



## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Barbara Kupikowska-Stobba

**Tytuł rozprawy: “A one-step electrostatic method for encapsulation of cells in alginate-polyethersulfone microcapsules”**

Tytuł w języku polskim: „Jednoetapowa elektrostatyczna enkapsulacja komórek w mikrokapsułkach alginianowo-polieterosulfonowych”

Promotor: dr hab. inż. Dorota Lewińska, prof. nadzw. IBIB PAN

W niniejszej rozprawie przedstawiono badania nad opracowaniem nowej jednoetapowej elektrostatycznej metody enkapsulacji komórek w mikrokapsułkach alginianowo-polieterosulfonowych. Metoda ta jest oparta na technice elektrostatycznego formowania kropeł, wykorzystującej głowicę trójdyszową, umożliwiającą wytwarzanie trójwarstwowych kropeł poprzez jednoczesne tłoczenie trzech cieczy. W metodzie tej, w celu zmniejszenia średnicy kropeł, generator wysokiego napięcia dostarcza do głowicy impulsy napięcia o regulowanej amplitudzie, czasie trwania i częstotliwości. Trójwarstwowe krople ulegają zestaleniu w wodnej łaźni żelującej, zawierającej jony  $\text{Ca}^{2+}$  i surfaktant, tworząc mikrokapsułki złożone z biokompatybilnego hydrożelowego rdzenia oraz polimerowej membrany półprzepuszczalnej.

W związku z opisywanym w literaturze problemem niskiej stabilności mikrokapsulek alginianowo-polilizynowych, najczęściej stosowanych do celów mikroenkapsulacji komórek, jako materiał membrany wykorzystano biokompatybilny polimer syntetyczny o wysokiej odporności mechanicznej i chemicznej – polieterosulfon. Zastosowana technika mikroenkapsulacji wyróżnia się na tle innych metod elektrostatycznych zwiększoną liczbą zmiennych parametrów procesu. Wpływ tych parametrów na właściwości otrzymywanych mikrokapsulek alginianowo-polieterosulfonowych nie był dotychczas znany. Z tego względu, za pierwszy cel badań obrano określenie zależności pomiędzy zmiennymi parametrami procesu enkapsulacji a wielkością, jednorodnością rozmiaru, kształtem i strukturą wewnętrzną mikrokapsulek. Badane parametry procesu obejmowały wartość napięcia, częstotliwość i czas trwania impulsów elektrycznych, przepływy cieczy formujących kroplę, skład roztworu membranotwórczego oraz napięcie powierzchniowe łaźni żelującej. Badania te wykazały, że wzrost wszystkich parametrów elektrycznych procesu powoduje spadek wielkości mikrokapsulek oraz jednorodności ich wielkości i kształtu. Jednocześnie zaobserwowano spadek tendencji do formowania nacieków polimerowych w obrębie membran, wskutek czego otrzymane membrany były bardziej jednorodne pod względem grubości. Wykazano, że dobierając odpowiednio wartości parametrów elektrycznych, można otrzymać mikrokapsułki o średnicach od 0,8 do 2,8 mm. Grubość membrany mikrokapsulek można zmieniać od 20 do ponad 500  $\mu\text{m}$ , zwiększając przepływ roztworu membranotwórczego lub/i zmniejszając przepływ cieczy rdzeniowej. Wielkość i strukturę porów membrany oraz kształt mikrokapsulek można modyfikować, zmieniając skład roztworu membranotwórczego.

Na geometrię mikrokapsulek w dużym stopniu wpływają również napięcie powierzchniowe łąźni żelującej oraz lepkość roztworu membranotwórczego. Stwierdzono, że stosując roztwór membranotwórczy o wystarczająco wysokiej lepkości mikrokapsułki o prawidłowej budowie (sferyczne, otoczone membraną o jednakowej grubości) można wytworzyć bez udziału surfaktantu. Przy średniej i niskiej lepkości roztworów membranotwórczych do prawidłowego formowania mikrokapsulek konieczne jest zmniejszenie napięcia powierzchniowego cieczy żelującej przy pomocy surfaktantu. W wyniku pierwszego etapu prac ustalono zakresy wartości zmiennych parametrów procesu, umożliwiające wytwarzanie mikrokapsulek o założonej strukturze, korzystnej z punktu widzenia enkapsulacji komórek tj. mikrokapsulek sferycznych, o niskim współczynniku zmienności średnic, pozbawionych deformacji i frakcji satelitarnej bardzo małych mikrokapsulek, o jednorodnych pod względem grubości membranach bez przewężeń i nacieków polimerowych.

Celem drugiego etapu prac była ocena przydatności opracowanej metody elektrostatycznej do enkapsulacji żywych komórek, a w szczególności zbadanie, czy proces elektrostatycznej mikroenkapsulacji nie upośledza zdolności enkapsulowanych komórek do namnażania się. W tym celu opracowano przy udziale autorki i opatentowano oryginalną metodę chemiczno-rozpuszczalnikową umożliwiającą odzyskanie ponad 97% komórek enkapsulowanych w kapsułkach alginianowo-polieterosulfonowych (z zachowaniem ich pełnej żywotności). Modelowe komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* enkapsulowano w mikrokapsułkach, hodowano w pożywce, uwalniano opracowaną metodą, a następnie oznaczano ich stężenie i żywotność. Wykazano, że opracowana metoda elektrostatycznej enkapsulacji pozwala na zachowanie wysokiej żywotności enkapsulowanych komórek modelowych (na poziomie powyżej 98%). Wytworzone tą metodą mikrokapsułki alginianowo-polieterosulfonowe umożliwiają swobodne namnażanie się enkapsulowanych komórek modelowych *in vitro*. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność opracowanej metody elektrostatycznej do celów enkapsulacji komórek oraz wskazują, że mikrokapsułki alginianowo-polieterosulfonowe stwarzają korzystne mikrośrodowisko dla komórek, w tym w szczególności dla komórek mikroorganizmów takich jak drożdże, a także potencjalnie bakterie (również genetycznie modyfikowane).

Różnorodność materiałów możliwych do zastosowania w procesie wytwarzania mikrokapsulek opracowaną metodą stwarza szerokie możliwości jej wykorzystania do celów biomedycznych i biotechnologicznych.