

**INSTYTUT BIOCYBERNETYKI I INŻYNIERII
BIOMECYCZNEJ
im. M. NAŁĘCZA PAN**

**MEMBRANY PÓŁPRZEPUSZCZALNE
DO ZASTOSOWAŃ
BIOTECHNOLOGICZNYCH
I BIOMEDYCZNYCH**

Andrzej Chwojnowski,

Ludomira Granicka

Dorota Lewińska

Piotr Ładyżyński

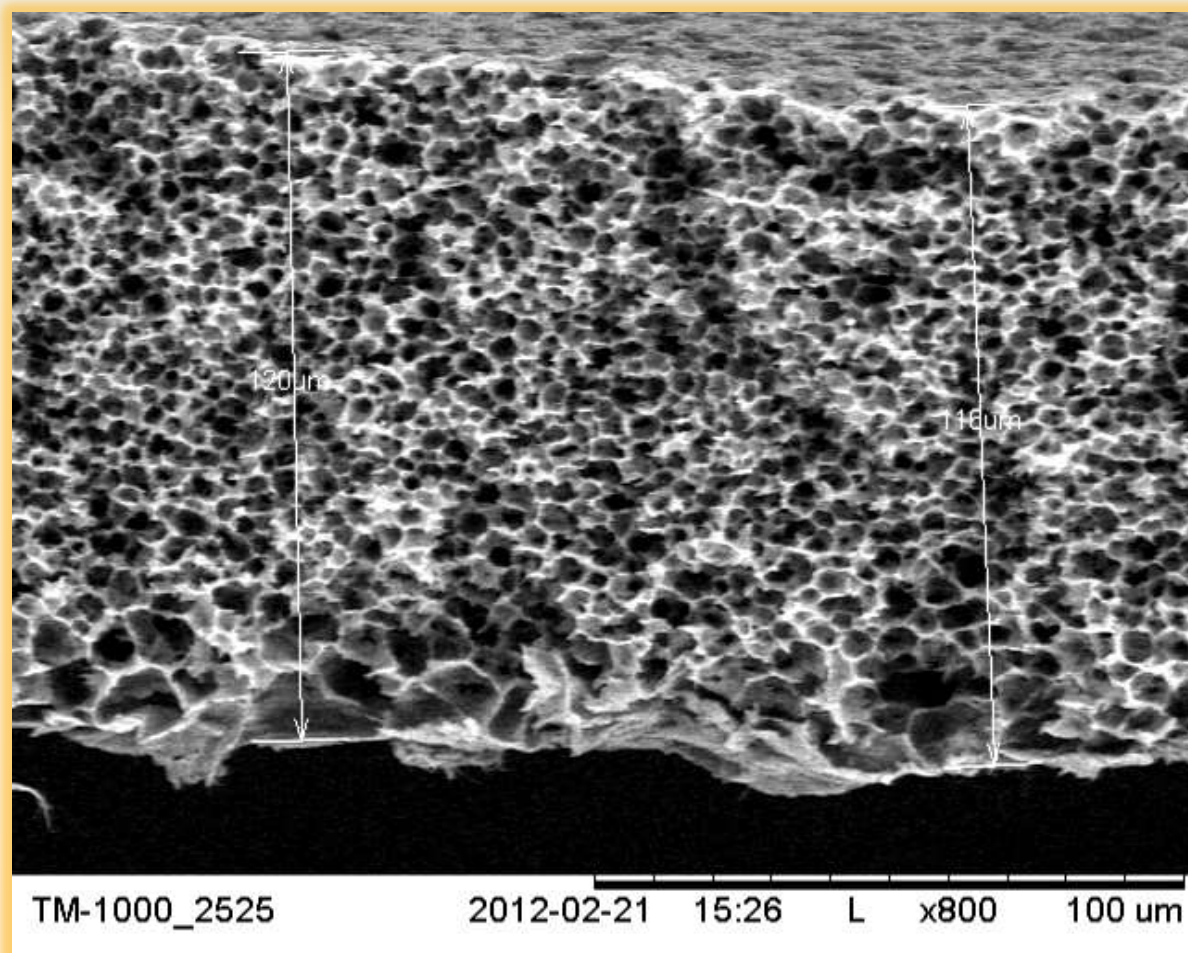
Dorota Pijanowska

- **Polisulfony, polieterosulfony,**
- **Octan celulozy,**
- **Poliestry,**
- **Poliuretany,**
- **Poliamidy, Poliimidy,**
- **Poliakrylonitryl,**
- **Hydrożele naturalne i syntetyczne,**
- **Polielektrokiety.**

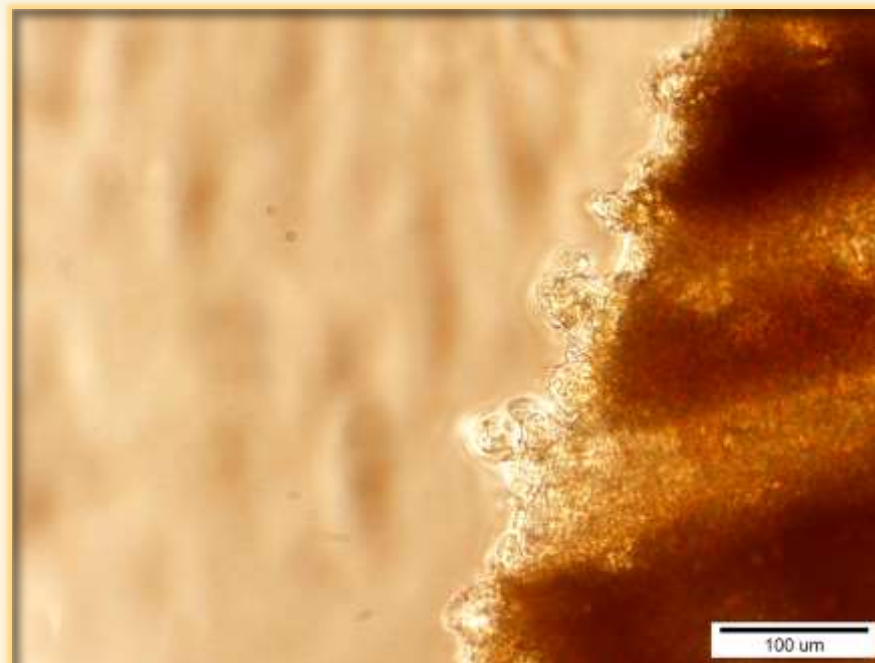
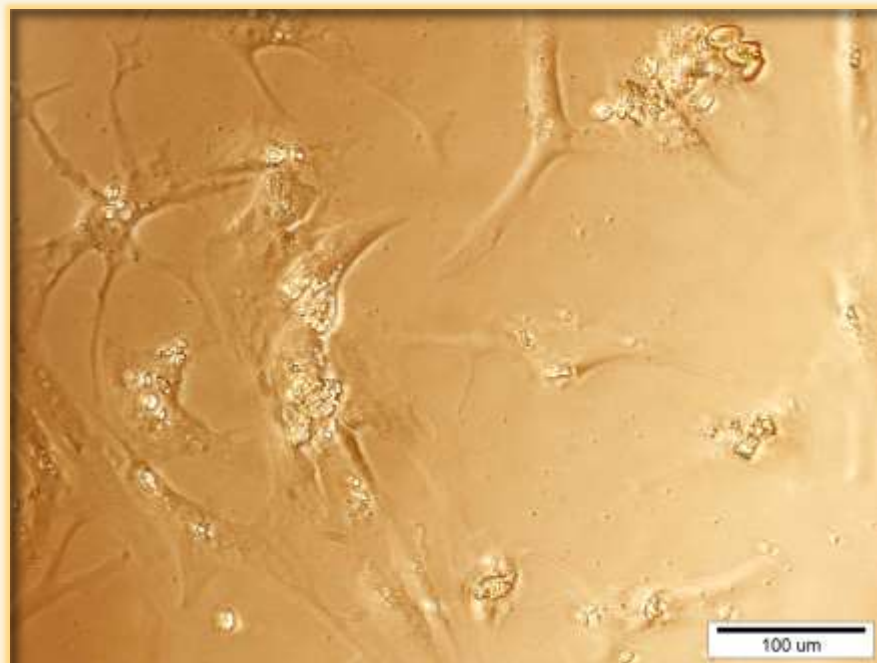
MEMBRANY PŁASKIE

- **Punkty odcięcia w zakresie od 1 kD- 50 μ m,**
- **Powierzchnie gładkie lub fałdowane,**
- **Modyfikacje powierzchni,**
- **Membrany kompozytowe.**

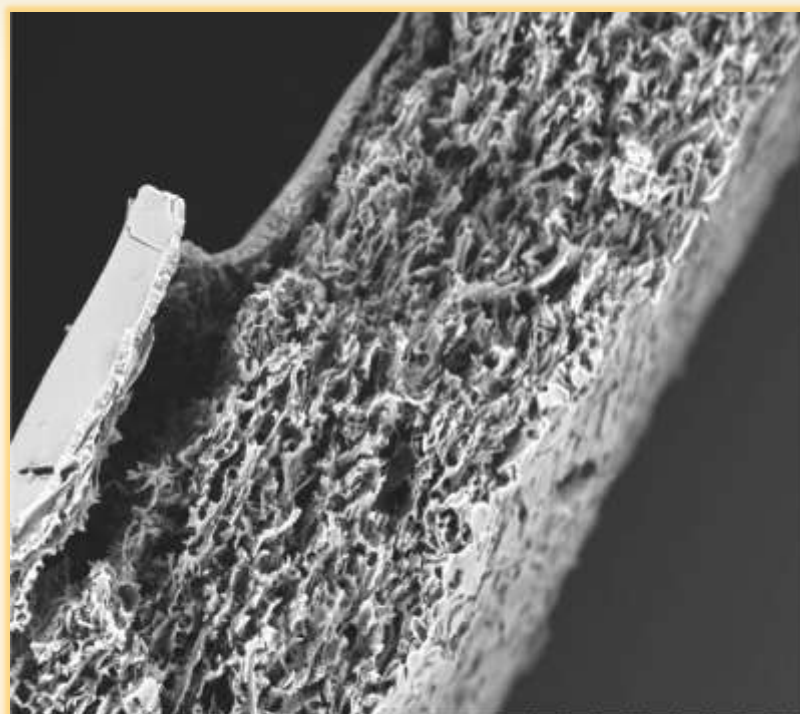
Membrana poliestrowa: co(poli-L-laktyd-poliglikolid)



Fibroblasty na membranie poliestrowej

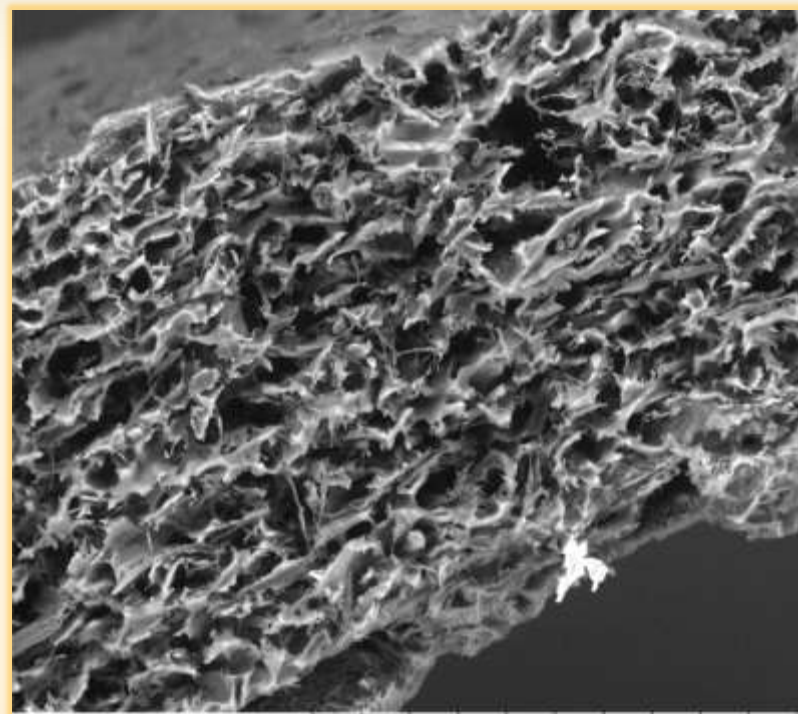


Polietersulfonowa membrana szerokoporowata do hodowli chondrocytów



TM-1000_0401

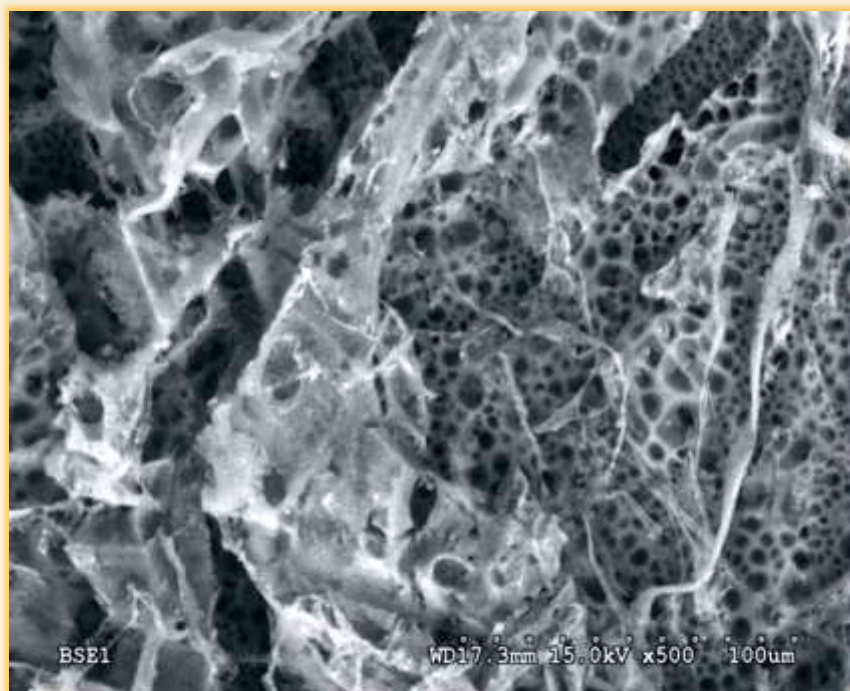
x120 500 μm



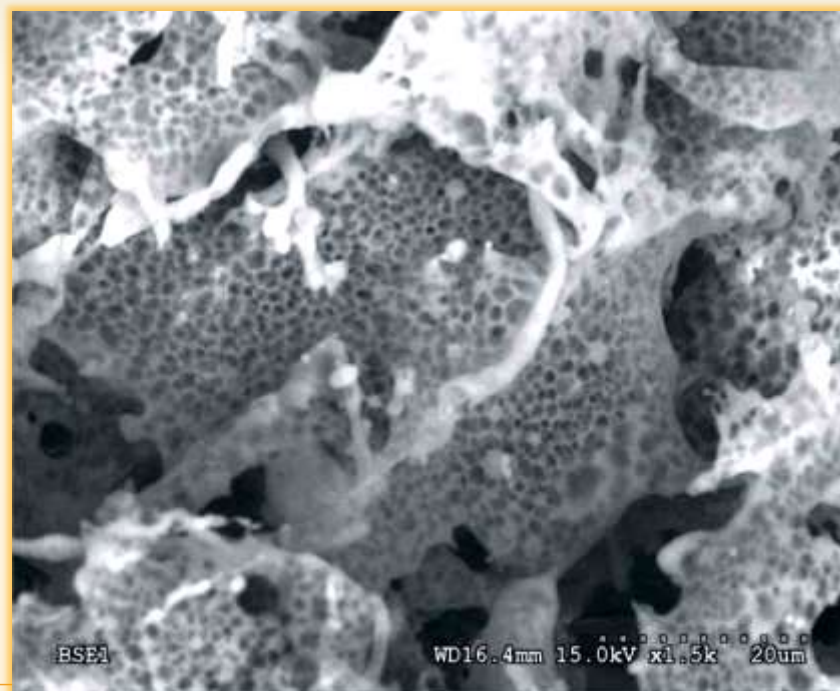
TM-1000_0385

L x200 500 μm

Polietersulfonowa membrana szerokoporowata do hodowli chondrocytów



100μm

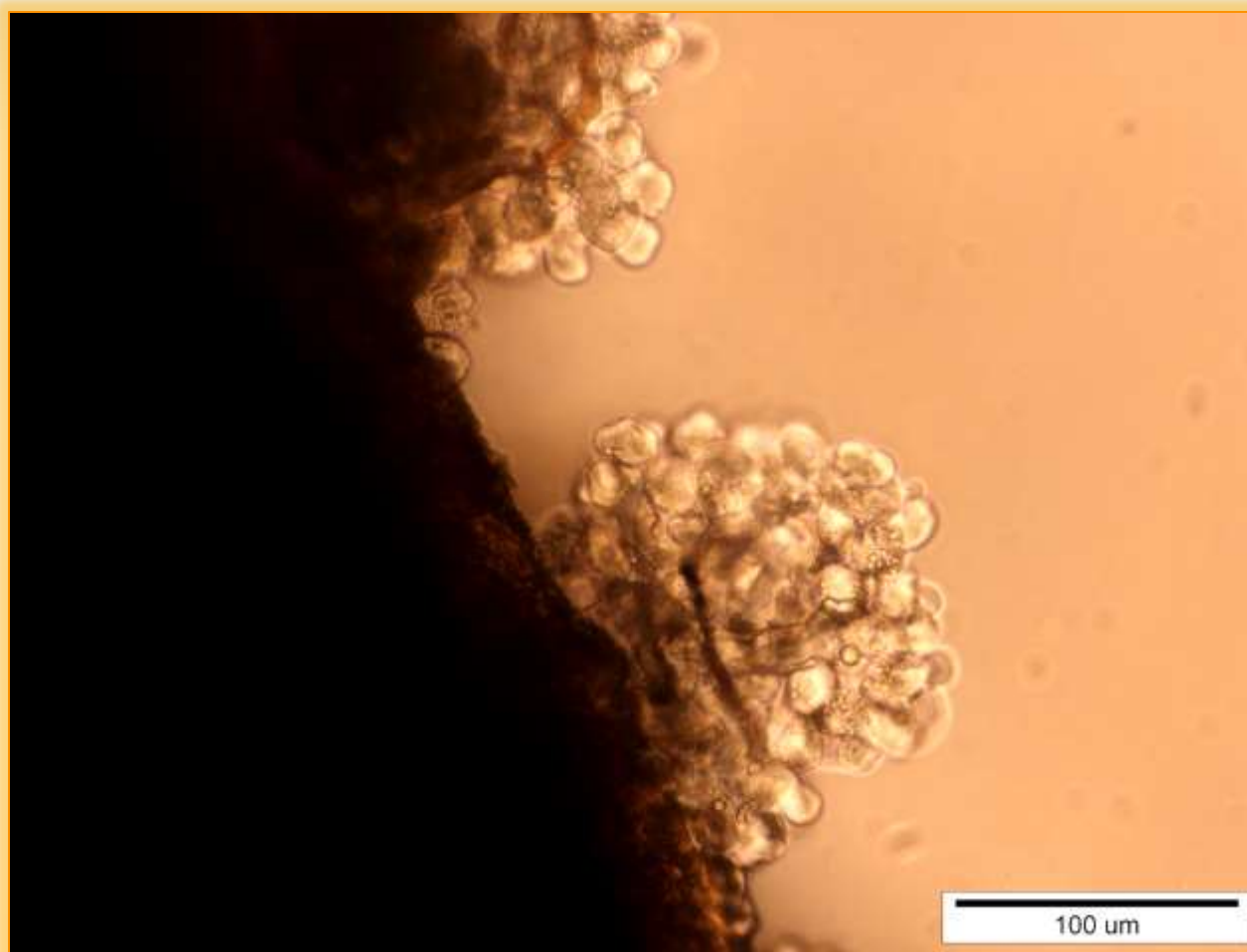


20μm

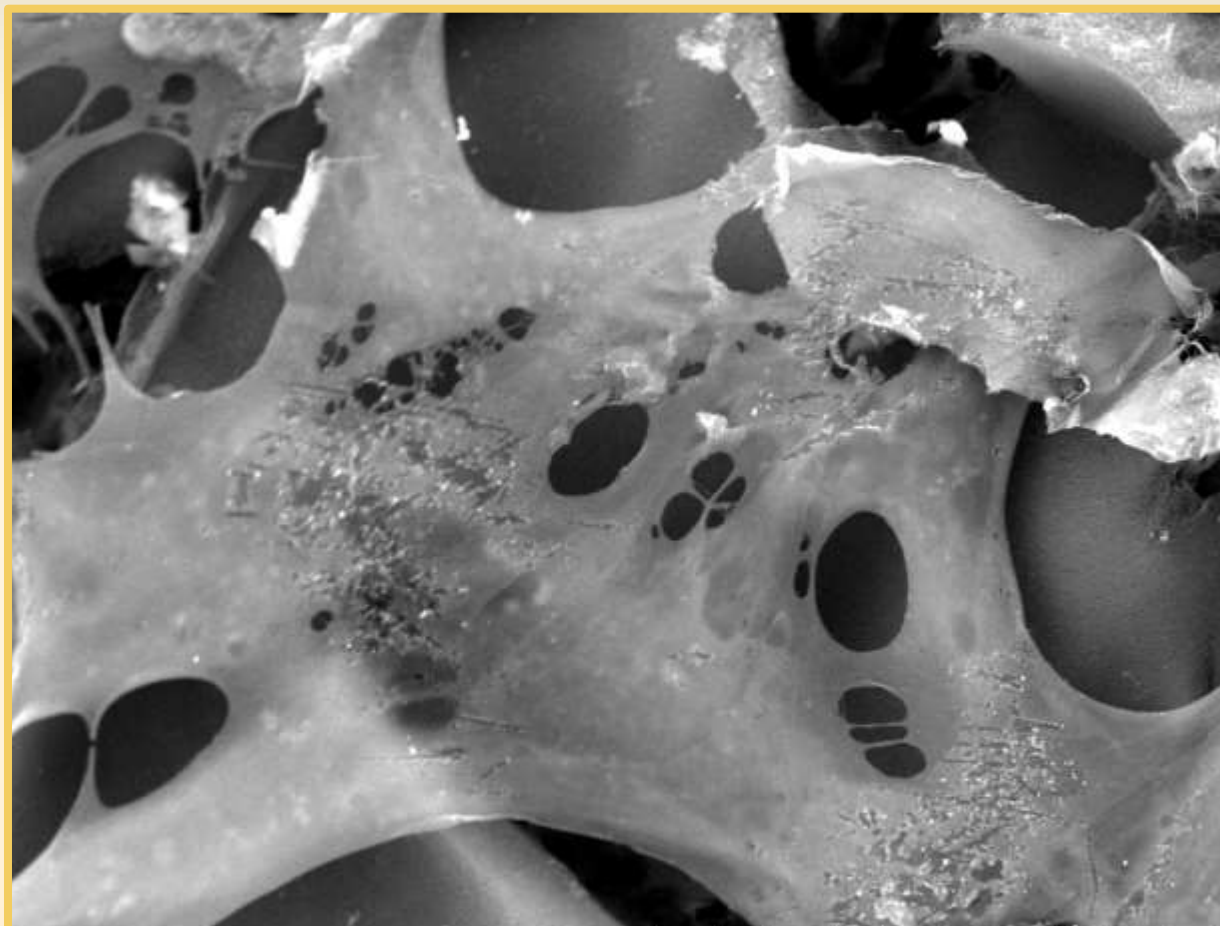
Chondrocyty ludzkie na membranie szerokoporowatej



Chondrocyty ludzkie na membranie polieterosulfonowej



CHONDROCYTY LUDZKIE WEWNĄTRZ MEMBRANY PES

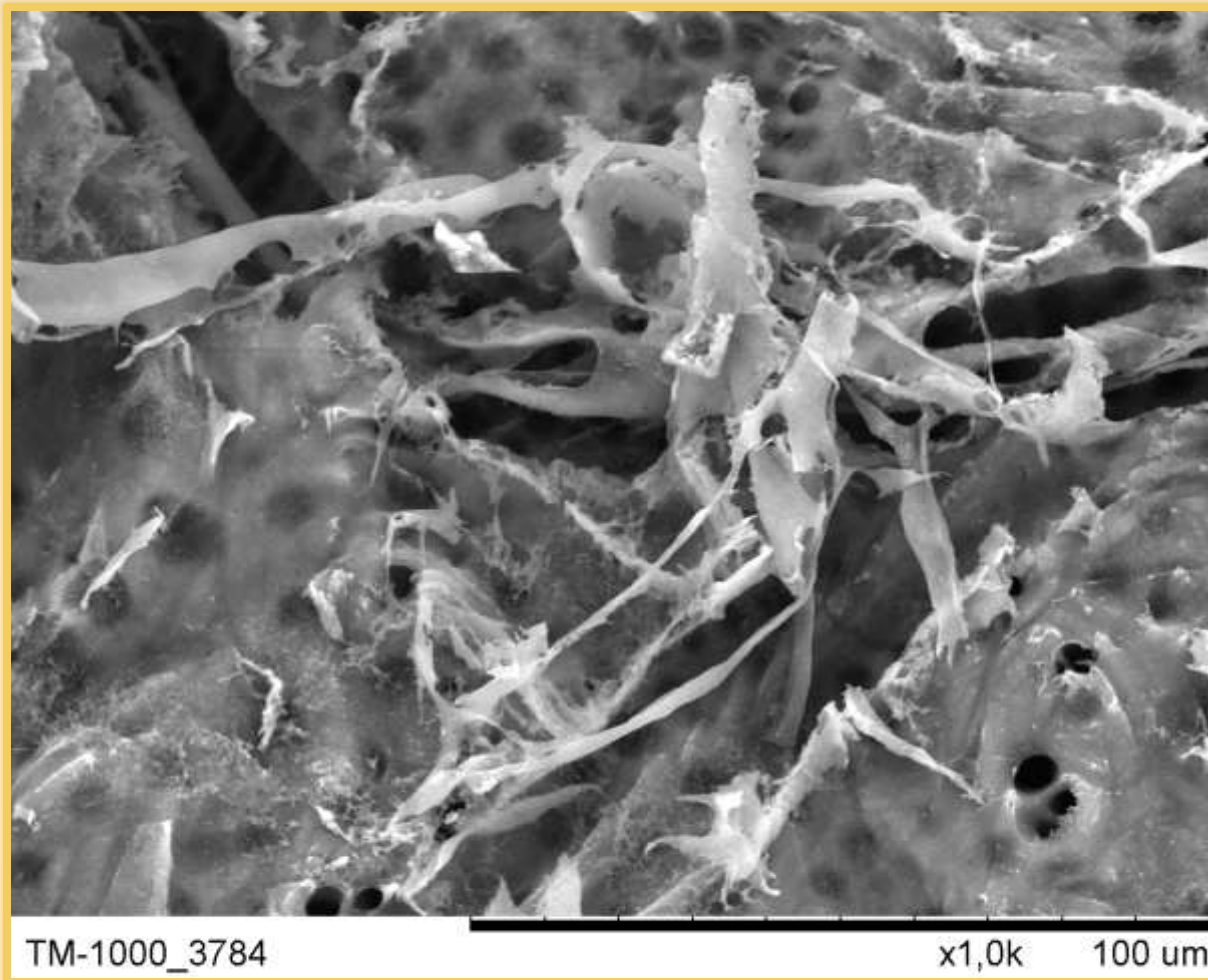


TM-1000_3774

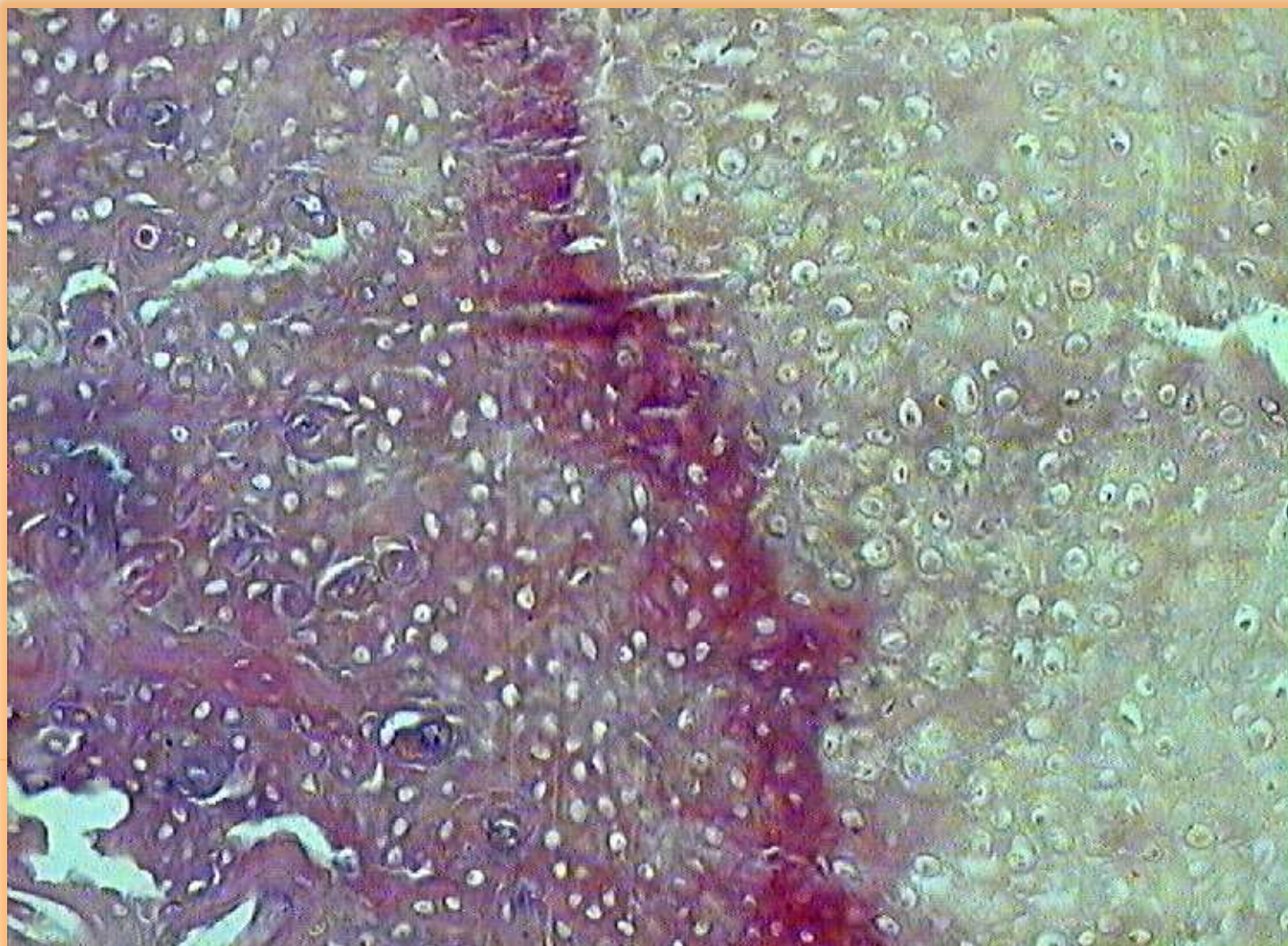
x1,5k

50 um

Tworzenie chrząstki wewnątrz membrany

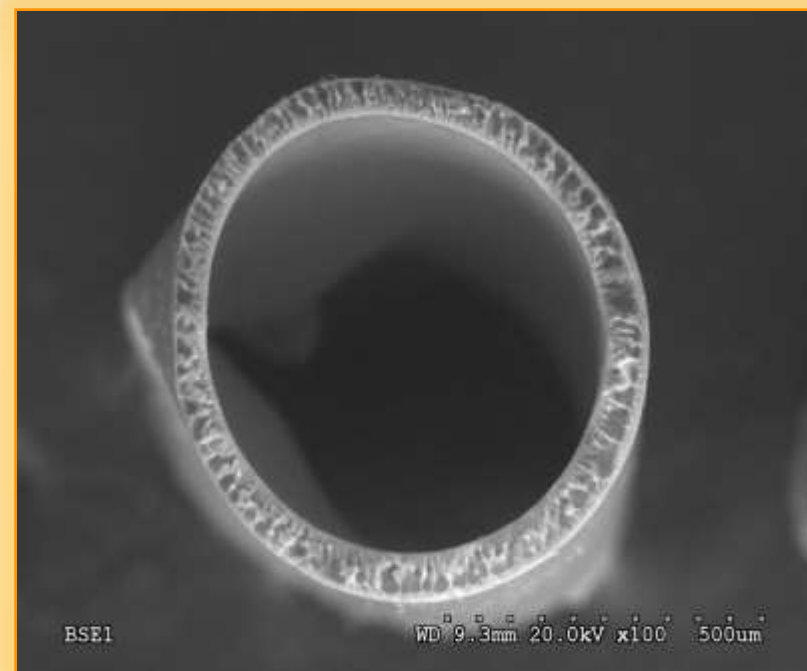
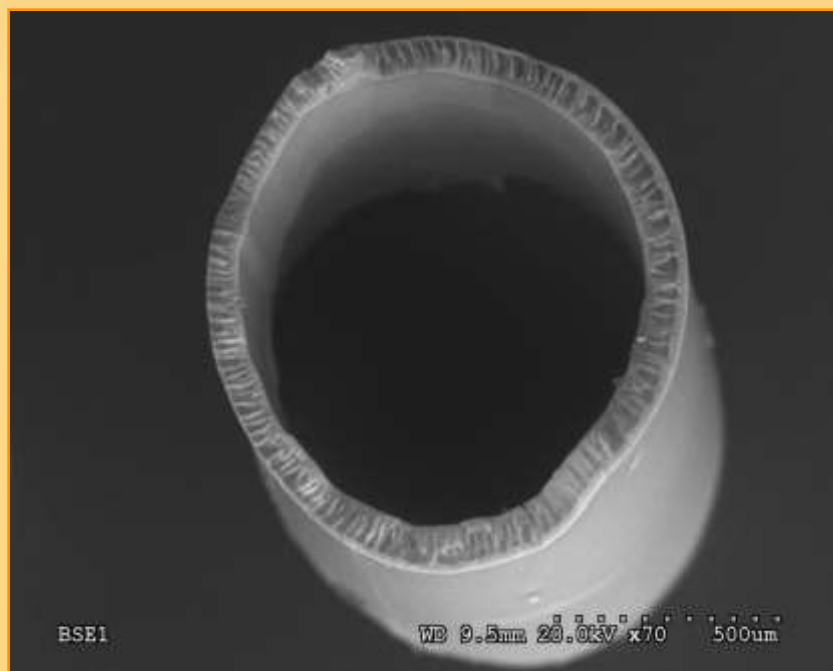


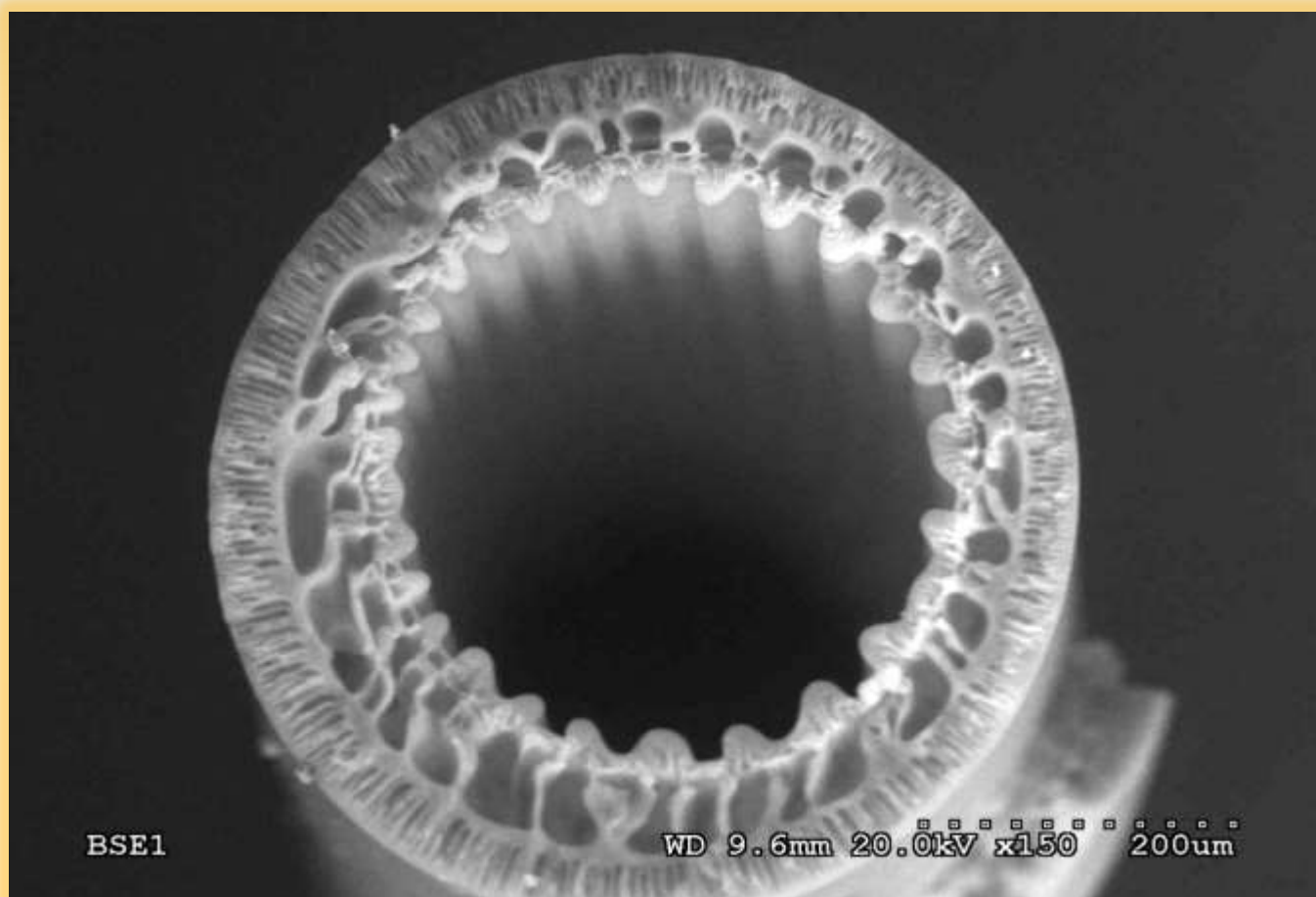


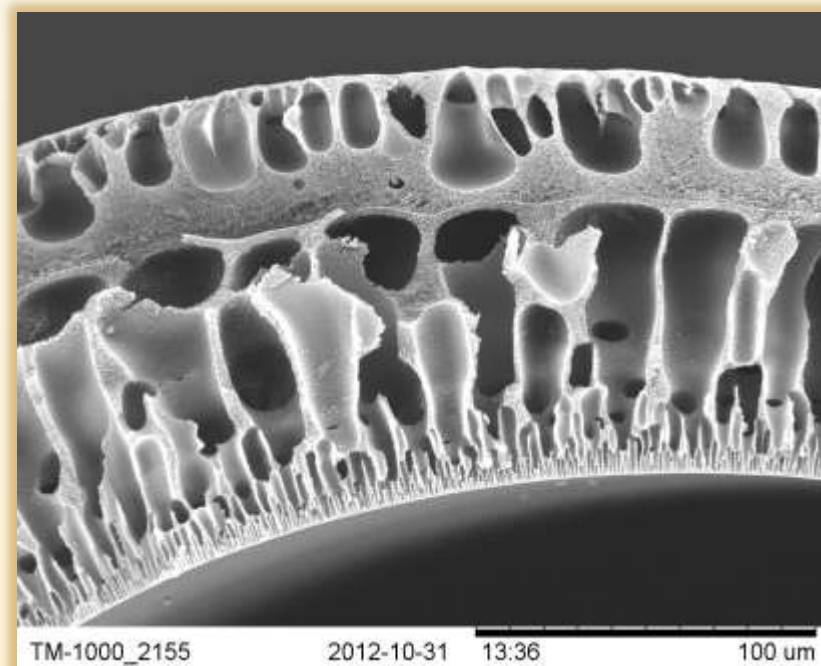
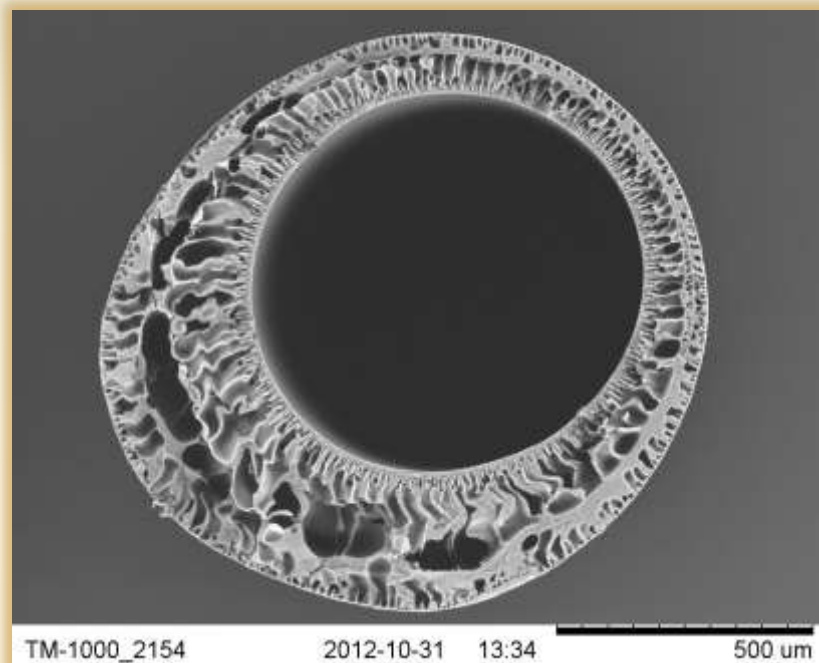


MEMBRANY KAPILARNE

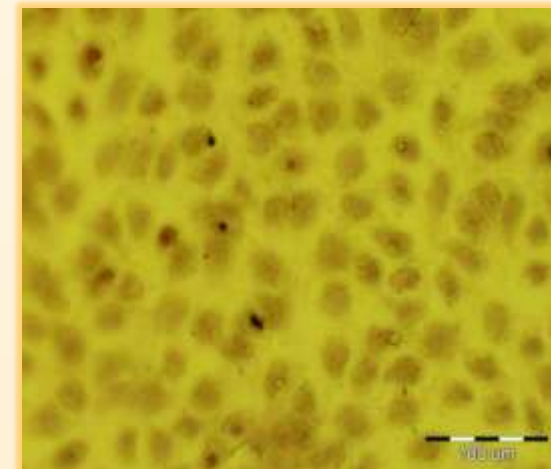
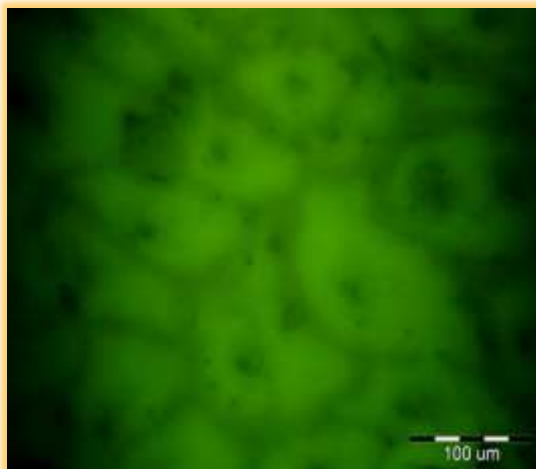
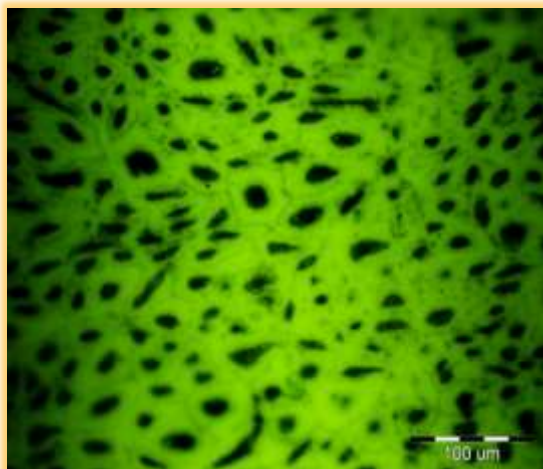
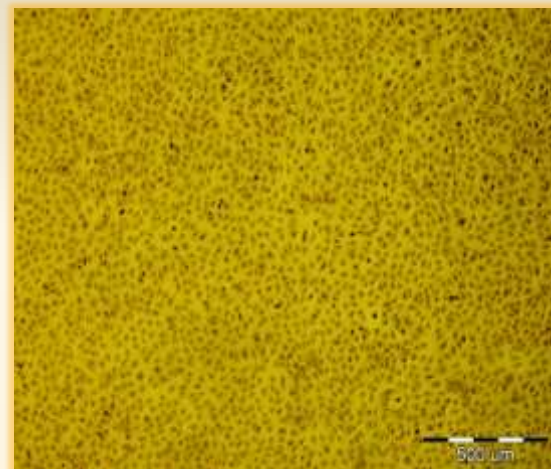
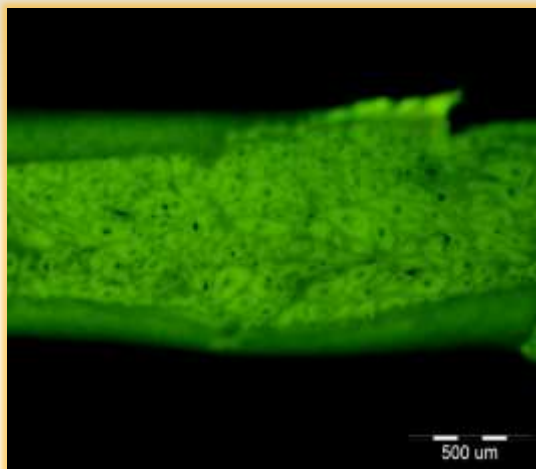
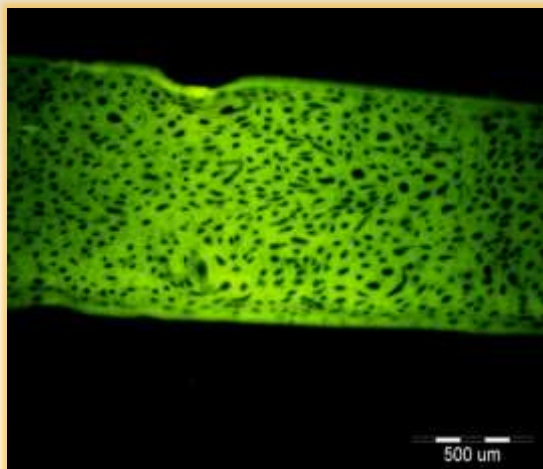
- **Punkty odcięcia w zakresie od 10 - 100 kD,**
- **Wewnętrzne powierzchnie gładkie lub fałdowane,**
- **Możliwość modyfikacji,**
- **Kapilary dwuwarstwowe.**







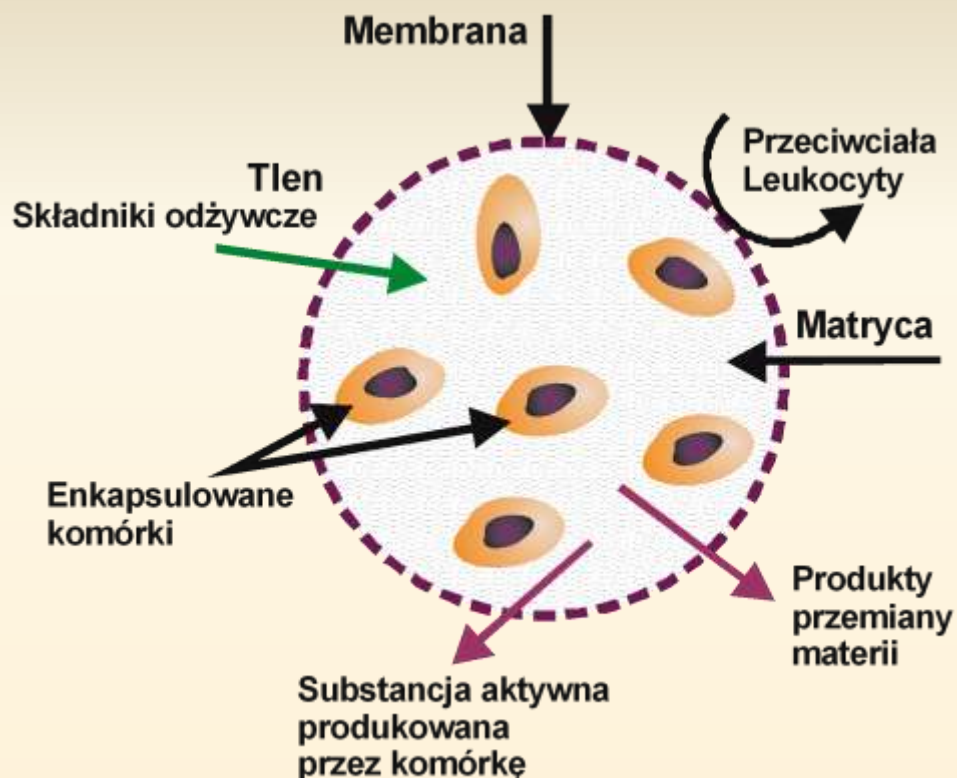
**Komórki śródbłónka (HUVEC) osadzone i hodowane w przepływie
pożywki na powierzchni wewnętrznej kapilarnej membrany PES
po 96 godzinach hodowli. Wybarwienie: hematoksylina-eozyna**



MIKROKAPSUŁKI

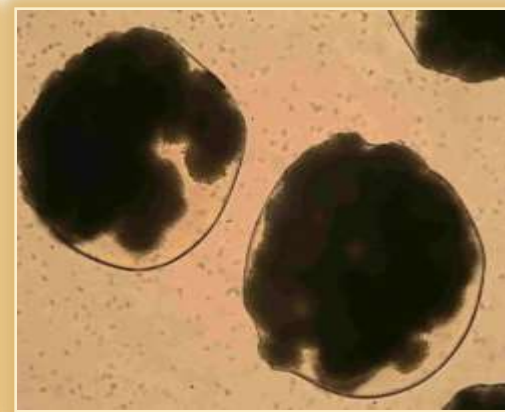
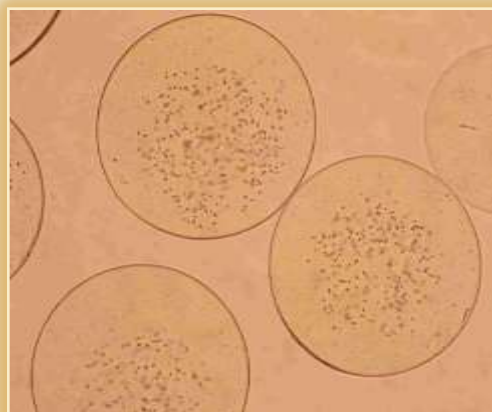
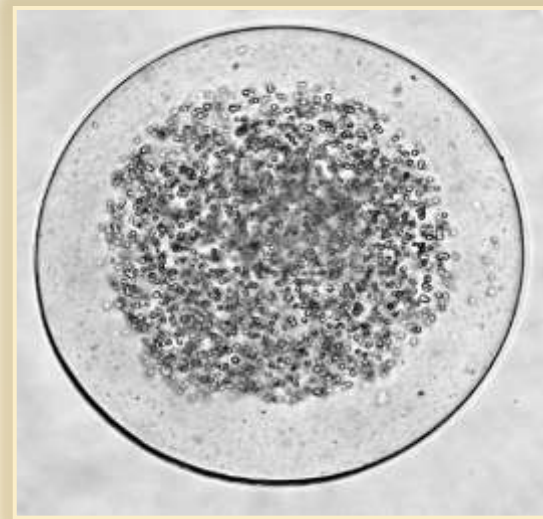
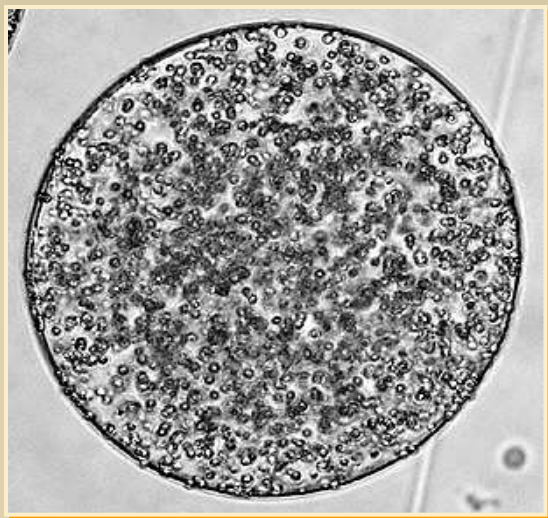
- **Punkty odcięcia w zakresie od 10 - 100 kD,**
- **Mikrokapsułki z polimerów syntetycznych,**
- **Możliwość modyfikacji,**
- **Nanopołączanie polielektrolitami.**

IMMUNOIZOLACJA



- **matryca** - budulec membrany, zapewnienie najkorzystniejszych warunków do życia dla enkapsulowanych komórek.
- **membrana półprzepuszczalna** – odseparowanie komórek od układu immunologicznego pacjenta.

Jednoetapowe wytwarzanie mikrokapsulek

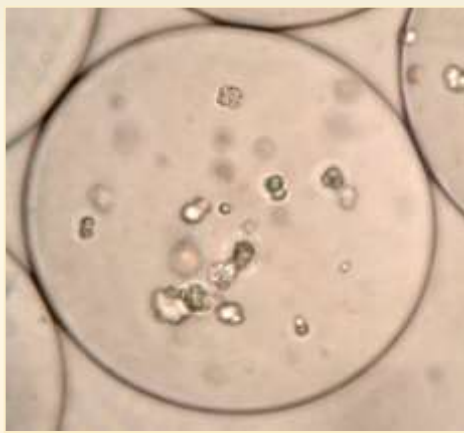


Enkapsulacja komórek

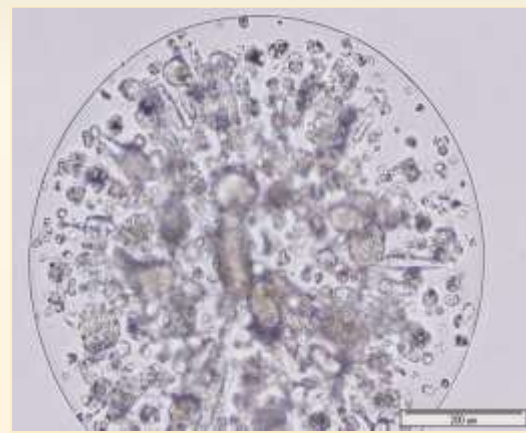
Przytarczycy ludzkie



Mikroenkapsulowane komórki C3A



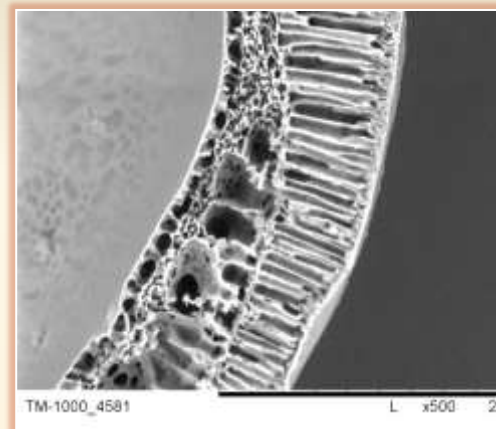
Przed hodowlą



**Po 2 tygodniach hodowli
w DMEM medium**

we wszystkich przypadkach przeżywalność komórek wynosiła **powyżej 90%**, a po 14 dniach obserwowano **wzmożoną produkcję albuminy**, świadczącą o namnażaniu się hepatocytów.

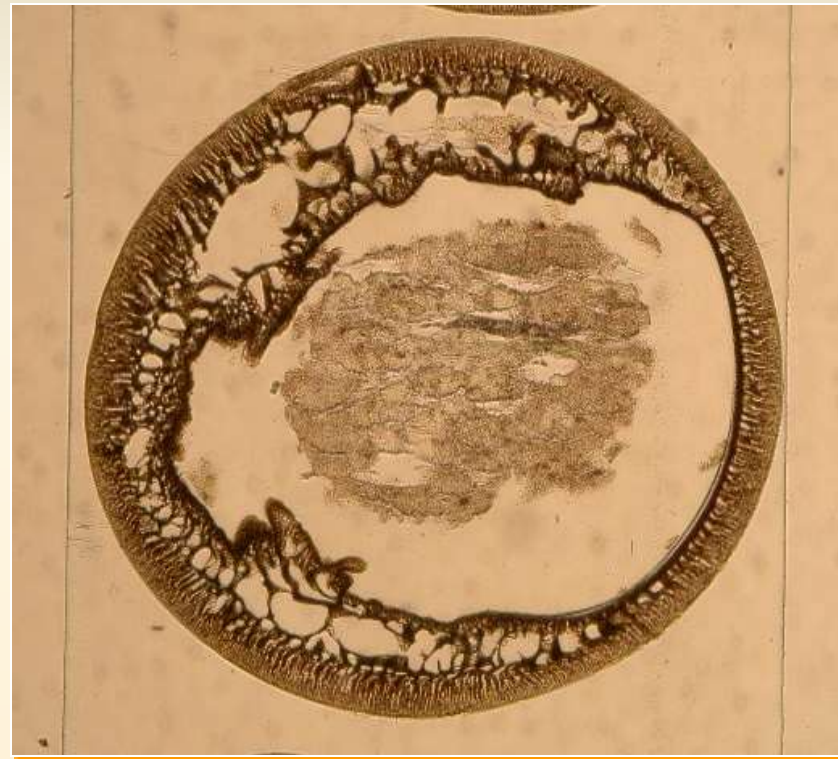
Mikrokapsułki alginianowo - polieterosulfonowe



Enkapsulacja komórek drożdży



Przed hodowlą



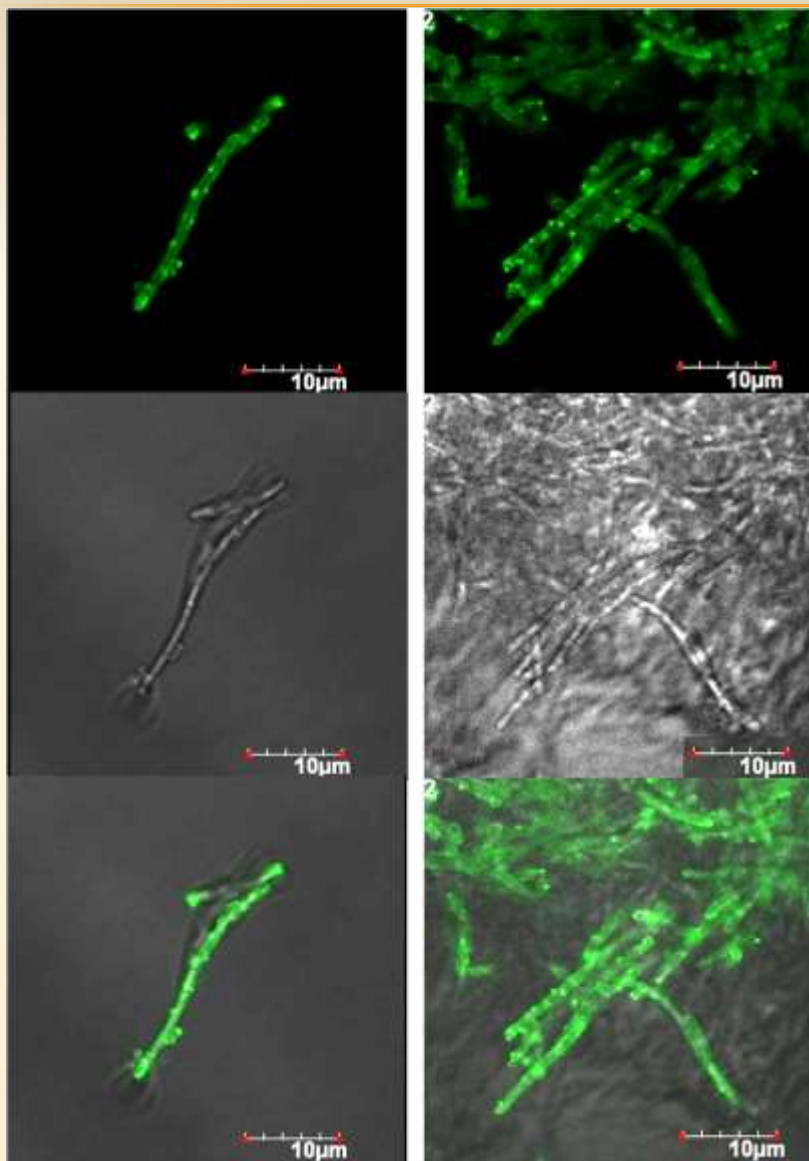
Po 24 h hodowli

NANO-CIENKIE POLIELEKTROLITOWE POWŁOKI WIELOWARSTWOWE

Przewidywane do układów do regulacji procesów biologicznych – wspomagania utraconych funkcji organizmu, działania przeciwnowotworowego,

**Pozwalają na minimalizację objętości wszczepu,
Mogą zapewnić immunoizolację.**

OBRAZ NANOPOWŁÓKI CELOWANEJ

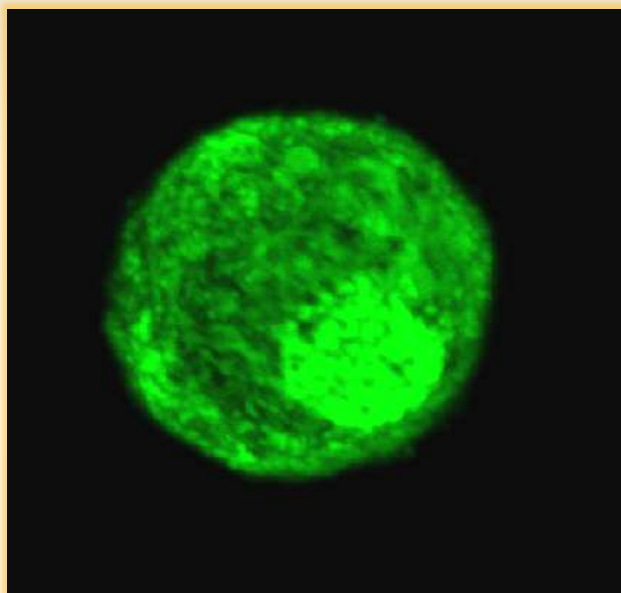


Widok w mikroskopie konfokalnym bakterii *Bacillus subtilis* szczepu BR1-C pokrytych nano-cienką membraną z inkorporowaną transferyną z połączonym przeciwciałem skierowanym przeciwko transferynie znakowanym fluoresceiną FITC (co pozwala na obserwację powłoki).

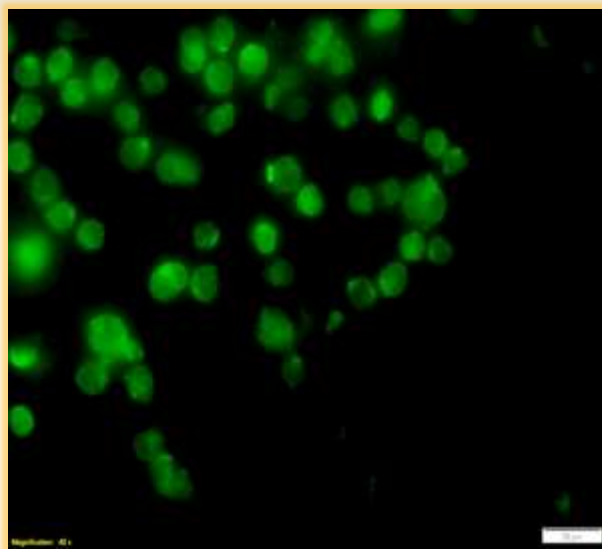
Układ nanoenkapsulowanych w powłoce celowanej bakterii produkujących cytolizynę może służyć do celowanej terapii przeciwnowotworowej

Granicka L.H.et al.;
J. Biomedical Materials Res. A, 2013

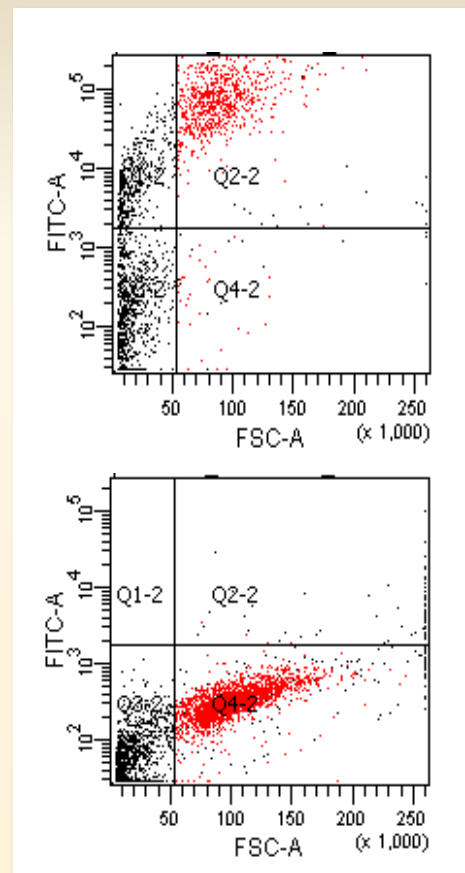
WIDOK NANOPOWŁOKI NA KOMÓRKACH



Obraz w mikroskopie konfokalnym
nanoenkapsulowanej komórki



Obraz z mikroskopu świetlnego komórek Jurkat
nanoopłaszczonych polielektrolitowymi
wielowarstwami (inkorporowany fluorochrom
emituje zielone światło)

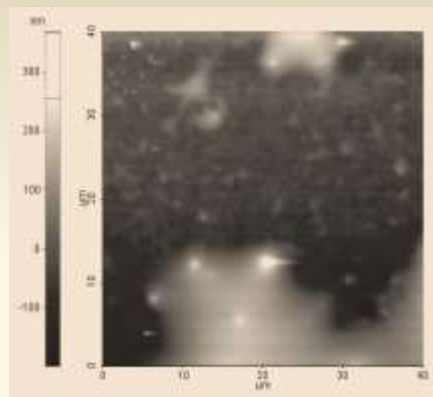


Obraz cytometryczny badania fluorescencji
komórek Jurkat opłaszczonych powłoką
PLL/PEI+FUOL/PLL-FITC

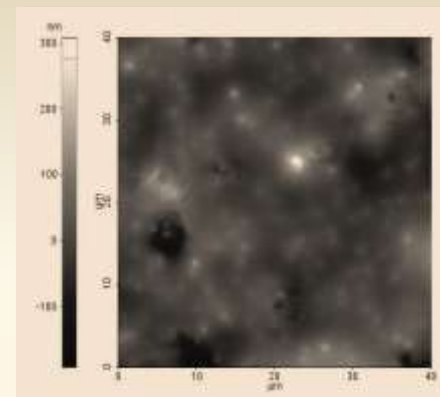
ANALIZA AFM



A

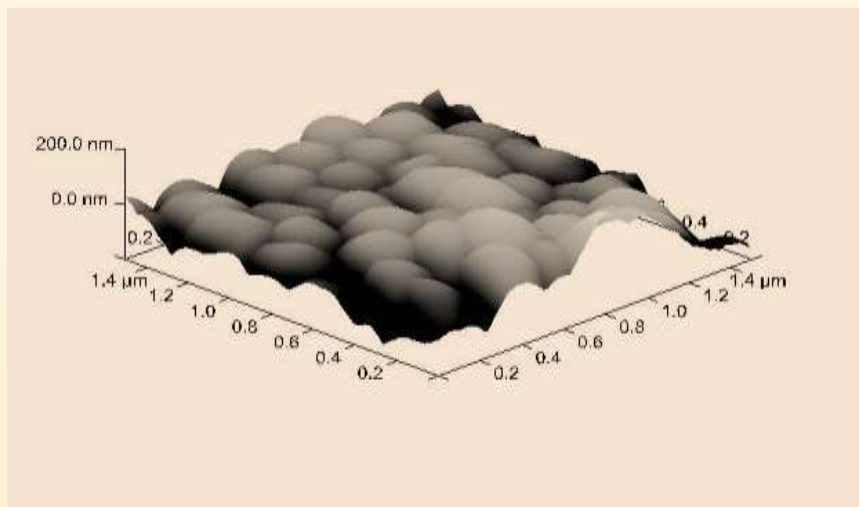


B

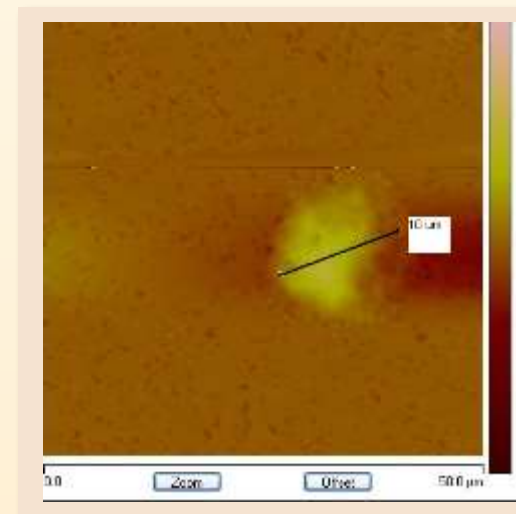


C

Obraz AFM przedstawiający: (A) mika pokryta złotem; (B) warstwa polielektrolitu na micy; (C) biwarstwa polielektrolitowa z inkorporowanym fulerenołem na micy.



Analiza profili obrazów warstw w mikroskopie AFM pozwala określić grubość warstwy



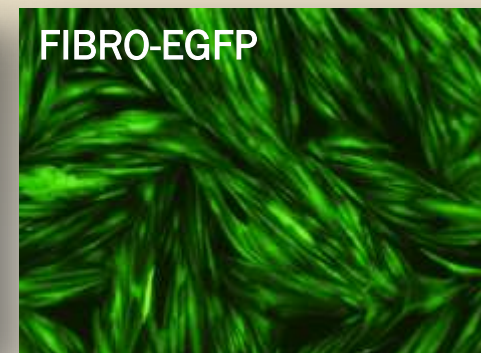
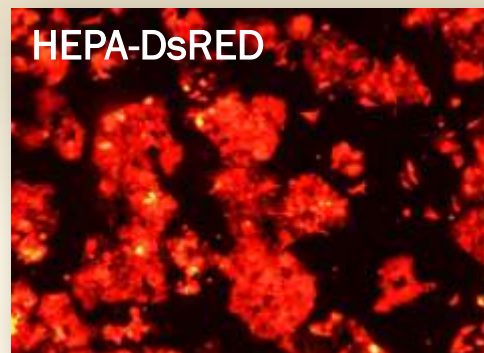
Obraz AFM nanoenkapsulowanej komórki

Modyfikacja genetyczna komórek

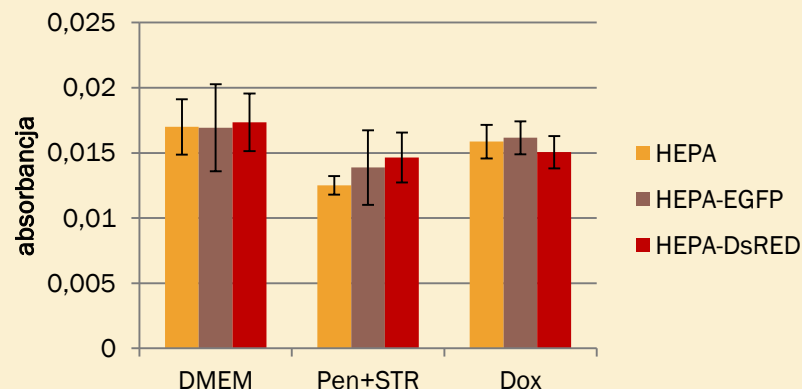
Modyfikacja genetyczna – wpływ na metabolizm komórek wątrobiaka C3A (HEPA) i fibroblastów skóry (FIBRO)

Prowadzone są prace nad:

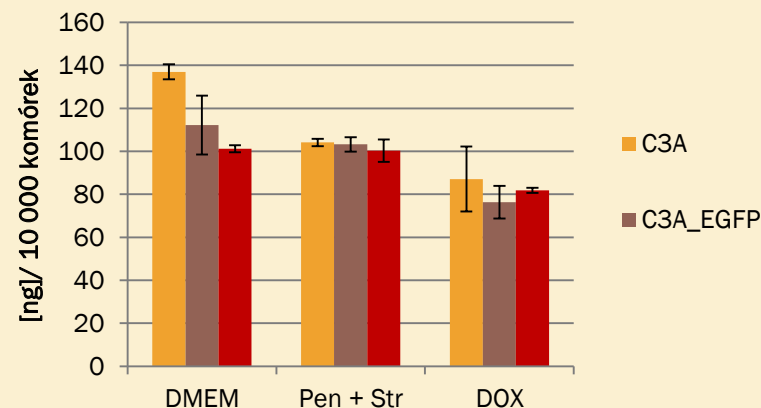
1. trwałymi modyfikacjami genetycznymi komórek pochodzenia wątrobowego, z użyciem wektorów lentiwirusowych
2. opracowaniem metody analizy populacji komórek izolowanych z fragmentów ludzkiej wątroby za pomocą cytometrii przepływowej



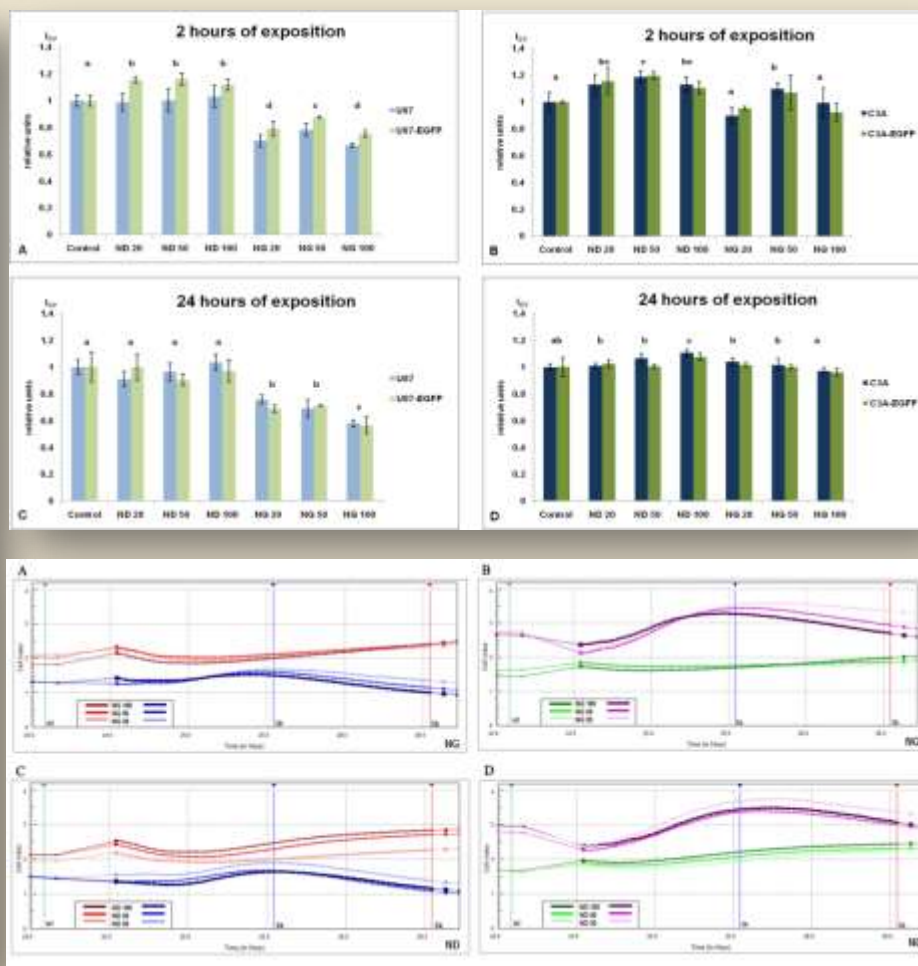
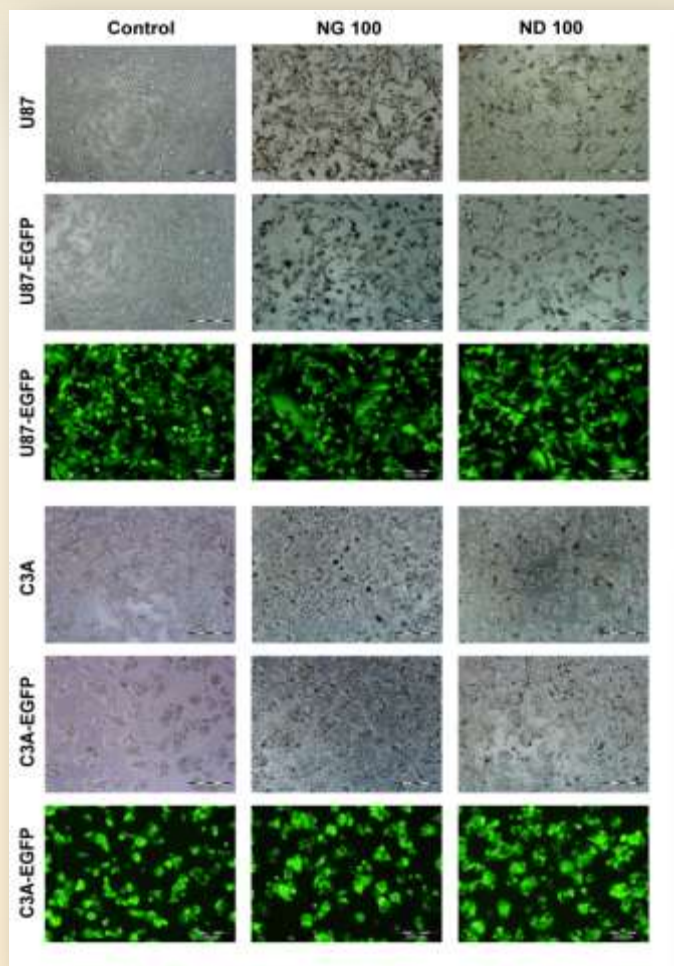
Aktywność metaboliczna komórek C3A w przeliczeniu na 10 000 komórek (dzień 14; test MTT)



Synteza albuminy w komórkach C3A w zależności od rodzaju medium hodowlanego (dzień 10; test ELISA)

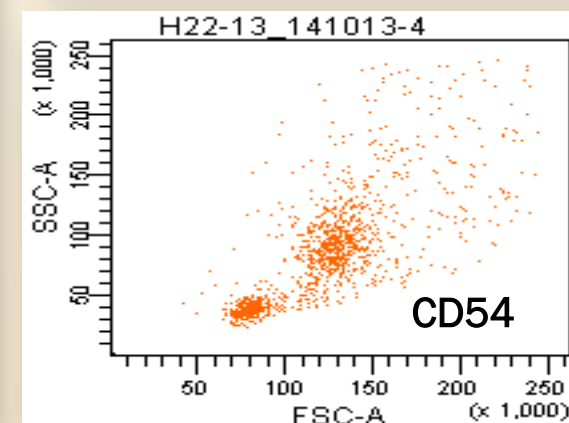
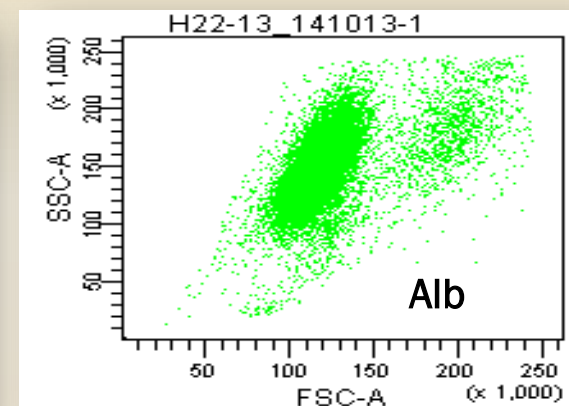
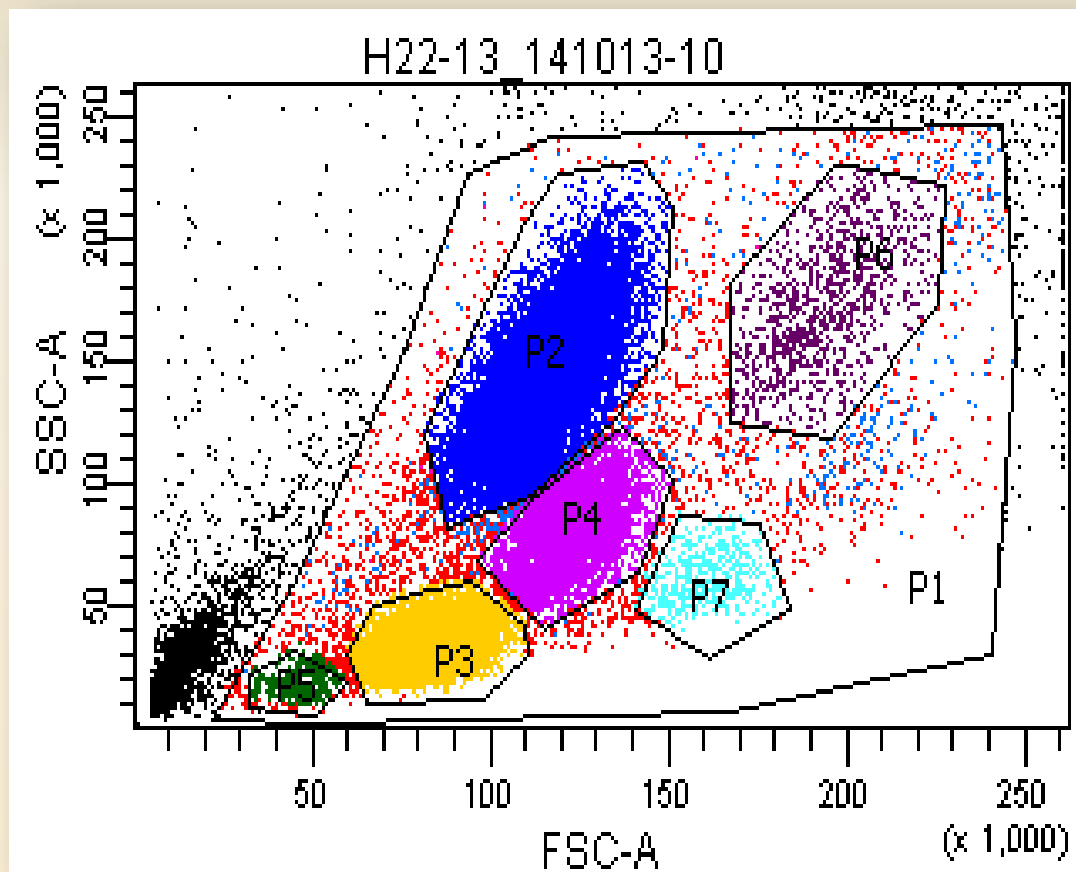


Analiza cytotoksyczności nanocząstek węglowych z wykorzystaniem trwale modyfikowanych linii komórek nowotworowych (C3A i U87)



Analiza cytometryczna populacji komórek w izolacji ludzkiej wątroby

populacje P2-P7



Własna metoda izolacji komórek z fragmentów po resekcji ludzkiej wątroby (pozyskiwanych we współpracy z WUM) i poddaje analizie cytometrycznej (FACS) otrzymane izolaty.

***DZIĘKUJĘ
ZA UWAGĘ***

LITERATURA

- Kinasiewicz A, Dudziński K, Chwojnowski A, Weryński A, Kawiak J. - Three-dimensional culture of hepatocytes on spongy polyethersulfone membrane developed for cell transplantation. *Transplant. Proc.* 39(9)(2007) 2914-6
- Kiansiewicz A., Smietanka A., Dudzinski K., Chwojnowski A., Gajkowska, Werynski A. - Spongly polyethersulfone membrane for hepatocyte cultivation. *Studies on hepatoma C3A cells –Artificial Organs* 32/9(2008)747-752
- Łukowska E., D Pijanowska, A. Chwojnowski – A New polymeric support for enzyme immobilization for Bioreactors - *Polish J. Chem.* 92(2008)1265-1272
- Płończak M., Czubak J., Hoser G., Chwojnowski A., Kawiak J., Dudziński K., Czumińska K - Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes on polysulphonic membrane: experimental studies in rabbits – *Biocyb. and Biomed. Eng.* 28(2008)87-93
- Chwojnowski A., C. Wojciechowski, K. Dudziński, E. Łukowska, L. Granicka - New type of hollow fiber membrane for cell and microorganisms cultivation and encapsulation – *Desalination* 240(2009)9-13
- Kupikowska B., D. Lewińska, K. Dudziński, J. Jankowska-Sliwińska, M. Grzeczkwicz, C. Wojciechowski, A. Chwojnowski - The influence of changes in the composition of the membrane-forming solution on the structure of alginate-polyethersulfone *microcapsules* - *Biocyb. and Biomed. Eng.* – 29/3(2009)61-69
- Chwojnowski A., C. Wojciechowski, K. Dudziński, E. Łukowska - Polysulphone and polyethersulphone hollow fiber membranes with developed inner surface as material for bio-medical applications - *Biocyb. and Biomed. Eng.* – 29/3(2009)47-59
- Dudziński K., Chwojnowski A., Gutowska M., Płończak M., Czubak J., Łukowska E., Wojciechowski C. – Three dimensional polyethersulphone scaffold for chondrocytes cultivation – the future supportive material for articular cartilage regeneration; *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 30(3)(2010) 65 – 76
- D. Lewińska, A. Chwojnowski, C. Wojciechowski, B. Kupikowska-Stobba, M. Grzeczkwicz, A. Weryński. - “Electrostatic droplet generator with 3-nozzle head for microencapsulation of living cells in hydrogel covered by synthetic polymer membranes - *Sep. Sci. Techn.* 47(2012)463-469
- M. Płończak, J. Czubak, A. Chwojnowski, B. Kupikowska-Stobba –Culture of human autologous chondrocytes on polysulfonic membranes – preliminary Studies. - *Biocyb. and Biomed. Eng.* – 32/3(2012)63-68
- D. Lewińska, S. Rosiński, A. Weryński. „Influence of process conditions during impulsed electrostatic droplet formation on size distribution of hydrogel beads”, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, vol. 32(1):41-53, 2004
- D. Lewińska, J. Bukowski, M. Kożuchowski A. Kinasiewicz, A. Weryński, “Electrostatic microencapsulation of living cells”, *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, vol. 28(2):69-84, 2008
- U. Prusse, L. Bilancetti, M. Bucko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tossi, A. Vikartovska , K-D. Vorlop, “Comparison of different technologies for alginate beads production”, *Chem. Papers*, vol. 62(4):364-374, 2008
- S. Rosiński, D. Lewińska, M. Migaj, B. Woźniewicz, A. Weryński, “Electrostatic microencapsulation of parathyroid cells as a tool for the investigation of cells activity after transplantation”, *Landbauforschung Volkenrode, Special Issue “Practical Aspects of Encapsulation Technologies”*, 241:47-50, 2002
- Kinasiewicz A. Gautier, D. Lewińska, J. Bukowski, C. Legallais, A. Weryński, “Culture of C3A cells in alginate beads for fluidized bed bioartificial liver”, *Transplantation Proceedings*, vol. 39(9):2911-13, 2007

- D. Lewińska, S. Rosiński, D. Hunkeler, D. Poncelet, A. Weryński "Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules", J. Membrane Science, vol. 209(2):533-540, 2002
- S. Rosiński, G. Grigorescu, D. Lewińska, L.G. Ritzén, H. Viernstein, E. Teunou, D. Poncelet, Z. Zhang, X. Fan, D. Serp, I. Marison, D. Hunkeler "Characterization of microcapsules: recommended methods based on round-robin testing", J. Microencapsulation, vol. 19(5):641-659, 2002
- S. Rosiński, D. Lewińska, M. Wójcik, G. Orive, J.L. Pedraz, A. Weryński, "Mass transfer characteristics of poly-lysine, poly-ornithine and poly-methylene-co-guanidine membrane coated alginate microcapsules", J. Membrane Science, vol. 254:249-257, 2005
- Kinasiewicz, A. Gautier, D. Lewińska, A. Śmietanka, C. Legallaise, A. Weryński, "Three-dimensional growth of human hepatoma C3A cells within alginate beads for fluidized bioartificial liver", Int. J. Artif. Organs, vol. 31(4):340-347, 2008
- Kupikowska-Stobba, D. Lewińska, M. Grzechkiewicz, "Chemical method for retrieval of cells encapsulated in alginate-polyethersulfone microcapsules." Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, vol. 42(3):151-160, 2014 doi: 10.3109/21691401.2013.800083
- Pluta K & Kacprzak MM (2009) Use of HIV as a gene transfer vector. Acta Biochim Pol 56(4):531-595.
- Samluk A, Zakrzewska KE, Pluta KD (2013) Generation of fluorescently labeled cell lines, C3A hepatoma cells, and human adult skin fibroblasts to study coculture models. Artif Organs 37(7):E123-130.
- Zakrzewska KE, Samluk A, Pluta KD, Pijanowska DG (2014) Evaluation of the effects of antibiotics on cytotoxicity of EGFP and DsRed2 fluorescent proteins used for stable cell labeling. Acta Biochim Pol (*zaakceptowane do druku*)
- L. H. Granicka, M. Antosiak-Iwańska, E. Godlewska, M. Strawski, M. Szklarczyk, B. Maranowski, C. Kowalewski, J. Wiśniewski: Conformal nano-thin modified polyelectrolyte coatings for encapsulation of cells. Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology, 39(5):274-80, 2011.
- R. Stachowiak, L. H. Granicka, J. Wiśniewski, M. Łyżniak, J. Kawiak and J. Bielecki: Cytotoxicity of listeriolysin o produced by encapsulated in membrane *Bacillus subtilis* on leukemia cells. J. Microbiol. Biotechnol., 21(11):1193-1198; 2011.
- M. Borkowska, E. Godlewska, M. Antosiak-Iwańska, J. Kinasiewicz, M. Strawski, M. Szklarczyk and L. H. Granicka: Suitability of polyelectrolyte shells modified with fullerene derivate for immunoisolation of cells. Experimental study. J Biomed Nanotechnol. 8(6):1-6; 2012.
- M. Borkowska, M. Łyżniak, A. Grzechkiewicz, R. Stachowiak, Kawiak, J. Bielecki, B. K. Budziszewska and L.H. Granicka: The Cytotoxic effect of polyelectrolyte shells coated bacterial cells on human leukemia cells. Nanomedicine and Nanotechnology, 3(8), nr 1000152; 2012.
- L. H. Granicka, M. Borkowska, A. Grzechkiewicz, R. Stachowiak, M. Szklarczyk, J. Bielecki, M. Strawski: The targeting nanothin polyelectrolyte shells in system with immobilized bacterial cells for antitumor factor production. Journal of Biomedical Materials Research: Part A. 102 (8): 2662-2668; 2014.
- M. Borkowska, A. Grzechkiewicz, M. Strawski, J. Kawiak, M. Szklarczyk, L. H. Granicka: Performance and detection of nano-thin polyelectrolyte shell for cell coating. Journal of Nanoparticle Research, (Volume 16, Issue 7:2488) DOI: 10.1007/s11051-014-2488-x ; 2014.