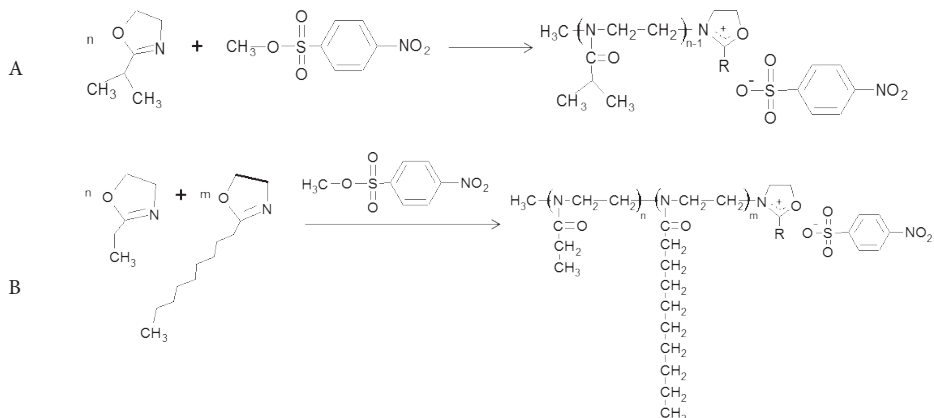
### 2.1. SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA TERMOWRAŻLIWYCH POLIMERÓW

**Liniowy poliglicydol** otrzymano na drodze polimeryzacji koordynacyjnej eteru 2,3-epoksypropylo-(1-etoksy)etylowego, inicjowanej częściowo zhydrolizowanym dietylocynkiem ( $\text{ZnEt}_2/\text{H}_2\text{O}$ , 1:0,8). Grupy etoksyetylowe, zabezpieczające grupy hydroksylowe podczas polimeryzacji glicydolu, zostały usunięte przez hydrolizę w środowisku kwaśnym. Tak otrzymany polimer nie wykazuje termowrażliwości. Wiadomo, że hydrofobowa modyfikacja poliglicydolu grupami octanowymi i etylokarbaminowymi prowadzi do otrzymania polimerów termowrażliwych [6]. Przeprowadzono więc reakcję modyfikacji grup hydroksylowych poliglicydolu izocyjanianem etylu, wprowadzając do łańcucha grupy etylokarbaminowe (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat modyfikacji poliglicydolu za pomocą etyloizocyjanianu  
 Figure 2. Modification of polyglycidol with ethyl isocyanate

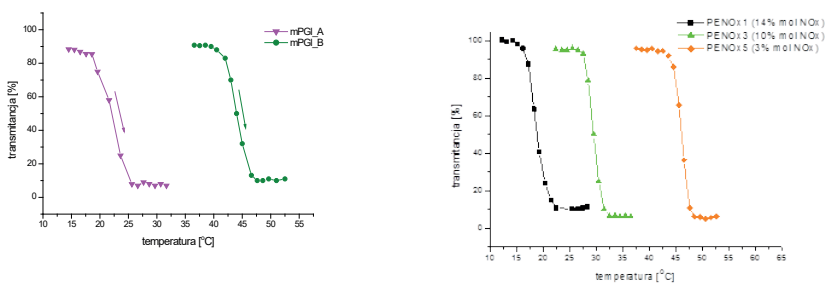
**(Ko)polimery 2-oksazolin** otrzymano na drodze kationowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia 2-izopropylo-2-oksazoliny (IPOx) oraz 2-etylo- (EOx) i 2-nonylo-2-oksazoliny (NOx) stosując 4-nitrobenzenosulfonian metylu jako inicjator, zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [7, 8] (Rys. 3).



Rysunek 3. Otrzymywanie homopolimeru 2-izopropyl-2-oksazoliny (A) oraz kopolimeru 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny (B)

Figure 3. Synthesis of 2-isopropyl-2-oxazoline (A) and copolymer of 2-ethyl- and 2-nonyl-2-oxazoline (B)

Otrzymano szereg kopolimerów glicydotu (mPGI) i 2-oksazolin (PENOX, PIPOX) o różnym składzie i masach molowych. Masy molowe otrzymanych polimerów wyznaczone techniką chromatografii żelowej z detekcją wielokątowego rozpraszania światła (GPC MALLS) były zgodne z wartościami teoretycznymi. Obserwowano wąski i monomodalny rozkład mas molowych. Strukturę i skład otrzymanych kopolimerów potwierdzono techniką  $^1\text{H}$  NMR. Oznaczony eksperymentalnie skład kopolimerów był zgodny z założeniami teoretycznymi. Otrzymane kopolimery wykazywały termowrażliwość – obserwowano zmianę transmitancji ich roztworów wodnych i w pożywce do hodowli komórek w funkcji temperatury (Rys. 4).



Rysunek 4. Transmitancja w funkcji temperatury dla wybranych polimerów rozpuszczonych w pożywce hodowlanej (5 g/L,  $\lambda = 700$  nm)

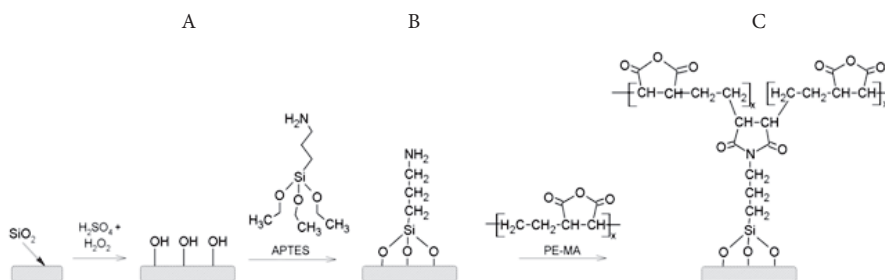
Figure 4. Transmittance – temperature curves for chosen polymers dissolved in cell culture medium

Otrzymane termowrażliwe (ko)polimery glicydotu i 2-oksazolin nanoszono w dalszym etapie prac na podłoże stałe.



## 2.2. SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA TERMOWRAŻLIWYCH WARSTW POLIMEROWYCH NA PODŁOŻACH

Termowrażliwe warstwy otrzymano metodą „szczępienia do”. W tym celu uprzednio syntezowane i scharakteryzowane polimery nanoszono na podłoże zawierające odpowiednie grupy funkcyjne. Funkcjonalizacja podłoża obejmowała hydroksylację (Rys. 5A), aminosililowanie (Rys. 5B) oraz immobilizację tzw. warstwy pośredniej poli(etylenu-*alt*-bezwodnika maleinowego) (PE-MA) (Rys. 5C).

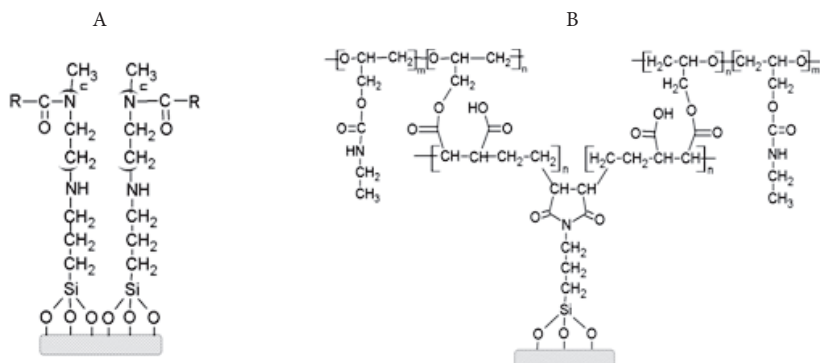


Rysunek 5. Etapy modyfikacji podłoża: hydroksylacja (A), aminosililowanie (B), wprowadzenie warstwy poli(etylenu-*alt*-bezwodnika maleinowego) (C)

Figure 5. Surface modification steps: hydroxylation (A), aminosililation (B), the intermediate layer of poly(ethylene-*alt*-maleic anhydride) (C)

Pokażymy etapie modyfikacji obecność grup funkcyjnych na podłożach potwierdzono techniką spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Wraz z postępem modyfikacji obserwowano wzrost chropowatości i zwilżalności podłoża.

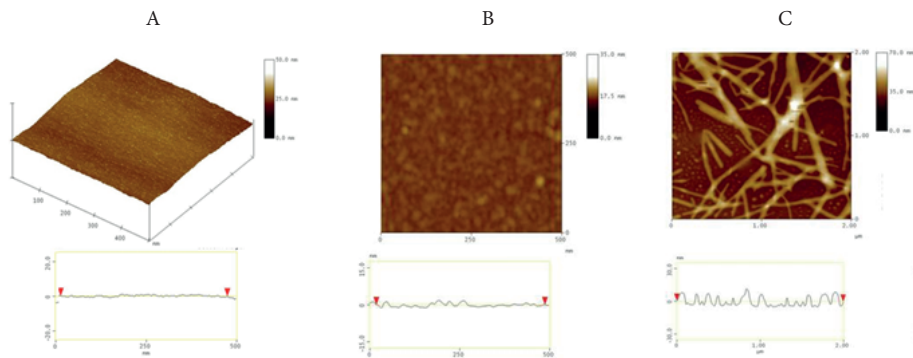
W wypadku termowrażliwych polioksazolin, żyjący koniec łańcucha polimeru terminowano grupami aminowymi na podłożu (Rys. 5B). Otrzymano w ten sposób warstwę o strukturze szczotek (Rys. 6A). Natomiast warstwa PE-MA (Rys. 5C) służyła do związania z podłożem termowrażliwej pochodnej poliglicydu, w wyniku czego otrzymano warstwy polimerowe o łańcuchach wielokrotnie przyczepionych do powierzchni (Rys. 6B).



Rysunek 6. Warstwa poli(2-oksazolin) o strukturze szczotek (A), warstwa pochodnej poliglicydotu (B)  
 Figure 6. Poly(2-oxazoline) layer of “brush” structure (A), layer of polyglycidol derivative (B)

Analiza składu powierzchni techniką FT-IR potwierdziła obecność termowrażliwych polimerów szczepionych na podłożu. Morfologię warstw badano za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM). Warstwy poliglicydotu miały strukturę gładkiego, regularnego filmu (Rys. 7A) o grubości od 20 do 60 nm. Ze wzrostem stężenia roztworu polimeru nanoszonego na podłoże zwiększała się chropowatość powierzchni oraz grubość warstwy.

Stosując kopolimer PENOX otrzymano warstwy o chropowatej strukturze (Rys. 7B). Chropowatość warstwy zwiększała się wraz ze wzrostem masy molowej kopolimeru oraz z zawartością hydrofobowej 2-nonylo-2-oksazolinylu w łańcuchu. Na powierzchniach warstw PIPOx występowały zarówno gładkie obszary, jak i podłużne struktury – pojedyncze lub połączone w większe skupiska, kształtem przypominające fibryle (Rys. 7C). Wykazano, że fibrylarne struktury utworzone zostały przez kryształity PIPOx zaadsorbowane na powierzchni warstwy. Zawartość kryształitów na powierzchni kontrolowano poprzez zmiany czasu polimeryzacji 2-izopropylu-2-oksazolinylu.



Rysunek 7. Morfologia otrzymanych warstw mPGL (A), PENOX (B) i PIPOx (C)  
 Figure 7. The morphology of obtained layers: mPGL (A), PENOX (B) and PIPOx (C)

Badano termowrażliwość otrzymanych warstw polimerowych na podłożach stałych. Zmiana konformacji termowrażliwych makrocząsteczek na podłożu, spowodowana podwyższeniem temperatury, prowadzi do odwracalnej dehydratacji łańcuchów, w wyniku czego warstwa polimerowa zmniejsza swoją zwilżalność, kurczy się i przylega do podłoża. Badano grubość warstwy oraz jej zwilżalność w temperaturze poniżej i powyżej temperatury przejścia fazowego immobilizowanego polimeru. Do tego celu wykorzystano elipsometrię i pomiar kąta zwilżania.

Wszystkie warstwy inkubowane w wodzie w temperaturze 20°C wykazywały zwiększone powinowactwo do wody przy jednoczesnym zwiększeniu grubości warstwy w porównaniu z warstwami suchymi. Woda przenika w obszary międzycząsteczkowe polimeru i solwatuje łańcuchy. Warstwa polimeru wykazuje wysokie powinowactwo do niej i pęcznieje. Wartość kąta zwilżania dla inkubowanych w wodzie warstw mPGL wynosiła od 30 do 60° w zależności od grubości warstwy polimerowej, dla warstw PENOX od 50 do 56° w zależności od zawartości hydrofobowej 2-nonylo-2-oksazoliny w kopolimerze tworzącym warstwę oraz dla warstw PIPOx od 54 do 61° w zależności od stopnia pokrycia krystalitami. Jednocześnie obserwowano zwiększenie grubości wszystkich warstw podczas inkubacji w wodzie w temperaturze 20°C.

Po określonym czasie inkubacji w wodzie zwiększono temperaturę powyżej  $T_{CP}$  immobilizowanych kopolimerów. Spowodowało to zmniejszenie się grubości warstw PIPOx i PENOX wywołane kurczeniem się łańcuchów polimerowych na powierzchni. Największą zmianę grubości wykazywały warstwy PIPOx o zawartości krystalitów do 40%. Dla wszystkich warstw zaobserwowano również zmniejszenie powinowactwa do wody. Powyżej temperatury przejścia fazowego woda usuwana jest z wnętrza warstwy, powierzchnia staje się hydrofobowa, czemu towarzyszy podwyższenie kąta zwilżania.

Nietypowo na zmianę temperatury reagowały warstwy mPGL. Wzrost temperatury powyżej punktu zmętnienia polimeru powodował dalszy, choć nieznaczny wzrost grubości warstw. Badany w pracy termowrażliwy łańcuch kopolimeru zawierający wiele grup funkcyjnych wiąże się z podłożem w wielu miejscach (Rys. 6B). Taka warstwa może zupełnie inaczej reagować na zmiany temperatury niż warstwy o strukturze szczotek [9]. Pomimo że warstwy mPGL w temperaturze powyżej  $T_{CP}$  ulegają dehydratacji i zmieniają swoją filowość, to jednak usuwaniu wody z ich wnętrza musi towarzyszyć częściowe rozciąganie łańcuchów prowadzące do wzrostu grubości warstwy.

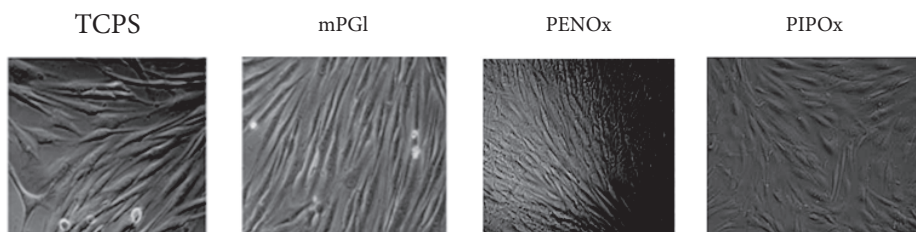
Zmiany kątów zwilżania i grubości warstw pod wpływem temperatury potwierdziły, że otrzymane warstwy są termowrażliwe.

### 2.3. ODDZIAŁYWANIE POLIMERÓW I WARSTW POLIMEROWYCH Z KOMÓRKAMI SKÓRY

W pracy jako modelowe komórki do badań oddziaływania z termowrażliwymi warstwami polimerowymi zastosowano komórki skóry. Hodowle komórek skóry w formie arkuszy mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu ran i oparzeń. Istotnym postępowaniem w leczeniu oparzeń jest możliwość stosowania arkuszy komórek spojonych macierzą zewnątrzkomórkową, a nie zawiesiny pojedynczych komórek. Wyhodowanie *in vitro* komórek naskórka lub skóry właściwej w postaci płata i jego nałożenie bezpośrednio na ranę to alternatywa, która mogłaby znacznie skracać proces gojenia.

W pracy przeprowadzono hodowlę i próby odczepiania arkusza komórek skóry – fibroblastów, z wykorzystaniem termowrażliwych powierzchni mPGL, PENOX i PIPOx. W pierwszym etapie zbadano wpływ tych polimerów na żywotność komórek. W pracy do oceny przeżywalności fibroblastów w obecności termowrażliwych pochodnych poliglicydołu i polioksazolin zastosowano standardowy test metaboliczny Alamar Blue [10]. Wykazano, że badane polimery nie były toksyczne w stosunku do fibroblastów w szerokim zakresie stosowanych stężeń, co pozwoliło na ich wykorzystanie do hodowli tych komórek.

Następnie fibroblasty wysiewano na termowrażliwe warstwy mPGL, PENOX i PIPOx w temperaturze 37°C (powyżej  $T_{CP}$  polimerów). Po określonym czasie hodowli obliczano odsetek komórek, które uległy adhezji do termowrażliwej warstwy kopolimeru. Próbkę kontrolną stanowiła hodowla fibroblastów na podłożu stosowanym standardowo w laboratoriach medycznych i biologicznych – modyfikowanym polistyrenie (TCPS). W temperaturze prowadzenia hodowli fibroblasty ulegały adhezji i rozplaszczaniu na badanych podłożach. Po 24 godzinach hodowli na wszystkich badanych warstwach komórki osiągnęły pełną konfluencję (cała powierzchnia wzrostowa warstw była porośnięta przez komórki). Utworzony został zwarty arkusz komórek, w obrębie którego komórki ściśle przylegały do siebie i były połączone macierzą zewnątrzkomórkową. W wypadku warstw PIPOx obecność krystalitów na warstwach sprzyjała adhezji komórek. Fibrylarne krystality podobne są kształtem do włóknistych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen, elastyna, fibronektyna czy laminina, przez co mogą imitować naturalne warunki wzrostu komórek. Przestrzenna sieć krystalitów, na której rosną fibroblasty, może dodatkowo ułatwiać przepływ substancji odżywczych do komórek oraz metabolitów z komórek do macierzy, co sprzyja proliferacji komórek. Na Rysunku 8 porównano przykładowy arkusz komórek wyhodowany na TCPS po 24 godzinach oraz arkusze wyhodowane na termowrażliwych warstwach mPGL, PENOX i PIPOx.

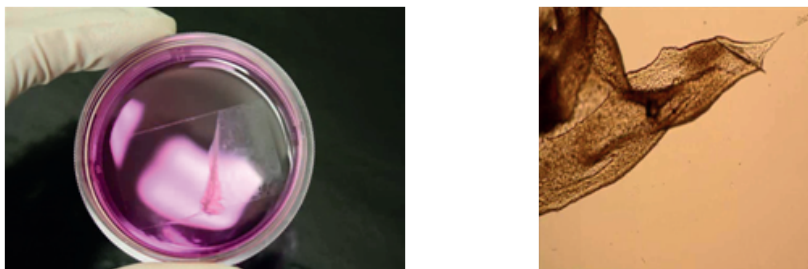


Rysunek 8. Porównanie arkusza komórek wyhodowanego na TCPS, PENOx i PIPOx i po 24 godzinach hodowli

Figure 8. Comparison of cell sheets cultured on TCPS PENOx and PIPOx after 24 hours of culture

Po osiągnięciu przez fibroblasty pełnej konfluencji przeprowadzono próby indukowanego termicznie odzepienia jednolitego arkusza fibroblastów od termowrażliwych warstw. W tym celu obniżono temperaturę hodowli do 20°C w wypadku warstw mPGL i PIPOx oraz do 15°C w wypadku warstw PENOx. W tych warunkach warstwy są dehydratowane. Pod wpływem fizykochemicznych zmian właściwości podłoża, na którym znajdują się komórki, zmienia się charakter oddziaływań białek i innych składników ECM z podłożem, co jest koniecznym bodźcem zapoczątkowującym proces odzepiania komórek od podłoża. Dla żadnej z badanych warstw mPGL po obniżeniu temperatury hodowli do 20°C nie zaobserwowano efektu samoczynnego odzepiania arkusza fibroblastów. Było to najprawdopodobniej spowodowane specyficzną reakcją warstwy na zmianę temperatury. Spośród wszystkich otrzymanych warstw PENOx, tylko dla jednej powierzchni zaobserwowano samoczynne, indukowane termicznie odzepianie arkusza komórek. Powierzchnia ta charakteryzowała się najbardziej chropowatą strukturą i najmniejszym powinowactwem do wody i wykazywała największą różnicę w kątach zwilżania pomiędzy stanem hydratowanym a dehydratowanym. W wypadku warstwy PIPOx o stopniu pokrycia krystalitami 40%, natychmiast po obniżeniu temperatury zaobserwowano odzepianie się fragmentu arkusza fibroblastów. Po około 15 minutach fibroblasty uległy całkowitemu odzepieniu, tworząc oddzielony, zwinięty arkusz (Rys. 9). W wypadku warstw PIPOx o stopniu pokrycia krystalitami 70%, a także warstw, z powierzchni których usunięto krystality, nawet po całonocnej inkubacji w temperaturze 20°C nie obserwowano efektu odzepiania arkusza fibroblastów. Zaobserwowano, że doszło jedynie do odklejenia pojedynczych komórek i fragmentów arkusza. Przeprowadzone badania wskazują, że obecność pewnej liczby krystalitów sprzyja odzepianiu arkusza.

Arkusz fibroblastów podczas samoczynnego odzepiania ulegał zwijaniu (Rys. 9). Aby zapobiec zwijaniu się arkusza użyto narzędzi do wspomaganie odzepiania i przenoszenia komórek. W tym celu zastosowano trzy różne opatrunki biologiczne w postaci membran: krążek kolagenowy, syntetyczny naskórek „Suprathel” składający się z kopolimeru laktydu, węglanu trimetylenu i  $\epsilon$ -kapolaktonu oraz opatrunek hydrożelowy „Aqua-Gel”, w skład którego wchodzi poliwinylpirolidon, glikol polietylenowy i agar.



Rysunek 9. Odklejanie arkusza fibroblastów od warstwy PIPOx w temperaturze 20°C (rysunek lewy) oraz zwinięty arkusz fibroblastów odczepiający się od tej warstwy (rysunek prawy)

Figure 9. Detachment of fibroblast sheet from PIPOx layer at temperature 20 °C (left) and rolling of fibroblast sheet during detachment (right)

Membrany nanoszono na arkusz fibroblastów wyhodowany na termowrażliwej warstwie w temperaturze 37°C. Po przyczepieniu się komórek do danej membrany obniżono temperaturę hodowli poniżej  $T_{CP}$ . Po 15 minutach podnoszono membranę z przyczepioną warstwą komórek i przenoszono arkusz do wyjałowionych naczyń hodowlanych. Doświadczenia z wykorzystaniem membran dowiodły, że ich użycie ułatwia odczepienie i umożliwia przeniesienie arkusza fibroblastów w nienaruszonej formie.

## WNIOSKI

W ramach pracy opracowano termowrażliwe warstwy wykorzystując pochodne poliglicydolu i (ko)polimery oksazolin na podłożach stałych do hodowli i bezinwazyjnego odczepiania komórek skóry w postaci arkusza.

Termowrażliwe kopolimery glicydolu i etylokarbaminianu glicydylu, 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny oraz homopolimery 2-izopropyl-2-oksazoliny nie wykazywały toksyczności względem fibroblastów.

Funkcjonalizacja powierzchni krzemu i szkła pozwoliła na wprowadzenie na podłoże reaktywnych grup funkcyjnych, zdolnych do reakcji z polimerem. W wyniku reakcji kompatybilnych grup podłoża i polimeru metodą „szczępienia do” utworzone zostały stabilne warstwy. Warstwa poliglicydolu składała się z łańcuchów polimerowych, przyczepionych do podłoża w wielu miejscach wzdłuż łańcucha. Warstwy polioksazolin miały strukturę szczotkową.

Ustalono, że struktura i grubość warstwy poliglicydolu zależy od warunków szczępienia i stężenia roztworu polimeru stosowanego podczas nanoszenia polimeru. Otrzymano warstwy o grubości od 20 do 60 nm. O chropowatości warstw kopolimerów 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny i ich powinowactwie do wody decydowała zawartość hydrofobowej NOx w łańcuchu. Warstwy poli(2-izopropyl-2-oksazoliny) były pokryte zaadsorbowanymi krystalitami w kształcie fibryli, a ich liczba zależała od czasu polimeryzacji PIPOx w acetonitrylu. Stopień pokrycia



powierzchni krystalitami można kontrolować stosując odpowiednie procedury (stopienie, zamorfizowanie i wymycie). Powinowactwo warstw PIPOx do wody zmniejszało się ze zwiększającą ilością krystalitów na podłożu.

Wszystkie otrzymane nanometrowe warstwy były termowrażliwe i zmieniały swój charakter z hydrofilowego na hydrofobowy wraz ze wzrostem temperatury powyżej temperatury zmętnienia immobilizowanych (ko)polimerów. Dzięki tym właściwościom otrzymane warstwy mogły być zastosowane do hodowli i odczepiania komórek.

W temperaturze hodowli, 37°C, fibroblasty dokonywały adhezji do wszystkich warstw, i w ciągu 24 godzin tworzyły jednolity, zwarty arkusz, w obrębie którego ściśle przylegały do siebie i były połączone macierzą zewnątrzkomórkową. Po obniżeniu temperatury poniżej  $T_{CP}$  gdy warstwy wykazywały właściwości hydrofilowe, arkusz fibroblastów samoczynnie odczepił się od warstw (ko)polioksazolin. Najszybciej (w czasie 15 minut od obniżenia temperatury) arkusz fibroblastów odczepiał się od warstwy poli(2-izopropyl-2-oksazolin), której powierzchnia była w 40% pokryta krystalitami. Badania wykazały, że obecność pewnej liczby krystalitów sprzyja odczepianiu arkusza fibroblastów od warstw poli(2-izopropyl-2-oksazolin). Arkusz nie odczepia się samoczynnie ani od w pełni amorficznej warstwy PIPOx, ani wtedy, gdy na powierzchni znajduje się zbyt wiele hydrofobowych krystalitów. Spośród warstw PENOX, najszybsze odczepianie fibroblastów obserwowano w wypadku powierzchni o najwyższej chropowatości oraz najmniejszym powinowactwie do wody. Nie obserwowano samoczynnego odczepiania arkusza fibroblastów od warstw poli(glicydolu-co-etylokarbaminianu glicydyłu).

Stwierdzono, że zastosowanie narzędzi w postaci syntetycznego naskórka, opatrunku hydrożelowego lub krążka kolagenowego wspomaga odczepianie i umożliwia przenoszenie arkuszy fibroblastów w niezmienionej formie.

## PODZIĘKOWANIE

Praca była współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, projekt DERMOSTIM, UDA-POIG.01.03.01-00-088/08

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Heskins, J.E. Guillet, J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem., 1968, **2**, 1444.
- [2] T. Chen, R. Ferris, J. Zhang, R. Ducker, S. Zauscher, Prog. Polym. Sci., 2010, **35**, 94.
- [3] T. Takezawa, Y. Mori, K. Yoshizato, Biol. Technol., 1990, **8**, 854.
- [4] N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, Makromol. Chem. Rapid Commun., 1990, **11**, 571.
- [5] L.Q. Chu, X.N. Zou, W. Knoll, R. Förch, Surf. Coat. Tech., 2008, **202**, 2047.
- [6] M. Jamróz-Piegeza, A. Utrata-Wesołek, B. Trzebicka, A. Dworak, Eur. Polym. J., 2006, **42**, 2497.
- [7] K. Aoi, M. Okada, Prog. Polym. Sci., 1996, **21**, 151.

- [8] M.W.M. Fijten, J.M. Kranenburg, H.M.L. Thijs, R.M. Paulus, B.M. van Lankvelt, J. de Hullu, M. Springintveld, D.J.G. Thielen, C.A. Tweedie, R. Hoogenboom, K.J. Van Vliet, U.S. Schubert, *Macromolecules*, 2007, **40**, 5879.
- [9] T. Chen, R. Ferris, J. Zhang, R. Ducker, S. Zauscher, *Prog. Polym. Sci.*, 2010, **35**, 94.
- [10] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 5421.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 stycznia 2017