

IN VITRO KULTURE TKIVA: MIKROENKAPSULACIJA I BIOREKTORSKA KULTIVACIJA

Bojana OBRADOVIĆ, Branko BUGARSKI, Diana BUGARSKI¹, Gordana VUNJAK-NOVAKOVIĆ²

Katedra za hemijsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Karnegijeva 4, PO Box 3503, 11000 Beograd

¹Institut za medicinska istraživanja, Dr Subotića 4, PO Box 102, 11129 Beograd

²Harvard - MIT Division of Health Sciences and Technology, Massachusetts Institute of Technology,
E25-330, 45 Carleton Street, Cambridge MA 02139, USA

(Primljen 2. juna 2004., prihvaćen 24. juna 2004.)

Sadržaj – U ovom radu su prikazana dva pravca razvoja kultura tkiva za potencijalnu primenu u medicini. Mikroenkapsulacija je usmerena na transplantaciju funkcionalnih tkiva zaštićenih polupropustljivom membranom koja treba da obezbedi efikasnu razmenu materija neophodnih za održavanje viabilnosti i funkcije tkiva, i istovremenu zaštitu od imunološkog odgovora organizma. Kao model sistem, ćelije pankreasa su enkapsulirane primenom tehnike elektrostatičke ekstruzije u mikrokapsule od alginata i poli-L-ornitina za potencijalnu primenu u lečenju dijabetesa. Drugi pravac istraživanja predstavlja *in vitro* kultivaciju funkcionalnih tkiva baziranu na autolognim ćelijama, biodegradabilnim polimernim nosačima i biorektorskoj kultivaciji. Optimizacijom karakteristika polimernih nosača ćelija, uslova kultivacije, tipa i režima rada biorektora dobijeno je kultivisano tkivo hrskavice koje se po biohemijskim, strukturnim, morfološkim i biomehaničkim karakteristikama približava prirodnom tkivu.

Ključne reči: kulture tkiva, mikroenkapsulacija, bioreaktori, pankreas, hrskavica.

In Vitro Tissue Cultures: Microencapsulation and Bioreactor Cultivation

Abstract – In this paper, two strategies for *in vitro* tissue cultivation are presented. Microencapsulation is aimed for transplantation of functional tissues encapsulated in semi-permeable membranes, which provide efficient transport of nutrients, gases and small molecules necessary for tissue survival and normal function, and, in the same time, tissue protection from immunological response. Pancreatic islets were encapsulated in poly-L-ornitine – alginate microcapsules by electrostatic droplet generation technique for potential treatment of diabetes. Another approach to tissue cultivation is *in vitro* regeneration of functional tissue equivalents based on autologous cell, biodegradable polymer scaffolds and bioreactor cultivation. Under optimal *in vitro* conditions (three-dimensional, biodegradable polymer scaffolds, dynamic laminar flow in rotating bioreactors) biochemical composition, morphology and biomechanical properties of engineered cartilage tissue approached those of the native tissue.

Key words: tissue cultures, microencapsulation, bioreactors, pancreas, cartilage.

1. Uvod

Savremena dostignuća u oblasti novih tehnologija za proizvodnju i oblikovanje biomaterijala su omogućila i ubrzani razvitak na poljima farmacije i biomedicine. Jedna od najatraktivnijih i najispitivanijih oblasti je *in vitro* kultivacija funkcionalnih tkiva za potencijalnu kliničku primenu. Potrebe za zamenom obolelih tkiva i organa danas u svetu daleko prevazilaze raspoložive mogućnosti i sve više rastu. Implantacijom kultivisanih funkcionalnih tkiva bi ovaj problem mogao da se prevaziđe kao i problemi

koji se u određenim slučajevima javljaju pri transplantaciji tkiva kao što su imunološki odgovor organizma, mogućnost prenosa bolesti i dr. Kultivisana tkiva takođe mogu da predstavljaju relevantne fiziološke modele za kontrolisane *in vitro* studije procesa razvoja tkiva i uticaja različitih fizičko-hemijskih faktora u normalnim i patološkim uslovima.

Raznovrsnost strukturnih, biomehaničkih i funkcionalnih karakteristika različitih tkiva je uslo-

vila i razvoj mnoštva specifičnih pristupa kulturama tkiva. U slučaju mnogih bolesti uzrokovanih gubitkom funkcije i nedostatkom zdravog tkiva, kao što su dijabetes, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, epilepsija i hemofilija, transplantacija funkcionalnih tkiva zaštićenih polupropustljivom membranom predstavlja atraktivno rešenje [1]. Osnova ove metode je membrana sa strogo kontrolisanim karakteristikama tako da obezbeđuje nesmetanu razmenu gasova i materija radi održavanja vitalnosti i normalne funkcije implantiranog tkiva, a istovremeno i zaštitu od imunološkog odgovora organizma. Više različitih rešenja je ponuđeno za enkapsulaciju tkiva uključujući perfuzione komore i vlakna ali makro i mikrokapsule su se pokazale kao potencijalno najprimenljivije [2]. Atraktivnost ovog pristupa predstavlja i potencijalna mogućnost enkapsulacije i implantacije životinjskih tkiva.

Drugi pravac istraživanja je regeneracija funkcionalnog tkiva u *in vitro* uslovima bazirajući se na autolognim ćelijama, nosačima od biomaterijala i bioreaktorskoj kultivaciji [3, 4]. Kao rezultat, kultivisano tkivo treba da po sastavu, morfologiji i strukturi odgovara prirodnom tkivu, da se integriše u okolno tkivo i da ostvari normalnu funkciju po implantaciji.

Polazna pretpostavka u ovom pristupu je da će ćelije regenerisati funkcionalno tkivo u *in vitro* uslovima koji podražavaju prirodnu *in vivo* sredinu. Pri tome nosač mora da obezbedi početnu trodimenzionalnu strukturu za regeneraciju tkiva, ravnomernu raspodelu ćelija, nesmetanu razmenu materija i odgovarajuću brzinu degradacije u skladu sa razvojem i remodelovanjem kultivisanog tkiva. Uz to, u pojedinim slučajevima, biomaterijal treba da poseduje i određene mehaničke karakteristike. Danas se u kultivaciji tkiva ispituju razne vrste prirodnih i sintetičkih biomaterijala u različitim oblicima od gelova, sunđerica, vlaknastih nosača do membrana i precizno izrađenih poroznih struktura.

Izbor biomaterijala i oblika nosača određuje uslove u mikro-okolini ćelije dok tip i režim rada bioreaktora određuju makro uslove u kulturi tkiva. Bioreaktor treba da obezbedi kontrolisane, stacionarne uslove kultivacije, efikasan transport mase i toplote do kulture tkiva, adekvatne fluidodinamičke karakteristike, a u pojedinim slučajevima i biomehaničke i električne signale. Iz-

bor biomaterijala i tipa bioreaktora su međusobno povezani i zavisni od karakteristika ćelija i tkiva, tako da često postoji više potencijalno dobrih rešenja.

U ovom radu će biti opisan razvoj sistema sa kulturama tkiva na primerima enkapsulacije ćelija pankreasa za potencijalnu implantaciju u lečenje dijabetesa i kultivacije ćelija hondrocita i kostne srži u cilju dobijanja tkiva hrskavice.

2. Mikroenkapsulacija ćelija pankreasa

Može se reći da je najveći deo savremenih istraživanja enkapsulacije ćelija za potencijalnu transplantaciju posvećen enkapsulaciji ćelija pankreasa radi lečenja dijabetesa. Kao razlozi za ovu činjenicu mogu se navesti: (a) velika rasprostranjenost ove bolesti, (b) ćelije Langerhansovih ostrvaca koje su odgovorne za lučenje insulina čine svega 1-2% vol. pankreasa odrasle osobe, a mogu se izolovati iz životinjskih tkiva i (c) količina potrebnih funkcionalnih ćelija je prihvatljiva (<1 g) [2]. Pri tome, mikrokapsule predstavljaju atraktivan oblik za enkapsulaciju ćelija pankreasa usled velikog odnosa površine i zapremine, a time i malih difuzionih limitacija, i jednostavne implantacije injektiranjem.

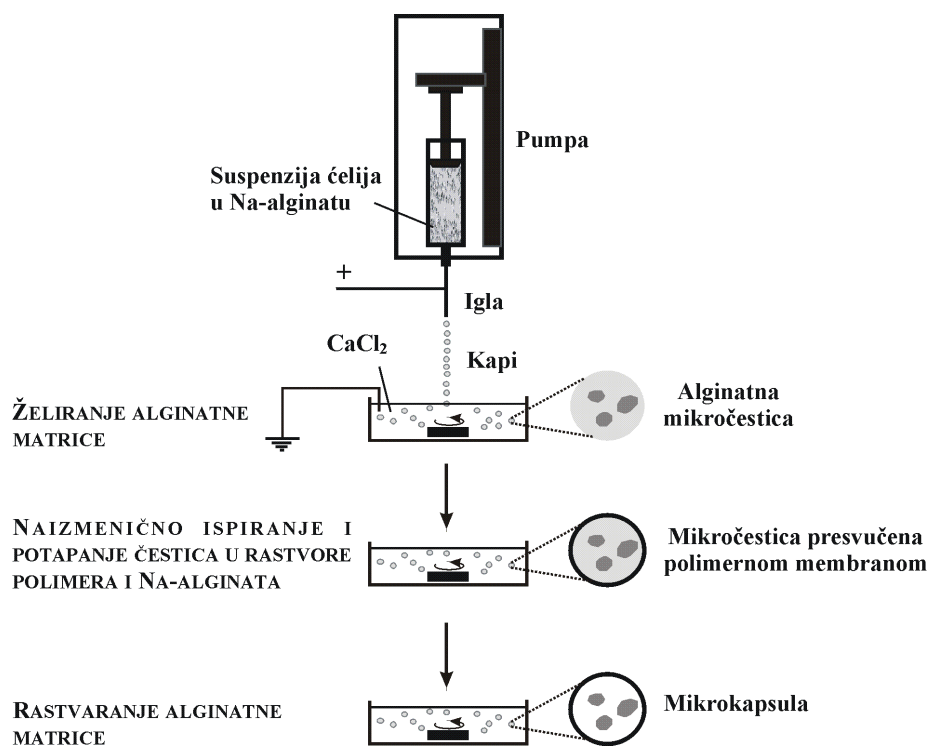
Veličina mikrokapsula i karakteristike membrane su ključni parametri u mikroenkapsulaciji. Permeabilnost membrane mora da bude precizno regulisana tako da dozvoljava efikasan transport kiseonika, nutrijenata i metabolita kao i aktivnih molekula uz zadržavanje antitela i limfocita. Uz to, membrana mikrokapsula treba da bude neimunogena i određene mehaničke čvrstoće. Nezavisna regulacija ovih parametara kao i karakteristika površine i veličine mikrokapsula je jedan od osnovnih izazova u razvoju tehnika mikroenkapsulacije [1]. Neki od materijala korišćenih za mikroenkapsulaciju uključuju alginat, poli-L-lizin (PLL), poli-L-ornitin (PLO), agarozu, polietilen glikol, polivinil alkohol i hitozan [1].

2.1. Tehnika mikroenkapsulacije

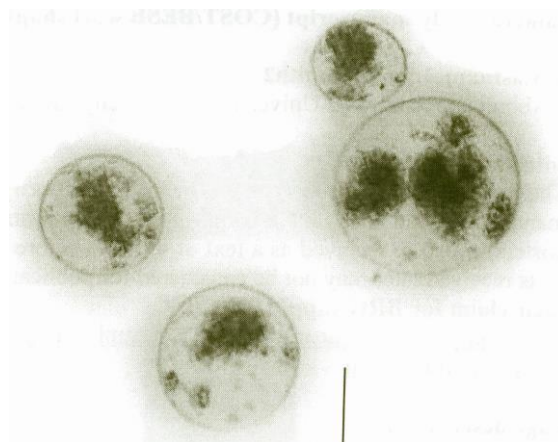
Jedna od metoda mikroenkapsulacije se zasniva na primeni elektrostaičke ekstruzije, prikazana na slici 1 [5]. U ovoj tehnici se suspenzija ćelija u Na-alginatu potiskuje kroz najčešće pozitivno naelektrisanu iglu na čijem vrhu dolazi do formiranja kapi.

Ove kapi se odvajaju sa vrha igle i padaju pod uticajem gravitacione i elektrostatičke sile u rastvor kalcijum hlorida koji je uzemljen. U ovom rastvoru do-lazi do jonske izmene i očvršćavanja gela pošto kalcijum alginat nije rastvoran u vodi. Na taj način se mogu dobiti sitne čestice uniformne raspodele prečnika čija se veličina može kontrolisati podešavanjem elektrostatičkog napona, prečnika igle i rastojanja iz-

među igle i rastvora. Formiranje kapi i uticaj parametara ove tehnike su opisani matematičkim modelom koji uzima u obzir i uticaj površinskog napona i viskoziteta ćelijske suspenzije (Poncelet i sar., 1999) [6]. Na taj način se mogu dobiti mikročestice do ispod 50 μm u prečniku [7].



Slika 1. Šematski prikaz procesa dobijanja alginatnih mikročestica i mikrokapsula metodom elektrostatičke ekstruzije.

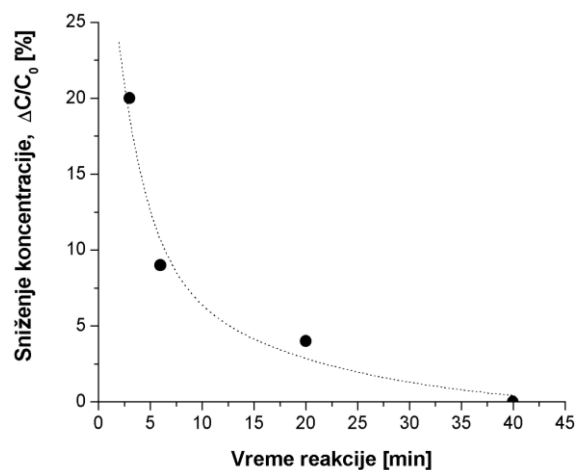


Slika 2. Langerhansova ostrvca enkapsulirana u mikrokapsulama od poli-L-ornitina i alginata (originalno uvećanje x10).

U procesu dobijanja mikrokapsula, čestice alginata se zatim prevlače polimernim membranama potapanjem u rastvore polimera (PLL, PLO ili druge aminokiseline) koji se vezuju za alginat jonskim umrežavanjem. Podešavanjem vremena reakcije moguće je kontrolisati karakteristike dobijene membrane: elastičnost, veličinu pora i poroznost. Naknadnim rastvaranjem matrice alginata primenom limunske kiseline ili EDTA dobijaju se mikrokapsule koje sadrže ćelije. Primenjenom procedurom su uspešno enkapsulirana pojedinačna Langerhansova ostrvca u alginat-PLO mikrokapsule prečnika 150-200 μm , slika 2.

2.2. Karakteristike mikrokapsula

Veličina, oblik i permeabilnost alginat-PLO mikrokapsula je ispitivana u zavisnosti od molekulske težine PLO (3 - 90 kD) i vremena reakcije sa alginatom (3 - 60 min) [8]. PLO molekulske težine 20 - 25 kD se pokazao kao optimalan za enkapsulaciju živo-tinjskih ćelija. Pri manjim molekulskim težinama membrane mikrokapsula nisu imale dovoljnu elastičnost dok je pri većim, prečnik pora bio suviše veliki. Sa povećanjem vremena reakcije PLO i alginata permeabilnost nastale membrane se smanjuje.



Slika 3. Permeabilnost PLO-alginat mikrokapsula izražena kao procentualno sniženje koncentracije goveđeg albumina u rastvoru u ravnoteži, u zavisnosti od vremena reakcije poli-L-ornitina i alginata.

Na slici 3 je prikazana permeabilnost alginat-PLO membrana kao procentualno sniženje koncentracije goveđeg albumina u suspenziji mikrokapsula dobijenih pri različitim vremenima reakcije PLO i alginata. Mikrokapsule dobijene pri vremenima umrežavanja dužim od 20 min su imale praktično zanemarljivu permeabilnost u odnosu na goveđi albumin.

2.3. Funkcionalnost mikrokapsula

Mikroenkapsulirane ćelije pankreasa su kultivisane 15 dana, pri čemu je ispitana viabilnost i očuvanost površine ćelija [8]. Funkcionalnost mikrokapsula je ispitana praćenjem odgovora ćelija

na stimulaciju povišenom koncentracijom glukoze. Ovi testovi su pokazali biokompatibilnost alginat-PLO mikročestica sa ćelijama Langerhansovih ostrvaca i zadovoljavajuću permeabilnost membrane pri kojoj je odgovor enkapsuliranih ćelija na stimulaciju glukozom dobijen u vidu povećanja koncentracije insulina u medijumu posle oko 20 min [8]. Dalja siste-matska i dugoročna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su potrebna za utvrđivanje optimalnih karakteristika membrane, stabilnosti i funkcionalnosti mikrokapsula za potencijalnu primenu u medicini.

3. *In vitro* kultivacija tkiva hrskavice

Artikularna hrskavica predstavlja avaskularno, elastično tkivo na krajevima kostiju koje omogućava pokretanje zglobova uz minimalno trenje. Čelije hrskavice, hondrociti, zauzimaju samo oko 5% vol, a ostali deo čini ekstracelularno tkivo i voda koja predstavlja čak 65-80% mas. hrskavice [9]. Osnovne komponente ekstracelularnog tkiva su kolagen II i glikozaminoglikani (GAG) vezani u proteoglikane. U odrasлом organizmu, ćelije hrskavice stacionarnom metaboličkom aktivnošću održavaju ekstracelularno tkivo ali pri povredama nisu u stanju da obnove oštećenje. Iz tog razloga kao i odsustva imunološkog odgovora organizma pri implantaciji, hrskavica je jedno od prvih i najšire ispitivanih tkiva u *in vitro* kultivaciji za potencijalnu kliničku primenu. U ovom slučaju se pristup baziran na autolognim ćelijama, biodegradabilnim polimernim nosačima i bioreaktroskoj kultivaciji pokazao kao re-arno primenljiv dajući pod optimalnim uslovima tkivo koje se po karakteristikama približava prirodnoj hrskavici [4, 10, 11, 12, 13].

3.1. Imobilizacija ćelija

Izvor ćelija za kultivaciju tkiva hrskavice je tkivo u okolini same povrede i delovi artikularne hrskavice koji nisu mehanički opterećeni. Čelije iz ovog uzorka bi zatim bile propagirane u *in vitro* uslovima do dovoljnog broja za dalju kultivaciju na polimernim nosačima u cilju dobijanja tkiva za implantaciju. Međutim, kako je ovaj izvor ćelija ograničen, alternativno rešenje predstavljaju ćelije kostne srži koje pod određenim uslovima mogu da diferenciraju u hondrocite [14, 15, 16, 17].

Većina ispitivanja je pokazala da je kultivacija ćelija na trodimenzionalnim nosačima neophodan uslov za regeneraciju hrskavice *in vitro* i *in vivo*. Polimerni nosači od poliglikolne kiseline (PGK) u obliku presovanih vlakana su često korišćeni i pogodni za imobilizaciju i kultivaciju hondrocita [18]. Ove nosače odlikuje visoka poroznost (96-97%), biokompatibilnost i spontano vezivanje ćelija za vlakna. Kada su ovi nosači bili zasejani dovoljnom koncentracijom hondrocita (5 miliona ćelija po nosaču u obliku diska debljine 2 mm i prečnika 5 mm) brzina degradacije nosača je odgovarala brzini sinteze ekstracelularnog tkiva [10].

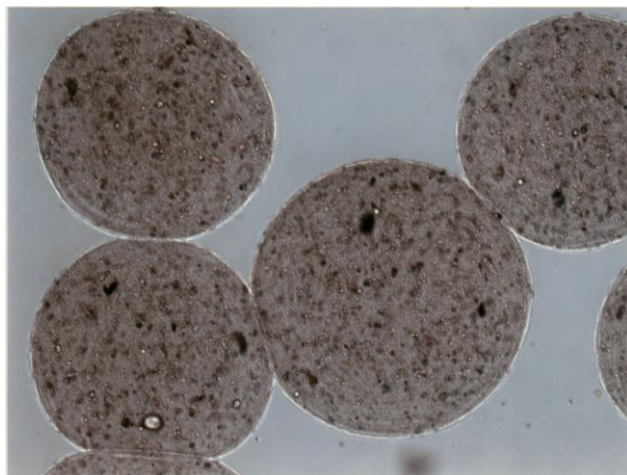
U slučaju kultura ćelija kostne srži parametri koji utiču na proces diferencijacije ćelija nisu do kraja ispitani i ove kulture zahtevaju duže vreme i primenu dodatnih faktora rasta u odnosu na kulture hondrocita. Nosači od poliglikolne kiseline su se pokazali pogodni za kultivaciju i diferencijaciju ćelija kostne srži pileta [16] i biokompatibilni sa ćelijama kostne srži miša [19]. Međutim za diferencijaciju i kultivaciju ćelija kostne srži teleta bio je potreban mehanički čvršći nosač sa manjom brzinom degradacije [17].

Alginat predstavlja često korišćen nosač za imobilizaciju različitih tipova ćelija, a u kulturi određenih matičnih ćelija za mezenhimalno tkivo miša u visoko prečišćenom ultraviskoznom alginatu dobijena je diferencijacija u pravcu hondrocita [20].

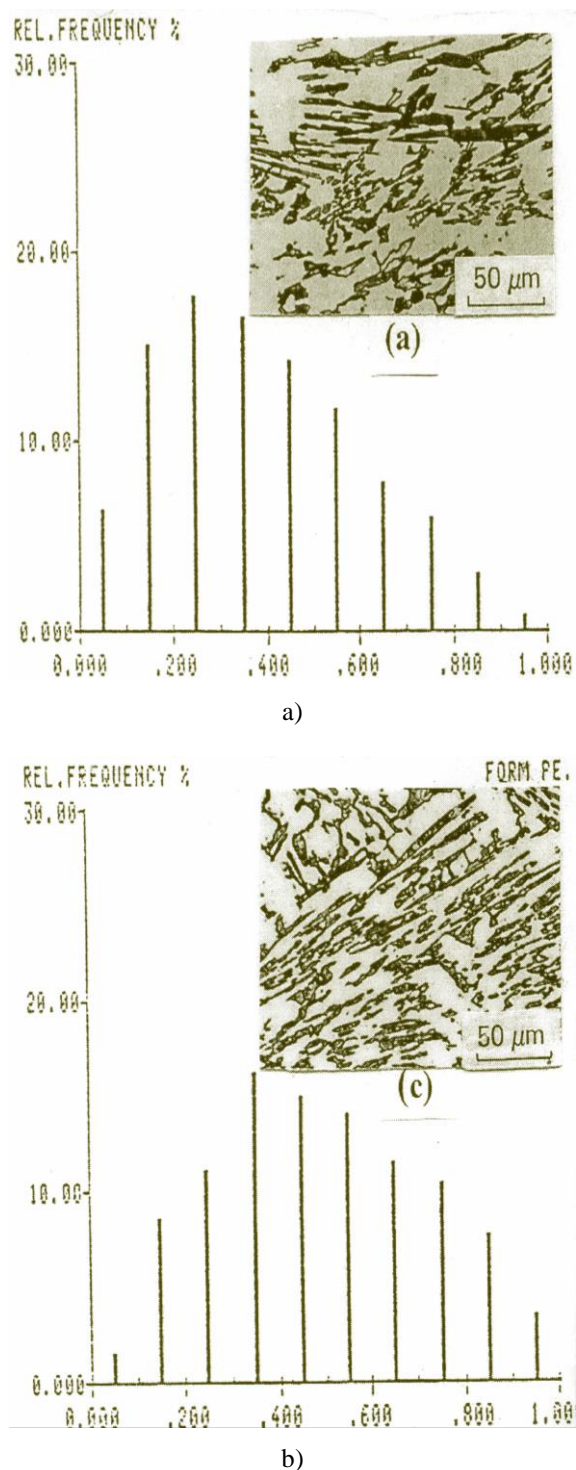
U ovom radu je ispitivana imobilizacija ćelija kostne srži miša u alginatnim mikročesticama primenom elektrostatičke ekstruzije. Primena ove tehnike na suspenziju ćelija je pokazala zanemarljiv uticaj elektrostatičkog polja na ćelije kostne srži miša [19]. Pri koncentraciji alginata od 1.5%, koncentraciji ćelija od 4×10^5 cel./ml, primenjenom naponu od 4.6 kV i korišćenjem igle 22 elektrostatičkom ekstruzijom su dobijene mikročestice veličine 680 ± 100 μ m u prečniku. Mikročestice su zatim kultivisane pod statičkim uslovima u toku 4 nedelje u prisustvu

faktora rasta IGF-1 kao što je to ranije opisano pri kultivaciji ćelija kostne srži miša na nosačima od poli-glikolne kiseline [19].

U toku statičke kultivacije u ispitivanom medijumu nije došlo do diferencijacije ćelija kostne srži ali su ćelije ostale viabilne i metabolički aktivne. Konzistencija mikročestica je ostala očuvana u toku 4 nedelje kultivacije, slika 4, iako je došlo do bubrenja i promene površine alginata, slika 5. Na uzorku površine mikročestica, kvalitativno se može zapažiti da su se oblik i raspodela veličina pora promenili u toku statičke kultivacije pri čemu se srednja veličina pora povećala od oko 300 μ m na početku kultivacije do oko 400 μ m 29-tog dana kultivacije, slika 5.



Slika 4. Alginatne mikročestice sa imobilisanim ćelijama kostne srži 29-tog dana statičke kultivacije (originalno uvećanje $\times 4$).

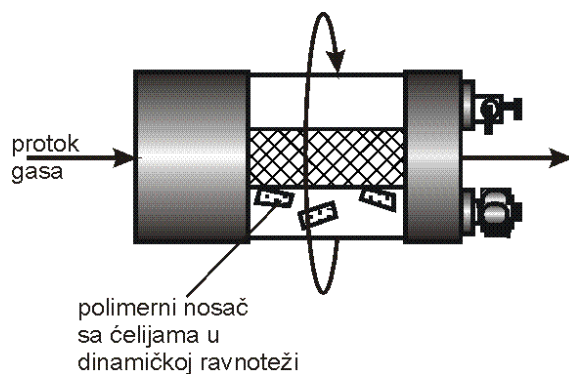


Slika 5. Površina alginatnih mikročestica sa imobilisanim ćelijama kostne srži sa raspodelom veličina pora (dato u μm): a) prvi dan kultivacije; b) 29-ti dan kultivacije.

Ovi rezultati pokazuju da alginatne mikročestice mogu da predstavljaju pogodan nosač za kultivaciju ćelija kostne srži. Brzine prenosa mase i trodimenzionalna struktura pogoduju kultivaciji ćelija u dužem vremenskom periodu, a optimizacijom sastava medijuma i regulacijom brzine degradacije alginata primenom različitih agenasa mogu se dalje kontrolisati i optimizovati uslovi u mikro-okolini ćelija.

3.2. Bioreaktorska kultivacija

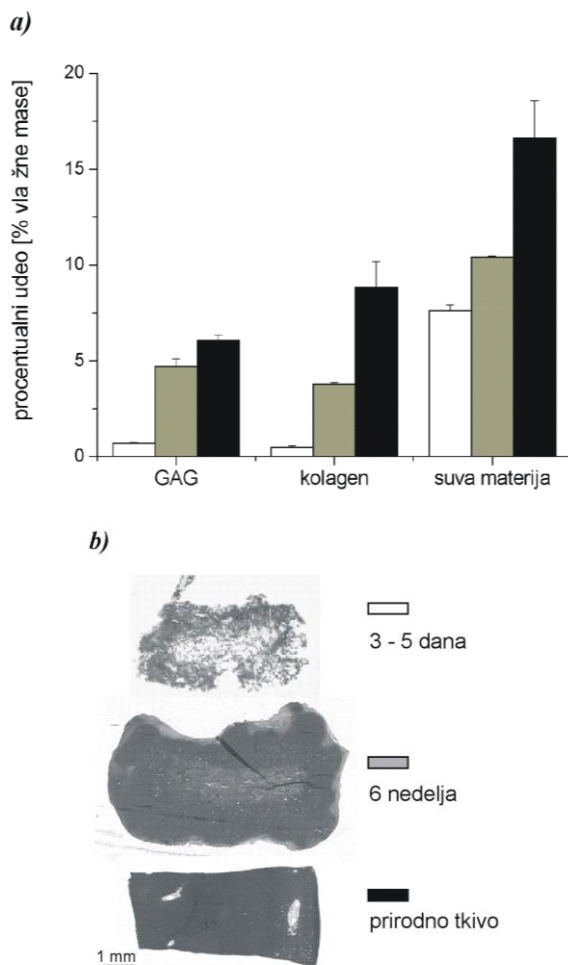
Hondrociti izolovani iz articularne hrskavice teleta i imobilisani na nosačima od poliglikolne kiseline (5 miliona ćelija po nosaču u obliku diska debljine 2 mm i prečnika 5 mm) su kultivisani u nekoliko tipova bioreaktora pri različitim fluidodinamičkim uslovima [11, 21]. Laminarni režim strujanja uz uspostavljene dinamičke fluktuacije toka oko kultivisanog tkiva u rotacionim bioreaktorima se pokazao kao najpogodniji za uniformnu regeneraciju hrskavičavog tkiva. Kulture tkiva (11 - 12 polimernih nosača sa ćelijama) se u ovim bioreaktorima nalaze suspendovane u anularnom prostoru (110 ml zapremine) između unutrašnje cilindrične, silikonske membrane kroz koju se obavlja kontinualna razmena gasova i spoljašnjeg zida reaktora, slika 6. Brzina rotacije se podešava tako da se kulture tkiva nalaze u dinamičkoj ravnoteži oscilujući oko svog ravnotežnog položaja. Kultivacija kultura hondrocita se obavlja na 37°C pri 10% CO₂ pri čemu se 50% medijuma zamenjuje svaka 2 - 3 dana [22].



Slika 6. Rotacioni bioreaktor.

U toku kultivacije u rotacionim bioreaktorima dolazi do degradacije polimernog nosača i regene-

racije hrskavičavog tkiva. Posle 6 nedelja kultivacije zapremina tkiva se povećala za oko 3.6 puta, a suva masa za oko 4.2 puta dok se tkivo po sastavu i morfologiji približilo karakteristikama prirodne hrskavice, slika 7. Procentualni sadržaj osnovnih komponenta hrskavice, GAG-a i kolagena, je na kraju 6 nedelja kultivacije iznosio 78, odnosno 43% u odnosu na prirodno tkivo uz još uvek značajno viši sadržaj vode, slika 7a. Regeneracija komponenta hrskavice se u toku kultivacije u rotacionim bioreaktorima odvija od periferije tkiva ka unutrašnjosti [10].



Slika 7. Karakteristike kultivisanog tkiva hrskavice neposredno posle imobilizacije ćelija na polimernim nosačima (3-5 dana) i posle 6 nedelja kultivacije u rotacionim bioreaktorima u poređenju sa karakteristikama prirodnog tkiva hrskavice; a) biohemijski sastav; b) histološki izgled (safranin O boja).

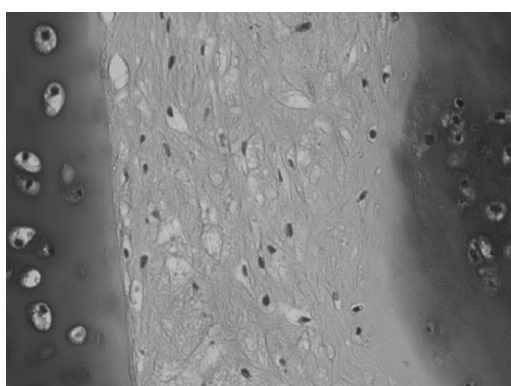
Posle 6 nedelja kultivacije, tkivo je po morfološkom izgledu dostiglo uniforman sastav sa ravnomernom raspodelom GAG-a po čitavoj zapremini, slika 7b. Izuzetak je površinska zona tkiva debljine od oko 300 μm u kojoj koncentracija GAG-a opada usled difuzije u okolni medijum [23, 24]. Koncentracija ćelija određena analizom histoloških sekcija u kultivisanom tkivu je bila nešto viša od koncentracije u prirodnom tkivu ($1.16 \pm 0.47 \times 10^5$ u odnosu na $0.83 \pm 0.21 \times 10^5$ ćelija/ mm^3 , respektivno) pri čemu je raspodela ćelija bila uniformna po čitavoj zapremini tkiva.

U potencijalnoj kliničkoj primeni, kultivisano tkivo hrskavice treba da ispolji odgovarajuće biomehaničke karakteristike i da se strukturno integriše u okolno tkivo po implantaciji. Biomehaničke karakteristike tkiva kultivisanog 6 nedelja u rotacionim bioreaktorima su bile značajno lošije od karakteristika prirodne hrskavice i izmerene vrednosti su iznosile svega 20 - 25% odgovarajućih vrednosti prirodnog tkiva [11]. Sa porastom dužine kultivacije do 7 meseci došlo je do poboljšavanja biomehaničkih karakteristika kultivisanog tkiva ali su sadržaj kolagena i dinamička čvrstoća još uvek bili niži u odnosu na prirodnu hrskavicu [10, 12]. Ovi rezultati bi mogli da ukažu na različite strukture kultivisanog i prirodnog tkiva hrskavice i potrebu za dodatnim faktorima u *in vitro* kultivaciji.

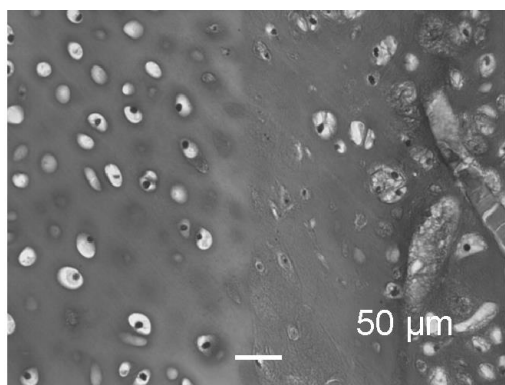
Sa druge strane, u ispitivanjima integracije kultivisanog tkiva i prirodne hrskavice u *in vitro* uslovima, polimerni nosači sa tek zasejanim ćelijama su se bolje integrisali u odnosu na duže kultivisano tkivo [25, 26]. Na površinama dodira polimernih nosača sa ćelijama i prirodnog tkiva hrskavice formirala se zona fibroznog tkiva debljine 150 - 200 μm sa izduženim ćelijama sličnim fibroblastima koje su intenzivno regenerisale tkivo i remodelovale površinu u toku kultivacije, slika 8. U slučaju integracije tkiva prethodno kultivisanog 4 - 5 nedelja u rotacionim bioreaktorima i prirodnog tkiva hrskavice, međufazna zona se sastojala samo od 1 - 2 sloja izduženih ćelija i u toku kultivacije od 8 nedelja nije došlo do značajnih promena u izgledu ove zone. Zapažena struktura međufazne površine je odgovarala i izmerenim vrednostima čvrstoće veze kultivisanog tkiva i prirodne hrskavice koja je bila oko 1.6 puta veća za tek zasejane polimerne nosače u odnosu na prethodno kultivisano tkivo [25].

Ovi rezultati ukazuju da se integriranim pristupom koji uzima u obzir karakteristike ćelija, izbor i dizajn oblika i strukture nosača i tip, režim rada i fluidodinamičke karakteristike bioreaktora mogu obezbediti uslovi za kultivaciju funkcionalnih tkiva.

U slučaju kulture tkiva hrskavice, optimizacijom vremena i uslova kultivacije mogu se dobiti potrebne strukturne i biomehaničke karakteristike kultivisanog tkiva dok se modifikacijom površine tkiva može postići i integracija implantiranog tkiva na mestu povrede [25].



a)



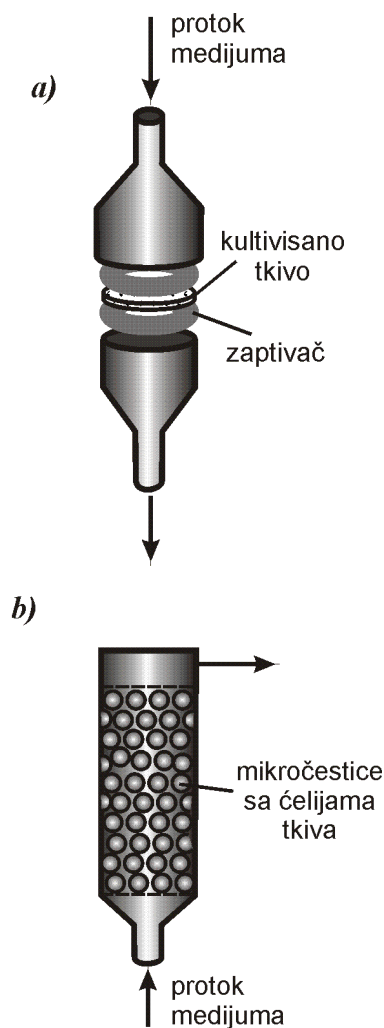
b)

Slika 8. Histološki izgled zone integracije polimernih nosača tek zasejanih ćelijama (3-5 dana) i prirodnog tkiva hrskavice u in vitro kultivaciji (safranin O boja); a) 2 nedelje, b) 8 nedelja.

Alternativna bioreaktorska rešenja atraktivna za kultivaciju ćelija kostne srži, koje zahtevaju efikasan dotok faktora rasta i kontrolu uslova u mikro-okolini

ćelije, se zasnivaju na perfuziji medijuma direktno kroz tkivo. Perfuzioni reaktor prikazan na slici 9a je pogodan za kultivaciju ćelija zasejanih na polimernim poroznim nosačima koji se mogu učvrstiti prstenastim zaptivačima. Ovaj tip bioreaktora je uspešno primenjen za kultivaciju miocita koji zahtevaju efikasan dotok kiseonika [27, 28].

Reaktor sa pakovanim slojem, slika 9b, predstavlja drugi tip perfuzionog bioreaktora koji je primenljiv za kultivaciju ćelija imobilisanih u alginatnim mikročesticama.



Slika 9. Alternativna bioreaktorska rešenja za kultivaciju ćelija kostne srži; a) perfuzioni bioreaktor, b) bioreaktor sa pakovanim slojem mikročestica.

Atraktivnost ovog pristupa predstavlja mogućnost postepene i kontrolisane razgradnje alginata čime bi se regulisala poroznost sloja, brzine transporta materija i struktura regenerisanog tkiva.

4. Zaključak

Kultivacija tkiva predstavlja interesantnu, multidisciplinarnu oblast kojom se dolazi do fundamentalnih odgovora o procesima razvoja tkiva u organizmu, međucelijskih signala, funkcije i integracije tkiva. Međutim, zadatak imitacije prirode zahteva suštinsko poznavanje i sagledavanje procesa u ćelijama i tkivima sa više različitih nivoa i objedinjavanje pristupa u iznalaženju najboljeg rešenja.

U ovom radu su prikazana dva pravca razvoja kultura tkiva. Mikrokapsule sa enkapsuliranim ćelijama pankreasa za primenu u lečenju dijabetesa predstavljaju potencijalno rešenje za oslobađanje dijabetičara od insulinske zavisnosti uz mogućnost implantacije životinjskih tkiva. Veličina mikrokapsula i karakteristike membrane su u ovom slučaju ključni parametri koji treba da obezbede viabilnost i funkcionalnost enkapsuliranog tkiva, sa jedne strane, i zaštitu od imunološkog odgovora organizma, sa druge strane. Pitanja koja još uvek ostaju otvorena za istraživanja su mogućnosti različitih inflamatornih reakcija organizma na implantirane mikrokapsule, brzina odgovora i stabilnost funkcije enkapsuliranih ćelija i moguća potreba za uklanjanjem nekrotičnih mikrokapsula iz organizma.

Drugi pristup lečenju tkiva je zamena obolelog tkiva zdravim uz obezbeđivanje strukturne i funkcionalne integracije implantiranog tkiva. Kultivacijom ćelija hondrocita na biodegradabilnim polimer-nim nosačima u rotacionim biorektorima dobijeno je kultivisano tkivo koje se po biohemijskim, strukturnim, morfološkim i biomehaničkim karakteristikama približava prirodnom tkivu hrskavice.

Ćelije kostne srži i perfuzioni bioreaktori predstavljaju alternativne sisteme koji se trenutno intenzivno ispituju.

Pored toga, neka od pitanja koja su u fokusu istraživanja su uslovi za diferencijaciju ćelija, poboljšanje mehaničkih i strukturnih karakteristika kultivisanog tkiva, integracija i *in vivo* funkcija kultivisanog tkiva.

Odgovore na ova pitanja kao i pitanje mogućnosti praktične kliničke primene kultura tkiva će dati dugoročna i sistematska eksperimentalna istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Literatura:

- [1] G. Orive, R.M. Hernandez, A.R. Gascon, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Laczka and L. Pedraz; History, challenges and perspectives of cell microencapsulation; *Trends Biotechnol.*, Vol. 22, pp. 87-92, 2004.
- [2] T.G. Wang, R.P. Lanza; Bioartificial pancreas; In: R.P. Lanza, R. Langer and J. Vacanti (eds), *Principles of Tissue Engineering*; Academic Press, pp. 495-507, 2000.
- [3] R.M. Nerem; The challenge of imitating nature; In: R.P. Lanza, R. Langer and J. Vacanti (eds), *Principles of Tissue Engineering*; Academic Press, pp. 9-15, 2000.
- [4] L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic; Tissue engineering bioreactors; In: R.P. Lanza, R. Langer and J. Vacanti, (eds), *Principles of Tissue Engineering*; Academic Press, pp. 143-156, 2000.
- [5] M.F.A. Goosen, E.S.E. Mahmud, A.S. Al-Ghafri, H.A. Al-Hajri, Y.S. Al-Sinani and B. Bugarski; Immobilization of cells using electrostatic droplet generation; In: G.F. Bickerstaff (ed), *Methods in Biotechnology, Vol. 1: Immobilization of Enzymes and Cells*; Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 167-174, 1997.
- [6] D. Poncelet, V.G. Babak, R.J. Neufeld, M. Goosen, B. Bugarski; Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst; *Adv. Colloid Interface Sci.*, Vol. 79, pp. 213-228, 1999.
- [7] B. Bugarski, Q. Li and M.F.A. Goosen; Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation; *AIChE J.*, Vol. 40, pp. 1026-1031, 1994.
- [8] B. Bugarski, L. Sajc, M. Plavšić, M.F.A. Goosen and G. Jovanović; Semipermeable alginate-PLO microcapsules as a bioartificial pancreas; In: K. Funatsu, Y. Shirai and T. Matsushita (eds), *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 8; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 479-486, 1997.
- [9] V.C. Mow, J.S. Hou, J.M. Owens and A. Ratcliffe; Biphasic and quasilinear viscoelastic theories for hydrated soft tissues; In: Mow, V.C., Ratcliffe, A. and

- S.L-Z. Woo (eds.): *Biomechanics of Diarthrodial Joints*, Chapter 8, Springer-Verlag, New York, 1990.
- [10] L.E. Freed, A.P. Hollander, I. Martin, J.R. Barry, R. Langer and G. Vunjak-Novakovic; Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system; *Exp. Cell Res.*, Vol. 240, pp. 58-65, 1998.
- [11] G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A.J. Grodzinsky and L. E. Freed; Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage; *J. Orthop. Res.*, Vol. 17, pp. 130-138, 1999.
- [12] I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A.J. Grodzinsky, R. Langer, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage; *Bioarheology*, Vol. 37, pp. 141-147, 2000.
- [13] L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic; Tissue engineering of cartilage; In: J.D. Bronzino (ed.), *The Biomedical Engineering Handbook*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton., pp.124-1 – 124-26, 2000.
- [14] B. Johnstone, T.M. Hering, A.I. Caplan, V.M. Goldberg and J.U. Yoo; In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells; *Exp. Cell Res.*, Vol. 238, pp. 265-232, 1998.
- [15] J.U. Yoo, T.S. Barthel, K. Nishimura, L. Solchaga, A.I. Caplan, V.M. Goldberg and B. Johnstone; The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells; *J. Bone Joint Surg. Am.*, Vol. 80, pp. 1745-1757, 1998.
- [16] I. Martin, R.F. Padera, G. Vunjak-Novakovic and L.E. Freed; In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues; *J. Orthop. Res.*, Vol. 16, pp. 181-189, 1998.
- [17] I. Martin, V.P. Shastri, R.F. Padera, J. Yand, A.J. Mackay, R. Langer R., G. Vunjak-Novakovic, L.E. Freed; Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams; *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 55, pp. 229-235, 2001.
- [18] L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R.J. Biron, D.B. Eagles, D.C. Lesnoy, S.K. Barlow and R. Langer; Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering; *BioTechnology*, Vol. 12, pp. 689-693, 1994.
- [19] B. Obradovic, D. Bugarski, M. Petakov, G. Jovicic, N. Stojanovic, B. Bugarski, and G. Vunjak-Novakovic; Cell Support Studies Aimed for Cartilage Tissue Engineering in Perfused Bioreactors, In: D.P. Uskokovic, S.K. Milonjic, and D.I. Rakovic (eds.), *Mat. Sci. Forum*, Vol. 453-454: *Progress in Advanced Materials Processes*, pp. 549-555, 2004.
- [20] M. Weber, A. Steinert, A. Jork, A. Dimmler, F. Thurmer, N. Schutze, C. Hendrich and U. Zimmermann; Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates; *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 2003-2013, 2002.
- [21] B. Obradovic, I. Martin, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Bioreactor studies of natural and tissue engineered cartilage; *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacija*, Vol. 3, pp. 181-189, 2001.
- [22] L.E. Freed, G. Vunjak-Novaković; Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity; *Biotech. Bioeng.*, Vol. 46, pp. 306-313, 1995.
- [23] I. Martin, B. Obradovic, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; A method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage; *Ann. Biomed. Eng.*, Vol. 27, pp. 1-7, 1999.
- [24] B. Obradovic, J. Meldon, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Mathematical model of glycosaminoglycan deposition in tissue engineered cartilage; *J. AIChE.*, Vol. 46, pp. 1860-1871, 2000.
- [25] B. Obradovic, I. Martin, R.F. Padera, S. Treppo, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Integrative potential of tissue engineered cartilage: bioreactor studies; *J. Orthop. Res.*, Vol. 19, pp. 1089-1097, 2001.
- [26] B. Obradovic, I. Martin, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Towards functional cartilage equivalents: bioreactor cultivation of cell-polymer constructs; In: D.P. Uskokovic, G.A. Battiston, S.K. Milonjic and D.I. Rakovic (eds.), *Mat. Sci. Forum*, Vol. 413: *Contemporary Studies in Advanced Materials and Processes*, pp. 251-256, 2003.
- [27] R.L. Carrier, M. Rupnick, R. Langer, F.J. Schoen, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle; *Tissue Eng.*, Vol. 8, pp. 175-188, 2002.
- [28] M. Radisic, L. Yang, J. Boublik, R.J. Cohen, R. Langer, L.E. Freed and G. Vunjak-Novakovic; Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, in press, 2004.

