

Bioinżynieria komórek i tkanek w służbie medycyny

Martyna Kandefer-Szerszeń¹

Roman Paduch¹

Jadwiga Daniluk²

¹ Zakład Wirusologii i Immunologii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

² Katedra i Klinika Gastroenterologii Akademia Medyczna
Lublin

1. Wstęp

Zapotrzebowanie na tkanki i organy ludzkie do przeszczepów, w ostatnich dziesięciu latach, zainspirowało rozwój nowej dziedziny biotechnologii, inżynierii tkankowej. Przedmiotem jej jest tworzenie funkcjonalnych tkanek z żywych, eksplantowanych z organizmu zwierząt i człowieka komórek, hodowanych *in vitro* na różnego rodzaju nośnikach. Komórki, specyficzne dla określonej tkanki, namnaża się *in vitro*, przenosi na porowate, biokompatybilne i biodegradowalne nośniki. Po pewnym czasie hodowli, powstaje tkanka, którą można przeszczepić dawcy komórek. Nośnik ulega biodegradacji, a dojrzewająca po przeszczepieniu do organizmu nowa tkanka, przypominająca prawidłową pod względem struktury i funkcji, zastępuje uszkodzoną chorobowo lub traumatycznie.

2. Nośniki do hodowli komórek (biomateriały)

Wiele uwagi poświęcono opracowaniu nośników do hodowli komórek zwierzęcych i ludzkich, stanowiących substytut macierzy pozakomórkowej, nie tylko pod względem struktury przestrzennej, ale także zdolności do regulacji fenotypu komórek. W tkankach miękkich, macierz pozakomórkowa (ECM — *extracellular matrix*) składa się z kolagenów, proteoglikanów i glikozaminoglikanów. Włókna kolagenowe zapewniają elastyczność tkanki, podczas gdy uwodnione żele proteoglikanów wypełniają przestrzeń pozakomórkową i warunkują dyfuzję substancji odżywczych, metabolitów i czynników wzrostu. Częsteczki takie jak, np. fibronektyna uczestniczą w adhezji komórkowej, a inne

składniki ECM są nośnikiem dla czynników wzrostu, dostarczając je rosnącym komórkom (1).

Nośniki mogą spełniać dwie role: po wprowadzeniu do organizmu działać chemotaktycznie na komórki zasiedlające nośnik i tworzące od nowa określoną tkankę, lub *in vitro* zapewniać komórkom warunki wzrostu dogodne pod względem przestrzennym (odpowiednia porowatość nośnika) i biochemicznym. Nośniki powinny także stymulować różnicowanie komórek i tworzenie funkcjonalnej tkanki. Prawidłowa funkcja komórek zależy od receptorów komórkowych, pozwalających komórce na interakcję z macierzą pozakomórkową i pobliskimi komórkami. Do materiału nośnika można wbudować peptydy adhezyjne lub czynniki wzrostu, np. krótką sekwencję aminokwasową Arg-Gly-Asp (RGD), która rozpoznawana jest przez receptory komórkowe dla integryn (2,3).

Po transplantacji otrzymanej *in vitro* nowej tkanki, nośnik, o określonej porowatości i z wbudowanymi czynnikami angiogennymi, może stymulować jej unaczynienie przez wnikające z organizmu biocyty naczyń krwionośnych. Całkowita integracja przeszczepu z organizmem wymaga również unerwienia przez regenerujące nerwy obwodowe biocyty, których wzrost można stymulować wbudowanymi w nośnik czynnikami wzrostu. Omówione etapy otrzymywania i integracji implantu z organizmem są obecnie trudne do osiągnięcia, choć w ostatnich latach zanotowano znaczny postęp w technikach inżynierii tkankowej (4).

Materiały do wytwarzania biodegradowalnych nośników otrzymano ze źródeł naturalnych, np. kolagen lub w wyniku syntezy, np. poliestry α -hydrokyskwasów: poliglikolowego (PGA), polimlekowego (PLA), czy kopolimery obu kwasów (PLGA). Należy wspomnieć, że polimery te są obecnie stosowane w medycynie jako rozpuszczalne nici chirurgiczne. W organizmie ulegają one rozszczepieniu na kwas mlekowy i/lub glikolowy i całkowicie są metabolizowane. Są to polimery termoplastyczne, rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych i łatwe do przestrzennego formowania. W inżynierii tkankowej używane są najczęściej w postaci błon perforowanych i włókien formowanych w struktury podobne do filcu lub tkaniny. Nadają się do hodowli różnych komórek zwierzęcych i ludzkich: chondrocytów, osteoblastów, hepatocytów, mięśni gładkich, komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, nabłonka jelitowego, fibroblastów skóry i nabłonka nerkowego. Polimery, np. w postaci rurki, zasiedlone kolejno fibroblastami, komórkami mięśni gładkich i śródbłonna służą do odtworzenia fragmentów naczyń krwionośnych (2-4).

Do biopolimerów, zaliczane są także polimery aminokwasów, np. poliwęglany lub poliakrylany tyrozyny oraz białka, podobne do kolagenu, jedwabiu lub elastyny, produkowane przez rekombinanty bakteryjne. Są one niestety immunogenne, co ogranicza ich zastosowanie. Do opłaszczania komórek, np. wysp trzustkowych, używane są alginiany ze względu na tworzenie w obecności Ca^{2+} hydrożeli i względną biokompatybilność, lecz nie ulegają one biodegradacji w organizmie (3).

Metody hodowli i skład nośnika zależą od rodzaju tkanki. Otrzymanie odpornej mechanicznie chrząstki stawowej wymaga „treningu” tworzącej się

tkanki, a wytworzenie kości, wbudowania do nośnika hydroksyapatytu indukującego wytwarzanie przez osteoblasty składników mineralnych. O ekspresji niektórych genów decydują oddziaływania międzykomórkowe, np. agregacja hepatocytów zwiększa w nich syntezę albuminy (4).

3. Bioinżynieria tkanek i narządów

Tworzenie funkcjonalnej tkanki *in vitro* składa się z 3 etapów:

- 1) namnożenie komórek pobranych z organizmu,
- 2) indukcja różnicowania,
- 3) utrzymanie fenotypu.

Ponad pięćdziesiąt lat badań nad hodowlami komórkowymi zaowocowało opracowaniem wielu nośników, płaskich i przestrzennych (szkło, plastik, nośniki ceramiczne, dekstranowe) oraz metod hodowli (stacjonarne, rotacyjne i bioreaktorowe) i płynów hodowlanych z dodatkami wzbogacającymi podłoża (np. surowica płodowa), służących do uzyskania szybkiego przyrostu biomasy komórkowej. Komórki hodowane w warunkach stymulujących ich wzrost zmieniają swój fenotyp, np. chondrocyty przybierają wygląd komórek mezenchymatycznych i nie wytwarzają ECM, a hepatocyty tracą zdolności wydzielnicze i detoksyfikacyjne. Komórki takie przeszczepione do organizmu mogą być rozpoznawane jako obce i wywoływać reakcje immunologiczne. Dlatego konieczne jest stworzenie warunków do prawidłowego różnicowania komórek. Wspomniano, że różnicowanie komórek zależy od właściwości fizykochemicznych nośnika, jego porowatości, stopnia w jakim naśladuje ECM (nośnik można opłaszczyc lub wbudować do niego elementy ECM), a także od wzajemnych oddziaływań komórek, np. tworzenia skupisk. Trzeci etap, czyli utrzymanie fenotypu różnicujących się komórek, wymaga ciągłej eliminacji toksycznych metabolitów, czynników parakrynych i dostarczania substancji odżywczych oraz czynników wzrostu. Stwierdzono, że stężenie elektrolitów oraz osmolarność płynów hodowlanych wpływa na różnicowanie komórek. Płyny hodowlane do namnożenia komórek (np. MEM — *minimal essential medium*) zawierają zwykle 112 mM Na⁺/l, podczas gdy w surowicy ludzkiej stężenie Na⁺ wynosi 137 mM/l. Modyfikacja molarności i osmolarności w kierunku wartości stwierdzonych w surowicy stwarza warunki do zahamowania wzrostu i rozpoczęcia różnicowania, np. komórek nabłonka kanalików nerkowych. W celu indukcji różnicowania komórek, surowicę płodową zastępuje się surowicą osobników dorosłych lub podłożem bez surowicy, lecz z dodatkiem hormonów lub/i czynników indukujących różnicowanie (4,5).

3.1. Chrzątka

Wyhodowana *in vitro* chrzątka może być stosowana:

- 1) w chirurgii plastycznej do uzupełnienia ubytków chrzastki o określonym kształcie, np. w uchu zewnętrznym, nosie,
- 2) do uzupełnienia traumatycznych ubytków w stawach,

3) genetycznie zmodyfikowana chrząstka może zastąpić zmienioną chorobowo chrząstkę, np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Hodowlę chondrocytów opisano pod koniec lat sześćdziesiątych, lecz wkrótce okazało się, że w hodowlach płaskich wytwarzają one bardzo małe ilości glikozoaminoglikanów i charakterystycznego dla chrząstki szklistej i sprężystej (w tym chrząstki stawowej) kolagenu typu II, a wytwarzają kolagen typu I. Natomiast hodowane na nośnikach przestrzennych syntetyzują ECM i utrzymują swój fenotyp. W zjawisku tym uczestniczy wiele białek, np. białka morfogenetyczne chrząstki (CDMP — *cartilage-derived morphogenic proteins*), a także cytokiny — TGF- β (*tumor growth factor β*) (6,7).

Pierwsze doświadczenia z przeszczepianiem chondrocytów wykonał Green, który podskórnie wszczepiał królikom zasiedlone chondrocytami odwapnione fragmenty kości i obserwował tworzenie chrząstki w takim implancie (8). Obecnie, do hodowli chondrocytów używane są nośniki wykonane ze spletanych nici (struktura filcu) kwasu poliglikolowego (PGA). Nośnik ten pomimo małej wytrzymałości mechanicznej, w porównaniu z innymi polimerami, np. PLA czy PLGA, jest szybko degradowany po zasiedleniu chondrocytami. Kształt nośnika, jeszcze przed zasiedleniem komórkami, musi odpowiadać określonym potrzebom biorcy, gdyż utworzona chrząstka zachowuje swój kształt wyjściowy, pomimo całkowitej degradacji nośnika po implantacji do organizmu.

Do wykonania autoprzeszczepu, od biorcy pobiera się niewielki fragment chrząstki, zawierający około 10^5 komórek, namnaża się je w płaskiej hodowli stacjonarnej, w tradycyjnych płynach hodowlanych, np. DMEM (*Dulbecco modified MEM*), wzbogaconych autologiczną surowicą. W celu przyspieszenia tego etapu, chondrocyty można hodować w bioreaktorach, np. typu *air-lift*, czy fluidalnych, z użyciem kulistych mikronośników. Po uzyskaniu dostatecznej ilości komórek (do wytworzenia 1 cm^3 chrząstki potrzeba około 20 mln komórek) zasiedla się nimi nośnik przestrzenny. Etap ten wymaga specjalnych warunków hodowli, mających na celu równomierne i gęste zasiedlenie nośnika komórkami (hodowle z mieszaniem), gdyż utrzymanie fenotypu, obok oddziaływań z nośnikiem, wymaga interakcji międzykomórkowych. Nośniki zasiedlone komórkami umieszcza się w naczyniach z perfuzją świeżego płynu, który dostarcza substancji odżywczych i tlenu, a usuwa produkty przemiany materii komórek i kwaśne produkty biodegradacji nośnika. Szybkość wzrostu chondrocytów, zasiedlanie przez nie wolnych przestrzeni i wytwarzanie ECM, w dużym stopniu zależy od grubości tworzącej się chrząstki. W etapie tym użyteczne są hodowle bioreaktorowe. Na uwagę zasługują bioreaktory mikrograwitacyjne, opracowane dla potrzeb NASA, zbudowane z dwóch cylindrycznych naczyń obracających się przeciwstawnie. Pozwala to na agregację chondrocytów, które bez obecności nośnika wytwarzają ECM, lecz objętość tak otrzymanej chrząstki jest jednak za mała do praktycznego stosowania (9-12).

Wytworzenie chrząstki szklistej, którą można uzupełniać ubytki w stawach, wymaga specjalnych warunków hodowli. Stwierdzono, że chrząstka staje się odporna mechanicznie i bardziej przypomina chrząstkę stawową,

wykazując zwiększoną produkcję kolagenu typu II, jeśli hodowle chondrocytów na nośnikach podda się działaniu sił ściskających. Można to osiągnąć zwiększając ciśnienie gazu nad hodowlą lub ciśnienie płynu hodowlanego (0,013-0,5 MPa) z określoną częstotliwością (0,3 Hz), lub nieprzerwanie przez kilka tygodni (7,13).

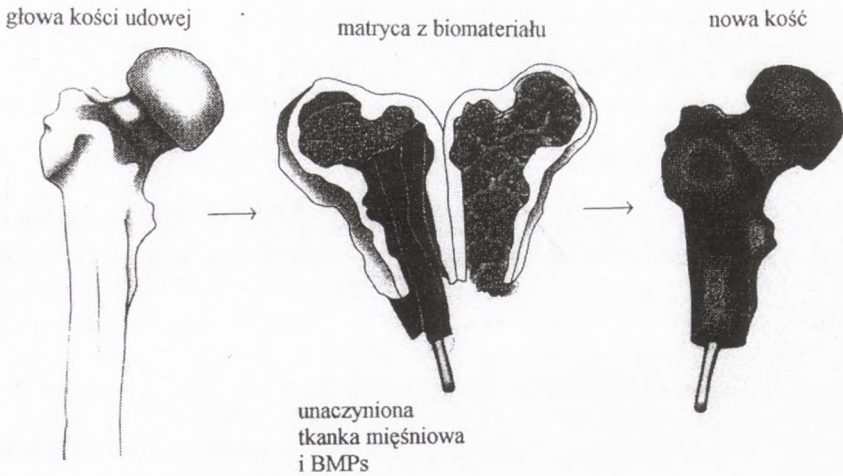
Przy użyciu wyhodowanej *in vitro* chrząstki przeprowadzono wiele udanych operacji plastycznych i uzupełnień zniszczonej chrząstki stawowej. Po transplantacji zwykle nie obserwuje się reakcji immunologicznych, choć opisano tworzenie przeciwciał przeciw kolagenowi typu IX, który w naturalnej chrząstce występuje w bezpośrednim sąsiedztwie chondrocytów, a w biosyntetycznej może być eksponowany na zewnątrz chrząstki (7).

3.2. Kość

W przeciwieństwie do chrząstki, która ma ograniczone zdolności regeneracyjne z powodu proteoglikanów zawartych w macierzy i hamujących migrację chondrocytów, kości posiadają duże zdolności regeneracyjne i gojenie złamań zachodzi w stosunkowo krótkim czasie. W przypadku dużych ubytków kości, których organizm nie jest w stanie odtworzyć, stosuje się allogeniczne przeszczepy kości pobranej ze zwłok i zamrożonej lub liofilizowanej i wysterylizowanej promieniowaniem jonizującym. Taki dewitalizowany przeszczep kostny jest słabo immunogenny i pełni podwójną rolę: jest materiałem podporowym i odgrywa rolę biologicznego stymulatora osteogenezy. Po implantacji do organizmu biorcy następuje jego stopniowa resorpcja i zastępowanie przez własną tkankę biorcy. Wykazano, że w procesie tym uczestniczy wiele substancji zawartych w implancie: kolagen typu I, wiążący z krwi fibronektynę, która z kolei zawiera domeny wiążące inne składniki macierzy, takie jak kolagen, fibrynę i heparynę. Zapoczątkowuje to migrację komórek mezenchymalnych, ich adsorbcję do macierzy i proliferację chondrocytów. Po pojawieniu się naczyń krwionośnych chondrocyty zastępowane są przez osteoblasty wytwarzające osteokalcynę. Następuje przebudowa wewnętrzna tkanki kostnej. Oczyszczono i sklonowano geny kodujące około 15 różnych, należących do kilku rodzin, białek morfogenetycznych kości (BMP), które regulują poszczególne etapy morfogenezy. Pomimo sterylizacji kości, alloprzeszczep stwarza niebezpieczeństwo przeniesienia czynników zakaźnych, np. prionów (6).

Obecne badania inżynierii tkankowej koncentrują się na możliwości odtworzenia *in vitro* fragmentów kości z zastosowaniem różnych nośników: ceramicznych, kolagenowych i syntetycznych. Szczególnie wiele badań wykonano z zastosowaniem PLGA/HA, o gąbczastej strukturze (średnica porów 150-700 μm), z dodatkiem hydroksyapatytu ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$), który także, jak wykazano w badaniach, ma właściwości osteoindukcyjne (14-16).

W doświadczeniach na zwierzętach osteoblasty uzyskuje się przez enzymatyczne trawienie fragmentu kości pobranej z organizmu (np. czaszki), natomiast w autologicznych przeszczepach u człowieka źródłem osteoblastów może być szpik kostny zawierający komórki macierzyste podścieliska, różni-



Rys. 1. Nowa metoda odtworzenia kości o określonym kształcie. Kość udowa służy jako matryca do sporządzenia formy z biomateriału. W matrycy umieszcza się unaczyniony fragment mięśnia, zawierający komórki macierzyste osteoblastów. W odpowiednich warunkach *in vitro*, w obecności morfogenetycznych białek kości (BMPs) powstaje nowa kość o określonym kształcie (6).

cujące się w zależności od warunków otoczenia do osteoblastów, adipocytów, chondrocytów lub ńioblastów. Osteoblasty namnaża się początkowo w płaskich hodowlach stacjonarnych, w zwykłych płynach hodowlanych (np. DMEM), wzbogaconych surowicą płodową, fosforanem glicerolu, który jest źródłem jonów wapniowych do syntezy hydroksyapatytu, kwasem L-askorbinowym i deksametazonem. Po zasiedleniu osteoblastami gąbczastego nośnika, o kształcie wynikającym z konkretnych potrzeb, inkubuje się go przez około 50 dni w naczyniach z ciągłą wymianą pożywki. Stwierdzono, że osteoblasty rosną na nim wielowarstwowo i wytwarzają elementy mineralne typowe dla kości. Implantacja takiego fragmentu kości do organizmu wiąże się niestety z problemem szybkiego unaczynienia. Dlatego też rozważa się możliwość zastosowania innych metod hodowli, pozwalających na uzyskanie *in vitro* unaczynionych implantów kości. Proponowany schemat opiera się na wiedzy dotyczącej czynników morfogenetycznych kości i obejmuje: wykonanie matrycy kości z materiału wzbogaconego czynnikami ułatwiającymi adhezję komórek, białkami BMP i innymi czynnikami indukującymi osteogenezę (czynniki wzrostu i interleukiny) (6). Matryca ta powinna umożliwić przepływ płynu odżywczego niezbędnego dla proliferacji komórek macierzystych pochodzących, np. z małego, unaczynionego fragmentu mięśnia (rys. 1). Uzyskano już wyniki wskazujące na to, że w przyszłości metoda ta może znaleźć zastosowanie praktyczne (17).

3.3. Skóra

Leczenie głębokich oparzeń, w początkowym okresie, wymaga szybkiego pokrycia powierzchni ran opatrunkiem biologicznym, zapobiegającym utracie płynów ustrojowych. Rolę tę może spełniać jedno- lub wielowarstwowa hodowla autologicznych lub allogenicznych keratynocytów. Rheinwald i Green (18) w 1975 r. opisali metodę hodowli keratynocytów, która znalazła kliniczne zastosowanie do leczenia ran oparzeniowych i owrzodzeń kończyn dolnych. Stosowanie samych keratynocytów wiąże się z trudnościami technicznymi: wynikającymi z kurczliwości i kruchości warstwy komórek po jej oddzieleniu od dna naczynia hodowlanego. Nawet udoskonalone hodowle keratynocytów, tworzące warstwę składającą się z 10-15 komórek, wykazują liczne wady, w tym brak przyczepiania się transplantantu do łoża rany, związany z pierwotnym brakiem skóry właściwej w przeszczepie.

Podjęto zatem próby wyhodowania *in vitro* pełnego substytutu skóry ludzkiej. Pierwszym etapem w jego otrzymaniu jest hodowla fibroblastów skóry na przestrzennych biomateriałach, np. z benzytowych estrów hialuronianu (HYAFFTM), żeli kolagenowo-glikozoamino-glikanowych lub PLA i PGLA. Dodanie adipocytów do hodowli fibroblastów, jak stwierdzono, wpływa korzystnie na wzrost i uorganizowanie keratynocytów, ekspresję cząstek adhezyjnych i syntezę ECM, w tym kolagenu typu IV. Kultury keratynocytów na cienkich, perforowanych błonach z biodegradowalnych polimerów lub w hodowlach płaskich, nanosi się na powierzchnię żelu z fibroblastami łącznie z błonami lub po enzymatycznym rozproszeniu keratynocytów. Dzięki obecności w błonie porów o określonej gęstości i średnicy, keratynocyty i fibroblasty mogą tworzyć hemidesmosomalne połączenia międzykomórkowe i syntetyzować filamenty kotwiczące, a użyte biomateriały ulegają stopniowej biodegradacji po implantacji w organizmie. Do hodowli keratynocytów dodaje się melanocyty, dzięki którym uzyskuje się prawidłową pigmentację przeszczepionej skóry (19-21).

W USA dostępne są komercyjnie różne ekwiwalenty skóry (LSE — *living skin equivalent*), np. Skin Model 2K1300 (*Advanced Tissue Sciences*, La Jolla CA) czy EpiDermTM (MatTek Corp., Ashland MA) (21). Komórki używane do otrzymywania LSE pochodzą od pacjentów, u których wykonuje się auto-przeszczep biosyntetycznej skóry, lub ze skóry noworodków (przeszczep allogeniczny). Stosowany obecnie w LSE kolagen bydlęcy, w najbliższej przyszłości, zastąpiony będzie kolagenem ludzkim, gdyż w Collagen Corp. USA opracowano metody jego produkcji z rekombinantów drożdżowych i zwierząt transgenicznych. Ostatnio Organogenesis wprowadziła na rynek ApligrafTM, który to substytut skóry składa się z dwóch warstw: ekwiwalentu skóry właściwej z fibroblastami w przestrzennym biomateriale i zróżnicowanej warstwy naskórka. Uzyskano dobre wyniki badań klinicznych z tym LSE. Także EpiDermTM wykazuje typowe dla naskórka uwarstwienie i składa się z warstwy podstawnej, kolczystej, ziarnistej i zrogowacialej (21).

W próbach klinicznych, przeszczepianiu LSE towarzyszą liczne problemy, np. przeszczepy atakowane są przez bakterie i wytwarzane przez nie enzymy.

Dlatego w nowych biomateriałach w materię nośnika wbudowuje się czynniki przeciwbakteryjne i przeciwzapalne uwalniane stopniowo w trakcie biodegradacji nośnika. Przykładem może być ATRIGEL^R, produkt Atrix Laboratories Inc. (22).

LSE wykorzystywane są także jako modele do badań toksykologicznych i metabolicznych. Wykazują jednak znaczne różnice biochemiczne, strukturalne i funkcjonalne w porównaniu z dojrzałą skórą ludzką, np. słabe wykształcenie błony podstawnej, warstwy zrogowaciałej naskórka, większą przepuszczalność dla różnych związków oraz brak gruczołów potowych, tłuszczowych czy mieszków włosowych. Obecnie podejmowane są próby hodowania komórek mieszków włosowych (21).

3.4. Wątroba

Po wystąpieniu objawów ostrej niewydolności wątroby w wyniku zatrucia lekami lub zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B i C, pomimo stosowania różnych metod leczenia, umiera około 60% pacjentów (23). Jedyną skuteczną metodą terapii jest transplantacja wątroby, wykonana w ciągu kilku godzin po diagnozie. Czas oczekiwania na przeszczep można wydłużyć, pod warunkiem zastąpienia funkcji wątroby przez pozaustrojową „sztuczną wątrobę”. U wielu pacjentów możliwa jest regeneracja własnej wątroby, również pod warunkiem zastąpienia jej funkcji przez okres niezbędny do regeneracji hepatocytów (około 2 tygodni). Potrzeby te zainspirowały badaczy do stworzenia pozaustrojowego urządzenia zastępującego funkcje wątroby, którego najważniejszym elementem są aktywne metabolicznie hepatocyty (ze względu na brak dawców, pochodzące od zwierząt) lub zachowujące funkcje hepatocytów komórki nowotworów wątroby (24).

Należy podkreślić, że wątroba ze względu na funkcje detoksyfikacyjne, biosyntetyczne (synteza albuminy, czynników krzepnięcia) oraz metaboliczne (metabolizm węglowodanów i tłuszczów) nie może być w pełni zastąpiona przez systemy hemodializacyjne, hemofiltracyjne, hemoperfuzyjne (kolumny z aktywnym węglem i żywicami) czy przez plazmaferzę połączoną z dializą (24,25).

Metodę hodowli hepatocytów opracował Seglen w 1976 r. (26), lecz *in vitro* hepatocyty traciły swoje właściwości metaboliczne. Wiele prac poświęcono zatem modyfikacji płynów hodowlanych, przez dodatek hormonów, dwumetylosulfotlenku (DMSO), macierzy pozakomórkowej ekstrahowanej z wątroby lub pochodzącej z komórek nowotworowych (Matrigel). Hodowano także hepatocyty łącznie z fibroblastami lub komórkami zatok wątrobowych, uzyskując znaczne przedłużenie ich zdolności metabolicznych i wydzielniczych (27-29). Do zastąpienia funkcji wątroby u dorosłego człowieka potrzeba około 10^{10} hepatocytów, co odpowiada około 1/3 masy wątroby. Aby uzyskać tę ilość hepatocytów, konieczna jest hodowla o gęstości około 10^7 komórek/cm³ podłoża lub nośnika, zachowujących swą aktywność metaboliczną przez blisko 2 tygodnie (25,30) (tab. 1)

TABELA 1
WYMAGANIA STAWIANE „SZTUCZNEJ” WĄTROBIE

Warunki	Cel
wysoka gęstość hepatocytów utrzymanie funkcji metabolicznej długotrwałe utrzymanie funkcji metabolicznej łatwość powiększania skali hodowli warunki aseptyczne	co najmniej 10^7 kom/cm ³ objętości naczynia porównywalna z hepatocytami w wątrobie co najmniej 1-2 tygodnie pojemność rzędu kilku litrów naczynia brak zakażeń drobnoustrojami

Pod koniec lat osiemdziesiątych podjęto prace nad pozaustrojową „sztuczną” wątrobą (BAL — *bioartificial liver*), składającą się z naczyń (bioreaktora) z hodowlą hepatocytów i urządzeń umożliwiających jej połączenie z krwiobiegiem pacjenta. W niektórych projektach BAL uwzględniono także urządzenia hemodializacyjne, mające na celu obniżenie we krwi pacjenta stężenia substancji toksycznych dla hepatocytów.

Pierwszą BAL stworzyli w 1988 r. Uchno i wsp. (31). Krew badanych psów po hepatektomii przepływała przez naczynie zawierające 200 obracających się, pokrytych kolagenem szklanych płyt z hodowlą hepatocytów. Taka pozaustrojowa „sztuczna” wątroba przedłużała życie psom średnio o dwa dni. W innych zaprojektowanych BAL krew pacjentów przepływała wielokrotnie przez półprzepuszczalne błony oddzielające ją od gęstej zawiesiny hepatocytów. Uzyskano zachęcające efekty kliniczne, mierzone zwiększonym przeżyciem pacjentów z ostrą niewydolnością wątroby. Jedną z wad takiego systemu była niska przeżywalność hepatocytów hodowanych w zawieszynie, gdyż jako komórki adherentne wymagają one kontaktu ze stałym podłożem (32). Większość późniejszych rozwiązań dotyczyła immobilizacji (unieruchamiania) hepatocytów w żelach alginianowych lub kolagenowych. Jedno z takich urządzeń składało się z 40 obracających się i omywanych przez krew dysków, zawierających hepatocyty zamknięte w żelu alginianowym. U kotów z doświadczalnie indukowaną niewydolnością wątroby zastępowało funkcje wątroby przez kilka godzin, lecz hemoperfuzja powodowała upłynnianie żelu alginianowego, a hepatocyty szybko obumierały (33). Yarmush i wsp. (34) stworzyli inny układ, tzw. „kanapkowy”, w którym hepatocyty hodowane na żelu kolagenowym pokrywano drugą warstwą tego żelu, uzyskując zbliżone do naturalnego opłaszczenie hepatocytów macierzą pozakomórkową. Stosunkowo niedawno opisano podobną metodę hodowli hepatocytów, lecz z zastosowaniem ekstrahowanej z komórek nowotworu Engelbreth-Holm-Swarm (ECS), bogatej w lamininę macierzy, która dostępna jest komercyjnie pod nazwą „Matrigel” (35).

W wielu ośrodkach, do hodowli hepatocytów i tworzenia BAL, zastosowano bioreaktory typu *hollow fiber* z hodowlą hepatocytów w przestrzeniach pozakapilarnych lub uwięzionych wewnątrz kapilar. W przestrzeniach pozakapilarnych hepatocyty hodowano w zawieszynie lub po adhezji do zewnętrznej powierzchni włókien lub do mikronośników.

Kliniczne zastosowanie znalazły dwa typy urządzeń: opracowana przez Sussmana i jego grupę badawczą ELAD (*extracorporeal liver assist device*), z hodowlą pochodzących z raka wątroby ludzkich komórek C3A, rosnących na pozakapilarnej powierzchni włókien, oraz BAL (*bioartificial liver*) opracowana przez Demetriou i wsp., zawierająca świńskie hepatocyty hodowane w pozakapilarnej przestrzeni na mikronośnikach (36,37).

W ELAD, bioreaktor typu *hollow fiber* zawierał około 400 g komórek C3A rosnących na włóknach w przestrzeni pozakapilarnej, a krew pacjentów przepływała wewnątrz kapilar przez średnio 144 godz. Wyniki badań klinicznych były umiarkowane: spośród pacjentów zaliczanych do grupy, w której nie planowano transplantacji wątroby (korzystne rokowanie) przeżyło 78%; w grupie, w której planowano wykonanie transplantacji (zła prognoza), 33% osób przeżyło, w porównaniu z przeżyciem 75% pacjentów grupy 1 i 25% przeżyciem pacjentów grupy 2, leczonych klasycznymi metodami. W ELAD czynnikiem ograniczającym rozmiary hodowli była mała, dostępna dla rosnących komórek zewnętrzna powierzchnia włókien. Dlatego Gerlach zastosował nową odmianę bioreaktora *hollow fiber* ze znacznie zwiększoną ilością cienkich włókien opłaszczonych Martigel (38,39).

W BAL, opracowanym przez grupę Demetriou, hepatocyty świńskie rosły na opłaszczonych kolagenem mikronośnikach (Cytodex), o średnicy 100-200 μm , umieszczonych w pozakapilarnej przestrzeni bioreaktora *hollow fiber* z półprzepuszczalnymi włóknami z azotanu i octanu celulozy. Plazma pacjentów z separatora plazmy przepływała włóknami przez średnio 39 godz. Wyniki badań klinicznych z zastosowaniem tego typu bioreaktora były zachęcające, gdyż przeżyła większość pacjentów, których poddano perfuzji i w ciągu 3 dni przeszczepiono wątrobę (25,26).

Opisano także BAL, w której świńskie hepatocyty, zamknięte w żelu kolagenowym umieszczano w przestrzeni wewnątrzkapilarnej, przeznaczając przestrzeń pozakapilarną do przepływu krwi pacjenta (40). Badacze japońscy do hodowli hepatocytów zastosowali bioreaktor ze złożem upakowanym. Nośniki w formie sześciątów (200-500 nośników) zawierały syntetyczną żywicę z dwumetoksymetanu poliwinylu (PVF) o porowatej strukturze (pory o średnicy 250 μm). Uzyskali hodowlę hepatocytów o gęstości 10^7 komórek/ cm^3 PVF, tworzących strukturę zbliżoną do zrazików wątroby. Hodowane hepatocyty zachowywały pełne funkcje metaboliczne przez tydzień. Należy wspomnieć o zdolności hepatocytów do spontanicznej agregacji *in vitro* i tworzenia skupisk, w których obserwowano tworzenie mikrokanalików żółciowych oraz długie zachowywanie funkcji życiowych. Opinie o możliwości ich zastosowania w BAL są jednak podzielone (41-44).

3.5. Trzustka

Cukrzyca typu I (insulinozależna) jest przewlekłą chorobą, w przebiegu której, aby zapobiec hipoglikemii, konieczne jest codzienne podawanie insuliny. Na świecie, z powodu tej choroby kilku tysiącom pacjentów rocznie przeszczepia się trzustkę. Przeszczep ten jest bardzo immunogeny i pociąga

za sobą konieczność leczenia immunosupresyjnego, a liczba dawców ogranicza szersze stosowanie tej metody leczenia (45). Dlatego, od wielu lat, prowadzone są badania nad wszczepianiem izolowanych wysp trzustkowych.

Choroba trzustki uniemożliwia pobranie komórek od potencjalnego biocyprzeszczepu. Niemożliwe jest również namnożenie komórek gdyż, jak dotąd, nie udało się odtworzyć *in vitro* złożonej, charakterystycznej dla wysp trzustkowych, struktury tkankowej. Ponadto komórki trzustki *in vitro* tracą swe zdolności wydzielnicze (46).

Obecnie wyspy izoluje się z trzustki pobranej ze zwłok (przeszczep allogeniczny), z trzustek zwierzęcych (świni, krowy — przeszczep ksenogeniczny), lub zastępuje się mysimi liniami komórkowymi wywodzącymi się z nowotworów trzustki, które pomimo transformacji nowotworowej zachowały zależne od stężenia glukozy właściwości wydzielania insuliny. W celu izolacji komórek trzustki od układu odpornościowego biocyprza opłaszczają się je biomateriałami posiadającymi właściwości błon półprzepuszczalnych; przepuszczają one glukozę i substancje odżywcze z organizmu biocypra oraz wytworzoną przez komórki wysepek insuliny, nie przepuszczają natomiast immunoglobulin, składników dopełniacza oraz komórek immunologicznie kompetentnych (47). Do opłaszczania wysp trzustkowych najczęściej używane są żele alginianowo-poli L-lizynowe (PLL) i znacznie rzadziej polimeryzujące pod wpływem światła glikole polietylenowe. Opisano również wielowarstwowe opłaszczanie wysp trzustkowych żelem alginianowym, poli L-lizyną, a następnie warstwą alginianu (APA), lub kolejno alginianem, polietylenoiminą, protaminą i heparyną (APPH), dzięki czemu są dobrze chronione przed atakiem układu odpornościowego biocypra (47-49).

Wielowarstwowe opłaszczanie jest szczególnie ważne w przypadku użycia komórek wywodzących się z nowotworów trzustki myszy, np. komórek MIN6, które cechują się porównywalną z komórkami wysp zdolnością wytwarzania insuliny po stymulacji glukozą, lecz korzystnie różnią się od nich możliwością namnażania *in vitro*. Doświadczalnie wykazano, że komórki te opłaszczono trójwarstwowo żelem: agarozowym, z kwasu polistyrenosulfonowego, polybrene (Sigma), i karboksymetylocelulozy zachowują żywotność przez wiele tygodni i nie są atakowane przez komórki immunologicznie kompetentne. Niektóre z linii komórkowych, np. TC3, po opłaszczeniu żelem PLL zachowują zdolność do podziałów i tworzą zgrupowania komórek na obwodzie kapsułki (51-55).

Obok przeszczepiania mikrokapsułkowanych wysp trzustkowych podejmowane są próby stworzenia małego, wydzielniczego bioreaktora, który wszczepiony do jamy otrzewnej po wykonaniu zespolenia tętniczo-żylnego, lub wszczepiony pod skórę, mógłby regulować poziom glukozy w organizmie człowieka. Zaproponowano kilka rozwiązań polegających na umieszczeniu opłaszczonych żelem agarozowym wysp wewnątrz rurki zbudowanej z polimeru AN69 (poliakrylonitrylometalilosulfonian sodu), który jest obecnie stosowany w urządzeniach hemodializacyjnych; na umieszczeniu opłaszczonych żelem wysp w komorach dyfuzyjnych ograniczonych błonami Nucleopore, o średnicy porów 0,2 μm , lub w torebkach/rurkach hydrożelowych z alkoholu poli-

winyłowego (56-61). Stwierdzono funkcjonowanie takich minireaktorów i utrzymywanie prawidłowego poziomu glukozy przez wiele miesięcy u zwierząt doświadczalnych.

Mimo dość dużego zainteresowania, nie są to metody stosowane rutynowo, a wiele problemów, np. żywotność przeszczepionych wysp i ich zdolność do długoterminowego wydzielania insuliny wymaga dalszych badań (62,63).

Literatura

1. Siegel G., Malmsten M., (1997), *Int. J. Microcirc.*, 17, 257-272.
2. Kim B. S., Mooney D. J., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 224-230.
3. Hellman K. B., Picciolo G. L., Fox C. F., (1994), *J. Cell. Biochem.*, 56, 210-224.
4. Minuth W. W., Sittinger M., Kloth S., (1998), *Cell Tissue Res.*, 291, 1-11.
5. Hellman K. B., (1997), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, 1-9.
6. Reddi A. H., (1998), *Nature Biotechnol.*, 16, 247-252.
7. Heath C. A., Magari S. R., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 430-437.
8. Green W. T., (1977), *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 124, 237-249.
9. Freed L. E., Vunjak-Novakovic G., Langer R., (1993), *J. Cell. Biochem.*, 51, 257-264.
10. Duke P. J., Daane E. L., Montufar-Solis D., (1993), *J. Cell. Biochem.*, 51, 274-282.
11. Naumann A., Rotter N., Bujia J., Aiger J., (1998), *Am. J. Rhinology*, 12, 59-63.
12. Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Bursac P. M., Langer R., Freed L. E., (1998), *Biotechnol. Prog.*, 14, 193-202.
13. Chang Y. S., Oka M., Gu H. O., Kobayashi M., Toguchida J., Nakamura T., Hayami T., (1997), *J. Biomed. Mater. Res.*, 37, 51-59.
14. Ishaug-Riley S. L., Crane-Kruger G. M., Yaszemski M. J., Mikos A. G., (1998), *Biomaterials*, 19, 1405-1412.
15. Laurencin C. T., Attawia M. A., Elgendy H. E., Herbert K. M., (1996), *Bone*, 19, 93S-99S.
16. Ishaug S. L., Crane G. M., Miller M. J., Yasko A. W., Yaszemski M. J., Mikos A. G., (1997), *J. Biomed. Mater. Res.*, 36, 17-28.
17. Khouri R. K., Koudsi B., Reedi A. H., (1991), *JAMA*, 266, 1953-1955.
18. Rheinwald J. G., Green H., (1975), *Cell*, 6, 317-330.
19. Zacchi V., Soranzo C., Cortivo R., Radice M., Brun P., Abatangelo G., (1998), *J. Biomed. Mater. Res.*, 40, 187-194.
20. Dvorankova B., Smetana K., Konigova R., Singerova H., Vacik J., Jelinkova M., Kapounkova Z., Zahradnik M., (1998), *Biomaterials*, 19, 141-146.
21. Monteiro-Reviere N. A., Inman A. O., Snider T. H., Blank J. A., Hobson D. W., (1997), *Microscop. Res. Technol.*, 37, 172-179.
22. Marewicz E., (1994), *Post. Biol. Kom.*, 21, 73-87.
23. de Groot. G. H., Schalm S. W., Fick T., Reuvers C. B., Boks A. L., Terpstra O. T., (1989), *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 4, 283-293.
24. Hughes R. D., Williams R., (1995), *Liver Transpl. Surg.*, 1, 200-206.
25. Hughes R., Williams R., (1996), *Sem. Liver Dis.*, 16, 435-444.
26. Seglen P. O., (1976), *Meth. Cell Biol.*, 13, 29-83.
27. Mioshi H., Yanagi K., Fukuda H., Oshima N., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 635-644.
28. Naughton B. A., Roman J. S., Sibanda B., Weintraub J. P., Kamali V., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 810-825.
29. Nyberg S. L., Shatford R. A., Peshwa M. V., White J. G., Cerra F. B., Hu W. S., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 194-203.
30. Hughes R. D., Williams R., (1996), *Int. J. Artif. Organs*, 19, 3-6.
31. Uchino J., Tsuburaya T., Kumagai F., Hase T., Hamada T., Komai T., Funatsu A., Hashimura E., Nakamura K., Kon T., (1988), *ASAIO Transplant.*, 34, 972-984.

32. Margulis M. S., Erukhimov E. A., Andreiman L. A., Viksna L. M., (1989), *Resuscitation*, 19, 85-91.
33. Oshima N., Shiota M., Kusano H., Wada G., Tsunetsugu T., Ookawa K., Yanagi K., (1994), *Mater. Sci. Engineer.*, 1, 79-85.
34. Yarmush M. L., Dunn J. C. Y., Tomkins R. G., (1992), *Cell Transplant.*, 1, 323-326.
35. Berthiaume F., Moghe P. V., Toner M., Yarmush M. L., (1996), *FASEB J.*, 10, 1471-1478.
36. Demetriou A. A., Rozga J., Podesta L., LePage E., Morsiani E., Moscioni A. D., Hoffman A., McGrath M., Kong L., Rosen H., Villamil F., Woolf G., Vierling J., Makowka L., (1995), *Scand. J. Gastroenterol.*, 30, 111-119.
37. Sussman N. L., Gislason G. T., Conlin C. A., Kelly J. H. (1994), *Artif. Organs.*, 18, 390-397.
38. Oshima N., (1997), *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, 28, 441-453.
39. Gerlach J. C., Schnoy N., Encke J., Smith M. D., Muller C., Neuhaus P., (1995), *Hepatology*, 22, 546-553.
40. Sielaff T. D., Nyberg S. L., Rollins M. D., Hu M. Y., Amiot B., Lee A., Wu F. J., Hu W. S., Cerra F.B., (1997), *Cell Biol. Toxicol.*, 13, 357-364.
41. Oshima N., Yanagi K., Miyoshi H., (1997), *Artif. Organs.*, 21, 1169-1176.
42. Miyoshi H., Yanagi K., Fukuda H., Oshima N., (1996), *Artif. Organs.*, 20, 803-807.
43. Yanagi K., Miyoshi H., Fukuda H., Oshima N., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 316-320.
44. Miyoshi H., Ookawa K., Oshima N., (1998), *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 9, 227-237.
45. Stratta R. J., Larsen J. L., Cushing K., (1995), *Annu. Rev. Med.*, 46, 281-298.
46. Lucas-Clerc C., Massart C., Campion J. P., Launois B., Nicol M., (1993), *Molec. Cell. Endocrinol.*, 94, 9-20.
47. Giannarelli R., Marchetti P., Coppelli A., Lorenzetti M., Viacava P., Naccarato A. G., Cosmi S., Arvia C., Navalesi R., (1995), *Transplant.*, 60, 1044-1046.
48. Siebers U., Horcher A., Bretzel R. G., Federlin K., Zekorn T., (1997), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, 304-312.
49. Orłowski T., Sitarek E., Tatarkiewicz K., Sabat M., Antosiak M., (1997), *Int. J. Artif. Organs.*, 20, 701-703.
50. Hill R. S., Cruise G. M., Hager S. R., Lamberti F. V., Yu X., Garyfis C. L., Yu Y., Mundwiler K. E., Cole J. F., Hubbell J. A., Hegre O. D., Scharp D. W., (1997), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, 332-343.
51. Ohgawara H., Miyazaki J., Nakagawa Y., Sato S., Karibe S., Akaike T., (1996), *Cell Transplant.*, 5, S71-S73.
52. Kawakami Y., Inoue K., Hayashi H., Wang W. J., Satoyama H., Gu Y. J., Imamura M., Iwata H., Ikada Y., Nozawa M., Miyazaki J., (1997), *Cell Transplant.*, 6, 541-545.
53. Benson J. P., Papas K. K., Constantinidis I., Sambanis A., (1997), *Cell Transplant.*, 6, 395-402.
54. Constantinidis I., Mukundan N. E., Gamcsik M. P., Sambanis A., (1997), *Cell. Mol. Biol.*, 43, 721-729.
55. Hayashi H., Inoue K., Aung T., Tun T., Yuanjun G., Wenjing W., Shinohara S., Kaji H., Doi R., Setoyama H., Kato M., Imamura M., Maetani S., Morikawa N., Iwata H., Ikada Y., Miyazaki J., (1996), *Cell Transplant.*, 5, S65-S69.
56. Aung T., Kogire M., Inoue K., Fujisato T., Gu Y., Burczak K., Shinohara S., Mitsuo M., Maetani S., Ikada Y., Tobe T., (1993), *ASAIO J.*, 39, 93-96.
57. Inoue K., Fujisato T., Gu Y.J., Burczak K., Sumi S., Kogire M., Tobe T., Uchida K., Nakai I., Maetani S., Ikada Y., (1992), *Pancreas*, 7, 562-568.
58. Prevost P., Flori S., Collier C., Muscat E., Rolland E., (1997), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, 344-349.
59. Hiratani S., Ohgawara H., (1998), *Cell Transplant.*, 7, 407-410.
60. Lanza R. P., Chick W. L., (1997), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 831, 323-331.
61. Young T. H., Yao N. K., Chang R. F., Chen L. W., (1996), *Biomaterials*, 17, 2139-2145.
62. Calafiore R., (1992), *ASAIO J.*, 38, 34-37.

63. Soon-Shiong P., Heintz R.E., Merideth N., Yao Q., Yao Z., Zheng T., Murphy M., Moloney M. K., Schmehl M., Harris M., Mendez R., Mendez R., Sandford P. A., (1994), *Lancet*, 343, 950-951.

Medical application of bioartificial tissues and organs

Summary

The enormous need for „spare parts” for the human body is the driving force for research in a new scientific field — tissue engineering. Tissue engineering combines living cells with a wide range of biomaterials, mostly as a substitute for the extracellular matrix or the stroma. As experiments in conventional culture dishes continued to fail, new cell and tissue culture methods had to be developed. Tissues are cultured under conditions as close as possible to their natural environment. Cells are grown on novel tissue carriers, on selected biomaterials and scaffolds. The tissues are subsequently transferred into different types of containers for perfusion with fresh culture medium. The development of artificial skin for severely burned patients is among the most advanced tissue-engineering attempts. Intensive research is being focused on the generation of artificial cartilage and bones to treat articular joint diseases or injuries or augment defects in plastic surgery. Future challenges are the construction of liver organoids for bridging comas or bioartificial pancreas for the treatment of type I diabetes mellitus. In this paper we show strategies, needs, tools for the development of some artificial tissues and bioartificial organs.

Key words:

tissue engineering, bioartificial organs, human skin equivalent, bioartificial bone and cartilage.

Adres do korespondencji:

Martyna Kandefer-Szerszeń, Zakład Wirusologii i Immunologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.