

Zofia Bakula^{1*}, Radosław Stachowiak¹, Jarosław Wiśniewski¹,
Ludomira Granicka² i Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

²Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Wpłynęło w czerwcu 2013 r.

Spis treści: 1. Wprowadzenie. 2. Metody immobilizacji komórek. 2.1. Unieruchomienie bez nośnika. 2.2. Unieruchomienie na powierzchni nośnika. 2.3. Unieruchomienie wewnątrz nośnika. 2.3.1. Pułapkowanie. 2.3.2. Kapsułkowanie. 2.3.3. Nanopłaszczanie. 3. Historia zastosowania nośników do immobilizacji materiału biologicznego. 4. Immobilizacja w zastosowaniach biomedycznych. 4.1. Drogi podawania terapeutyków przy użyciu unieruchomionych komórek. 4.2. Właściwości kapsułek wykorzystywanych we wszczepieniach. 4.2.1. Struktura materiału nośnika. 4.2.2. Biogodność. 4.2.3. Wytrzymałość. 4.2.4. Właściwości chemiczne. 4.3. Właściwości kapsułek wykorzystywanych w terapii doustnej. 4.4. Immobilizowany materiał biologiczny. 4.5. Biomedyczne zastosowania immobilizowanych komórek. 4.5.1. Wykorzystanie unieruchomionych komórek eukariotycznych. 4.5.2. Wykorzystanie unieruchomionych drobnoustrojów. 5. Podsumowanie

Cell immobilization – biomedical significance

Abstract: Cell encapsulation, which aims to entrap viable cells within the confines of semi-permeable membranes, represents one of the current leading methodologies aimed at the delivery of biological factors to patients for the treatment of multiple diseases. The pores of the membrane are suitably sized to allow the entry of small molecules such as oxygen, nutrients and electrolytes into the capsule and egress of metabolites and small bioactive molecules from the capsule. Entrapment of cells in physical membranes has been practiced since the early 1930s. Numerous encapsulation techniques have been developed over the years and they are classified as entrapment, microencapsulation (usually small spherical devices), macroencapsulation (hollow fiber membranes) and nanocoating. Cell encapsulation technologies were initially directed towards the transplantation of cells across an immunological barrier without the use of immunosuppressant drugs. Some encapsulated microorganisms may carry a transfected human gene, and thus become a source of valuable regulatory factors or anti-tumor factors. Such factors released in strategic locations may direct or modify the biological processes in the eukaryotic organism in biomedical applications. Membranes with immobilized cells can be also used as a novel method for oral drug delivery.

Contents: 1. Introduction. 2. Methods of cell immobilization. 2.1. Immobilization without carrier. 2.2. Immobilization on carrier. 2.3. Immobilization in carrier. 2.3.1. Entrapment. 2.3.2. Encapsulation. 2.3.3. Nanocoating. 3. The history of using membranes for immobilization. 4. Encapsulation in biomedical applications. 4.1. Methods of drug delivery using encapsulated cells. 4.2. Membrane properties important for implantation. 4.2.1. Structure of carrier material. 4.2.2. Biocompatibility. 4.2.3. Durability. 4.2.4. Chemical properties. 4.3. Membrane properties for oral drug delivery. 4.4. Immobilized biological material. 4.5. Biomedical applications of encapsulated cells. 4.5.1. Use of encapsulated eukaryotic cells. 4.5.2. Use of encapsulated microorganisms. 5. Summary

Słowa kluczowe: immobilizacja, pułapkowanie, kapsułkowanie, nanopłaszczanie, terapia biohybrydowa

Key words: immobilization, entrapment, encapsulation, nanocoating, biohybrid therapy

1. Wprowadzenie

Znanych jest wiele chorób wywołanych nieprawidłowym metabolizmem cząsteczek w organizmie bądź ich nieodpowiednim stężeniem [77]. Skuteczne leczenie tego typu schorzeń wymaga dostarczenia biologicznie aktywnych cząstek terapeutycznych do właściwego miejsca w organizmie i ich uwalniania, najkorzystniej, w kontrolowany sposób. Systemy opierające się na immobilizowanych komórkach w półprzepuszczalnych nośnikach mających postać implantu dają medycynie nowe możliwości i pozwalają na produkcję substancji, których organizm sam produkować nie może. Unieruchamiać można szerokie spektrum komórek, jednocześnie

nie redukując niezbędnej dawki podawanych leków immunosupresyjnych, minimalizując skutki uboczne i poprawiając jakość życia pacjentów [53]. Immobilizacja komórek ma wiele zalet w porównaniu z immobilizacją białek. Jest mniej kosztowna, pozwala na długotrwałe i kontrolowane dostarczanie cząsteczek produkowanych *de novo*, a gdy implant ulegnie uszkodzeniu, toksyczność spowodowana wysokim stężeniem leku jest znacznie mniejsza. Unieruchamianie materiału biologicznego może być także wykorzystywane, jako nowa metoda doustnego podawania leków i szczepionek [62]. Jest ona szczególnie korzystna w porównaniu z doustnym podawaniem immobilizowanych białek, które często ulegają uszkodzeniu podczas wędrówki przez układ trawienny.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: zofiabakula@biol.uw.edu.pl

2. Metody immobilizacji komórek

Immobilizacja drobnoustrojów jak i komórek eukariotycznych polega na częściowym lub całkowitym ograniczeniu ich swobodnego ruchu przy jednoczesnym zapewnieniu im dostępu do składników odżywczych i odpływu produktów przemiany. Istnieje wiele klasyfikacji metod unieruchamiania, a najpopularniejsza wyróżnia: (i) unieruchomienie bez nośnika, (ii) unieruchomienie na powierzchni nośnika, (iii) unieruchomienie wewnątrz nośnika [74].

2.1. Unieruchomienie bez nośnika

Unieruchomienie bez nośnika wykorzystuje naturalną (samoagregacja) bądź indukowaną zdolność komórek do tworzenia skupisk (indukowana flokulacja komórek i sieciowanie przestrzenne).

Samoagregacja możliwa jest dzięki wydzielaniu przez komórki związków, które umożliwiają im wzrost w postaci kłaczek czy granulek (np. polimukosacharydów), a tworzeniu skupisk sprzyja duża koncentracja biomasy. Zdolność komórek do wzajemnego łączenia się może być zwiększana np. poprzez stosowanie odpowiednich podłoży, regulację pH, temperatury czy stężenia tlenu, a także poprzez dodawanie polielektrolitów. Manipulowanie wyżej wymienionymi czynnikami w celu umożliwienia tworzenia skupień i konglomeratów nazywane jest indukowaną flokulacją. Materiał biologiczny otrzymany zarówno w procesach samoagregacji jak i flokulacji charakteryzuje się jednak małą wytrzymałością mechaniczną, co ogranicza możliwości jego zastosowania.

Sieciowanie przestrzenne to wiązanie komórek różnymi substancjami mogącymi reagować z grupami funkcyjnymi osłon komórkowych np. aldehydem glutarowym, chlorkiem cyjanurowym bądź heksametylocyaniną. Wzajemne sieciowanie daje zwykle dosyć trwałe biomateriały, jednak może prowadzić do częściowej utraty aktywności komórek i utrudniać dyfuzję substratów.

2.2. Unieruchomienie na powierzchni nośnika

W obrębie metod unieruchamiania na powierzchni nośnika wyróżnia się adsorpcję i adhezję oraz wiązanie kowalencyjne.

Adsorpcja i adhezja oparte są na wiązaniach jonowych, wodorowych, hydrofobowych, siłach elektrostatycznych, siłach van der Waalsa lub kombinacjach tych sił. Nośnik (np. celulozę, drewno, szkło porowate, tlenki metali, syntetyczne polimery) wprowadza się do roztworu z materiałem biologicznym i pozostawia na pewien czas, bez mieszania lub z mieszaniem, w celu osadzenia się komórek. Skuteczność unieruchamiania zależy od rodzaju matrycy, typu zastosowanych komórek,

ich metabolizmu i cech środowiska [6]. Wadą tej metody jest uzyskiwanie stosunkowo niskiego stężenia biomasy na jednostkę objętości bioreaktora.

Wiązanie kowalencyjne polega na utworzeniu wiązań chemicznych takich jak wiązania estrowe czy peptydowe między grupami funkcyjnymi składników osłon komórek a nośnikiem (siła przyczepu jest tu wyższa niż w przypadku adsorpcji i adhezji). W metodzie tej stosuje się czynnik wiążący (np. aldehyd glutarowy) i nośnik (np. ziemię okrzemkową, szkło porowate, pochodne celulozy, akrylany, skały wulkaniczne, bawełnę) [6]. Aby poprawić efektywność immobilizacji sugeruje się obniżenie siły elektrostatycznego odpychania komórki – nośnik, bądź nadaje się powierzchni komórki lub nośnika odpowiedni ładunek (np. poprzez zastosowanie polietylenoiminy). Zarówno czynniki wiążące jak i stosowane modyfikacje nośnika muszą być indywidualnie dobierane, gdyż mogą one redukować żywotność komórek oraz powodować opory dyfuzyjne.

W metodach wykorzystujących wiązanie do powierzchni nośnika należy zwracać szczególną uwagę na zmiany środowiska (np. spadek pH może powodować odklejanie się komórek). Ponadto obserwuje się częściowe uwalnianie materiału biologicznego związane z autolizą komórek z niższych warstw, turbulencjami czy przepływem fazy ciekłej.

2.3. Unieruchomienie wewnątrz nośnika

Unieruchomienie materiału wewnątrz nośnika polega na fizycznym zamknięciu komórek w matrycy. Drobnoustroje zamknąć można wewnątrz półprzepuszczalnej membrany w postaci kapsułki (nanokapsułkowanie i mikrokapsułkowanie) bądź kapilary (makrokapsułkowanie) lub pułapkować w porowatym nośniku [75].

2.3.1. Pułapkowanie

Pułapkowanie (inkluzyja) polega na uwięzieniu komórek w trójwymiarowej matrycy, której rozmiar jest istotnie większy od rozmiarów komórek (najczęściej są to kuleczki o średnicy 0,3–3 mm) [6]. Materiał biologiczny można wymieszać z roztworem nośnika (monomerem bądź nieusieciowanym polimerem) i środka sieciującego, a następnie układ taki poddać polimeryzacji. Do produkcji matryc pełnożelowych wykorzystuje się związki chemiczne pochodzenia naturalnego bądź syntetyczne, które żelują poprzez wytworzenie między cząsteczkami wiązań wodorowych, hydrofobowych, kowalencyjnych lub oddziaływań jonowych. Muszą one spełniać pewne wymagania: nie być toksyczne względem unieruchamianych komórek, tworzyć żel w łagodnych warunkach (temperatura, pH, nietoksyczne odczynniki) oraz mieć odpowiednie właściwości mechaniczne [34]. W biotechnologii materiałem najczęściej stosowanym

do pułapkowania jest alginian sodu (jednowartościowa sól kwasu alginianowego) – liniowy kopolimer zbudowany z dwóch typów monomerów: kwasu β -D-mannurowego (M) i α -L-guluronowego (G), pozyskiwany z morskich brunatnic.

2.3.2. Kapsułkowanie

Kapsułkowanie polega na otaczaniu rdzenia ściankami uformowanymi z jednej lub kilku substancji okrywających [2]. Rdzeń stanowi zwykle od 10 do 90% ogólnej masy kapsułki. Może nim być substancja lub mieszanina substancji w postaci stałej, ciekłej lub gazowej. Materiałem ścianek mogą być związki naturalne bądź syntetyczne [17]. Technikami wykorzystywanymi do formowania kapsułek są: odparowanie rozpuszczalnika, żelowanie za pomocą jonów, suszenie rozpyłowe, powlekanie, ekstruzja, koacerwacja, denaturacja termiczna i suszenie sublimacyjne [56]. Kapsułki zwykle zapobiegają ucieczce komórek z nośnika, jednocześnie nie zaburzając przepływu małowcząsteczkowych produktów i substratów [17].

Makrokapsułki zwane też membranami kapilarnymi mają cylindryczny kształt, średnice wewnętrzną od 0,5 do 1,5 mm i długość od 1 do 10 cm [37]. Membrany kapilarne wytwarzane są między innymi z polipropylenu, polimeru z grupy poliolefin, zbudowanego z merów o wzorze: $-(CH_2CH(CH_3))-$. Polimer ten występuje w trzech podstawowych formach stereoizomerycznych: ataktycznej, izotaktycznej i syndiotaktycznej. Polipropylen izotaktyczny, w którym konfiguracja wszystkich centrów chiralności jest jednakowa, posiada najlepsze własności mechaniczne i jest najczęściej wykorzystywaną formą. Polipropylen jest termoplastyczny, wykazuje dużą odporność chemiczną na działanie soli, zasad, kwasów i rozpuszczalników organicznych. Charakteryzuje się także dobrą przepuszczalnością powietrza. Jest materiałem palnym, bezbarwnym, bezwonny i niewrażliwym na działanie wody (absorpcja wody wynosi od 0,01 do 0,03%). Polipropylen charakteryzuje się wysoką biogodnością i nie jest biodegradowalny [41]. Innymi materiałami stosowanymi do makrokapsułkowania jest m.in. polichlorek winylu, poliuretan czy polisulfon.

Mikrokapsułki są kuliste, a ich średnica zawiera się w przedziale 0,2–5000 μ m. Metodami najczęściej stosowanymi do ich wytwarzania są metody polegające na modyfikacji pełnych kapsułek żelowych. Modyfikacje te miały głównie na celu stworzenie dodatkowych warstw pokrywających, dzięki którym komórki wydostające się z żelu zatrzymują się w wolnej warstwie między kapsułką a płaszczem. Jedną z nich wykorzystywała pełne alginianowe kulki żelowe, które umieszczane były w roztworze poli-L-lizyny. Koacerwacja dwóch polielektrolitów, ujemnie naładowanego algi-

nianu i dodatnio naładowanej poli-L-lizyny prowadziła do powstania membrany koacerwacyjnej. Następnie kapsułki pokrywano roztworem polietylenoiminy (ładunek ujemny), a rdzeń alginianowy upłynniano przy użyciu cytrynianu sodu [46]. Modyfikacja dokonana przez O'Shea i wsp., polegała na zastąpieniu polietylenoiminy kolejną warstwą alginianu w celu zwiększenia biokompatybilności kapsułek (w literaturze kapsułki uzyskane tą metodą, z upłynnionym bądź nieupłynnionym rdzeniem nazywane są kapsułkami APA – *alginate-poly-L-lysine-alginate*) [52]. Kapsułki APA zastosowane zostały między innymi do produkcji przeciwciał monoklonalnych na skalę przemysłową [55]. Przeszkodą w masowej produkcji okazała się jednak wysoka cena odczynników oraz skomplikowana metoda wytwarzania kapsułek (w procesie przemysłowym wiele kapsułek zostało uszkodzonych podczas upłynniania alginianowego rdzenia cytrynianem sodu) [53]. Inne modyfikacje polegały na zastępowaniu poli-L-lizyny innymi związkami np. chitozanem, bądź zwiększaniu liczby kolejnych warstw (np. kapsułki APAPA – alginian/poli-L-lizyna/alginian/poli-L-lizyna/alginian; APPPP – alginian/poli-L-lizyna/pektyna/poli-L-lizyna/pektyna; APCPA – alginian/poli-L-lizyna/chitozan/poli-L-lizyna/alginian) [54, 61, 64]. Mniej skomplikowane metody polegają na pokrywaniu kulek tłuszczami np. olejem palmowym [19]. Kulki takie miały być wykorzystywane do terapii doustnych, a dodatkowe pokrycie miało chronić immobilizowane bakterie przed szkodliwym działaniem soku żołądkowego. Hunkler opisał metodę polegającą na koacerwacji anionowego siarczanu celulozy z kationowym chlorkiem polimetyloamonowym lub alginianu, siarczanu celulozy, chlorku wapnia polimetylenoguanidyny [35].

2.3.3. Nanopłaszczanie

Nanokapsułki to zwykle warstwy otaczające pojedynczą komórkę bakteryjną, a ich średnica nie przekracza 0,2 μ m [17]. Metoda ta eliminuje niewykorzystaną przestrzeń w rdzeniu kapsuły, co może korzystnie wpływać na transport cząsteczek między otoczeniem kapsułki a masą komórkową, jednocześnie zmniejszając rozmiary wszczepu. Sposobem wytwarzania takiego nośnika jest odwirowanie materiału komórkowego w gradiencie gęstości z polimerem np. z kopolimerem metakrylanu hydroksylowego i metakrylanu metylowego [70] lub z roztworem alginianu i czynnika sieciującego. Można także zastosować metodę warstwa po warstwie (LbL – *layer by layer*) wykorzystując elektrostatyczne oddziaływania poszczególnych warstw. W technice tej używa się głównie polielektrolitów, czyli polimerów z ugrupowaniami jonowymi lub ulegającymi jonizacji np. poli-L-lizyny wraz z polietylenoiminą bądź poli-L-lizyny wraz z sulfonaniem polistyrenu

sodu. Koacerwacja dwóch polielektrolitów dodatkowo naładowanej poli-L-lizyny i ujemnie naładowanej polietylenoiminy bądź sulfonianu polistyrenu prowadzi do powstania membrany koacerwacyjnej. Kilka prac wykazało, że zastosowanie tego typu związków jest przydatne w opłaszczaniu komórek eukariotycznych i drobnoustrojów (np. nanoopłaszczane drożdże zachowały swoją żywotność i zdolności wydzielnicze) [18]. Polietylenoimina może występować w formie liniowej bądź rozgałęzionej. Forma liniowa zawiera jedynie aminy drugorzędowe i w temperaturze pokojowej występuje w stałym stanie skupienia, dlatego do immobilizacji wykorzystywana jest forma rozgałęziona, która zawiera pierwszo, drugo i trzeciorzędowe grupy aminowe. Jednak jak pokazują badania, polietylenoimina może charakteryzować się wysoką toksycznością [76]. Sulfonian polistyrenu (sól sodowa sulfonianu polistyrenu, PSS) jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, a w medycynie wykorzystywany może być do zmniejszania stężenia jonów potasu we krwi. Doustne podawanie PSS może jednak wywołać utratę apetytu, wymioty, nudności, a nawet doprowadzić do martwicy jelita grubego [67].

3. Historia zastosowania nośników do immobilizacji materiału biologicznego

Naukowcy badają problem transplantacji nośników zawierających materiał biologiczny od początku XX wieku. W 1933 B i s c e g e l i e zamknęła komórki rakowe w polimerowej matrycy i wszczepiła je do jamy brzusznej świni [4]. Wyniki tego badania pokazały, że komórki nie zostały zniszczone przez system immunologiczny gospodarza. Około trzydzieści lat później, C h a n g wprowadził pomysł wykorzystywania tzw. „sztucznych komórek”, czyli układów, które naśladują funkcje biologiczne komórek własnych [9]. Idea ta została wdrożona w latach 70- i 80-tych XX wieku do immobilizacji komórek wysp trzustkowych wydzielających insulinę, jako ksenoprzeszczepu (przeszczepy ksenogeniczne to przeszczepy międzygatunkowe, allogeniczne – wewnątrzgatunkowe) [11, 46]. Od tego czasu bardzo wiele wysiłku zostało włożone w lepsze zrozumienie tego typu układów. Trwają badania nad zastosowaniem enkapsulowanych komórek celem wspomagania chorej tkanki lub narządów. Taki układ może służyć do podawania leków, a także znaleźć zastosowanie biotechnologiczne np. przy produkcji różnego typu związków na skalę przemysłową. Z immobilizacją materiału biologicznego wewnątrz nośnika można spotkać się przy zastosowaniach w oczyszczaniu środowiska – biodegradacji [50], badaniach biogodności – badaniu cytotoxyczności [27], a także w inżynierii tkankowej w klonalnej selekcji pożądanych fenotypów [63].

4. Immobilizacja w zastosowaniach biomedycznych

4.1. Drogi podawania terapeutyków przy użyciu unieruchomionych komórek

Istnieją dwie podstawowe metody podawania terapeutyków w postaci enkapsulowanych komórek – wszzczenie lub terapia doustna. Wszczepienie polega na umieszczeniu urządzenia wydzielającego lek w określonym miejscu w organizmie. W zależności od ukrwienia tego miejsca, możemy osiągać wysokie stężenie czynnika terapeutycznego w osoczu, bądź jedynie w okolicach implantu. W terapii doustnej substancja może wchłaniać się w żołądku i jelicie, bądź tylko w jelicie. Preparaty wchłaniane z żołądka i jelit dostają się do układu krwionośnego, osiągając wysokie stężenie we krwi przez określony czas.

4.2. Właściwości kapsułek wykorzystywanych we wszczepieniach

Implantacja immobilizowanych komórek wiąże się z szeregiem trudności związanych ze strukturą, biogodnością, wytrzymałością i właściwościami chemicznymi. W celu rozwiązania możliwych problemów optymalizacja systemu dotyczy następujących sfer:

4.2.1. Struktura materiału nośnika

Interakcja między tkankami gospodarza a implantem zależy zarówno od struktury zewnętrznej jak i kształtu urządzenia. Wykazano, że implanty z ostrymi rogami wywołują silniejszą odpowiedź organizmu gospodarza (powstaje więcej komórek stanu zapalnego i wyższa jest aktywność enzymów komórkowych wokół implantu). Badania wykazały także różnice w zdolności do utrzymania przy życiu immobilizowanych komórek w implantach różniących się zewnętrzną strukturą [43]. Powierzchnia gładka stymuluje częściej reakcję fibrotyczną, podczas gdy powierzchnia szorstka indukuje wrastanie komórek gospodarza w struktury ściany. Uważa się, iż bioimplanty w postaci kapilar zapewniają bardziej powtarzalny kształt oraz wyższą gładkość powierzchni w porównaniu do mikrokapsułek [80].

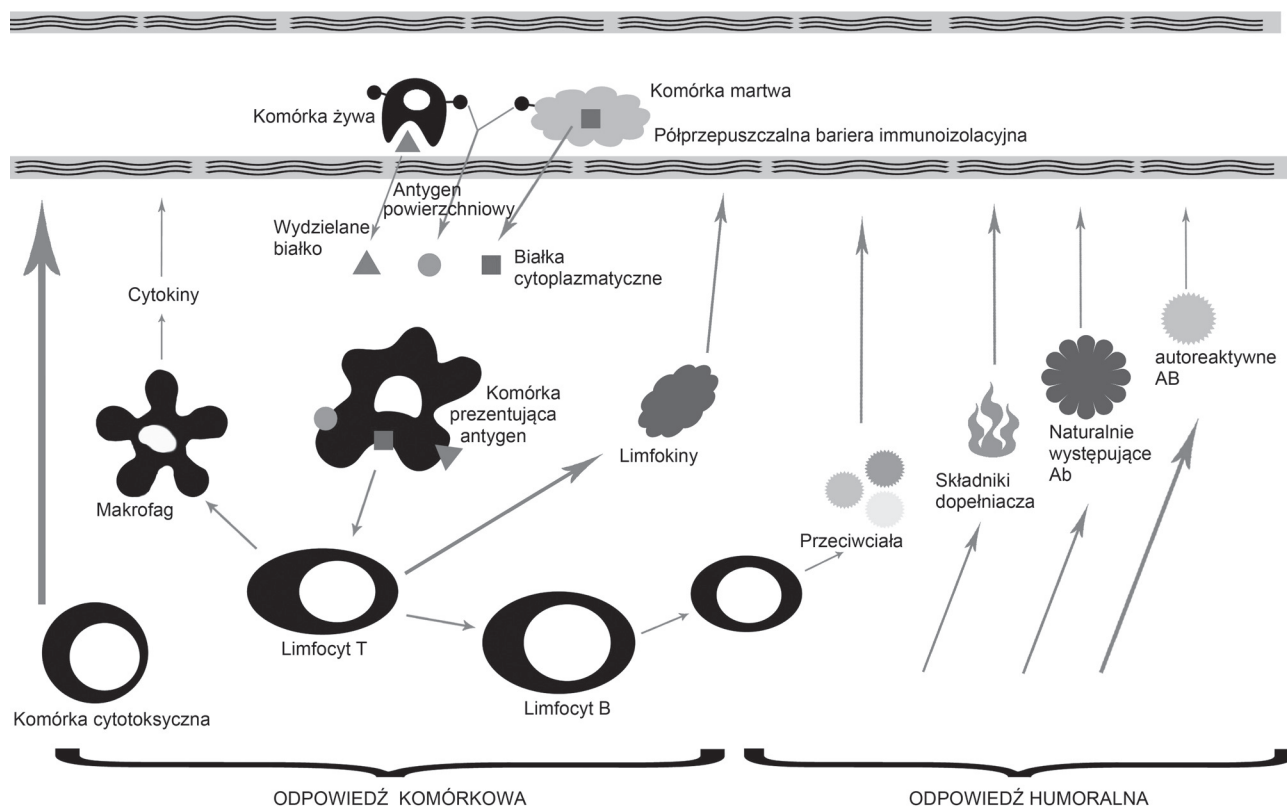
Struktura porów w nośniku determinuje zasięg interakcji między immobilizowanymi komórkami a środowiskiem zewnętrznym. Określana jest przez ich wielkość, rozmieszczenie oraz głębokość. Nośniki porowe, zgodnie z klasyfikacją IUPAC definiowane są jako mikroporowate (średnica porów niższa niż 2 nm), mezoporowate (średnica między 2 a 50 nm) i makroporowate (średnica powyżej 50 nm). Tylko niewielkie cząsteczki jak np. tlen mogą penetrować materiały mikroporowate. Materiały mezoporowate pozwalają na przepływ większych cząstek jak np. małych białek. Implanty zawierające makro-

pory pozwalają na przepływ dużych białek, czasem nawet całych komórek. Strukturę porów określa także Masa Cząsteczkowa Progu Odcięcia (MWCO – *Molecular Weight Cut Off*), czyli masa najmniejszej cząsteczki (wyrażona w kDa) która pozostaje w nośniku. Wiele z wykorzystywanych materiałów posiada jednak nieregularną strukturę i wielkość porów, a dodatkowo ich właściwości mogą ulegać zmianie w środowisku poimplantacyjnym (np. poprzez wchłanianie wody przez polimer bądź jego degradację). Pory powinny umożliwiać swobodny przepływ substancji odżywczych, tlenu i produktów przemiany, ale nie samych komórek. Transport substancji wzdłuż matrycy możliwy jest dzięki gradientowi stężeń. Badania wykazały, że głównym czynnikiem limitującym przeżywalność komórek w kapsułkach jest dostępność tlenu [69]. Komórki o większych wymaganiach pokarmowych powinny znajdować się w materiałach o bardzo dobrej przepuszczalności, komórki ksenogeniczne w przeciwieństwie do allogenicznych wymagają bardziej restrykcyjnej immunoizolacji [44].

Immunoizolacja to ochrona implantowanego materiału biologicznego przed reakcją immunologiczną gospodarza. Efektywność immunoizolacji związana jest bezpośrednio z wielkością porów w kapsule. Ważne jest, żeby aktywne składniki układu immunologicznego nie były w stanie oddziaływać z antygenami na powierzchni izolowanych komórek. Ponieważ kapsułki nie są barierami absolutnymi, a system immunologiczny zawiera cały szereg ścieżek obronnych, bardzo ciężko jest opra-

cować system, który zagwarantuje pełną ochronę immobilizowanego materiału biologicznego. Indukcja odpowiedzi może zacząć się wraz z dyfuzją przez matrycę antygenów powierzchniowych lub białek wydzielanych przez komórki żywe, a także białek uwolnionych z martwych komórek. Rozpoznawanie i prezentowanie antygenów przez komórki prezentujące antygen inicjuje komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną. Pierwszy z tych szlaków prowadzi do aktywacji między innymi komórek cytotoksycznych i makrofagów. Elementy te nie powinny przenikać do kapsulek, i jest to dość łatwo osiągalne dzięki regulacji wielkości porów. Znacznie trudniejsze jest hamowanie wnikania do nośnika składników odpowiedzi humoralnej. Należy dodatkowo pamiętać, że samo przeciwciało może nie wpływać niszcząco na obcą komórkę, np. patogennego drobnoustroju, ale może uruchomić dopełniacz, który tego dokona. Dla cytokin, limfokiny i przeciwciał kapsuła okazuje się często niewystarczającą barierą. Ważnym problemem jest także wydzielanie przez makrofagi tlenu azotu, a także reaktywnych metabolitów tlenu [13]. Możliwe szlaki odpowiedzi immunologicznej względem immobilizowanych komórek wszczepionych do organizmu przedstawiono na Rysunku 1.

Kilku autorów w swych pracach wykazało, że wszczep może powodować niespecyficzną odpowiedź immunologiczną przeciwko implantowanym komórkom [5]. Dodatkowym problemem jest implantowanie komórek mających wydzielać fibrynogen, histaminę czy



Rys. 1. Oddziaływanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza z komórkami znajdującymi się w implancie

fibronektynę. Czynniki te powodują napływ granulocytów, bazofili i makrofagów w pierwszych dniach po implantacji. Makrofagi produkują czynniki takie jak TNF- α , TGF- β i histamina, stymulując komórki umieszczone w implancie [3].

4.2.2. Biozgodność

Biozgodność jest niezbędną cechą materiału warunkującą jego prawidłowe działanie w żywym organizmie. Nośnik w pełni biozgodny powoduje minimalną odpowiedź organizmu, do którego jest wszczepiany [75]. Materiał powinien być chroniony przed pokryciem przez fibroblasty (przerost tkanki włóknistej zaburza przepuszczalność matrycy) [20]. Nośnik nie może oddziaływać negatywnie na biorcę implantu, prowadzić do reakcji alergicznych lub toksycznych, wywoływać stanu zapalnego, zmian nowotworowych, być mutageny lub teratogeny. W kontakcie z krwią nie powinien wywoływać zmian w jej składzie, wpływać na krzepliwość krwi, a także zmieniać konfiguracji, morfologii i trwałości komórek immobilizowanych i komórek gospodarza.

4.2.3. Wytrzymałość

Materiał musi być tak wytrzymały, aby przetrwać proces implantacji w formie nienaruszonej. Już bardzo niewielkie uszkodzenia mogą powodować ucieczkę immobilizowanego materiału biologicznego. Dodatkowo nośnik musi charakteryzować się elastycznością i odpornością na rozciąganie. Wiele urządzeń immunoizolacyjnych zawiodło z powodu zbyt małej wytrzymałości mechanicznej – układy pękały uwalniając unieruchomione komórki do organizmu gospodarza.

4.2.4. Właściwości chemiczne

Nośnik powinien być nierozpuszczalny w środowisku, w którym drobnoustroje będą unieruchamiane. Ważna jest odporność na degradację chemiczną i mikrobiologiczną. Właściwości chemiczne determinują także możliwości sterylizacji i oczyszczania implantu. Dodatkowo obecność odpowiednich grup funkcyjnych może wpływać na przyleganie komórek lub białek do powierzchni nośnika. Pokrywanie matrycy przez białka może zatykać pory i znacząco obniżyć jej przepuszczalność.

Na przydatność materiału wpływa także jego cena, dostępność, możliwości regeneracji i zastosowania w skali przemysłowej, prostota i parametry biologiczne podczas unieruchamiania. Przykładowe materiały wykorzystywane do unieruchamiania dla zastosowań biomedycznych znajdują się w Tabeli I.

4.3. Właściwości kapsułek wykorzystywanych w terapii doustnej

Przewód pokarmowy jest doskonałym miejscem do dostarczania substancji terapeutycznych. Odpowiednio dobrane komórki mogą produkować enzymy, białka, przeciwciała czy leki. Tego typu układy mogą także zostać wykorzystane przy produkcji szczepionek jadalnych. Obecnie tylko nieliczne mogą być podawane doustnie, ponieważ często antygen zostaje uszkodzony podczas wędrówki przez układ trawienny, i nie może on indukować odpowiedniej reakcji ze strony układu immunologicznego. Immobilizowane komórki dostarczane do jelita i produkujące antygen mogą rozwiązać ten problem. Ze względu na nieprzyjazne środowisko do doustnej terapii komórek wykorzystuje się głównie

Materiały wykorzystywane do immobilizacji materiału biologicznego

Tabela I

	Zastosowany materiał	Komórki immobilizowane	Gospodarz	Piśmienictwo
Makrokapsułkowanie	Polipropylen	Komórki trzustki chomika	Szczur	[36]
		Komórki wątroby płodowej świni	Szczur	[73]
		<i>Escherichia coli</i>	Mysz	[28]
	Poliuretan	Szczurze komórki trzustki	Szczur	[78]
	Komórki trzustki świni	Szczur	[82]	
Poliaryloeterosulfon	Szczurze mioblasty	Mysz	[10]	
Polisulfon	Szczurze hepatocyty	Szczur	[80]	
Poliakrylonitryl	Szczurze komórki nowotworowe nadnerczy	Małpa	[1]	
Makrokapsułkowanie i pułapkowanie	Alginiano-L-lizyno-alginian	<i>Escherichia coli</i>	Szczur	[58]
	Silikon	Szczurze komórki trzustki	Szczur	[7]
	Alginian	Ludzkie hepatocyty Bakterie kwasu mlekowego	Badania <i>in vitro</i>	[16] [68]
	Glikol polietylenowy	Komórki trzustki świni	Szczur	[15]
	Amylopektyna	Szczurze komórki nadnerczy	Badania <i>in vitro</i>	[49]

drobnooustroje. Bakterie wykorzystywane tu są jako małe bioreaktory. Dodatkowo charakterystyka wzrostu, krótki czas replikacji i wysoka odporność niektórych szczepów na warunki środowiska czyni je idealnymi kandydatami do produkcji substancji terapeutycznych w jelicie.

W terapii doustnej szerokie zastosowanie znajdują hydrożelowe kapsułki (np. których podstawę stanowi alginian, karagen, agaroz). Różnorodność wykorzystywanych nośników sprawia, że mogą być one odpowiednio dobierane, zależnie od tego jak zaplanujemy terapię. Po doustnym podaniu kapsułki narażone są na nieprzyjemne czynniki takie jak: aktywność różnego rodzaju enzymów, zachodzące w organizmie reakcje chemiczne, zmieniające się pH [24]. Ważne jest odpowiednie dobranie wielkości porów. Immunoizolacja nie musi być aż tak restrykcyjna jak w przypadku kapsułek implantowanych. Nośnik musi być biozgodny, ale nie musi być chroniony przed pokryciem przez fibroblasty. Dalej należy rozważyć czy immobilizowane komórki mogą być potencjalnie niebezpieczne dla człowieka. W przypadku pracy z genetycznie modyfikowanymi organizmami, kapsułki nie powinny rozpuszczać się w środowisku kwaśnym, ani po długiej ekspozycji na środowisko zasadowe. Gdy unieruchomione komórki mają dotrzeć do jelita (aby terapeutyk uwalniany był jedynie w jelicie, np. przez wzgląd na jego drażniące na żołądek działanie), należy upewnić się, że przetrwają nieuszkodzone przejście przez żołądek. Podczas dojelitowego dostarczania probiotyków przy użyciu kapsułek, wykorzystywany materiał powinien być nierozpuszczalny w środowisku kwaśnym, natomiast rozpuszczalny po odpowiedniej ekspozycji na środowisko zasadowe. Kapsułki warto dodatkowo powlekać substancjami wielkocząsteczkowymi, tak, aby ułatwić pobranie ich odpowiedniej ilości na raz, a jednocześnie stworzyć dodatkową barierę ochronną. Droga doustna podawania terapeutyków ma wiele zalet. Do pobrania nie jest wymagany żaden specjalistyczny sprzęt ani personel, a w razie przedawkowania lek w łatwy sposób można usunąć. Jest też relatywnie tania, a podawane kapsułki nie muszą być sterylne. By zaprojektować nośnik w terapii doustnej należy wziąć pod uwagę konieczność maksymalizowania przeżywalności bakterii i maksymalizowania zdolności do dostarczania substancji terapeutycznej.

4.4. Immobilizowany materiał biologiczny

Jako materiał biologiczny stosowany w immobilizacji nadają się odpowiednie szczepy bakterii bądź linie komórkowe, które wydzielają cząstki terapeutyczne przez długi okres czasu, bądź są w stanie pełnić określone funkcje przy ciągłej terapii doustnej. Można korzystać z linii pierwotnych, stabilnych, allogenicznymi, ksenogenicznymi. Przykładowe typy komórek

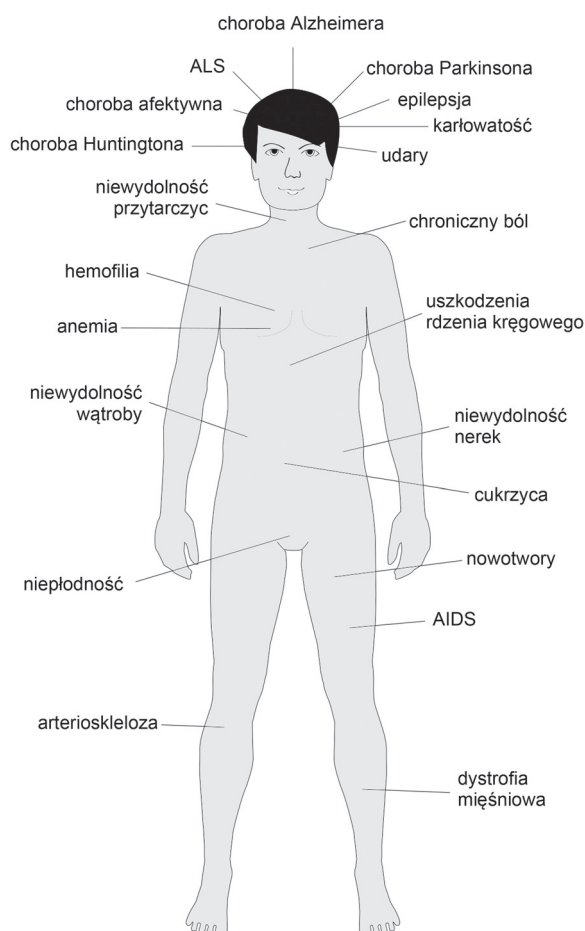
Tabela II
Przykładowe typy komórek wykorzystywanych do immobilizacji i ich zastosowania

Typ komórek	Zastosowanie	Piśmiennictwo
Mioblasty	Choroba Parkinsona Choroba afektywna Nowotwory Hemofilia	[1] [45] [12] [33]
Komórki macierzyste	Regeneracja kości	[22]
<i>Escherichia coli</i>	Usuwanie mocznika	[58]
Hepatocyty	Transplantacja wątroby	[31]
Komórki wysepek trzustkowych	Cukrzyca	[11]
Komórki przytarczyc	Sztuczne narządy	[32]
Komórki jajnika	Choroba Fabry'ego	[51]
<i>Oxalobacter formigenes</i>	Kamienie nerkowe	[21]
<i>Erwinia herbicola</i>	Fenyloketonuria	[47]

wraz z ich zastosowaniem zaprezentowano w Tabeli II. Przy wyborze odpowiedniego materiału biologicznego należy zwrócić uwagę na jego wymagania pokarmowe, odporność na stres oraz zmienność morfologiczną (ewentualne zmiany w rozmiarze komórek mogłyby umożliwiać im wydostawanie się z kapsuł). Ważne jest upewnienie się czy komórki, których używamy nie są zakażone wirusami, grzybami, a także zbadanie reakcji organizmu na inne poza pożądaną przez nas cząsteczką produkty wydzielane przez dany typ komórek. Bakterie posiadają przewagę nad eukariotycznymi liniami komórkowymi. Są zazwyczaj tańsze w hodowli, bardziej odporne na stres, mniej wymagające, jeśli chodzi o warunki zewnętrzne, mogą być aktywne przez dłuższy czas. Są także prostszymi modelami do modyfikacji. Genetycznie modyfikowane drobnooustroje, zaprojektowane w celu wydzielania pożądanego czynnika mogą stać się przyszłością terapii biohybrydowej. Przy pewnego typu terapiach niezastąpione mogą także okazać się bakteriofagi. Bardzo ważnym aspektem jest bezpieczeństwo biologiczne. W przypadku organizmów modyfikowanych genetycznie ekspresja genów powinna być regulowana wielopoziomowo, a same szczepy powinny być wysoce stabilne genetycznie.

4.5. Biomedyczne zastosowania immobilizowanych komórek

Znanych jest wiele chorób wywołanych niewystarczającym stężeniem odpowiednich cząstek w organizmie (Rys. 2), bądź ich nieprawidłowym metabolizmem. Terapia biohybrydowa umożliwia dostarczanie substancji terapeutycznych przez długi okres czasu. Implanty produkujące pożądaną cząstkę mogłyby wypełniać liczne defekty enzymatyczne. Drugim obszarem



Rys. 2. Wybrane choroby wywołane niedolnością organizmu do produkcji odpowiedniej ilości cząstek biologicznych

wykorzystującym unieruchomione komórki jest dostarczanie leków. Medycyna ciągle poszukuje skutecznej metody ukierunkowanego podawania terapeutyków. Implanty wszczepiane w pobliżu chorobowo zmienionego miejsca umożliwiałyby osiągnięcie lokalnie wysokich stężeń leków i jednocześnie zmniejszałyby wywołane przez nie skutki uboczne.

W terapiach biohybrydowych wykorzystywanych może być wiele typów związków: enzymy, inhibitory, aktywatory, przeciwciała. Uwalnianie cząstek terapeutycznych może być konstytutywne bądź stymulowane. Uwalnianie konstytutywne jest najprostszym systemem i umożliwia otrzymanie stałych porcji substancji z kapsuły do zewnętrznej tkanki. Uwalnianie kontrolowane umożliwia odpowiedź komórek znajdujących się wewnątrz kapsułek na pewne sygnały z wnętrza organizmu (produkcja cząstek tylko wtedy, kiedy organizm tego wymaga), może też być indukowane podaniem pacjentowi odpowiedniej substancji. Dodatkową kontrolę uwalniania mogą stanowić mechanizmy dyfuzji. Jeżeli stężenie cząstek terapeutycznych na zewnątrz kapsułki będzie wysokie, produkty te nie będą dalej dyfundowały na zewnątrz matrycy. Zaletą terapii biohybrydowych jest to, że immobilizowane, genetycznie

modyfikowane komórki mogą wytwarzać każdą pożądaną cząstkę *in vivo* bez modyfikacji genomu gospodarza. Układy te pozwalają także na zmniejszenie lub całkowite wycofanie podawania leków immunosupresyjnych. Immobilizacja komórek ma wiele zalet w porównaniu z immobilizacją białek, ponieważ pozwala na długotrwałe i kontrolowane dostarczanie cząsteczek produkowanych *de novo*. Poza tym, jeżeli implant ulegnie uszkodzeniu, toksyczność spowodowana wysokim stężeniem leku będzie znacznie mniejsza. Problemem jest ewentualne uwolnienie komórek z kapsułek i wywołanie reakcji immunologicznej.

Enkapsulacja może być także wykorzystywana przy dojelitowym dostarczaniu terapeutyków, a enkapsulowane bakteriofagi, mogą usuwać patogeny jelitowe takie jak *Salmonella* czy *Clostridium* [23, 38].

4.5.1. Wykorzystanie unieruchomionych komórek eukariotycznych

Przeprowadzono badania dotyczące leczenia metachromatycznej leukodystrofii przy użyciu membran immobilizacyjnych [14]. Ta neurodegeneracyjna choroba wywołana jest niskim poziomem arylosulfatazy A w organizmie. Zmodyfikowana genetycznie linia komórkowa mysich mioblastów C2C12 stała się zdolna do produkcji artylosulfatazy A. Komórki zamykano w kapilarach z poliaryloeterosulfonu. Wykazano, że badana linia produkuje pożądaną enzym, jednocześnie przeżywając nawet 4 tygodnie po implantacji do allogenicznej myszy.

Inny eksperyment dotyczył leczenia cukrzycy za pomocą kapsułkowanych komórek [44]. Nośniki wykonane zostały z polimeru akrylowego i posłużyły do transplantacji szczurzych wysepek trzustkowych myszom chorym na tę chorobę. Matryca okazała się biokompatybilna, implant nie był odrzucany i umożliwiał utrzymanie poziomu cukru we krwi w normie nawet przez 60 dni.

Stworzono także system umożliwiającą kontrolowane wydzielanie erytropoetyny przez immobilizowany materiał biologiczny [71]. Zmodyfikowane fibroblasty wydzielają hormon peptydowy w obecności doksycykliny bądź mifepristonu. Kapilary implantowane były do jamy otrzewnej myszy. U zwierząt, którym podawano doksycyklinę lub mifepriston obserwowano podwyższone stężenie erytropoetyny w surowicy podczas 6-miesięcznej obserwacji (podwyższonego poziomu nie obserwowano u myszy nieotrzymujących antybiotyków).

Wykorzystano także genetycznie zmodyfikowane mioblasty do produkcji VEGF i FGF-2 (czynniki angiogenezy) [66]. Komórki zamykano w polimerowych nośnikach z polieterosulfonu i implantowano szczurom. Tylko komórki produkujące FGF-2 okazały się skutecznie redukować nekrozę tkanki. Terapia ta może być wykorzystywana przy chorobach niedokrwiniennych.

Systemy oparte na komórkach modyfikowanych genetycznie zamkniętych w kapilarach mogą także dostarczać czynniki neurotropowe [45]. Produkcja tego typu cząstek mogłaby skutecznie leczyć choroby neurodegeneracyjne. Odpowiednio zmodyfikowana genetycznie linia komórkowa C2C12 efektywnie wydzielala rzęskowy czynnik neurotropowy. Wykazano także, że żywotność komórek a także efektywność produkcji czynnika może zależeć od wykorzystanej do kapsułkowania matrycy.

Inne badania wskazały na obiecujące wyniki w zakresie leczenia kapsułkowanymi komórkami choroby Parkinsona [81]. Układy tego typu mogą także znaleźć zastosowanie w leczeniu raka. Obiecujące wyniki w tej sferze dały badania z dostarczaniem do nowotworowo zmienionych miejsc czynników takich jak cytochrom P-450 i IL-2 a także inhibitorów angiogenezy [12, 39, 65]. Trwają badania nad leczeniem tą metodą stwardnienia zanikowego bocznego [83].

Pojawiają się pojedyncze doniesienia o zastosowaniu terapii immobilizowanymi komórkami u pacjentów. Gu n z b u r g i wsp. przeprowadzili terapię nowotworu trzustki, polegającą na wszczepieniu w miejscu nowotworu, enkapsulowanych komórek L293 modyfikowanych genetycznie do produkcji enzymu aktywującego czynnik przeciwnowotworowy podawany pacjentom. Stwierdzono u 10 pacjentów zatrzymanie wzrostu nowotworu w ciągu 20-tygodniowej obserwacji [30]. Jednak unieruchamianie materiału biologicznego nie jest dotąd stosowane w klinicznej praktyce, głównie z powodu ograniczonej żywotności wszczepów [29].

Jak widać, cały czas prowadzone są prace nad zastosowaniem immobilizowanego materiału komórkowego dla celów terapeutycznych, uwieńczone pojedynczymi zastosowaniami klinicznymi, pomimo konkurencyjnych dla tych metod badań prowadzonych nad możliwością generowania zastępczych narządów z własnych komórek macierzystych pacjentów.

4.5.2. Wykorzystanie unieruchomionych drobnoustrojów

Graniczka i wsp., przeprowadzili badania dotyczące uwalniania zielonego białka fluoryzującego (GFP – *green fluorescent protein*) przez makrokapsułkowane w polipropylenowych membranach kapilarnych komórki *E. coli*. Wydzielane białko miało posłużyć jako model substancji terapeutycznej. Membrany kapilarne implantowano myszom. Wykazano, że użyta matryca jest szczelna względem immobilizowanego szczepu, a produkowane GFP jest w stanie przekraczać barierę, jaką jest membrana [28]. Naturalnie, w literaturze nie brak przykładów bardziej bezpośrednio demonstrujących przydatność immobilizowanych drobnoustrojów *in vivo*.

Zbadano możliwość usuwania mocznika przez doustne podawanie mikrokapsulek zawierających genetycznie zmodyfikowaną *E. coli* (plazmid pAKU17 zawierający geny ureazy *ureaDABCEFG* z *Klebsiella aerogenes* został wtransformowany do *E. coli* DH5) [60]. Doustna dawka kapsulek APA zawierających zmodyfikowany szczep skutkowała spadkiem wysokiego poziomu mocznika u szczurów chorych na mocznicę. Metoda ta okazała się skuteczna podczas 21 dniowej terapii. Szczury leczone przeżywały okres eksperymentalny, jednocześnie 50% nieleczonych szczurów w tym czasie umierało [58].

W badaniach *in vitro* zmodyfikowaną *E. coli* DH5 zamknięto w kapsułkach zbudowanych z poli(alkoholu winylowego) (PVA – *polyvinyl alcohol*). PVA charakteryzuje się znacznie wyższą wytrzymałością mechaniczną niż APA. W ten sposób rozwiązany może zostać wcześniej napotkany problem łamliwości kapsulek zbudowanych z APA. Badania *in vitro* wykazały, że 100 mg kapsułkowanej hodowli bakteryjnej może usunąć 18,4 mg mocznika w 4 godziny [24].

P r a k a s h i C h a n g zbadali rozkład innych niż mocznik metabolitów przy użyciu mikrokapsulek zawierających zmodyfikowane komórki *E. coli* DH5 (badania *in vitro*) [59]. Zaobserwowano spadek w osoczu stężenia potasu, magnezu, fosforu, sodu, chloru, cholesterolu, bilirubiny, kreatyniny i kwasu moczowego, co może mieć ogromne znaczenie terapeutyczne między innymi przy niewydolności nerek. W eksperymentach tych bakterie zamykane były w kapsułkach APA. Wykazano, że kapsułki te nie wpływają w sposób zauważalny na metabolizm immobilizowanych komórek *E. coli*. Profil białkowy komórek kapsułkowanych w APA nie różnił się znacząco od profilu białkowego komórek będących w stanie wolnym [57].

G a r o f a l o i C h a n g w swoich badaniach wykazali, że *Pseudomonas pictorum* jest w stanie usuwać nadmiar cholesterolu z surowicy. Drobnoustrój ten immobilizowany był w kapsułkach alginianowych, polilizynowo-alginianowych, a także kapsułkach agarowych. Tylko w przypadku kapsulek agarowych zaobserwowano spadek poziomu cholesterolu porównywalny z tym, który uzyskiwano dla komórek w stanie wolnym. Jednocześnie, nie obserwowano wydostawania się komórek z nośnika. Pory w mikrokapsułkach alginianowych i alginianowo-polilizynowych były zbyt małe, i stanowiły barierę dla przepływu lipoprotein [26]. Dalsze badania z użyciem matryc agarowych wykazały, że znacznie skuteczniejsze w usuwaniu cholesterolu są mikrokapsułki o średnicy 0,5 mm – 1,6 mm niż te o średnicy powyżej 2,5 mm [25].

B o r k o w s k a i wsp. zastosowali enkapsulowane w modyfikowanych powłokach polilizynowo-polietylenoiminowych bakterie *B. subtilis*, szczepy zrekombinowane wydzielające toksyny, wykazując cytotoksyczny wpływ na komórki białaczkowe pacjentów z ostrą białaczką limfatyczną [8].

Lloyd - George i Chang umieścili w kapsułkach komórki *Erwinia herbicola* wykazujące aktywność fenolo-liazy tyrozynowej (TPL – tyrosine phenol-lyase). Podczas trwania eksperymentu badano reakcję enzymatyczną amoniaku i pirogronianiu wraz z fenolem czy katecholem odpowiednio w L-tyrozinę bądź L-3,4-dihydroksyfenyloalaninę (badania *in vitro*). Wykorzystany szczep kapsułkowany był w matrycy APA. Nie wykazano różnic w aktywności TPL między szczepem kapsułkowanym a szczepem w stanie wolnym. Aktywność TPL mikrokapsułkowanych komórek *E. herbicola* mogłaby znaleźć zastosowanie w usuwaniu amoniaku czy fenolu przy niewydolności wątroby [47].

Doustne dostarczanie kapsułkowanych bakterii może także stać się skuteczną metodą w leczeniu kamieni nerkowych. *Oxalobacter formigenes* produkuje enzymy degradujące szczawiany, niszcząc ich nadmiar, główny czynnik ryzyka powstawania i wzrostu kamieni nerkowych u pacjentów z kamicą nerkową [21].

Terapia oparta na kapsułkowanych drobnoustrojach wpływających na stężenia aminokwasów w osoczu mogłaby okazać się skuteczna np. przy leczeniu fenylketonurii [47]. Bakterie mogłyby także wpływać na poziom wodoru i azotu cząsteczkowego we krwi. Żywe komórki dostarczane doustnie metabolizujące wodór czy azot do związków takich jak metan czy woda zapobiegałyby chorobie dekompresyjnej bądź zmniejszały czas dekompresji. Bakterie mające potencjalne zastosowanie w tej terapii to metabolizujący wodór *Methanobrevibacter smithii* czy azot – bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [42].

Mikrokapsułkowane drobnoustroje mogłyby także radzić sobie z chorobami jelita związanymi z podniesionym poziomem kwasów żółciowych. *Lactobacillus reuterii* jest zdolny do wiązania kwasów żółciowych i mógłby łagodzić problem związany z nadmiernym wydzielaniem elektrolitów, towarzyszącej mu bieguncie i odwodnieniu [40].

Poza kapsułkowaniem szczepów zdolnych do wydzielania substancji mogących wypełniać defekty enzymatyczne czy cząstek, których organizm produkować nie może, kolejnym zastosowaniem jest kapsułkowanie probiotyków. Żywe komórki, jako uzupełnienie diety pozytywnie mogą wpłynąć na bakteryjną florę jelitową. Analizy jedzenia wzbogacanego w probiotyki oraz niektórych preparatów farmaceutycznych wykazały, że podawane w ten sposób szczepy mają niską przeżywalność i zdolność do zasiedlania jelita [48]. Bakterie muszą przejść takie biologiczne bariery jak kwaśne środowisko żołądka, czy żółć w jelicie. Jak wykazano, probiotyki obniżają poziom cholesterolu, wzmagają tolerancję laktozy, a także mogą zapobiegać nowotworom, biegunkom i modulują aktywność układu odpornościowego. Enkapsulacja bakterii w alginianie wapnia jest często używana do immobilizacji szczepów ze względu na nietoksyczność nośnika, łatwość metody oraz jej niski koszt.

Wykazano, że immobilizowane w ten sposób bakterie przeżywają w warunkach zbliżonych do tych, panujących w żołądku i jelicie, a także zachowują w nich swoją aktywność (badania *in vitro*). Matryca hydrożelowa jest rozpuszczalna w 37°C, w zasadowym pH (warunki panujące w jelicie cienkim), uwalniając bakterie do środowiska. Metoda ta, może być bardzo efektywna przy dostarczaniu różnego rodzaju probiotyków takich jak *Lactobacillus* czy *Bifidobacterium*, a także wykorzystywana do dostarczania różnego rodzaju związków aktywnych do jelita [23].

Enkapsulacja materiału biologicznego może także zostać wykorzystana w terapii fagowej. Bakteriofag Felix O1 okazał się bardzo skuteczny w walce z zakażeniami *Salmonella* [79]. Jednak, aby fag podawany doustnie okazał się skuteczny w leczeniu patogenów jelitowych, musi przetrwać nieprzyjemne warunki panujące w układzie pokarmowym zwierząt czy człowieka (a bez ochrony nie jest w stanie tego zrobić) [38]. Niezbędne więc okazuje się jego kapsułkowanie. Badania wykazały, że Felix O1 immobilizowany w mikrokapsułkach chitozowo-alginianowych jest odzyskiwany przy długotrwałej ekspozycji na stymulowane warunki układu pokarmowego (liczba cząstek fagowych po godzinnej ekspozycji na pH 2,4 spadła o 2,58 jednostki logarytmiczne (fag w stanie wolnym nie był wykrywalny już po 5 minutach ekspozycji na pH poniżej 3,7)). Kapsułki rozpuszczały się po 6 godzinach w pH 6,8.

Podobne badania przeprowadził Stanford i wsp. Autorzy wykorzystali cztery fagi: wV8, rV5, wV7 i wV11 (bakteriofagi *E. coli* O157:H7 – enterohemolityczny szczep wywołujący choroby układu pokarmowego i moczowego) zamknięte w polimerowych kapsułkach. Po 20 minutowej ekspozycji na pH 3,0 odzyskiwano 13,6% cząstek fagowych (po uwolnieniu w pH 7,2). Dla porównania, w tych warunkach fagi niekapsułkowane całkowicie traciły swoją aktywność [72].

5. Podsumowanie

Pierwsze badania z wykorzystaniem enkapsulowanych komórek eukariotycznych pochodzą z lat 30-tych XX wieku. Od tego czasu wprowadzono wiele technik immobilizacji, a najprostszy podział wyróżnia pułapkowanie, kapsułkowanie i nanoopłaszczanie. Bardzo ważne jest odpowiednie dobranie materiału, z którego kapsułki będą wykonane, a optymalizacja systemu dotyczy struktury, biodegradacji, wytrzymałości i właściwości chemicznych. Unieruchomione, immunoizolowane komórki, wydzielające czynniki terapeutyczne, wszczepione do organizmu, pozwalają na regulację lub modyfikację procesów biologicznych, a tym samym leczenie różnych zaburzeń. Nośniki stosowane są z powodzeniem do immunoizolacji komórek eukariotycznych, jednak kapsułkowanie drobnoustrojów do zastosowań

biomedycznych budzi ciągle wątpliwości przez wzgląd na bezpieczeństwo.

W przyszłości unieruchamianie materiału biologicznego prawdopodobnie zajmie ważne miejsce w medycynie. Wiele aspektów tej metody wymaga jeszcze opracowania. Przedmiotem badań są w dalszym ciągu: zastosowanie allogenicznym i ksenogenicznym komórek, ich przeżywalność, immunoprotekcja, biokompatybilność nośników, długoterminowa skuteczność układów, ściśle kontrolowane wydzielanie cząstek terapeutycznych, kontrola proliferacji (przepełnienie kapsułek komórkami może obniżać żywotność immobilizowanych komórek) i wytrzymałość układów. Gdy już powyższe kwestie zostaną dokładnie zbadane, można będzie oczekiwać bardziej powszechnych zastosowań klinicznych układów z immobilizowanym materiałem biologicznym.

* * *

Badania nad immobilizacją i jej zastosowaniami biomedycznymi prowadzone przez autorów były dofinansowane przez MNiSW grant nr: N N401 015936 oraz NCN grant nr N N401 592840.

Pracę dedykujemy pamięci Jarosława Wiśniewskiego, który zapoczątkował badania nad immobilizacją w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW.

Piśmiennictwo

- Aebischer P., Goddard M., Signore A., Timpson R.: Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Experiment. Neurol.* **126**, 151–158 (1994)
- Arshady R.: Microcapsules for foods. *J. Microencapsul.* **10**, 413–435 (1993)
- Babensee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L.V., Mikos, A.G.: Host response to tissue engineered device. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **33**, 111–139 (1998)
- Bisceglie V.: Über die antineoplastische immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-embryonen. *Zeit. Krebsforsch.* **40**, 122–140 (1933)
- Blasi P., Giovagnoli S., Schoubeen A., Ricci M., Rossi C., Luca G., Basta G., Calafiore R.: Preparation and in vitro and in vivo characterization of composite microcapsules for cell encapsulation. *Int. J. Pharm.* **324**, 27–36 (2006)
- Bonin S.: Mikroorganizmy immobilizowane. *Agro Przemysł*, **6**, 20–23 (2008)
- Boninsegna S., Bosetti P., Carturan G., Dellagiocoma G., Dal-Monte R., Rossi M.: Encapsulation of individual pancreatic islets by sol-gel SiO₂: a novel procedure for perspective cellular grafts. *J. Biotechnol.* **100**, 277–286 (2003)
- Borkowska M., Lyżniak M., Grzeczkwicz A., Stachowiak R., Kawiak J., Bielecki J., Budziszewska B., Granicka L.: The Cytotoxic effect of polyelectrolyte shells coated bacterial cells on human leukemia cells. *Nanomed. Nanotech.* (2012), <http://www.omicsonline.org/2157-7439/2157-7439-3-152.pdf>
- Chang T.M.S.: Semipermeable microcapsules. *Science*, **146**, 524–525 (1964)
- Cheung S., Tai J., Tze W.: Effect of molecular weight of polysulfone fibres on macroencapsulated pig islet xenograft function in diabetic mice. *Cell Transplant.* **29**, 2144–2145 (1997)
- Chick W.L.: Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science*, **187**, 847–848 (1975)
- Citrone P., Bourgeois M., Chang P.L.: Antiangiogenic cancer therapy with microencapsulated cells. *Hum. Gene Ther.* **14**, 1065–1077 (2003)
- Colton C.K.: Engineering challenges in cell encapsulation technology. *Trends Biotechnol.* **14**, 158–162 (1996)
- Consiglio A., Bordignon C. i wsp.: Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J. Neurol. Sci.* **255**, 7–16 (2007)
- Cruise G.M., Hegre O.D., Lamberti F.V., Hager S.R., Hill R., Scharp D.S., Hubbell J.A.: In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant.* **8**, 293–306 (1999)
- David B., Dufresne M., Nagel M.D., Legallais C.: In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidized bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1204–1212 (2004)
- Dembczyński R., Jankowski T.: Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **41**, 5–17 (2004)
- Diaspro A., Silvano D., Cavalleri O., Gliozzi A.: Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir*, **18**, 5047–5050 (2002)
- Ding W.K., Shah N.P.: An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J. Food Sci.* **74**, 53–61 (2009)
- Dulong J.L., Legallais C.: Contribution of a finite element model for the geometric optimization of an implantable bioartificial pancreas. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 183–192 (2000)
- Duncan S.H., Richardson A.J., Kaul P., Holmes R.P., Allison M.J., Stewart C.S.: *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3841–3847 (2002)
- Endres, M., Wenda N., Woehlecke H., Neumann K., Ringe J., Erggelet C., Lerche D., Kaps C.: Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection. *Acta Biomater.* **6**, 436–444 (2010)
- Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.: Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J. Microencapsul.* **19**, 485–494 (2002)
- Gao H., Yu Y., Cai B., Wang M.: Preparation and properties of microencapsulated genetically engineered bacteria cells for oral therapy of uremia. *Chin. Sci. Bull.* **49**, 1117–1121 (2004)
- Garofalo F.A., Chang T.M.: Effects of mass transfer and reaction kinetics on serum cholesterol depletion rates of free and immobilized *Pseudomonas pictorum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27**, 75–91 (1990)
- Garofalo F.A., Chang T.M.: Immobilization of *P. pictorum* in open pore agar, alginate and polylysine-alginate microcapsules for serum cholesterol depletion. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs*, **17**, 271–89 (1989)
- Goguen B., Kedersha N.: Clonogenic cytotoxicity testing by microdrop encapsulation. *Nature*, **363**, 189–190 (1993)
- Granicka L.H., Żołnierowicz J., Wasilewska D., Weryński A., Kawiak J.: Induced Death of *Escherichia coli* encapsulated in a hollow fiber membrane as observed in vitro or after subcutaneous implantation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 224–228 (2010)

29. Groot M., T.A. Schuur, R. van Schilfgaarde: Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J. Surg. Res.* **121**, 141–150, (2004)
30. Gunzburg W.H., Salmons B: Use of cell therapy as a means of targeting chemotherapy to inoperable pancreatic cancer. *Acta Biochim. Polon.* **52**, 601–607 (2005)
31. Hai-Ying G., Zhong C., Rong-Xiao S., Su-Su Y., Hong-Yuan C., Yi-Tao D., Ai-Min Y.: The immobilization of hepatocytes on 24 nm-sized gold colloid for enhanced hepatocytes proliferation. *Biomaterials*, **25**, 3445–3451 (2004)
32. Hasse, C., Klöck G., Schlosser A., Zimmermann U., Rothmund M.: Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet*, **350**, 1296–1297 (1997)
33. Hortelano G., Al-Hendy A., Frederick A., Chang P.L.: Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. *Blood*, **87**, 5095–5103 (1996)
34. Hunkeler D., Prokop A., Powers A., Haralson M., Di Mari S., Wang T.A.: Screening of polymers as biomaterials for cell encapsulation. *Polymers News*, **22**, 232–240 (1997)
35. Hunkeler D.: Polymers for bioartificial organs. *Trends Polymers Sci.* **5**, 286–293 (1997)
36. Imai M., Kawabata N., Kato K., Kawahara T., Nakazawa F., Sawa M., Kasai S., Mito M.: Successful xenograft in streptozotocin induced diabetic rat using dispersed hamster islet tissue within microporous polypropylene bag. *Cell Transplant.* **5**, 51–65 (1996)
37. Jasiński A., Słomski R., Szalata M., Lipiński D.: Transplantacja narządów – wyzwanie dla biotechnologii. *Biotechnologia*, **72**, 7–28 (2006)
38. Joerger R.D.: Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* **82**, 640–647 (2003)
39. Joki T., Machluf M., Atala A., Zhu J., Seyfried N.T., Dunn I.F., Abe T., Carroll R.S., Black P.: Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat. Biotech.* **19**, 35–39 (2001)
40. Jones M.L., Chen H., Ouyang W., Metz T., Prakash S.: Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *J. Biomed. Biotechnol.* **27**, 61–69 (2004)
41. Karger-Kocsis J.: Polypropylene, structure and morphology, str. 1–30, Chapman and Hall, Londyn 1995
42. Kayar S.R., Axley M.J.: Accelerated gas removal from divers tissues utilizing gas metabolizing bacteria. US Patent 5 922 317 (1997)
43. Lacy P.E., Hegre O.D., Gerasimidi-Vazeou A., Gentile F.T., Dionne K.E.: Maintenance of normoglycemia in diabetic Lysaght mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science*, **254**, 1782–1784 (1991)
44. Lanza R.P., Jackson R., Sullivan A., Ringeling J., McGrath C., Kuhlreiber W., Chick W.L.: Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplant.* **67**, 1105–1111 (1999)
45. Li R.H., Williams S., Burkstrand M., Roos E.: Encapsulation matrices for neutrophilic factor-secreting myoblast cells. *Tissue Eng.* **6**, 151–163 (2000)
46. Lim F., Sun A.M.: Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, **210**, 908–909 (1980)
47. Lloyd-George I., Chang T.M.: Free and microencapsulated *Erwinia herbicola* for the production of tyrosine. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.* **21**, 323–333 (1993)
48. Matsuzaki T., Chin J.: Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 67–73 (2000)
49. Mercier P., Fernandez F., Tortosa F., Bagheri H., Duplan H., Tafani M., Bes J.C., Bastide R., Lazorthes Y., Sallerin B.: A new method for encapsulation of living cells: preliminary results with PC12 cell line. *J. Microencaps.* **18**, 323–334 (2001)
50. Moslemy P., Neufeld R.J., Guiot S.R.: Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. *Biotech. Bioeng.* **80**, 175–184 (2002)
51. Naganawa Y., Ohsugi K., Kase R., Date I., Sakuraba H., Sakuragawa N.: In vitro study of encapsulation therapy for Fabry disease using genetically engineered CHO cell line. *Cell Transplant.* **11**, 325–9 (2002)
52. O'Shea G. M., Goosen M.F.A., Sun A.M.: Prolonged survival of transplanted islets of langerhans encapsulated in a bio-compatible membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **804**, 133–135 (1984)
53. Orive G., Hernandez R.M., Gascon A., Pedraz J.L.: Biomedical application of immobilized cells. *Methods Biotech.* **22**, 427–437 (2006)
54. Ouyang W, Chen H., Jones M.L., T. Haque, Martoni C., Afkhami F., Prakash S.: Novel multi-layer APPPA microcapsules for oral delivery: preparation condition, stability and permeability. *Indian J. Biochem Biophys.* **46**, 491–497 (2009)
55. Posillico E. G.: Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Biotechnol.* **4**, 114–117 (1986)
56. Pothakamury U.R., Barbosa-Cánovas G.V.: Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci. Tech.* **6**, 397–406 (1995)
57. Prakash S., Chang T.M.S.: Growth kinetics of genetically engineered *E. coli* DH 5 cells in artificial cell APA membrane microcapsules: preliminary report. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **27**, 291–301 (1999)
58. Prakash S., Chang T.M.S.: Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nat. Med.* **2**, 883–887 (1996)
59. Prakash S., Chang, T.M.S.: Artificial cell microcapsules containing genetically engineered *E. coli* DH5 cells for in-vitro lowering of plasma potassium, phosphate, magnesium, sodium, chloride, uric acid, cholesterol, and creatinine: a preliminary report. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **27**, 475–481 (1999)
60. Prakash S., Chang, T.M.S.: Preparation and in-vitro analysis of genetically engineered *E. coli* DH5 cells, microencapsulated in artificial cells for urea and ammonia removal. *Biotech. Bioeng.* **46**, 621–626 (1995)
61. Prakash S., Jones M.L.: Artificial Cell Therapy: New Strategies for the Therapeutic Delivery of Live Bacteria. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**, 44–56 (2005)
62. Prakash S., Urbanska A.M.: Colon-targeted delivery of live bacterial cell biotherapeutics including microencapsulated live bacterial cells. *Biologics Targ. Ther.* **2**, 355–378 (2008)
63. Pueyo M.E., Darquy S., Arbet-Engels C., Poitout V., Di Maria S., Gangnerau M.N., Reach G.: A method for obtaining mono-dispersed cells from isolated porcine islets of Langerhans. *Int. J. Artif. Org.* **18**, 34–38 (1995)
64. Rabanel J.M., Banquy X., Zouaoui H., Mokhtar M.: Progress Technology in Microencapsulation Methods for Cell Therapy. *Biotechnol. Prog.* **25**, 946–963 (2009)
65. Read T.A., Sorensen D.R., Mahesparan R., Enger P.R., Timpl R., Olsen B.R., Hjelstuen H.B., Haraldseth O., Bjerkvig R.: Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat. Biotech.* **19**, 29–34 (2001)
66. Rinsch, C., Quinodoz P., Pittet B., Alizadeh N., Baetens D., Montandon D., Aebischer P., Pepper M.S.: Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther.* **8**, 523–533 (2001)

67. Rogers F.B., Li S.C.: Acute colonic necrosis associated with sodium polystyrene sulfonate (Kayexalate) enemas in a critically ill patient: case report and review of the literature. *J. Trauma*. **51**, 395–397 (2001)
68. Ross G.R., Gullis C., Gonzalez N.S.: Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 2121–2125 (2008)
69. Schrezenmeir, J., Kirchgessner J.: Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islet organs. *Transplant.* **57**, 1308–1314 (1994)
70. Sefton M.V., May M.H., Lahooti S., Babensee J.E.: Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance. *J. Contr. Release*, **65**, 173–186. (2000)
71. Serguera C., Bohl, D., Rolland E., Prevost P., Heard J.M.: Control of erythropoietin secretion by doxycycline of mifepristone in mice bearing polymer encapsulated engineered cells. *Hum. Gene Ther.* **10**, 375–383 (1999)
72. Stanford K., McAllister M.A., Niu Y.D., Stephens T.P., Mazzocco A, Waddell T.E., Johnson R.P.: Oral Delivery Systems for Encapsulated Bacteriophages Targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *J. Food Prot.* **73**, 1304–12 (2010)
73. Takebe K., Shimura T., Munkhbat B., Hagihara M., Nakaniishi H., Tsuji K.: Xenogeneic (pig to rat) fetal liver fragment transplantation using macrocapsules for immunosolation. *Cell Transplant.* **5**, 31–33 (1996)
74. Tuszyński T. Immobilizacja droboustrojów. Możliwości ich przemysłowego wykorzystania. *Laboratorium*, **10**, 34–39 (2008)
75. Uludag H., de Vos P., Tresco P.A.: Technology of mammalian cell encapsulation, *Adv. Drug Deliv.* **42**, 29–64 (2000)
76. Vancha A.R., Govindaraju S., Parsa K., Jasti M., González-García M., Ballesteros R.: Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnol.* **4**, 23 (2004)
77. Wang T.G., Cell encapsulation technology and therapeutics (w) Birkhäuser, red. W. M. Kühntreiber, R.P. Lanza, W.L. Chick., Boston, 1999, s. 29–30.
78. Ward R.S., White K.A., Wolcott C.A., Wang A.Y., Kuhn R.W., Taylor J.E., John J.K.: Development of a hybrid artificial pancreas with a dense polyurethane membrane. *ASAIO J.* **39**, 261–267 (1993)
79. Whichard J.M., Sriranganathan N., Pierson F.W.: Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J. Food Prot.* **66**, 220–225 (2003)
80. Yang M.B., Vacanti J.P., Ingber D.E.: Hollow fibers for hepatocyte encapsulation and transplantation: studies of survival and function in rats. *Cell Transplant.* **3**, 373–385 (1994)
81. Yasuhara T., Date I.: Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application. *Cell Transplant.* **16**, 125–132 (2007)
82. Zondervan G.J., Hoppen H.J., Pennings A.J., Fritschy W., Wolters G.: Design of a polyurethane membrane for the encapsulation of islets of Langerhans. *Biomaterials*, **13**, 136–144 (1992)
83. Zurn A.D., Henry H., Schelup M., Aubert V., Winkel L., Eilers B., Bauchmann C., Aebischer P.: Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogenic cells. *Cell Transplant.* **9**, 471–484 (2000)