

Maria Magdalena GROLIK, Koło Naukowe Biomechaniki przy Katedrze Mechaniki Stosowanej, Politechnika Śląska, Gliwice

Sylwia FIEJDASZ, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

MATERIAŁY DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

Streszczenie. Niniejszy artykuł został poświęcony tematyce związanej z inżynierią tkankową. Dziedzina ta, pomimo tego, że jest stosunkowo młoda rozwija się dosyć prędko. Łącząc w sobie zagadnienia z wielu dyscyplin naukowych (inżynierii materiałowej, chemii, biologii, medycyny) ma na celu regenerację uszkodzonych tkanek i narządów. Bardzo ważną rolę w całym procesie dogrywiają materiały, które mają posłużyć jako mechaniczne wsparcie dla rosnących tkanek. Dobór i odpowiednia obróbka materiałów jest kluczowa dla powodzenia tej techniki.

1. WSTĘP

Inżynierię tkankową (*ang. Tissue Engineering*, TE) można uznać za interdyscyplinarną dziedzinę, łączącą w sobie podstawy inżynierii, nauk przyrodniczych (biologia, biochemia, chemia) i medycznych w celu uzyskania biologicznych substytutów, które mają za zadanie regenerację, utrzymanie lub też poprawienie funkcjonowania tkanki [1].

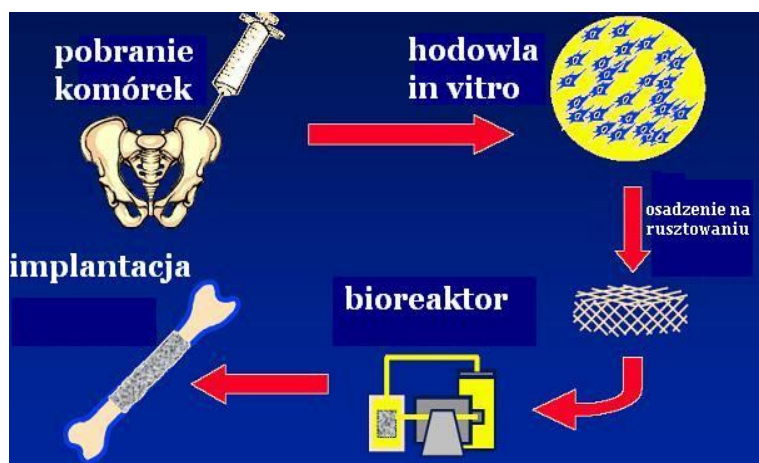
Początki inżynierii tkankowej przypadają na lata osiemdziesiąte XX wieku. W 1993 chemik J. Langer oraz chirurg J.P. Vacanti opublikowali artykuł: „Tissue Engineering” w prestiżowym magazynie *Science*, zwracając uwagę naukowego świata na tę posiadającą ogromne możliwości rozwoju dziedzinę. Celem poszukiwań jest uzyskanie funkcjonalnego materiału biologicznego, który będzie w stanie zastąpić lub zregenerować uszkodzoną tkankę w organizmie i przywrócić jej funkcję. Taki materiał powinien posiadać architekturę w pełni przypominającą tkankę naturalną, z jej niezwykłymi właściwościami mechanicznymi [2, 5]. Inżynieria tkankowa, zaraz po transplantologii i chirurgii rekonstrukcyjnej, uważana jest za trzecią z form terapii w medycynie. Jako forma terapii regeneracyjnej unika problemów związanych z przeszczepami organów, takich jak na przykład niewystarczająca liczba dawców czy też leki immunosupresyjne, zapobiegające odrzutowi organów. Nie wymaga również implantacji sztucznych protez, materiałów o względnie niskiej biogodności. Wymienione zalety inżynierii tkankowej sprawiają, że wzrasta prawdopodobieństwo powodzenia procesu regeneracji tkankowej, z jednoczesnym spadkiem liczby powikłań [3].

2. PODSTAWOWE ZAGADNIENIA INŻYNIERII TKANKOWEJ

2.1. Fazy inżynierii tkankowej

Jeśli chodzi o inżynierię tkankową, można wyróżnić trzy główne podejścia. Pierwsze zakłada użycie wyizolowanych komórek lub substytutów komórkowych w celu zastąpienia komórek odpowiedzialnych za pożądane funkcje. Innymi słowy ma miejsce wstrzyknięcie zawiesiny komórkowej w celu regeneracji uszkodzonego narządu lub tkanki. Drugie opiera się na dostarczeniu czynników indukujących wzrost tkanki tj. czynniki wzrostu, różnicowania się do konkretnych lokalizacji. Niestety dwa pierwsze rodzaje regeneracji na dzień dzisiejszy mają ograniczone zastosowanie, wykorzystywane są w przypadku niewielkich uszkodzeń. Trzecie i zarazem najważniejsze, proponuje hodowlę komórek na trójwymiarowych rusztowaniach, których właśnie dotyczy niniejszy artykuł [1,8].

Wszystkie fazy inżynierii tkankowej zostały przedstawione poniżej (Rys.1). Podstawą procesu jest wyizolowanie komórek (punkt 2.2), które następnie są namnażane w środowisku *in vitro*. Kolejnym etapem jest wysiewanie komórek na trójwymiarowym rusztowaniu, najczęściej polimerowym. Całość zostaje przeniesiona do tzw. bioreaktora, gdzie prowadzona jest specjalistyczna hodowla konkretnych tkanek czy narządów. Bioreaktor zapewnia właściwe warunki środowiskowe, dostarczenie czynników wzrostu oraz pożywki hodowlanej [1, 4].



Rys.1 Fazy inżynierii tkankowej [4]

2.2 Komórki

Głównymi składnikami niezbędnymi w inżynierii tkankowej są komórki, które mogą pochodzić z różnorodnych źródeł, stąd też wynika ich klasyfikacja:

- *ksenogeniczne* tj. pochodzące od obcego gatunku
- *allogeniczne* tj. przeszczep następuje w obrębie tego samego gatunku
- *syngeniczne* tj. jednorodne, pochodzące od osobników identycznych genetycznie lub
- *autologiczne* tj. przeszczep w obrębie tego samego ustroju

Komórki macierzyste i prekursorowe są obecne w małej liczbie we wszystkich głównych tkankach i określa się je jako komórki proliferacyjnie nieaktywne. Ze wszystkich potencjalnych źródeł tych komórek, najłatwiejszym i najmniej inwazyjnym sposobem ich otrzymania jest ich pobranie ze szpiku kostnego drogą przezskórnej biopsji. W przypadkach,

kiedy stosowane są komórki autologiczne, można uniknąć problemów z układem immunologicznym, ponieważ organizm nie potraktuje ich jako obcych [6, 7].

2.3 Rusztowanie komórkowe

Pojęciem *rusztowanie komórkowe* określa się *zewnątrzkomórkową matrycę (ECM Extracellular Matrix)* otaczającą komórki w ciele. Jej głównym zadaniem jest fizycznie wspieranie komórek oraz regulacja ich namnażania, różnicowania i morfogenezy. Naturalna regeneracja uszkodzonych tkanek jest praktycznie niemożliwa, jeśli komórki nie są zaopatrywane w substytut ECM. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu jest umieszczenie rusztowania ze sztucznej ECM w miejscu uszkodzenia, co ułatwia proces regeneracji. Dodatkowo spełnia wiele różnych istotnych funkcji:

- mechaniczna podpora dla komórek i tkanek
- scalanie komórek w tkanki
- wpływanie na kształt i ruch komórek
- wpływanie na rozwój i różnicowanie się komórek
- kierowanie funkcjami komórek poprzez specyficzne sygnały (komórkowe receptory adhezyjne) [1, 3]

Jeżeli chodzi o strukturę to można wyróżnić kilka głównych składowych ECM:

- włókna: kolagen, elastyna (zapewniają wytrzymałość i elastyczność)
- proteoglikany: proteoglican = (protein+GAGs) czyli kompleksy białko-cukier (zapewniają duże rozmiary, objętość matrycy)
- adhezyjne glikoproteiny: np. fibronektyna, laminina pośredniczą w połączeniach ECM z błoną komórkową komórek („sklejają” komórki i ECM);
- glikoaminoglikany (GAGs): polimery hydrofilowe disacharydów tworzące matrycę żelatynową, duży ładunek ujemny [15]

Rusztowania z materiałów syntetycznych bądź naturalnych, powinny w jak największym stopniu odzwierciedlać cechy i funkcje naturalnej matrycy. Syntetyczne rusztowanie wszczepione w uszkodzone miejsce, po spełnieniu swojego zadania, czyli umożliwieniu wzrostu komórek, powinno ulec stopniowemu rozkładowi na rzecz naturalnej ECM.

2.4 Materiały na rusztowania komórkowe.

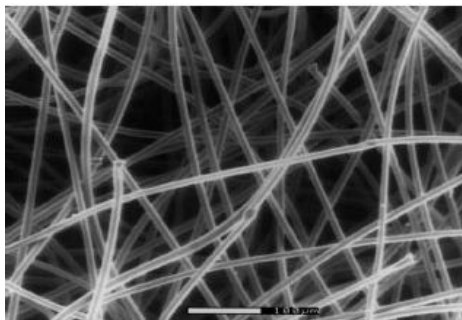
Idealny materiał na rusztowania komórkowe (*ang. scaffold*) powinien charakteryzować się:

- biozgodnością
- bioresorbowalnością
- wysokim stopniem porowatości
- nietoksycznymi i łatwo usuwalnymi produktami rozkładu
- sprzyjającym środowiskiem do namnażania komórek
- odpowiednimi właściwościami mechanicznymi.

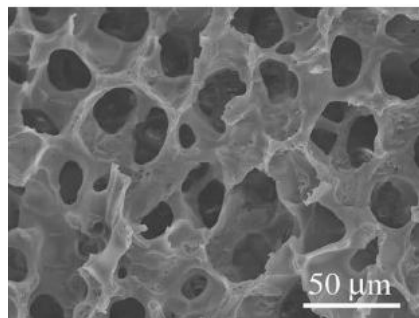
Materiały wykorzystuje się w zależności od przeznaczenia. Przykładowo inne stosowane są w ortopedii, inne w kardiologii. Obecnie w użytku można spotkać metale, ceramikę, a także polimery, które znajdują największe zastosowanie.

2.4.1 Polimery syntetyczne (PGA, PLA, PLGA)

1) **PGA - poliglikolid** (Rys 2) uważa się za najczęściej używany materiał na rusztowania wykonane z polimerów biodegradowalnych. W środowisku wodnym bądź in vivo ulega szybkiej degradacji tracąc przy tym swoje mechaniczne właściwości (w przeciągu 2 do 4 tygodni) [8]



Rys 2. Obraz PGA spod skaningowego mikroskopu elektronowego [8]

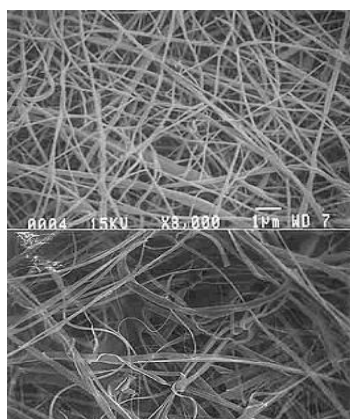


Rys 3. Obraz porowatego rusztowania komórkowego PLGA spod skaningowego mikroskopu elektronowego [8]

2) Popularnym materiałem jest także **PLA- polilaktyd** (Rys. 3). Dzięki dodatkowej grupie metylowej jest on bardziej hydrofobowy niż wymieniony wcześniej PGA.. Jego degradacja jest znacznie wolniejsza. Poprzez regulację stężenia odpowiednich merów PGA i PLA można uzyskać kopolimer (**PLGA**) o właściwościach pośrednich pomiędzy wyżej wymienionymi rodzajami polimerów [8]

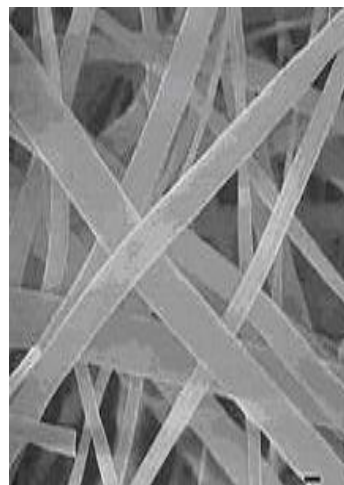
2.4.2 Polimery naturalne (kolagen, elastyna, chitozan, alginiany)

1) **Kolagen** wchodzi w skład naturalnej matrycy ECM, zapewniając mechaniczną wytrzymałość tkankom. Po implantacji wywołuje minimalną reakcję zapalną. Stosowano go z sukcesem jako rusztowanie do regeneracji skóry, nerwów, pęcherza moczowego (Rys 4, 5) [12]



Rys. 4. Spleciony kolagen typu I. Ilustracja włókien o średnicy $100 + 40$ nm

Rys 5. Spleciony kolagen typu I. Włókna o średnicy $4,63 + 2,09$ μm [13]



Rys 6. Splecione włókna elastyny o średnicy 1.1 ± 0.7 μm [13]

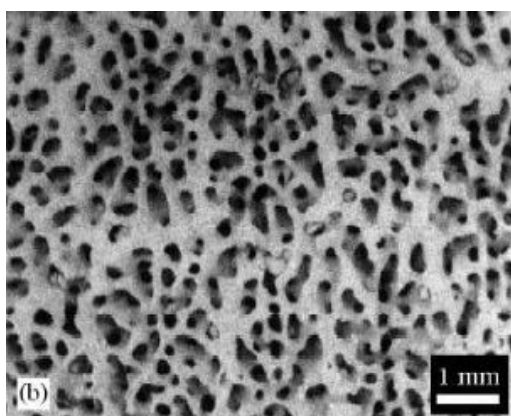
2) Materiały oparte na **elastynie** zysują coraz większą popularność jako biomateriały stosowane w inżynierii tkankowej. Jest ona naturalnym polipeptydem, wchodzącym w skład matrycy zewnątrzkomórkowej (ECM). Głównie odpowiada za zapewnienie elastyczności tkankom, narządom i w związku z tym, występuje w organach, w których niezbędna jest elastyczność np. naczynia krwionośne, płuca i skóra. Elastyna to główny składnik włókien elastycznych (Rys 6) [14]

3) **Chitozan** to materiał pochodzenia naturalnego, otrzymywany w wyniku deacetylacji chityny pozyskiwanej z pancerzy skorupiaków morskich. Badania wykazały, że ma właściwości antybakteryjne, hemostatyczne i jest biokompatybilny, co sprawia, że jest bardzo obiecujący jako materiał na rusztowania dla inżynierii tkankowej. [16]

4) **Alginiany i kwas alginowy** uzyskuje się ze ścian komórkowych różnych brązowych alg morskich i trawy morskiej. Kwas alginowy nie rozpuszcza się w wodzie, za to bardzo dobrze pęcznieje w środowisku wodnym. Potrafi przyjąć trzykrotną ilość wody w stosunku do własnej wagi. Są bardzo aktywnymi substancjami żelującymi.

2.4.3 Materiały ceramiczne (hydroxyapatyt, bioszkła)

Hydroxyapatyt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - hydroksyfosforan wapnia) sól kompleksowa wapniowo i fosforowa jest materiałem bioceramicznym wykazującym chemiczne i mineralogiczne podobieństwo do komponentu nieorganicznego kości i zębów. Stanowi w nich rusztowanie zapewniające mechaniczne właściwości. Odznacza się dużą biozgodnością w stosunku do tkanek. [11]



Rys 7. Obraz z mikroskopu skaningowego – rusztowanie z hydroxyapatytu [11]

3. PODSUMOWANIE

Postępy nauki w dziedzinie biologii, biotechnologii i medycyny przyczyniają się do rozwoju obiecujących koncepcji genowych i tkankowych służących profilaktyce oraz leczeniu chorób i dysfunkcji organizmu ludzkiego. Bieżące zastosowania tej rodzącej się dziedziny „medycyny regeneracyjnej” obejmują leczenie chorób lub urazów skórnych, chrząstkowych i kostnych. Niemniej pomimo obiecujących wyników klinicznych nadal muszą być prowadzone intensywne badania nad nowymi i coraz lepszymi materiałami, które będą w stanie uratować każdy organ.

LITERATURA

- [1] R. Langer, J.P. Vacanti „Tissue engineering” Science Vol. 260. no. 5110, (1993) pp. 920 - 926
- [2] „Puls”. Pismo Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie. Numer 2004-06.
- [3] Y. Tabata. „Recent progress in tissue engineering” Drug Discovery Today Vol. 6, Issue 9, (2001), p. 483-487
- [4] Rui L. Reis “Tissue Engineering: The Essential elements” 3B’s Research Group Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics. University of Minho, Campus de Gualtar. Portugal.
- [5] <http://tissue-engineering.webpark.pl/tis-en.html/>
- [6] Nicholas Krebs “Tissue Engineering Advances in Cardiac Tissue Engineering and Cardiac Tissue Replacement Modalities”, 2002 Department of Biomedical Engineering
- [7] <http://www.cartilage.pl/>
- [8] Peter X. Ma “Scaffold for tissue fabrication” Materials Today vol 7 issue 5, May (2004) p. 30-40
- [9] M. M. Stevensa, M. Mayerb "Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps", Biomaterials Volume 26, Issue 36, December (2005), p. 7636-7641
- [10] www.poli-farm.pl/chitozanfitc.htm
- [11] <http://fluid.ippt.gov.pl/seminar/text/jedynski040106.pdf>
- [12] Kaeuis A. Faraj, Toin H. VanKuppevelt, Willke F. Daamen “Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues” Tissue engineering, vol 13, number 10 (2007) p. 2387- 94
- [13] <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1313/figures.htm>
- [14] W.F. Daamena, J.H. Veerkampa, J.C.M. van Hestb, T.H. van Kuppevelta, “Elastin as a biomaterial for tissue engineering” Biomaterials 28 (2007) p. 4378–4398
- [15] <http://ipmc.epfl.ch/webdav/site/ipmc/shared/BB-03/08%20ECM%202006.pdf>
- [16] D.L. Nettles, S.H. Elder, J.A. Gilbert “Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering” Tissue engineering vol.8 number 6 (2002) p. 1009-1016

MATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING

Summary. This article is dedicated to the topic connected with tissue engineering. Despite the fact that this field is relatively young it is developing quite quickly. It combines the principles of many disciplines (material engineering, chemistry, biology, medicine) in order to regenerate damaged tissues and organs. Materials are very important in the whole process - they provide the mechanical support for growing tissues. The selection of materials and their fabrication plays the key role in this technique.