



**UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH**

**SZKOŁA DOKTORSKA**

**SEKCJA NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE**

**DYSCYPLINA NAUKI BIOLOGICZNE**

**Monika Sikora**

**SYNTEZA NOWYCH MATERIAŁÓW NA BAZIE CHITOZANU ORAZ  
ICH WYBRANE ZASTOSOWANIA W BIOTECHNOLOGII  
I MEDYCYNIE**

**Praca doktorska napisana  
pod kierunkiem**

**dr hab. Michała Arabskiego, prof. UJK  
promotor**

**i**

**dr Marii Wiśniewskiej-Wrony  
promotor pomocniczy**

**Kielce rok 2023**

Badania zrealizowano w ramach projektu:

**„AKCELERATOR ROZWOJU** *Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach*”,  
nr POWR.03.05.00-00-Z212/18, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej  
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

*Serdeczne podziękowania kieruję do:*

*promotora, prof. dr hab. Michała Arabskiego, za wnikliwą opiekę merytoryczną na każdym etapie powstawania tej pracy, cenne uwagi, poświęcony czas, ogromną życzliwość i optymizm,*

*promotora pomocniczego, dr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony za cenne uwagi merytoryczne w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz dzielenie się swą wiedzą i doświadczeniem,*

*prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy z Uniwersytetu Wrocławskiego za inspirującą współpracę naukową oraz udostępnienie materiałów i aparatury badawczej,*

*prof. Samuela Hudsona z North Carolina State University za współpracę naukową, udostępnienie surowca do badań oraz ogromną życzliwość i wsparcie merytoryczne,*

*Kolegów i Koleżanek z zespołu za ich wsparcie, zrozumienie i okazaną przyjaźń,*

*Szczególne podziękowania składam moim najbliższym, kochanym Rodzicom, Bratu oraz Partnerowi, których ogromna miłość, wiara we mnie, wsparcie w trudnych chwilach i cierpliwość przyczyniły się do powstania tej pracy.*

## Spis treści

Wykaz skrótów i oznaczeń	1
1. Wprowadzenie	4
2. Charakterystyka fizykochemiczna chitozanu	5
3. Właściwości biologiczne chitozanu o znaczeniu medycznym	9
3.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa chitozanu	9
3.2. Chitozan jako przeciwutleniacz	10
3.3. Właściwości przeciwzapalne chitozanu	11
3.4. Działanie przeciwnowotworowe chitozanu	11
3.5. Właściwości hemostatyczne chitozanu	12
4. Wybrane zastosowanie praktyczne chitozanu	13
4.1. Chitozan w biologii	14
4.1.1. Oczyszczanie białek rekombinowanych	15
4.2. Chitozan w medycynie	18
4.2.1. Opatrunki przeciwbakteryjne i hemostatyczne	19
4.2.2. Inżynieria tkankowa	21
4.2.3. Systemy podaży leków	23
5. Uzasadnienie podjęcia tematu	25
6. Cel pracy	26
7. Materiały i metody	26
7.1. Materiały	26
7.2. Metody	27
7.2.1. Parametry fizykochemiczne chitozanu	27
7.2.2. Synteza polimerowych granulek na bazie chitozanu (ChbM-g)	29
7.2.3. Synteza macierzy chitozanowej o strukturze gąbki (ChbM-s)	31
7.2.4. Synteza matrycy chitozanowej (Matrix) jako nośnika dla bakteriofagów	33
7.2.5. Parametry fizykochemiczne i mechaniczne ChbM-g, ChbM-s i Matrix	35
7.2.6. Skaningowa mikroskopia elektronowa	37
7.2.7. Test LAL	37
7.2.8. Oczyszczanie rekombinowanych białek fagowych	38
7.2.9. Rozdział elektroforetyczny białek fagowych metodą SDS-PAGE	38
7.2.10. Badanie aktywności enzymatycznej oczyszczonych białek fagowych	39
7.2.11. Analiza cytotoksyczności ChbM-g i ChbM-s	39

7.2.12. Analiza termograwimetryczna ChbM-g i ChbM-s metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (TG-DSC)	40
7.2.13. Analiza struktury ChbM-s, ChbM-g i Matrix techniką spektroskopii Fourierowskiej w podczerwieni (FT-IR)	40
7.2.14. Analiza profili uwalniania bakteriofagów z Matrix polimerowej techniką interferometrii laserowej	41
7.2.15. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej Matrix modyfikowanej bakteriofagami	42
7.2.16. Analiza statystyczna danych	43
8. Wyniki	43
8.1. Parametry fizykochemiczne chitozanu	43
8.2. Parametry fizykochemiczne i mechaniczne ChbM-g, ChbM-s i Matrix	45
8.3. Analiza strukturalna powierzchni ChbM-g, ChbM-s i Matrix metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	54
8.4. Wybór matryc wiążących LPS	56
8.4.2. Oczyszczanie rekombinowanych białek fagowych z użyciem wybranych matryc	57
8.4.2.1. Rozdział elektroforetyczny białek fagowych metodą SDS-PAGE	59
8.4.2.2. Ocena aktywności enzymatycznej oczyszczonych białek fagowych	60
8.4.2.3. Analiza termograwimetryczna ChbM-g* i ChbM-s* metodą TG-DSC	62
8.4.2.4. Analiza cytotoksyczności ChbM-g* i ChbM-s*	66
8.4.2.5. Charakterystyka oddziaływania ChbM-g* i ChbM-s* z LPS metodą FT-IR	67
8.4.3. Opatrunek chitozanowy modyfikowany bakteriofagami	70
8.4.3.1. Analiza profili uwalniania bakteriofagów z Matrix polimerowej techniką interferometrii laserowej	70
8.4.3.2. Oddziaływanie fagów ze składnikami Matrix 3 mierzona metodą FT-IR	71
8.4.3.3. Badanie aktywności antybakteryjnej fagów w Matrix polimerowej	73
9. Dyskusja	75

9.1. Matryce do oczyszczania rekombinowanych białek fagowych z lipopolisacharydu	75
9.2. Opatrunek chitozanowy z dodatkiem bakteriofagów o działaniu przeciwbakteryjnym	78
10. Wnioski	82
11. Streszczenie	83
12. Summary	85
13. Bibliografia	87
14. Dorobek naukowy	97

## Wykaz skrótów i oznaczeń

A549	(ang. <i>human basal epithelial adenocarcinoma cells</i> ); linia ludzkich komórek nabłonka podstawnego gruczolakoraka
AMPK	(ang. <i>5'AMP-activated protein kinase</i> ); kinaza aktywowana 5'AMP
ATCC	(ang. <i>American Type Culture Collection</i> ); kolekcja kultur typu amerykańskiego
CAERR	(ang. <i>Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin</i> ); komercyjna żywica do oczyszczania białek z endotoksyn
CD14	(ang. <i>Cluster of Differentiation 14</i> ); białko, nieswoistego układu immunologicznego
CFU	(ang. <i>Colony-forming Unit</i> ); jednostka tworząca kolonię
ChbM-g	(ang. <i>Chitosan-based Matrix-granulates</i> ); matryca chitozanowa w formie granulatu
ChbM-s	(ang. <i>Chitosan-based Matrix-sponge</i> ); matryca chitozanowa w formie gąbki
chit1	medyczny chitozan krewetkowy ChitoClear fg 95 (TM 4293) firmy Primex ehf
chit2	medyczny chitozan krewetkowy ChitoClear fg 95 44000 firmy Primex ehf, dodatkowo oczyszczony metodą plazmy niskotemperaturowej
CMC	(ang. <i>Carboxymethylcellulosum</i> ); karboksymetyloceluloza
COS	(ang. <i>Chitooligosaccharides</i> ); chitooligosacharydy, oligomery chitozanu
COX-2	(ang. <i>Cyclooxygenase-2</i> ); cyklooksygenaza 2
cP	(fr. <i>centipoise</i> ); centypuaz, jednostka lepkości dynamicznej, 1 cP to $10^{-3}$ Pa·s
CR3	(ang. <i>Complement Receptor 3</i> ); receptor 3 dopełniacza, heterodimer transbłonowych glikoprotein $\alpha$ (CD11b) i $\beta$ (CD18)
DD	(ang. <i>Deacetylation Degree</i> ); stopień deacetylacji chitozanu, %
ECM	(ang. <i>Extracellular Matrix</i> ); macierz pozakomórkowa
ET AAS	(ang. <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> ); atomowa spektrometria absorpcyjna
EtOH	etanol, alkohol etylowy
FDA	(ang. <i>Food and Drug Administration</i> ); Agencja Żywności i Leków
FT-IR	(ang. <i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i> ); spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
GAG	(ang. <i>Glycosaminoglycans</i> ); glikozaminoglikany
GlcN	(ang. <i>Glucosamine</i> ); glukozamina
GlcNAc	(ang. <i>N-acetylglucosamine</i> ); N -acetylglukozamina
GPC/SEC	(ang. <i>Gel Permeation Chromatography/ Size Exclusion Chromatography</i> ); chromatografia żelowo-permeacyjna/chromatografia wykluczania wielkości

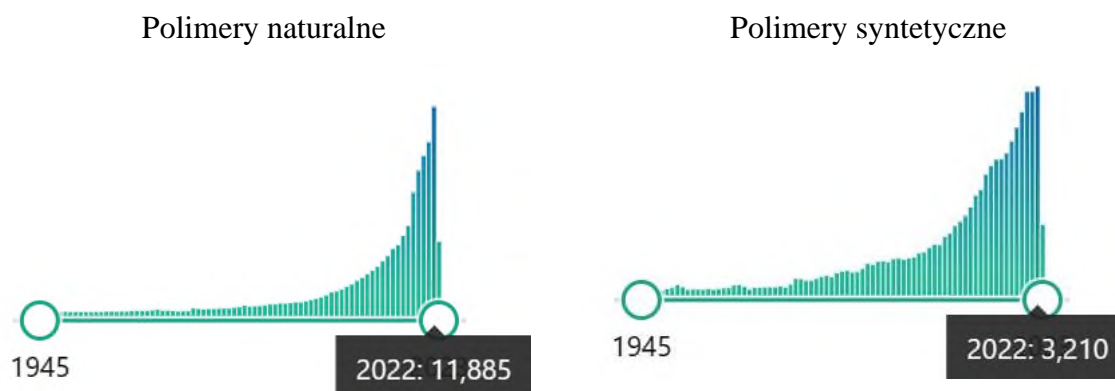
HA	(ang. <i>Hyaluronic Acid</i> ); kwas hialuronowy
HeLa	ludzka linia komórkowa raka szyjki macicy
Hep3B	ludzka linia komórkowa hepatomy, 3B
HepG2	ludzka linia komórkowa hepatomy, G2
IIb/IIa	inhibitory receptora glikoproteinowego
IκBα	(ang. <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i> ); czynnik jądrowy wzmacniacza genu polipeptydu lekkiego kappa w inhibitorze komórek B, alfa
IκKβ	(ang. <i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i> ) inhibitor wzmacniacza genu lekkiego polipeptydu kappa w komórkach B, kinaza beta
IL-2	(ang. <i>Interleukin-2</i> ); interleukina-2
IL-4	(ang. <i>Interleukin-4</i> ); interleukina-4
IL-10	(ang. <i>Interleukin-10</i> ); interleukina-10
IL-12	(ang. <i>Interleukin-12</i> ); interleukina-12
iNOS	(ang. <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> ); indukowalna syntaza tlenku azotu
JNK	(ang. <i>c-Jun N-terminal kinases</i> ); N-końcowe kinazy c-Jun
kDa	kilodalton, jednostka masy cząsteczkowej, 1kDa to 1000 Da
KT28	myovirus <i>Pbunavirus</i> , bakteriofag modelowy
KTN4	<i>Phikzvirus</i> , bakteriofag modelowy
LA	(ang. <i>Lactic Acid</i> ); kwas mlekowy
LPS	(ang. <i>Lipopolysaccharide</i> ); lipopolisacharyd
LUZ19	podovirus <i>Phikmvvirus</i> , bakteriofag modelowy
MHFC	(ang. <i>Minimal Halo Forming Concentration</i> ); minimalne stężenie tworzące efekt halo
MKCh	(ang. <i>Microcrystalline Chitosan</i> ); chitozan mikrokrystaliczny
mTOR	(ang. <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> ); kinaza białkowa serynowo-treoninową zdolna do wiązania kompleksu rapamycyny z białkiem FKBP12
NF-κB	(ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ); czynnik jądrowy kappa-wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B
NMC	(ang. <i>Nonpolymerized Matrix Components</i> ); niespolimeryzowane składniki matrycy
PAO1	szczep <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDGF-AB	(ang. <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> ); heterodimer AB płytkopochodnego czynnika wzrostu

pDNA	(ang. <i>Plasmid DNA</i> ); plazmidowy DNA
PET-PP	(ang. <i>Polyethylene Terephthalate - Polyethylene</i> ); politereftalan etylenu-polietylen
PG	(ang. <i>Peptidoglycan</i> ); peptydoglikan
PLA	(ang. <i>Polylactic Acid</i> ); polilaktyd, poli(kwas mlekowy)
PVA	(ang. <i>Polyvinyl Acetate</i> ); poli(octan winylu)
SCRI	(ang. <i>the Sum of Changes in the Refractive Index</i> ); suma zmian współczynnika załamania światła
SDS-PAGE	(ang. <i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ); elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z siarczanem dodecyłu sodu
SEM	(ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i> ); skaningowa mikroskopia elektronowa
siRNA	(ang. <i>Small Interfering RNA</i> ); mały interferujący RNA
SW480	linia komórkowa ludzkiego gruczolaka okrężnicy
T4P	(ang. <i>Type IV Pili</i> ); pilusy typu IV bakterii Gram-dodatnich
TG-DSC	(ang. <i>Thermogravimetric Differential Scanning Calorimetry</i> ); termograwimetryczna skaningowa kalorymetria różnicowa
TGF- $\beta$ 1	(ang. <i>Transforming Growth Factor beta 1</i> ); transformujący czynnik wzrostu beta 1
TLR4	(ang. <i>Toll-like Receptor 4</i> ); receptor Toll-podobny 4
TNF $\alpha$	(ang. <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> ); czynnik martwicy nowotworów
TPP	trifosforan pentasodu

## 1. Wprowadzenie

Szybki rozwój cywilizacyjny związany jest z rozwojem nauki i nowych technologii, innowacyjnym podejściem do tradycyjnych rozwiązań, poszukiwaniem nowych substancji, materiałów, czy źródeł energii. Jedną z tych dynamicznie rozwijających się dziedzin jest medycyna i związane z nią kierunki pokrewne. Wraz z postępowaniem medycyny wzrasta też nasza świadomość i edukacja zdrowotna. Niestety szybki rozwój cywilizacyjny doprowadził również do zwiększonej zachorowalności na pojawiające się w wymiarze globalnym choroby, głównie nowotworowe, choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzycę, otyłość, czy choroby immunologiczne. Nowe kierunki badań obejmują takie obszary, jak inżynieria tkankowa, medycyna kliniczna, biologia molekularna i genetyka, biotechnologia, bioinformatyka, czy bioinżynieria i materiałoznawstwo.

Istotne znaczenie dla tych obszarów mają obecnie coraz częściej wykorzystywane związki należące do grupy polimerów naturalnych (biopolimerów). Są one podstawowym budulcem organizmów żywych. Wiele z nich posiada szczególne właściwości biologiczne i fizykochemiczne, które czynią je interesującym materiałem do wykorzystania w obszarach medycznych.



Ryc. 1 Analiza liczby publikacji dotyczących polimerów naturalnych oraz syntetycznych według bazy PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). W ramce podano liczbę publikacji w roku 2022.

Analiza liczby publikacji w bazie PubMed (Ryc. 1), będąca odzwierciedleniem zainteresowania naukowców polimerami, wskazuje na przewagę tematów badawczych, koncentrujących się wokół polimerów naturalnych. Biorąc pod uwagę liczbę źródeł literaturowych, opisujących ogromną ilość osiągnięć w tym zakresie, grupa związków biopolimerowych z dużym prawdopodobieństwem będzie systematycznie zastępować stosowane dotąd polimery syntetyczne.

Jednym z takich biopolimerów jest chitozan; polisacharyd, którego źródłem jest chityna naturalnie występująca w organizmach żywych. Jest budulcem ścian komórkowych wodorostów, grzybów i bakterii, a także szkieletów zewnętrznych stawonogów, ramienionogów i mszywołów. Chitozan swoją popularność zawdzięcza wszechstronności zastosowań, wysokiej aktywności biologicznej i chemicznej, jest bezpieczny dla komórek żywych i środowiska naturalnego. Może być stosowany jako nowy biomateriał w wielu obszarach biologii, medycyny i farmacji, ochrony środowiska i przemysłu.

W niniejszej pracy opisano syntezę nowych polimerów na bazie chitozanu, mających zastosowanie w biologii i medycynie. W części badawczej zaproponowano nowe wykorzystanie chitozanu w biologii: jako matryce do oczyszczania rekombinowanych białek fagowych z lipopolisacharydu (LPS), oraz w medycynie jako opatrunek chitozanowy z dodatkiem bakteriofagów o działaniu przeciwbakteryjnym.

## 2. Charakterystyka fizykochemiczna chitozanu

Chityna jest drugim po celulozie, powszechnie występującym w przyrodzie biopolimerem. Jest głównym składnikiem egzoszkieletu stawonogów, głównie skorupiaków morskich, np. kraby, homary i krewetki, ale także owadów i ścian komórkowych grzybów. Odkrycie chityny przypisuje się Henriemu Braconnotowi, który w roku 1811 po raz pierwszy zidentyfikował ten polisacharyd w ścianach komórek grzybów, natomiast dopiero w 1894 roku nazwę „chitozan” wprowadził Felix Hoppe-Seyler. Ze względu na szeroki zakres występowania oraz szczególne właściwości, takie jak biogodność, biodegradowalność, nietoksyczność i hydrofilowość oraz działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, chitozan jest biomateriałem o dużym potencjale wykorzystania w wielu dziedzinach nauki i przemysłu [1].

Chitozan jest liniowym, półkryształicznym polisacharydem złożonym z (1→4)-2-acetamido-2-deoksy-β-d-glukanu (n-acetylo d-glukozaminy) i (1→4)-2-amino-2-deoksy-β-d-glukan (d-glukozamina). Jest to pochodna chityny, uzyskiwana w wyniku jej częściowej deacetylacji. W tym procesie cząsteczki N-acetyloglukozaminy są przekształcane w jednostki glukozaminy [2]. Stopień deacetylacji (ang. *Deacetylation Degree*; DD) jest istotnym parametrem fizykochemicznym, charakteryzującym każdą partię chitozanu. Wartość DD informuje o liczbie grup aminowych wzdłuż łańcuchów makrocząsteczki, a oblicza się ją jako stosunek D-glukozaminy do sumy D-glukozaminy i N-acetylo-d-glukozaminy [3]. Chityna odróżnia się od chitozanu również rozpuszczalnością. Ze względu na wysoką energię oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych oraz wiązań wodorowych, chityna jest trudna

do rozpuszczenia w wodzie. Chityna ma małą zawartość grup aminowych, dlatego jej makrocząsteczki nie pęcznieją w zwykłych rozpuszczalnikach. Wyjątek stanowi  $\beta$ -chityna-allomorficzna odmiana chityny, w której polarne rozpuszczalniki (woda, alkohole) są zdolne dyfundować w jej strukturę. Natomiast obecność wolnych grup aminowych w pozycji C-2 jednostki D-glukozaminy wzdłuż łańcuchów makrocząsteczek chitozanu pozwala na rozpuszczanie w rozcieńczonych, wodnych kwaśnych rozpuszczalnikach w wyniku protonowania tych grup i tworzenia odpowiedniej soli polimeru [4]. Chitozan w środowisku kwaśnym jest przekształcany w polielektrolit. Rozpuszcza się w rozcieńczonych kwasach nieorganicznych, m.in. HBr, HCl, HNO<sub>3</sub> i HClO<sub>4</sub>, stęż. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oraz w kwasach organicznych, głównie: octowym, cytrynowym, mrówkowym, mlekowym. Rozpuszcza się także w rozpuszczalnikach organicznych: tetrahydrofuranie, octanie etylu oraz 1,2-dichloroetanie. Już około 50% wszystkich protonowanych grup aminowych znacząco wpływa na rozpuszczalność chitozanu. Jest ona zależna od różnych czynników, m.in.: masy cząsteczkowej polimeru, stopnia deacetylacji (DD), pH, temperatury i krystaliczności polimeru [5].

Chitozan ma sztywną strukturę krystaliczną poprzez wewnątrz- i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, ale obecność wiązań  $\beta$ -(1,4)glikozydowych między D-glukozaminą i N-acetylo-D-glukozaminą umożliwia jego modyfikacje chemiczne i zmiany parametrów użytkowych. Każda handlowa partia chitozanu powinna zostać odpowiednio scharakteryzowana pod kątem najważniejszych parametrów fizykochemicznych. Chitozan jako związek pochodzenia naturalnego jest niepowtarzalny, co wymaga oceny stopnia deacetylacji (DD), masy cząsteczkowej, lepkości oraz cech fizycznych jak czystość i barwa, krystaliczność, poziom wilgoci oraz rozpuszczalność. Te cechy mają duże znaczenie w kontekście praktycznego zastosowania surowców pochodzenia naturalnego. Handlowe chitozany przemysłowe lub techniczne nie muszą spełniać restrykcyjnych norm, w przeciwieństwie do chitozanów medycznych, które powinny wykazywać wysoką jakość i czystość produktu. Dlatego też oprócz wyżej wymienionych parametrów istotne jest także oznaczenie jego czystości mikrobiologicznej (powinien być wolny od zanieczyszczeń mikrobiologicznych) oraz spełniać odpowiednie wymogi czystości chemicznej (zawartość metali ciężkich, związanych białek resztkowych czy zawartość popiołu) [6].

Ważnym parametrem przy doborze chitozanu w badaniach medycznych jest przede wszystkim DD. Wpływa nie tylko na właściwości fizyczne i chemiczne (rozpuszczalność, lepkość, krystaliczność, czy przewodność), ale przede wszystkim na właściwości biologiczne chitozanu (biodegradowalność, biokompatybilność, mukoadhezję, właściwości hemostatyczne, immunomodulacyjne, czy przeciwdrobnoustrojowe) [6].

Innym ważnym parametrem fizykochemicznym jest masa cząsteczkowa, od której w dużym stopniu zależy wartość lepkości wodnego roztworu chitozanu. Lepkość chitozanu maleje wraz ze spadkiem masy cząsteczkowej chitozanu, dlatego parametr ten jest wykorzystywany w praktyce do określenia stabilności polimeru w roztworze. Spadek lepkości obserwowany w czasie przechowywania polimeru świadczy o jego degradacji. Technika stosowana do oznaczania masy cząsteczkowej to przede wszystkim wiskozymetria, ale także chromatografia żelowo-permeacyjna i osmometria. Polisacharydy wykazują polidispersję, co oznacza, że masa cząsteczkowa danego chitozanu jest średnią całego rozkładu mas cząsteczkowych w próbce badanej. Zatem każdą próbkę można scharakteryzować za pomocą wskaźnika polidispersyjności [7].

Chitozan ma wiele właściwości fizykochemicznych, biologicznych i technologicznych. Główną zaletą tego polimeru jest niewątpliwie jego kationowy charakter i szczególne zachowanie w roztworze. Przy niskim pH (poniżej 6,3), grupy aminowe chitozanu są protonowane, nadając polikationowość, przy wyższym pH (powyżej 6,3), grupy aminowe chitozanu są deprotonowane. Po rozpuszczeniu możliwe jest wytrącanie chitozanu, co sprzyja technologicznym procesom formowania w granulki, odlewania w folie czy membrany, przędzenia w włókna lub nanowłókna, a także sieciowania w celu wytworzenia włókien w postaci fibryl lub gąbek. Proces przetwarzania chitozanu jest dużo łatwiejszy niż chityny. Jednak ze względu na hydrofilowy charakter i wrażliwość na pH, stabilność produktów chitozanowych jest niższa. Dlatego też przy produkcji form użytkowych często stosuje się substancje sieciujące, które poprawiają stabilność chitozanu, są to m.in. związki epoksydowe, aldehyd glutarowy, genipina, czy trifosforan pentasodu (TPP). Sieciowanie zachodzi z udziałem grupy aminowej przy atomie C-2 lub grupy hydroksylowej przy atomie C-6 łańcucha, w zależności od rodzaju zastosowanego czynnika sieciującego. Chitozan, jako polikation wiązać się może z innymi naturalnymi i syntetycznymi polielektrolitami anionowymi, tworząc kompleksy polielektrolitowe. Czynnikiemami sieciującymi chitozan mogą być również inne polisacharydy takie jak, np. alginian, karboksymetyloceluloza (CMC), kwas hialuronowy (HA), czy pektyna, polimery syntetyczne, np. kwas polifosforowy czy poli(kwas akrylowy), ale także DNA i białka [8].

Chitozan jako polielektrolit zdolny jest do wiązania mikro i makro cząstek, a oddziaływania elektrostatyczne mogą mieć wiele praktycznych zastosowań, np. w oczyszczaniu ścieków, wytwarzaniu kapsułek lub folii polielektrolitowych warstwa po warstwie, czy też bioadhezyjnych błon. Obecność grup aminowych pozwala wyjaśnić większość właściwości biologicznych tego polimeru. Na przykład jego działanie

mukoadhezyjne tłumaczy się interakcją między ujemnie naładowanymi resztami w mucynie (glikoproteiny), a dodatnio naładowanymi grupami aminowymi chitozanu. Działanie hemostatyczne wiąże się z oddziaływaniem dodatnio naładowanego łańcucha chitozanu z naładowanymi ujemnie błonami krwinek czerwonych. Łatwa derywatywacja sprawia, że chitozan jest idealnym polimerem użytecznym w konstrukcji nowych biomateriałów o ukierunkowanej funkcjonalności. Ponadto jego biodegradowalność, nietoksyczność i biozgodność czyni go bezpiecznym w kontakcie z żywymi komórkami i ludzkim organizmem [9].

Chitozan jako polimer biodegradowalny degradowuje do nieszkodliwych związków, które w ustroju mogą być całkowicie wchłaniane przez komórki żywe. Rozpad chitozanu może nastąpić poprzez różne mechanizmy: hydroliza kwasowa, utleniająco-redukcyjna lub azotowa, depolimeryzacja kwasowa, enzymatyczna lub ultradźwiękowa. W chitozanie wyróżniamy cztery rodzaje wiązań glikozydowych typu: -D-D-, -A-A-, -A-D- i -D-A- (gdzie A to monomery N-acetyloglukozaminy i D to monomery glukozaminy). W zależności od procesu, występuje przewaga pęknięć niektórych wiązań nad innymi. Dzięki rozpoznawaniu specyficznemu dla danego enzymu, enzymatyczne metody degradacji są bardziej selektywne niż metody chemiczne i fizyczne, gdyż istnieje pewna kontrola nad składem produktów degradacji. Ultradźwiękowa degradacja chitozanu pozwala na umiarkowaną degradację polimeru, gdyż szybkość degradacji zależy od stopnia acetylacji macierzystego chitozanu, a nie od jego masy cząsteczkowej. Nadtlenek wodoru powoduje przyspieszoną degradację, wytwarzając znaczną liczbę monomerów i chitooligosacharydów, a ich skład zależy od temperatury i stężenia  $H_2O_2$  [10]. Depolimeryzację kwasem azotowym można uznać za dość specyficzną ponieważ  $HNO_2$  atakuje pierwszorzędową aminę w glukozaminie. Procesy chemicznej degradacji chitozanu dają duże ilości monomerów (D-glukozamina), a produktami końcowymi są najczęściej chitooligosacharydy (COS) i wydajność tych reakcji jest niska. Szybkość hydrolizy wiązań glikozydowych D-D i D-A jest niższa niż hydroliza A-A i A-D [11]. Specyficzna degradacja enzymatyczna chitozanu zachodzi przy udziale enzymów z grupy chitozanaz (EC 3.2.1.132) i chitynaz (EC 3.2.1.14). Chitozanazy są glikozydami hydrolazy, które katalizują endohydrolizę wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych chitozanu częściowo acetylowanych do uwolnienia oligosacharydów chitozanu (COS) z niewielkim procentem uwolnionych monomerów [12]. Chitozanaza specyficznie hydrolizuje wiązania glikozydowe o wzorce -DD-DA lub -DD-DD. Chitynazy można podzielić na dwie główne kategorie: endochitynazy i egzochitynazy w zależności od sposobu ich działania. Enzymy niespecyficzne, zdolne do degradacji chitozanu to proteazy, lipazy, celulazy i hemicelulazy. Jednym z najczęściej badanych ze względu na

związek z biodegradacją polimerów jest lizozym. Enzym ten jest proteazą, która hydrolizuje wiązania glikozydowe o wzorze A-A-A-A lub A-A-A-D. Poza lizozymem, inne działające na chitozan enzymy proteolityczne to pepsyna i papaina, które powodują depolimeryzację głównie do niskocząsteczkowych chitozanów (od 4 do 10 kDa) [13].

Przedstawione powyżej właściwości fizyko-chemiczne chitozanu warunkują jego aktywność biologiczną, a zarazem zastosowanie w różnych dziedzinach, w tym biologii, biotechnologii i medycynie.

### **3. Właściwości biologiczne chitozanu o znaczeniu medycznym**

Pierwsze wzmianki o korzystnym wpływie chitozanu na zdrowie człowieka powstały w latach 80-tych XX wieku. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat przeprowadzono liczne badania w kierunku poszukiwania nowych możliwości wykorzystania tego biomateriału w medycynie i farmacji. Liczne dostępne dane mówią o wielu wszechstronnych właściwościach biologicznych tego polimeru, które zostały potwierdzone wieloma badaniami, m.in. działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne i immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, hemostatyczne ukierunkowane na przyspieszenie procesów gojenia i regeneracji. Dlatego chitozan jest bardzo obiecującym biopolimerem, możliwym do wykorzystania na szeroką skalę w biomedycynie, m.in. jako nowe materiały opatrunkowe przyspieszające gojenie się ran, zwłaszcza tych zakażonych bakteryjnie, jako nowy nośnik leków kontrolujący uwalnianie substancji czynnych, składowa bioresorbowalnych implantów czy matryc tworzących rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej [14].

#### **3.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa chitozanu**

Chitozan, pochodne chitozanu i chitooligosacharydy działają przeciwdrobnoustrojowo, aktywnie zwalczają zakażenia bakteryjne i grzybicze (grzyby nitkowate i drożdże). Wartość pH i temperatura środowiska reakcji, obecność soli kompleksujących, a także faza wzrostu komórki bakteryjnej mają wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową chitozanu. Najbardziej podatne na działanie chitozanu są komórki będące w fazie logarytmicznego wzrostu [15], ponieważ w tej fazie wzrostu potencjał błonowy na powierzchni komórek rośnie, a w fazie stacjonarnej stopniowo maleje. Za aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą chitozanu odpowiada przede wszystkim dodatnio naładowana grupa aminowa, która wchodzi w reakcję z grupami lipopolisacharydów i białek na powierzchni

komórek drobnoustrojów o ładunku ujemnym. Powoduje to dezintegrację błon komórkowych, uszkodzenie ścian komórek i lizę komórek bakterii Gram-ujemnych. Zatem przeciwbakteryjne działanie chitozanu zależne jest od stopnia deacetylacji. Ponadto, wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową chitozanu ma masa cząsteczkowa tego polimeru. Chitozan wysokocząsteczkowy tworzy film polimerowy wokół ściany komórek drobnoustrojów, blokując dostęp składników odżywczych, co prowadzi do lizy. Chitozan małowcząsteczkowy może wnikać do wnętrza komórek, gdzie łączy się ze składnikami wewnątrzkomórkowymi o ładunkach ujemnych (np. resztami fosforanowymi cząsteczek DNA). Taki mechanizm powoduje blokowanie reakcji na etapach transkrypcji i syntezy mRNA. Dotychczas wykazano działanie chitozanu na szczepy bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, czy *Salmonella typhimurium* [16]. Dobór chitozanu o odpowiedniej masie nie jest bez znaczenia również w kontekście grubości ściany komórkowej drobnoustroju, na który ma działać. Ze względu na większą grubość ściany komórek bakterii Gram-dodatnich dużo efektywniej działa chitozan o dużej masie cząsteczkowej, poprzez tworzenie otoczki. Dużo cieńsza ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych powoduje, że znacznie lepiej działa na nie chitozan o małej masie cząsteczkowej, gdyż wnika do wnętrza i dezintegruje ich materiał genetyczny [17]. Chitozan wykazuje również aktywne działanie wobec grzybów nitkowatych i drożdży. Jego aktywność przeciwgrzybicza polega głównie na hamowaniu sporulacji i kiełkowania zarodników. Oligomery chitozanu przenikając do wnętrza strzępek powodują zahamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za wzrost grzyba. Chitozan działa między innymi na grzyby *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus niger* oraz *Fusarium solani* [18].

### **3.2. Chitozan jako przeciwutleniacz**

Ze względu na związek między stresem oksydacyjnym, a patomechanizmem niektórych chorób cywilizacyjnych, przeciwutleniacze zyskują coraz większe zainteresowanie w kontekście profilaktyki powstawania chorób, jak również występowania ich powikłań. Wolne rodniki generujące tzw. stres oksydacyjny uszkadzają zdrowe komórki (białka, tłuszcze, DNA) i zaburzają ich funkcje. Istotną rolę w przywróceniu równowagi tlenowej odgrywają przeciwutleniacze, które wiążą wolne rodniki tlenowe i przywracają prawidłowe funkcjonowanie organizmu [18-19]. Dzięki obecności grup aminowych i hydroksylowych chitozan, chitooligosacharydy, jak również niektóre pochodne chitozanu (siarczany chitozanu lub N-2-karboksyetylochitozan) mogą wiązać wolne rodniki w postaci nadtlenków i rodników hydroksylowych. Aktywność przeciwutleniająca tego polimeru można dodatkowo zwiększyć

poprzez chemiczną modyfikację, np. kwasem galusowym lub związkami fenolowymi [20]. Chitozan zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych i hamuje proces peroksydacji lipidów. Działanie to wspiera naturalne mechanizmy antyoksydacyjne organizmu i opóźnia proces starzenia się komórek [21].

Właściwości przeciwutleniające chitozanu są ściśle związane z jego średnią masą molową i stopniem deacetylacji. W przypadku chitozanu niskocząsteczkowego ta aktywność jest dużo wyższa niż dla chitozanu wysokocząsteczkowego, ponieważ krótsze łańcuchy chitozanowe mają mniej wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, co zwiększa dostępność grup hydroksylowych i aminowych, które mogą wiązać wolne rodniki [22]. Większy stopień deacetylacji również zwiększa tę aktywność. Stres oksydacyjny jest główną przyczyną wielu chorób, takich jak nowotwory, uszkodzenie układu odpornościowego, choroby układu krążenia i wiele innych związanych z przyspieszonym starzeniem komórek, dlatego możliwe stało się włączenie chitozanu do praktyki żywieniowej i suplementacyjnej. W przypadku typowych dolegliwości związanych z wiekiem i naturalnym procesem starzenia się komórek, suplementacja preparatami chitozanowymi może aktywnie wspierać mechanizmy antyoksydacyjne organizmu [23].

### **3.3. Właściwości przeciwzapalne chitozanu**

Niskocząsteczkowe chitozany i chitoooligosacharydy (COS) wykazują skuteczną eliminację stanu zapalnego i znacząco hamują wydzielanie tlenu azotu NO. Przeprowadzone dotychczas badania na zwierzęcych modelach laboratoryjnych potwierdzają skuteczną redukcję NO, hamowanie aktywacji czynników zapalnych NF- $\kappa$ B i wzmocnienie ekspresji iNOS poprzez wiązanie z receptorami CD14, TLR4 i CR3 do aktywacji białek sygnałowych JNK [24]. Badane pochodne oligosacharydów chitozanu zmniejszyły poziomy ekspresji TNF- $\alpha$  poprzez promowanie wydzielania IL-4 i IL-10 oraz inaktywację sygnalizacji NF- $\kappa$ B poprzez hamowanie fosforylacji p65, I $\kappa$ B $\alpha$  i I $\kappa$ K $\beta$  [25].

### **3.4. Działanie przeciwnowotworowe chitozanu**

Wolne grupy aminowe w cząsteczkach chitozanu mogą odgrywać istotną rolę również w walce z komórkami nowotworowymi. Przeciwnowotworowe działanie chitozanu jest związane z immunomodulacją. Dostępne w literaturze naukowej dane, dotyczące aktywności preparatów chitozanowych na modelach zwierzęcych, pokazują obiecujące wyniki w kontekście potencjału chitozanu jako adiuwanta w leczeniu nowotworów. Badania

potwierdzają, że chitozan może modulować układ odpornościowy indukując przeciwnowotworowe reakcje prozapalne i zwiększoną apoptozę w komórkach nowotworowych w różnych modelach mysich (z nowotworem jelita grubego, mięsakiem, nowotworem wątroby). Chitozan zwiększał produkcję TNF $\alpha$  i IL-2, które są krytyczne w odpowiedzi przeciwnowotworowej [26-28]. Badania przeprowadzone na trzech liniach komórek nowotworowych: ludzkich komórkach raka wątroby (Hep3B), ludzkich komórkach raka okrężnicy (SW480) i ludzkich komórkach raka szyjki macicy (HeLa), udowodniły, znaczne zmniejszenie wzrostu komórek nowotworowych i masy guza pod wpływem działania chitozanu. Zwiększona ekspresja białka kaspazy-3, indukowała apoptozę komórek wątrobiaka (HepG2) [29]. Antytransformacyjne i chemoprewencyjne działanie chitozanu polegało na zwiększonej produkcji systemów antyoksydacyjnych, takich jak glutation, czy S-transferaza glutationowa [30]. Dotychczas prowadzone globalnie badania w różnych ośrodkach naukowych na całym świecie przyczyniły się do bliższego poznania mechanizmów działania chitozanu na różnych etapach kancerogenezy. W pierwszej fazie hamuje on ekspresję COX-2, NF- $\kappa$ B i aktywuje komórkowe systemy antyoksydacyjne. Wzrasta również aktywność enzymu AMPK, który zapobiega transformacji komórek prawidłowych w komórki nowotworowe [31]. Natomiast w późniejszych etapach kancerogenezy chitozan może hamować ekspresję białek związanych z metabolizmem komórkowym (mTOR, kateniny B, kinazy pirogronianowej i dekarboksylazy ornityny), co przyczynia się do zahamowania wzrostu masy guza. Może on aktywować szlaki kaspazy-3 i IL-12 indukując proces apoptozy komórek nowotworowych [32].

### **3.5. Właściwości hemostatyczne chitozanu**

Gojenie ran jest wieloetapowym procesem i wymaga zaangażowania wielu mechanizmów wewnątrzkomórkowych, od stanu zapalnego i migracji komórek, po angiogenezę i syntezę nowej macierzy komórkowej. Chitozan odgrywa istotną rolę w tych procesach, aktywnie wspierając regenerację komórek. Jego działanie hemostatyczne oparte jest na tworzeniu kompleksów z krwinkami czerwonymi [33]. Masa cząsteczkowa i stopień deacetylacji (DD) ma istotny wpływ na właściwości hemostatyczne chitozanu. Wyższy stopień deacetylacji poprawia reaktywność polimeru, dzięki obecności wolnych grup aminowych w łańcuchu, które niosąc ładunek dodatni działają na erytrocyty i płytki krwi, uczestniczące w agregacji, niezbędnej do zainicjowania hemostazy [34]. Grupy aminowe chitozanu ułatwiają agregację erytrocytów poprzez oddziaływanie elektrostatyczne z ich ujemnymi ładunkami powierzchniowymi (obecność fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy i kwasu

sialowego) [34]. Chitozan promuje adhezję płytek krwi i kaskadę wewnątrzkomórkowej sygnalizacji, która angażuje w procesy hemostatyczne glikoproteiny IIb/IIa i tromboksan A<sub>2</sub>/ADP. Jego rola promująca procesy gojenia wiąże się również z kontaktową interakcją w ziarnistościach alfa płytek krwi, co znacznie zwiększa stabilność adhezji. Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa inicjuje uwalnianie PDGF-AB i TGF- $\beta$ 1- płytkowych czynników wzrostu. Badania *in vitro* potwierdziły, iż wyższa masa cząsteczkowa chitozanu powoduje najbardziej optymalne działanie pro koagulacyjne [35]. Chitozan przyspiesza proces gojenia również na poziomie immunomodulacyjnym, zmniejsza stan zapalny i indukuje migrację neutrofilii. Proces regeneracji tkanek w końcowych etapach gojenia rany może być wspierany przez chitozan poprzez stymulację wzrostu fibroblastów skórnych, a jego działanie przeciwdrobnoustrojowe, aktywnie chroni to miejsce przed zakażeniem [36]. Stosowanie opatrunków chitozanowych korzystnie wpływa na procesy hemostatyczne, tworzenie tkanki ziarninowej, przyspiesza etap odnowy naskórka i skóry właściwej, a działając przeciwbakteryjnie tworzy barierę chroniącą ranę przed zakażeniem drobnoustrojami [37].

#### **4. Wybrane zastosowania praktyczne chitozanu**

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost zainteresowania rynku wykorzystaniem polimerów naturalnych. Niektóre ze zidentyfikowanych obszarów zainteresowania obejmują metody nowych modyfikacji biopolimerów celem poprawy ich parametrów użytkowych, badania poszerzające znajomość biologicznych mechanizmów aktywności chitozanu, jego pochodnych i chitoooligosacharydów, a także liczne badania przedkliniczne i kliniczne testujące prototypy przed wdrożeniem na rynek medyczny i farmaceutyczny [38, 39]. Chitozan i jego pochodne mają praktyczne zastosowania, m.in. w przemyśle spożywczym, rolnictwie, farmacji i kosmetologii, medycynie, biotechnologii, weterynarii, a także przemyśle tekstylnym i papierniczym. W ostatnich latach chitozan stał się również interesującym obiektem wielu badań w dynamicznie rozwijającym się obszarze inżynierii tkankowej, jako biomateriał do wielu zastosowań w medycynie regeneracyjnej. Głównymi źródłami produkcji chityny i chitozanu na skalę przemysłową są skorupiaki morskie, krewetki, kraby i kałamarnice [40]. Możliwy jest również odzysk chitozanu z odpadów przemysłu spożywczego. Chitozan ze względu na swoje unikalne właściwości i wysoki potencjał przetwórczy, łatwo poddaje się obróbce chemicznej w procesach technologicznej produkcji form użytkowych, np. do postaci roztworów, zawiesin, żeli/hydrożeli, mikrocząstek/nanocząstek, proszków, granulek, pianek, czy gąbek. Jego zdolności błonotwórcze wykorzystuje się także w produkcji membran i folii, a dzięki metodzie

elektroprzewodzenia również w włókna i nanowłókna [41]. Chitozan jest także wykorzystywany w ochronie środowiska i ekologii w procesach klarowania i oczyszczania wody, w oczyszczaniu ścieków, w rekultywacji, oraz jako biokatalizator, czy też biomembrana w procesach filtracji. Jego zastosowanie znaleźć można również w czujnikach elektrochemicznych, cieczach jonowych i detergentach, oraz w bioobrazowaniu. Od lat 80-tych XX w. największym rynkiem zbytu dla chityny i chitozanu jest Japonia, która dysponuje znacząco przewagą technologiczną i komercyjną, a rynek w tym kraju pochłania około 700-800 ton chitozanu rocznie [42].

#### **4.1. Chitozan w biologii**

Chitozan jest stosowany, m.in. do oczyszczania wody, może być stosowany jako koagulant w oczyszczaniu ścieków i flokulant (do odzysku białka), jako adsorbent do usuwania zanieczyszczeń (metale ciężkie- miedź, nikiel, cynk, kadm i ołów, barwniki, pestycydy i antybiotyki, zanieczyszczenia biologiczne z ścieków). Chityna jako adsorbent stosowana jest sama, w układzie, np. chityna–lignina lub jako kompozyty, np. z proszkiem z zielonych alg (*Ulva lactuca*) [43]. Chitozan stosuje się jako czynnik chelatujący i kompleksujący w metodach oczyszczania ścieków celulozowo-papierniczych do usuwania ligniny oraz barwników [44]. Do usuwania jonów metali i barwników stosowane są żywice chitozanowe, które mogą stanowić alternatywę dla obecnych żywic anionowymiennych [45]. Chitozan w postaci membran, kompozytów i nanocząstek stosuje się także jako środek zaradczy w wodzie i glebie. Kompozyt alginianowo- chitozanowy w formie granulatu sprawdził się także w usuwaniu herbicydów i pestycydów. Chitozan może być stosowany w przemyśle odsalania do wstępnego uzdatniania wody morskiej jako biosorbent soli i metali ciężkich z wody. Dużą zaletą stosowania tego polimeru jest jego naturalne pochodzenie i wysoka biodegradowalność [46, 47].

Chitozan jest również ważny dla sektora rolniczego i obecnie bardzo propagowanego rolnictwa ekologicznego. Jest on stosowany do zaprawiania nasion i ziaren, może ograniczać rozwój chorób, stymulować rozwój i wzrost rośliny oraz oddziaływać na jakość plonów. Zaprawianie nasion, cebul lub sadzonek przed wysiewem/wysadzeniem polega na moczeniu ich przez określony czas w roztworze polimeru. Taka aplikacja chitozanu poza poprawą parametrów kiełkowania i stymulacji wzrostu roślin w warunkach stresu, redukuje także porażenie przez grzyby patogeniczne roślin (m.in. pszenicy, pomidora, tytoniu i tulipana) [48, 49]. Oligoaminosacharydy, jako produkty enzymatycznego rozkładu chitozanu (glukozamina i N-acetyloglukozamina), charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną. Chitozan i jego

pochodne mogą być stosowane jako biostymulatory, stymulujące wzrost roślin, zwiększające wschody, masę pędów i korzeni. Preparaty chitozanowe poprawiają plony w przypadku pszenicy, owsa i jęczmienia. Chitozan stosowany w formie nanocząsteczek posiada właściwości przeciwwgrzybicze, a zabiegi preparatami chitozanowymi w dużym stopniu ograniczają chorobę zgnilizny korzeni i więdnienie siewek fasoli. Polimer spełnia rolę elicytora, indukując naturalne reakcje obronne roślin. Pobudza biosyntezę związków fenolowych i lignifikację ścian komórkowych oraz akumulację reaktywnych form tlenu [50]. Chitozan zwiększa tolerancję na stres środowiskowy (susze, wysoka temperatura, czy zasolenie) [51]. Dzięki zdolności błonotwórczej stosuje się go również jako substancję wiążącą w otoczkowaniu nasion. Otoczki chitozanowe charakteryzuje dobra przepuszczalność wody oraz gazów, ograniczają one liczebność owadów roślinożernych i zwiększają plon. Dodatek innych składników, np. polimerów syntetycznych, surfaktantów, czy grzybów antagonistycznych wzmacnia protekcyjne i stymulujące działanie otoczek [52].

#### **4.1.1. Oczyszczanie białek rekombinowanych**

Chitozan, który w swoim łańcuchu ma dużą liczbę grup hydroksylowych i aminowych, w środowisku kwaśnym tworzy polikationy, co pozwala mu reagować z ujemnie naładowanymi cząsteczkami. Za ładunek dodatni odpowiadają grupy aminowe, które wiążą się substancjami anionowymi. Reaktywność chitozanu zależy więc od stopnia DD, dlatego też jest to istotny parametr w przypadku zastosowania go jako adsorbenta. Biokompatybilność tego polimeru wzrasta wraz z liczbą ładunków dodatnich [53]. Jego reaktywność jest tym większa im wyższy jest stopień deacetylacji. Zdolność wiązania mikro-i makrocząstek stwarza możliwość oczyszczania nie tylko wód i ścieków, ale również produktów biofarmaceutycznych, w tym otrzymywanych metodami biotechnologicznymi. Najczęściej stosowanym prokariotycznym systemem ekspresyjnym jest *Escherichia coli*, która charakteryzuje się szybkim wzrostem, stosunkowo niskim kosztem produkcji, dobrze scharakteryzowanym genomem i dużym wyborem dostępnych wektorów i szczepów. Gram-ujemna pałeczka *E.coli* została po raz pierwszy wykorzystana do komercyjnej produkcji rekombinowanej ludzkiej insuliny [54]. Produkcja rekombinowanych białek z wykorzystaniem systemów bakteryjnych opartych na bakteriach Gram-ujemnych nie jest jednak pozbawiona istotnych wad. Wytwarzanie białka do celów terapeutycznych jest utrudnione z powodu obecności lipopolisacharydu (LPS), który jest endotoksyną stanowiącą amfifilowy, integralny składnik zewnętrznej błony komórkowej, gdzie tworzy złożone struktury z białkami i fosfolipidami [55]. Lipopolisacharyd (LPS) jest cząsteczką termostabilną, na którą składają się trzy elementy, o odmiennej strukturze: lipid A,

oligocukier rdzenia oraz antygen O. W organizmie ludzkim LPS daje bardzo silną odpowiedź immunologiczną, która w krytycznych przypadkach może doprowadzić do sepsy [56,57]. Zastosowanie bakteryjnych systemów ekspresji wymaga więc skutecznego i łagodnego dla produktu białkowego sposobu oczyszczania. Istotne jest precyzyjne dobranie warunków oczyszczania, tak aby uzyskać jak najwyższą wydajność procesu, ale przede wszystkim aby otrzymane białko zachowało aktywność biologiczną oraz strukturę i wysoki stopień czystości. Dzięki dużej aktywności biologicznej oraz zdolności do wiązania mikro-i makrocząstek chitozan może być wykorzystany w tym procesie [58]. Lipid A jest zbudowany głównie z nasyconych kwasów tłuszczowych i warunkuje biologiczną aktywność lipopolisacharydu. Obecność cukru D-glukozaminylo-D-glukozaminy stanowi element polarny lipidu A. Ujemnie naładowane reszty w części lipidu A oraz oligocukru rdzenia wewnętrznego są zdolne do oddziaływań z kationami dwuwartościowymi [59]. Rozbudowana i obfitująca w grupy funkcyjne o ujemnych ładunkach cząstka LPS wiąże się z dodatnio naładowanymi grupami w cząsteczce chitozanu. Dlatego też biopolimer stanowi dobry adsorbent, wiążący LPS w procesie oczyszczania białek pochodzących z ekspresyjnych systemów produkcji bakteryjnej. Istotną cechą chitozanowych adsorbentów jest ich nietoksyczność, biogodność i biodegradowalność, dlatego są one bezpieczne w użyciu jako metoda oczyszczania produktów do celów medycznych, farmaceutycznych oraz spożywczych.

W literaturze naukowej znaleźć można kilka przykładów prowadzonych wcześniej badań nad związanym ze strukturą chitozanu potencjałem wiązania cząsteczek LPS pochodzącego z różnych szczepów chorobotwórczych, m.in. *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus mirabilis*, czy *Proteus vulgaris* [60]. W przypadku oczyszczania z LPS produktów białkowych dostępne na rynku komercyjne złoża to, m.in. Detoxi-Gel™, AffiPrep® Polymyxin Matrix, Polymyxin B agarose, Endotoxin Affisorbent™, Pierce™. Większość z tych komercyjnych produktów wykorzystuje ligand polimiksyny B immobilizowany na żywicy/nośniku polimerowym, który wykazuje powinowactwo do wiązania i ekstrakcji endotoksyn z próbek przeciwciał lub białek [61]. Dostępne złoża wiążą endotoksyny wielu różnych szczepów bakterii Gram-ujemnych, w tym *Escherichia coli*, *Salmonella abortus*, *Salmonella minnesota*, czy *Serratia marcescens*. Ponieważ endotoksyny są naładowane ujemnie, stosowane ligandy są zdolne do wymiany anionu. Przykładem dobrych ligandów do wiązania LPS jest, m.in.: dietyloaminoetan, polimyksyna B, histamina, histydyna, poli-L-lizyna, polietyloimina, oraz proponowany chitozan [62]. Obecnie w praktyce produkcyjnej nie ma jednej metody oczyszczania, która pasowałaby do każdego produktu białkowego. Stosowana metoda ultrafiltracji ogranicza się do usuwania endotoksyn z soli,

małocząsteczkowych środków terapeutycznych lub wody. Ekstrakcja jest skuteczna w usuwaniu endotoksyn w silnie zanieczyszczonych próbkach, ale powoduje duże straty produktu. Chromatografia jonowymienna separuje LPS z produktów o słabym ładunku dodatnim [63]. Przykładem zastosowania tej metody w praktyce jest oczyszczanie roztworów pDNA w szczepionkach przeciw grypie, w której produkt zwykle charakteryzuje się czystością na poziomie 97%, ale wydajność związana ze stratami produktu wynosi 47–88%. Przeciwciała monoklonalne oczyszczają się zwykle przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa i chromatografii w trybie mieszanym, ze względu na wysoką specyficzność ligandów, które zapewniają odpowiedni rozdział z wysokim odzyskiem produktu. Inną praktykowaną metodą oczyszczania z LPS jest adsorpcja membranowa, której zaletą jest szybkość i niski koszt oraz wysoki odzysk białka, ale istotną wadą jest niska zdolność wiązania, która ogranicza skuteczność usuwania LPS dla niektórych produktów białkowych [64, 65]. Istnieje zatem potrzeba nowych rozwiązań w zakresie techniki produkcji biofarmaceutyków wytwarzanych przy użyciu bakterii Gram-ujemnych, w przypadku których zanieczyszczenie endotoksyną stanowi poważny problem. Istotne wydaje się poszukiwanie nowych ligandów, które wykazywałyby wysokie powinowactwo do endotoksyn, a przy tym nie generowałyby wysokich kosztów, były nietoksyczne i wydajne [66].

Przeprowadzone badania na chitozanie, jako potencjalnym ligandzie wiążącym LPS dostarczają istotnych informacji o możliwościach jego wykorzystania w praktyce. Z danych literaturowych wynika, że chitozan zdolny jest do tworzenia stabilnych kompleksów z LPS *Escherichia coli* i *Yersinia pseudotuberculosis* [67]. Opisywana interakcja zależy m.in. od czasu i temperatury reakcji, oraz od masy cząsteczkowej użytego chitozanu. Stabilny kompleks powstawał po inkubacji składników wyjściowych w temp. 37°C. Wykazano, że interakcja chitozanu z LPS ma wpływ na biologiczną aktywność LPS, który po podaniu myszom w testach laboratoryjnych wykazywał znacznie mniejszą toksyczność niż czysty LPS [68]. Powstawanie kompleksów chitozan-LPS związane jest z kationowym charakterem polimeru i polega na oddziaływaniu jonowym między naładowanymi ujemnie grupami LPS a aminowymi grupami chitozanu. Fosforanowe i karboksylowe grupy LPS, które znajdują się na fragmencie lipidu A są głównym czynnikiem nadającym cząsteczce LPS całkowitego ładunku ujemnego i to prawdopodobnie one są głównym miejscem wiązania z chitozaniem [69]. Badania interakcji chitozan-LPS pozwoliło także na obserwację zmian stałej tworzenia wiązania. Stała wiązania LPS z chitozaniem spada z dużą szybkością wraz ze wzrostem hydrofobowego charakteru LPS. Ponadto obecność chitozanu zmienia aktywność biologiczną LPS, wpływa na stymulację wydzielania cytokin i przyłączanie do określonych receptorów komórkowych. Chitozan może

znacząco hamować działanie prozapalne w makrofagach traktowanych LPS [70]. Opisywane właściwości chitozanu stwarzają obiecującą perspektywę i skłaniają do dalszych, bardziej szczegółowych badań nad potencjalnym zastosowaniem tego polimeru w procesie biotechnologicznej produkcji białek.

## **4.2. Chitozan w medycynie**

Chitozan i jego pochodne znalazły szerokie zastosowanie w obszarach medycznych. Biomateriały na bazie chitozanu przyciągają uwagę wielu badaczy przede wszystkim ze względu na jego unikatowe i wszechstronne właściwości biologiczne. Jako materiał bioaktywny chitozan i jego pochodne mogą być stosowane w inżynierii tkankowej, jako opatrunek na trudno gojące się rany, ale również nośnik substancji aktywnych i suplement diety wspomagający metabolizm tłuszczów [71].

Chitozan do zastosowań biomedycznych musi jednak spełniać warunek bardzo wysokiej czystości chemicznej i mikrobiologicznej. Często handlowe chitozany należy poddać dodatkowemu procesowi oczyszczania, np. chromatograficznego, sączenia i filtracji, czy też plazmy niskotemperaturowej. Pozostałości białek, pigmentów oraz zanieczyszczenia mikrobiologiczne mogą powodować fatalne skutki w kontakcie z organizmem ludzkim. Chitozan spełnia wszystkie wymagania stawiane biomateriałom [72]. Jest biozgodny, a więc może podlegać długotrwałemu kontaktowi z żywymi tkankami oraz płynami ustrojowymi. Charakteryzuje go również biodegradowalność, co oznacza że w organizmie ludzkim podlega rozkładowi na nietoksyczne związki, które mogą być wchłaniane lub wydalane w bezpiecznej formie. Chitozan jako biomateriał spełnia także warunek nietoksyczności, dlatego nie powoduje reakcji immunologicznych, stanów zapalnych i alergii [73].

Biomateriały na bazie chitozanu i jego pochodnych znalazły zastosowanie w medycynie, m.in. jako implanty kostne/chrzęstne, podłoża do hodowli komórkowych, implanty stomatologiczne, biomateriały wspomagające regenerację tkanki skóry, naczyń krwionośnych i tkanki nerwowej [74]. Opatrunki chitozanowe są szeroko testowaną grupą biomateriałów, w obszarze której naukowcy wciąż odkrywają nowe możliwości innowacyjnych rozwiązań. Wykorzystanie chitozanu jako opatrunku związane jest przede wszystkim z właściwościami hemostatycznymi oraz przeciwdrobnoustrojowego tego polimeru. Istnieje także możliwość łączenia go z substancjami czynnymi, z antybiotykami, bakteriofagami, czy jonami srebra, w celu ulepszenia jego działania terapeutycznego na trudno gojące się rany i oparzenia [75, 76]. Chitozan w procesie produkcyjnym pozwala na wytworzenie wielu form użytkowych, stosuje

się go w postaci hydrożeli, gąbek, filmów i błon, mikro i nanowłókien, kapsulek, granulatów i proszku [77].

#### 4.2.1. Opatrunki przeciwbakteryjne i hemostatyczne

Gojenie się ran to złożony proces fizjologiczny, w którym na każdym etapie zaangażowanych jest wiele złożonych interakcji i procesów. Niewłaściwe gojenie się rany może przerodzić się w stan przewlekły, często trudny do wyleczenia. W takich sytuacjach może dochodzić do zakażenia bakteryjnego. Trudno gojące się rany bardzo często są konsekwencją poważnych chorób, np. cukrzycy, chorób związanych z układem sercowo-naczyniowym, czy chorób o podłożu immunologicznym. Skóra wykazuje duże zdolności regeneracyjne, jednak w rozległych uszkodzeniach konieczne jest zastosowanie odpowiedniego leczenia i zabezpieczenie rany dobrze dobranym opatrunkiem. Duże rany skórne mogą zostać zainfekowane przez wiele szczepów bakterii, najczęściej są to: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* [78]. Główne etapy gojenia rany to: stan zapalny, następnie migracja komórek i angiogeneza, synteza macierzy komórkowej i odkładanie kolagenu. Na każdym z tych etapów dobrze dobrany opatrunek odgrywa istotną rolę. Powinien hamować krwawienia, zmniejszać stan zapalny i przyspieszać regenerację komórek. Ważne jest również jego działanie antybakteryjne, chroniące ranę przed zakażeniem [79].

Chitozan, dzięki właściwości przeciwzapalnej i hemostatycznej jest znakomitym kandydatem do projektowania opatrunków w leczeniu trudno gojących się ran. Materiały opatrunkowe na bazie chitozan działają na wszystkich etapach procesu gojenia. Przyspieszają agregację płytek i tworzenie skrzepu fibrynowego w stadium hemostazy, a w stadium zapalnym powodują proliferację neutrofilów i makrofagów [80].

Chitozan naśladuje natywną macierz zewnątrzkomórkową, co stwarza optymalne mikrośrodowisko dla gojącej się rany. Opatrunki chitozanowe wspomagają wzrost fibroblastów i proces ziarninowania. Dodatkowo działają bakteriobójczo wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [81].

Jego zdolność do modyfikacji chemicznej, pozwala na wytwarzanie funkcjonalnych form opatrunku, w zależności od potrzeb i późniejszego wykorzystania. Szeroko opisywanymi w literaturze opatrunkami chitozanowymi są proszki, nanowłókna, gąbki, membrany, hydrożele. Chitozan poddawano również modyfikacjom, np. sieciowaniu, stosowane były również kompozyty, gdzie chitozan łączono z innymi polimerami w celu zwiększenia jego aktywności przeciwbakteryjnej lub wytrzymałości mechanicznej [82].

Opatrunki chitozanowe powstałe w wyniku techniki elektroprzędzenia charakteryzowały się strukturą nanowłóknistą. Tą metodą można otrzymać wiele kompozytów polimerowych, skutecznych jako opatrunki w formie nanowłókien. Przykładem może być opatrunek karboksymetylochitozanowy, nanowłókna chitozanowo-alginianowe, czy nanokompozytowa membrana włóknista chitozanowo-kolagnowa [83].

Opatrunki nanowłókniste skutecznie absorbują wysięk i niwelują stan beztlenowy w środowisku rany. Ponadto, postać kompozytowa włókien zwiększa podatność na lizozym. Enzymatyczny rozkład powoduje uwalnianie chitooligomerów, czyli N-acetylo-glukozaminy i glukozaminy, które stymulowały makrofagi i korzystnie wpływały na odkładanie kolagenu [84].

Opatrunki w postaci gąbki chitozanowej są materiałem miękkimi i elastycznymi, o wysokiej porowatości. Powstają w procesie liofilizacji, dlatego też cechuje je wysoka chłonność, co umożliwia usuwanie wysięków z rany. Jednak są to materiały dość nietrwałe mechanicznie, dlatego też wskazane jest modyfikowanie ich na etapie wytwarzania dodatkami wzmacniającymi ich strukturę wewnętrzną lub sieciowaniem [85]. Opatrunek w postaci gąbki na bazie chitozanu umożliwia wymianę gazową, chroni przed odwodnieniem i ma dużą zdolność pęcznienia [86]. Można go również wzbogacić o środki przeciwdrobnoustrojowe. Gąbki chitozanowe wykazują właściwości hemostatyczne, mają korzystny wpływ na proliferację fibroblastów i redukcję drobnoustrojów [87].

Innym rodzajem szeroko opisywanych w literaturze opatrunków są hydrożele. Mają one postać sieci polimerowych, utworzone w procesie sieciowania hydrofilowych homopolimerów lub kopolimerów. Ich cenną właściwością jest zdolność absorpcji dużych ilości wody i płynów biologicznych. Hydrożele cechuje duże podobieństwo fizyczne i chemiczne do macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Extracellular Matrix*; ECM), dzięki czemu dyfuzja i proliferacja komórek jest znacznie ułatwiona [88]. Hydrożele chitozanowe wykazują idealne przyleganie do miejsca zranienia, odpowiednie właściwości mechaniczne i umożliwiają wymianę gazową w środowisku rany. Badania na modelu zwierzęcym wykazały, dobrą tolerancję, regenerację skóry, zmniejszenie stanu zapalnego i aktywność angiogenetyczną, sprzyjającą dobremu unaczynieniu nowych tkanek [89]. Zastosowanie hydrożelu kompozytowego PVA/ chitozan z minocykliną zapewnia wysoką aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Stosowanie opatrunków hydrożelowych jest szczególnie skuteczne w przypadku ran oparzeniowych, które wymagają intensywnego nawilżenia. Badano również skuteczność hydrożeli opartych na nanocząstkach chitozanu i jonów srebra. W tym przypadku nanocząstki srebra poprawiały właściwości mechaniczne hydrożelu i działały jako środek przeciwdrobnoustrojowy.

Hydrożele chitozanowo-alginianowe pobudzają proliferację fibroblastów, sprzyjają syntezie kolagenu i kwasu hialuronowego w miejscu rany [90].

Jednym z opatrunków dedykowanych do leczenia ran przewlekłych jest układ kompozytowy złożony z chitozanu, alginianu i kolagenu. Dzięki dużej porowatości i zdolności pęcznienia, opatrunek doskonale wchłania wysięk z rany i utrzymuje wilgotne środowisko, sprzyjające gojeniu [91].

Wyniki badań histologicznych wskazują, że stosowanie opatrunków chitozanowych w postaci membran stymuluje migrację komórek zapalnych i decyduje o organizacji komórkowej podczas procesu gojenia [92]. Dane kliniczne dowodzą, że błony chitozanowe przylegają jednolicie do powierzchni rany indukując kaskadowe reakcje krzepnięcia, zmniejszając towarzyszący procesowi gojenia ból i świąd, jak również wspomagają proces bliznowacenia [93].

Jedną ze strategii projektowania opatrunków przeciwdrobnoustrojowych jest modyfikacja fizykochemiczna polimerów chemicznymi czynnikami bójczymi, np. jonami srebra, amoksycyliną, penicyliną czy tlenkiem cynku [94]. Dodatkowo rozważa się stosowanie matryc polimerowych, w tym chitozanu w postaci bakteriofagów w środowisku rany, jako czynnik bakteriobójczy. Bakteriofagi wykazują skuteczne działanie bakteriobójcze na drodze cyklu litycznego, zarówno na bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Charakteryzuje je wąskie spektrum działania, które może być ukierunkowane na konkretny szczep bakterii [95]. Możliwość syntezy nośników powyższych czynników bójczych na bazie chitozanu jako preparatów półstałych (np. w postaci hydrożelu) lub stałych (np. membrana, gąbka, nanowłókna) pozwala „zaprojektować” mechanizm ich działania. Matryca biopolimerowa może w sposób kontrolowany uwalniać czynnik bójczy w środowisko rany lub go immobilizować w swojej strukturze (absorbacja wysięku rany i eradykacja patogenu) [96].

Chitozan został zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków (Food and Drug Administration; FDA) jako biomateriał do zastosowań w opatrunkach na trudno gojące się rany [97].

#### **4.2.2. Inżynieria tkankowa**

Medycyna regeneracyjna przeżywa obecnie intensywny rozwój, dzięki któremu pojawiły się nowe możliwości i kierunki leczenia wielu trudnych przypadków klinicznych. Inżynieria tkankowa jako technika opracowywania nowych biomateriałów, stwarza możliwości naprawy, utrzymania lub odzyskania funkcjonalności tkanek lub całych narządów. Zaczyna powoli zastępować tradycyjne metody leczenia, takie jak: ksenotransplantacja i implanty. Dzięki

wykorzystaniu kombinacji rusztowań, komórek i regulatorów wzrostu pozwala odzyskiwać i regenerować uszkodzone tkanki. Dużym zainteresowaniem w naprawie i regeneracji uszkodzonej tkanki cieszą się: chitozan, alginian, kwas hialuronowy, kolagen, hydroksyapatyt, fibroina czy żelatyna [98]. Chitozan z sukcesem został poddany licznym badaniom pod kątem jego użyteczności w inżynierii tkankowej, co stawia go w czołówce najbardziej obiecujących materiałów wykorzystywanych w inżynierii tkanki chrzęstnej i kostnej, tkanki naczyń krwionośnych, regeneracja rogówki, tkanki skórnej, czy inżynierii tkanek przyzębia [99]. Biomateriały chitozanowe można zmodyfikować w celu zwiększenia ich wytrzymałości mechanicznej i rozbudowy struktury wewnętrznej. W tym celu dodawano, m.in.: alginian, kwas hialuronowy (HA), polilaktyd (PLA), jedwab oraz bioaktywne nanomateriały, np. SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> czy hydroksyapatyt [100]. Obecność protonowalnej grupy aminowej wzdłuż reszt D-glukozaminy chitozanu pozwala oddziaływać z ujemnie naładowanymi błonami komórek (działanie hemostatyczne, mukoadhezyjne, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze). Ponadto polikationowa natura chitozanu wpływa na jego działanie przeciwbólowe [101]. Chitozan jest rozkładany *in vivo* przez proteazy, depolimeryzowany w procesie hydrolizy enzymatycznej, w której pośredniczą różne hydrolazy (m.in. lizozymy, pektynazy, celulazy, hemicelulazy, lipazy i amylazy). Ulega biodegradacji do nietoksycznych oligosacharydów lub monosacharydów, włączanych w szlaki metaboliczne i wydalanych z organizmu. Jest również uznany za odpowiedni materiał do konstruowania biorusztowań dla tkanek ludzkich i ma odpowiednie właściwości mechaniczne, morfologię i wysoką porowatość, co sprzyja adhezji komórek do powierzchni, ich różnicowaniu i proliferacji [102]. Biomateriały chitozanowe mogą być wytwarzane w postaci wielu różnych form użytkowych, np. gąbek, rurek, nanowłókien, hydrożeli, czy mikrokapsułów. Biomateriały chitozanowe w postaci podłoża do hodowli komórek charakteryzować powinna wysoka porowatość, która umożliwia namnażanie komórek, migrację i wymianę składników odżywczych. Strukturą chitozan przypomina glikozaminoglikany (GAG), dlatego też może je naśladować w regulacji czynników bioaktywnych [103].

Niewielka wytrzymałość mechaniczna biomateriałów chitozanowych wymaga dodatkowego wzmocnienia struktury poprzez łączenie z innymi związkami czy polimerami, np. węglanem wapnia, fosforanem wapnia czy krzemionką. Rusztowania chitozanowe spełniają swoją rolę w regeneracji tkanek kości i tkanki chrzęstnej, skóry, wątroby, tkanki rogówki czy też tkanki naczyniowej [104]. Dane literaturowe potwierdzają, że materiały chitozanowe są zdolne promować różnicowanie hodowanych komórek, np. w hodowlach melanocytów, keratynocytów, komórek nabłonkowych pochodzących z dróg oddechowych czy astrocytów

z zachowaniem cech fenotypowych, charakterystycznych i specyficznych dla linii komórkowych. Zastosowanie rusztowań na bazie chitozanu wpływa na wyższy potencjał proliferacji komórek i wyższy poziom ekspresji mRNA, w tym TGF- $\beta$ 1 oraz kolagenu typu III, jak również prawidłowy rozwój cytoszkieletu [105]. Porowatość biomateriału ma wpływ na migrację i adhezję komórek do podłoża. Przez oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe chitozan moduluje funkcje różnych aktywnych biocząsteczek, zwłaszcza nabłonkowych czynników morfogenetycznych, np. czynnika wzrostu fibroblastów, które promowały morfogenezę nabłonkową i proliferacyjną. Biomateriały indukują tworzenie włókien kolagenu typu I, III i IV [106]. Hodowle tkankowe na rusztowaniach chitozanowych charakteryzują się również zwiększoną zawartością glikozaminoglikanów (GAG), które stanowią rezerwuarnie niezbędnych czynników bioaktywnych, a w połączeniu z białkami, tworzą proteoglikany. Materiały na bazie chityny pomagają zaszczerpiętym komórkom regulować syntezę głównych elementów ECM swoistych dla tkanek. Jest to istotne z punktu widzenia przeżycia komórek w hodowli oraz prawidłowej organizacji i genezy tkanek [107].

#### **4.2.3. Systemy podaży leków**

Dane literaturowe potwierdzają wzrost zainteresowania nanonośnikowymi systemami dostarczania leków w postępowaniu klinicznym. Taka forma podaży substancji leczniczej umożliwia jej działanie bezpośrednio w miejscu wymagającym leczenia. Wiele badań skupiających się na konstrukcji nanocząstek o potencjalnie terapeutycznym dotyczyło wykorzystania polimerów naturalnych, w tym chitozanu. Stosowanie takich nośników eliminuje konieczność podawania leków drogą ogólnoustrojową [108].

Materiały kompozytowe na bazie chitozanu wykazują właściwości mechaniczne i czas retencji, umożliwiające projektowanie systemów podaży leków w funkcji czasu. Badania potwierdzają jego skuteczność jako nośnika DNA, siRNA, czy też regulatorów wzrostu. Chitozan testowano także w preparatach nanotechnologicznych, w formie nanocząstek do dostarczania leków, białek i genów różnymi drogami podawania (doustne, miejscowo i pozajelitowo) [109]. W celu zwiększenia stabilności polimeru stosuje się między innymi techniki sieciowania jonotropowego, czy też kowalencyjnego. Uwalnianie substancji aktywnej uzależnione było głównie od zmiany pH środowiska [110]. W literaturze znaleźć można wiele przykładów nośników na bazie chitozanu, które badane były pod kątem aktywności biologicznej oraz parametrów farmakokinetycznych. Znaleźć można takie przykłady jak: chitozan/ poliwinylpirolidon, chitozan/ tiolowany karboksymetylchitozan, chitozan / aptamer/

mezoporowate nanocząstki krzemionki/ doksorubicyna, chitozan/ pektyna/ 5-fluorouracyl, czy chitozan/ alginian magnetyczny/ amoksycylina [111-113].

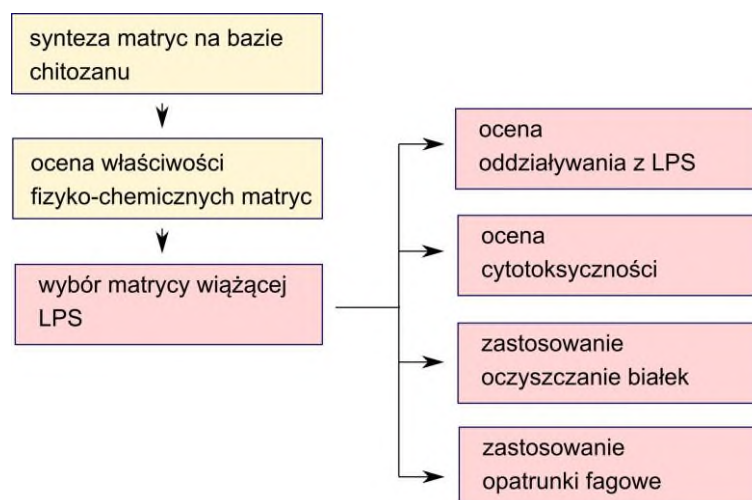
Chitozan wspomaga syntezę kationowych nanocząstek oligonukleotydowych, stabilizuje je zapobiegając aglomeracji. Może być stosowany jako polikationowy wektor niewirusowy do przenoszenia genów. Lipo-chitopleksy to nowe formy chitozanu zamkniętego w nanocząsteczkach lizosomalnych. Do ich wytwarzania zastosowano techniki żelowania jonotropowego, nanocząsteczki chitozanu inkubowano z liposomami anionowymi. Chitozan o niskiej masie cząsteczkowej z wysokim DD został usieciowany polianionowym tripolifosforanem. Lipo-chitopleksy są skuteczne w pułapkowaniu plazmidowego DNA (pDNA) w nanocząstkach, zapewniały doskonałą ochronę pDNA, niższą cytotoksyczność i poprawiały wydajność transfekcji. Taka forma została uznana za idealny mechanizm dostarczania genów w badaniach terapii niewirusowych *in vivo* [114].

Terapie białkowe zyskują coraz większą skuteczność w walce z nowotworami, problemami trawiennymi i chorobami autoimmunologicznymi. Jednak dystrybucja białek *in vitro* i *in vivo* jest wyzwaniem ze względu na zachowanie odpowiedniego stabilnego środowiska dla utrzymania białek w niezmienionej, niezdegradowanej i aktywnej formie. Nanocząstki chitozanowe mogą pomóc w rozwiązaniu problemu stabilności białek terapeutycznych w kwaśnych warunkach przy podaży doustnej [115]. Supramolekularne hydrożele chitozanowe o ulepszonych właściwościach mechanicznych oferują wysoki potencjał dystrybucji i mogą być nośnikiem białek w czasie regeneracji uszkodzonych tkanek. Wykorzystanie chitozanu w terapiach celowanych daje szansę na skuteczniejsze i bezpieczniejsze zwalczanie nowotworów, niż obecnie standardowo stosowana chemioterapia i radioterapia. Wykazano, że nanocząstki chitozanowe mogą chronić siRNA przed denaturacją i ograniczają dostarczanie osocza komórkom nowotworowym. Podanie w miejscu tkanek guza litego zwiększa retencję przepuszczalności i powoduje indukcję biomolekuł i czynników przeciwnowotworowych [116]. Materiały na bazie chitozanu mogą być środkami wspomagającymi w szczepionkach w zakresie immunostymulacji. Stworzone nanożele na bazie chitozanu w badaniach laboratoryjnych wykazały lepszą przenikalność oraz zdolność kontrolowanego uwalniania leku. W badaniu szczepionek donosowych zaobserwowano, że dzięki dodatniemu ładunkowi powierzchniowemu nanożel chitozanowy poprawiają adhezyjność substancji antygenowych do błon śluzowych nosa i lepsze wchłanianie [117].

## 5. Uzasadnienie podjęcia tematu

Produkcja białek rekombinowanych wymaga stosowania procedur ich oczyszczania z zachowaniem aktywności biologicznej. Istotnym aspektem jest wyeliminowanie niebezpiecznego czynnika pirogenego, jakim jest lipopolisacharyd (LPS), który jako endotoksyna, wykazuje bardzo silną odpowiedź immunologiczną w kontakcie z organizmem ludzkim. Biorąc pod uwagę właściwości biologiczne i chemiczne chitozanu, jego wysoką reaktywność i zdolność wiązania mikro- i makrocząsteczek, może być odpowiednim kandydatem do wykorzystania go w procesie oczyszczania białek z LPS. Dodatkowym atutem mającym znaczenie w procesie oczyszczania białek terapeutycznych jest fakt, iż chitozan to polimer naturalny o dużej biogodności. Jest nietoksyczny i biodegradowalny, dlatego też istnieje duże bezpieczeństwo jego użycia do celów medycznych czy farmaceutycznych. Ponadto dzięki właściwościom bójczym wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, jak również przeciwzapalnym i hemostatycznym, może być stosowany jako składnik macierzy w projektowaniu opatrunków dla trudno gojących się ran, np. jako nośnik polimerowy dla bakteriofagów.

Przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej badania mają charakter badań podstawowych. Jednak w oparciu o szeroko zbadane i opisane w źródłach literaturowych właściwości biologiczne chitozanu, podjęto próbę wykorzystania tego biopolimeru w biotechnologii i medycynie. Przegląd obecnego stanu wiedzy skłonił do zaproponowania wykorzystania chitozanu w dwóch różnych aspektach: jako matrycy do oczyszczania rekombinowanych białek fagowych z lipopolisacharydu bakteryjnego, oraz jako prototyp opatrunku z dodatkiem bakteriofagów o działaniu przeciwbakteryjnym (Ryc. 2).



Ryc. 2 Schemat części doświadczalnej rozprawy.

## 6. Cel pracy

Celem pracy jest synteza, charakterystyka fizykochemiczna i ocena właściwości biologicznych nowych biomateriałów na bazie chitozanu do:

1. Oczyszczania rekombinowanych białek fagowych z lipopolisacharydu (LPS). W badaniach zastosowano układ modelowy oparty na analizie wydajności oczyszczania dwóch białek tj. endolizyny i depolimeraza różniących się masą i strukturą przestrzenną, pozyskanych w procesie biotechnologicznym;
2. Jako nośników dla bakteriofagów umożliwiającą eradykację bakterii (*P. aeruginosa* PAO1). Jako układ modelowy zastosowano bakteriofagi różniące się morfologią i wielkością wirionu.

## 7. Materiały i metody

### 7.1. Materiały

Medyczny chitozan z krewetek (chit1) ChitoClear fg 95 (TM 4293) z firmy Primex ehf Iceland Company (Siglufjordur, Islandia) zastosowano do wytworzenia polimerowych granulek (ChbM-g) oraz matrycy dla bakteriofagów w postaci błony (Matrix). Chitozan z krewetek (chit2) ChitoClearfg 95 (TM 44000), firmy Primex ehf. Iceland Company (Siglufjordur, Islandia), oczyszczony przez firmę Karamedica INC (Raleigh, North Carolina, USA) przy użyciu plazmy niskotemperaturowej użyto do wytworzenia gąbki (ChbM-s); chitozan wykazywał wysoką czystość mikrobiologiczną, poziom endotoksyn bakteryjnych oczyszczonego chitozanu wynosił <10EU/g, z wynikiem ujemnym na obecność endotoksyn. Chitozan chit2 pozyskano w ramach współpracy z prof. Samuelem Hudson z North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.

Rekombinowane białka fagowe (endolizyna i depolimeraza) oraz szczep *Klebsiella pneumoniae* 77 (K63) wykorzystano do badań w ramach współpracy z zespołem prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawa z Uniwersytetu Wrocławskiego. Endolizyna KP27 jest małym, kulistym białkiem (~15,79 kDa), natomiast depolimeraza KP34p57 jest modułowym białkiem tworzącym strukturę trimeryczną (~202,92 kDa)




Peptydoglikan (PG) wyizolowano z komórek *E. coli* ATCC 8739 zgodnie z metodą opisaną przez Bera i in. pochodził z Zakładu Biologii Medycznej UJK [118].

LPS *P. aeruginosa* O10 oraz *E. coli* O111:B4 z firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

Linia komórek eukariotycznych: ludzkie komórki nabłonka podstawnego gruczołakoraka A549 (ATCC® CCL-185™, Manassas, VA, USA) zostały dostarczone przez American Tissue Cell Collection. Komórki A549 hodowano w pożywce F-12K (Sigma-Aldrich, USA) uzupełnionej 10% płodową surowicą cielęcą (Invitrogen, CA, USA), 2 mM L-glutaminy (Sigma Aldrich, USA) i antybiotykami: 100 jednostek/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (Invitrogen, CA, USA) w temp. 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

Jako fagi modelowe do immobilizacji na błonowej matrycy polimerowej (Matrix 1,2,3) wykorzystano trzy fagi lityczne specyficzne dla *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692; ATCC, Manassas, VA, USA), różniące się klasyfikacją taksonomiczną, specyficznością receptora i wielkością wirionu. KTN4 gigantyczny Phikzvirus i KT28 myovirus Pbnavirus pochodziły z kolekcji Katedry Biologii Patogenów i Immunologii Uniwersytetu Wrocławskiego w ramach współpracy z prof. dr hab. Zuzanną Drulis-Kawą [119, 120], natomiast podowirus LUZ19 został zastosowany, dzięki uprzejmości Laboratorium Technologii Genów KU Leuven, Leuven, Belgia [121]. Charakterystykę fagów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka fagów wybranych do badań

FAG	KT28	KTN4	LUZ19
Taksonomia	<i>Caudoviricetes</i> , <i>Pbnavirus</i> , Pbnavirus*	<i>Caudoviricetes</i> , <i>Phikzvirus</i> , Phikzvirus*	<i>Caudoviricetes</i> , <i>Autographiviridae</i> , <i>Krylovirinae</i> , <i>Phikmvirus</i> , Phikmvirus **
Morfologia i wymiary kapsydu [nm] <sup>1</sup>	 myovirus 74/136	 myovirus giant 130/168	 podovirus 65/12
Rozpoznawany receptor bakteryjny	LPS	T4P	T4P
Stabilność w pH	3-12	6-12	4-11
Wielkość genomu [kbp]	66	278	44
Numer dostępu GenBank	KP340287	KU521356	NC_010326
Referencje	Ceyssens et al. 2010	Danis-Włodarczyk et al. 2016	Olszak et al. 2018

<sup>1</sup>Przybliżone wymiary średnicy główki/długości ogona; \*zbiory Katedry Biologii Patogenów i Immunologii UWr, Wrocław; \*\*ze zbiorów Laboratorium Technologii Genów, KU Leuven, Leuven, Belgia

## 7.2. Metody

### 7.2.1. Parametry fizykochemiczne chitozanu

Wiskozymetryczną średnią masę cząsteczkową chitozanu chit1 oraz chit2 obliczono z lepkości istotnej [ $\eta$ ] za pomocą wzoru Marka-Houwinka:

$$[\eta] = k \times \overline{M}_V^\alpha \quad (1)$$

gdzie:  $k$ ,  $\alpha$ - wyznaczone empirycznie stałe wynoszące  $k=8,93 \times 10^{-4}$ ;  $\alpha=0,71$ ;  $\overline{M}_V$ -wiskozymetryczna średnia masa cząsteczkowa [122].

Pomiary lepkości wykonano na lepkościomierzu rozcieńczeniowym z kapilarą nr. 1,  $K \approx 0,01$ .

Metoda GPC/SEC (Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography) pozwala na analityczne wyznaczenie parametrów funkcji rozkładu mas molowych, wskaźnika dyspersji mas molowych oraz średnich wartości mas molowych. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem systemu GPC/SEC wyposażonego w wysokiej czułości detektor refraktometryczny nowej generacji Optilab T-rEX firmy Wyatt Technology, który umożliwia wykonywanie badań konwencjonalną i uniwersalną techniką kalibracji, w przypadku chitozanu z wykorzystaniem wartości parametrów Marka-Houwinka-Sakurady.

Stopień deacetylacji (*Deacetylation Degree*, DD) określono metodą spektrofotometryczną, polegającą na wyznaczeniu maksimum krzywej pierwszej pochodnej widma UV i obliczeniu DD chitozanu zgodnie z opracowaną metodą [123].

Lepkość dynamiczną [cP] określono na wiskozymetrze Brookfield model DV-II Digital wyposażonym w program Rheocalc V3.1-1 w temp.  $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$ . Do pomiaru dla objętości 0,5 ml użyto stożka typu CPE-40.

Zawartość wilgoci w chitozanie oznaczano wagowo na podstawie masy badanej próbki po suszeniu w temp.  $105^\circ\text{C}$  do stałej wagi. Zawartość wilgoci obliczono z zależności:

$$W = [(m_1 - m_0)/m_1] \times 100\% \quad (2)$$

gdzie:  $m_1$  - masa próbki (g) z dokładnością do 0,0001g przed suszeniem;  $m_0$  - masa próbki (g) z dokładnością do 0,0001g po wyschnięciu w temp.  $105^\circ\text{C}$ .

Oznaczenie części nierozpuszczalnych w chitozanie wykonano wagowo, na podstawie pomiaru masy badanej próbki po wysuszeniu w temp.  $105^\circ\text{C}$  do stałej masy. Po zważeniu próbkę chitozanu zmieszano z 100 ml 0,5% HCl i pozostawiono na mieszadle magnetycznym na 2 h. Otrzymany roztwór przesączono na lejku Schott'a, a części nierozpuszczalne po przemyciu wodą destylowaną wysuszono do stałej wagi w temp.  $105^\circ\text{C}$ . Udział części nierozpuszczalnych obliczono ze wzoru:

$$S_n = [(m_2 - m_1)] \times 100\% \quad (3)$$

gdzie:  $m_1$  - masa części nierozpuszczalnych (g) z dokładnością do 0,0001 g po wyschnięciu w temp.  $105^\circ\text{C}$ ;  $m_2$ - masa chitozanowa (g) z dokładnością 0,0001 g przed rozpuszczeniem.

Zawartość metali ciężkich oznaczono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej. Zastosowano spektrometr absorpcji atomowej o wysokiej rozdzielczości ze źródłem światła ciągłego Contra 700, firmy Analytik Jena. Mineralizację próbek przeprowadzono w 70% HNO<sub>3</sub> przy następujących parametrach mineralizacji: masa próbki: 0,5 g; 70% HNO<sub>3</sub> o objętości 10 ml; czas reakcji: 60 min; maksymalne ciśnienie: 100 psi. Obecność pierwiastków As, Cd, Pb, Zn i Hg określono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją elektrotermiczną (ET AAS).

Zawartość popiołu w chitozanie oznaczono wagowo na podstawie pozostałości po spopieleniu próby w temp. 800°C

Wskaźnik pęcznienia wtórnego chitozanu wyznaczono grawimetrycznie na podstawie równania:

$$\text{WRV} = [(m_1 - m_0)/m_0] \times 100\% \quad (4)$$

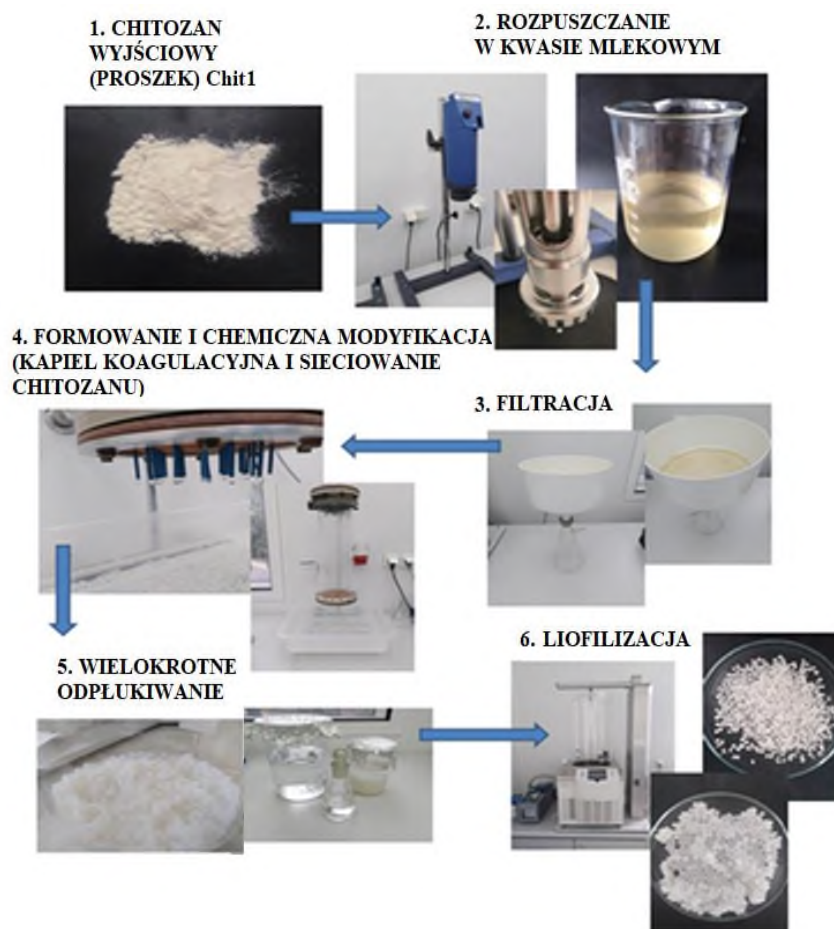
gdzie:  $m_1$  - masa próbki chitozanu po przetrzymywaniu w wodzie przez 20 h i odwirowaniu (4000 obr/min) przez 10 min;  $m_0$  - masa próbki chitozanu po wysuszeniu w temp. 105°C do stałej masy.

Chitozan jako materiał wyjściowy został scharakteryzowany pod kątem czystości mikrobiologicznej zgodnie z Farmakopeą Europejską 8.0: „Oznaczanie czystości mikrobiologicznej biopolimerów – Microbial enumeration tests [jtk/g]” w akredytowanym Laboratorium Biodegradacji i Analiz Mikrobiologicznych Łukasiewicz – ŁIT (Certyfikat akredytacji AB 388).

### **7.2.2. Synteza polimerowych granulek na bazie chitozanu (ChbM-g)**

Chitozan (chit1) w stężeniu 2,2% wag. rozpuszczono w 1,1% wag. roztworze kwasu mlekowego (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska) za pomocą homogenizatora firmy IKA WERKE typ T50, z końcówką umożliwiającą rozdrobnienie preparatu w postaci zawiesiny w zakresie 10-100 μm (typ G45G). Proces ten prowadzono przy szybkości 4800-6400 obr/min. przez 15 min. Następnie roztwór soli polimeru mieszano ze zmniejszoną prędkością ok. 4000-5200 obr/min. przez 4-6 h. W celu ustabilizowania wartości pH i odpowietrzenia otrzymany roztwór mleczanu chitozanu pozostawiono na noc w temp. 15°C. Po 24 h roztwór przesączono przez lejek Büchnera wyposażony w tkaninę batystową typu BT 192. Po procesie filtracji do roztworu soli chitozanu dodano 96% etanol (Chempur®, Polska) w ilości 3% wag. w stosunku do objętości roztworu mleczanu chitozanu. Dodatek alkoholu etylowego zastosowano w celu zmniejszenia siły napięcia powierzchniowego, która utrudniała

formowanie granulek o odpowiedniej morfologii oraz w celu zabezpieczenia przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym polimeru na etapie produkcji i późniejszego przechowywania. Czynnikiem sieciującym, użytym do modyfikacji granulatu był trifosforan pentasodu (TPP, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozpuszczony w wodzie w stężeniu 2% wag. w stosunku do zawartości polimeru w soli i dodany bezpośrednio do kąpielii koagulacyjnej, którą stanowił 5% wag. NaOH (Chempur®, Polska). Po dokładnym wymieszaniu roztwor mleczanu chitozanu umieszczono w zbiorniku wyposażonym w drobne kapilary na dnie i dozowano grawitacyjnie kroplami, bezpośrednio do kąpielii koagulacyjnej 5% wag. NaOH. Proces ten polegał na formowaniu granulek. Zbiornik umieszczono na takiej wysokości (ścieżka spadku- 10 cm), która umożliwiła utworzenie okrągłych granulek o pożądanej morfologii. Proces formowania w kąpielii koagulacyjnej trwał 24 h, po tym czasie powstałe granulki przemyto 8 razy wodą destylowaną o pH 7,3 (pH zwiększono przy użyciu 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Chempur®, Polska). Przemyte granulki ChbM-g (2,2% chitozanu w 1,1% LA z dodatkiem 3% etanolu usieciowanego 2% TPP) liofilizowano przy użyciu liofilizatora ALFA 2-4 LD Plus (Martin Christ GmbH, Niemcy). Liofilizację prowadzono w zakresie temperatur od (-17°C) do (+15°C), pod próżnią od 0,1 do 0,06 mbar. W zadanych warunkach całkowity czas suszenia wynosił 20 h. Schematyczny proces wytwarzania ChbM-g przedstawia Ryc.3.



Ryc. 3 Schemat przygotowania polimerowych granulek na bazie chitozanu (ChbM-g).

### 7.2.3. Synteza macierzy chitozanej o strukturze gąbki (ChbM-s)

Chitozan mikrokrystaliczny (MKCh) wytworzono przez aglomerację chitozanu z roztworu mleczanu, metodą ciągłą opracowaną w Sieci Badawczej Łukasiewicz- Łódzki Instytut Technologiczny, według patentu PL 164 247 [124]. W pierwszym etapie procesu przygotowano roztwór chitozanu wyjściowego (chit2) o stężeniu 2,0 % wag. w wodnym rozcieńczonym roztworze kwasu mlekowego (Avantor Performance Materials, Gliwice) o stężeniu 1,0 % wag. W tym etapie procesu wykorzystano homogenizator IKA WERKE typ T50 basic z końcówką pozwalającą na rozdrobnienie preparatu w formie zawiesiny w zakresie od 10–100  $\mu\text{m}$  (typ G45G)– proces prowadzono przy obrotach od 4800-6400 obr/min przez 15 min. Następnie roztwór soli polimeru mieszano przy pomocy mieszadła na zmniejszonych obrotach ok. 4000-5200 obr/min przez 4-6 h (z przerwami, w celu uniknięcia przegrzania roztworu polimeru). W celu ustabilizowania wartości pH, jak i odpowietrzenia, otrzymany roztwór mleczanu chitozanu pozostawiono do następnego dnia, przechowując go w lodówce

w temp. 15°C. Po 24 h roztwór poddano filtracji na lejku Büchnera zaopatrzonego w tkaninę batystową typu BT 192. Następnie roztwór soli chitozanu neutralizowano przy użyciu rozcieńczonego wodorotlenku sodowego (Chempur®, Polska) o stężeniu 0,65 % wag. aż do osiągnięcia pH otrzymanej zawiesiny w zakresie 7,4-7,6. Dyspersję mikrokryształicznego chitozanu (MKCh) oczyszczano przez wielokrotne odmywanie wodą destylowaną aż do zaniku reakcji na anion usuwanej soli (do spadku pH ok. 7,4-7,2; w temp. 20°C). Odmywanie odbywało się przy wykorzystaniu techniki membranowej w procesie ultrafiltracji na nuczcy wyposażonej w materiał filtracyjny, złożony z batystu i włókniny (PET-PP). Pozbawioną soli i nadmiaru alkaliów zawiesinę MKCh zatężano do konsystencji pasty, która stanowiła podstawową formę użytkową. Zawiesinę MKCh rozcieńczono do stężenia 2,0 % mikrobiologicznie czystą wodą i wykorzystano do przygotowania gąbki z dodatkiem gliceryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Glicerynę dodawano do MKCh o stężeniu 2% wag. w ilości 1:0,7 w stosunku do zawartości polimeru. Tak przygotowany mikrokryształiczny chitozan formowano na gotowych szablonach (kwadrat o wymiarach 5×5 cm) i liofilizowano w zakresie temp.: (-17°C) - (+15°C) pod próżnią 0,1-0,06 mbar. W zadanych warunkach całkowity czas suszenia wynosił 20 h. Schematyczny proces wytwarzania ChbM-s przedstawia Ryc.4.

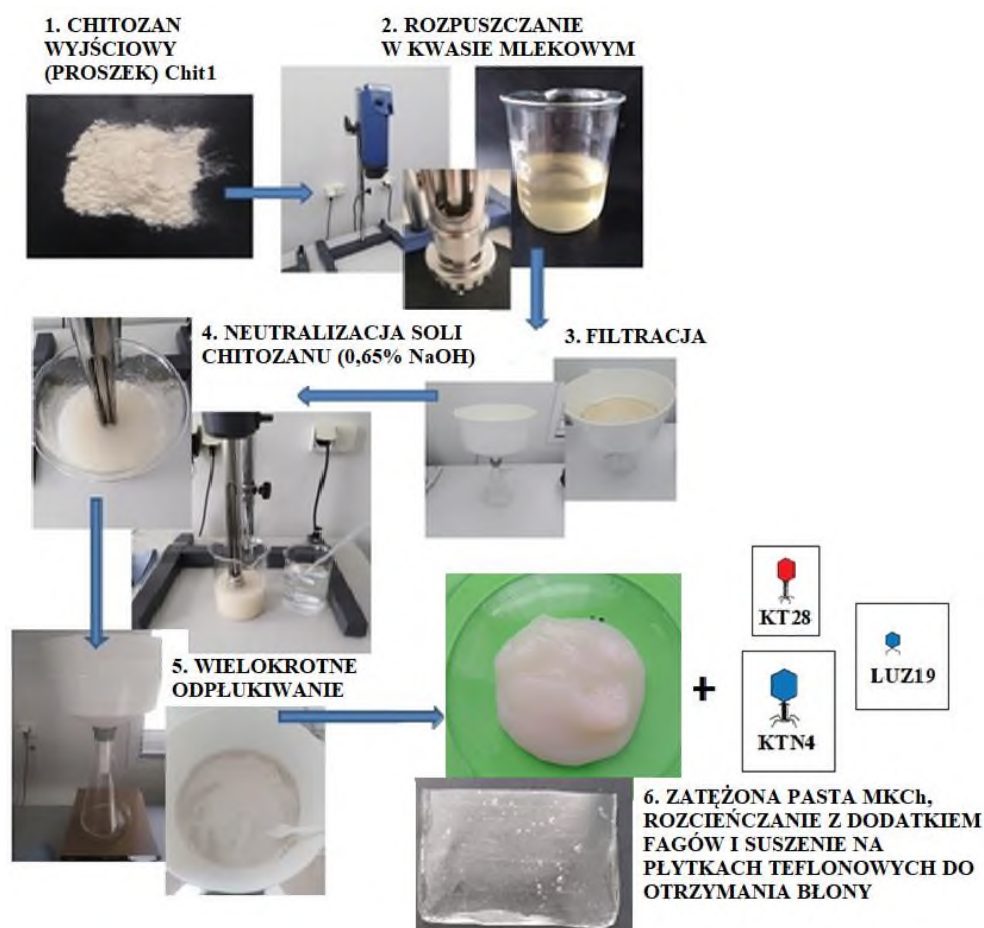


Ryc. 4 Schemat przygotowania macierzy chitozanej o strukturze gąbki (ChbM-s).

#### 7.2.4. Synteza matrycy chitozanej (Matrix) jako nośnika dla bakteriofagów

Mikrokryształiczny chitozan (MKCh) wytworzono metodą aglomeracji z roztworu, przy wykorzystaniu metody ciągłej, opracowanej w Sieci Badawczej Łukasiewicz- Łódzki Instytut Technologiczny, według patentu PL 164 247 [124]. W pierwszym etapie procesu przygotowano wyjściowy roztwór chitozanu (chit1) o stężeniu 1,0% wag. w wodnym rozcieńczonym roztworze kwasu mlekowego (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska) o stężeniu 0,45% wag. W tym etapie procesu wykorzystano homogenizator IKA WERKE typ T50 basic z końcówką pozwalającą na rozdrobnienie preparatu w formie zawiesiny w zakresie od 10–100  $\mu\text{m}$  (typ G45G)– proces prowadzono przy obrotach od 4800-6400 obr/min przez 15 min. Następnie roztwór soli polimeru mieszano przy pomocy mieszadła na zmniejszonych obrotach ok. 4000-5200 obr/min przez 4-6 h (z przerwami, w celu uniknięcia przegrzania roztworu polimeru). W celu ustabilizowania wartości pH, jak i odpowietrzenia, otrzymany roztwór mleczanu chitozanu pozostawiono do następnego dnia, przechowując go w lodówce temp.

15°C. Po 24 h roztwór poddano filtracji na lejku Büchnera zaopatrzonego w tkaninę batystową typu BT 192. Następnie roztwór soli chitozanu neutralizowano przy użyciu rozcieńczonego wodorotlenku sodowego (Chempur®, Polska) o stężeniu 0,65 % wag. aż do osiągnięcia pH otrzymanej zawiesiny w zakresie 7,4-7,6. Dyspersję mikrokrystalicznego chitozanu (MKCh) oczyszczano przez wielokrotne odmywanie wodą destylowaną, aż do zaniku reakcji na anion usuwanej soli (do spadku pH ok. 7,4-7,2; w temp. 20°C). Odmywanie odbywało się przy wykorzystaniu techniki membranowej w procesie ultrafiltracji na nuczycy wyposażonej w materiał filtracyjny złożony z batystu i włókniny (PET-PP). Pozbawioną soli i nadmiaru alkaliów zawiesinę MKCh zatężano do konsystencji pasty, która stanowiła podstawową formę użytkową. Zawiesinę MKCh rozcieńczono do stęż. 1,5% wag. mikrobiologicznie czystą wodą i wykorzystano do przygotowania Matrix jako nośnika dla bakteriofagów, w postaci błony z dodatkiem gliceryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Glicerynę dodawano do 1,5% MKCh w ilości 1:0,6 w stosunku do zawartości polimeru. Tak przygotowaną rozcieńczoną pastę MKCh (Matrix) w ilości 5 g wylano na płytki teflonowe o wymiarach okienka 5×6 cm i zmieszano z 1 ml hodowli modelowych fagów: KT28, KTN4 i LUZ19 ( $10^8$  PFU/ml). Płytki pozostawiono do wyschnięcia preparatów w temperaturze pokojowej w sterylnych warunkach. Schematyczny proces wytwarzania Matrix przedstawia Ryc.5.



Ryc. 5 Schemat przygotowania matrycy chitozanowej (Matrix) jako nośnika dla bakteriofagów KT28, KTN4 i LUZ19.

### 7.2.5. Parametry fizykochemiczne i mechaniczne ChbM-g, ChbM-s i Matrix

W celu określenia średniej masy cząsteczkowej granulatu ChbM-g metodą wiskozymetryczną, z przygotowanej soli chitozanu (2,2% wag. chit1 + 1,1% wag. LA +3% wag. EtOH) na płytki teflonowe wylano po 5 g roztworu soli chitozanu na płytkę i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej w celu uzyskania membran. Zawartość wilgoci w otrzymanych membranach oznaczono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.2.1. Membrany regenerowano przez dodanie do nich 25 ml mieszaniny regeneracyjnej (woda amoniakalna-EtOH w stosunku objętościowym: 30 ml: 70 ml) przez 24 h w temp. pokojowej. Po 24 h membrany przemyto kilkakrotnie wodą destylowaną o pH=7,0 i wysuszono na płytce teflonowej w temperaturze pokojowej. W tak przygotowanej i zregenerowanej membranie chitozanowej oznaczono średnią masę cząsteczkową chitozanu metodą wiskozymetryczną zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.2.1.

W celu określenia średniej masy cząsteczkowej metodą wiskozymetryczną mikrokrystalicznego chitozanu chit2 do wytwarzania ChbM-s, membrany z 1% wag. mikrokrystalicznym chitozanem, po 5 g każda, wylano na płytki teflonowe i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Zawartość wilgoci w otrzymanych membranach oznaczono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.2.1.

W celu określenia średniej masy cząsteczkowej metodą wiskozymetryczną mikrokrystalicznego chitozanu chi1 do wytwarzania Matrix dla bakteriofagów (KT28, KTN4 i LUZ19) membrany z 1% mikrokrystalicznym chitozanem, po 5 g każda, wylano na płytki teflonowe i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Zawartość wilgoci w otrzymanych membranach oznaczono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.2.1.

Do oznaczania zawartości polimeru w przygotowanej postaci użytkowej – ChbM-g, ChbM-s i Matrix, ok. 1g odważono na wadze analitycznej z dokładnością do 0,0001 g, umieszczono w naczyniu wagowym, wysuszono do stałej masy w temperaturze 105°C i oznaczono zawartość polimeru z następującej zależności:

$$Z_p = m_s / m_w \times 100 \% \quad (5)$$

gdzie:  $m_s$  – sucha masa próbki badanej (g);  $m_w$  – masa mokrej próbki badanej (g)

Właściwości chłonne gotowych preparatów chitozanowych- ChbM-g, ChbM-s i Matrix oceniono na podstawie wskaźnika wtórnego pęcznienia (WRV %) wyznaczonego grawimetrycznie na podstawie równania:

$$WRV = [(m_1 - m_0) : m_0] \times 100\% \quad (6)$$

gdzie:  $m_1$  – masa próbki po przetrzymaniu w wodzie przez 20 h i odwirowaniu (4000 rpm) przez 10 min;  $m_0$  – masa próbki po wysuszeniu w temp 105°C do stałej masy.

Stabilność chemiczną gotowych preparatów chitozanowych- ChbM-g, ChbM-s i Matrix oceniono na podstawie ich zachowania w środowisku o różnym pH (1,5; 7,0; 12,0). Próbkę 20 g umieszczono w 100 ml cieczy, a następnie obserwowano i określano czas potrzebny do pęcznienia lub rozpuszczenia próbek.

Do oceny stabilności mechanicznej odważono ilość 20 g gotowych preparatów chitozanowych- ChbM-g, ChbM-s i Matrix, umieszczono do kolb stożkowych z 100 ml wody destylowanej i wytrząsano przy amplitudzie 2, szybkości 250 obr/min przez 60 min. Po tym czasie obliczono ilość badanych próbek całkowicie lub częściowo zniszczonych, wyrażoną w % za pomocą wzoru:

$$Z = Z_1 / Z_0 \times 100 \% \quad (7)$$

gdzie:  $Z_1$ - ilość próbki po wirowaniu, całkowicie lub częściowo uszkodzona;  $Z_0$ -ilość próbki użytej do testów.

### 7.2.6. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Strukturę powierzchni ChbM-g, ChbM-s i Matrix oceniano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Quanta 200 (SEM) (FEI Co., USA). Próbki zamontowano na stole szczerkowym i spryskano cienką warstwą złota (20 nm) przy użyciu rozpylacza próżniowego Q150R S (z Quorum Technologies, Ltd. Limited Company, Wielka Brytania). Po rozpyleniu próbki umieszczono w komorze mikroskopu. Badania przeprowadzono w warunkach wysokiej próżni z napięciem przyspieszającym wiązkę elektronów 5 KV, z wykorzystaniem programu analySISDocu firmy Soft Imaging System, przystosowanego do pracy w środowisku Quanta.

### 7.2.7. Test LAL

Poziom LPS w natywnych matrycach polimerowych ChbM-s i ChbM-g, jak również w roztworach rekombinowanych enzymów fagowych po oczyszczaniu z użyciem żywicy komercyjnej, ChbM-g i ChbM-s, oznaczono testem LAL (PyroGene® rFC Assay, LONZA, Bazylea, Szwajcaria) według instrukcji producenta.

Analizę wykonano dla wszystkich wytworzonych wstępnych wariantów złoży w postaci granulek (mokrych i liofilizowanych) oraz gąbek. Przed badaniem próbki umieszczono na sterylnych płytkach z insertami hodowlanymi firmy Becton Dickinson o średnicy porów 1  $\mu\text{M}$  i przepłukano 2 ml wody wolnej od LPS, pozostawiono do spęcznienia na 24 h w temp. pokojowej. Po tym czasie płytki z badanymi materiałami polimerowymi odwirowano przy 1200 obr/min., 6°C, 10 min. i do każdej sterylnej płytki z badanymi matrycami polimerowymi dodano 1 ml standardowej endotoksyny (ze szczepu *P. aeruginosa* 010) w stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$ . Płytki z dodaną endotoksyną wytrząsano w temperaturze pokojowej (25°C) przy niskiej szybkości (40  $\text{min}^{-1}$ )/1h. Po 1h płytki z badanymi próbkami i endotoksyną odwirowano (1200 rpm, 6°C, 10 min), a następnie z otrzymanego przesącza pobrano po 100  $\mu\text{l}$ /dołek 96-dołkowej płytki mikrotitracyjnej. Do każdej studzienki dodano 100  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej (substrat fluorogenny: bufortestowy: enzyme rFC w stosunku 5:4:1). Standard LPS 10  $\mu\text{g/ml}$  zastosowano jako kontrolę pozytywną, a standard wody LAL (LAL water) zastosowano jako kontrolę negatywną. Reakcję prowadzono na 96-studzienkowej mikropłytkce i mierzono poziom fluorescencji w kilku odstępach czasu: czas zero, 20 min., 40 min. i 60 min., inkubacja w fluorescencyjnym czytniku mikropłytek (długość fali wzbudzenia/emisji 380/440 nm).

W obecności endotoksyny aktywator FC rozszczepia fluorogeniczny substrat, powodując fluorescencję roztworu. Logarytm netto fluorescencji jest proporcjonalny do logarytmu stężenia endotoksyny i jest liniowy w zakresie 0,005-5,0 EU/ml.

### **7.2.8. Oczyszczanie rekombinowanych białek fagowych**

Rekombinowane białka fagowe (depolimeraza i endolizyna) zostały poddane procesowi oczyszczania z LPS z wykorzystaniem matryc wyselekcjonowanych po przeprowadzonym teście weryfikacyjnym LAL: (1) granulek ChbM-g (25 peletek o średnicy 2 mm i masie całkowitej ~ 0,025 g; (2) gąbki ChbM-s w postaci krążka o średnicy 22 mm, wysokości 3 mm i masie ~ 0,1 g w porównaniu z (3) dostępną w handle żywicą do usuwania endotoksyn jako kontrolą. Poszczególne matryce polimerowe naniesiono na kolumny grawitacyjne wolne od endotoksyn i upakowano je tak, aby tworzyły podobną wysokość w kolumnach. 300 µl żywicy komercyjnej zregenerowano przez 2 h inkubacji z 1,5 ml 0,2 M NaOH w 95% etanolu i przemyto 1,5 ml 2 M NaCl, a następnie wodą ultraczystą, zgodnie z protokołem producenta. Następnie polimerowe matryce oczyszczające ChbM-g, ChbM-s oraz żywicę komercyjną zrównoważono 1,5 ml buforu PBS wolnego od endotoksyn. Na każdą matrycę oczyszczającą nałożono 1 ml białka i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie przesącz zebrano (szybkość przepływu 10-15 ml/h) i białka eluowano przy użyciu 1 ml wolnego od endotoksyn buforu PBS. Stężenie oczyszczonego białka mierzono bezpośrednio przed i po oczyszczeniu z LPS za pomocą fluorometru Qubit 2.0 (Qubit® Protein assay Kit, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz protokołu producenta.

### **7.2.9. Rozdział elektroforetyczny białek fagowych metodą SDS-PAGE**

Białka oczyszczone z LPS poddano elektroforetycznej separacji w warunkach denaturujących SDS-PAGE (SDS *polyacrylamide gel electrophoresis*). Białka testowe denaturowano merkaptoetanołem w temperaturze 99°C przez 5 min. Białka nałożono na żel w ilości 10 µl na studzienkę górnego żelu. Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 190 V, stosując jako standard białkowy Precision Plus Protein™ All Blue Protein Standard (BioRad, Hercules, CA, USA). Żele barwiono Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (BioRad, Hercules, CA, USA).

### **7.2.10. Badanie aktywności enzymatycznej oczyszczonych białek fagowych**

Przed i po oczyszczeniu określono doświadczalnie aktywność depolimerazy i endolizyny. Aktywność enzymatyczną rekombinowanej depolimerazy KP34p57 zbadano na szczepie *K. pneumoniae* 77 przez określenie minimalnego stężenia tworzącego efekt halo (MHFC). Próbkę oczyszczonego białka doprowadzono do stężenia 100 µg/ml stosując bufor PBS jako rozcieńczalnik i zestawu Qubit Protein Assay Kit do pomiarów. Następnie przygotowano seryjne dwukrotne rozcieńczenia do stężenia 0,78 µg/ml. Pobrane 10 µl każdego stężenia nanoszono na hodowlę bakteryjną na szalce Petriego o typie murawy. MHFC mierzono jako najniższe stężenie białka powodujące widoczną strefę halo na wysianej murawie bakteryjnej po 18 h inkubacji w temp. 37°C.

Aktywność enzymatyczną rekombinowanej endolizyny KP27 określono metodą degradacji peptydoglikanu. Z komórek *E. coli* ATCC 8739 wyizolowano peptydoglikan (PG) i użyto 100 µl w stężeniu 0,5 µg/ml do przeprowadzenia reakcji kinetycznej z 50 µl oczyszczonej endolizyny. W tym celu zastosowano pomiar spektrofotometryczny przy użyciu czytnika mikroplatek TECAN Spark® (Tecan Austria, GmbH) i długości fali 560 nm w temp. 37°C przez 90 min. z pomiarem interwałowym co 1 min.

### **7.2.11. Analiza cytotoksyczności ChbM-g i ChbM-s**

Matryce ChbM-g i ChbM-s oceniano pod kątem ich potencjalnych właściwości cytotoksycznych wobec żywych komórek. Jako modelową linię komórkową wybrano komórki A549. Hodowle prowadziło się na płytkach w standardowych warunkach 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Jako pożywkę hodowlaną zastosowano pożywkę Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Hodowlę pasażowano 3 razy, następnie 1 ml zebrano dosterylnej 6-studzienkowej płytki, w której komórki inkubowano z testowanymi ChbM-g i ChbM-s w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/24 h. Komórki nietraktowane próbkami badanymi zastosowano jako kontrolę negatywną, Natomiast inkubowane z chlorkiem niklu o stężeniu 25 µM jako kontrolę pozytywną. Po 24h inkubacji z badanymi związkami, hodowle odwirowano (10 min/900 crf), a osad komórek zawieszono w 100 µl 10-krotnie rozcieńzonego buforu BD (BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD Biosciences, Vaud, Szwajcaria). Z każdej próbki przeniesiono 100 µl zawiesiny komórek do probówek cytometrycznych. Do każdej dodano 5 µl aneksyny i 5 µl jodku propidyny. Próbkę inkubowano z barwnikami w temp. pokojowej przez 15 min., unikając światła. Po 15 min. do każdej próbki bezpośrednio przed pomiarem dodano 100 µl buforu BD, całość delikatnie

wytrząsano, a następnie zmierzono liczbę żywych i martwych komórek na cytometrze przepływowym (BD LSR II Flow Cytometer, BD Biosciences, Vaud, Szwajcaria).

#### **7.2.12. Analiza termogravimetryczna ChbM-g i ChbM-s metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (TG-DSC)**

Czyste ChbM-g i ChbM-s oraz po procesie oczyszczania z LPS analizowano metodą termiczną w celu zbadania reakcji chemicznych i przemian fazowych zachodzących podczas ogrzewania lub chłodzenia próbek. Pomiar różnicy mas z krzywej TG dostarcza informacji o zmianach składu próbki, termostabilności substancji oraz parametrach kinetyki reakcji chemicznych zachodzących w próbce. Badania przeprowadzono metodą analizy TG-DSC w beztlenowej atmosferze azotu (przepływ 21 cm<sup>3</sup>/min) w zakresie temperatur 20°C ÷ 500°C. Wagi próbek badanych mieściły się w zakresie 20,2-43,8 mg. Pomiar wykonano aparatem Setaram TG LabsysEvo 1150 z oprogramowaniem sterującym i generującym wyniki AKTS „Calisto”.

#### **7.2.13. Analiza struktury ChbM-s, ChbM-g i Matrix techniką spektroskopii Fourierowskiej w podczerwieni (FT-IR)**

Analizę struktury ChbM-s i ChbM-g, ich oddziaływań z cząsteczkami LPS i oczyszczonymi białkami, jak również analizę struktury Matrix oraz interakcji z fagami (KT28, KTN4 i LUZ19), przeprowadzono techniką spektrofotometrii w podczerwieni (FT-IR). Widma FT-IR rejestrowano na aparacie Genesis Series FT- Instrument IR™ (Unicam, Wielka Brytania) wyposażonym w oprogramowanie ATI Mattson i Peak Solve Analytical. Preparaty w postaci tabletek KBr przygotowano z użyciem odważników stałych. Próbki rozdrobniono mechanicznie i pobrano 1 mg, następnie zmieszano z wysuszonym KBr 100 mg i sprasowano pod ciśnieniem 70 atm. przez 5 min. Następnie zmielono w laboratoryjnym młynie kulowym w celu dokładnego zdyspergowania polimeru w nośniku i suszono przez 1 h w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 70°C w celu usunięcia wilgoci. Tak przygotowany preparat przeniesiono do komory transmisyjnej FT-IR. Przed pomiarem próbki dokonano pomiaru tła. Widma wykonano techniką rentgenowską w zakresie liczby falowej 500-4000 cm<sup>-1</sup>, z rozdzielczością 4 cm<sup>-1</sup> i liczbą skanów równą 32. W technikach transmisyjnych widmo oscylacji analizuje się, mierząc intensywność promieniowania po przejściu przez próbkę. Spadek natężenia padającej wiązki wskazuje na absorpcję promieniowania przez próbkę. W technikach transmisyjnych miarą absorpcji promieniowania o określonej liczbie falowej

$(\tilde{\nu})$  przez próbkę może być transmitancja ( $T(\tilde{\nu})$ ) lub absorbancja ( $A(\tilde{\nu})$ ), które są określone równaniami (8) i (9). Absorbancja jest wartością praktyczną, ponieważ można ją wykorzystać do ilościowego określenia absorpcji – jej wielkość jest wprost proporcjonalna do ilości cząstek absorbujących zgodnie z prawem Bouguera-Lamberta-Beera.

$$T(\tilde{\nu}) = \frac{I}{I_0} \quad (8)$$

$$A(\tilde{\nu}) = \log \frac{I_0}{I} = -\log T \quad (9)$$

gdzie:  $I_0$  – intensywność wiązki padającej na próbkę;  $I$  – intensywność wiązki po przejściu przez próbkę.

#### **7.2.14. Analiza profili uwalniania bakteriofagów z Matrix polimerowej techniką interferometrii laserowej**

Metodę interferometrii laserowej wykorzystano do analizy Matrix poprzez ilościowe określenie liczby uwolnionych fagów i niespolimeryzowanych składników matrycy (NMC) z produktu polimerowego w funkcji czasu. System interferometrii laserowej składa się z dwuwiązkowego interferometru Macha-Zehndera z laserem He-Ne typu HN 40P (Zeiss, Oberkochen, Niemcy), kuwety (wymiary wewnętrzne: wysokość 70 mm, szerokość 10 mm, długość drogi optycznej: 7 mm) wykonane ze szkła optycznego o wysokiej jednorodności, kamerę TV-CCD oraz komputer z oprogramowaniem do akwizycji i obróbki obrazów interferencyjnych (interferogramów) [125-127]. Zmodyfikowaną fagami Matrix umieszczono na dnie kuwety, którą następnie napełniono wodą. Właściwości transportowe fagów/NMC z matrycy polimerowej do wody mierzono za pomocą układu interferometrii laserowej na podstawie otrzymanych interferogramów. Komputerowy system przetwarzania obrazu wraz z dedykowanym oprogramowaniem umożliwia analizę matematyczną interferogramów wyświetlanych na ekranie systemu. Co więcej, wykonanie serii zdjęć obrazów interferencyjnych w czasie i przeprowadzenie ich analizy matematycznej umożliwia analizę ilościową kinetyki uwalniania fagów/NMC w czasie rzeczywistym w polach powierzchni bliskiej polimerowi. Interferogramy, które pojawiają się w wyniku interferencji wiązek laserowych, zostały określone przez współczynnik załamania substancji rozpuszczonej, który z kolei zależy od stężenia substancji. Gdy substancja rozpuszczona jest jednorodna, prążki interferencyjne są proste i wyginają się, gdy pojawia się gradient stężenia. Metodę interferometrii laserowej zastosowano więc również w badaniach fagów/NMC uwalnianych z polimeru w temperaturze 37°C przez 2 h. W tym celu analizowano całkowitą ilość

uwolnionych fagów/NMC. Ponieważ stała proporcjonalności między stężeniem a współczynnikiem załamania światła dla fagów/NMC uwolnionych w tym eksperymencie jest nieznana, obliczono sumy zmian współczynnika załamania światła (SCRI) substancji rozpuszczonej:

$$SCRI(t) = S \int_0^{\delta} \Delta n(x, t) dx. \quad (10)$$

SCRI(t) odzwierciedla zależność czasową całkowitej ilości fagów/NMC (w dowolnych jednostkach) uwolnionych z polimeru do fazy wodnej. Rejestrując interferogramy w danym przedziale czasu, można odtworzyć profile stężeń w różnych momentach. Interferogramy rejestrowano od 5 do 120 min z przedziałem czasowym  $\Delta t = 5$  min. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w temp. 37°C. Ponadto za pomocą system interferometrii laserowej zmierzono grubość Matrix (jej pęcznienie) podczas uwalniania fagów /NMC do wody. W tym celu za pomocą oprogramowania przeznaczonego do analizy interferogramów wyznaczono współrzędne obszaru danej membrany na obrazie interferencyjnym. Na podstawie uzyskanych współrzędnych określono grubość zmodyfikowanej Matrycy w pikselach. Następnie znając rozmiar piksela obliczono grubość membrany w mm. Dla powiększenia optycznego zastosowanego w naszym systemie pomiarowym, podczas eksperymentu rozmiar piksela był równy 0,019 mm.

#### **7.2.15. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej Matrix modyfikowanej bakteriofagami**

Matrycę o wymiarach 2 cm×2 cm (natywną i modyfikowaną fagami), przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.2.4. i analizowano dwiema metodami hodowli mikrobiologicznej.

Pierwsza metoda polegała na ocenie, czy fagi eradykujące bakterie *P. aeruginosa* PAO1 uwalniają się z Matrix. W tym celu matryce polimerowe o wymiarach 2 cm×2 cm (natywne i modyfikowane fagami) umieszczono w 2 ml czystej mikrobiologicznie wodzie w temp. 25°C przez 18 h. Następnie do dołków 96- dołkowej płytki mikrotitracyjnej dodano 90 µl wody po inkubacji z matrycami, 100 µl bulionu (tryptonowy bulion sojowy TSB, Thermo Scientific™, Waltham, MA USA) i 10 µl kultury bakteryjnej zawierającej 10<sup>5</sup> komórek *P. aeruginosa* PAO1. Kinetykę wzrostu bakterii mierzono, mierząc absorbancję przy 600 nm przez 18 h w temp. 37°C z odstępem czasu 0,5 h, stosując spektrofлуorymetr TECAN SPARK (Tecan Group Ltd., Szwajcaria) [120].

Drugi sposób badania aktywności przeciwbakteryjnej polegał na określeniu, czy Matrix przygotowana zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 7.2.4. absorbuje bakterie podczas jej pęcznienia, które następnie mogłyby być eliminowane przez obecne w strukturze polimerowej bakteriofagi. Powyższe właściwości przeciwdrobnoustrojowe matrycy polimerowej oceniono stosując zmodyfikowaną normę ISO 22196:2007 (E) na szczepie *P. aeruginosa* PAO1. W tym celu 200 µl hodowli bakteryjnej zawierającej  $10^5$  komórek *P. aeruginosa* PAO1 umieszczono na Matrix o wymiarach 2 cm×2 cm (natywnej i modyfikowanej fagami), a stopień redukcji określono zgodnie ze zmodyfikowaną normą ISO 22196 : 2007 (E).

### **7.2.16. Analiza statystyczna danych**

Dane analizowano statystycznie przy użyciu pakietu oprogramowania Statistica Version 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Pomiarów wykonano w trzech powtórzeniach. Wartości  $p$  mniejsze niż 0,05 uznano za statystycznie istotne. Różnice porównano za pomocą testu ANOVA.

## **8. Wyniki**

### **8.1. Parametry fizykochemiczne chitozanu**

Chitozan jako polimer naturalny posiada parametry o zmiennych wartościach, dlatego też każda partia chitozanu może różnić się poszczególnymi wartościami istotnych parametrów fizykochemicznych. Dogłębna charakterystyka materiałów wyjściowych jest bardzo ważna, zwłaszcza w przypadku zastosowania chitozanu do celów medycznych. Surowiec polimerowy musi charakteryzować się wysoką czystością mikrobiologiczną i chemiczną (z uwzględnieniem zawartości metali ciężkich i popiołu). Określenie masy cząsteczkowej chitozanu medycznego jest istotne ze względu na związek między budową cząsteczkową a aktywnością biologiczną. Stopień deacetylacji (DD) określa się jako stosunek liczby grup glukozaminowych do ogólnej liczby N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) i grup glukozaminy (GlcN) w łańcuchu polimerowym. Wartość DD ma znaczący wpływ na właściwości fizykochemiczne chitozanu, tj. rozpuszczalność, reaktywność chemiczną, pęcznienie w wodzie czy biodegradowalność. Deacetylowana chityna powinna zawierać co najmniej 60% reszt D-glukozaminy. Kolejnymi parametrami określanymi dla materiału wyjściowego są lepkość, zawartość wilgoci, rozpuszczalność i zdolność pęcznienia. Wykorzystanie w badaniach chitozany chit1 i chit2 analizowano pod kątem ich najważniejszych parametrów fizykochemicznych, wyniki zostały

zebrane w Tabeli 2 i 3. Surowce wyjściowe są podobne pod względem parametrów fizykochemicznych, mają wysoki stopień DD (na poziomie 86,8% i 76,9%), odpowiednią lepkość (39,17 cP i 33,4 cP) i masę cząsteczkową (119,95 kDa i 117,55 kDa), posiadają wysoki stopień czystości medycznej (brak zanieczyszczeń metalami ciężkimi: As, Cd, Pb, Zn, Hg i popiołem- wartości w normie), ale różnią się czystością mikrobiologiczną (bakterie i grzyby). Chit2 wykazuje ultraczystość, dzięki zastosowaniu dodatkowego oczyszczania plazmą niskotemperaturową. Proces oczyszczania został przeprowadzony dzięki międzynarodowej współpracy z prof. Samuelem Hudsonem i amerykańską firmą Karamedica INC (Raleigh, Karolina Północna, USA).

**Tabela 2. Parametry fizykochemiczne i czystość mikrobiologiczna chitozanu chit1 do syntezy ChbM-g.**

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>
Lepkość dynamiczna roztworu chitozanu metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwas octowy), cP	39,17
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną, kDa	119,95
Rozkład mas molowych, wartości średnich mas molowych i wskaźnik dyspersji mas molowych chitozanu metodą chromatografii żelowo-permeacyjnej SEC/GPC	Mn [g/mol] 47 367 Mw [g/mol] 111 367 Mw/Mn 2,4
Stopień deacetylacji metodą pierwszej pochodnej widma UV, DD,%	86,8
Zawartość wilgoci, wt%	8,75
Części nierozpuszczalne, wt%	0,31
Zawartość metali ciężkich, wt%	As<0,2; Cd<0,2; Pb<1; Zn= 0,23; Hg<0,01
Zawartość popiołu, wt%	0,60
Wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV %	224,59
Oznaczanie czystości mikrobiologicznej chitozanu zgodnie z Farmakopeą Europejską 8.0. Testy oznaczania mikrobiologicznego [cfu/g]	Bakterie: $1,1 \times 10^2$ ; Grzyby: $2,0 \times 10^1$

Tabela 3. Parametry fizykochemiczne i czystość mikrobiologiczna chitozanu chit2 do syntezy ChbM-s.

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>
Lepkość dynamiczna roztworu chitozanu metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwas octowy), cP	33,4
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną, kDa	117,55
Rozkład mas molowych, wartości średnich mas molowych i wskaźnik dyspersji mas molowych chitozanu metodą chromatografii żelowo-permeacyjnej SEC/GPC	Mn [g/mol] 51 067 Mw [g/mol] 119 233 Mw/Mn 3,0
Stopień deacetylacji metodą pierwszej pochodnej widma UV, DD,%	75,9
Zawartość wilgoci, wt%	10,34
Części nierozpuszczalne, wt%	0,33
Zawartość metali ciężkich, wt%	As<0,2; Cd<0,01; Pb<0,1; Zn=0,2; Hg<0,012
Zawartość popiołu, wt%	0,39
Wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV %	139,53
Oznaczenie czystości mikrobiologicznej chitozanu zgodnie z Farmakopeą Europejską 8.0. Testy oznaczania mikrobiologicznego [cfu/g]*	Bakterie: < 10 Grzyby: < 10

\* poziom endotoksyn<10EU/g (met. LAL)

Wykorzystanie w badaniach dwóch surowców wyjściowych o różnym stopniu czystości mikrobiologicznej miało na celu ocenę, czy czynnik ten ma istotny wpływ na końcowe działanie biologiczne wytworzonych w eksperymencie form biopolimerowych. Ze względu na różnicę w cenie tych dwóch surowców, możemy to również istotne znaczenie z ekonomicznego punktu widzenia dla potencjalnej produkcji na skalę przemysłową.

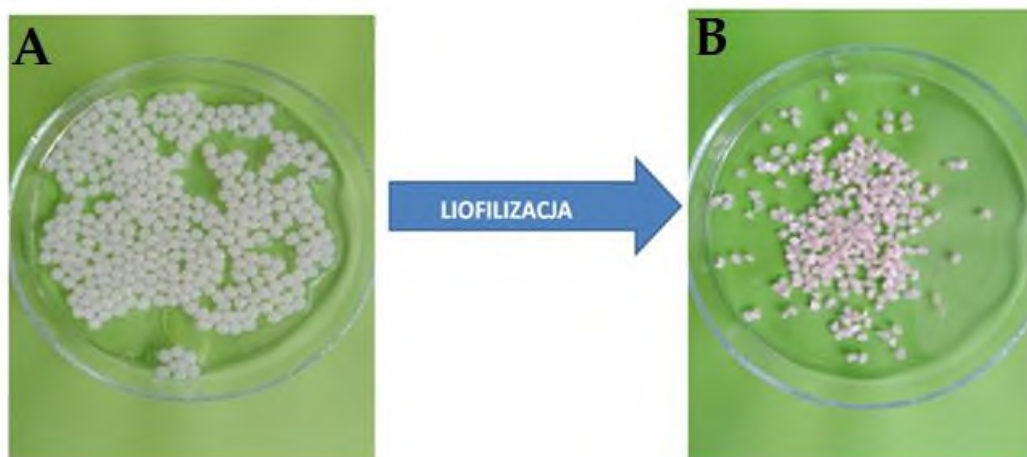
## 8.2. Parametry fizykochemiczne i mechaniczne ChbM-g, ChbM-s i Matrix

Przygotowane formy chitozanu: ChbM-g, ChbM-s oraz Matrix jako nośnika dla bakteriofagów zostały poddane ocenie ich parametrów fizykochemicznych oraz użytkowych: wytrzymałości chemicznej oraz mechanicznej.

Na etapie prób doboru odpowiedniego składu granulatu chitozanowego (ChbM-g) oraz gąbki (ChbM-s), wytworzonych zostało kilka początkowych wariantów, które w późniejszym etapie badawczym zostały poddane selekcji i wybrano dwie, najlepsze pod kątem wiązania cząsteczek LPS w teście weryfikacyjnym LAL (opis metody w podrozdziale 7.2.7.). W celu opracowania najlepszej formuły granulatu chitozanowego wykorzystano początkowo jako rozpuszczalniki kwas mlekowy (LA, *lactic acid*) i kwas octowy (CH<sub>3</sub>COOH) w różnych wariantach stężeniowych z dodatkiem lub bez dodatku środka sieciującego (TPP) i etanolu (EtOH): a. 2 % wag. chit1 + 2 % wag. CH<sub>3</sub>COOH (Tabela 4); b. 2 % wag. chit1 + 2 % wag. CH<sub>3</sub>COOH + 2 % wag. TPP (Tabela 4); c. 2 % wag. chit1 + 1 % wag. LA (Tabela 5); d. 2 % wag. chit1+1 % wag. LA + 2 % wag. TPP (Tabela 5); e. 2,2 % wag. chit1 + 1,1 % wag. LA

(Tabela 6); f. 2,2 % wag. chit1 + 1,1 % wag. LA + 2 % wag. TPP (Tabela 6); g. 2,2 % wag. chit1 + 1,1 % wag. LA + 3% wag. EtOH (Tabela 7); h. 2,2 % wag. chit1 + 1,1 % wag. LA + 3 % wag. EtOH + 2 % wag. TPP (Tabela 7); i. 2,2 % wag. chit2 + 1,1 % wag. LA + 3 % wag. EtOH+ 2 % wag. TPP (Tabela 8).

Wszystkie powyższe warianty badano w wersji mokrej po przepłukaniu z kąpieli koagulacyjnej oraz po procesie liofilizacji, w wersji suchej (Ryc. 6). Otrzymane wyniki przedstawiają Tabele 4-8.



Ryc. 6 Przykładowe zdjęcie granulek chitozanowych: (A) w formie mokrej; (B) w formie suchej

Tabela 4. Parametry fizykochemiczne wariantu ChbM-g: 2% chit1+2% CH<sub>3</sub>COOH; lepkość soli chitozanu: 125,7 cP (CPE 40; 25°C)\*

Parametr	2% chit1+ 2% CH <sub>3</sub> COOH mokre	2% chit1+ 2% CH <sub>3</sub> COOH liofilizat	2% chit1 + 2% CH <sub>3</sub> COOH + 2% TPP mokre	2% chit1+2% CH <sub>3</sub> COOH+ 2% TPP liofilizat
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	505,67	268,2	563,05	291,16
Zawartość polimeru (%)	3,11	96,79	2,91	87,48
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	92,0	77,9	92,0	93,6

\*2% chit1+2% CH<sub>3</sub>COOH- 2% chitozan chit1 rozpuszczony w 2% CH<sub>3</sub>COOH; Lepkość dynamiczna roztworu chitozanu wykonana metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwasie octowym, mierzona w 25°C) opis metody w podrozdziale 7.2.1.

Tabela 5. Parametry fizykochemiczne wariantu ChbM-g: 2% chit1+1% LA; lepkość soli chitozanu: 180,96 cP (CPE40; 25°C)\*

<b>Parametr</b>	<b>2% chit1+1% LA mokre</b>	<b>2% chit1+1% LA liofilizat</b>	<b>2% chit1+1% LA + 2% TPP mokre</b>	<b>2% chit1+1% LA + 2% TPP liofilizat</b>
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	525,46	213,57	634,49	316,3
Zawartość polimeru (%)	3,15	95,91	2,76	85,88
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	209,4	134,0	209,4	170,0

\*2% chit1+1% LA- 2% chitozan chit1 rozpuszczony w 1% LA; Lepkość dynamiczna roztworu chitozanu wykonana metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwasie octowym, mierzona w 25°C) opis metody w podrozdziale 7.2.1

Tabela 6. Parametry fizykochemiczne wariantu ChbM-g: 2,2% chit1+1,1% LA; lepkość soli chitozanu: 271,93cP (CPE40; 25°C)\*

<b>Parametr</b>	<b>2,2% chit1+1,1% LA mokre</b>	<b>2,2% chit1+1,1% LA liofilizat</b>	<b>2,2% chit1+1,1% LA+ 2% TPP mokre</b>	<b>2,2% chit1+1,1% LA + 2% TPP liofilizat</b>
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	524,86	190,62	661,90	311,52
Zawartość polimeru (%)	2,6	94,22	3,04	87,54
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	212,1	100,3	212,1	82,2

\*2,2% chit1+1,1% LA – 2,2% chitozan chit1 rozpuszczony w 1,1% LA; Lepkość dynamiczna roztworu chitozanu wykonana metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwasie octowym, mierzona w 25°C) opis metody w podrozdziale 7.2.1.

Tabela 7. Parametry fizykochemiczne wariantu ChbM-g: 2,2% chit1+1,1% LA+ 3% EtOH; lepkość soli chitozanu: 269,21cP (CPE40; 25°C)\*

<b>Parametr</b>	<b>2,2% chit1+1,1% LA+ 3% EtOH mokre</b>	<b>2,2% chit1+ 1,1% LA+ 3% EtOH liofilizat</b>	<b>2,2% chit1+ 1,1% LA+ 3% EtOH + 2% TPP mokre</b>	<b>2,2% chit1+ 1,1% LA+ 3% EtOH + 2% TPP liofilizat</b>
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	478,28	183,29	784,17	270,72
Zawartość polimeru (%)	2,5	94,37	2,48	85,74
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	197,0	70,7	197,0	91,0

\*2,2% chit1+1,1% LA+3% EtOH – 2,2% chitozan chit1 rozpuszczony w 1,1% LA z dodatkiem etanolu; Lepkość dynamiczn aroztworu chitozanu wykonana metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwasie octowym, mierzona w 25°C) opis metody w podrozdziale 7.2.1.

Tabela 8. Parametry fizykochemiczne wariantu ChbM-g: 2,2% chit2+1,1% LA+ 3% EtOH + 2% TPP; lepkość soli chitozanu: 484,24cP (CPE40; 25°C)\*

<b>Parametr</b>	<b>2,2% chit2+ 1,1%LA+ 3% EtOH+ 2% TPP mokre</b>	<b>2,2% chit2+ 1,1%LA+ 3% EtOH + 2% TPP liofilizat</b>
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	704,28	354,32
Zawartość polimeru (%)	2,51	87,15
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	97,5	125,2

\*2,2% chit2+1,1% LA + 3% EtOH+ 2% TPP – 2,2% chitozan chit2 rozpuszczony w 1,1% LA z dodatkiem etanolu, sieciowany 2% trifosforanem pentasodu (TPP); Lepkość dynamiczna roztworu chitozanu wykonana metodą Brookfielda, stożek - CPE 40 (1% chit. w 1% kwasie octowym, mierzona w 25°C) opis metody w podrozdziale 7.2.1.

Wskaźnik wtórnego pęcznienia (WRV %) jest parametrem bardzo istotnym z punktu widzenia użyteczności granulatu i gąbki jako absorbenta. Wysoka chłonność materiałów chitozanowych sprzyja zdolności wiązania mikro- i makrocząstek w środowisku wodnym. Wskaźnik WRV w przypadku badanych granulatów ChbM-g był znacznie wyższy dla wersji mokrej niż liofilizowanej. Granulaty sieciowane wykazywały większe zdolności chłonne zarówno dla form mokrych, jak i liofilizowanych. TPP poprzez sieciowanie łańcucha chitozanowego stwarza większą możliwość wiązania cząsteczek wody w strukturę polimeru. Ze względu na utratę wody w procesie liofilizacji formy suche zawierały także dużo większą zawartość procentową polimeru, niż ich warianty mokre, ale ich średnia wiskozymetryczna masa cząsteczkowa uległa zmniejszeniu.

W celu opracowania najlepszej formuły gąbki chitozanowej ChbM-s wytworzonych zostało kilka wariantów na mleczanie chitozanu z dodatkiem i bez dodatku gliceryny jako plastyfikatora oraz TPP, jako środka sieciującego w różnych stężeniach. Wyniki parametrów tych prób zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Parametry fizykochemiczne ChbM-s na mleczanie chitozanu chit1.

<b>Wariant gąbki</b>	<b>Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)</b>	<b>Zawartość polimeru (%)</b>
Mleczan chitozanu	1934,67	84,02
Mleczan chitozanu + gliceryna	1203,8	56,22
Mleczan chitozanu + 0,5 % TPP	1566,07	82,47
Mleczan chitozanu + 0,5 % TPP + gliceryna	1499,75	53,87
Mleczan chitozanu + 1,0 % TPP	1397,9	83,22
Mleczan chitozanu + 1,0 % TPP + gliceryna	1087,52	55,06

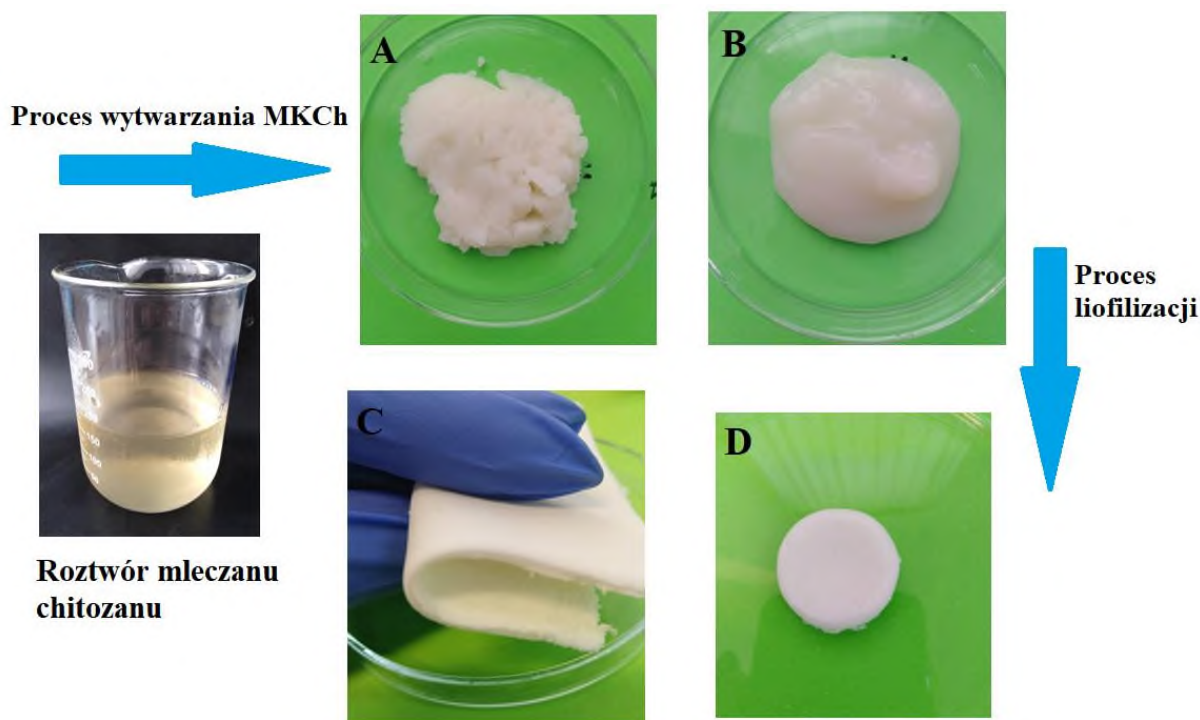
Wykonano również kilka kompozycji gąbek na chitozanie mikrokrystalicznym (MKCh) w różnych stężeniach z dodatkiem i bez dodatku gliceryny. Wyniki parametrów tych prób zestawiono w Tabeli 10-11. Na Ryc. 7. Przedstawiono przykładowe ChbM-s wytworzone z MKCh w procesie liofilizacji.

Tabela 10. Parametry fizykochemiczne ChbM-s na mikrokrystalicznym chitozanie chit1.

<b>Parametr</b>	<b>1,2% MKCh</b>	<b>2,5% MKCh</b>	<b>1,5%MKCh+ gliceryna</b>	<b>2,0% MKCh+ gliceryna</b>
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	115,54	129,52	141,4	154,87
Zawartość polimeru (%)	92,06	93,3	60,81	62,33

Tabela 11. Parametry fizykochemiczne ChbM-s na mikrokrystalicznym chitozanie na chit2.

<b>Parametr</b>	<b>1,5% MKCh</b>	<b>2,0% MKCh</b>	<b>1,5% MKCh+ gliceryna</b>	<b>2,0% MKCh+ gliceryna</b>
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	117,61	144,58	134,57	184,0
Zawartość polimeru (%)	85,96	90,16	75,62	48,86



Ryc. 7 Przykładowe zdjęcia gąbek chitozanowych wytworzonych w wyniku procesu aglomeracji chitozanu z roztworu mleczanu, metodą ciągłą (A) zatężona pasta MKCh; (B) pasta po rozcieńczeniu; (C) gąbka MKCh otrzymana w procesie liofilizacji w kształcie kwadratu; (D) gąbka MKCh otrzymana w procesie liofilizacji w kształcie krążka.

W przypadku wytwarzania gąbek z mikrokrystalicznego chitozanu (MKCh), określono także najważniejsze parametry fizykochemiczne dla wyjściowej pasty MKCh, z której wykonano rozcieńczenia do formowania gąbek. Wyniki dotyczyły pasty wykonanej z obu surowców wyjściowych- chit1 i chit2, które zestawiono w Tabeli 12-13.

Tabela 12. Parametry fizykochemiczne mikrokrystalicznego chitozanu (MKCh) na chit1.

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	134,3
Zawartość polimeru (%)	5,28
Zawartość wilgoci w błonie z 1% MKCh (% wag.)	13,43
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	688,25

Tabela 13. Parametry fizykochemiczne mikrokrystalicznego chitozanu (MKCh) na chit2.

Parametr	Wartość
Średnia masa cząsteczkowa metodą wiskozymetryczną (kDa)	121,1
Zawartość polimeru (%)	3,77
Zawartość wilgoci w błonie z 1% MKCh (% wag.)	12,04
Wartość wskaźnik wtórnego pęcznienia, WRV (%)	623,35

Wszystkie badane formy gąbek wykazywały zdolność pęcznienia w środowisku wody. Największym stopniem pęcznienia charakteryzowały się formy gąbek wytworzonych na mleczanie chitozanu (wartości WRV w zakresie 1087,52-1934,67 %). Natomiast dla formy gąbek wytworzonych na MKCh ten wskaźnik wykazywał mniejszą wartość- w zakresie 115,54-184,0 % i wzrastał wraz ze wzrostem stężenia chitozanu w próbce. Pod wpływem procesu sublimacyjnego, stosowanego do wytwarzania gąbek MKCh wartość WRV zmniejsza się w porównaniu z wartością dla samej pasty. Jest to zauważalne w przypadku formy mikrokrystalicznej zarówno dla chit1, jak również dla chit2. Zjawisko to jest związane z przemianami wewnątrzcząsteczkowymi w trakcie procesu wytwarzania i końcowej liofilizacji.

Badanie odporności chemicznej wszystkich wariantów ChbM-g i ChbM-s oceniano na podstawie ich zachowania w środowisku o różnym pH. Próbkę o masie 20 g umieszczano w 100 ml płynu: 0,9 % wag. NaCl (pH 7,00), 1,5% wag. HCl (pH 1,5) oraz 1,5% wag. NaOH (pH 12,00), a następnie obserwowano i określano czas, po jakim materiały chitozanowe ulegały spęcznieniu lub rozpuszczeniu. Testy wytrzymałości chemicznej wszystkich ChbM-g i ChbM-s potwierdziły ich odporność w środowisku obojętnym oraz zasadowym- materiały spęczniały po ok. 10-15 min., ale nie uległy rozpuszczeniu. Natomiast nie wykazywały odporności chemicznej w pH kwasowym, po 10-15 min. (bez mieszania) gąbki uległy całkowitemu rozpuszczeniu, granulaty suche po 2-3 min., a granulaty liofilizowane po ok. 5 min.

Badanie wytrzymałości mechanicznej wszystkich wariantów ChbM-g i ChbM-s polegało na umieszczeniu materiału polimerowego w kolbach stożkowych, następnie zalano je 100 ml wody destylowanej i wytrząsano przy amplitudzie 2, prędkości 250 rpm przez 60 min. Po tym czasie obserwowano próbki pod kątem ewentualnych uszkodzeń i zmian morfologicznych. Wszystkie badane warianty ChbM-g i ChbM-s wykazywały odporność mechaniczną w zadanych warunkach.

Na etapie prób doboru odpowiedniego składu Matrix jako nośnika dla bakteriofagów wytworzone zostały trzy warianty kompozycyjne:

- a. Matrix 1: 1,5% MKCh
- b. Matrix 2: 1,0% MKCh+ 0,7 gliceryna

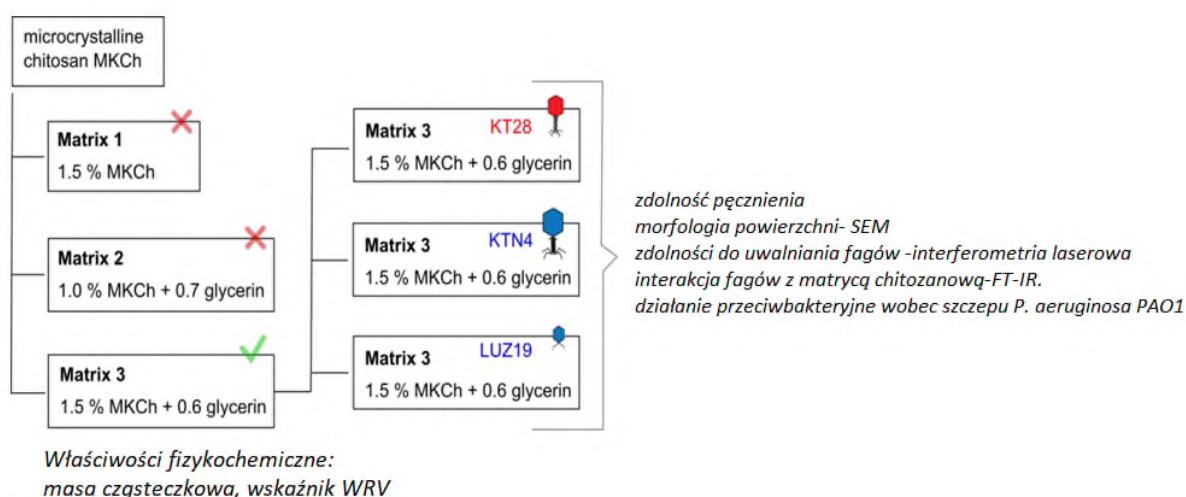
c. Matrix 3: 1,5% MKCh+ 0,6 gliceryna

Trzy matryce w postaci filmu (Matrix 1, Matrix 2 i Matrix 3) przygotowano z mikrokrystalicznego chitozanu MKCh, wytwarzanego przez aglomerację z roztworu 1 % wag. chitozanu chit1 w 0,45 % kwasie mlekowym (opis metody podrozdział 7.2.4., Ryc. 4). Po wysuszeniu wszystkich trzech matryc na płycete flonowej jedynie Matrix 3 była mechanicznie odporna na uszkodzenia/naruszenia. Pozostałe matryce w postaci wysuszonej kruszyły się i próba ich zdjęcia z płytki nie powiodła się (Tabela 14).

Tabela 14. Matryce przygotowane z mikrokrystalicznego chitozanu (MKCh).

MKCh-Matrix	Skład kompozycji	Odporność mechaniczna
Matrix 1	1,5% MKCh	-
Matrix 2	1,0% MKCh+0,7 gliceryny	-
Matrix 3	1,5% MKCh+0,6 gliceryny	+

Wytworzony film był zbyt cienki i łamliwy, dlatego do dalszych badań wybrano Matrix 3, którą wykorzystano jako nośnik dla bakteriofagów KT28, KTN4 oraz LUZ19 i testowano pod kątem pozostałych właściwości fizykochemicznych i biologicznych: zdolności pęcznienia, morfologii powierzchni metodą SEM, zdolności do uwalniania fagów badanej za pomocą system interferometrii laserowej oraz interakcji fagów z matrycą chitozanową mierzonych metodą FT-IR. Biokompozyt w postaci błony został ostatecznie oceniony pod kątem działania przeciwbakteryjnego wobec szczepu *P. aeruginosa* PAO1. (Ryc. 8).



Ryc. 8 Schemat badań Matrix jako chitozanowego nośnika dla bakteriofagów.

Wybrana do dalszych badań Matryca 3 została sprawdzona pod kątem ubytków masy cząsteczkowej po procesie jej wytwarzania. Aglomeracja MKCh jest skorelowana z redukcją

masy cząsteczkowej chitozanu, dlatego w analizie fizykochemicznej wyznaczono średnią masę cząsteczkową samej Matrix 3 za pomocą metody wiskozymetrycznej. Próbkę MKCh do tego pomiaru przygotowano w postaci filmu (pasta wysuszona w temperaturze pokojowej), który rozpuszczono w 25 ml rozpuszczalnika o składzie: 0,2 M kwas octowy + 0,1 M chlorek sodu + 4 M mocznik. Przy określaniu masy uwzględniono wilgotność próbki (%). Pomiar lepkości wykonano na wiskozymetrze rozcieńczeniowym z kapilarą nr 1,  $K \approx 0,01$  (Tabela 15).

Tabela 15. Parametry fizyczne Matrix 3 mierzone metodą wiskozymetryczną do oznaczania masy cząsteczkowej chitozanu.

Masa próbki [g]	Objętość <sup>1</sup> [ml]	T <sub>0</sub> <sup>2</sup> [s]	Wilgoć <sup>3</sup> [%]	k <sup>4</sup>	$\alpha$ <sup>4</sup>	[ $\mu$ ] <sup>5</sup>	M <sub>v</sub> <sup>6</sup> [kDa]
0,0393	25	111,39	4,85	$8,93 \times 10^{-4}$	0,71	5,641	225,3

<sup>1</sup>objętość zużytego rozpuszczalnika; <sup>2</sup>czas splywu rozpuszczalnika; <sup>3</sup>zawartość wilgoci w badanej próbce; <sup>4</sup>k,  $\alpha$ -stałe wartości wyznaczone empirycznie; <sup>5</sup>graniczna liczba lepkości; <sup>6</sup>średnia masa cząsteczkowa

Masa cząsteczkowa chitozanu w Matrix 3 (225,3 kDa) okazała się mniejsza w porównaniu z chitozaniem w proszku (235 kDa) użytym do syntezy Matrix, ale poziom redukcji masy cząsteczkowej był niski, co wskazuje, że chitozan nie ulegał degradacji podczas przygotowania Matrix 3. Różnica w masie cząsteczkowej chitozanu może być związana z redukcją cząsteczek wody w strukturze matrycy.

Następnie zmierzono wskaźnik wtórnego pęcznienia (WRV%) zsyntetyzowanej matrycy polimerowej w celu określenia zdolności do wchłaniania wody, co ma duże znaczenie w kontekście tworzenia opatrunków chłonnych. Pastę MKCh rozcieńczono do stęż. 1,5% wag. przy użyciu wody i utworzono Matrix 3 w postaci filmu połączonego z każdym fagiem osobno (KTN4, KT28 lub LUZ19). Wybrano trzy fagi: myovirus KT28 o średniej wielkości kapsydu (74/136 nm) specyficzny dla lipopolisacharydu (LPS), olbrzymi wirus KTN4 (130/168 nm) i mały podowirus LUZ19 (65/12 nm) adsorbujący się na pilusach typu IV (T4P). Matrycę 3 wylano na płytki teflonowe, pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej i scharakteryzowano pod względem zdolności pęcznienia (opis metody w podrozdziale 7.2.5.). Wysoki wskaźnik wtórnego pęcznienia badanego biokompozytu membranowego świadczy o jego dużej higroskopijności (Tabela 16).

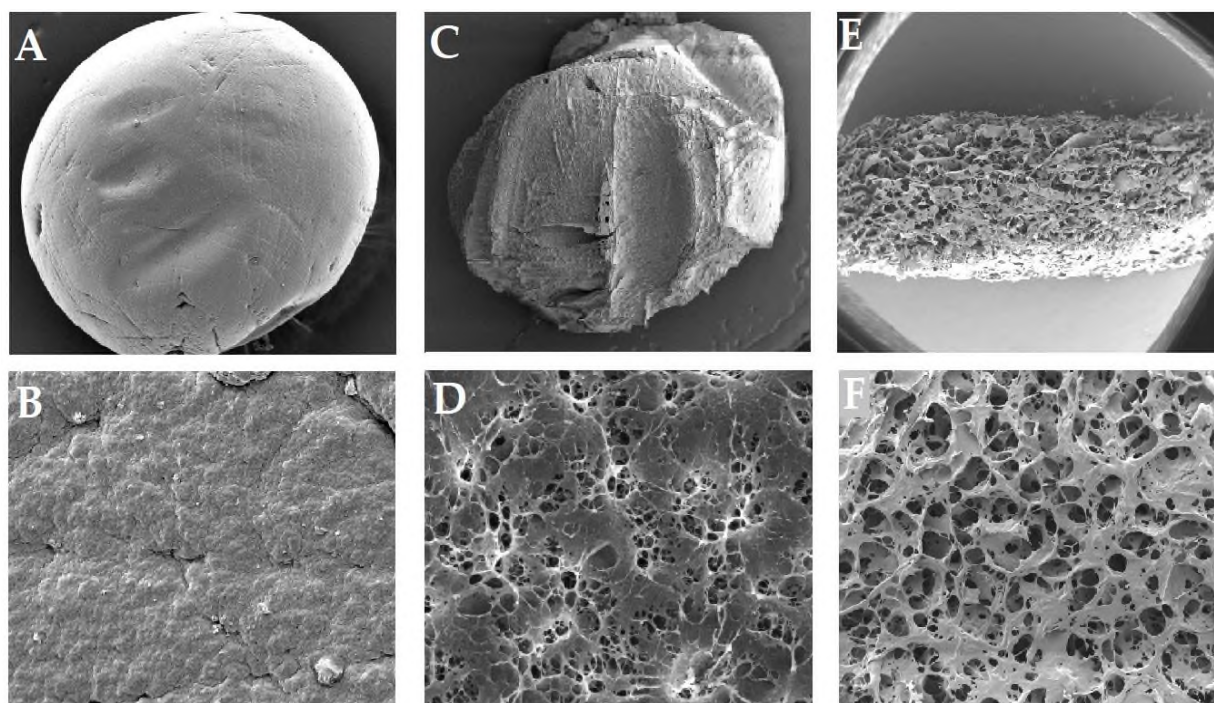
Tabela 16. Zdolność pęcznienia (wskaźnik WRV%) samej Matrix 3 i zmodyfikowanej fagami.

Matryca polimerowa	Wartość wskaźnika wtórnego pęcznienia, WRV (%)
Pasta MKCh	714,00
Matrix 3	366,67
Matrix 3 + KTN4 giant phage	390,32
Matrix 3 + KT28 myovirus	195,16
Matrix 3 + LUZ19 podovirus	256,41

Natywna Matrix 3 i modyfikowana fagami miała 2-4 razy mniejszą zdolność pęcznienia niż postać pasty MKCh (714,00%; wskaźnik WRV). Wiąże się to ze spadkiem stężenia chitozanu w badanych polimerach w porównaniu z koncentracją chitozanu w wytworzonej paście. Największą zdolność pęcznienia stwierdzono dla Matrix 3 z gigantycznym KTN4, następnie z podowirusem LUZ19, a najniższą z połączonym myowirusem KT28. Wielkość wirionów fagów nie była skorelowana z właściwościami pęcznienia Matrix 3. Ogólnie rzecz biorąc, cukry rozpoznające faga KT28 (LPS) miały najwyższą zdolność chemiczną do wiązania się z Matrix 3 na bazie chitozanu. Wydaje się, że odpowiada to niższemu poziomowi indeksu WRV. Test potwierdza zdolność wchłaniania płynów przez Matrix 3.

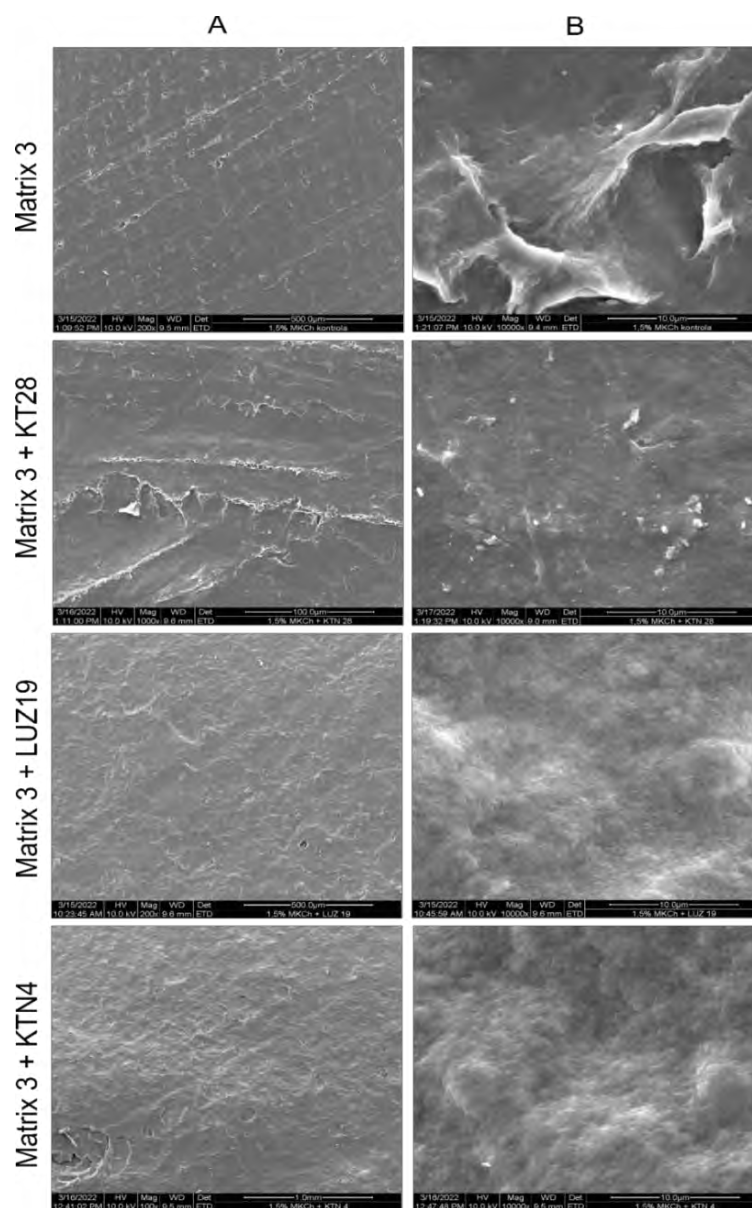
### 8.3. Analiza strukturalna powierzchni ChbM-g, ChbM-s i Matrix metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Strukturę powierzchni ChbM-g i ChbM-s oceniano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego Quanta 200 (SEM) (FEI Co., USA) przy różnych powiększeniach (50-5000×). Mikrofotografie SEM granulatów w wersji mokrej i liofilizowanej potwierdzają rozwiniętą, wewnętrzną strukturę morfologiczną. Gąbka oraz liofilizat granulate charakteryzują się wysoką porowatością struktury. Fotografie SEM przedstawiono na Ryc. 9.



Ryc. 9 Dokumentacja fotograficzna SEM dla ChbM-g: (A) granulat mokry, powierzchnia zewnętrzna, pow. 170×; (B) granulat mokry, powierzchnia zewnętrzna, pow. 5000×; (C) granulat liofilizowany, powierzchnia zewnętrzna, pow. 70×; (D) granulat liofilizowany, powierzchnia zewnętrzna, pow. 5000×) i ChbM-s: (E) gąbka MKCh w przekroju poprzecznym; pow. 50×; (F) gąbka MKCh w przekroju poprzecznym, pow. 100×.

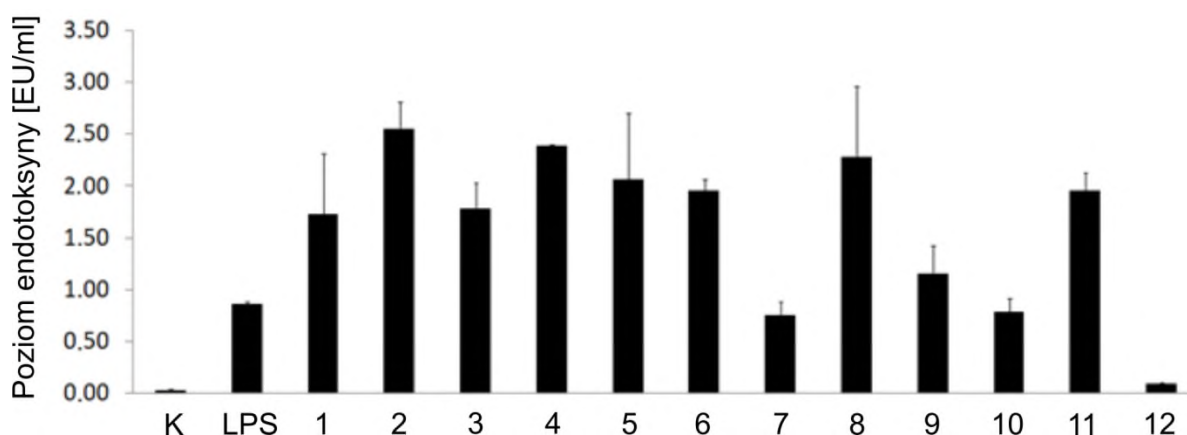
Analizie struktury powierzchni poddano również matrycę fagową Matrix 3. Oceniono morfologię powierzchni samej Matrix 3 i zmodyfikowanej fagami przy powiększeniach 100 i 10 000× (Ryc. 10). Istotne było sprawdzenie, czy dodatek fagów nie wpływa na morfologię powierzchni błony chitozanej Matrix. Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie matrycy jako opatrunku, korzystne jest by błony nie posiadały zupełnie gładkiej powierzchni, która mogłaby utrudniać przyczepność i odpowiednie przyleganie do miejsca rany. Powierzchnia samego Matrix 3 oraz form modyfikowanych fagami była podobna, co potwierdziło brak negatywnego wpływu dodatku faga na morfologię polimeru. Zdjęcia SEM wskazują również, że wytworzone błony nie posiadają jednorodnej, gładkiej powierzchni.



Ryc. 10 Dokumentacja fotograficzna SEM Matrix 3 natywnej, bez dodatku fagów i zmodyfikowanej fagami (KT28, KTN4 i LUZ19); (A) – pow. 100×; (B) – pow. 10 000×.

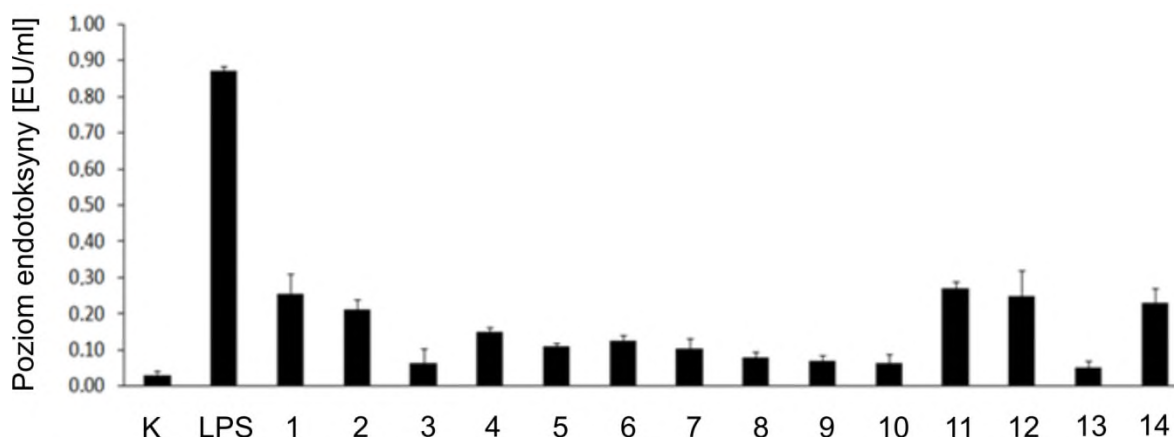
#### 8.4. Wybór matryc wiążących LPS

Po opracowaniu technologii wytwarzania matryc chitozanowych w postaci granulatu i gąbki oraz przeprowadzeniu analiz fizykochemicznych ich różnych wariantów, w kolejnym etapie oceniono poziom endotoksyny wzorcowej (LPS *P. aeruginosa* O10) w przesączach po inkubacji z powyższymi matrycami za pomocą komercyjnego testu LAL (Ryc. 11 i 12). Pozwoliło to na ocenę wychwytu endotoksyny przez matryce i wybór jednej formy granulatu (ChbM-g) i jednej formy gąbki (ChbM-s), które wykazywały największą zdolność wychwytu LPS. Wybrane formy w dalszym etapie wykorzystano do oczyszczenia rekombinowanych białek fagowych oraz jako nośnika dla bakteriofagów.



Ryc. 11 Poziom endotoksyn w przesączach po oczyszczeniu matrycami na bazie chit1 w postaci granulek (ChbM-g), zmierzono testem LAL. Jako kontrolę zastosowano wodę wolną od endotoksyn, jako kontrolę pozytywną użyto 10 µg/ml LPS ze szczepu *P. aeruginosa* O10. Poziom fluorescencji mierzone po 60 minutach. Badane próby granulatów:

1. 2% chit1 rozpuszczony w 2% kwasie octowym, mokry granulat;
2. 2% chit1 rozpuszczony w 2% kwasie octowym, usieciowanym 2% trójfosforanem pentasodowym, mokry granulat;
3. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie octowym, mokry granulat;
4. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie mlekowym, usieciowanym 2% trójfosforanem pentasodowym, mokry granulat;
5. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie mlekowym, z dodatkiem etanolu;
6. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie mlekowym, z dodatkiem etanolu, usieciowany 2% trifosforanem pentasodu, mokry granulat;
7. 2% chit1 rozpuszczony w 2% kwasie octowym, granulat liofilizowany;
8. 2% chit1 rozpuszczony w 2% kwasie octowym, usieciowanym 2% trifosforanem pentasodowym, granulat liofilizowany;
9. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie mlekowym, granulat liofilizowany;
10. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1% kwasie mlekowym, usieciowany 2% trifosforanem pentasodu, granulat liofilizowany;
11. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie mlekowym, z dodatkiem etanolu, granulat liofilizowany;
12. 2,2% chit1 rozpuszczony w 1,1% kwasie mlekowym, z dodatkiem etanolu, usieciowany 2% trifosforanem pentasodu, granulat liofilizowany - ChbM-g\*.



Ryc. 12 Poziom endotoksyn w przesączach po oczyszczeniu matrycami na bazie na chit1 i chit2 w postaci gąbki (ChbM-s) zmierzony testem LAL. Jako kontrolę zastosowano wodę wolną od endotoksyn, jako kontrolę pozytywną użyto 10 µg/ml LPS ze szczepu *P. areuginosa* O10. Poziom fluorescencji mierzono po 60 minutach. Badane próby gąbek:

1. 1,5% gąbka mikrokrystaliczna z chit1;
2. 1,5% gąbka mikrokrystaliczna z chit1 z dodatkiem gliceryny;
3. 2% gąbka mikrokrystaliczna z chit1;
4. 2% gąbka mikrokrystaliczna z chit1 z dodatkiem gliceryny;
5. gąbka z mleczanu chitozanu na chit1;
6. gąbka z mleczanu chitozanu na chit1 z dodatkiem gliceryny;
7. gąbka z mleczanu chitozanu na chit1, usieciowana 0,5% trifosforanem pentasodu;
8. gąbka z mleczanu chitozanu na chit1, usieciowana dodatkiem 0,5% trifosforanu pentasodu i gliceryny;
9. gąbka z mleczanu chitozanu na chit1, usieciowana 1% trifosforanem pentasodu;
10. gąbka z mleczanu chitozanu na chit1, usieciowana 1% trifosforanem pentasodu i dodatkiem gliceryny;
11. 1,5% gąbka mikrokrystaliczna z chit2 z dodatkiem gliceryny;
12. 1,5% gąbka mikrokrystaliczna z chit2;
13. 2% gąbka mikrokrystaliczna z chit2 z dodatkiem gliceryny - ChbM-s\*;
14. 2% gąbka mikrokrystaliczna z chit2.

Najlepszy wynik wśród badanych granulatów uzyskała liofilizowana kompozycja: 2,2 % chit1 rozpuszczonym w 1,1% kwasie mlekowym z dodatkiem etanolu i 2 % TPP (**ChbM-g\***), która zredukowała poziom endotoksyny o 87,04% w stosunku do kontroli. Natomiast wśród gąbek: 2% MKCh na chit2 z dodatkiem gliceryny (**ChbM-s\***), która zredukowała poziom endotoksyny o 93,92% w stosunku do kontroli.

#### 8.4.2. Oczyszczanie rekombinowanych białek fagowych z użyciem wybranych matryc

Rekombinowane białka (endolizyna i depolimeraza) poddano procesowi oczyszczania z LPS przy użyciu: (A) dostępnej w handlu żywicy do usuwania endotoksyn oraz matryc chitozanowych: (B) ChbM-g\* i (C) ChbM-s\*. Stężenie białka mierzono przed i po oczyszczeniu. Przesącz zebrano do sterylnych probówek testowych i zmierzono stężenie

oczyszczonego białka za pomocą fluorometru Qubit 2.0 (Qubit® Protein Assay Kit) (Tabela 17).

Tabela 17. Stężenie oczyszczonego białka za pomocą (A) komercyjna żywica, (B) ChbM-g\*, oraz (C) ChbM-s\*.

Matryca oczyszczająca	Endolizyna [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Depolimeraza [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	przed	po	przed	po
(A) kom. żywica	1030	1030	486	425
(B) ChbM-g*	1030	1020	486	402
(C) ChbM-s*	1030	497	486	182

Wielkość odzysku endolizyny była porównywalna dla żywicy komercyjnej i ChbM-g\* (odpowiednio 100% i 98% odzysku), ale znacznie niższa dla ChbM-s\* (48,25 % odzysku). Najwyższy odzysk depolimerazy przy użyciu matryc biopolimerowych zaobserwowano dla ChbM-g\* (82,72 % odzysku), natomiast najmniej dla ChbM-s\* (37,45 % odzysku). Oczyszczenie komercyjnie dostępną żywicą pozwoliło na 87,45 % odzysku białka. Wyższy odzysk endolizyny jest prawdopodobnie związany z wielkością białka. Endolizyna KP27 jest małym, kulistym białkiem występującym w postaci monomeru o masie cząsteczkowej ~15,79 kDa. Natomiast depolimeraza KP34p57 jest modułowym białkiem tworzącym strukturę trimeryczną o masie cząsteczkowej ~202,92 kDa. Duży rozmiar może utrudniać przepływ białka przez matryce i powodować jego częściowe uwięzienie w porowatej strukturze. Po oczyszczeniu rekombinowanych enzymów fagowych (depolimerazy i endolizyny) przy użyciu: (1) komercyjna żywica, (2) ChbM-g\* i (3) ChbM-s\*, oznaczono poziom LPS w białkach metodą LAL. Wyniki testu przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Poziom LPS w przesączu białkowym: endolizynie i depolimerazie oczyszczonych na matrycach biopolimerowych: ChbM-g\* and ChbM-s\* w porównaniu z komercyjną żywicą. Jako kontrolę negatywną zastosowano wodę wolną od endotoksyn (LAL water). Jako kontrolę pozytywną zastosowano LPS *E. coli* w stężeniu 10  $\mu\text{mol/l}$  (7,287 $\pm$ 0,635 EU/ml). \* $p < 0,05$  w porównaniu z LPS *E. coli* przed oczyszczaniem. Przedstawiono % oczyszczenia filtratu z LPS.

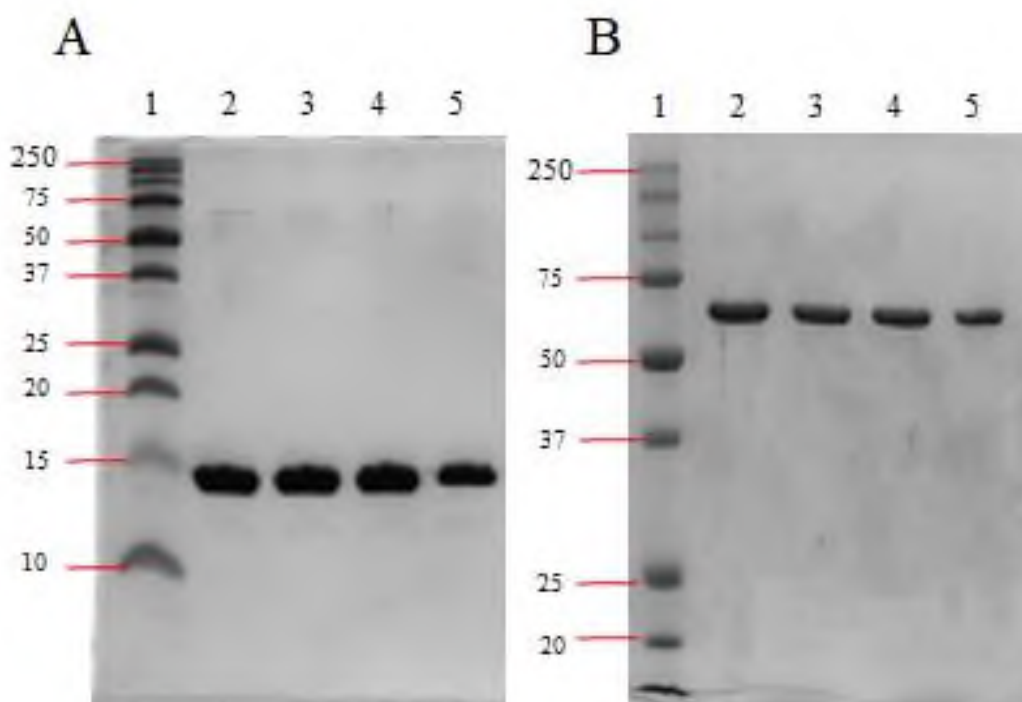
LPS <i>E. coli</i> w filtracie	Filtrat białka	
	endolizyna [EU/ml]	depolimeraza [EU/ml]
przed oczyszczeniem	4,887 $\pm$ 0,163	
oczyszczony komercyjną żywicą	1,618* $\pm$ 0,122 (67 %)	1,869* $\pm$ 0,438 (62 %)
oczyszczony ChbM-g*	4,694 $\pm$ 0,217 (4 %)	1,354* $\pm$ 0,174 (72 %)
oczyszczony ChbM-s*	1,749* $\pm$ 0,311 (64%)	1,092* $\pm$ 0,302 (78 %)

Do oczyszczania endolizyny, ChbM-g\* miała odzysk białka 98%, ale z bardzo słabym oczyszczaniem z LPS (4%). ChbM-s\* charakteryzowała się znacznie wyższą skutecznością eliminacji LPS (64%), natomiast obecność endolizyny w oczyszczonym przesączu wyniosła

48%. W przypadku depolimerazy, właściwości oczyszczające LPS ChbM-g\* i ChbM-s\* były na wysokim poziomie, odpowiednio 72% i 78%, z odzyskiem białka na poziomie 83% i 37%.

#### 8.4.2.1. Rozdział elektroforetyczny białek fagowych metodą SDS-PAGE

Białka oczyszczone z LPS poddano rozdzielni elektroforetycznemu w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Badane matryce polimerowe nie powinny zmieniać masy cząsteczkowej oczyszczonych białek. Analizę przeprowadzono w celu określenia, czy białka nie uległy degradacji po procesie oczyszczenia przez ChbM-g\* i ChbM-s\*, czy miały odpowiednią masę i były wolne od zanieczyszczeń. Separacja elektroforetyczna w żelach jest przedstawiona na Ryc. 13. Analiza elektroforetyczna endolizyny i depolimerazy nie wykazała zanieczyszczenia, nie zaobserwowano także proteolizy po zastosowaniu matryc biopolimerowych ChbM-g\* i ChbM-s\*, oczyszczane białka zachowały swoją masę cząsteczkową.



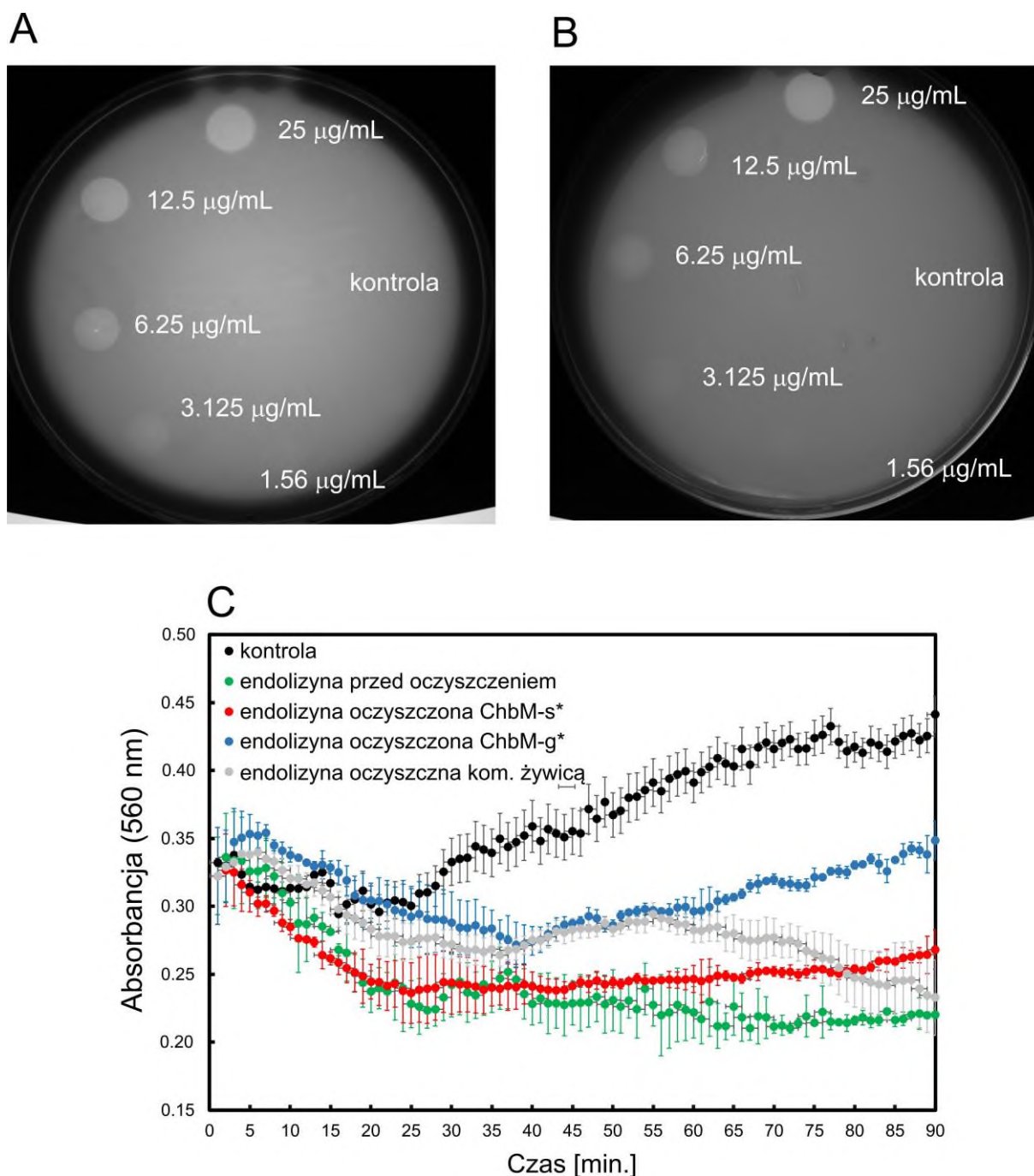
Ryc. 13 SDS-PAGES enzymów fagowych przed i po oczyszczeniu LPS różnymi matrycami. (A) endolizyna KP27: linia 1. standard białkowy; linia 2. KP27 przed oczyszczaniem LPS (1030  $\mu\text{g/ml}$ ); linia 3. KP27 po oczyszczeniu LPS przy użyciu CAERR (1030  $\mu\text{g/ml/ml}$ ); linia 4. KP27 po oczyszczeniu LPS przy użyciu ChbM-g (1020  $\mu\text{g/ml/ml}$ ); linia 5. KP27 po oczyszczeniu LPS przy użyciu ChbM-s (497  $\mu\text{g/ml}$ ); (B) depolimeraza KP34p57: linia 1. standard białkowy; linia 2. KP34p57 przed oczyszczaniem LPS (486  $\mu\text{g/ml}$ ); linia 3. KP34p57 po oczyszczeniu LPS przy użyciu CAERR (425  $\mu\text{g/ml}$ ); linia 4. KP34p57 po oczyszczeniu LPS przy użyciu ChbM-g (402  $\mu\text{g/ml}$ ); linia 8. KP34p57 po oczyszczeniu LPS przy użyciu ChbM-s (182  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 8.4.2.2. Ocena aktywności enzymatycznej oczyszczonych białek fagowych

Po oczyszczeniu białek fagowych dokonano analizy ich aktywności enzymatycznej. Istotne było sprawdzenie, czy proces oczyszczania przez ChbM-g\* i ChbM-s\* wpłynął na zmianę funkcji biologicznych endolizyny i depolimerazy.

Aktywność enzymatyczną depolimerazy określono przez oznaczenie aktywności rekombinowanej depolimerazy KP34p57 wobec szczepu *K. pneumoniae* 77 poprzez określenie minimalnego stężenia wywołującego efekt halo (MHFC) w hodowli bakteryjnej na podłożu stałym. MHFC wynoszące 3,125 µg/ml ustalono jako najniższe stężenie białka powodujące wciąż widoczną strefę halo na murawie bakteryjnej po 18 h inkubacji w temp. 37°C (Ryc. 15A). Ustalony MHFC jest taki samo dla depolimerazy KP34p57, która nie została poddana oczyszczaniu LPS.

Aktywność enzymatyczną endolizyny KP27 oznaczono metodą degradacji peptydoglikanu (PG) (Ryc. 15B). Peptydoglikan (PG) wyizolowano z komórek *E. coli* ATCC 8739 i użyto 100 µl w stężeniu 0,5 µg/ml do przeprowadzenia reakcji kinetycznej z 50 µl oczyszczonej endolizyny. Wyniki aktywności oczyszczonych enzymów przedstawiono na rycinie (Ryc. 14).



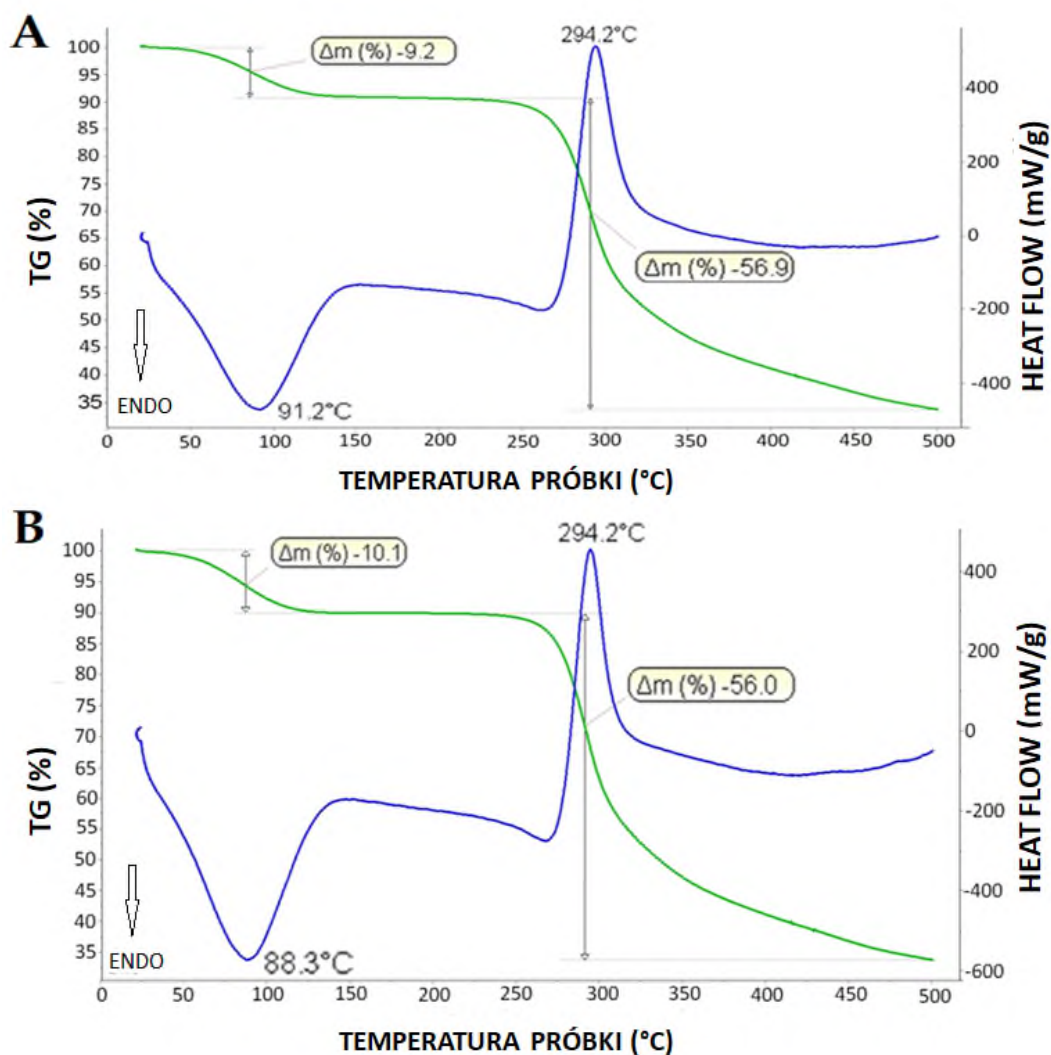
Ryc. 14 (A, B) Test aktywności depolimerazy KP34p57 określający MHFC na murawie bakteryjnej *K. pneumoniae* 77 (serotyp K63), po 18 h inkubacji w temp. 37°C; (C) Analiza spektrofotometryczna degradacji peptydoglikanu (PG) pod wpływem surowej, nieoczyszczonej oraz oczyszczonej z LPS endolizyny KP27. Pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 560 nm przez 90 min, (z pomiarem co 1 min.) w temp. 37°C. Kontrolę stanowił PG w 0,5 µg/ml.

Aktywność enzymatyczna endolizyny wyrażona jako zmiany poziomu absorbancji jest związana ze spadkiem rozpuszczalności peptydoglikanu. Wszystkie zastosowane matryce biopolimerowe (ChbM-s\*, ChbM-g\*) powodują nieznaczny spadek aktywności białka (różnice istotne statystycznie w porównaniu z endolizyną surową  $p < 0,05$ ), z wyjątkiem komercyjnej żywicy (brak różnic istotnych statystycznie w porównaniu z aktywnością endolizyny surowej,

$p > 0,05$ ). Największy spadek absorbancji w stosunku do PG (kontrola) zaobserwowano dla surowej endolizyny. Stopniowo mniejszy spadek zauważono odpowiednio dla komercyjnej żywicy, ChbM-s\* i ChbM-g\* (Ryc. 15C).

#### **8.4.2.3. Analiza termogravimetryczna ChbM-g\* i ChbM-s\* metodą TG-DSC**

Czyste matryce biopolimerowe ChbM-g\* i ChbM-s\* oraz po związaniu LPS poddano analizie metodą termiczną w celu zbadania reakcji chemicznych i przemian fazowych zachodzących podczas ogrzewania lub chłodzenia próbek. Matryce poddano analizie metodą TG-DSC w celu określenia wpływu procesu ich wytwarzania na właściwości termiczne otrzymanych materiałów, a także wpływu związanej endotoksyny na te właściwości. Badania TG-DSC są istotne w przypadku formulacji chitozanu ze względu na możliwe różne warunki termiczne wymagane podczas procesu oczyszczania. Pomiar różnicy masy z krzywej TG dostarcza informacji o właściwościach termicznych chitozanu, zmianach składu czystych matryc polimerowych, ich stabilności termicznej oraz parametrów kinetyki reakcji chemicznych zachodzących w matrycach polimerowych po związaniu LPS. Wyniki pomiarów termogravimetrycznych dla materiałów wyjściowych (chit1 i chit2) oraz poszczególnych matryc biopolimerowych (ChbM-g\* i ChbM-s\*) wraz z krzywymi TG przedstawiono na Ryc.15-17 i zestawiono w Tabelach 19-21.

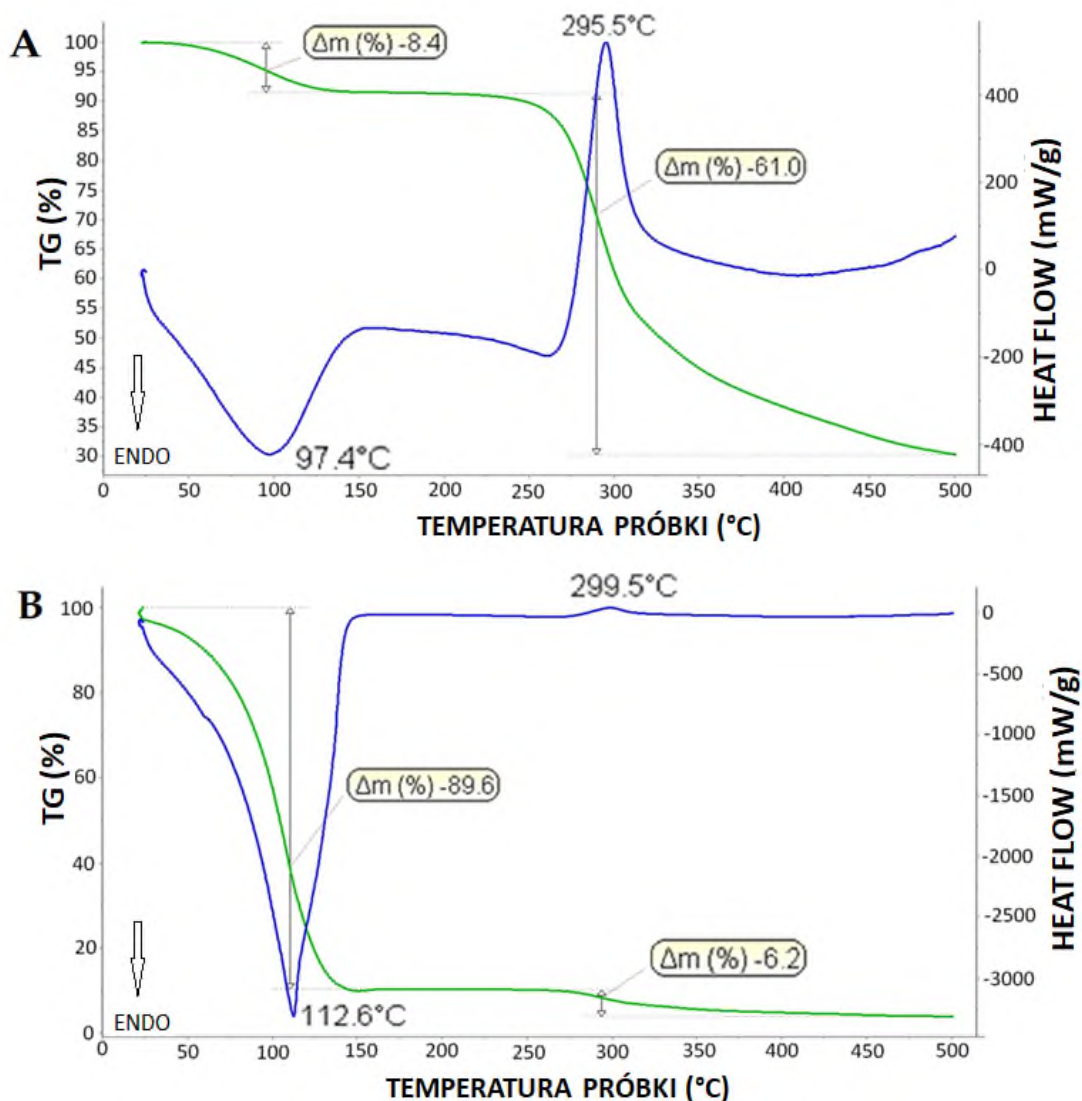


Ryc. 15 Krzywe TG (zielona krzywa) i DCS (niebieska krzywa) dla próbek: (A) chit1; (B) chit2. Badania przeprowadzono metodą analizy TG-DSC przy następujących parametrach: atmosfera: azot beztlenowy; przepływ: 21 cm<sup>3</sup>/min.; cup: Pt 100 μl; szybkość ogrzewania: 5°C/min.; Zakres temperatury: 20°C÷500°C; waga próbki: 20,2-43,8 mg.

Tabela 19. Parametryczna charakterystyka termograwimetryczna dla surowców wyjściowych: chit 1 i chit 2 przy ogrzewaniu z szybkością 5°C/min. w atmosferze suchego beztlenowego azotu.

Próbka	Odparowanie			Rozkład termiczny				Pozostałość po pomiarze	
	Δm[%]	T <sub>1</sub> [°C]	T <sub>inf</sub> [°C]	T <sub>2</sub> [°C]	T <sub>1</sub> [°C]	T <sub>inf</sub> [°C]	T <sub>2</sub> [°C]	Δm[%]	Δm[%]
chit 1	9,2	66,4	86,0	107,2	267,8	291,1	332,3	56,9	33,9
chit2	10,1	71,0	87,3	99,9	268,8	291,2	338,0	56,0	33,8

Δm – ubytek wagi; T<sub>1</sub> – temperatura skutecznego rozpoczęcia procesu ubytku masy określa się według programu metodą horyzontalną; T<sub>inf</sub> – maksymalna temperatura procesu rozrzedzania masy; T<sub>2</sub> – temperatura efektywnego zakończenia procesu ubytku masy wyznaczono według programu metodą poziomą; Δm-określono w stosunku do masy próbki wyjściowej.

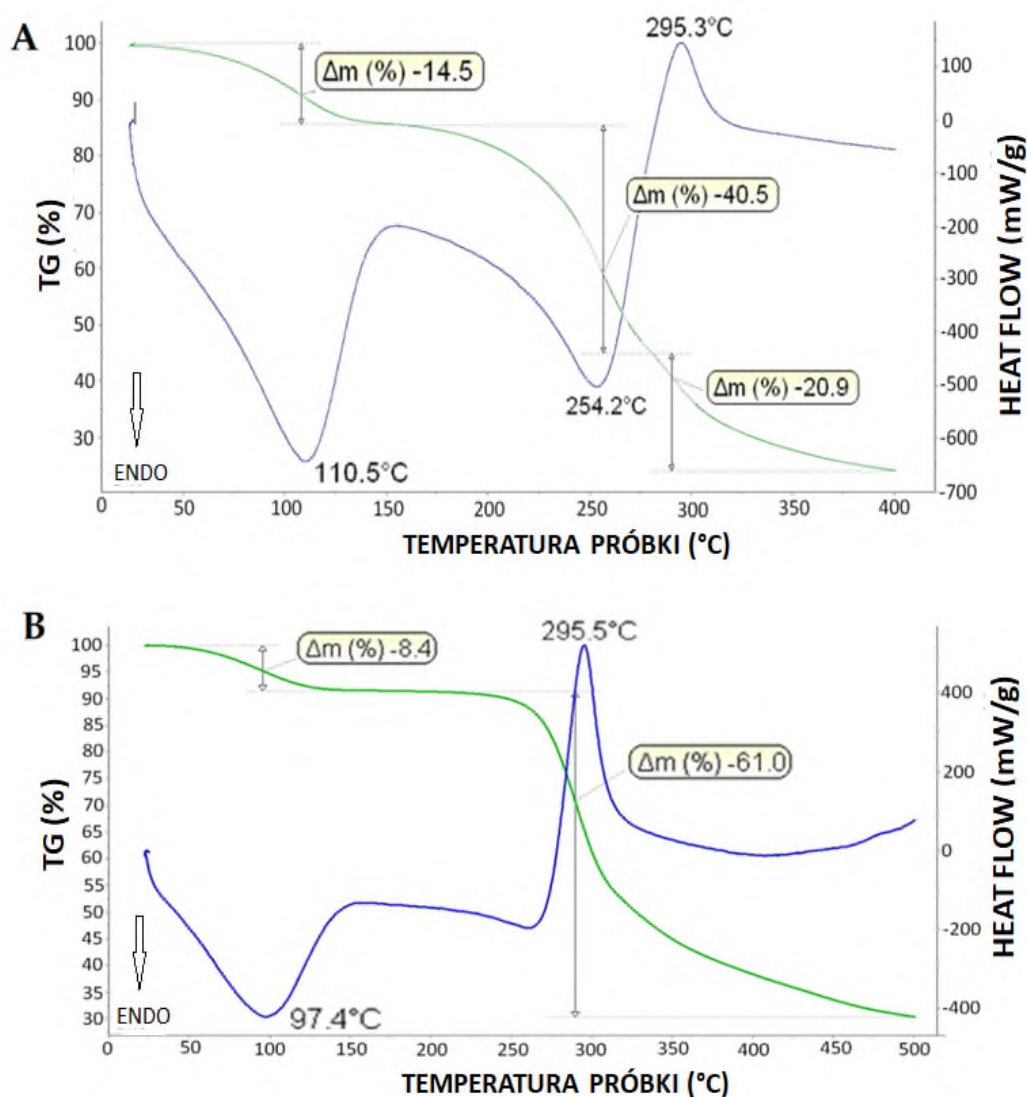


Ryc. 16 Krzywe TG (zielona krzywa), DCS (niebieska krzywa) dla próbek: (A) ChbM-g czysty granulat; (B) ChbM-g granulat po związaniu LPS. Badania przeprowadzono metodą analizy TG-DSC przy następujących parametrach: atmosfera: azot beztlenowy; przepływ: 21 cm<sup>3</sup>/min.; cup: Pt 100 μl; szybkość ogrzewania: 5°C/min.; Zakres temperatury: 20°C÷500°C; waga próbki: 20,2-43,8 mg.

Tabela 20. Parametryczna charakterystyka termogravimetryczna dla granulate ChbM-g\* czystego i ChbM-g\* po związaniu LPS przy ogrzewaniu z szybkością 5°C/min w atmosferze suchego beztlenowego azotu.

Próbka	Odparowanie			Rozkład termiczny				Pozostałość po pomiarze	
	Δm [%]	T <sub>1</sub> [°C]	T <sub>inf</sub> [°C]	T <sub>2</sub> [°C]	T <sub>1</sub> [°C]	T <sub>inf</sub> [°C]	T <sub>2</sub> [°C]	Δm [%]	Δm [%]
ChbM-g* czysty	8,4	66,5	95,7	118,5	261,2	289,8	345,9	61,0	30,3
ChbM-g* po związaniu LPS	89,6	73,8	111,0	127,8	276,7	294,1	334,8	6,2	4,0

Δm – ubytek wagi; T<sub>1</sub> – temperatura skutecznego rozpoczęcia procesu ubytku masy określa się według programu metodą horyzontalną; T<sub>inf</sub> – maksymalna temperatura procesu rozrzedzenia masy; T<sub>2</sub> – temperatura efektywnego zakończenia procesu ubytku masy wyznaczono według programu metodą poziomą; Δm-określono w stosunku do masy próbki wyjściowej.



Ryc. 17 Krzywe TG (zielona krzywa), DCS (niebieska krzywa) dla próbek: (A) ChbM-s\* czysta gąbka; (B) ChbM-s\* gąbka po związaniu LPS. Badania przeprowadzono metodą analizy TG-DSC przy następujących parametrach: atmosfera: azot beztlenowy; przepływ: 21 cm<sup>3</sup>/min.; cup: Pt 100 µl; szybkość ogrzewania: 5°C/min.; zakres temperatury: 20°C ÷ 400°C; waga próbki: 12,8-35,8 mg.

Tabela 21. Parametryczna charakterystyka termogravimetryczna dla gąbki ChbM-s\* czystej i ChbM-g\* po związaniu LPS przy ogrzewaniu z szybkością 5°C/min. w atmosferze suchego beztlenowego azotu.

Próbka	Odparowanie			Rozkład termiczny				Pozostałość po pomiarze		
	$\Delta m$ [%]	T <sub>1</sub> [°C]	T <sub>inf</sub> [°C]	T <sub>2</sub> [°C]	T <sub>1</sub> [°C]	T <sub>inf</sub> [°C]		T <sub>2</sub> [°C]	$\Delta m$ [%]	
ChbM-s*czysta	14,5	77,0	108,2	125,7	221,3	1	2	329,6	61,4	24,0
ChbM-s*po związaniu LPS	12,3	43,0	86,7	111,6	195,7	230,7	291,5	332,4	57,0	30,2

$\Delta m$  – ubytek wagi; T<sub>1</sub> – temperatura skutecznego rozpoczęcia procesu ubytku masy określa się według programu metodą horyzontalną; T<sub>inf</sub> – maksymalna temperatura procesu rozrzedzania masy; T<sub>2</sub> – temperatura efektywnego zakończenia procesu ubytku masy wyznaczono według programu metodą poziomą;  $\Delta m$ -określono w stosunku do masy próbki wyjściowej.

Zarówno dla surowców wyjściowych- chitozanów chit1 i chit2, jak i dla wszystkich granulatów ChbM-g\* czystego i po związaniu LPS można wyróżnić dwa etapy utraty wagi (Ryc. 16-17, Tabele 17-18). Pierwszy, występujący do około 128°C, związany jest głównie z desorpcją wody. Drugi związany jest z degradacją materiału próbki, która rozpoczyna się w temperaturze około 260°C. Na krzywych DSC zaobserwowano dwa piki: pierwszy endotermiczny w zakresie niższych temperatur, związany z desorpcją - odparowaniem części próbki, oraz drugi egzotermiczny związany z degradacją materiału chitozanowego. Dla chit1 na krzywej DSC zaobserwowano dwa piki endo i egzotermiczne: pik endotermiczny przy 91,2°C i pik egzotermiczny przy 294,2°C. Dla chit2 pik endo dla niższych temperatur wynosił 88,3°C i 294,2°C dla zakresu egzotermicznego. Dla czystej próbki ChbM-g\* pik endo w zakresie niższych temperatur 97,4°C i 295,5°C był postrzegany jako pik egzotermiczny. Dla próbki ChbM-g\* po związaniu LPS pik endo w zakresie niższych temperatur w temperaturze 112,6°C i 299,5°C był postrzegany jako pik egzotermiczny. Z badań ChbM-s\* czystych i ChbM-s\* po związaniu LPS (Ryc. 18, Tabela 19) możemy zaobserwować, że proces rozkładu termicznego rozpoczyna się w temperaturze ok. 180°C i kontynuuje w jednym lub dwóch etapach. Z testu DSC można wywnioskować, że w temperaturze około 88,6°C-110,5°C (84,5°C-108,2°C według testu TG) najprawdopodobniej następuje odparowanie wody (krzywe TG-DSC, Ryc. 18, Tabela 19). Badane materiały polimerowe wykazywały szeroki zakres tolerancji temperaturowej. Sam polimer zachowywał się specyficznie i typowo, dla swoich właściwości termicznych, nie stwierdzono żadnych odchyłeń od normy dla chitozanu.

#### **8.4.2.4. Analiza cytotoksyczności ChbM-g\* i ChbM-s\***

Ocenę cytotoksyczności ChbM-g\* i ChbM-s\* przeprowadzono na linii komórek A549 (ludzkiego raka płuc) po 24 h inkubacji z materiałem polimerowym- granulatem i gąbką. Za pomocą barwienia Aneksyna V-jodek propidyny zidentyfikowano komórki apoptotyczne i nekrotyczne z zastosowaniem techniki cytometrii przepływowej. Test ten pozwala na rozróżnienie czterech populacji komórek: komórki żywe (faza Q3), komórki nekrotyczne (wybarwiane tylko jodkiem propidyny - faza Q1), komórki we wczesnej apoptozie (wybarwiają się Aneksyną V - faza Q4) oraz komórki w późnej apoptozie (wybarwiają się jednocześnie obydwoma odczynnikami – faza Q2). Uzyskane wyniki badania cytometrycznego przedstawiono w Tabeli 22.

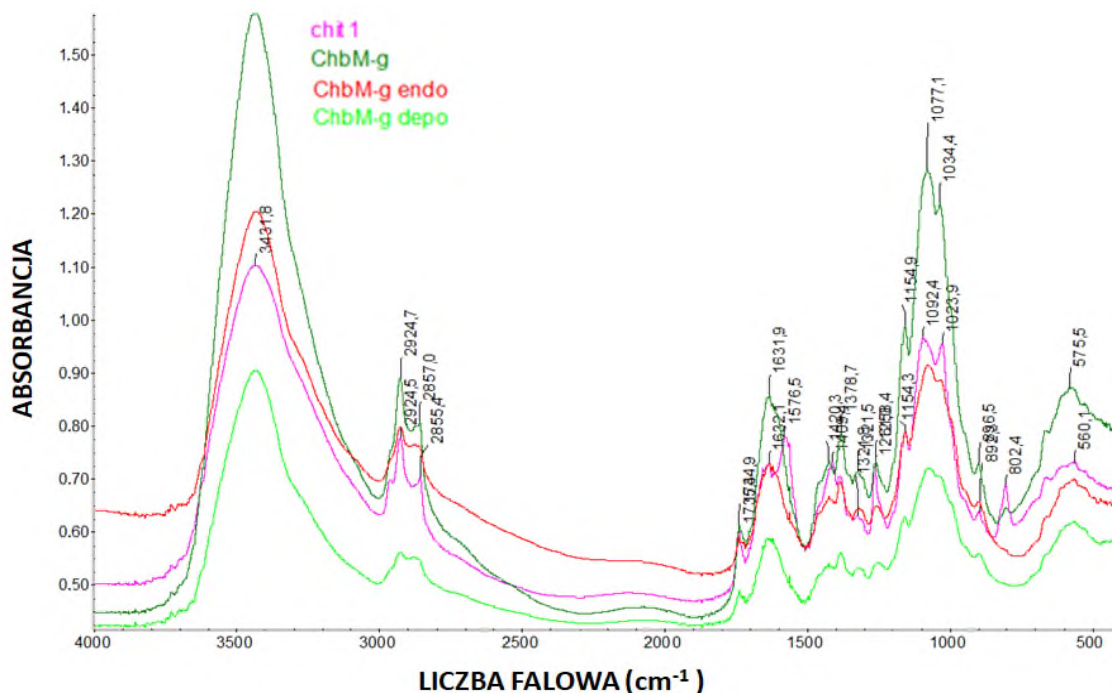
Tabela 22. Procent wczesnych i późnych apoptotycznych i nekrotycznych komórek A549 traktowanych matrycami biopolimerowymi ChbM-g i ChbM-s, mierzony za pomocą cytometrii przepływowej i barwienia aneksyną/jodkiem propidyny (IP).

Próbka	Komórki prawidłowe (Aneksyna- /IP-)	Apoptoza		Nekroza (Aneksyna -/IP+)
		Wczesna (Aneksyna+ /IP-)	Późna (Aneksyna +/IP+)	
kontrola	96,13 ± 0,75	0,57± 0,21	2,63± 0,91	0,70± 0,26
NiCl <sub>2</sub>	5,20 ± 1,90	1,70± 0,64	86,33± 3,59	6,77± 1,56
ChbM-g*	94,53± 2,67	1,03± 0,76	3,13± 1,50	1,27± 0,40
ChbM-s*	92,63± 5,24	0,93± 0,76	4,70 ± 3,99	1,80± 0,66

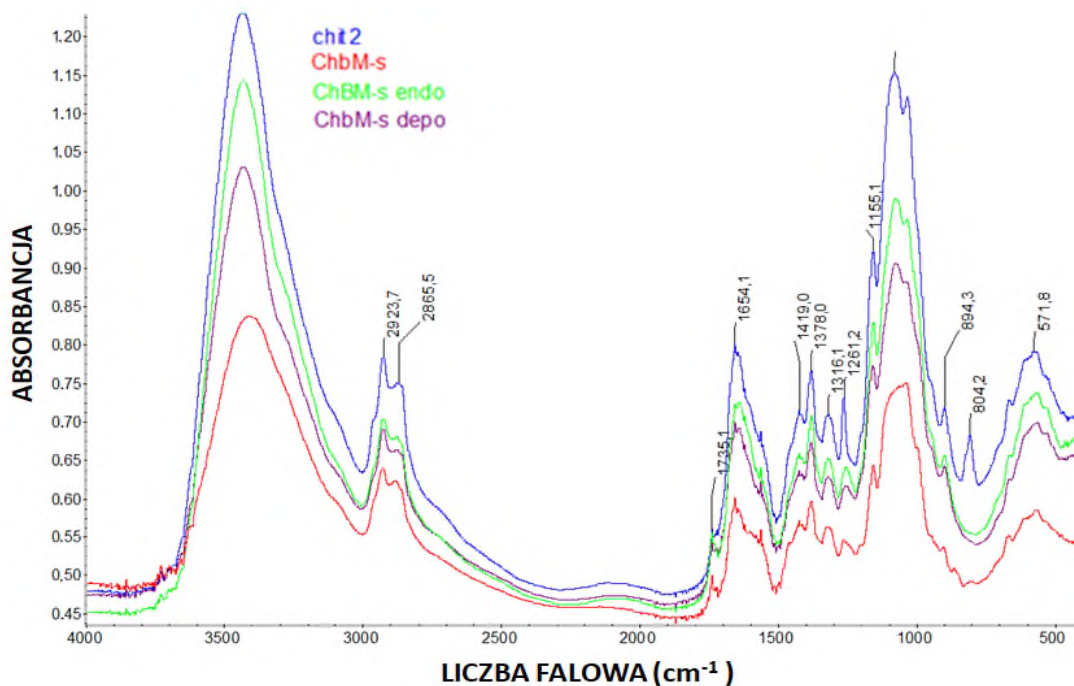
W badaniu cytometrycznym stwierdzono duży odsetek komórek w fazie Q3, co świadczy o braku aktywności cytotoksycznej (komórki niewybarwione, komórki żywe). Nie zaobserwowano zjawiska apoptozy/nekrozy po 24 h inkubacji komórek z badanymi matrycami biopolimerowymi.

#### 8.4.2.5. Charakterystyka oddziaływania ChbM-s\* i ChbM-g\* z LPS metodą FT-IR

Analizę struktury ChbM-g i ChbM-s, ich interakcji z cząsteczkami LPS i oczyszczonymi białkami fagowymi (endolizyną i depolimerazą), opartą na identyfikacji grup funkcyjnych, przeprowadzono techniką spektrofotometrii w podczerwieni (FT-IR). Wykresy przedstawiające widma FT-IR dla poszczególnych próbek przedstawiono na Ryc. 18-19.



Ryc. 18 Widma FTIR dla materiału wyjściowego (chit1) użytego do przygotowania matrycy polimerowej w postaci granulek: przed oczyszczaniem (ChbM-g\*) i po oczyszczeniu białek fagowych: endolizyny (ChbM-g\* endo) i depolimerazy (ChbM-g\* depo). Widmo zarejestrowano w zakresie 400-4000 cm<sup>-1</sup> w ilości 32 skanów z rozdzielczością 4 cm<sup>-1</sup> dla wszystkich próbek. Do badania wykorzystano 300 mg KBr i 1 mg badanej próbki.



Ryc. 19 Widma FTIR dla materiału wyjściowego (chit2) użytego do przygotowania matrycy polimerowej w postaci gąbki: przed oczyszczaniem (ChbM-s\*) i po oczyszczeniu białek fagowych: endolizyny (ChbM-s\* endo) i depolimerazy (ChbM-s\* depo). Widmo zarejestrowano w zakresie 400-4000 cm<sup>-1</sup> w ilości 32 skanów z rozdzielczością 4 cm<sup>-1</sup> dla wszystkich próbek. Do badania wykorzystano 300 mg KBr i 1 mg badanej próbki.

W wyniku analizy widm FTIR (Ryc. 18-19) techniką transmisyjną można zaobserwować obecność pików charakterystycznych dla chitozanu, tj. ok.  $3435\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające wiązaniom rozciągającym O-H, ok.  $2924\text{ cm}^{-1}$  i  $2859\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające symetrycznemu i asymetrycznemu C-H, ok.  $1654\text{--}4632\text{ cm}^{-1}$  charakterystyczne pasmo rozciągające wiązanie C=O w grupie N-acetylowej (amid I). Jest też pik  $1576\text{ cm}^{-1}$  odpowiadający grupie aminowej (amid II), ale tylko dla chit1, podczas gdy dla próbki chit2 próżek ten nie został zaobserwowany. Istnieje również szczytowa liczba falowa  $1316\text{ cm}^{-1}$  odpowiadająca grupie C-N (amid III) i wiązania: ok.  $1410\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1321\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające symetrycznym odkształceniom wiązań  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$ . Widma zawierają również charakterystyczną liczbę pików dla wiązań C-O-C, przy liczby falowej  $1155\text{ cm}^{-1}$  dla wiązania glikozydowego i ok.  $1080\text{ cm}^{-1}$  dla wiązań w pierścieniu sacharydowym. Istnieją również widma  $898\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające grupie hydroksylowej. Proces wytwarzania matryc polimerowych ChbM spowodował zmiany intensywności widm w porównaniu z widmami materiałów wyjściowych (chit1 i chit2). Piki  $802,4\text{ cm}^{-1}$  oraz  $804,2\text{ cm}^{-1}$  widoczne są tylko dla materiału wyjściowego (chit1 i chit2), nie obserwuje się ich w przypadku wytworzonych form ChbM-g\* i ChbM-s\*, co jest związane z reorganizacją wiązań w wyniku procesu rozpuszczania i przetwarzania polimeru na etapie wytwarzania form użytkowych i zmian w strukturze cząsteczki. Takie wyniki mogą wskazywać na występowanie procesów degradacji lub reorganizacji wiązań między cząsteczkami podczas procesów chemicznych zachodzących na etapie wytwarzania matryc.

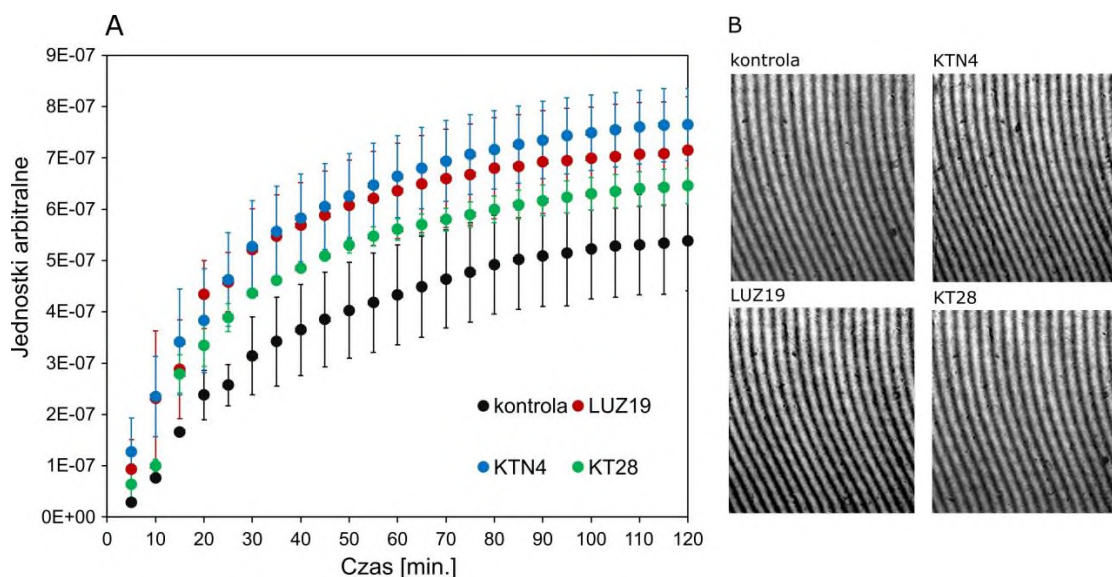
LPS jest heteropolimerem lipidowo-polisacharydowym, który podobnie jak chitozan ma reszty cukrowe połączone wiązaniami glikozydowymi, co utrudnia wyizolowanie charakterystycznych widm endotoksyn. Zauważalne są jednak zmiany intensywności charakterystycznych widm chitozanu w próbkach czystych i brudnych po procesie oczyszczania LPS. Może to wskazywać na degradację chitozanu i zmiany w układzie wiązań spowodowane przyłączeniem cząsteczek LPS. Pik przy liczby falowej  $1034\text{ cm}^{-1}$  oznacza wiązanie w pierścieniu sacharydowym i w przypadku próbek ChbM-g\* oraz ChbM-s\* po oczyszczeniu endolizyny i depolimerazy jest spłaszczony, co może być również spowodowane degradacją matrycy. W zakresie  $3000\text{--}2860\text{ cm}^{-1}$  i ok.  $1320\text{ cm}^{-1}$  rozkład piku dla ChbM-g\* po oczyszczeniu endolizyny i ChbM-g\* po oczyszczeniu depolimerazy jest spłaszczony w porównaniu z czystym ChbM-g\* (asymetryczne i symetryczne pasma rozciągające C-H), co może być spowodowane degradacją macierzy po związaniu LPS i pewnej ilości białka. Z kolei w przypadku ChbM-s\* rozkład pików dla wszystkich próbek jest podobny, co prawdopodobnie wskazuje na mniej intensywne procesy degradacji matrycy w formie gąbki.

### **8.4.3. Opatrunek chitozanowy modyfikowany bakteriofagami**

Po opracowaniu technologii wytwarzania Matrix chitozanowej w postaci błony z dodatkiem wyselekcjonowanych trzech bakteriofagów o działaniu przeciwbakteryjnym, tj. KTN4 gigantyczny Phikzvirus, KT28 myovirus Pbnavirus i podowirus LUZ19 dokonano analizy masy cząsteczkowej, zdolności pęcznienia (WRV) oraz analizy morfologii powierzchni techniką mikroskopii elektronowej SEM (podrozdział 8.2 i 8.3). Spośród trzech początkowych wariantów Matrix (1, 2 i 3) do dalszych analiz wybrano Matrix 3, w skład której wchodził 2% MKCh na chit2 z dodatkiem gliceryny. Matrix 3 w dalszej części badawczej poddano analizie profilu uwalniania fagów za pomocą system interferometrii laserowej oraz analizie interakcji fagów z matrycą chitozanową mierzonych metodą FT-IR. Biokompozyt w postaci błony został ostatecznie oceniony pod kątem działania przeciwbakteryjnego wobec szczepu *P. aeruginosa* PAO1.

#### **8.4.3.1. Analiza profili uwalniania bakteriofagów z Matrix polimerowej techniką interferometrii laserowej**

Metodę interferometrii laserowej wykorzystano do analizy skuteczności uwalniania wirionów fagów z pęczniejącej Matrix 3. Ryc. 20. przedstawia fagi i niespolimeryzowane składniki matrycy (NMC) uwalniane z Matrix 3 w funkcji czasu w temp. 37°C. Sumy zmian współczynnika załamania światła (SCRI) roztworu podczas uwalniania fagów i NMC podano w jednostce arbitralnej. Sumy te odpowiadają bezpośrednio liczbie fagów i/lub NMC uwolnionych z właściwej Matrix 3. Wszystkie fagi zostały uwolnione podobnie do siebie, niezależnie od ich wielkości i morfologii wirionów. Ponadto profile uwalniania w porównaniu z kontrolą nie wykazały statystycznie istotnych różnic, co oznacza, że fagi są unieruchomione w strukturze Matrix 3.



Ryc. 20 (A) Sumy zmian współczynnika załamania światła (SCRI) roztworu (jednostki arbitralne) dla fagów i niespolimeryzowanych składników matrycy (NMC) uwolnionych z Matrix 3 w 37°C. (B) Przykłady interferogramów po 120 min.; kontrola – Matryca 3.

Dodatkowo metodą interferometrii laserowej zweryfikowano wiązanie wody z Matrix 3 poprzez pomiar grubości spęczniałej Matrix 3 w porównaniu z postacią wysuszoną, której grubość wynosiła  $\sim 0,274$  mm (Tabela 23). Największą grubość zaobserwowano dla Matrix 3 modyfikowanej KT28, w następnej kolejności dla LUZ19, a najmniejszą dla KTN4. Interferometria laserowa wykazała, że Matrix 3 ma właściwości hydrofilowe, a maksymalne właściwości wiązania wody wszystkich badanych polimerów zaobserwowano po 5 min. i statystycznie bez zmian po 120 min. eksperymentu. Może to być skorelowane z właściwościami hydrofilowymi związanymi wirionów fagów i/lub oddziaływaniem cząsteczek wody z innymi grupami chemicznymi chitozanu. Oba testy (WRV i interferometria laserowa) potwierdzają zdolność pęcznienia i wchłaniania płynów.

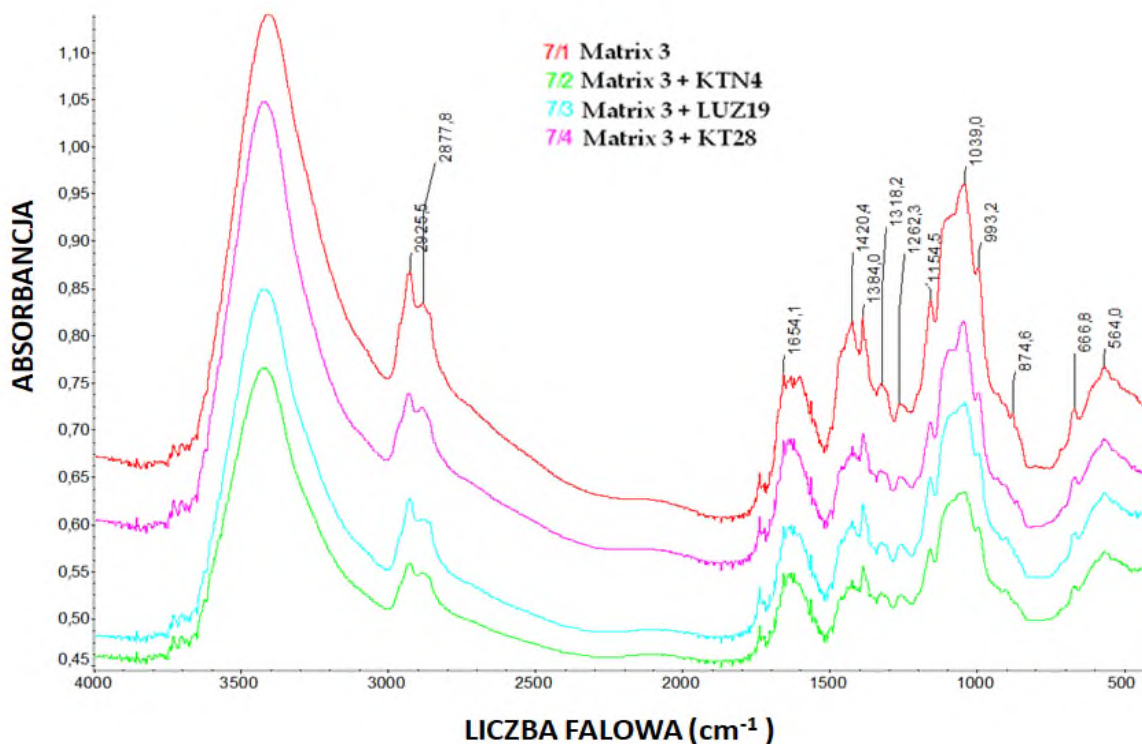
Tabela 23. Grubość Matrix 3 i zmodyfikowanej fagami, mierzona techniką interferometrii laserowej po 5 min. i 120 min. po dodaniu wody.

Matryca polimerowa	Interferometria laserowa (grubość [mm])	
	5 min.	120 min.
Matrix 3	$0,728 \pm 0,055$	$0,785 \pm 0,011$
Matrix 3 + KTN4 giant phage	$0,342 \pm 0,027$	$0,345 \pm 0,097$
Matrix 3 + KT28 myovirus	$0,903 \pm 0,013$	$0,884 \pm 0,148$
Matrix 3 + LUZ19 podovirus	$0,504 \pm 0,067$	$0,495 \pm 0,027$

#### 8.4.3.2. Oddziaływanie fagów ze składnikami Matrix 3 mierzone metodą FT-IR

Badanie interferometryczne Matrix 3 zmodyfikowanej fagami wykazało ograniczone uwalnianie fagów z tego polimeru, co sugerowało możliwe wiązanie cząstek faga

z makrocząsteczkami matrycy. Dlatego przeprowadzono badanie FT-IR w celu sprawdzenia obecności wiązań, które mogły powstać między matrycą a cząstkami faga. Analiza interakcji Matrix 3 z każdym fagiem (KTN4, LUZ19 i KT28) opierała się na identyfikacji funkcjonalnych grup chitozanu. Ryc. 21 przedstawia widma FT-IR dla Matrix 3 bez fagów w porównaniu z macierzą zawierającą wybrane fagi.



Ryc. 21 Widma FT-IR dla Matrix 3 bez fagów (czerwony) w porównaniu z Matrix 3 zmodyfikowanej każdym fagiem: KTN4 (zielony), LUZ19 (niebieski) i KT28 (różowy).

Na wykresie widm zaobserwowano wyraźny pik o liczbie falowej  $3490\text{ cm}^{-1}$  odpowiadający rozciąganiu wiązań O-H oraz pik  $2877\text{ cm}^{-1}$  przypisywany rozciąganiu asymetrycznemu wiązań C-H. Piki te są charakterystyczne dla polisacharydowej struktury chitozanu. Zawartość grup N-acetylowych w łańcuchu polimeru została potwierdzona obecnością dwóch pików o liczbie falowej  $1654\text{ cm}^{-1}$  charakterystycznych dla rozciągania wiązań C=O amidu i pik  $1318\text{ cm}^{-1}$  dla rozciągania wiązań C-N amidu III. Szczyt absorpcji o wartości  $1154\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się asymetrycznemu rozciąganiu mostka C-O-C. Wszystkie opisane powyżej piki występowały zarówno w czystym chitozanie (Matrix 3), jak i dla Matrix 3 w połączeniu z fagami. W wyniku analizy FT-IR techniką transmisyjną spłaszczenie piku charakterystycznego dla wiązań w pierścieniu sacharydowym ( $1039\text{ cm}^{-1}$ ) chitozanu zaobserwowano dla biokompozytu z fagami LUZ19 i KTN4, a nieobecnego dla Matrix 3 zmodyfikowanego myovirusem KT28. W przypadku chitozanu pik ten był wyraźny, co może

wskazywać na wiązanie fagów LUZ19 i KTN4 ze strukturą pierścieni sacharydowych w matrycy polimerowej. Spadek intensywności pików obserwowany dla wszystkich badanych dodatków fagowych sugerował również niewielki stopień degradacji polimeru. Wokół zaobserwowano spłaszczone dwa piki:  $1420\text{ cm}^{-1}$  (odpowiada za symetryczne odkształcenia  $\text{CH}_2$ ) i  $2925\text{ cm}^{-1}$  (odpowiada za rozciąganie symetryczne C-H) dla wszystkich matryc zawierających fagi. Porównując szczyt pików  $1420\text{ cm}^{-1}$  i sąsiedni szczyt pików  $1384\text{ cm}^{-1}$  z  $2925\text{ cm}^{-1}$  i  $2977\text{ cm}^{-1}$ , zmiana intensywności widma była znacząca. Zmniejszenie intensywności tych pików może wynikać z zastosowania tych grup w wiązaniu fagów. Są to łatwo dostępne grupy w łańcuchu chitozanowym i mogą tworzyć wiązania wodorowe.

Biorąc pod uwagę analizę FT-IR zaproponowano dwie możliwości interakcji fagów. Pierwszy mechanizm jest charakterystyczny dla fagów LUZ19 i KTN4, które mogą wiązać się z pierścieniami sacharydowymi chitozanu w strukturze Matrix 3. Drugi dotyczy myovirusa KT28, który może oddziaływać z grupami  $\text{CH}_3$  za pomocą wiązań wodorowych.

#### **8.4.3.3. Badanie aktywności antybakteryjnej fagów w Matrix polimerowej**

Działanie przeciwbakteryjne fagów litycznych zawierających Matrix 3 jako potencjalnego materiału opatrunkowego badano wobec szczepu *P. aeruginosa* PAO1. Zastosowano dwie metody analizy, aby ocenić, czy testowane zaprojektowane opatrunki wykazują działanie przeciwbakteryjne poprzez aktywne uwalnianie lub aktywność statyczną fagów osadzonych/unieruchomionych w Matrix.

Pierwsza metoda polegała na ocenie fagów uwolnionych z Matrix 3 do 2 ml mikrobiologicznie czystej wody, a następnie ocenie zdolności eradykacyjnej *P. aeruginosa* PAO1. Aby określić podatność na lizę za pośrednictwem fagów, zmierzono kinetykę wzrostu *P. aeruginosa* PAO1 w obecności uwolnionych fagów w roztworze wodnym. Absorbancję przy 600 nm mierzono przez 18 h w temp.  $37^\circ\text{C}$  i określano liczbę kolonii bakteryjnych *P. aeruginosa* PAO1 dla macierzy natywnej (kontrolnej) i modyfikowanej fagami (KTN4, KT28 i LUZ19). Nie było statystycznie istotnych różnic w wartości absorbancji dla kontroli ( $0,34 \pm 0,01$ ) i modyfikowanej fagami Matrix 3: KTN4 ( $0,38 \pm 0,02$ ), KT28 ( $0,39 \pm 0,02$ ) i LUZ19 ( $0,34 \pm 0,01$ ).

Druga metoda określała zdolność matryc polimerowych do wchłaniania komórek bakteryjnych podczas pęcznienia, a następnie eliminowania ich poprzez aktywność lityczną immobilizowanych w strukturze polimeru fagów. Pobrane 200  $\mu\text{l}$  hodowli *P. aeruginosa* PAO1 ( $2,37 \pm 0,86 \times 10^6$  CFU/mL) inkubowano z natywną Matrix 3 (bez dodatku fagów) i Matrix 3 modyfikowaną fagami (KTN4, KT28 i LUZ19) w łaźni wodnej przez 24 h w temp.  $37^\circ\text{C}$ .

Jednostkę tworzącą kolonię (CFU) określono w czasie 0 (T0) i po 24 h inkubacji (T24) metodą płytkową (Tabela 24).

Tabela 24. CFU/ml komórek *P. aeruginosa* PAO1 po 24 h kontaktu z badaną Matrix 3 samą lub modyfikowaną fagami (KTN4, KT28 i LUZ19) w porównaniu do wyjściowej kontroli hodowli *P. aeruginosa* PAO1 ( $2,37 \pm 0,86 \times 10^6$  CFU/ml).

<b>Próbka/Polimer</b>	<b>CFU/ml po 24h inkubacji*</b>
PAO1 (kontrola)	$4,96 \pm 2,58 \times 10^6$
Matrix 3	$2,32 \pm 1,46 \times 10^6$
Matrix 3 + KTN4 giant phage	brak kolonii
Matrix 3 + KT28 myovirus	brak kolonii
Matrix 3 + LUZ19 podovirus	brak kolonii

\*CFU-jednostka tworząca kolonię (*colony forming unit*)

Stwierdzono, że natywna Matrix 3 miała słabe właściwości przeciwbakteryjne w przeciwieństwie do biokompozytów zawierających badane fagi, zdolnych do redukcji liczby kolonii w powyższych sześciu logach w porównaniu z kulturą kontrolną. Tak silne działanie przeciwbakteryjne można wytłumaczyć bezpośrednim kontaktem komórek bakteryjnych z cząstkami faga unieruchomionymi w strukturze polimerowej chitozanu, po którym następuje liza komórki bakteryjnej.

## 9. Dyskusja

### 9.1. Matryce do oczyszczania rekombinowanych białek fagowych z lipopolisacharydu

Przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej badania miały na celu sprawdzenie skuteczności matryc chitozanowych w usuwaniu endotoksyn bakteryjnych z białek fagowych, przygotowanych metodą bakteryjnych systemów ekspresyjnych, wykorzystujących hodowlę *E. coli*. Pochodząca z faga endolizyna i depolimeraza służyły jako model w zaprojektowanym prototypowym systemie oczyszczania. Zbadano dwa układy modelowe oparte na matrycy chitozanowej w dwóch postaciach funkcjonalnych: granulatu i gąbki wykonanych z materiałów wyjściowych o różnej czystości mikrobiologicznej. Chitozan to naturalny polimer pozyskiwany z żywych organizmów, a każda partia może się znacznie różnić. Dlatego ważne jest określenie parametrów fizykochemicznych chitozanu (m.in. stopnia deacetylacji, masy cząsteczkowej, zawartości metali ciężkich) przed ich zastosowaniem. W pracy wykorzystano dwa chitozany krewetkowe (chit1 i chit2) o wysokiej czystości mikrobiologicznej. Chit2 dodatkowo poddano obróbce plazmą niskotemperaturową, aby pozbyć się zanieczyszczenia mikrobiologicznego i związanego z nim LPS. Ogromny wpływ na jego właściwości ma technika produkcji chitozanu, dlatego kontrola procesu deacetylacji chityny wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla jego późniejszych właściwości biologicznych, gdyż ilość powstających na tym etapie wolnych grup aminowych decyduje o reaktywności całego polimeru [128-130]. Dzięki szerokiej gamie modyfikacji chemicznych i fizycznych możliwe jest wytwarzanie różnych form funkcjonalnych chitozanu. W tym badaniu opracowano dwie formułacje: granulki (ChbM-g\*) i gąbkę (ChbM-s\*). Granulat ChbM-g\* powstał na bazie mleczanu chitozanu usieciowanego środkiem sieciującym TPP. Dzięki tej modyfikacji chemicznej, po procesie liofilizacji, uzyskano dobrze rozwiniętą powierzchnię wewnętrzną o dużej porowatości. Jak podaje literatura, zawartość grup fosforanowych i gęstość usieciowania mogą również wpływać na hydrofilowość, zwilżalność i krystaliczność polimeru. Proces sieciowania chitozanu poprawia hydrofilowość, co powoduje wzrost składowej polarnej swobodnej energii powierzchniowej oraz całkowitej energii swobodnej. Polimer staje się bardziej reaktywny chemicznie oraz łatwiej wiąże mikro i makrocząsteczki [131]. Zaproponowana w tych badaniach forma ChbM-g\* wykazała odporność mechaniczną i stabilność chemiczną w pH obojętnym i zasadowym. Drugą stworzoną formą była gąbka chitozanowa ChbM-s\* z dodatkiem plastyfikatora, jakim była gliceryna. Technologia jego wytwarzania opierała się na modyfikacji mleczanu chitozanu poprzez ciągłą aglomerację z roztworu do uzyskania charakterystycznej mikrokrystalicznej postaci chitozanu (MKCh). Pasta MKCh po procesie

kształtowania dała produkt o dużej elastyczności (dzięki dodatkowi gliceryny) i porowatości. Badane matryce biopolimerowe wykazują wysoką odporność termiczną. Jest to istotne w kontekście możliwości wykorzystania matryc polimerowych w różnych zakresach temperatur podczas procesów oczyszczania. Matryce ChbM-g i ChbM-s nie wykazały działania cytotoksycznego w testach biologicznych na liniach komórkowych A549, zatem wstępnie można je uznać za bezpieczne w kontakcie z organizmem człowieka i płynami ustrojowymi.

Dobrze zaprojektowane układy do heterologicznej ekspresji białek i peptydów konkurują obecnie z syntezą chemiczną. Pozwalają na wprowadzenie zmian poprawiających biodostępność, okres półtrwania czy aktywność biologiczną produktu. Jako metoda szybka i wydajna umożliwia produkcję na większą skalę, pozwalając na wytwarzanie dużych ilości polipeptydów. Obecnie na dużą skalę produkowane są rekombinowane białkowe terapie, w tym leki z grupy cytokin, hormonów, czynników i inhibitorów krzepnięcia, enzymy, szczepionki, białka fuzyjne [132, 133]. W ciągu ostatnich dziesięcioleci oporność na antybiotyki wśród bakterii chorobotwórczych wzrosła i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia. Dlatego coraz więcej badań koncentruje się na metodach wykorzystania bakteryjnych systemów ekspresyjnych do produkcji terapeutycznych białek pochodzących z fagów, jako alternatywnej lub wspomagającej terapii infekcji bakteryjnych. Główną przeszkodą w przypadku produkcji rekombinowanych białek w systemach bakterii Gram-ujemnych jest zanieczyszczenie końcowego produktu endotoksynami (LPS, pirogen), co wymaga specyficznej procedury oczyszczania w celu zmniejszenia zawartości LPS [134].

Obecnie dostępne procedury oczyszczania mogą często prowadzić do obniżenia stabilności oczyszczonych białek [135]. Dostępne są komercyjne zestawy do oczyszczania endotoksyn bakteryjnych z produktów biotechnologicznych oraz pozaustrojowe metody oczyszczania krwi dla pacjentów z sepsą [58]. Przykładami takich absorbentów jest Detoxi-Gel™ na bazie żelu agarozowego (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), AffiPrep® Polymyxin Matrix (BioRad, Hercules, Kalifornia, USA), Polymyxin B Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Endotoxin Affi Sorbent™ (bioWORLD, Atlanta, Georgia, USA) i inne [135]. Liczne przykłady badań nad rozwojem alternatyw zostały również opisane w literaturze, w tym chromatografia jonowymienna, powinowactwa z absorbentami (L-histydyna, poli-L-lizyna, poli( $\gamma$ -L-glutaminian) lub polimyksyna B), chromatografia żelowa, ultrafiltracja, wirowanie w gradiencie lub redukcja endotoksyn techniką rozdzielania faz z użyciem detergentu (np. Triton X) [35]. Jednak duża liczba dostępnych metod wykazuje pewne ograniczenia: (I) pozostałości detergentu mogą być szkodliwe dla komórek, (II) znaczna ilość białka może zostać wchłonięta do złoża lub rozcieńczona w metodach filtracyjnych, (III)

możliwa utrata właściwości biologicznych materiału w procesach wymagających kilku cykli oczyszczania, (IV) uszkodzenia białek siłami fizycznymi lub zmiany aktywności biologicznej białka. Dlatego wciąż istnieje zapotrzebowanie na udoskonalone metody, które wykażą się wysokim stopniem oczyszczenia i zminimalizują niekorzystne skutki [136].

W tej pracy oceniono naturalny biopolimer-chitozan jako matrycę w postaci granulek i gąbki jako nowe podejście do oczyszczania rekombinowanego białka z endotoksyny bakteryjnej. ChbM-g\* i ChbM-s\* wykorzystano do oczyszczania dwóch białek pochodzenia fagowego: endolizyny i depolimerazy. Zdolność do usuwania LPS z enzymów faga porównano z komercyjną żywicą. Po pierwsze, nie potwierdzono wpływu proteolitycznego ChbM-g\* i ChbM-s\* na oczyszczone białka. ChbM-g\* i ChbM-s\* nie zmniejszały biologicznej aktywności depolimerazy, podczas gdy aktywność enzymatycznej degradacji peptydoglikanu przez endolizynę zmniejszyła się o ok. 46% i 13% w porównaniu z surową endolizyną, odpowiednio dla ChbM-g\* i ChbM-s\*. Oczyszczanie za pomocą komercyjnej żywicy nie zmieniło aktywności endolizyny. Do oczyszczania endolizyny matryca na bazie chitozanu w postaci granulek miała odzysk białka 98%, ale z bardzo słabym oczyszczeniem z LPS (4%). Matryca na bazie chitozanu w postaci gąbki charakteryzowała się znacznie wyższą skutecznością eliminacji LPS (64%), natomiast obecność endolizyny w oczyszczonym przesączu wyniosła 48%. W przypadku depolimerazy właściwości oczyszczające LPS matrycy na bazie chitozanu w granulach i gąbkach były na wysokim poziomie, odpowiednio 72% i 78%, z odzyskiem białka na poziomie 83% i 37%. Oczyszczone białka były aktywne. Podsumowując, wysokie właściwości oczyszczające matryc na bazie chitozanu z LPS są ujemnie skorelowane z odzyskiem białka. Wyższy odzysk endolizyny jest prawdopodobnie związany z wielkością białka. Endolizyna KP27 jest małym, kulistym białkiem (~15,79 kDa), natomiast depolimeraza KP34p57 jest modułowym białkiem tworzącym strukturę trimeryczną (~202,92 kDa), co utrudnia przepływ białka przez matryce polimerowe i może powodować jego częściowe uwięzienie w ich porowatej strukturze. Ponadto morfologia zastosowanych matryc oraz rodzaj białka zdecydowały o skuteczności procesu oczyszczania LPS. Spośród wszystkich testowanych matryc najskuteczniejsza była matryca na bazie chitozanu w granulach do oczyszczania depolimerazy z LPS, biorąc pod uwagę odzysk oczyszczonego białka. Pomimo, iż forma porowatej gąbki wykazywała większą zdolność absorpcji LPS, co jest prawdopodobnie związane z mikrokrystaliczną formą wyjściową mleczanu chitozanu oraz bardziej rozwiniętą powierzchnią wewnętrzną o wysokiej porowatości uzyskaną po procesie liofilizacji, to poziom odzyskanego białka był niższy w stosunku do granulatu. Badania dowiodły, że ChbM-g\* jest dobrym kandydatem do wstępnego oczyszczenia produktu z LPS

z wysokim odzyskiem materiału. Jeśli jednak priorytetem jest uzyskanie możliwie najczystszej produktu wolnego od LPS, niezależnie wydajności, ChbM-s\* spełnia to wymaganie.

## **9.2. Opatrunek chitozanowy z dodatkiem bakteriofagów o działaniu przeciwbakteryjnym**

W niniejszym badaniu przygotowano i scharakteryzowano nową matrycę na bazie chitozanu jako nośnika dla fagów stanowiących biokompozyt antybakteryjny. W literaturze można znaleźć wiele przykładów pozytywnego wpływu biokompozytów chitozanu na proces gojenia ran, związany z wysoką biogodnością, nietoksycznością, chłonnością i działaniem antybakteryjnym tego polimeru [137]. Materiał na bazie chitozanu zsyntetyzowany z mikrokystalicznej postaci chitozanu (MKCh) w tym badaniu miał pozytywny wpływ na zdolność pęcznienia, w tym skuteczność absorpcji roztworu bakteryjnego. Spośród trzech różnych matryc przygotowanych z MKCh, tylko Matrix 3 wykazała odpowiednią elastyczność filmu ze względu na optymalny skład i zawartość plastyfikatora (gliceryny), zastosowanego w stosunku wagowym 0,6 do zawartości polimeru. Wolną od soli i nadmiaru alkaliów zawieszinę MKCh zateżono do konsystencji pasty, która stanowiła podstawowy preparat. Matrycę polimerową przygotowano na bazie MKCh w postaci pasty rozcieńczonej wodą do stężenia 1,5%. Formę MKCh połączono następnie z testowanymi fagami i wysuszono na płytkach teflonowych.

Trzy dobrze scharakteryzowane fagi lityczne swoiste dla *P. aeruginosa* (olbrzymi KTN4, myowirus KT28 i podowirus LUZ19) wykorzystano do unieruchomienia na Matrix chitozanowej i przetestowania ich potencjału przeciwbakteryjnego jako nowy model opatrunku. Zakładając, że aktywność przeciwbakteryjna przygotowanego opatrunku może być związana z właściwościami fizykochemicznymi samych fagów, wybrano wirusy różniące się klasyfikacją taksonomiczną, wielkością kapsydu i morfologią wirionów, a także rozpoznawanymi receptorami (sacharydowymi i białkowymi) do oceny profilu uwalniania cząstek i potencjalnej interferencji z matrycą chitozanu. Wszystkie wyselekcjonowane fagi były stabilne w szerokim zakresie pH i tolerowały środowisko matrycy chitozanowej o lekko zasadowym pH.

Biorąc pod uwagę potencjalne przeznaczenie prototypu opatrunku stworzonego w tym badaniu, skupiono się na ważnych aspektach aplikacyjnych. Przede wszystkim zbadano zdolność matrycy do pęcznienia i wchłaniania wody. Częstym problemem trudno gojących się ran zakażonych bakteriami jest wysięk, który nie sprzyja gojeniu i może wtórnie reinfekować ranę [138]. Proponowany prototyp opatrunku wykazywał wysokie właściwości chłonne

zarówno sam, jak i po dodaniu fagów. Stopień absorpcji wody przez te materiały może być skorelowany z rodzajem chemicznego wiązania wirionów faga z chitozanem.

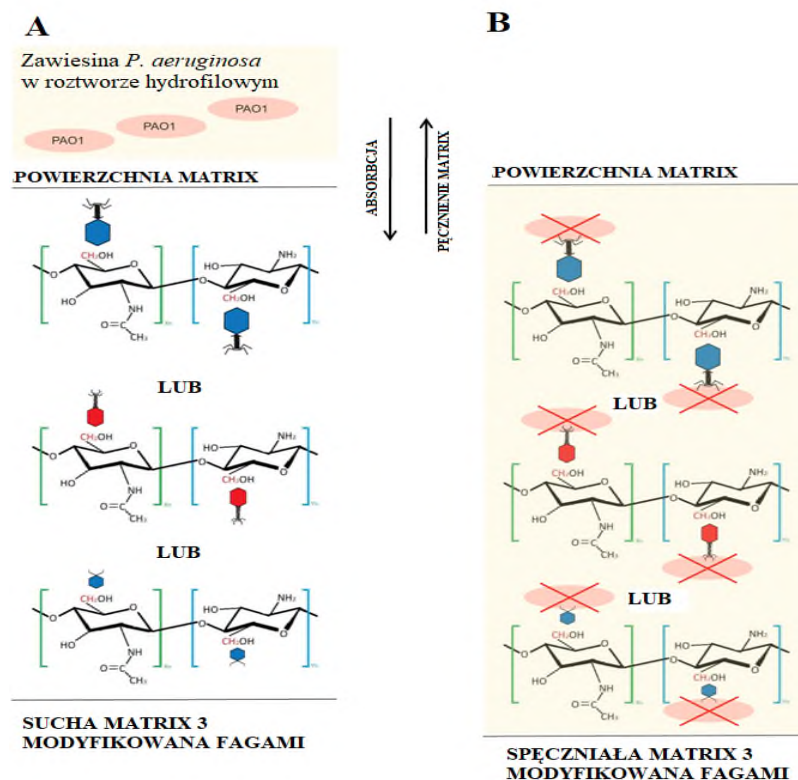
Fag KT28 miał najwyższą zdolność wiązania z grupami  $\text{CH}_3$  chitozanu wiązaniami wodorowymi, więc Matrix 3 zmodyfikowana przez myowirusa KT28 wykazywał mniejsze właściwości pęcznienia, z powodu ograniczonej ilości chemicznych grup wiążących cząsteczki wody. Podowirus LUZ19 i gigantyczny fag KTN4 mogły wiązać się z chitozanem za pomocą pierścieni sacharydowych, a zmodyfikowana przez te fagi Matrix 3 wykazała wyższe właściwości absorpcji wody za pomocą wiązań wodorowych.

Ponadto, metodą SEM zbadano nieregularność powierzchni biokompozytu w postaci cienkiej błony, które niezależnie od dodatku faga wykazywały nierówną powierzchnię, co było bezpośrednio związane ze strukturą mikrokryształicznego chitozanu (MKCh). Jest to ogromna zaleta w kontekście wykorzystania biokompozytu jako opatrunku kontaktowego dla lepszego przylegania do powierzchni rany. Ponadto szeroko opisana w literaturze aktywność biologiczna chitozanu sprzyja gojeniu się ran, głównie ze względu na jego właściwości hemostatyczne i antybakteryjne [78, 139]. Chitozan ma również zdolność wiązania endotoksyny bakterii Gram-ujemnych, czyli LPS, co może być dodatkową zaletą opisanego w tej pracy prototypu [62]. Metabolity bakteryjne i produkty degradacji wraz z LPS mogą być wydzielane do sączącej się rany [140]. Dzięki opisanym powyżej zdolnościom absorpcyjnym oraz chitozanowi obecnemu w składzie macierzy można przyspieszyć proces gojenia. Dodatek fagów aktywnie ogranicza liczebność bakterii. Zaletą jest zdolność wchłaniania bakterii wraz z wysiękiem do matrycy, gdzie aktywne fagi namnażają się i lizują komórki bakteryjne. Dobrze rozwinięta powierzchnia morfologiczna macierzy oraz odpowiednia elastyczność sprzyjają adhezji i stanowią dobrą barierę ochronną rany przed niekorzystnym środowiskiem zewnętrznym [141].

Technika interferometrii laserowej w połączeniu ze standardowymi metodami mikrobiologicznymi wykazała, że liczba wirionów uwalnianych ze struktury Matrix była silnie ograniczona. Brak znaczącej dyfuzji cząstek faga w macierzy chitozanu można wytłumaczyć różnicą w ładunku wypadkowym między kapsydem (naładowanym ujemnie) a ogonem (naładowanym dodatnio) powodującą bezruch kierunkowy w dodatnio naładowanej matrycy biopolimerowej [96, 142, 143,]. Polaryzacja ta może prowadzić do orientacji fagów w obrębie badanej struktury. Założono, że fagi niezależnie od wielkości wirionu i powinowactwa do struktur polisacharydowych lub białkowych były unieruchomione w dodatnio naładowanych ugrupowaniach Matrix chitozanu. Zdolność polimeru do wiązania mikro i makrocząstek wynika przede wszystkim z obecności dwóch rodzajów reaktywnych grup funkcyjnych: grupy

aminowej oraz dwóch grup hydroksylowych – przy trzecim i szóstym atomie węgla w pierścieniu sacharydowym [144, 145]. Dodatkowo naładowane ugrupowania chitozanu i ujemnie naładowane kapsydy fagów prowadziły do silnej adsorpcji fagów na cząsteczkach matrycy, co potwierdziła przeprowadzona analiza FT-IR. Niemniej jednak unieruchomione cząsteczki faga zachowały swoją efekt bójczy poprzez niezwiązane włókna ogonka, które nadal był w stanie rozpoznawać bakteryjne receptory powierzchniowe i infekować komórki. Jest to istotne z terapeutycznego punktu widzenia dostarczania fagów litycznych w zaprojektowanym chitozanowym opatrunku. Przeprowadzony test antybakteryjny wykazał bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną w bezpośrednim kontakcie z kulturą PAO1 dla wszystkich trzech badanych fagów. Potwierdziło to, że zastosowana matryca biopolimerowa nie zaburzyła właściwości antybakteryjnych fagów osadzonych w matrycy.

Wytworzony film chitozanowy wykazywał zdolność pęcznienia oraz pozytywny efekt wiązania fagów ze strukturą matrycy, umożliwiając im działanie antybakteryjne w bezpośrednim kontakcie z zawiesiną *P. aeruginosa* PAO1 absorbowaną przez biokompozyt. Koncepcję sposobu działania opatrunku przedstawiono na Ryc. 22.



Ryc. 22 Koncepcja działania przeciwbakteryjnego Matrix 3 zmodyfikowanej fagami przeciwko komórkom *P. aeruginosa* PAO1. (A) „gotowa do użycia” wysuszona Matrix 3 w połączeniu z fagami wykazała potencjalną interakcję grup CH<sub>2</sub> chitozanu z cząstkami faga; (B) przypuszczalny mechanizm działania przeciwbakteryjnego Matrix 3 w połączeniu z fagami wykazuje zarówno pęcznienie roztworu bakteryjnego, jak i lizę za pośrednictwem fagów przez cząsteczki wirusa unieruchomione w strukturze polimeru.

Można stwierdzić, że prototyp opatrunku membranowego MKCh z unieruchomionymi fagami litycznymi ma wysoki potencjał antybakteryjny. Wykorzystanie chitozanu do tworzenia opatrunków kombinowanych jest uzasadnione jego właściwościami hemostatycznymi, antybakteryjnymi, biokompatybilnymi i biodegradowalnymi [146].

## 10. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że opracowane i scharakteryzowane pod kątem chemicznym i biologicznym matryce polimerowe na bazie chitozanu mają właściwości wiązania LPS, co daje możliwość ich zastosowanie do: oczyszczania rekombinowanych białek fagowych pozyskanych w systemie ekspresyjnym, opartym na bakteriami Gram-ujemnych, oraz jako nośniki dla bakteriofagów w komponowaniu opatrunków przeciwbakteryjnych o działania kontaktowym.

Wynikiem przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej opisanych badań są dwa krajowe zgłoszenia patentowe na wynalazek, pt.: „Synteza i zastosowanie matrycy polimerowej do oczyszczania białek rekombinowanych z lipopolisacharydu bakteryjnego” (zgłoszenie do Urzędu Patentowego RP z dn. 31.03.2023, nr. P.443659) oraz: „Metoda syntezy i zastosowanie matrycy polimerowej do komponowania z preparatami bakteriofagów” (zgłoszenie do Urzędu Patentowego RP z dn. 31.03.2023, nr. P.443658).

## 11. Streszczenie

Metoda biosyntezy białek terapeutycznych z wykorzystaniem mikrobiologicznych systemów ekspresyjnych przez komórki prokariotyczne niesie ze sobą ryzyko przeniesienia lipopolisacharydu Gram-ujemnego (LPS). Dlatego ważne jest posiadanie współistniejącego, dobrze rozwiniętego systemu oczyszczania produktów białkowych, który będzie w stanie skutecznie wiązać szkodliwe LPS i nie zmieni istotnych właściwości białka. Ze względu na wysoką aktywność biologiczną oraz zdolność wiązania mikro i makrocząstek chitozan może być proponowany do oczyszczania białek terapeutycznych z endotoksyn. Jest biomateriałem o wysokiej biogodności, nietoksycznym i biodegradowalnym, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne i może być poddawany różnym modyfikacjom chemicznym i fizycznym. W pierwszej części niniejszej pracy zaproponowano dwa różne układy biopolimerowe na bazie chitozanu z krewetek, o różnej czystości mikrobiologicznej- formę granulatu i formę gąbki. Matryce wykorzystano do oczyszczenia wybranych białek fagowych (endolizyny i depolimerazy) uzyskanych za pomocą bakteryjnych systemów ekspresyjnych. Matryce scharakteryzowano pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych, wpływu na żywe komórki (cytotoksyczność), aktywności oczyszczonych białek oraz zdolności wiązania endotoksyn oraz sposobu ich wiązania do łańcucha chitozanowego (FT-IR). Wyniki wskazały, że obie formy użytkowe, tj. granulaty i gąbka są zdolne do wiązania LPS zanieczyszczającego wyprodukowane metodami biotechnologicznymi białka fagowe. Ponadto czystość mikrobiologiczna materiału wyjściowego oraz forma funkcjonalna tych polimerów są istotne w kontekście zdolności wychwytu endotoksyn w badanych preparatach białkowych. Granulaty okazały się dobrym kandydatem do wstępnego oczyszczenia produktu z LPS z wysokim odzyskiem oczyszczanego materiału (białka). Gąbka chitozanowa natomiast pozwala na uzyskanie możliwie najczystszej postaci wolnej od LPS, przy dużo niższym odzysku produktu białkowego.

Trudno gojące się rany są jednym z problemów w praktyce klinicznej. Gojenie się ran to dynamiczny i złożony proces, w którym kluczowe znaczenie ma zapobieganie infekcjom. Podczas gojenia zachodzi wiele ważnych zmian: od stanu zapalnego, przez migrację komórek, angiogenezę i syntezę macierzy komórkowej. Chitozan dzięki działaniu bakteriobójczemu na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne oraz właściwościom przeciwzapalnym i hemostatycznym jest doskonałym kandydatem do projektowania opatrunków do leczenia trudno gojących się ran. Ogromną zaletą tego biopolimeru jest jego zdolność do chemicznej modyfikacji, co pozwala na wytwarzanie różnych form użytkowych w zależności od potrzeb

i późniejszego wykorzystania. Ponadto chitozan może być doskonałą matrycą polimerową do immobilizacji bakteriofagów (fagów) jako nowatorskie alternatywne/wspomagające podejście do terapii przeciwbakteryjnej. Druga część niniejszej pracy dotyczy przygotowania i charakterystyki materiału na bazie chitozanu w postaci filmu z dodatkiem fagów litycznych *Pseudomonas* (KTN4, KT28 i LUZ19), który wykazywałby działanie przeciwbakteryjne jako potencjalny opatrunek przyspieszający gojenie się ran. Opracowano metodę wytwarzania polimeru na bazie mikrokrystalicznego chitozanu (MKCh) służącego jako matryca do osadzania faga. Opisano kilka ważnych parametrów, takich jak średnia masa molowa, zdolność pęcznienia, morfologia powierzchni, profil uwalniania faga i aktywność przeciwbakteryjna testowana w modelu bakteryjnym *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Udowodniono, że polisacharyd chitozanu oddziałuje z cząsteczkami faga, unieruchamiając je w strukturze matrycy. Niemniej jednak, przy wysokiej hydrofilowości i cechach pęcznienia przygotowanego materiału, zewnętrzny roztwór hodowli bakteryjnej został wchłonięty, a fagi weszły w bezpośredni kontakt z bakteriami powodując ich lizę w matrycy polimerowej.

## 12. Summary

The method of biosynthesis of therapeutic proteins using microbial expression systems by prokaryotic cells carries the risk of transferring gram-negative lipopolysaccharide (LPS). Therefore, it is important to have a concomitant, well-developed purification system for protein products that will be able to effectively bind harmful LPS and will not change the essential properties of the protein. Due to its high biological activity and the ability to bind micro and macro particles, chitosan can be proposed for the purification of therapeutic proteins from endotoxins. It is a biomaterial with high biocompatibility, non-toxic and biodegradable, due to its physicochemical properties and can be subjected to various chemical and physical modifications. In the first part of this work, two different biopolymer systems based on chitosan from shrimps of different microbiological purity were proposed - the form of granules and the form of a sponge. The templates were used to purify selected phage proteins (endolysins and depolymerases) obtained using bacterial expression systems. The matrices were characterized in terms of their physicochemical and mechanical properties, impact on living cells (cytotoxicity), activity of purified proteins, endotoxin binding capacity and the method of their binding to the chitosan chain (FT-IR). The results showed that both formulations: granulate and sponge are capable of binding LPS contaminating biotechnologically produced phage proteins. In addition, the microbiological purity of the starting material and the functional form of these polymers are important in the context of the ability to capture endotoxins in the tested protein preparations. The granulate turned out to be a good candidate for the initial purification of the product from LPS with a high recovery of purified material (protein). Chitosan sponge, on the other hand, allows to obtain the purest possible LPS-free product, with much lower recovery of the protein product.

Difficult-to-heal wounds are one of the most common problems in clinical practice, especially in patients with various diseases (mainly diabetes), but also during post-operative convalescence or post-traumatic treatment at various stages. Wound healing is a dynamic and complex process where infection prevention is key. Many important changes occur during healing: from inflammation, to cell migration, angiogenesis and cell matrix synthesis, to collagen deposition and re-epithelialization. Chitosan, thanks to its bactericidal effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as anti-inflammatory and haemostatic properties, is an excellent candidate for the design of dressings for the treatment of hard-to-heal wounds. The great advantage of this biopolymer is its ability to be chemically modified, which allows the production of various utility forms depending on the needs and subsequent use.

In addition, chitosan may be an excellent polymer matrix for the immobilization of bacteriophages (phages) as a novel alternative/adjunctive approach to antibacterial therapy. The second part of this work concerns the preparation and characterization of a chitosan-based material in the form of a film with the addition of *Pseudomonas* lytic phages (KTN4, KT28 and LUZ19), which would show antibacterial activity as a potential dressing accelerating wound healing. A method for producing a polymer based on microcrystalline chitosan (MKCh) that serves as a template for phage deposition has been developed. Several important parameters were described, such as the average molar mass, swelling capacity, surface morphology, phage release profile and antibacterial activity tested in the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacterial model. It has been proven that chitosan polysaccharide interacts with phage particles, immobilizing them in the matrix structure. Nevertheless, due to the high hydrophilicity and swelling characteristics of the prepared material, the external bacterial culture solution was absorbed, and the phages came into direct contact with the bacteria, causing their lysis in the polymer matrix.

### 13. Bibliografia

- [1] Morin-Crini N., Lichtfouse E., Torri G., Crini G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environ Chem Lett* 2019; 17: 1667–1692. doi: 10.1007/s10311-019-00904-x
- [2] Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr Chem Biol* 2009; 3: 203-230.
- [3] Dutta P.K., Rinki K., Dutta J. Chitosan: A promising biomaterial for tissue engineering scaffolds. *Adv Polymer Sci* 2011; 244: 45-79.
- [4] Alves N.M., Mano J.F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol* 2008; 43:401–414. doi: 10.1016/j.ijbio mac.2008.09.007
- [5] No H.K., Meyers S.P. Preparation and characterization of chitin and chitosan—a review. *J Aquat Food Product Technol* 1995; 4:27–52. doi: 10.1300/J030v04n02\_03
- [6] Majekodunmi S.O. Current development of extraction, characterization and evaluation of properties of chitosan and its use in medicine and pharmaceutical industry. *Am J Polym Sci* 2016; 6:86–91. doi: 10.5923/j.ajps.20160603.04
- [7] Aranaz I., Alcántara A. R., Civera M. C., Arias C., Elorza B., Caballero A. H., Acosta N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polym (Basel)* 2021; 13(19):3256. doi: 10.3390/polym13193256
- [8] Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci* 2009; 34:641–678. doi: 10.1016/j.progpolyms ci.2009.04.001
- [9] Kravanja G., Primožic M., Knez Z., Leitgeb M. Chitosan-based (nano)materials for novel biomedical applications. *Molecules* 2019; 24(10):1960. doi: 10.3390/molecules24101960
- [10] Ren D., Yi H., Wang W., Ma X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohyd Res* 2005; 15: 2403-2410. doi: 10.1016/j.carres.2005.07.022
- [11] Ahn J., Ryu J., Song G., Whang M., Kim J. Network structure and enzymatic degradation of chitosan hydrogels determined by crosslinking methods. *Carbohyd Polym* 2019; 2017: 160-167. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.055
- [12] Zainol I., Ghani S.M., Mastor A., Derman M. A., Yahya M. F. Enzymatic degradation study of porous chitosan membrane W: *Materials Research Innovations*, W.S. Maney & Son Ltd. 2009; 13: 316-319. doi: 10.1179/143307509X440631
- [13] Nidheesh T., Kumar P.G., Suresh P.V. Enzymatic degradation of chitosan and production of d-glucosamine by solid substrate fermentation of exo-β-d-glucosaminidase (exochitosanase) by *Penicillium decumbens* CFRNT15. *Int Biod Biodeg* 2015; 97: 97-106. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.10.016
- [14] Dong L., Wichers H. J., Govers C. Beneficial Health Effects of Chitin and Chitosan W: *Chitin and Chitosan: Properties and Applications*, van den Broek L.A.M., Boeriu C.B., Stevens C. Wiley Series in Renewable Resources, England 2019, ISBN: 978-1-119-45043-6, pp. 145-164. doi: 10.1002/9781119450467.ch7
- [15] Chi J., Zhang X., Chen C., Shao C., Zhao Y., Wang Y. Antibacterial and angiogenic chitosan microneedle array patch for promoting wound healing. *Bioact Mater* 2020; 5: 253–259. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.02.004

- [16] Kucharska M., Sikora M., Brzoza-Malczewska K., Owczarek M. Antimicrobial properties of chitin and chitosan, W: Chitin and Chitosan: Properties and Applications, van den Broek L.A.M., Boeriu C.B., Stevens C. Wiley Series in Renewable Resources, England 2019, ISBN: 978-1-119-45043-6, pp. 169-188. doi: 10.1002/9781119450467.ch7
- [17] Affes, S.; Aranaz, I.; Acosta, N.; Heras, Á.; Nasri, M.; Maalej, H. Chitosan derivatives-based films as pH-sensitive drug delivery systems with enhanced antioxidant and antibacterial properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 182, 730–742. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.014
- [18] Maa Z., Garrido-Maestua A., Jeonga K.C. Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydr Polym* 2017; 176: 257–265. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.082.
- [19] Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T., Tew K.D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* 2020; 38: 167–197. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001
- [20] Pu S., Li J., Sun L., Zhong L., Ma Q. An *in vitro* comparison of the antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2019; 211: 161–172. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.02.007
- [21] Li X. et al. Chemical composition and antioxidant activities of polysaccharides from Yingshan Cloud Mist tea. *Oxidative Med Cell Longev* 2019; 2019: 1915967. doi: 10.1155/2019/1915967
- [22] Feng T., Du Y. M., Li J., Wei Y.A., Yao P. J. Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan *in vitro*. *Eur Food Res Technol* 2007; 225: 133.
- [23] Abd El-Hack M. E., El-Saadony M.T., Shafi M. E., Zabermawi N. M. Arif M., Batiha G. E., Khafaga A. F., Abd El-Hakim Y. M., Al-Sagheer A. A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int J Biol Macromol* 2020; 164: 2726–2744. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153
- [24] Mao S., Wang, B., Yue L., Xia W. Effects of citronellol grafted chitosan oligosaccharide derivatives on regulating antiinflammatory activity. *Carbohydr Polym* 2021; 262: 117972. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117972
- [25] Chang S.H., Lin Y.Y., Wu G.J., Huang C.H., Tsai G.J. Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. *Int J Biol Macromol* 2019; 131: 167–175. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.066
- [26] Zeng W., Chang Z., Liu Z., Zhu L., Wang M., Hao D., He B. Controlled delivery of bioactive BDNF for potential treatment of peripheral nerve injury. *Polym Degrad Stab* 2020; 181: 109296. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109296
- [27] Bartos C., Varga P., Szabo-Revesz P., Ambrus R. Physico-chemical and *in vitro* characterization of chitosan-based microspheres intended for nasal administration. *Pharmaceutics* 2021; 13: 608. doi: 10.3390/pharmaceutics13050608
- [28] Ma S., Moser D., Han F., Leonhard M., Schneider-Stickler B., Tan Y. Preparation and antibiofilm studies of curcumin loaded chitosan nanoparticles against polymicrobial biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Polym* 2020; 241: 116254. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116254
- [29] Acosta N., Sanchez E., Calderon L., Cordoba-Diaz M., Cordoba-Diaz D., Dom S., Heras A. Physical stability studies of semi-solid formulations from natural compounds loaded with Chitosan Microspheres. *Mar Drugs* 2015; 13: 5901–5919. doi: 10.3390/md13095901
- [30] Gull N., Khan S.M., Butt O.M., Islam A., Shah A., Jabeen S., Khan S.U., Khan A., Khan R.U., Butt, M.T.Z. Inflammation targeted chitosan-based hydrogel for controlled release of diclofenac sodium. *Int J Biol Macromol* 2020; 162: 175–187. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.133

- [31] Gao J. et al. The use of chitosan based hydrogel for enhancing the therapeutic benefits of adipose-derived MSCs for acute kidney injury. *Biomaterials* 2012; 33: 3673–3681.
- [32] Zhao, L. et al., Water-soluble chitosans shows anti-cancer effect in mouse H22 liver cancer by enhancing the immune. *Int J Clin Exp Med* 2016; 9: 164–171
- [33] Ueno H., Mori T., Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52:105–115. doi:10.1016/S0169-409X(01)00189-2
- [34] Hattori H., Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomed mat* 2015; 10: 015014. doi: 10.1088/1748-6041/10/1/015014
- [35] Khan M.A., Mujahid M. A Review on Recent Advances in Chitosan based Composite for Hemostatic Dressings. *Int J Biol Macromol* 2018; 124: 138-147. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045
- [36] Chen H. et al. Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. *Mat Sci Eng* 2017; 70: 287–295. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.086
- [37] Matica M.A., Aachmann F.L., Tondervik A., Sletta H., Ostafe V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Mol Sci* 2019; 20(23): 5889. doi: 10.3390/ijms20235889
- [38] Chitosan Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application (Pharmaceutical & Biomedical, Water Treatment, Cosmetics, Food & Beverage), By Region (APAC, North America, Europe, MEA), and Segment Forecasts, 2020–2027); Report ID: 978-1-68038-798-8; Grand View Research: San Francisco, CA, USA, 2020. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-chitosan-market> (accessed on 15.04.2023)
- [39] Morin-Crini N., Lichtfouse E., Torri G., Crini G. Fundamentals and Applications of Chitosan, W: Sustainable Agriculture Reviews 35, Crini G., Lichtfouse E. Springer Cham France 2019, ISBN 978-3-030-16540-6 pp 49–123
- [40] Ke C.L., Deng F.S., Chuang C.Y., Lin C.H. Antimicrobial actions and applications of Chitosan. *Polymers* 2021; 13: 904. doi: 10.3390/polym13060904
- [41] Thadathil N., Velappan S.P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food Chem* 2014; 150: 392–399. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.083
- [42] Verma M.L., Kumar S., Das A., Randhawa J.S., Chamundeeswari M. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. *Environ Chem Lett* 2020; 18: 315–323. doi: 10.1007/s10311-019-00942-5
- [43] Saad E.M., Elshaarawy R.F., Mahmoud S.A., El-Moselhy K.M. New *Ulva lactuca* algae based chitosan bio-composites for bioremediation of Cd (II) ions. *J Bioresour Bioprod* 2021; 6: 223–242. doi: 10.1016/j.jobab.2021.04.002
- [44] Song Z., Li G., Guan F., Liu W. Application of chitin/chitosan and their derivatives in the papermaking industry. *Polymers* 2018; 10: 389. doi: 10.3390/polym10040389
- [45] Tan L., Zhang Y., Zhang W., Zhao R., Ru Y., Liu T. One-pot method to prepare lignin-based magnetic biosorbents for bioadsorption of heavy metal ions. *Ind Crops Prod* 2022; 176: 114387. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114387
- [46] Azmana M., Mahmood S., Hilles A.R., Rahman A., Arifin M.A.B., Ahmed S. A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications. *Int J Biol Macromol* 2021; 185: 832–848. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.023

- [47] Pal P., Pal A., Nakashima K., Yadav B.K. Applications of chitosan in environmental remediation: A review. *Chemosphere* 2021; 266: 128934. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128934
- [48] Kowalska J., Łukaszyk J. Metody zaprawiania materiału siewnego dozwolone w rolnictwie ekologicznym. *Prog Plant Protect* 2022; 62: 100–108. doi: 10.14199/ppp-2022-012
- [49] Korbecka-Glinka G., Wiśniewska-Wrona M., Kopania E. Zastosowanie polimerów naturalnych do uszlachetniania materiału siewnego. *Polimery* 2021; 66: 11-20. doi: 10.14314/polimery.2021.1.2
- [50] Ghule M.R., Ramteke P.K., Ramteke S.D., Kodre P.S., Langote A., Gaikwad A.V., Holkar S.K., Jambhekar H. Impact of chitosan seed treatment of fenugreek for management of root rot disease caused by *Fusarium solani* under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Biotech* 2021; 11: 290. doi: 10.1007/s13205-021-02843-3
- [51] Samarah N.H., Al-Quraan N.A., Massad R.S., Welbaum G.E. Treatment of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds with chitosan increases chitinase and glucanase activities and enhances emergence in a standard cold test. *Sci Hortic* 2020; 269:109393. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109393
- [52] Gonzalez-Saucedo A., Barrera-Necha L.L., Ventura-Aguilar R.I., Correa-Pacheco Z.N., Bautista-Banos S., Hernandez-Lopez M. Extension of the postharvest quality of bell pepper by applying nanostructured coatings of chitosan with *Byrsonima crassifolia* extract (L.) Kunth. *Postharvest Biol Technol* 2019; 149: 74–82. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.11.019
- [53] Struszczyk M.H. Chitin and Chitosan. Part 1. Properties and production. *Polimery* 2002; 47: 316–325
- [54] Hartley J.L. Cloning technologies for protein expression and purification. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17: 359-366
- [55] Goodwin D., Simerska P., Toth I. Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. *Curr Med Chem* 2012; 19: 4451-4461
- [56] Kaszowska M. Chemical structure and biosynthesis of lipopolysaccharide – important component of the cell envelope of Gram negative bacteria. *Postępy Hig Med Dośw* 2004; 58: 333-342
- [57] Rusiecka-Ziółkowska J., Stekla J., Szponar B., Walszewska M. Rola endotoksyn w patomechanizmie sepsy. *Pol Merk Lek* 2008; 25: 260-265
- [58] Pospiech E., Peltre G., Wąsowicz E., Jeleń H., Greaser M.L., Mikołajczak B., Bresińska A., Gorączka A. Metody separacji i ocena rozdzielczości: elektroforeza, wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa, spektroskopia masowa. W: *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii*, red.: Z. Kędzior, M. Jankiewicz, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego. Wydział Technologii Żywności, Poznań 2003, pp. 155-193
- [59] Rietschel E.T., et.al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. W: *Pathology of Septic Shock. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 216. red.: E.T. Rietschel, H. Wagner, Springer, Berlin-Heidelberg 1996, pp. 39-81
- [60] Mamat U., Wilke K., Bramhill D., Schromm A. B., Lindner B., Kohl T.A., Woodard R.W. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin- free production of recombinant proteins. *Micro Cell Fa* 2015; 14: 57. doi: 10.1186/s12934-015-0241-5
- [61] Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C.V., Pessoa A.J. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. *J Pharm Sci* 2007; 10: 388-404

- [62] Schneier M., Razdan S., Miller A.M., Briceno M.E., Barua S. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. *Biotechnol Bioeng* 2020; 117: 2588-2609. doi: 10.1002/bit.27362
- [63] Petsch D., Anspach F.B. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech* 2000; 76: 97–119
- [64] Razdan S., Wang J. C., Barua S. PolyBall: A new adsorbent for the efficient removal of endotoxin from biopharmaceuticals. *Sci Rep* 2019; 9: 8867
- [65] Jozala A. F., Geraldles D.C., Tundisi L. L., Feitosa V. d A., Breyer C. A., Cardoso S. L., Pessoa A. Biopharmaceuticals from microorganisms: From production to purification. *Braz J Microbiol* 2016; 47: 51–63. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.007
- [66] Pina A. S., Lowe C. R., Roque A. C. A. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotechnol Adv* 2014; 32: 366–381. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.001
- [67] Arabski M., Davydova N. V., Wasik S., Reunov A. V., Lapshina L. A., Yermak I. M., Kaca W. Binding and biological properties of lipopolysaccharide *Proteus vulgaris* O25 (48/57)–chitosan complexes. *Biochimie* 2006; 88: 23–30
- [68] Arabski M., Lisowska H., Lankoff A., Davydova V. N., Drulis-Kawa Z., Augustyniak D., Yermak I. M., Molinaro A., Kaca W. The properties of chitosan complexes with smooth and rough forms of lipopolysaccharides on CHO-K1 cells. *Carbohydr Polym* 2013; 97: 284-292. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.008
- [69] Yermak I. M., et al. Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide–chitosan, *Biochimie* 2006; 88: 23–30
- [70] Naberezhnykh G. A., Gorbach V. I., Kalmykova E. N., Solov'eva T .F. Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezoquartz biosensor. *Biophys Chem* 2015; 198: 9-16. doi:10.1016/j.bpc.2015.01.003
- [71] Al-Rooqi M.M., et al. Advancement of chitin and chitosan as promising biomateriale. *J Saudi Chem Soc* 2022; 26: 101561. doi: 10.1016/j.jscs.2022.101561
- [72] Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* 2015; 13:1133-74. doi: 10.3390/md13031133
- [73] Kędzierska M., Miłowska K. The use of chitosan-based biomaterials for the treatment of hard-healing wounds. *Postepy Hig Med Dosw* 2019; 73 : 768-781. doi: 10.5604/01.3001.0013.6823
- [74] Ahsan S.M., Thomas M., Reddy K.K., Sooraparaju S.G., Asthana A., Bhatnagar I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissueengineering. *Int J Biol Macromol* 2018; 110: 97–109. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140
- [75] Baranwal A., Kumar A., Priyadharshini A., Oggu G.S., BhatnagarI., Srivastava A., Chandra P. Chitosan: An undisputed bio-fabricationmaterial for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int J Biol Macromol* 2018; 110: 110–123. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.006
- [76] Pellá M.C., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E.T., Guilherme M.R.,Muniz E.C., Rubira A.F. Chitosan-based hydrogels: From preparationto biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2018; 196: 233–245. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.033
- [77] Brown B.N., Ratner B.D., Goodman S.B. Amar S., Badylak S.F. Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomesin biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterial*, 2012; 33: 3792–3802. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.034
- [78] Mayet N., Choonara Y.E., Kumar P., Tomar L.K., Tyagi C., Toit L.C.D., Pillay V. A comprehensive review of advanced polymeric wound healing systems. *J Pharm Sci* 2014;103: 2211–2230

- [79] Koehler J., Brandl F.P., Goepferich A.M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *Eur Pol J* 2018; 100: 1–11. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046
- [80] Mukherjee D., et al. Development and characterization of chitosan-based hydrogels as wound dressing materials. *J Drug De. Sci Technol* 2018; 46: 498–510. doi: 10.1016/j.jddst.2018.06.008
- [81] Negm N.A., Hefni H.H.H., Abd-Elaal A.A.A., Badr E.A., Kana M.T.H.A. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *Int J Biol Macromol* 2020; 152: 681–702. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196
- [82] Sashiwa H., Aiba S.I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2004; 29: 887–908. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2004.04.001
- [83] Ranjith R., Balraj S., Ganesh J., Milton M.C.J. Therapeutic agents loaded chitosan-based nanofibrous mats as potential wound dressings: A review. *Mat Today Chem J* 2019; 12: 386- 395. Doi: 10.1016/j.mtchem.2019.03.008
- [84] Kalantari K., Afifi A.M., Jahangirian H., Webster T. J. Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review. *Carbohydr Polym* 2019; 207: 588-600. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.011
- [85] Mi F.L., Shyu S.S., Wu Y.B., Lee S.T., Shyong J.Y., Huang R.N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 2001; 22: 165-173. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00167-8
- [86] Wang D., Zhang N., Meng G., He J., Wu F. The effect of form of carboxymethyl-chitosan dressings on biological properties in wound healing. *Coll Surf B: Biointerf* 2020; 194: 111191. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111191
- [87] Zhou L., et al. Antibacterial and wound healing–promoting effect of sponge-like chitosan-loaded silver nanoparticles biosynthesized by iturin. *Inter J Biol Macromol* 2021; 181:1183-1195. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.119
- [88] Pellá M.C., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E.T., Guilherme M.R., Muniz E.C., Rubira A.F. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2018; 196: 233–245. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.033
- [89] Patrúlea V., Ostafe V., Borchard G., Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 97: 417-426. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.08.004
- [90] Liu H., Wang C., Li C., Qin Y., Wang Z., Yang F., Li Z., Wang J. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv* 2018; 14: 7533-7549. doi: 10.1039/C7RA13510F
- [91] Xie H., et al. Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. *Int J Biol Macromol* 2018; 107: 93–104. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.142
- [92] Miguel S.P., Moreira A.f., Correia I.J. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *Int J Biol Macromol* 2019; 127: 460-475. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072
- [93] Kenawy E., Omer A.M., Tamer T.M., Elmeligy M.A., Mohy Eldin M.S. Fabrication of biodegradable gelatin/chitosan/cinnamaldehyde crosslinked membranes for antibacterial wound dressing applications. *Int J Biol Macromol* 2019; 139: 440-448. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.191
- [94] Zhang S., Li J., Liab J., Dulogo N., Lid D., Li F., Man J. Application status and technical analysis of chitosan-based medical dressings: a review. *RSC Adv* 2020; 10: 34308-34322. doi: 10.1039/D0RA05692H

- [95] Shen H.Y., Liu Z.H., Hong J.S., Wu M.S., Shiue S.J., Lin S.Y. Controlled-release of free phage nanoparticles from 3D-plotted hydrogel fibrous structure as potential antibacterial wound dressing. *J Contr Rel* 2021; 331: 154–163. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.01.024 .
- [96] Nogueira F., Karumidze N., Kusradze I., Goderdzishvili M., Teixeira P., Gouveia I.C. Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure. *Nanomed Nanotech Biol Med* 2017; 13: 2475–2484. doi: 10.1016/j.nano.2017.08.008
- [97] Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Europ Polym J* 2013; 49: 780–792. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009
- [98] Madni A., Kousar R., Naeem N., Wahid F. Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering. *J Biores Bioprod* 2021; 6: 11-25. doi: 10.1016/j.jobab.2021.01.002
- [99] Khan A., Alamry K.A. Recent advances of emerging green chitosan-based biomaterials with potential biomedical applications: A review. *Carbohydr Res* 2021; 506: 108368. doi: 10.1016/j.carres.2021.108368
- [100] Sultankulov B., Berillo D., Sultankulova K. , Tokay T., Saparov A. Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomolecules* 2019; 9: 470. doi: 10.3390/biom9090470
- [101] Bakshi P.S., Selvakumar D., Kadirvelu K., Kumar N.S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *Int J Biol Macromol* 2020; 150: 1072-1083. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113
- [102] Asadpour S., Kargozar S., Moradi L., Ai A., Nosrati H., Ai J. Natural biomacromolecule based composite scaffolds from silk fibroin, gelatin and chitosan toward tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2020; 154:1285-1294. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.003
- [103] Paul P., Kolesinska B., Sujka W. Chitosan and Its Derivatives - Biomaterials with Diverse Biological Activity for Manifold Applications. *Mini Rev Med Chem* 2019; 19: 737-750. doi: 10.2174/1389557519666190112142735
- [104] Nosrati H., Pourmotabed S., Sharifi E. A review on some natural biopolymers and their applications in angiogenesis and tissue engineering. *J Appl Biotech Rep* 2018; 5: 81-91. doi: 10.29252/JABR.05.03.01
- [105] Kim C.H., Park S.J., Yang D.H., Chun H.J. Chitosan for Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1077: 475-485. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2\_25
- [106] Rodríguez-Vázquez M., Vega-Ruiz B., Ramos-Zúñiga R., Saldaña-Koppel D.A., Quiñones-Olvera L.F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 821279. Doi: 10.1155/2015/821279
- [107] Francesko A., Tzanov T. Chitin, chitosan and derivatives for wound healing and tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2011; 125:1-27. doi: 10.1007/10\_2010\_93
- [108] Abourehab M.A.S., Pramanik S., Abdelgawad M.A.A., Abualsoud B.M., Kadi A., Ansari M.J., Deepak A. Recent Advances of Chitosan Formulations in Biomedical Applications. *Int J Mol Sci* 2022; 23:10975. doi: 10.3390/ijms231810975
- [109] Wang, Y.; Liu, P.; Du, J.; Sun, Y.; Li, F.; Duan, Y. Targeted siRNA delivery by anti-HER2 antibody-modified nanoparticles of MPEG-chitosan diblock copolymer. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013, 24, 1219–1232. <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.745716>

- [110] Yu Z., Ma L., Ye S., Li G., Zhang M. Construction of an environmentally friendly octenylsuccinic anhydride modified PH sensitive chitosan nanoparticle drug delivery system to alleviate inflammation and oxidative stress. *Carbohydr Polym* 2020; 236: 115972. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115972
- [111] Jin Z., Hu G., Zhao K. Mannose-anchored quaternized chitosan/thiolated carboxymethyl chitosan composite NPs as mucoadhesive carrier for drug delivery. *Carbohydr Polym* 2022; 283: 119174. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119174
- [112] Gerami S.E., Pourmadadi M., Fatoorehchi H., Yazdian F., Rashedi H., Nigjeh M.N. Preparation of PH-sensitive chitosan/polyvinylpyrrolidone/ $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite for drug delivery application: Emphasis on ameliorating restrictions. *Int J Biol Macromol* 2021; 173: 409–420. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.067
- [113] Zhang K., Gao J., Li S., Ma T., Deng L., Kong Y. Construction of a PH-responsive drug delivery platform based on the hybrid of mesoporous silica and chitosan. *J Saudi Chem Soc* 2021; 25: 101174. doi: 10.1016/j.jscs.2020.11.007
- [114] Baghdan E., Pinnapireddy S.R., Strehlow B., Engelhardt K.H., Schäfer J., Bakowsky U. Lipid coated chitosan-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery. *Int J Pharm* 2018, 535, 473–479. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.045
- [115] Zhu Y., Marin L.M., Xiao Y., Gillies E.R., Siqueira W.L. Ph-sensitive chitosan nanoparticles for salivary protein delivery. *Nanomaterials* 2021; 11: 1028. doi: 10.3390/nano11041028
- [116] Suarato G., Li W., Meng Y. Role of PH-responsiveness in the design of chitosan-based cancer nanotherapeutics: A review. *Biointerphases* 2016; 11: 04B201. doi: 10.1116/1.4944661
- [117] Gao X., Liu N., Wang Z., Gao J., Zhang H., Li M., Du Y., Gao X., Zheng A. Development and optimization of chitosan nanoparticle-based intranasal vaccine carrier. *Molecules* 2022; 27: 204. doi: 10.3390/molecules27010204
- [118] A. Bera, S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, F. Götz, Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*, *Mol. Microbiol.* 55(2005) 778–787
- [119] Ceysens P.J., Brabban A., Rogge L., Lewis M.S., Pickard D., Goulding D., Dougan G., Noben J.P., Kropinski A., Kutter E., Lavigne R. Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the “N4-like viruses”. *Virology* 2010; 405: 26–30
- [120] Danis-Wlodarczyk K., Vandenheuvel D., Jang Bin H., Briers Y., Olszak T., Arabski M., Wasik S., Drabik M., Higgins G., Tyrrell J., Harvey B.J., Noben J.P., Lavigne R., Drulis-Kawa Z. A proposed integrated approach for the preclinical evaluation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. *Sci Rep* 2016; 6: 28115. doi: 10.1038/srep28115
- [121] Olszak T., Danis-Wlodarczyk K., Arabski M., Gula G., Maciejewska B., Wasik S., Lood C., Higgins G., Harvey B.J., Lavigne R., Drulis-Kawa Z. *Pseudomonas aeruginosa* PA5oct Jumbo Phage impacts planktonic and biofilm population and reduces its host virulence. *Viruses* 2018; 11:1–20. doi: 10.1101/405027
- [122] Rinaudo M., Milas M., Dung P.L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol* 1993;15: 281-285
- [123] Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *Carbohydr Polym* 1985; 5: 461-472
- [124] H. Struszczyk et al. A method of producing microcrystalline chitosan by a continuous method. *PL* 164 247

- [125] Arabski M., Wasik S., Dworecki K., Kaca W. Laser Interferometric Determination of Ampicillin and Colistin Transfer through Cellulose Biomembrane in the Presence of *Proteus Vulgaris* O25 Lipopolysaccharide. *J Memb Sci* 2007; 299: 268–275. doi:10.1016/j.memsci.2007.05.003
- [126] Dworecki K., Slezak A., Drabik M., Ornal-Wasik B., Wasik S. Determination of the Membrane Permeability Coefficient under Concentration Polarisation Conditions. *Desalination* 2006;198: 326–334. doi:10.1016/j.desal.2006.03.518
- [127] Rewak-Soroczynska J., Sobierajska P., Targonska S., Piecuch A., Grosman L., Rachuna J., Wasik S., Arabski M., Ogorek R., Wiglusz R.J. New approach to antifungal activity of fluconazole incorporated into the porous 6-anhydro- $\alpha$ -l-galacto- $\beta$ -d-galactan structures modified with nanohydroxyapatite for chronic-wound treatments- *in vitro* evaluation. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 1–21. doi:10.3390/ijms22063112
- [128] Koide S.S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Res* 1998;8: 1091-1101
- [129] Piatkowski M., Bogdal D., Radmoski P., Jarosinski A. Application of chemically modified chitosan in metal ions sorption. *Chem Tech Trans* 2010; 1079: 258-265
- [130] Tarsi R., Muzzarelli R.A., Guzman C.A., Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res* 1997; 76: 665-672
- [131] Gierszewska M., Ostrowska- Czubenko J. Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. *Carbohydr Polym* 2016; 153: 501–511 doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.126
- [132] Goodwin D., Simerska P., Teth I. Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. *Current Med Chem* 2012;19: 4451–4461
- [133] Szmyt A., Dabrowska A., Chrzanowska J. Alternative methods of obtaining biologically active proteins and peptides. *Acta Sci Pol* 2015; 14: 33-44
- [134] Szermer-Olearnik B., Boratynski J. Removal of Endotoxins from Bacteriophage Preparations by Extraction with Organic Solvents, *PloS One*. 2015; 10: 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0122672
- [135] Teixeira-Pinto R.G.R., Molino J.V.D., Santos-Ebinuma V.C., Pessoa A. J., Valentinia S.R., Pereira F.F.B., Lopes A.M. Effect of electrolytes as adjuvants in GFP and LPS partitioning on aqueous two-phase systems: 2. Nonionic micellar systems, *Sep Purif Tech* 2019; 210: 69-79, doi:10.1016/j.seppur.2018.07.078
- [136] Harm S., Falkenhagen D., Hartmann J. Endotoxin adsorbents in extracorporeal blood purification: Do they fulfill expectations? *Int J Artif Organs* 2014; 37: 222-232
- [137] Nesovica K., Jankovica A., Radetica T., Vukasinovic-Sekulica M., Kojic V., Zivkovic L., Peric-Grujica A., Rheed K.Y., Miskovic-Stankovica V. Chitosan-based hydrogel wound dressings with electrochemically incorporated silver nanoparticles– *In vitro* study. *Eur Polym J* 2019; 12:1-17. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109257
- [138] Choi M., Hasan N., Cao J., Lee J., Hlaing S.P., Yoo J.W. Chitosan-based nitric oxide-releasing dressing for anti-biofilm and *in vivo* healing activities in MRSA biofilm-infected wounds. *Inter J Biol Macromol* 2020; 142: 680–692. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.009
- [139] Mukhopadhyay A., Puri Sikka M., Midha V.K. Speciality dressings for managing difficult-to-heal wounds. In: Rajendran S *Advanced Textiles for Wound Care*. 2nd edn. Elsevier, UK 2019, pp 391-421. doi: 10.1016/B978-0-08-102192-7.00014-X
- [140] Brothers K.M., Stella N.A., Hunt K.M., Romanowski E.G., Liu X., Klarlund J.K., Shanks R.M.Q. Putting on the brakes: Bacterial impediment of wound healing. *Sci Rep* 2015; 5: 14003. doi:10.1038/srep14003

- [141] Zmejkoski D.Z., Zdravkovi N.M., Trisic D.D., Budimir M.D., Markovic Z.M., Kozyrovska N.O., Markovic B.M.T. Chronic wound dressings – Pathogenic bacteria anti-biofilm treatment with bacterial cellulose-chitosan polymer or bacterial cellulose-chitosan dots composite hydrogels. *Inter J Biol Macromol* 2021;191: 315-323. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.09.118
- [142] Chang R.J.K., Morales S., Okamoto Y., Chan H.K. Topical application of bacteriophages for treatment of wound infections. *Trans Res* 2020; 220: 153-166. doi:10.1016/j.trsl.2020.03.010
- [143] Meyer A., Greene M., Kimmelshue C., Cademartiri R. Stabilization of T4 bacteriophage at acidic and basic pH by adsorption on paper. *Col Surf B: Biointerf* 2017;160: 169–176. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.002
- [144] Zhang J., Xia W., Liu P., Cheng Q., Tahirou T., Gu W., Li B. Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Mar Drugs* 2010; 8: 1962-1987. doi:10.3390/md8071962
- [145] Kedzierska M., Milowska K. The use of chitosan-based biomaterials for the treatment of hard-healing wounds. *Postepy Hig Med Dosw* 2019; 73: 768–781. doi:10.5604/01.3001.0013.6823
- [146] Danis-Wlodarczyk K., Olszak T., Arabski M., Wasik S., Majkowska-Skrobek G., Augustyniak D., Gula G., Briers Y., Jan Bin H., Vandenheuvel D., Duda K.A., Lavigne R., Drulis-Kawa Z. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One* 2015;10: 1-20. doi:10.1371/journal.pone.0127603

## 14. Dorobek naukowy

03.11.2020- Członek Komitetu Organizacyjnego III Krajowej Konferencji Naukowej „Polimery w medycynie” Łódź;

od 22.12.2020- Członek Komitetu Technicznego Polskiego Komitetu Normalizacyjnego ds. Materiałów Medycznych i Biomateriałów, Warszawa;

od 01.09. 2021- Członek Polskiego Towarzystwa Chitynowego, Polish Chitin Society, Łódź;

20.06.2021- Członek Komitetu Organizacyjnego III Krajowej Konferencji Naukowej „Innowacyjne Oblicza Przemysłu Włókienniczego” Łódź.

### Zgłoszenia patentowe

zgłoszenie patentowe na wynalazek, pt.: „*Metoda syntezy i zastosowanie matrycy polimerowej do komponowania z preparatami bakteriofagów*” (zgłoszenie do Urzędu Patentowego RP z dn. 31.03.2023, nr. P.443658);

zgłoszenie patentowe na wynalazek, pt.: „*Synteza i zastosowanie matrycy polimerowej do oczyszczania białek rekombinowanych z lipopolisacharydu bakteryjnego*” (zgłoszenie do Urzędu Patentowego RP z dn. 31.03.2023, nr. P.443659).

### Publikacje naukowe

1. Kucharska M., Sikora M., Brzoza-Malczewska K., Owczarek M.: Antimicrobial properties of chitin and chitosan, W: van den Broek L.A.M., Boeriu C.B., Stevens C.: Chitin and Chitosan: Properties and Applications, Wiley Series in Renewable Resources, England 2019, ISBN: 978-1-119-45043-6, pp. 169-188. doi: 10.1002/9781119450467.ch7;

2. Sikora M., Wiśniewska-Wrona M., Arabski M.: Biomedyczne właściwości chitozanu- zastosowanie w inżynierii tkankowej. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2021;75:1020 -1037. doi: 10.2478/ahem-2021-0015;

3. Piekarska K., Sikora M., Owczarek M., Józwiak-Pruska J., Wiśniewska-Wrona M.: Chitin and chitosan as polymers of the future—obtaining, modification, life cycle assessment and main directions of application. Polymers, 2023, 15(4), 793. doi: 10.3390/polym15040793.

### Komunikaty naukowe

„III Konferencja Polimery w Medycynie”, Łódź, 03.11.2020: *Opracowanie technologii produkcji złoża chitozanowego stosowanego do oczyszczania białkowych produktów biotechnologicznych z endotoksyn bakteryjnych*- prezentacja posterowa;

„IV Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach”, Kielce, 17-19.11.2020: *Development of technology for the production of a deposit dedicated to the purification of biotechnological protein products from bacterial endotoxins*- komunikat ustny, przyznanie Nagrody Rektora „PRODOMUS” za najlepszą prezentację w sekcji nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych;

„V Forum Doktorantów Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach”, Kielce, 02-03.06.2022- *The potential of using chitosan in the biotechnological production of proteins*- komunikat ustny;

„II Konferencja Naukowa EkoBioTex”, Łódź 25.11.2022: *Potencjał wykorzystania chitozanu w biotechnologicznej produkcji białek*- komunikat ustny;

„IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Polimery w Medycynie”, Łódź, 23-24.05.2023: *Matryca na bazie chitozanu jako nośnik dla bakteriofagów*- prezentacja posterowa;

„XXVII Conference PolishChitin Society. New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives”, Poland, 23-24.09. 2021: *Chitosan based beds for the purification of biotechnological protein products from bacterial endotoxins*- komunikat ustny;

„The 4th EPNOE Junior Scientist Meeting Belgium” Belgium, 03-04.02.2021: *Development of chitosan-based technology for purification of recombinant proteins from bacterial endotoxins*- prezentacja posterowa;

„The 7th International Congress of the European Polysaccharide Network of Excellence in 2021”, Nantes, 11-15.10.2021: *Chitosan-based technology for binding of bacterial endotoxins*- komunikat ustny;

„Polymers 2022 - New Trends in Polymer Science: Health of the Planet, Health of the People”, Turin Italy, 25-27.05.2022: *The potential of using chitosan in the biotechnological production of proteins*- prezentacja posterowa.

#### Udział w projektach

AKCELERATOR ROZWOJU Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach”, wsparcie finansowe w postaci stypendiów motywacyjnych oraz finansowania działalności naukowej w latach 2019-2023,

*Opracowanie innowacyjnego granulatu na bazie chitozanu z dodatkiem unikalnych biomodyfikatorów, przeznaczonego do przetwórstwa techniką ekstruzji*, 2020-2023, NCBiR,

*Zestaw opatrunkowy zabezpieczający urazy powstałe w trakcie pełnienia obowiązków służbowych przez służby mundurowe*, 2014-2023, NCBiR,

*Ekologiczny preparat na bazie polimerów naturalnych działający repelentnie na kleszcze*, finansowanie projektu w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Nauka dla Społeczeństwa”, 2022-2024,

*Nowoczesne protezy odprowadzające mocz dla pacjentów z rakiem pęcherza moczowego poddanych bezkontaktowym minimalnie inwazyjnym operacjom onkologicznym wycięcia pęcherza moczowego/ Smart AUCI*, Program STRATEGMED/I, okres realizacji projektu 01.11.2014-31.10.2019,

*Opracowanie innowacyjnej linii produktowej ręczników papierów funkcjonalnych, zawierających uzyskiwane z recyklingu odpadów własne dodatki wzmacniające oraz biopolimerowe dodatki funkcjonalizujące, zastępujące żywice wodoutrwalające i stanowiące*

*nośnik nowatorskich substancji higienizacyjnych – gemini surfaktantów*, Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny Inteligentny Rozwój na lata 2014-2020. Okres realizacji projektu 01.05.2018-31.10.2020.

Kierownik prac statutowych finansowanych z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z ramienia Łódzkiego Instytutu Technologicznego:

*Opracowanie technologii produkcji złoża dedykowanego do oczyszczania białkowych produktów biotechnologicznych z endotoksyn bakteryjnych*, w latach: 2020-2021;

*Badania nad opracowaniem matrycy polimerowej będącej rusztowaniem dla komórek macierzystych o potencjalnym przeznaczeniu do leczenia ubytków tkanki chrzęstnej*, 2021;

*Materiały opatrunkowe na bazie polimerów naturalnych z wykorzystaniem bakteriofagów do leczenia zakażeń bakteryjnych w trudno gojących się ranach*, 2022.

### Szkolenia

„Bio-Based Industries JU”, Regionalny Punkt Kontaktowy Programów Badawczych UE Województwa Łódzkiego, Łódź, 22.03.2019;

Warsztaty mikroreologiczne „II Polski Dzień Materii Miękkiej i Mikroreologii”, Politechnika Łódzka, 14-15.11.2019;

Warsztaty naukowe „Logical Framework Matrix- narzędzie do planowania, realizacji i oceny projektów. Projekty mobilnościowe dla rozwoju kariery naukowca”, Łódź, 01.02-30.06.2020;

Szkolenie z zarządzania projektami „Prince 2® Foundation 6th Edition” i „Prince 2® Practitioner 6th Edition”, In Progress, Kraków, 05-07.10.2020;

„Ocena Cyklu Życia (LCA)- narzędzie do badania zrównoważonego rozwoju”, Łódź, 11-12.03.2021;

„Specjalistyczne szkolenie z chromatografii cieczowej HPLC”, Centrum Naukowo-Techniczne A2K CeNT s.c „Chromatografia dla początkujących”, Warszawa, 09-10.06.2021;

„Modern analytical approaches in biopolimer characterization”, EPNOE Workshop, BOKU, Tulln, Austria, 26-27.02.2020;

„Polysaccharide Research – Fundamentals and Beyond”, EPNOE Brussels, 15-16.09.2020.

### Staże

Staż krajowy w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, 14.03-28.03.2022;

Staż zagraniczny w Organic and Inorganic Chemistry Department, University of Alcalá (UAH); Alcalá de Henares, Spain, 03-30.10.2022.