

Tomasz Machałowski  
Politechnika Poznańska  
Wydział Technologii Chemicznej

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

”  
*Naturalnie uformowane scaffoldy chitynowe: charakterystyka, funkcjonalizacja i  
praktyczne zastosowanie*  
”

Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski

Zrównoważony rozwój wciąż stanowi trudne zadanie. Nasze doświadczenia pokazują jednak, że najlepszym doradcą w rozwoju technologii przyjaznych środowisku jest sama natura, która stanowi niewyczerpane źródło inspiracji dla syntezy materiałów. Biokompatybilność, wysoka porowatość, odnawialność i bezpieczeństwo ekologiczne materiałów biologicznych predysponują je do stania się realną konkurencją dla materiałów syntetycznych. Chityna jest wśród nich jednym z najbardziej fascynujących przykładów. Niezwykła skala jej biosyntezy powoduje, że chitynę można znaleźć w ponad 70% wszystkich żywych organizmów na świecie. Jednak trudności w przetwarzaniu, jak choćby nierozpuszczalność, sprawiają, że jej zastosowanie jest bardzo ograniczone. Rozwiązaniem dla poprawy użyteczności chityny, może być możliwość jej zastosowania w postaci naturalnie uformowanej. Różnorodność unikalnych form szkieletów chitynowych, zwłaszcza u gąbek i pajęczaków, stanowi inspirację nie tylko do opracowania efektywnych technik izolacji, ale także umożliwia jej wykorzystanie ich jako komponentów nowych kompozytów 3D, do zastosowań w inżynierii tkankowej, biokatalizie i ochronie środowiska.

Przedstawiony przegląd literaturowy przedłożonej pracy doktorskiej ukazuje zagadnienia dotyczące stanu wiedzy z zakresu biomimetyki, inżynierii tkankowej oraz chemii chityny. W pierwszej części skupiono się na znaczeniu koncepcji biomimetyki, która zakłada tworzenie technologii i syntezę materiałów poprzez naśladowanie natury. Następnie szczególną uwagę zwrócono na trójwymiarowe rusztowania (scaffoldy), jako podłoża hodowlane dla zróżnicowanych kultur komórkowych. Dokładnie opisano kilka metod tworzenia i modyfikacji scaffoldów. Dodatkowo osobny rozdział poświęcono bioscaffoldom jako istotnemu obszarowi badawczemu współczesnej inżynierii tkankowej. Na koniec tej części zwrócono uwagę na znaczenie chityny z kilku punktów widzenia. Przeanalizowano chitynę pod kątem jej naturalnych źródeł występowania, metod izolacji, właściwości strukturalnych oraz potencjalnej użyteczności.

Hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej zakłada, że wykorzystanie alternatywnych źródeł chityny, takich jak szkielety gąbek morskich czy naskórków pająków, pozwoli na

otrzymanie funkcjonalnych trójwymiarowych rusztowań o unikalnym kształcie i właściwościach predysponujących je do syntezy biomateriałów na potrzeby inżynierii tkankowej oraz w zastosowaniach związanych z ochroną środowiska. W celu weryfikacji głównych założeń hipotezy wykonano kilka eksperymentów badawczych, które opisano w części wynikowej.

Doświadczenia zdobyte podczas eksperymentów nad izolacją chityny z gąbek morskich, pozwoliły na opracowanie nowej metody izolacji, wspomaganej mikrofalami. Korzyści płynące z zastosowania tej metody są niezwykle istotne, gdyż pozwala ona skrócić czas izolacji z około 7 dni (klasyczna izolacja chemiczna) do mniej niż 1 h. Inną zaletą, jest zmniejszenie objętości stosowanych odczynników oraz ich niższe stężenie. Ponadto, wyniki uzyskane podczas badań strukturalnych i fizykochemicznych wykazały brak negatywnego wpływu mikrofal na strukturę chemiczną chityny. Obserwacje poczynione podczas tej części badań, pozwoliły na wyselekcjonowanie czystego rusztowania chitynowego o unikalnym trójwymiarowym kształcie do dalszych zastosowań. Przykładowo, szkielety chitynowe z gąbki morskiej *Aplysina fistularis* zostały wykorzystane jako scaffoldy do hodowli komórek skóry keratynocytów (HaCaT) i fibroblastów (Balb/3T3, NHDF). Analiza cytotoksyczności potwierdziła, że przygotowany materiał nie wpływa negatywnie na morfologię i ultrastrukturę komórek. Specyficzne barwienie pozwoliło na lepsze zrozumienie procesu przyłączania i proliferacji komórek na chitynowym scaffoldzie. Dalsze badania skupiły się na funkcjonalizacji powierzchni matrycy chitynowej. Kolejny z opisanych eksperymentów umożliwił osadzanie węgla wapnia w postaci amorficznej i krystalicznego kalcytu, z wykorzystaniem hemolimfy ślimaka *Cornu aspersum*, jako czynnika biomineralizującego. Funkcjonalizacja ta wpłynęła na poprawę właściwości pożądanych, takich jak zwilżalność, chropowatość powierzchni czy odporność mechaniczna. Zmiany te wpłynęły korzystnie na zachowanie ludzkich komórek kostnych – osteoblastów (hFOB 1.19), podczas rozprzestrzeniania się i przyczepiania do scaffoldu. W kolejnym etapie pracy, podjęto się immobilizacji lakazy na trójwymiarowych chitynowych szkieletach izolowanych z gąbki morskiej *Aplysina archeri*. Stworzony system biokatalityczny był w stanie usunąć tetracyklinę z roztworu wodnego z blisko 100% wydajnością (w zależności od warunków procesu). W dalszej części pracy przedstawiono analizę potencjału aplikacyjnego kompozytu chityna-Ag/AgBr, jako efektywnego materiału filtracyjnego o właściwościach antybakteryjnych. Przeprowadzone badania dowiodły, że blisko 100% bakterii *Escherichia coli* zostało zdezaktywowanych w szóstej godzinie trwania eksperymentu.

Ostatnia część przedłożonej pracy doktorskiej skupia się wokół charakterystyki i wykorzystania rusztowań chitynowych pochodzących z naskórków pajaków *Caribena versicolor* i *Avicularia sp. Peru purple*. Należy podkreślić, że mimo bioróżnorodności i liczebności, pająki przez wiele lat były pomijane w doniesieniach naukowych jako potencjalne źródło chityny. W związku z tym, aspekt aplikacyjny tego materiału zaproponowane w tym rozdziale został opisany po raz pierwszy. Wyniki charakterystyki fizykochemicznej pozwoliły na potwierdzenie obecności wysokiej czystości  $\alpha$ -chityny. Wstępne eksperymenty nad wykorzystaniem rurkowych scaffoldów chitynowych, jako strukturalnego wsparcia dla hodowli ludzkich kardiomiocytów (iPSC-CMs) dały bardzo intrygujące wyniki. Długotrwałe obserwacje pozwoliły na scharakteryzowanie kolejnych etapów powstawania nowej tkanki. Od prostego rozprzestrzeniania się komórek, poprzez tworzenie wyższych grup, aż po

tworzenie kurczliwych włókien mięśniowych wewnątrz chitynowego podłoża. W kolejnym etapie, wykorzystano wysoką hydrofobowość oskórka pajęczego, która stała się inspiracją do wykorzystania go jako sorbentu ropy naftowej. Dane eksperymentalne określiły pojemność sorpcyjną ropy naftowej na poziomie 16,6 g/g, co czyni ten chitynowy materiał atrakcyjnym, w porównaniu z innymi naturalnymi sorbentami pochodzenia zwierzęcego.

Wyniki przedstawione w ramach przedłożonej pracy doktorskiej potwierdziły osiągnięcie założonych celów badawczych i uzasadniają postawioną hipotezę badawczą. Gorąco wierzę, że wysiłek przedstawiony w niniejszej rozprawie, będzie iskrą do dalszych działań naukowych i poszerzy świadomość na temat właściwości i możliwości aplikacyjnych chityny w postaci naturalnie uformowanej.

28.09.12 

data i podpis autora