

Biohybrydowe, sztuczne narządy w terapii chorób układowych

Tomasz Jankowski
Akademia Rolnicza
Poznań

1. Wstęp

Wrodzona lub nabyta utrata specyficznych funkcji przez narządy i tkanki jest przyczyną dużej liczby chorób układowych organizmu człowieka. Do najbardziej rozpowszechnionych i społecznie uciążliwych chorób o tym podłożu należą: cukrzyca, ostra niewydolność wątroby, a także choroby Alzheimera i Parkinsona, związane z degeneracją układu nerwowego. Do mniej częstych schorzeń, w których pewne narządy także utraciły zdolność wykonywania swoistych funkcji zalicza się: hemofilię, karłowatość, brak mechanizmów odpornościowych, niedoczynność przytarczyc, czy też anemię. Zachowawcze leczenie tych chorób jest kosztowne, uciążliwe dla pacjentów i często powoduje poważne skutki uboczne. Najbardziej znamienym przykładem jest cukrzyca, na którą choruje około 2% populacji ludzkiej. Pomimo powszechnie stosowanej terapii insulinowej, połączonej z koniecznością przestrzegania określonej diety, u chorych, szczególnie na cukrzycę typu I, występują dość znaczne wahania poziomu glukozy, co w konsekwencji prowadzi do poważnych powikłań wzroku, chorób nerek i układu krążenia (1).

Skutecznym sposobem leczenia wielu schorzeń układowych mogą być transplantacje całych narządów lub ich części. Powodzenie transplantacji jest jednak uwarunkowane tolerancją immunologiczną wszczepianych tkanek i wymaga stosowania środków immunosupresyjnych. Te z kolei, poprzez obniżenie ogólnej odporności organizmu, mogą mieć groźne skutki uboczne, wśród których wymienia się podatność na zakażenia, powikłania nerkowe, osteoporozę, a nawet nowotwory (2). Transplantacje narządów i tkanek pochodzących od wielonarządowych dawców, są także ograniczone ich dostępnością, umiejętnością pobierania materiału do przeszczepu, a także możliwością konserwacji i długotrwałego przechowywania w nie zmienionym stanie.

W ostatnich latach, kilka zespołów badawczych na świecie podjęło się przeprowadzenia badań nad opracowaniem technik umożliwiających transplantację komórek i tkanek bez konieczności stosowania immunosupresji. Ogólnie, te-

chniki te polegają na immunoizolacji wszczepianego materiału tkankowego poprzez zamknięcie go w selektywnie przepuszczalnej osłonie. Całkowita immunoizolacja wszczepów tkankowych, przypuszczalnie umożliwi wykorzystanie do celów transplantacji także tkanek pobieranych od zwierząt lub komórek zmodyfikowanych genetycznie, pochodzących z wielkoskalowych hodowli.

Układ składający się z komórek lub tkanek immobilizowanych w półprzepuszczalnej osłonie immunoizolacyjnej i zastępujący funkcje naturalnego narządu, nazwano biohybrydowym, sztucznym narządem. Sztuczne narządy, wykorzystujące tkanki allo- i ksenogeniczne zastosowane w leczeniu różnych chorób układowych były ostatnio dyskutowane w różnych aspektach w opracowaniach przeglądowych (3-5).

Przedmiotem szerokich badań z użyciem komórek immobilizowanych w półprzepuszczalnych membranach jest również leczenie ostrej niewydolności wątroby. Z uwagi jednak na złożoność funkcji tego narządu, w tej dziedzinie przeważa ciągle koncepcja utrzymania sztucznego narządu funkcjonującego poza organizmem człowieka (6).

Celem artykułu jest przedstawienie stanu badań w zakresie wytwarzania i stosowania biohybrydowych, sztucznych narządów, a także omówienie wybranych zagadnień wymagających dalszych prac.

2. Budowa i funkcje biohybrydowych, sztucznych narządów

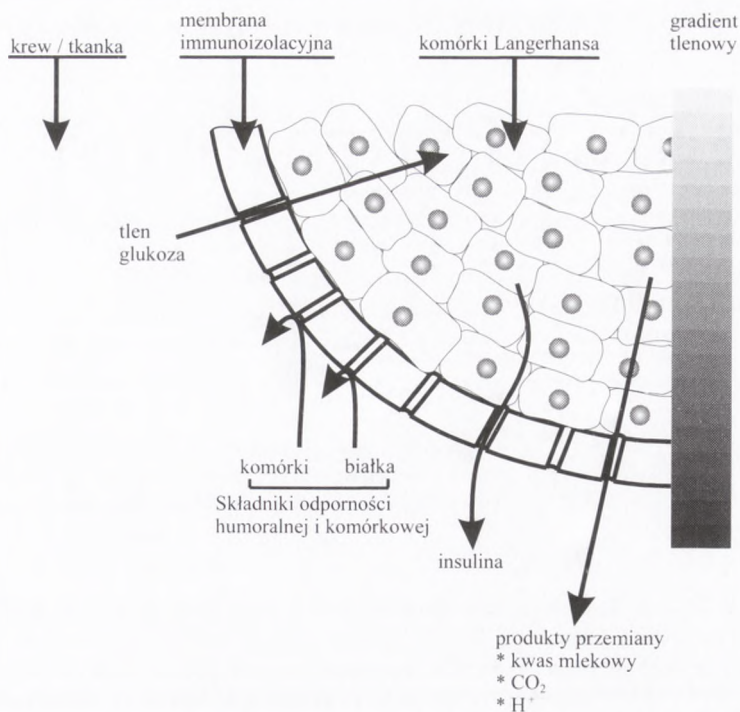
Całkowite lub częściowe zastąpienie czynności niewydolnego narządu w organizmie człowieka przez jego biohybrydowy analog wymaga, aby sztuczny narząd był wytworzony z biozgodnego materiału, zapewniał immunoizolacyjność wszczepianej tkance, zawierał dostateczną ilość materiału komórkowego, umożliwiał implantację podskórną lub dootrzewnową i był łatwo i bezpiecznie usuwany z organizmu człowieka (7).

Na rysunku 1 przedstawiono koncepcję biohybrydowej, sztucznej trzustki, gdzie wszczepiany materiał komórkowy, o gęstości przypominającej strukturę tkankową jest zamknięty w odpowiedniej matrycy-nośniku i oddzielony od organizmu półprzepuszczalną membraną o właściwościach immunoizolacyjnych. Membrana otaczająca tkankę, nie dopuszcza do wnętrza sztucznej trzustki komórkowych i humoralnych składników układu odpornościowego, lecz umożliwia swobodny przepływ substancji odżywczych do wszczepu oraz wytwarzanych metabolitów na zewnątrz. Wszczep komórkowy jest odżywiany z najbliższych naczyń krwionośnych i otaczających go tkanek.

W pracach badawczych nad biohybrydowymi, sztucznymi narządami opracowano trzy systemy immobilizacji komórek i tkanek przeznaczonych do implantacji.

2.1. Implanty naczyniowe w postaci tętniczo-żylnych boczników

Pierwsze implanty naczyniowe zawierające immobilizowane komórki, opracowane ponad 20 lat temu, miały postać wiązki kapilarnych, drażonych włó-



Rys. 1. Koncepcja biohybrydowego, sztucznego narządu na przykładzie wszczepu wysepek trzustkowych.

kien polimerowych z osadzonymi na zewnętrznej powierzchni wysepkami Langerhansa. W warunkach laboratoryjnych, przy recyrkulacji pożywki przez światło włókien, komórki wytwarzały insulinę, stymulowane zmiennym stężeniem glukozy (8). Przy perfuzji krwi przez włókna, ze względu na ich niewielką średnicę, szybko tworzyły się skrzepy (9).

Udoskonalona postać implantu, nazywana szantem, testowana na psach insulinozależnych, była wykonana z akrylowego pojemnika o średnicy 9 cm i grubości 2 cm, w którym umieszczono 30-35 cm spiralnie zwiniętej, polimerowej membrany rurowej o średnicy 5-6 mm i granicznym punkcie odcięcia 50 kD (10). W testowanym implancie, przestrzeń na zewnątrz membrany wypełniano zawiesiną wysepek trzustkowych w 1% agarze. Implant wprowadzano do jamy otrzewnowej, a membranę rurową łączono na obu końcach do teflonowego graftu i wszywano pomiędzy tętnicę i żyłę biodrową zewnętrzną. Membrana nie była blokowana przez skrzepy, a implant zawierający allogeniczny materiał tkankowy regulował poziom glukozy przez rok. Immunoizolacyjność stosowanych membran potwierdzono w badaniach z użyciem tkanki ksenogenicznej. Przy stosowaniu świńskich i bydłych wysepek trzustkowych, właściwy poziom glukozy utrzymywano u psów przez odpowiednio 9 i 2 miesiące (11).

Pomimo dobrych wyników badań *in vivo* u dużych zwierząt, wykorzystanie implantów naczyniowych w leczeniu cukrzycy u człowieka, jak się wydaje,

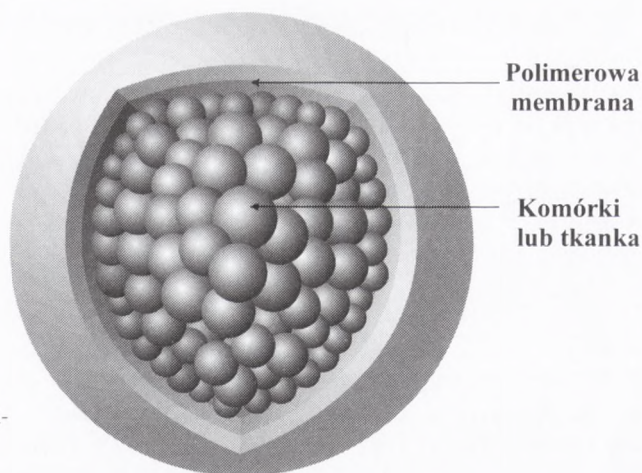
jest ograniczone. Wiąże się to z małą pojemnością zbiornika wypełnionego wysepkami (5-6 ml), wymaga wszczepienia przynajmniej dwóch szantów choremu z wymaganiami insulinowymi około 30 j./dobę. Próby zmniejszenia średnicy membrany rurowej i jej wydłużenia, w celu zwiększenia sekrecji insuliny były nieudane z powodu szybkiego wykrzepiania krwi w jej świetle (4). Jednocześnie, ograniczony czas aktywności wysepek wymaga ich okresowej wymiany, co wiąże się z koniecznością reoperacji chorego.

2.2. Pojemniki dyfuzyjne

Pojemniki dyfuzyjne, wykorzystywane przy wytwarzaniu wszczepów komórkowych mają postać kapilarnych, półprzepuszczalnych, polimerowych membran rurowych o budowie typu *hollow-fibre*, z materiałem komórkowym umieszczonym wewnątrz kapilary. Testowane w kilku pracach kapilarne pojemniki były wytwarzane z poliakrylonitrylu, polisulfonu lub kopolimeru poliakrylonitryl-polichlorek winylu, metodami suchego lub mokrego przędzenia oraz inwersji fazowej. Ich średnice zewnętrzne wynosiły od 0,5 do 3 mm, grubość ścianek około 100 μm , zaś długość do 2 cm (12-15).

W kilku opublikowanych pracach badano przydatność pojemników dyfuzyjnych do wytworzenia biohybrydowej, sztucznej trzustki, umieszczając wewnątrz kapilar allo- lub ksenogeniczne wysepki Langerhansa i wszczepiając pojemniki dootrzewnowo lub podskórnie małym zwierzętom doświadczalnym (13, 14). W testach *in vitro*, stwierdzono konieczność immobilizacji komórek wewnątrz kapilar w żelu alginianowym. Działanie to miało na celu odseparowanie pojedynczych wysepek od siebie, które umieszczone w pojemnikach w zawieszynie, tworzyły agregaty i szybko obumierały (13). Stwierdzono także, że wszczep dootrzewnowy funkcjonuje lepiej od podskórnego, ze względu na lepsze natlenianie wysepek. Testowane pojemniki, o granicznym punkcie odcięcia od 30 do 50 kD, zapewniały według autorów pełną immunoizolację wszczepianych komórek. Jednocześnie, użyte polimery były biogodne zarówno z materiałem komórkowym wszczepu, jak i organizmem biorcy.

Wśród innych prób z wszczepami tkankowymi zamykanymi w kapilarnych pojemnikach dyfuzyjnych, na uwagę zasługują badania nad zwalczaniem silnego bólu towarzyszącego zaawansowanemu procesowi chorób nowotworowych. W fazie przedklinicznej badań, wykonanej na dużych zwierzętach, dla sprawdzenia immunoizolacyjności pojemników, wszczepiano chromafinowe komórki nadnerczy bydłych do płynu mózgowo-rdzeniowego w części lędźwiowej kręgosłupa owcy (15). W próbach klinicznych, podobne komórki implantowano w pojemnikach do przestrzeni podpajęczynówkowej lub bocznej komory mózgu chorym, cierpiącym na silny ból, obserwując znaczne złagodzenie jego objawów (16). Komórki chromafinowe użyte w badaniach, wytwarzają naturalne substancje przeciwbólowe jak katecholaminy, adrenalinę i opioidy. Podobne badania na dużych zwierzętach opisali autorzy japońscy, stosując genetycznie zmodyfikowane komórki nerwowe wytwarzające β -endorfinę i hormon adrenokortykotropowy — ACTH (17).



Rys. 2. Mikro kapsułki z membraną w postaci hydrożelu.

W wielu opracowaniach zwraca się uwagę na konieczność lokalizacji i usuwania pojemników po ustaniu funkcji wszczepianych komórek. W tym celu stosuje się laparoskopię lub, gdy stwierdza się otorbienie wszczepów tkanką włóknistą, tradycyjne postępowanie chirurgiczne (4,5).

2.3. Mikro kapsułki

Mikro kapsułkowanie polega na wytworzeniu cienkiej, mikro porowatej, pół-przepuszczalnej membrany wokół zawiesiny pojedynczych komórek lub fragmentu tkanki (rys. 2). Mikro kapsułki wykazują wiele zalet, wskazujących na ich przewagę nad innymi rodzajami pojemników do transplantacji komórek i tkanek. Dotyczy to szczególnie dużego stosunku powierzchni do ich objętości, przez co uzyskuje się bardzo dobre natlenianie wnętrza, łatwości implantacji oraz możliwości usunięcia z organizmu przez wysysanie z użyciem igły chirurgicznej (4). Korzystną cechą mikro kapsulek jest także możliwość ich wytwarzania z materiałów pochodzenia naturalnego o wysokiej biogodności z wszczepianymi tkankami i organizmem biocy (18).

Jen i wsp. (19) oraz Hunkeler (20), opisali kilkanaście sposobów otrzymywania mikro kapsulek, stosowanych przez różnych autorów jako nośniki do wszczepianych komórek. Wśród wielu systemów mikro kapsułkowania, tylko niektóre wykazały pełną przydatność w odniesieniu do biogodności, immunizolacyjności i wytrzymałości mechanicznej membran w eksperymentach *in vitro* i po wszczepieniu do organizmu zwierząt doświadczalnych.

Najczęściej stosowaną metodą wytwarzania mikro kapsulek do celów implantacyjnych była ekstruzja zawiesiny komórek w alginianie sodu do roztworu jonów wielowartościowych metali, np. baru lub wapnia, a następnie pokrywanie ich powierzchni syntetyczną poli-L-lizyną (mikro kapsułki AP). Sposób ten, użyty po raz pierwszy przez Lim i Sun (21) do kapsułkowania wysepek trzustkowych, był od tego czasu wielokrotnie modyfikowany w celu

poprawienia właściwości immunoizolacyjnych, wytrzymałości mechanicznej i biogodności membran, a także zmniejszenia wielkości mikropojemników. Na przykład, mikrokapsułki AP pokrywano na przemian kolejnymi warstwami alginianu i polilizyny, wykorzystując interakcje pomiędzy polianionowym alginianem i polikationową polilizyną (22,23) lub glikolem polietylenowym sieciowanym przy użyciu fotopolimeryzacji (24). W rezultacie tych prac, uzyskiwano poprawę mechanicznej wytrzymałości mikrokapsulek i większą biogodność powierzchni zewnętrznej, lecz często kosztem pogorszenia ich właściwości dyfuzyjnych.

Pomimo pewnych wad, mikrokapsułki AP i APA były najczęściej testowanym układem do wytwarzania biohybrydowych, sztucznych narządów. Próby wykonane na modelach zwierzęcych dotyczyły głównie utrzymywania normoglikemii po wszczepach allo- i ksenogenicznych wysepek trzustkowych (22,25,26), wszczepów tkanki przytarczyc w leczeniu niedoczynności tego narządu (27), oraz implantacji zmodyfikowanych genetycznie komórek wytwarzających hormon wzrostu (28) i czynnik IX w leczeniu hemofilii typu B (29).

Należy dodać, że mikrokapsułki wykonane z samego alginianu lub alginianu i polilizyny użyto w nielicznych, jak dotąd, transplantacjach do organizmu człowieka wysepek trzustkowych pobranych od dawców wielonarządowych (30,31).

Mikrokapsułki do immobilizacji wszczepianych tkanek wytwarzano także z agarozy, przez termiczne żelowanie roztworu polimeru z zawieszonymi komórkami (32) oraz z kopolimerów poliakrylanowych, przez wytrącanie w niezgodnym rozpuszczalniku (33). Mikrokapsułki otrzymywane tą ostatnią metodą miały średnicę 300-500 μm i membrany o grubości 10-50 μm o porowatej strukturze przypominającej ścianki dyfuzyjnych pojemników typu *hollow-fibre*. Interesujące jest to, że wśród mikrokapsulek wytwarzanych z różnych, syntetycznych polimerów, tylko w nich uzyskano długotrwałą przeżywalność wysepek trzustkowych (33) i hepatocytów (35). Wynika to prawdopodobnie z metody wytwarzania mikrokapsulek, w której immobilizowane komórki nie stykają się bezpośrednio z roztworem polimeru budującego zewnętrzną membranę.

Ostatnio Wang i wsp. (36) opracowali sposób kapsułkowania wysepek trzustkowych spełniający wymogi biogodności, immunoizolacyjności i mechanicznej wytrzymałości. Mikrokapsułki formowano z mieszaniny polimerów o różnych właściwościach funkcjonalnych metodą kompleksowej koacerwacji. Komórki zawieszano w roztworze alginianu sodu i siarczanu celulozy, a następnie wprowadzano kroplami do roztworu kopolimeru polimetylenu i guanidyny oraz chlorku wapnia. Modyfikacja stężeń składników oraz czas reakcji, umożliwiały wytwarzanie kapsulek o średnicy od 0,5 do 3 mm i granicznym odcięciu molekularnym membran od 40 do 230 kD. W badaniach na myszach insulinozależnych, po wszczepieniu komórek ksenogenicznych, wykazano utrzymywanie się normoglikemii w ciągu roku (36,37).

3. Problemy związane z wytwarzaniem biohybrydowych, sztucznych narządów

Skuteczność biohybrydowych, sztucznych narządów w leczeniu chorób układowych, zależy od kompleksowego rozwiązania wielu zagadnień, z których do najważniejszych zaliczamy: 1) całkowitą immunoizolację wszczepów tkankowych, 2) utrzymanie żywotności tkanki i jej funkcji w czasie wytwarzania sztucznych narządów, jak i w organizmie biorcy, oraz 3) dostępność materiałów tkankowych do przeszczepów.

3.1. Immunoizolacja wszczepów tkankowych

Układ immunologiczny chroni organizm człowieka przed komórkami i innymi substancjami, które wykazują cechy antygenów. Układ immunologiczny rozpoznaje obce substancje i włącza odpowiedni mechanizm dezaktywacji i eliminujący antygeny. Antygenami są zatem także komórki obcego organizmu, zarówno allo- jak i ksenogeniczne, wprowadzane do organizmu człowieka w postaci biohybrydowych, sztucznych narządów. Wytworzenie immunoizolacyjnej bariery wokół obcej tkanki, jest zatem podstawowym zagadnieniem gwarantującym skuteczne funkcjonowanie narządu.

Rozpoznanie przez organizm obcej tkanki, uruchamia złożony kompleks reakcji odpornościowych, w których biorą udział składniki komórkowe i humoralne. Te pierwsze, aktywują komórki cytotoksyczne, makrofagi i inne komórki żerne, dla których polimerowe membrany stosowane do wytwarzania sztucznych narządów stanowią barierę nie do przejścia (7). O wiele trudniejsza jest izolacja wszczepu przed składnikami humoralnymi, znacznie mniejszymi od komórek, wśród których występują naturalne immunoglobuliny, przeciwciała powstałe w reakcji na przeszczep, limfokiny i cytokiny. Dodatkowo, makrofagi i inne komórki cytotoksyczne mogą wytwarzać niskocząsteczkowe, reaktywne związki tlenu i azotu, jak wolne rodniki, nadtlenek wodoru i tlenek azotu, które są także w niespecyficzny sposób toksyczne dla komórek (3). Ich rola w odrzucie implantu komórkowego nie jest jeszcze dostatecznie poznana i zależy od tego, jak szybko przedyfundują przez immunoizolacyjną membranę zanim nie ulegną dezaktywacji.

Ze względu na funkcje immunoglobulin wraz z układem dopełniacza w reakcji odrzutu, w modelowych badaniach właściwości przepuszczalnych membran otaczających wszczepy komórkowe najwięcej uwagi zwracano na najmniejsze z przeciwciał — immunoglobulinę G. IgG ma masę cząsteczkową 160 kDa i promień hydrauliczny (Stokesa) ~5,2 nm (38). Składnik dopełniacza C1q, uczestniczący w formowaniu kompleksu ataku błony komórkowej, posiada średnicę około 30 nm i masę cząsteczkową 410 kDa (3). Membrana o maksymalnej wielkości porów 30 nm, powinna zatem zabezpieczać wszczep przed humoralnym typem reakcji odrzutu.

Graniczny punkt odcięcia molekularnego mikrokapsulek alginian-polilizyna, używanych w wielu badaniach z zastosowaniem sztucznych narządów,

oznaczony metodą odwróconej chromatografii sitowej z użyciem dekstranów, wynosił około 100 kDa, co odpowiada promieniowi hydraulicznemu makrocząsteczki 7,8 nm (39). Inni autorzy, po immobilizacji w kapsułkach AP genetycznie zmodyfikowanych komórek wytwarzających rekombinowane białka, obserwowali nie tylko przepuszczalność membran AP dla IgG, lecz także dla białek o masie cząsteczkowej 300 kDa (40). Jedną z przyczyn tego zjawiska mogło być uwięzienie części komórek na powierzchni kapsulek w czasie ich wytwarzania i wystawanie ich na zewnątrz membran. Autorzy badań uważają, że większą wiarygodność w odniesieniu do właściwości immunoizolacyjnych membran osłaniających wszczepy tkankowe, mają prace z użyciem żywych komórek, niż te, w których wykorzystuje się modelowe substancje o zdefiniowanych wymiarach molekularnych.

Interesujące spostrzeżenia dotyczące problemu immunoizolacji ksenotransplantów immobilizowanych w żelowych kulkach alginianowych bez zewnętrznej warstwy polilizyny, opisał Lanza i wsp. (41). Po dootrzewnowym wszczępieniu myszom świńskich i bydłęcych wysepek trzustkowych unieruchomionych w żelu, normoglikemię utrzymywano w ciągu 10 tygodni bez immunosupresji, podczas gdy wyseпки bez osłony funkcjonowały zaledwie 4 dni. Według autorów było to zaskakujące, gdyż wcześniej uważano, że żel alginianowy bez dodatkowej warstwy zewnętrznej jest zbyt porowaty, aby zapewnić dostateczną izolację wszczepu przed składnikami humoralnymi układu odpornościowego. Przypuszcza się, że ujemnie naładowane makrocząsteczki alginianu mogły oddziaływać elektrostatycznie na białka humoralne, także elektroujemne w warunkach fizjologicznych. Wśród innych zjawisk wyjaśniających immunoizolację wszczepu w alginianie, wymieniało także niespecyficzne tworzenie się na powierzchni kulek cienkiej warstewki surowiczych białek.

Wymiary porów w żelowych kulkach alginianowych sieciowanych jonem wapnia, zależą od rodzaju i stężenia alginianu i w warstwie powierzchniowej zawierają się w przedziale od 6 do 17 nm (38,42). Żel alginianowy, niepokrywany dodatkowym polimerem jest zatem nieprzepuszczalny dla cytotoksycznych komórek układu odpornościowego, lecz przepuszczalny co najmniej dla makrocząsteczki IgG.

3.2. Utrzymanie żywotności wszczepianej tkanki i jej funkcji

Żywotność komórek w biohybrydowych, sztucznych narządach zależy w dużym stopniu od biozgodności materiału użytego do budowy immunoizolacyjnego pojemnika, zarówno z wszczepianym materiałem biologicznym, jak i organizmem biorcy. Dla prawidłowego funkcjonowania wszczepu konieczny jest także swobodny dostęp do wnętrza implantu składników odżywczych i tlenu.

Określenie „biozgodność”, wyraża brak klinicznie istotnej reakcji organizmu na naturalne lub syntetyczne materiały wprowadzane w postaci implantów do ciała człowieka. W przypadku wszczepów zawierających żywe komórki, materiał użyty do budowy immunoizolacyjnych pojemników nie może być dla nich toksyczny i nie może interferować z funkcjami komórek (18).

Wpływ materiałów stosowanych do wytwarzania sztucznych narządów na żywotność komórek, był omawiany wyłącznie w odniesieniu do mikrokapsułkowania. W większości technik mikrokapsułkowania, komórki są najpierw zawieszane w roztworach polimerów o właściwościach polielektrolitów, a następnie na bazie różnych reakcji wytwarza się zewnętrzną membranę. Ze względu na bezpośredni kontakt komórek z roztworem polimeru, do wytwarzania kapsułek nadają się wyłącznie polimery rozpuszczalne w wodzie. Spośród kilkunastu polielektrolitów już stosowanych i o przypuszczalnej przydatności do mikrokapsułkowania tkanek, zbadanych na cytotoksyczność w stosunku do wysepek trzustkowych, tylko niektóre polimery pochodzenia naturalnego wykazywały akceptowalny poziom biogodności (20). Należały do nich alginian, karboksymetyloceluloza, karagen, ksantan i kwas hialuronowy. Wśród polimerów syntetycznych tylko wysokocząsteczkowy kwas poliakrylowy był umiarkowanie cytotoksyczny, podczas gdy większość poliamin powodowała śmierć komórek przy niewielkich stężeniach. Ogólnie można stwierdzić, że bardziej biogodne w stosunku do immobilizowanych komórek były polimery o właściwościach polianionów.

Problem biogodności tworzyw, z których wykonywano pojemniki sztucznych narządów, z organizmem biorcy, był w literaturze omawiany częściej, ze względu na możliwość specyficznej stymulacji układu odpornościowego organizmu biorcy, w konsekwencji prowadzącej do zespołu reakcji zapalnej i odkładania się na powierzchni pojemnika komórek fibroblastów (43,44).

Zjawiska zachodzące na powierzchni sztucznego narządu, implantowanego do ciała biorcy, są determinowane właściwościami powierzchni i obejmują adsorpcję białek oraz adhezję komórek (45). Procesy adsorpcji i adhezji są wywołane typowymi oddziaływaniami, jak siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne, siły hydratacyjne, oddziaływania hydrofobowe i inne, specyficzne siły powierzchniowe, np. mostki wapniowe lub wiązania wodorowe. Dodatkowo, na powierzchniowe właściwości tworzyw mogą wpływać obecne w nich zanieczyszczenia, szczególnie pochodzenia biologicznego, różne dodatki i stabilizatory, a także sposób sterylizacji (43).

Syntetyczne polimery, jak poliakrylonitryl i polisulfon, używane do wytwarzania dyfuzyjnych pojemników typu *hollow-fibre*, nie powodują istotnej aktywacji układu odpornościowego (46). Ze względu na wysoką biogodność, te dwa tworzywa są powszechnie wykorzystywane do budowy membran dializacyjnych sztucznych nerek (43).

Mikrokapsułki wytwarzane tylko z alginianu lub alginianu pokrywanego polilizyną, wykazywały zróżnicowany poziom biogodności. W doświadczeniach *in vivo* z wysepkami trzustkowymi zamykanymi w kapsułkach AP, po krótkim czasie stwierdzano pokrywanie kapsułek tkanką włóknistą i obecność makrofagów (23,26,47,48). Zjawisko wyjaśniano oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy komórkami o ujemnym ładunku powierzchniowym i dodatnio naładowaną polilizyną (23), lub stopniowym uwalnianiem się polilizyny z powierzchni alginianu i reakcją organizmu biorcy na alginian (48). W celu zredukowania adsorpcji białek i adhezji komórek do mikrokapsułek AP, stosowano neutralizację powierzchniowych ładunków polilizyny niejono-

wymi polimerami jak tlenek polietylenu (49), modyfikowany glikol polietylenu (24,50) i alkohol poliwinylowy (50).

Szeroką dyskusję w literaturze medycznej wywołał problem biogodności alginianów, komercyjnie wytwarzanych w odmianach zawierających różne proporcje kwasu mannuronowego (typ M) i guluronowego (typ G). W kilku publikacjach opisano immunostymulacyjną aktywność alginianów o dużej zawartości oligomerów typu M, oraz brak tej aktywności w alginianach typu G (44,51). Inni autorzy stwierdzili, że pokrycie tkanką łączną powierzchni kapsulek alginianowych jest spowodowane frakcjami niskocząsteczkowymi polimeru (52). Ostatnio, autorzy niemieccy wykazali obecność 10-20 immunostymulujących zanieczyszczeń w alginianach handlowych, które zawierały endotoksyny, składniki mitogenne, wolne kwasy tłuszczowe i polifenole (53,54). Alginiany handlowe pozbawione zanieczyszczeń, wykazywały bardzo dobrą biogodność *in vitro*, niezależnie od proporcji oligomerów M do G. Jednocześnie, kapsułki alginianu żelowane jonami baru, wszczepione szczurom o podwyższonej aktywności makrofagów (BB/OK), nie były pokrywane tkanką włóknistą i nie wykazywały infiltracji komórek odpornościowych do wnętrza (54).

Utrzymanie żywotności i właściwego funkcjonowania sztucznego narządu w organizmie biorcy wymaga zaopatrywania komórek w składniki odżywcze i tlen. Immunoizolacyjna membrana otaczająca wszczep nie powinna stanowić bariery dla przepływu niskocząsteczkowych związków, takich jak np. glukoza, a także większych cząsteczek, jak albumina i transferyna.

Największe zagrożenie dla żywotności wszczepianych komórek stanowi ograniczenie dostępu tlenu. Do najważniejszych czynników, od których zależy dostęp tlenu do zakapsułkowanych komórek wszczepianych do organizmu należą: 1) umiejscowienie wszczepu i lokalne, cząstkowe ciśnienie tlenu (pO_2), 2) ukrwienie miejsca wszczepu i odległość powierzchni implantu od najbliższych naczyń krwionośnych, 3) szybkość transportu tlenu przez tkankę otaczającą wszczep, immunoizolacyjną membranę i zakapsułkowaną tkankę, 4) szybkość zużywania tlenu przez wszczepione komórki, 5) kształt geometryczny wszczepu, oraz 6) gęstość wszczepionej tkanki i jej przestrzenne rozmieszczenie w pojemniku (3).

Wśród omówionych wcześniej immunoizolacyjnych pojemników, najlepsze natlenianie wszczepu zapewniały tętniczo-żylny boczni (szanty), w których membrana znajdowała się w kontakcie ze strumieniem krwi o pO_2 ~100 mm Hg. Z kolei, pojemniki dyfuzyjne i mikrokapsułki wszczepiane dotrzewnowo lub podskórnice są zwykle w kontakcie z układem mikronaczyń o średnim pO_2 ~40 mm Hg (55). W miejscach o niskiej, lokalnej prężności O_2 , duże znaczenie ma zatem wielkość i kształt geometryczny pojemnika sztucznego narządu. Najkorzystniejszy jest kulisty kształt mikrokapsulek, zapewniający wysoki stosunek powierzchni do objętości. Biorąc jednak pod uwagę przeciętną średnicę mikrokapsulek alginianowych, stosowanych do immobilizacji wysepek trzustkowych równą 800 μm , oraz średnicę pojedynczej wysepki wynoszącą około 150 μm , objętość zajmowana przez tkankę wynosi zaledwie 7%. Zasadne, jak się wydaje, są zatem próby budowania

warstwy immunoizolacyjnej bezpośrednio na wszczepianym wycinku tkanki lub pojedynczej komórce. Doświadczenie tego rodzaju wykonano już w odniesieniu do pojedynczych wysepek trzustkowych, otaczając tkankę 30 μm warstwą alginianu (54) lub 10 μm powłoką kopolimeru akrylanu i glikolu polietylenowego, żelowanego w reakcji fotopolimeryzacji (56).

3.3. Źródła tkanek do wytwarzania biohybrydowych, sztucznych narządów

Wymagania odnoszące się do masy tkanki lub liczby komórek zawartej w sztucznych narządach, zależą od szybkości wytwarzania aktywnej substancji przez komórki, oraz od ilości tej substancji wymaganej przez organizm dla celów terapeutycznych. Na przykład, przy leczeniu dolegliwości centralnego układu nerwowego, wymagana ilość związków neuroaktywnych jest zwykle niewielka i do ich wytwarzania wystarczy 10^6 - 10^7 komórek, zajmujących objętość około 1-10 μl (3). Z kolei, liczba wysepek Langerhansa potrzebna do transplantacji choremu o wymaganiach insulinowych 30-50 j./dobę wynosi od 10 000 do 20 000 na kilogram masy ciała (30). Odpowiada to objętości tkanki 1-2,5 ml, przy średniej masie ciała 70 kg.

W ostatnich latach, problem pozyskiwania tkanek do transplantacji jest tematem szerokiej dyskusji zarówno w odniesieniu do źródeł allogenicznych, jak i ksenogenicznych. W wielu krajach uporządkowano prawne zasady dostępu do tkanek pochodzących od dawców wielonarządowych i utworzono banki niektórych tkanek wykorzystując techniki krioprezerwacji. Potrzeby transplantacyjne są jednak znacznie większe niż możliwości pozyskiwania organów. Rozważa się zatem wykorzystanie do przeszczepów tkanki pochodzącej od zwierząt, pod warunkiem rozwiązania problemu immunoizolacji graftów i pełnej identyfikacji zagrożeń chorobami odzwierzęcymi (57).

Innymi, obiecującymi źródłami materiałów tkankowych do wykorzystania w immunoizolowanych przeszczepach, są ludzkie komórki zmodyfikowane genetycznie, wytwarzające pożądaną substancję czynną biologicznie. Pomimo pomyślnych doświadczeń *in vitro* oraz na omówionych modelach zwierzęcych (28,29), istnieje pilna potrzeba opracowania metod hodowli standaryzowanych, rekombinowanych linii komórkowych na masową skalę. Dotyczy to szczególnie terapii, w których potrzeby transplantacyjne są szczególnie duże, na przykład leczenia cukrzycy.

4. Podsumowanie

Przeszczepy komórek i tkanek o zróżnicowanych funkcjach, bez wątpienia będą w przyszłości odgrywały ważną rolę w terapii chorób układowych. Zanim to jednak nastąpi, konieczny jest jeszcze znaczny postęp badań w dziedzinie dokładnego poznania mechanizmów odrzucania przeszczepów, wywarzania i modelowania pojemników do przeszczepianej tkanki z materiałów o wysokiej biogodności, rozwiązania problemu pozyskiwania tkanek do transplantacji, a także wielu problemów klinicznych. Pomyślne próby przeszczep-

pów ksenogenicznych z użyciem biohybrydowych, sztucznych narządów, wykonane na zwierzętach, otworzyły już drogę do pierwszych testów klinicznych na ludziach. Amerykańska agencja FDA umożliwiła ostatnio próby kliniczne ksenotransplantacji zakapsułkowanych świńskich wysepek trzustkowych w leczeniu cukrzycy, wszczepów świńskiej tkanki nerwowej do mózgu w leczeniu choroby Parkinsona i Huntingtona, oraz wszczepów chromafinowych komórek bydlęcych do rdzenia kręgowego w leczeniu objawów silnego bólu (58).

Literatura

1. Lacy P. E., (1995), *Scientific American*, 273, 50-58.
2. Kahan B. D., (1989), *New England Journal of Medicine*, 321, 1725-1738.
3. Colton C. K., (1996), *Trends in Biotechnology*, 14, 158-162.
4. Lanza R. P., Chick W. L., (1997), *Surgery*, 121, 1-9.
5. Lanza R. P., Hayes J. L., Chick W. L., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 1107-1111.
6. Kamlot A., Rozga J., Watanabe F. D., Demetriou A. A., (1996), *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 382-391.
7. Colton C. K., (1995), *Cell Transplantation*, 4, 415-436.
8. Chick W. L., Like A. A., Lauris V., (1975), *Science*, 187, 847-849.
9. Tze W. J., Wong F. C., Chen I. M., (1976), *Nature*, 246, 466-467.
10. Sullivan S. J., Maki T., Borland K. M., Mahoney M. D., Solomon B. A., Muller T. E., Monaco A. P., Chick W. L., (1991), *Science*, 252, 718-721.
11. Maki T., Otsu I., O'Neil J. J., Dunleavy K., Mullon C. J. P., Solomon B. A., Monaco A. P., (1996), *Diabetes*, 45, 342-347.
12. Kessler L., Pinget M., Aprahamian M., Poinot D., Keipes M., Demge C., (1992), *Transplantation Proceedings*, 24, 953-954.
13. Lacy P. E., Hegre O. D., Gerasimidu-Vazeon A., Gentile F. T., Dionne K. F., (1991), *Science*, 254, 1782-1784.
14. Lanza R. P., Borland K. M., Staruk J. E., Appel M. C., Solomon B. A., Chick W. L., (1992), *Endocrinology*, 131, 637-642.
15. Joseph J. M., Goddard M. B., Mills J., Padrun V., Zurn A., Zielinski B., Favre J., Gardaz J. P., Mosimann F., Sagen J., Christenson L., Aebischer P., (1994), *Cell Transplantation*, 3, 355-364.
16. Aebischer P., Buscher E., Joseph J. M., Favre J., de Tribelet N., Lysaght M. J., Rudnick S. A., Goddard M. B., (1994), *Transplantation*, 58, 1275-1277.
17. Hagihara Y., Saitoh Y., Iwata H., Taki T., Hirano S., Arita N., Hayakawa T., (1997), *Cell Transplantation*, 6, 527-530.
18. Anderson J. M., (1988), *Transactions of American Society of Artificial Internal Organs*, 34, 101-107.
19. Jen A. C., Wake M. C., Mikos A. G., (1996), *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 357-364.
20. Hunkeler D., (1997), *Trends in Polymer Science*, 5, 286-293.
21. Lim F., Sun A. M., (1980), *Science*, 210, 908-910.
22. Langer R., Vacanti J. P., (1993), *Science*, 260, 920-926.
23. Fan M., Lum Z., Fu X., Levesque L., Tai I., Sun A. M., (1990), *Diabetes*, 39, 519-522.
24. Sawhney A. S., Pathak C. P., Hubbel J. A., (1993), *Biomaterials*, 14, 1008-1017.
25. Soon-Shiong P., Feldman E., Nelson R., Heintz R., Merideth N., Sandford P., Zeng T., Komtebedde J., (1992), *Transplantation Proceedings*, 24, 2946-2947.
26. de Vos P., de Haan B. J., Wolters G. H. J., van Schilfgaarde R., (1996), *Transplantation*, 62, 888-893.
27. Hasse C., Zielke A., Klöck G., Barth P., Schlosser A., Zimmerman U., (1997), *Journal of Microencapsulation*, 14, 617-626.

28. Chang P. L., Shen N., Westcott A., (1993), *Human Gene Therapy*, 4, 433-440.
29. Liu H., Ofosu F. A., Chang P. L., (1993), *Human Gene Therapy*, 4, 291-301.
30. Soon-Shiong P., Heintz R., Meredith N., Zao Q. X., 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.
31. Calafiore R., Basta G., Osticioli L., Luca G., Tortoioli C., Brunetti P., (1996), *Transplantation Proceedings*, 28, 812-813.
32. Takagi T., Iwata H., Kobayashi K., Oka T., Tsuji T., Ito F., (1994), *Transplantation Proceedings*, 26, 801-802.
33. Sefton M. V., Stevenson W. T. K., (1993), *Advances in Polymer Science*, 107, 143-197.
34. Uludag H., Horvath V., Black J. P., Sefton M. V., (1994), *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 1199-1204.
35. Wells G. D. M., Fisher M. M., Sefton M. V., (1993), *Biomaterials*, 14, 615-620.
36. Wang T., Lacik I., Brissova M., Anilkumar A. V., Prokop A., Hunkeler D., Green R., Shahrokhi K., Powers A. C., (1997), *Nature Biotechnology*, 15, 358-362.
37. Wang T. G., (1998), *Artificial Organs*, 22, 68-74.
38. Li R., Altreuter D. H., Gentile F. T., (1996), *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 365-373.
39. Brissova M., Lacik I., Powers A. C., Wang T. G., (1996), *Analytical Biochemistry*, 242, 104-111.
40. Awrey D. E., Tse M., Hortelano G., Chang P. L., (1996), *Biotechnology and Bioengineering*, 52, 472-484.
41. Lanza R. P., Kuehtreiber W. M., Ecker D., Staruk J. E., Chick W. L., (1995), *Transplantation*, 59, 1377-1384.
42. Klein J., Stock J., Vorlop K. D., (1983), *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18, 86-91.
43. Ragaller M., Werner C., Bleyl J., Sigrid A., Jacobasch H. J., Albrecht D. M., (1998), *Kidney International*, 53 (suppl. 64), s84-s90.
44. Soon-Shiong P., Otterlei M., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Heintz R., (1991), *Transplantation Proceedings*, 23, 758-759.
45. Hubbell J. A., (1995), *Bio/Technology*, 13, 565-576.
46. Theodorou N.A., Howell S., (1979), *Transplantation*, 27, 350-352.
47. de Vos P., Wolters G. H. J., Fritschy W. M., van Schilfgaarde R., (1993), *International Journal of Artificial Organs*, 16, 205-212.
48. de Vos P., de Haan B., van Schilfgaarde R., (1997), *Biomaterials*, 18, 273-278.
49. Sawhney A. S., Hubbell J. A., (1992), *Biomaterials*, 13, 863-870.
50. Kung I. M., Wang F. F., Chang Y. C., Wang Y. J., (1995), *Biomaterials*, 16, 649-655.
51. Otterlei M., Ostgaard K., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Soon-Shiong P., Espevik T., (1991), *Journal of Immunotherapy*, 10, 286-291.
52. Petruzzo P., Cappai A., Ruiu G., Dessy E., Rescigno A., Brotzu G., (1997), *Transplantation Proceedings*, 29, 2129-2130.
53. Klöck G., Pfeiffermann A., Ryser C., Gröhn P., Kuttler B., Hahn H. J., Zimmermann U., (1997), *Biomaterials*, 18, 707-713.
54. Zimmermann U., (1997), *42nd International Centre of Biocybernetics Seminar*, (8-12 December), Warsaw, 9.
55. Colton C. K., (1995), *Cell Transplantation*, 4, 415-436.
56. Cruise G. M., Hegre O. D., Scharp D. S., Hubbell J. A., (1998), *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 655-665.
57. Murphy F. A., (1996), *Science*, 273, 746-748.
58. Cooper D. K. C., (1998), *Surgery International*, 40, 34-36.

Autor serdecznie dziękuje Panu dr. med. Fryderykowi Pukackiemu z Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń Akademii Medycznej w Poznaniu, za cenne uwagi i sugestie w trakcie przygotowania artykułu.

Biohybrid artificial organs in therapy of systemic disorders

Summary

Transplantation of cells and tissues secreting a desirable therapeutic product shows a potential in the treatment of many human diseases such as diabetes, hemophilia, dwarfism, immunodeficiencies, anemia, hypocalcemia, and some neurodegenerative disorders. To avoid graft rejection, the transplanted tissue is immunoisolated in a semipermeable membrane, thereby creating an implantable biohybrid artificial organ.

A number of encapsulation systems such as vascular implants, diffusion chambers, and microcapsules have been developed for cell therapy. The encapsulation membrane should allow for diffusion of nutrients, dissolved gases, and wastes and should be impermeable to the components of the immune system, including cellular and humoral components.

Encapsulation cell technology offers a solution to the problem of donor organ supply, not only by potentially allowing the transplantation of cells and tissues without immunosuppression, but also by permitting use of tissue isolated from animals. However, further research is required in the areas of encapsulation device design and tissue supply from primary or cell-culture sources.

Key words:

transplantation, encapsulation, immunoisolation, cell therapy.

Adres do korespondencji:

Tomasz Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.