

MARIA GROLIK

(UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI)

## INŻYNIERIA TKANKOWA – NOWE NARZĘDZIE W REKONSTRUKCJI TKANEK

### WSTĘP

Inżynieria tkankowa (ang. *Tissue Engineering*, TE) jest dyscypliną naukową, która proponuje nowe, alternatywne rozwiązania, zmieniające sposób podejścia do leczenia przy pomocy przeszczepów oraz uzupełnień ubytków narządów lub tkanek.

Początki inżynierii tkankowej przypadają na lata osiemdziesiąte XX wieku. W 1993 chemik J. Langer oraz chirurg J.P. Vacanti zwrócili uwagę całego naukowego świata na potencjał oraz ogromne możliwości tej młodej dziedziny [3]. Za główny cel inżynierii tkankowej uważa się otrzymanie materiału biologicznego, dzięki któremu możliwe byłoby zastąpienie, przywrócenie lub podtrzymanie podstawowych funkcji uszkodzonych tkanek bądź całych narządów. Materiał ten powinien posiadać strukturę biochemiczną w pełni przypominającą tkankę naturalną, z jej niezwyklejmi właściwościami mechanicznymi [2, 13].

### INŻYNIERIA TKANKOWA – PODSTAWOWE ZAGADNIENIA

Zakłada się, iż do prawidłowego, wydajnego przebiegu procesu regeneracji tkanki koniecznych jest kilka zależnych wzajemnie od siebie elementów. Zaliczamy do nich przede wszystkim rusztowanie (nośnik, podłoże), komórki hodowane w środowisku *in vitro* (poza organizmem), które integrują się z rusztowaniem, oraz różnego rodzaju czynniki wzrostu, hormony i witaminy występujące w specjalnie do tego przeznaczonych, dostępnych komercyjnie pożywkach

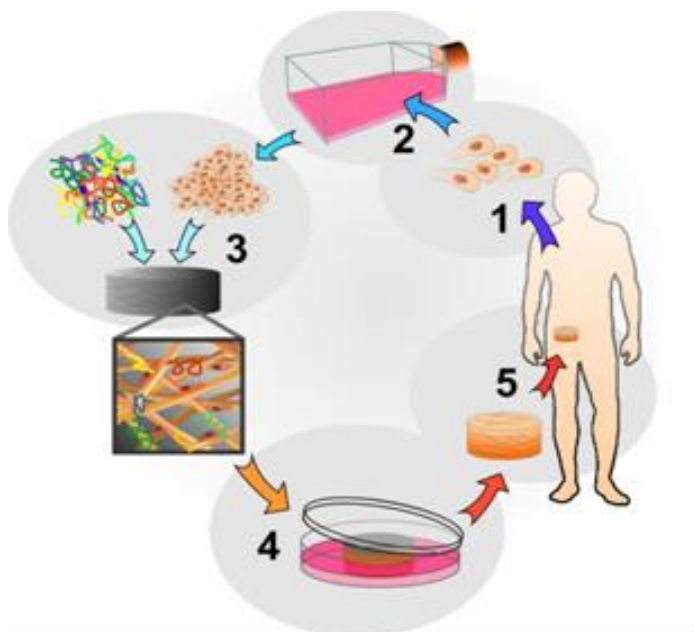
hodowlanych. Wykorzystanie przestrzennych struktur do hodowli komórek ułatwia uzyskanie tkanki o pożądanym kształcie oraz wielkości, ale także decyduje o prawidłowym funkcjonowaniu komórek [2, 3, 4, 5, 6].

#### FAZY INŻYNIERII TKANKOWEJ

Proces rekonstrukcji uszkodzonych tkanek (narządów) składa się z określonej sekwencji zdarzeń i przebiega etapowo. Początkowo z organizmu pacjenta bądź innego dawcy pobiera się fragment tkanki (biopsja). Pozyskany w ten sposób materiał poddaje się obróbce polegającej na uwolnieniu komórek z naturalnej macierzy otaczającej je w organizmie.

Następnie uzyskane komórki wysiewa się na rusztowaniach komórkowych (*in vitro*) symulujących natywną macierz łącznotkankową, dodając przy tym czynniki wzrostu, których głównym zadaniem jest przyspieszenie procesu proliferacji.

Rys. 1. Przebieg fazy inżynierii tkankowej [23]



Następnie tak przygotowany nośnik (wraz z wysianymi na nim komórkami) umieszczany jest w jałowej komorze bioreaktora, gdzie zachodzi proces namnażania komórek.

## KOMÓRKI WYKORZYSTYWANE W INŻYNIERII TKANKOWEJ

W inżynierii tkankowej podstawą są komórki. Mogą one pochodzi z różnorodnych źródeł:

1. ksenogeniczne, pochodzące od obcego gatunku;
2. allogeniczne, przeszczep następuje w obrębie tego samego gatunku;
3. syngeniczne, jednorodne, pochodzące od osobników identycznych genetycznie;
4. autologiczne, przeszczep w obrębie tego samego ustroju [16].

Strategie stosowane w inżynierii tkankowej wykorzystują rusztowania komórkowe głównie do namnażania pojedynczych komórek oraz scalania ich w tkankę. Bardzo istotny z punktu widzenia regeneracji jest jednak fakt, że komórki wykazują zdolność do produkcji składników natywnej macierzy łącznotkankowej [2]. Najczęściej spotykanym rozwiązaniem jest wszczepienie w miejsce ubytku rusztowań komórkowych pokrytych nahodowanymi wcześniej na nich komórkami. Inną, zupełnie odmienną możliwością jest bazowanie na rusztowaniach w postaci naturalnej matrycy komórkowej, uzyskanej w wyniku usunięcia komórek z tkanki. Pozbawione komórek rusztowanie wszczepiane jest do organizmu, gdzie w wyniku reakcji organizmu zostaje zasiedlone przez komórki gospodarza. W przypadkach, w których komórki pochodzą z tego samego ustroju (autologiczne), nie obserwuje się odpowiedzi układu immunologicznego pacjenta [16].

## RUSZTOWANIE KOMÓRKOWE

Kluczowym zadaniem rusztowania komórkowego (ang. *scaffold*) jest fizyczne stworzenie podłoża dla komórek i regulacja procesu proliferacji oraz różnicowania [6].

Jeśli komórkom nie dostarczy się naturalnego rusztowania komórkowego bądź jego substytutu, regeneracja jest praktycznie niemożliwa. Dlatego w przypadku niektórych urazów jedyną szansą na regenerację tkanki jest wprowadzenie sztucznej macierzy łącznotkankowej w miejsce uszkodzenia.

Za podstawowy parametr rusztowania komórkowego, decydujący o jego funkcji, przyjmuje się porowatość. Wielkość i ilość porów ma ogromny wpływ na przenikanie komórek do wnętrza implantu, co w konsekwencji wpływa korzystnie na regenerację uszkodzonej tkanki [6].

Prawidłowy przebieg odbudowy tkanki *in vitro* warunkowany jest nie tylko obecnością komórek i rusztowania, ale także sterujących procesami różnicowania komórek cytokin i czynników wzrostu [6].

Rusztowania komórkowe spełniają równocześnie wiele istotnych funkcji. Stanowią mechaniczną podporę dla komórek (tkanek), scalają je, wpływają na ich kształt, migrację oraz rozwój, a także kierują ich funkcjami poprzez oddziaływanie z receptorami na powierzchni komórek.

#### MATERIAŁY WYKORZYSTYWANE W INŻYNIERII TKANKOWEJ

Biomateriały wykorzystywane w inżynierii tkankowej w trakcie regeneracji uszkodzonej tkanki niejednokrotnie łączą się z nią trwale, dlatego też muszą one spełniać szereg ważnych kryteriów. Rusztowanie powinno odznaczać się biokompatybilnością (nie może powodować stanów pozapalnych, zmian nowotworowych ani mutagennych), bioresorbowalnością, odpowiednimi właściwościami wytrzymałościowymi (moduł sprężystości, wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie, sztywność itp.). Powinno też pozytywnie oddziaływać z komórkami i tkankami, tzn. należy uwzględnić zwiększoną przyczepność komórek do materiału rusztowania (adhezja), wzrost, migrację oraz funkcje różnicowania się komórek. Materiały wykorzystywane w inżynierii tkankowej powinny charakteryzować się wysoką porowatością struktury oraz odpowiednią wielkością porów. Biomateriał winien posiadać także zdolność do biodegradacji (szybkość musi być ściśle dobrana do tworzenia się nowej struktury tkankowej), a produkty jego rozkładu nie powinny być toksyczne dla organizmu.

W zależności od potrzeby do otrzymywania rusztowań stosuje się metale, ceramikę (w tym hydroksyapatyty, bioszkła), materiały węglowe, kompozyty oraz coraz częściej polimery, zarówno naturalne, jak i syntetyczne [14].

W chwili obecnej żaden z dostępnych materiałów implantacyjnych nie posiada właściwości takich, jakie wykazuje naturalna tkanka. Jest to kompromis pomiędzy różnorodnymi kryteriami jakościowymi, którymi powinien charakteryzować się biomateriał. Nie udało się stworzyć materiału przeznaczonego „na całe życie”, materiału obojętnego, który nie wchodziłby w reakcję z tkankami. Implant to zawsze ciało obce dla ludzkiego ciała, najczęściej o ściśle określonym czasie działania, i dlatego po spełnieniu swojej funkcji powinien być usuwany z organizmu [6, 9, 10, 14].

#### MATERIAŁY CERAMICZNE

Wśród materiałów implantacyjnych szczególne miejsce zajmują tworzywa oparte o fosforany wapnia (*ceramika hydroksyapatytowa HAp*, sól kompleksowa wapniowo-fosforowa). Nie wykazują one efektów prozapalnych ani mutagennych. Dzięki bioaktywności oraz wysokiej czystości chemicznej implanty ceramiczne mogą łączyć się bezpośrednio z tkanką (twardą lub miękką), przy tym odznaczają się również wysoką biogodnością. Dodatkowo, w zależności od po-

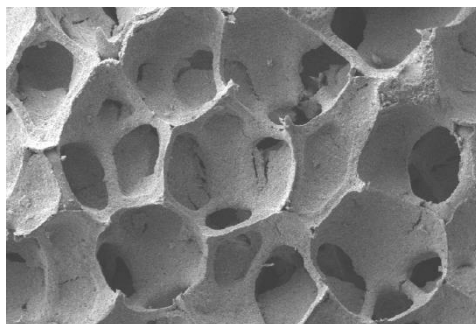
trzeby, istnieje możliwość utworzenia rusztowania komórkowego o różnym stopniu porowatości. Za wadę uznaje się niezadawalające parametry wytrzymałościowe i zawodność wykonanych rusztowań, co wpływa na zawężenie zakresu zastosowań HAp do miejsc, na które nie działają znaczne obciążenia mechaniczne [14].

Rys. 2. Przykłady (a) zastosowania ceramiki hydroksyapatytowej, (b) porowatej struktury hydroksyapatytu [23, 24]

(a)



(b)



## MATERIAŁY POLIMEROWE

Materiały polimerowe w medycynie stosuje się już od ponad 50 lat. Wykorzystuje się je do wytwarzania produktów jednorazowego użytku oraz do wyrobów implantów. Ich znaczenie wzrasta z dnia na dzień w miarę pojawiania się nowych materiałów o unikatowych właściwościach fizykochemicznych oraz bio-

logicznych, pojmowanych szeroko jako zgodność komórkowa i zgodność z komponentami żywego organizmu. Polimery biomedyczne podzielono na dwie podstawowe grupy: polimery pochodzenia naturalnego (biopolimery) i polimery syntetyczne [14].

## POLIMERY NATURALNE

Polimery występujące naturalnie w organizmach żywych i przez nie produkowane nazywamy biopolimerami. Do najpopularniejszych wykorzystywanych w medycynie zaliczamy białka (białka) oraz polisacharydy (wielocukry). Do najczęściej stosowanych w inżynierii tkankowej zaliczamy przede wszystkim chitozan, celulozę, kolagen i elastynę [14].

Chitozan to polisacharyd, substancja organiczna będąca pochodną chityny. W czystej postaci występuje jako składnik ścian komórkowych grzybów strzępkowych z klasy *Zygomycetes*, czyli popularnych „pleśni”. Na skalę przemysłową pozyskuje się go w procesie deacetylacji chityny – składnika budulcowego skorupiaków morskich. Chitozan uważany jest za polimer biodegradowalny, gdyż łatwo jest rozkładany na substancje pierwsze, z czym wiąże się nietoksyczność, bioaktywność i doskonała sorpcyjność (pochłanianie). Posiada on szereg przydatnych właściwości. Przykładowo, stosowanie opatrunków z chitozaniem przyspiesza zabliznianie trudno gojących się ran. Obniża on ciśnienie krwi i pomaga zwalczać arteriosklerozę (miażdżycę) – główną przyczynę nadciśnienia. Nazywany jest także biologicznie aktywną celulozą komórkową. Pod względem swoich właściwości podobny jest do ludzkiego włókna kolagenowego. Polimer ten stosowany jest także na szeroką skalę w produkcji otoczek na leki czy kosmetyków ze względu na jego właściwości ochronne [18, 19].

Kolagen i elastyna zaliczane są do białek strukturalnych. Kolagen odznacza się wysoką odpornością na rozciąganie oraz elastycznością, dzięki czemu stanowi podstawowy składnik ścięgien. To on odpowiedzialny jest za elastyczność skóry. Zaliczany do polimerów bioresorbowalnych, nierozpuszczalnych w wodzie, ulega denaturacji pod wpływem podwyższonej temperatury. Wykazuje znacznie mniejsze zróżnicowanie międzygatunkowe niż inne białka zwierzęce, cechując się ponadto stosunkowo niewielką immunogennością, dlatego też białko to znajduje szerokie zastosowanie w medycynie. Może być także skomponowane z innymi naturalnymi polimerami (np. chitozaniem), tworząc w ten sposób kompozytowe hydrożelowe rusztowanie komórkowe [7, 8].

Elastyna to białko tkanki łącznej. Nadaje sprężystość przede wszystkim skórze, więzadłom, tkance płucnej, ścianom naczyń krwionośnych. Dzięki niej tkanki po rozciągnięciu lub ściśnięciu odzyskują swój pierwotny kształt i wielkość. Polimer ten zaliczany jest do grupy polimerów inteligentnych (ang. *smart polymers*), wrażliwych na zmiany temperatury. Biomateriały na bazie elastyny

znajdują coraz szersze zastosowanie w inżynierii tkankowej. Wykorzystuje się je m.in. w przeszczepach naczyniowych, zastawkach serca lub do produkcji sztucznej skóry [7, 15, 20].

#### POLIMERY SYNTETYCZNE

Szczególą uwagę należy zwrócić na polimery bioresorbowalne, czyli takie, które degradują w środowisku biologicznym do nieszkodliwych produktów ubocznych. Produkty te występują naturalnie w organizmie jako produkty przemiany materii, a następnie są z organizmu wydalane. Obok nich stosuje się również polimery biodegradowalne. Materiały takie rozkładają się na produkty, które niekoniecznie występują naturalnie w organizmie, jednakże są one dla niego nieszkodliwe. Degradacja polimerów powinna być procesem kontrolowanym. Zbyt szybki rozkład może powodować nie tylko przedwczesną utratę właściwości mechanicznych, ale także uwalnianie w zbyt krótkim czasie znacznej ilości produktu degradacji, przekraczającej zdolność organizmu do jego wydalania. Do najczęściej stosowanych polimerów bioresorbowalnych zaliczamy: poliglikolid, polilaktydy, kopolimery glikolidu z laktydami [14].

Poliglikolid (poli(kwas glikolowy), PGA) jest polimerem bioresorbowalnym wykorzystywanym we współczesnej chirurgii do wyrobu implantów o dobrych właściwościach mechanicznych (śruby chirurgiczne, płytki, siatki i folie opatrunkowe). Czas degradacji takich wszczepów jest dobierany tak, aby po zrośnięciu się uszkodzonej tkanki spajający ją mechanicznie implant uległ całkowitej resorpcji. Kwas glikolowy stosuje się także do produkcji rusztowań komórkowych czy nici chirurgicznych, których dużą zaletą jest utrata wytrzymałości nawet do 50% już po 2 tygodniach, zaś całkowitej resorpcji ulegają one po 4-6 miesiącach. W porównaniu z polilaktydem (poli(kwasem mlekowym), PLA) cechuje go prawie dwukrotnie szybsze tempo rozkładu w środowisku *in vitro* [9, 14, 17, 21, 25].

Poprzez dobór odpowiednich stężeń monomerów GA i LA uzyskuje się kopolimer kwasu polimlekowego oraz kwasu glikolowego (PLGA) o właściwościach pośrednich pomiędzy wyżej opisanymi polimerami. Kopolimer ten najczęściej wykorzystywany jest do produkcji szwów chirurgicznych [25].

#### PODSUMOWANIE

Problem „naprawy” ubytków ludzkiego ciała zawsze wzbudzał zainteresowanie naukowców i ośrodków badawczych. Potocznie nazywana „naprawa” to proces mający na celu stworzenie lub też indukcję formowania się specyficznej tkanki w danym miejscu w wyniku czynności dokonywanych na komórkach, podłożach i czynnikach wzrostu.

Uważa się, że inżynieria tkankowa to przyszłość medycyny regeneracyjnej. Hodowla pojedynczych komórek lub całych tkanek poza żywym organizmem, za pomocą ciągle ewoluujących metod i technik, jest jednym z ciekawszych i ważnych zagadnień w ostatnich czasach nie tylko w medycynie i biologii, ale również chemii. Jako forma terapii regeneracyjnej unika ona problemów związanych z przeszczepami organów, na przykład niewystarczającą liczbą dawców czy leczeniem trwałego tłumienia immunologicznego. Nie wymaga również implantacji sztucznych protez (implantów), materiałów o względnie niskiej biozgodności [12].

## ABSTRACT

The loss or failure of an organ or tissue is one of the most devastating and costly problems in healthcare. Tissue engineering is a new field that applies the principles of biology, engineering and the life science in the development of functional substitutes for damaged tissue. Regeneration involves the creation of tissue identical to that which has been lost or injured. In contrast, tissue repair restores the damaged area with functional but different tissue. This approach uses two main components: cells and scaffolds [6, 11].

Scaffold development underpins the advancement of tissue engineering. Materials used for scaffold preparation play a major role and have found widespread biomedical applications in the development of synthetic skin substitutes, controlled drug release delivery, artificial tissue and organs, and biosensors. They have numerous advantages, such as biocompatibility, biodegradability, and anti-bacterial properties. They are safe for human use.

## BIBLIOGRAFIA

1. Krebs N., *Advances in Cardiac Engineering and Cardiac Tissue Replacement Modalities*, "Journal of Undergraduate Research", Vol. 2, No. 1.
2. Wojtowicz A., Szostak D., Malejczyk J., *Tissue engineering in oral surgery – review of new methodology*, „Nowa Stomatologia” 1/2002.
3. Langer R., Vacante J., *Tissue engineering*, "Science" 260 (1993).
4. Michalska M., Kozakiewicz M., Bodek K., *Polimerowe nośniki czynników angiogennych. Cz. I. Membrana chitozanolowo-alginianowa jako nośnik PDGF-AB i TGF-β*, „Polimery w Medycynie” 2008, T. XXXVIII, Nr 4.
5. Gelsea K., Poschlb E., Aigner T., *Collagens – structure, function, biosynthesis*, "Advanced Drug Delivery Reviews" 55 (2003).
6. Ma P.X., *Scaffolds for tissue fabrication*, "Materials Today", May 2004.
7. Daamena W.F., Veerkampa J.H., van Hestb J.C.M., van Kuppevelt T.H., *Elastin as a bio-material for tissue engineering*, "Biomaterials" 28 (2007).
8. Wisowski G., Olczyk K., Koźma E.M., *The influence of sorbitol on photooxidation-mediated crosslinking of porcine pericardial collagen*, „Biotechnologia”, 4 (71) 2005.
9. Jachimowicz M., *Projektowanie i wytwarzanie rusztowań stosowanych w rekonstrukcji tkanek biologicznych*, LXIV, Zeszyt 4/2005.
10. Ciupik L., Jędryc Ł., Kierzkowska A., *Biomaterials used for DERO implants: history, present-days, future*, Lfc.



11. Ranger L., *A new Field and its challenges*, "Pharmaceutical Research", Vol. 14, 1997.
12. Tabata Y., *Recent progress in tissue engineering*, "DDT" Vol. 6, No. 1, January 2001.
13. „Puls – Pismo Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie”, Nr 2004-06.
14. Nałęcz M., *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*, T. 4, Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003.
15. Minakowski W., Weidner S., *Biochemia kręgowców*, Warszawa 2005.
16. Kucharska M., Bocian K., Butruk B., Ciach T., *Implanty kostne*, „Przegląd Techniczny, Gazeta Inżynierska” 03.2008.
17. Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J., OPIS PATENTOWY PL 191846 B1.
18. [http://www.alejazdrowia.pl/product\\_info.php?products](http://www.alejazdrowia.pl/product_info.php?products).
19. <http://www.biolog.pl/article1258.html>.
20. [http://zschpraca.webpark.pl/podzial\\_bialek.htm](http://zschpraca.webpark.pl/podzial_bialek.htm).
21. <http://www.w3.aspoleczny.pl/Poliglikolid.html>.
22. <http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108Groups/group12/TEModelLarge.jpg>.
23. <http://www.ioi.com/>.
24. <http://www.ibs.upm.edu.my/~aini/micrograph.htm>.
25. [http://www.cmj.org/paper\\_journal/05/17/05/F051705\\_2.htm](http://www.cmj.org/paper_journal/05/17/05/F051705_2.htm).

Maria Grolik, e-mail: mg-b@tlen.pl