

CHEMIE, FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI A BOKOMPATIBILITA HYDROGELŮ PRO IMUNOPROTEKCI SAVČÍCH BUNĚK

JAROMÍR LUKÁŠ^{a*}, TAĀTANA FENCLOVÁ^a,
JAROSLAV MOKRÝ^b a JANA KARBANOVÁ^b

^aÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ^bUniverzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové
e-mail: jarolukas@tiscali.cz

Došlo 13.5.03, přijato 18.9.03.

Klíčová slova: biopolymery, hydrogely, kopolymery HEMA, imunoprotekce, buněčná terapie, biokompatibilita, interakce buněk s polymery, polymerní membrány

Obsah

1. Úvod
2. Buněčná terapie, mikroenkapsulace buněk
3. Požadavky na materiály pro mikroenkapsulaci buněk
4. Polymery na bázi komplexů polyelektrolytů
5. Syntetické polymery
6. Biologické testy
7. Závěr

1. Úvod

Trvalý nedostatek lidských dárců tkání a orgánů pro transplantaci dal vznik novému oboru aplikace polymerů v medicíně, tzv. imunoprotekci. Tato metoda spočívá v obalení buněk nebo malých kousků tkání produkujícími proteiny, enzymy či jiné bioaktivní látky do semipermeabilní membrány, která je chrání před buňkami imunitního systému hostitele. Koncepte imunoprotekce zahrnuje dva kroky: 1) přípravu jakéhosi mikro-bioreaktoru, produkujícího bioaktivní látky, jejichž nedostatek se projevil v organismu pacienta a 2) následnou implantaci do těla pacienta, umožňující pak dlouhodobě vyrovnávat hladinu těchto deficitních látek.

Pro enkapsulaci buněk lze volit jednu ze dvou využívaných forem¹. Mikroenkapsulaci, při které jsou buňky enkapsulovány do mnoha sférických kapsulí o průměru 100–600 μm, a makroenkapsulaci, představující enkapsulaci velkého množství buněk nebo jejich klastrů do kapsulí řádově větších rozměrů a různých tvarů, nebo do dutých vláken o průměru 0,5–6 mm a celkové délce 0,5–10 cm. Oba způsoby mají své výhody a nevýhody. Mikroenkapsule umožňují transplantovat velké množství buněk v malém objemu a jejich hlavní výhodou je snadná implantace, nevýhodou může být obtížnější eventuální zpětné vyjmutí. Naproti tomu rozměrnost makro-

kapsulí omezuje v některých případech jejich použití, jsou však snáze vyjimatelné po ukončení aplikace. Volba způsobu enkapsulace je tak do značné míry určována objemovými možnostmi v cíleném místě implantace. V tomto článku se soustředíme na vývoj a přípravu polymerních materiálů pro mikroenkapsulaci buněk a řešení problémů s tím souvisejících.

Přestože první práce zabývající se mikroenkapsulací biologicky aktivních materiálů² (hemoglobinu, enzymů, proteinů, buněk, mikroorganismů aj.) byla publikována již v r. 1964, k intenzivnímu rozvoji imunoprotekce došlo až v období dvou posledních dekad, což je podmíněno jak dosaženým pokrokem v technologii kultivace buněk a tkání, tak vývojem v oblasti biopolymerů a v neposlední řadě interdisciplinární týmovou spoluprací v oblasti chemie polymerů, imunologie, buněčné a molekulární biologie a chirurgie.

2. Buněčná terapie, mikroenkapsulace buněk

Buněčná terapie je relativně nová biomedicínská disciplína, kterou lze charakterizovat jako terapeutické zavádění buněk do organismu pacienta. V případě mikroenkapsulace bývají tyto buňky uzavřeny do polymerních mikrokapsulí a následně implantovány do těla pacienta s cílem léčit nemoci způsobené obvykle selháním sekreční činnosti buněk. Celý koncept je založen na imunoprotekci, tj. separaci implantovaných buněk semipermeabilní polymerní membránou od různých typů buněk a jiných složek imunitního systému hostitele. Tento způsob umožňuje úspěšnou implantaci buněk bez použití imunosupresiv. Polymerní membrána musí zároveň umožňovat dostatečný přísun kyslíku a nízkomolekulárních buněčných živin do kapsulí a naopak, difuzi terapeutických produktů buněčné sekrece a buněčného odpadu z kapsulí do těla pacienta (obr.1).

Pro účely buněčné terapie lze využít tři druhů buněk: *i*) autologních (vlastní buňky pacienta nebo jednovaječného dvojčete), *ii*) alogenních (od jiného lidského dárce) a *iii*) xenogenních (zvířecích). Použití xenogenních buněk umožňuje eliminovat nedostatek lidských dárců, specifický genový produkt těchto buněk však nesmí být sám o sobě imunogenní. Enkapsulované buňky jsou implantovány do příslušných cílových míst v těle pacienta (břišní dutina, mozek), kde tato aplikace umožní produkci příslušného terapeutického produktu v závislosti na jeho potřebě v hostitelském organismu. Úspěšnost imunoprotekční buněčné terapie pro léčbu nemocí způsobených ztrátou sekreční funkce buněk byla ověřována na zvířecích modelech, v některých případech již i v klinické praxi. Výsledky studia jsou publikovány v řadě prací se zaměřením na léčbu diabetes mellitus^{3–9}, Parkinsonovy nemoci^{10–12}, Alzheimerovy nemoci^{13–14}, Huntingtonovy choroby¹⁵, chronických bolestí^{16–18}, selhání funkce ledvin¹⁹, jater²⁰ a podvěsku mozkového²¹, léčbu nemoci²², hemofilie B3²³ a amyotrofni laterální sklerózy²⁴.

* autor pro korespondenci

3. Požadavky na materiály pro mikroenkapsulaci buněk

Polymery používané pro enkapsulaci buněk musí splňovat celou řadu požadavků. Především nesmí být toxické ani mutagenní (kancerogenní či teratogenní). Musí vykazovat velmi dobrou biologickou snášenlivost (biokompatibilitu), dostatečnou mechanickou stabilitu, vysokou odolnost vůči degradaci, nehydrolyzovatelnost za fyziologických podmínek a dobrou interakci s buňkami. Dále je nutno definovat míru jejich prostupnosti pro molekuly biologického původu.

Biokompatibilita biomateriálů (všech materiálů používaných pro medicínské aplikace) je definována jako schopnost materiálu vyvolat přijatelnou odezvu v organismu hostitele při dané aplikaci²⁵. Již z této definice lze odvodit, že biokompatibilita není žádnou jednoznačně definovanou vlastností, nýbrž multifunkčním pojmem. Zavedením cizího tělesa do živého organismu dochází vždy k přirozené reakci imunitního systému a snaze toto těleso z organismu vypudit. Po implantaci biopolymeru lze tedy za „přijatelnou odezvu organismu hostitele“ považovat stav, kdy projevy reakce imunitního systému, jako je obrůstání nežádoucími fibrózními tkáněmi, aktivity makrofágů vyvolávající záněty, degradace biopolymeru aj., jsou zanedbatelné, nebo alespoň minimalizovány na přijatelnou míru. Praxe ukazuje, že hlavními faktory, které ovlivňují biologickou snášenlivost biopolymerů, jsou chemické a morfologické vlastnosti jejich povrchů, tedy komponent, přicházejících do přímého styku s organismem hostitele. Běžně se testy na biokompatibilitu materiálů provádějí histologickými postupy po explantaci vzorků.

Při volbě polymerů pro enkapsulaci buněk je nutno mít na zřeteli vyhovující permeabilitu (propustnost) materiálu. Polymerní membrána musí zajišťovat dostatečný přísun nízkomolekulárních živin enkapsulovaným buňkám a difuzi produktů jejich sekrece; naproti tomu musí zamezit kontaktu imunologických látek (imunoglobulin G, imunoglobulin M a další doplňující frakce s relativní molekulovou hmotností v rozmezí 100 000–500 000). Jde tedy o přípravu semipermeabilní membrány s prahem propustnosti relativní molekulové hmotnosti $\approx 100\ 000$. Tento důležitý požadavek pro zachování správné funkce a životnosti enkapsulovaných buněk splňují polymerní hydrogely, vyznačující se botnavostí ve vodě a rovněž ve fyziologickém prostředí. Jejich trojrozměrná struktura je ve zbotnalém stavu prostoupena soustavou pórů a mikropórů, umožňující difuzi nízkomolekulárních látek. Optimální veli-

kost pórů lze ovlivnit volbou typu hydrogelu a podmínek jeho přípravy. Častým nedostatkem hydrogelů, především těch, které vážou více vody, je jejich nedostatečná mechanická pevnost a zvýšená lepivost. Obě tyto nežádoucí vlastnosti je nutno minimalizovat a zamezit tak nežádoucímu kolapsu sférického tvaru a shlukování mikrokapsulí.

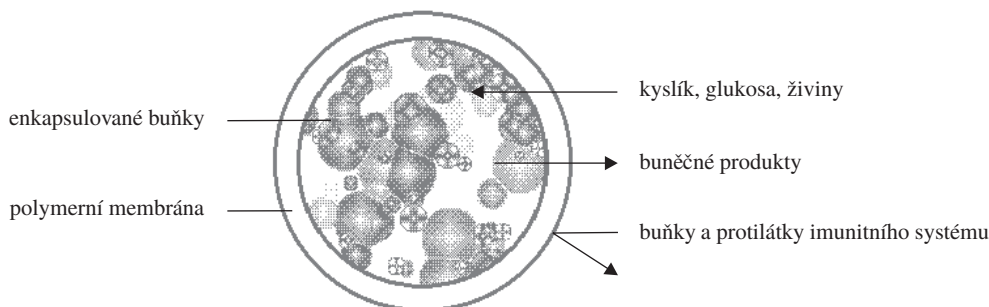
Dalším důležitým požadavkem je dobrá tolerance polymeru buňkami, které mají být enkapsulovány. Je třeba mít na zřeteli nejen co nejdelší životnost, ale i dobrou metabolickou aktivitu enkapsulovaných buněk. Buňky mají na svém povrchu celou řadu receptorů, pomocí kterých reagují na své nejbližší okolí. Zjednodušeně řečeno, při dobrých interakcích s polymerem dochází k rozproštění buněk na polymerním povrchu a k dobré metabolické aktivitě, zatímco v opačném případě se buňky shlukují, neadherují na povrchu a jejich sekrece je omezená. Tyto primární odezvy buněk na polymerní materiál lze studovat vizuálně pod mikroskopem.

Z uvedeného přehledu je evidentní, že výběr polymerních materiálů pro enkapsulaci buněk, kdy je nutno vyhovět množství požadavků, často vzájemně protichůdných, je velmi náročný a vyžaduje multidisciplinární přístup.

4. Polymery na bázi komplexů polyelektrolytů

První funkční enkapsulační systém byl připraven z komplexu přirozených polymerů alginát-poly(L-lysin)^{3,26–28}, který je ve vodě nerozpustný a vzniká reakcí vodných roztoků polyaniontu (alginát) a polykationtu poly(L-lysinu) (PLL). Komplexy polyelektrolytů jsou dlouho známé látky²⁹, které našly široké pole využití, mj. v přípravě ultrafiltračních, mikrofiltračních a jiných typů membrán pro separační procesy. Charakteristickým rysem tvorby komplexů elektrolytů je vznik párů opačně nabitých iontů, které drží celou trojrozměrnou strukturu elektrostatickými coulombickými silami.

Princip přípravy mikrokapsulí z komplexu alginátu a PLL spočívá v odkapávání kapiček roztoku alkalické soli alginátu z dávkovací jehly do roztoku PLL, kde se na povrchu alginátových kapiček tvoří komplex a dochází k inverzi fází (vyloučení mikrokapsulí v pevné fázi). Po určité reakční době je přebytečný PLL odstraněn a vzniklé mikrokapsule promyty. Velikost a rychlost tvorby mikrokapsulí je regulována koncentrací roztoku alginátu, průměrem dávkovací jehly a tlakem vzduchu, který kapičky unáší. Při enkapsulaci jsou buňky předem suspendovány do výchozího roztoku alginátu, zbyváající postup je stejný.



Obr. 1. Schéma mikrokapsule a její funkce

První aplikace mikrokapsulí alginát-PLL v pokusných zvířatech byly optimistické z hlediska jejich biokompatibility, jako nedostatek se však projevila jejich omezená mechanická stabilita (méně než tři měsíce), významně limitující možnosti klinického použití tohoto materiálu. Degradaci stěn kapsulí hrozí imunizace příjemce buňkami dárce a možnost rozvoje autoimunních onemocnění. V průběhu dalších let vývoje polymerních materiálů pro mikroenkapsulaci buněk se proto autoři zaměřili na zlepšení jejich biokompatibility a hlavně mechanické stability. Výhoda jednoduchého postupu při přípravě mikrokapsulí na bázi komplexů polyelektrolytů i nadále předurčovala volbu výchozích materiálů, o čemž svědčí množství dále uvedených publikovaných modifikací tohoto systému.

Je známo, že povrchy materiálů s pozitivními náboji jsou výbornými substráty pro růst buněk. Přebytkem pozitivní náboje na povrchu mikrokapsulí alginát-PLL však vyvolávaly tkáňovou reakci, vedoucí k omezení průchodnosti nízkomolekulárních produktů semipermeabilní membránou kapsulí a k následnému uhybnutí enkapsulovaných buněk. Snaha o potlačení tohoto nedostatku byla realizována následnou komplexací^{30,31} povrchové vrstvy mikrokapsulí roztokem polyaniontu. Tím byly vysyceny volné aminoskupiny PLL a výsledný povrch získal naopak negativní náboje, vykazující lepší biokompatibilitu. Jako polyanion byla většinou opět použita alkalická sůl alginátu. Takto získané mikrokapsule působily při aplikaci menší zánětlivost, jejich obrůstání fibrózními tkáněmi se zpomalilo a prodloužila se tak jejich mechanická stabilita a životnost enkapsulovaných buněk na šest měsíců a déle.

Výrazného zlepšení biokompatibility mikrokapsulí alginát-PLL bylo dosaženo v případě, kdy výchozí alginát byl přečištěn dialýzou s PBS (pufrovaný fyziologický roztok, zkratka z angl. phosphate buffered saline) za přítomnosti látky schopné redukovat disulfidové vazby asociovaných proteinů³², jako např. dithioerythritolu a 2-sulfanyethanolu. Tímto postupem byl podstatně snížen obsah proteinů v alginátu a především byly odstraněny disulfidové vazby, které mohou vyvolávat při implantaci nežádoucí reakce. Pozitivní výsledky byly potvrzeny po implantaci těchto mikrokapsulí s enkapsulovanými Langerhansovými ostrůvky do těla laboratorních potkanů.

Algináty z různých zdrojů se liší rozdílnými poměry v obsahu guluronové (G) a manuronové (M) kyseliny. Thu a spol.^{33,34} v studiích *in vitro* zjistili, že mikrokapsule s vyšším obsahem G alginátů se vyznačují větší mechanickou stabilitou než kapsule připravené z frakce s jejich středním obsahem. Následující histologické testy³⁵ však ukázaly, že zatímco kapsule se středním obsahem G řetězců osvědčily dobrou biokompatibilitu a stabilitu *in vivo*, kapsule s vyšším obsahem G řetězců byly zcela obrostlé zánětlivými buňkami (makrofágy). Studium chemického složení povrchů těchto materiálů XPS fotoelektronovou spektroskopií bylo zjištěno, že kapsule s vyšším obsahem G alginátů obsahují evidentně větší množství PLL, navíc systém obsahuje menší počet opačně nabitých iontových párů. Vyšší koncentrace volných aminoskupin a zároveň menší počet vazebných míst vysvětlují silnou zánětlivou reakci vyvolávanou tímto materiálem.

Z pokusů o chemickou modifikaci mikrokapsulí na bázi alginát-PLL lze považovat za úspěšné následné naroubování poly(ethylenoxidu)³⁶, nebo pokrytí poly(ethylenglykolem)^{37,38} (PEG). V obou případech etherové vazby osvědčily velmi dobrou biologickou snášenlivost a takto vzniklý neo-

nogenní povrch kapsulí minimalizoval koagulaci krve, adsorpci proteinů, zánětlivou reakci a jiné imunologické procesy³⁹. Kromě alginátů byly patentovány i jiné přírodní materiály jako agar, agarosa, karagenan, chitosan, želatina, fibrinogen a kolagen. Mikrokapsule z těchto materiálů, připravené na stejném principu komplexů polyelektrolytů, byly použity pro enkapsulaci zvířecích buněk, kultivovaných buněk, bakterií, řas a hub⁴⁰. Polymerní mikrokuličky byly připraveny dispergováním vodných roztoků polymerů a buněk v organické fázi. Tak např. Langerhansovy ostrůvky byly suspendovány v agarose a vytlačovány z injekční jehly do studené lázně s parafinovým olejem⁴¹. Vzniklé kuličky byly dále pokryty polyakrylamidem fotochemickou polymerizací akrylamidu *in situ* za přítomnosti methylenbisakrylamidu jako sířovačla. Tyto kapsule vykazovaly velmi dobrou sekreci inzulínu jako odezvu na glukosu⁴².

Vzhledem k mírným podmínkám při enkapsulaci byl přírodní alginát nejčastěji používaným polymerem. Přírodní polymery však mají i své nevýhody. Rozdíly ve složení, způsobené různým obsahem přírodních příměsí u materiálů různého původu, mění jejich výslednou biokompatibilitu, pevnost a jiné vlastnosti. Nedávají tedy vždy záruku přesně definovaných a konstantních charakteristik mikrokapsulí. Z tohoto hlediska umožňuje užití syntetických polymerů lepší reprodukovatelnost a nabízí možnost „ušít na míru“ výsledné vlastnosti podle specifických potřeb. Proto se někteří autoři pokusili použít k enkapsulaci syntetické polymery; např. Cohen a spol.⁴³ zaměnili alginát za polyfosfazeny obsahující v postranních řetězcích karboxylové skupiny. Vlastní enkapsulace na principu tvorby komplexů polyelektrolytů probíhala analogicky. Hydrolyticky stabilní polyfosfazeny byly komplexovány ve vodném prostředí dvojnásobnými nebo trojnásobnými kationty Ca²⁺ nebo Al³⁺ a následně ještě stabilizovány roztokem polykationtu, např. PLL. *In vitro* testy prokázaly, že takto vzniklý komplex není toxický a podporuje růst a rozmnožování buněk.

Z množství pokusů o zlepšení mechanických vlastností alginátových mikrokapsulí jmenujme náhradu PLL jinými polykationty. Pokusy s použitím poly(vinylaminu) nebo poly(alylaminu)^{38,44} však nedopadly přesvědčivě. Podstatně lepších výsledků bylo dosaženo náhradou PLL (3-aminopropyl)polysiloxanem, připraveným sol-gel hydrolyzou dvou prekurzorů, (3-aminopropyl)trimethoxysilanu a tetramethoxysilanu⁴⁵. Přebytkem aminoskupin na povrchu hydrogelových kuliček byly dále neutralizovány ponořením do vodného roztoku alginátu sodného. Takto připravené kapsule alginát/(3-aminopropyl)polysiloxan/alginát byly úspěšně odzkoušeny ve funkci umělého pankreatu.

Další modifikace spočívají v zesílení vrchní PLL vrstvy klasických kapsulí alginát-PLL tosylovaným poly(vinylalkoholem) nebo částečnou modifikací volných aminoskupin PLL fotocitlivým 3,5-difenylpenta-2,4-dienoylchloridem a následným světelným ozářením při ~320 nm (cit.^{46,47}). V obou případech se zlepšila mechanická pevnost mikrokapsulí, jistou nevýhodou chemického postupu však je uvolňování toluensulfonové kyseliny jako vedlejšího produktu.

5. Syntetické polymery

Jak již bylo řečeno, výhodou syntetických polymerů oproti přírodním je možnost přípravy hydrogelů s přesně definova-

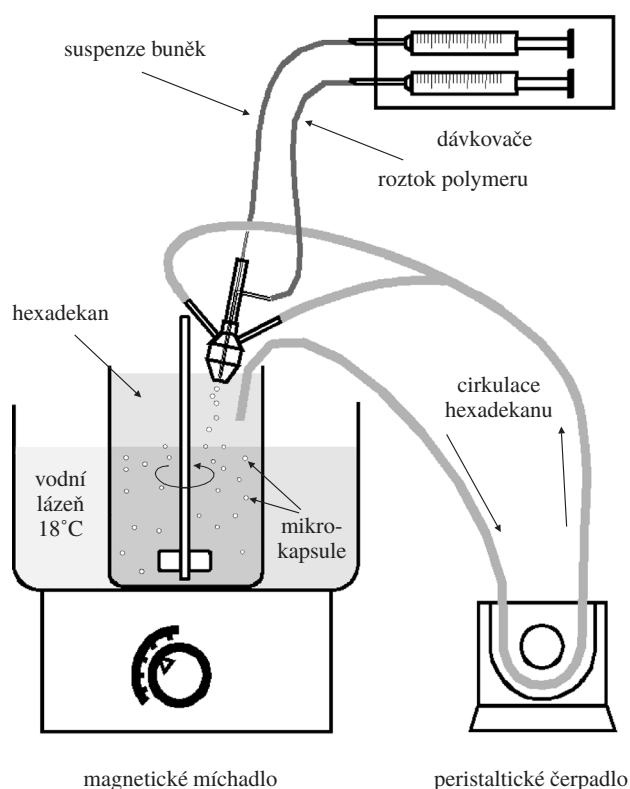
nými parametry pro požadovanou velikost pórů a optimálními chemickými vlastnostmi povrchu. Zavedením kovalentních vazeb u syntetických polymerů lze odstranit problémy s mechanickou stabilitou, projevující se u komplexů polyelektrolytů. Přesto však je počet navržených postupů pro enkapsulaci buněk s využitím syntetických polymerů podstatně menší. Hlavní příčinou jsou podmínky polymerizace nebo síťování (vyšší teplota, rozpouštědlo, přítomnost iniciátorů aj.), které jsou nutné pro vytvoření rigidní trojrozměrné matrice, ale které by byly pro přítomné buňky většinou zhoubné, toxické nebo z jiných důvodů nepříznivé.

Pokud je známo, enkapsulace buněk do kovalentně zesítěné trojrozměrné polymerní matrice byla provedena jen dvěma pracovními týmy. V obou případech bylo použito hydrogelu na bázi PEG. Pathak a spol.⁴⁸ suspendovali buňky do rozvětveného poly(ethylen glykol)-akrylátu s ethyleosinem a triethanolaminem a již dříve popsaným způsobem získané kuličky byly následně zesítěny polymerací *in situ* pomocí UV záření. Takto vzniklé kapsule vykazovaly velmi dobrou biokompatibilitu i imunoprotekci. Princip zesíťování hydrogelu na bázi PEG podle patentu autorů Jordana a spol.⁴⁹ spočívá v pokrytí buněk fluorescenčním barvivem (fotosenzibilizátorem), suspenzi takto pokrytých buněk v polymerní směsi a následném zesíťování vyvolaném laserovým zářením o vhodné frekvenci. Barvivo je vlivem mírného záření excitováno do tripletového stavu, což umožňuje vznik volných radikálů z vhodného donoru elektronů (triethanolamin) a následné zesíťování hydrogelu. Tloušťku membrány takto vzniklé mikrokapsule (10–20 μm) lze regulovat podmínkami přípravy, mj. dobou ozáření systému. Z řady testovaných fluorescenčních barviv se nejlépe osvědčily isothiokyanát eosinu a fosfolipidy odvozené od fluoresceinu a eosinu, které vytvářejí specifické vazby s buněčnou membránou. Jako výchozí polymer byl použit diakrylát PEG 400 nebo polyakrylát PEG 18500. Autoři prezentují úspěšné testy na životnost a sekreční aktivitu takto enkapsulovaných Langerhansových ostrůvků.

Výhody pevných kovalentních vazeb syntetických polymerů a možnosti dosažení lepší reprodukovatelnosti vlastností mikrokapsulí (biokompatibilita, permeabilita) využil Sefton se spolupracovníky. Jejich způsob je založen na srážení nezesíťovaných, ve vodě nerozpustných polymerů z roztoků organických rozpouštědel. Tento způsob enkapsulace má specifické požadavky. Jedním ze základních je optimální volba organického rozpouštědla⁵⁰, které nesmí být toxické ani jinak škodlivé pro enkapsulované buňky. Prvním použitým hydrogelem byl komerční Eudragit RL (cit.⁵¹), při dalším hledání připravili kopolymery na bázi methakrylátů s kombinovanými volnými skupinami v postranních řetězcích. Jako výchozích monomerů použili kyselinu methakrylovou, 2-(dimethylamino)ethyl-methakrylát, methyl-methakrylát (MMA) a 2-hydroxyethyl-methakrylát (HEMA)^{52,53}. V těchto testech se osvědčil jako perspektivní hydrogel poly(HEMA-*co*-MMA) (molární poměr 75:25), připravený roztokovou polymerací v ethanolu⁵⁴. Následovala řada publikací, zabývající se enkapsulací Langerhansových ostrůvků produkujících inzulin⁵⁵, buněk PC 12 se sekrecí dopaminu⁵⁶, jaterních buněk HepG2 vylučujících protein⁵⁷, CHO fibroblastů⁵⁸ aj. a byly sledovány interakce buněk s membránou hydrogelu, jejich životnost a sekreční aktivita, morfologie a permeabilita polymerní stěny kapsulí, limitní molekulová hmotnost propustnosti, biokompatibilita hydrogelu a další charakteristiky. Pro tento způsob enkapsulace

byla vyvinuta speciální aparatura, jejíž poslední modifikace⁵⁹ umožňuje připravit mikrokapsule o průměru ~400 μm . Schéma této aparatury je na obrázku 2. Roztok kopolymeru a suspenze buněk v živném roztoku (např. Ficoll 400, Matrigel[®]) jsou odděleně dávkovány do vytlačovací trysky skládající se ze dvou koncentrických injekčních jehel umístěných ve speciální komůrce. Střížné síly pro vznik kapsulí je dosaženo pulzy proudu hexadekanu, umožňujícími regulovat velikost kapsulí v rozmezí 300–600 μm . Odkapávající mikrokapsule klesají za mírného míchání nejprve vrstvou hexadekanu, kde se stabilizuje jejich sférický tvar, do srážecí lázně PBS. Pro usnadnění přechodu kuliček z vrstvy hexadekanu do PBS se přidáním malého množství surfaktantu snižuje mezifázové napětí. Následuje promývání v PBS, přičemž se vymývá rozpouštědlo z polymerní membrány za mírné kontrakce mikrokapsulí.

Výsledky testů poly(HEMA-*co*-MMA) při aplikaci různých typů buněk byly celkem úspěšné, naznačovaly však možnosti dalšího zlepšení. Dalším cílem byla příprava hydrogelu s vyšší permeabilitou nízkomolekulárních substrátů a se zlepšenou interakcí s buňkami. Tato strategie sleduje zlepšení životních podmínek enkapsulovaných buněk. Očekávaným efektem je pak prodloužení jejich životnosti a zlepšení jejich sekreční aktivity. Za tím účelem byly připraveny kopolymery HEMA s různými typy alkyl-akrylátů a methakrylátů a také amidů kyseliny akrylové a methakrylové^{60–62}. Kopolymery byly charakterizovány stanovením botnavosti ve vodě a PBS, viskozimetricky stanovenými relativními molekulovými



Obr. 2. Schéma enkapsulační aparatury

Tabulka I
 Charakteristiky HEMA kopolymerů⁶²

Kopolymer	Molární poměr monomerů	Botnavost ^a [hm.%]		Rel. molekulová hmotnost $M_n \cdot 10^{-3}$	Obsah komonomeru (NMR) [mol.%]
		ve vodě	v PBS		
HEMA-MMA	75:25	27,0	23,2	300	21,0
HEMA-EMA	90:10	33,9	30,6	320	12,6
	80:20	28,5	24,8	280	20,7
	70:30	24,3	20,5	330	26,7
HEMA-BA	90:10	36,8	31,3	150	9,7
	85:15	35,3	28,1	120	9,8
	70:30	28,8	20,7	150	20,1
HEMA-BMA	90:10	31,1	26,1	275	9,8
	85:15	27,5	23,4	280	13,9
	70:30	19,2	13,8	290	27,6
HEMA-iPAAm	90:10	41,2	39,1	140	3,6
	80:20	40,7	37,1	140	6,2
	70:30	39,8	35,2	150	10,8
HEMA-iPMAAm	90:10	39,5	37,2	236	4,3
	80:20	38,3	37,6	188	10,0
	70:30	38,2	34,1	183	16,1
HEMA-tBAAm	90:10	35,6	32,4	200	5,9
	80:20	31,5	28,4	120	11,2
	70:30	27,6	24,5	115	15,9
HEMA-tBMAAm	90:10	35,4	34,4	n ^b	4,9
	80:20	32,3	31,4	n ^b	9,3
	70:30	30,1	26,4	n ^b	14,7

^a Procentový obsah vody v zbotnalém polymeru; ^b nestanoveno; EMA ethyl-methakrylát; BA butyl-akrylát; BMA butyl-methakrylát; iPAAm *N*-isopropylakrylamid; iPMAAm *N*-isopropylmethakrylamid; tBAAm *N-terc*-butylakrylamid; tBMAAm *N-terc*-butylmethakrylamid

mi hmotnostmi a NMR analýzou a jejich vlastnosti byly porovnávány se standardním kopolymerem HEMA-MMA (tab. I). Je evidentní, že většina připravených vzorků, zvláště pak s amidovými komonomery, má vyšší botnavost, což svědčí o jejich větší prostupnosti pro nízkomolekulární substráty. Relativní molekulové hmotnosti jsou velmi důležité veličiny, určující vhodnost kopolymeru pro enkapsulaci. Bylo zjištěno, že pro alkyl-akrylátové a methakrylátové kopolymery jsou optimální hodnoty kolem 300 000. Zřejmě nízká relativní molekulová hmotnost kopolymeru HEMA s butyl-akrylátem byla příčinou borcení sférického tvaru kapsulí. Naproti tomu mnohem nižší hodnoty u amidových kopolymerů vykazovaly vyhovující mechanickou stabilitu kapsulí. NMR analýzy stanovují skutečný poměr monomerních jednotek v kopolymeru a zároveň umožňují zjistit kopolymerační reaktivitu jednotlivých komonomerů vůči HEMA. Amidové kopolymery HEMA jsou na rozdíl od alkylsubstituovaných transparentní a umožňují tak přímé mikroskopické sledování enkapsulovaných buněk.

6. Biologické testy

Vzhledem k tomu, že tento přehledný článek je určen především pro chemickou veřejnost, bude biologickým testům

věnována jen rámcová pozornost. Základní testy lze rozdělit do dvou skupin:

In vitro testy

- Cytotoxicita – provádí se 24hodinový sterilní výluh polymerního vzorku, který je přidán ke kultuře buněk. Sleduje se vliv polymerů na životaschopnost a růstový potenciál buněk⁶³.
- Adhezivita buněk – buňky jsou kultivovány na povrchu polymeru a mikroskopicky se sleduje, zda jsou schopny adheze a následného růstu na těchto polymerech⁶⁴.
- Vitalita a metabolická aktivita buněk – první testy se provádějí v kultivačních miskách. Jako příklad testu na vitalitu uveďme vyšetření pomocí trypanové modři, kterou se mrtvé buňky zbarví a statistickým způsobem se vyhodnotí počet živých a mrtvých buněk v určitých časových intervalech pokusu. Metabolická aktivita buněk je velmi často stanovována MTT testem, spočívajícím v přeměně bezbarvého 5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-difenylnitroimidazolium-bromidu mitochondriální sukcinátdehydrogenasou na barevný formazan, jehož koncentrace se po rozpuštění v dimethylsulfoxidu stanovuje fotometricky při vlnové délce 570 nm. Pro názornost a zároveň doplnění charakteristik HEMA kopolymerů s alkyl-akryláty a methakryláty a akryl- a methakrylamidy⁶², jsou výsledky těchto testů

Tabulka II

Adheze, růst a metabolická aktivita 3T3 fibroblastů na povrchu polymerních vzorků⁶²

Kopolymer	24 hodin		48 hodin		96 hodin		MTT test absorbance při 570 nm
	PB ^a ×10 ⁻³	MB ^b [%]	PB×10 ⁻³	MB [%]	PB×10 ⁻³	MB [%]	
HEMA	51	55,6	38	23,7	72	12,5	0,391
HEMA-MMA ^c	57	21,1	74	25,6	117	5,1	0,273
HEMA-EMA ^d	69	17,4	153	19,6	246	6,1	0,768
HEMA-BA ^d	120	37,5	131	13,0	252	19,0	0,711
HEMA-BMA ^d	66	31,8	141	24,8	102	25,0	0,284
HEMA-iPAAm ^d	63	41,2	92	23,0	117	7,7	0,165
HEMA-iPMAAm ^d	88	29,3	84	26,3	81	14,8	0,267
HEMA-tBAAm ^d	110	34,3	119	13,5	204	17,6	0,378
HEMA-tBMAAm ^d	96	23,6	99	12,2	193	11,5	0,339

^a PB: počet buněk, ^b MB: podíl mrtvých buněk, ^c molární poměr HEMA:MMA v kopolymerizační směsi 75:25; ^d molární poměr HEMA:komonomer v kopolymerizační směsi 70:30

uvedeny v tabulce II. Lze tedy vyvodit závěr, že nejlepší dlouhodobé vitality a zároveň metabolické aktivity 3T3 fibroblastů bylo dosaženo na površích poly(HEMA-co-EMA) a poly(HEMA-co-BA) hydrogelů. Oba uvedené testy se provádějí i pro enkapsulované buňky, avšak za speciálních technických podmínek⁶⁵. Sekreční aktivita enkapsulovaných buněk se pochopitelně testuje i stanovením množství specifických buněčných produktů^{42,45,55-59}, vztaženého na počet buněk.

In vivo testy probíhají ve dvou fázích:

- 1) Implantace polymerů – mikrokapsule bez buněk nebo proužky polymerních vzorků jsou implantovány subkutánně (do podkoží), intraperitoneálně (do pobřišnice) nebo intracerebrálně (do mozкового parenchymu) pokusných zvířat (většinou krysy) a po určité době vyjmuty a fixovány pro histologické vyhodnocení.
- 2) Histologické testy reakcí hostitele na implantované vzorky polymerů – histologická vyšetření implantátů prováděná v určitých časových intervalech se zaměřením na detekci charakteristických buněk kolonizujících nejen povrch implantátu, ale i okolní tkáň. Jde především o kolonizaci zánětlivými buňkami (siderofágy, reaktivními astrocyty, obřími buňkami z cizích těles, makrofágy, kolagenními vlákny⁶¹ aj.), které jsou citlivým ukazatelem intenzity zánětu indukovaného implantovaným polymerem.

7. Závěr

Cílem výzkumu v oblasti buněčné terapie je vývoj implantátů obsahujících živé alogenní nebo xenogenní buňky, jejichž aplikací by bylo možno léčit choroby způsobené ztrátou sekreční činnosti buněk. Buněčná terapie je založena na koncepci imunoprotekce, spočívající v enkapsulaci buněk či malých kousků tkání do semipermeabilní membrány a následné implantaci do těla pacienta, kde dlouhodobě vyrovnávají deficit chybějících enzymů, bílkovin a jiných biologických působků. Funkci semipermeabilní membrány, která má zabezpečit př-

sun kyslíku a požadovaných metabolitů, dále umožnit uvolňování produktů buněčné sekrece a zamezit průniku větších cytotoxických složek imunitního systému, úspěšně plní polymerní hydrogely.

V tomto přehledném článku jsme se zaměřili pouze na problematiku mikroenkapsulace, používající sférické kapsule o průměru 100–600 μm. Byly uvedeny důležité požadavky na polymerní hydrogely pro účely mikroenkapsulace. Z přehledu dosud použitých polymerních materiálů je evidentní, že převládají hydrogely na bázi komplexů polyelektrolytů – převážně přírodních polymerů, jejichž velkou předností je jednoduchá příprava za mírných podmínek, vhodná pro enkapsulované buňky. Naproti tomu trojrozměrná struktura polyelektrolytových komplexů je držena pouze elektrostatickými silami mezi páry opačně nabitých iontů a jejich mechanická pevnost a hydrolytická stabilita jsou omezené. Zavedením syntetických polymerů a kopolymerů s kovalentními vazbami lze připravit hydrogely lépe reprodukovatelné a definovatelné, odolné vůči hydrolyze a s lepšími mechanickými vlastnostmi. Problémem je naopak volba vhodujících podmínek polymerizace za přítomnosti buněk nebo volba netoxického rozpouštědla pro srážení polymerních roztoků v PBS. Jen rámcově jsou zmíněny biologické testy pro vyhodnocení vhodnosti polymerních hydrogelů jak pro enkapsulaci buněk, tak i implantaci mikrokapsul do těla pokusných zvířat.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR, grantem 304/00/0338.

LITERATURA

1. Gentile F. T., Doherty E. J., Rein D. H., Shoichet M. S., Winn S. R.: *React. Polym.* 25, 207 (1995).
2. Chang T. M. S.: *Science* 146, 524 (1964).
3. Lim F., Sun A. M.: *Science* 210, 908 (1980).
4. Tze W., Tai J., Wong F. C., Davis H. R.: *Diabetologia* 19, 541 (1980).

5. Sun A. M., O'Shea G. M.: *J. Controlled Release* 2, 137 (1985).
6. Fan M. Y., Lum Z. P., Fu X. W., Levesque L., Tai I. T., Sun A. M.: *Diabetes* 39, 519 (1990).
7. Sutherland D. E. R., Moudry-Munns K. C.: *Transplant. Proc.* 22, 571 (1990).
8. Lacy P. E., Hegre O. H., Gerasimidi-Vazeou A., Gentile F. T., Dionne K. E.: *Science* 254, 1782 (1991).
9. Scharp D. W., Swanson C. J., Olack B. J., Latta P. P., Hegre O. D., Doherty E. J., Gentile F. T., Flavin K. S., Ansara M. F., Lacy P. E.: *Diabetes* 43, 1167 (1994).
10. Aebischer P., Winn S. R., Galletti P. M.: *Brain Res.* 448, 364 (1988).
11. Aebischer P., Goddard M., Signore P., Timpson R.: *Exp. Neurol.* 126, 1 (1994).
12. Campioni E. G., Nobrega J. N., Sefton M. V.: *Biomaterials* 19, 829 (1998).
13. Emerich D. F., Winn S. R., Harper J., Hammang J. P., Baetge E. E., Kordower J. H.: *J. Comp. Neurol.* 349, 148 (1994).
14. Lindner M. D., Kearns C. E., Winn S. R., Frydel B., Emerich D. F.: *Cell Transplant.* 5, 205 (1996).
15. Emerich D. F., Hammang J. P., Baetge E. E., Winn S. R.: *Exp. Neurol.* 130, 141 (1994).
16. Sagen J., Wang H., Tresco P. A., Aebischer P.: *J. Neurosci.* 13, 2415 (1993).
17. Joseph J. M., Goddard M. B., Mills J., Padrun V., Zurn A., Zelinski B.: *Cell Transplant.* 3, 355 (1994).
18. Aebischer P., Buschser E., Joseph J. M., Favre J., deTribollet N., Lysaght M. J.: *Transplantation* 58, 1275 (1994).
19. Cieslinski D. A., Humes H. D.: *Biotechnol. Bioeng.* 43, 678 (1994).
20. Wong H., Chang T. M.: *Int. J. Artif. Organs* 9, 335 (1986).
21. Aebischer P., Russell P. C., Christenson L., Panol G., Monchik J. M., Galletti P. M.: *ASAIO Trans.* 32, 134 (1986).
22. Koo J., Chang T. S. M.: *Int. J. Artif. Organs* 16, 557 (1993).
23. Liu H. W., Ofosu F. A., Chang P. L.: *Hum. Gene Ther.* 4, 291 (1993).
24. Sagot Y., Tan S. A., Baetge E. E., Schmalbruch H., Kato A. C., Aebischer P.: *Eur. J. Neurosci.* 7, 1313 (1995).
25. Williams D. F. (Ed.): *Definitions in Biomaterials*. Elsevier, Amsterdam (1987).
26. Hackel V., Klein J., Megret R., Wagner F.: *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1, 291 (1975).
27. Kierstan M., Bucke C.: *Biotechnol. Bioeng.* 19, 387 (1977).
28. Lim F., Moss R. D.: *J. Pharm. Sci.* 70, 351 (1981).
29. Fuoss R. M., Sadek H.: *Science* 110, 552 (1949).
30. Goosen M. F. A., O'Shea G. M., Sun A. M. F.: EP 0 127 713 A2 (1984) (A 61 K 9/50, 9/52).
31. O'Shea G. M., Goosen M. F. A., Sun A. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 804, 133 (1984).
32. Clayton H. A., James R. F. L., London N. J. M.: WO 93/03710 (A61K 9/16, 9/50; C12N 11/4).
33. Thu B., Bruheim P., Espevik T., Smidrod O., Soon-Shiong P., Skjak-Break G.: *Biomaterials* 17, 1031 (1996).
34. Thu B., Bruheim P., Espevik T., Smidrod O., Soon-Shiong P., Skjak-Break G.: *Biomaterials* 17, 1069 (1996).
35. deVos P., Hoogmoed C. G., Busscher H. J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 252 (2002).
36. Sawhney A. S., Hubbell J. A.: *Biomaterials* 13, 863 (1992).
37. Sawhney A. S., Pathak C. O., Hubbell J. A.: *Biomaterials* 14, 1008 (1993).
38. Kung I. M., Wang F. F., Chang Y. C., Wang Y. J.: *Biomaterials* 16, 649 (1995).
39. Alcantar N. A., Aydil E. S.: *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 343 (2000).
40. Mosbach K., Nilsson K.: US 4,647,536 (1987).
41. Dupuy B., Gin H., Baquey C., Ducassou J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 22, 1061 (1988).
42. Howell S. L., Ishaq S., Tyhurst M.: *Proc. Physiol. Soc.* 1981 (November), 20.
43. Cohen S., Bano C., Visscher K. B., Chow M., Allcock H. R., Langer R. S.: US 5,494,682 (1996) (B01J 13/02; A61K 9/50).
44. Wang F. F., Wu C. R., Wang Y. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1115 (1992).
45. Sakai S., Ono T., Ijima H., Kawakami K.: *Biomaterials* 22, 2827 (2001).
46. Wang Y. J.: *Mater. Sci. Eng., C* 13, 59 (2000).
47. Chang S. J., Lee C. H., Hsu C. Y., Wang Y. J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 59, 118 (2001).
48. Pathak C. P., Sawhney A. S., Hubbell J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8311 (1992).
49. Jordan O., Ranieri J., Aebischer P., Clemence J. F.: WO 96/31199 (A61K 9/50; C12N 11/04; A61L 27/00).
50. Stevenson W. T. K., Evangelista R. A., Sugamori M. E., Sefton M. V.: *Biomater., Artif. Cells Artif. Organs* 16, 747 (1988).
51. Boag A. H., Sefton M. V.: *Biotechnol. Bioeng.* 30, 954 (1987).
52. Sefton M. V., Broughton R. L., Sugamori M. E., Mallabone C. L.: *J. Controlled Release* 6, 177 (1987).
53. Mallabone C. L., Crooks C. A., Sefton M. V.: *Biomaterials* 10, 380 (1989).
54. Sefton M. V., Stevenson W. T. K.: *Adv. Polym. Sci.* 107, 145 (1993).
55. Sefton M. V., Kharlip L.: *Pancreatic Islet Transplantation, sv. III: Immunoisolation of Pancreatic Islets* (Lanza R.P., Chick W.L., Eds.). R.G. Landes Company, Austin 1994.
56. Roberts T., De Boni U., Sefton M. V.: *Biomaterials* 17, 267 (1996).
57. Uludag H., Sefton M. V.: *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 1213 (1993).
58. Uludag H., Sefton M. V.: *Biotechnol. Bioeng.* 39, 672 (1992).
59. Uludag H., Horvath V., Black J. P., Sefton M. V.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1199 (1994).
60. Lukáš J., Palečková V., Smetana Jr. K., Dvořánková B.: CZ pat. př. PV 4248-98 (1998) (C0813/075).
61. Mokřý J., Karbanová J., Lukáš J., Palečková V., Dvořánková B.: *Biotechnol. Prog.* 16, 897 (2000).
62. Lukáš J., Palečková V., Mokřý J., Karbanová J., Dvořánková B.: *Macromol. Symp.* 172, 157 (2001).
63. Silver, F. H.: *Biomaterials, Medical Devices and Tissue Engineering*, str. 300. Chapman Hall, Londýn 1994.
64. Woerly S., Ulbrich K., Chytrý V., Smetana K., Petrovická

- P., Říhová B., Morassutti D. J.: Cell Transplant. 2, 229 (1993).
 65. Lahooti S., Sefton M. V.: Biomaterials 21, 987 (2000).

J. Lukáš^a, T. Fenclová^a, J. Mokry^b, and J. Karbanová^b
 (^a*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^b*Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové*): **Chemistry, Physical Properties and Biocompatibility of Hydrogels for Immunoprotection of Mammalian Cells**

The goal in the research of cell therapy is to develop implants containing living allogenic or xenogenic cells to treat disorders caused by the loss of secretory cell function. Cell therapy is based on the concept of immunoprotection, which

involves encapsulation of cells or small clusters of tissue in a semipermeable membrane capsule and subsequent implantation of the capsules into the body in order to eliminate a long-term lack of enzymes, proteins, or other biological substances. The semipermeable membrane should permit diffusion of oxygen and necessary metabolites and release of cell secretion products but restrict the transport of large cytotoxic agents of the body's immune system. This function is successfully fulfilled by polymer hydrogels. The review concerns cell microencapsulation, i.e. producing capsules 100–600 µm in diameter. The requirements qualifying polymers for cell encapsulation are discussed. Various types of polymers used in cell microencapsulation are reviewed and their pros and cons discussed. Biological tests of hydrogels for cell encapsulations are briefly mentioned.



Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Fakulta ekonomicko-správní

pořádá veletrh pracovních příležitostí

Kontakt 2004

dne 29.4.2004 v Aule Univerzity Pardubice

Program:

8:00–10:00 registrace firem
 10:00–15:00 ústní prezentace v aule
 firemní prezentace u stánků

Kontakt 2004 je prezentací firem působících v ČR s cílem informovat studenty o profilech firem a možnostech uplatnění absolventů. K dispozici bude katalog s informacemi o zúčastněných firmách.

Bližší informace o veletrhu, přihlášky k účasti a podmínky účasti je možné získat na děkanátu Fakulty chemicko-technologické, www.upce.cz, kontaktní osoby: doc. Ing. Ladislav Svoboda, CSc. a Ing. Iva Ulbrichová, CSc., nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, dekanat@upce.cz, tel 466 037 514, -507.