

Metody inżynierii tkankowej jako potencjalne narzędzie wykorzystywane w leczeniu chorób układu krążenia



Tissue engineering methods as a potential instrument used in treatment of circulatory system diseases

Piotr Wilczek¹, Roman Przybylski², Marian Zembala²

¹Fundacja Rozwoju Kardiologii, Zabrze

²Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii ŚAM, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2006; 3 (1): 73–79

Streszczenie

W pracy przedstawiono wybrane zagadnienia, związane z rozwojem tych technik inżynierii tkankowej i metod terapii komórkowych, które mają istotne znaczenie z punktu widzenia badawczego i wykazują potencjalną przydatność w praktyce klinicznej. Szczególną uwagę poświęcono możliwości ich wykorzystania w leczeniu chorób układu krążenia. W części poświęconej terapiom komórkowym zwrócono uwagę na rozbieżności i zagrożenia, związane z przeszczepianiem komórek. W części prac eksperymentalnych potwierdzono skuteczność terapii komórkowych w przywracaniu funkcjonalności mięśnia sercowego. Pojawily się jednak również doniesienia, że zastosowanie terapii komórkowych nie wpływa w znaczący sposób na poprawę funkcji uszkodzonego mięśnia sercowego. Za główną przyczynę tego zjawiska uznaje się się w tych przypadkach małą żywotność przeszczepionych komórek.

Istotne znaczenie w leczeniu chorób układu krążenia zyskują techniki inżynierii tkankowej. Dąży się przy tym do uzyskania bioprotez pokrywanych komórkami autologicznymi i takich, w których możliwe byłoby odtworzenie autologicznej macierzy zewnątrzkomórkowej. Takie bioprotezy mogłyby być trwalsze od protez klasycznych. Podczas tworzenia bioprotez jako rusztowania do nahodowywania komórek wykorzystywane są zwykle matryce bezkomórkowe, coraz częściej zastosowanie znajdują też matryce z materiałów biodegradowalnych. Materiał komórkowy stanowią z kolei dojrzałe komórki somatyczne bądź komórki macierzyste. W pracy zaprezentowano m.in. doświadczenia własne, dotyczące tworzenia biologicznej łąki z wykorzystaniem bezkomórkowego osierdzia, pokrywanego komórkami mięśniówki gładkiej. Łąka taka mogłaby być wykorzystywana podczas zabiegów chirurgicznej rekonstrukcji lewej komory serca. Do tej pory udało się opracować skuteczną metodę acellularyzacji tkanek, umożliwiającą efektywne usu-

Summary

Tissue engineering as well as the cell culture techniques seem to be the promising perspective of alternative treatment of circulatory system diseases. Quite recently, mentioned methods have been still only in the phase of *in vitro* tests or animal experiments. However, presently they are more often used in clinical practice.

Cell transplantations or heart bioprotheses constructions based on autologous cells – are only two examples of tissue engineering usage. There are two different methods to obtain the bioprothesis scaffolds: first based on biodegradable materials usage, while the second prefers usage of biological material – acellular matrix. The cell material consists of mature somatic cells or stem cells.

In a study, chosen issues regarding usage of cell therapies and cell engineering in clinical practice have been presented. Moreover, own experiences concerning preparation of biological patch using acellular pericardium covered with smooth muscle cells have been presented. Mentioned patch could be used in procedures of surgical reconstruction of left ventricle.

Key words: tissue engineering, cell therapy, bioprothesis.

Adres do korespondencji: dr med. Piotr Wilczek, Fundacja Rozwoju Kardiologii, 41-800 Zabrze, ul. Wolności 345a, tel. +48 32 373 56 00, e-mail: mildes@post.pl

nięcie komórek bez istotnych cech uszkodzenia macierzy zewnątrzkomórkowej i z zachowaniem właściwości biomechanicznych zbliżonych do tkanki własnej. Ponadto opracowano skuteczną metodę izolacji i hodowli komórek mięśniówki gładkiej. Potwierdzono równocześnie zdolność do zasiedlania matrycy bezkomórkowej przez izolowane komórki. Wstępne wyniki badań są obiecujące i zachęcają do kontynuowania doświadczeń.

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, terapia komórkowa, bioprotezy.

Terapie komórkowe

Transplantacja komórek może być ważnym czynnikiem terapeutycznym w leczeniu choroby niedokrwiennej serca. Istnieją doniesienia, świadczące o znacznej poprawie kurczliwości lewej komory serca po terapii komórkowej. Do pionierskich należą badania Soonpaa i wsp. [1, 2], którzy transplantowali komórki AT-1 i płodowe kardiomiocyty zdrowym myszom oraz psom. Wszczepione kardiomiocyty tworzyły struktury dyskowe i wytwarzały jednocześnie połączenia z komórkami gospodarza. W badaniach przeprowadzonych przez innych autorów [3, 4] obserwowano, że zabieg rekonstrukcji lewej komory serca z jednoczesnym wszczepieniem komórek mięśniowych i pooperacyjnym zastosowaniem ACE-inhibitorów istotnie poprawia funkcję skurczową lewej komory serca. Ciekawych informacji na ten temat dostarczyły także badania na chomikach szczepu BIO 53.58, którym wszczepiano allogenne komórki mięśnia sercowego oraz autologiczne komórki mięśniówki gładkiej [5, 6]. W obu wypadkach zaobserwowano, że wszczepione komórki zaczęły formować się w tkankę mięśniową, przy czym następowała też poprawa funkcji mięśnia sercowego. Wielu badaczy podtrzymuje tezę, że komórki mięśnia sercowego mogą być z dobrym efektem przeszczepiane do zmienionego niedokrwienne serca [7–10].

W niektórych badaniach zaobserwowano jednak, że embrionalne ludzkie kardiomiocyty wszczepione do uszkodzonego serca szczura nie mają zdolności różnicowania się w komórki dojrzałe, co wykazano w kilkumiesięcznej obserwacji [7]. Podobne wnioski wysnuwają się z badań Watanabe i wsp. [11]. Wszczepienie komórek mięśniowych mysich linii AT-1 do zdrowego i uszkodzonego mięśnia sercowego świni wykazało, że o ile zdrowy mięsień sercowy cechowało normalne przeżycie przeszczepionych komórek, o tyle w wypadku mięśnia uszkodzonego żadne z komórek nie przeżywały. W pewnym kontraście do tego są badania Connold i wsp. [9]. Autorzy stwierdzili, że embrionalne kardiomiocyty przeszczepione do uszkodzonego mięśnia sercowego szczurów wytwarzają połączenia międzykomórkowe (*gap junction*) z innymi przeszczepionymi komórkami, co może świadczyć o ich częściowym różnicowaniu. W żadnym wypadku nie odnotowano zaś wytworzenia się połączeń elektromechanicznych między przeszczepianymi komórkami a komórkami uszkodzonego mięśnia sercowego gospodarza.

Interesujące były również wyniki badań Reinecke i wsp. [12], którzy przeszczepiali płodowe, neonatalne i dojrzałe kardiomiocyty do zdrowego mięśnia sercowego, do mięśnia sercowego uszkodzonego w fazie ostrej i do mięśnia uszkodzonego w okresie odległym (6 dni) po uszkodzeniu. Dojrzałe kardiomiocyty nie przeżywały w żadnych warunkach, natomiast płodowe i neonatalne komórki mięśnia sercowego formowały żywe przeszczepy w każdej z wymienionych grup badanych. Zaobserwowano też tworzenie połączeń funkcjonalnych między przeszczepianymi komórkami, a w kilku wypadkach powstały połączenia między komórkami gospodarza i przeszczepionymi, co może sugerować wytworzenie się funkcjonalnych połączeń elektromechanicznych.

W terapii uszkodzonego mięśnia sercowego oprócz kardiomiocytów mogą mieć również zastosowanie komórki mięśniówki gładkiej, mają one bowiem zdolność do utrzymania długotrwałego skurczu tonicznego przy relatywnie niskim zapotrzebowaniu energetycznym, a ponadto wykazują wysoką maksymalną siłę skurczu w porównaniu z mięśniami szkieletowymi [13]. Eksperymenty, związane z zastosowaniem komórek mięśniówki gładkiej, zostały przeprowadzone przez Yoo i wsp. [14]. Przeszczepili oni te komórki do mięśnia sercowego, a dodatkowo, w innej grupie badanej, przeprowadzili transplantację kardiomiocytów. Wykazano, że w obu grupach eksperymentalnych następowało formowanie się tkanki mięśniowej. Obserwowano również poprawę funkcji rozkurczowej serca. W grupie, w której dokonano przeszczepu komórek mięśniówki gładkiej, odnotowano wyższe szczytowe ciśnienia skurczowe. Funkcja skurczowa serca w grupie, w której zastosowano komórki mięśniówki gładkiej, była porównywalna z wartościami obserwowanymi u zdrowych osobników.

Autorzy stwierdzili również, że zastosowanie komórek mięśniówki gładkiej daje lepsze rezultaty niż zastosowanie terapii kardiomiocytów. Badania te były prowadzone na chomikach, z tego względu autorzy podkreślają konieczność weryfikacji wyników na dużych zwierzętach. W innych badaniach [15] zastosowano komórki mięśniówki gładkiej izolowane z aorty. Były one przenoszone na materiał syntetyczny – polimer polilaktamowy (PCLA). Hodowano je na syntetycznej matrycy w warunkach *in vitro* mniej więcej przez 2 tyg., aż do uformowania się tkanki. Następnie matryce z komórkami wszczepiano szczurom, u których stymulowano wcześniej epizod niedokrwienia. W grupie kontrolnej autorzy zastosowali polimer niepokrywany komórkami. W konkluzji

stwierdzono, że łąta pokryta komórkami mięśniówki gładkiej w istotny sposób przyczynia się do poprawy funkcji skurczowej zmienionego zawałowo mięśnia sercowego.

Jak widać z przedstawionego opisu, zastosowanie terapii komórkowej może być czynnikiem, który w istotny sposób pozwala na poprawę kurczliwości mięśnia sercowego, jednak zastosowanie zawiesiny komórek ma istotne ograniczenia, a czynnikiem limitującym jest głównie wielkość obszaru blizny pozawałowej. Ponadto komórki, by zachować właściwą aktywność proliferacyjną i różnicowanie, wymagają stymulacji w postaci kontaktu z powierzchnią macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki o fenotypie komórek adhezyjnych, pozbawione tego rodzaju stymulacji uruchamiają program apoptozy. Może to częściowo tłumaczyć niepowodzenia związane ze stosowaniem w terapii zawiesiny pojedynczych komórek [11].

Bioprotezy sercowe oparte na matrycach z polimeru biodegradowalnego

Idea tworzenia takich bioprotez polega na nasiewaniu komórek autologicznych na szkielet z polimerów bioegradowalnych. Osadzone w syntetycznym szkielecie komórki rosną, różnicują się i syntetyzują macierz zewnątrzkomórkową. Równolegle z syntezą *matrix* zewnątrzkomórkowej następuje powolna degradacja polimeru, aby w efekcie mógł on być całkowicie zastąpiony przez wzrastającą tkankę. W ten sposób powstaje tkanka w pełni autologiczna.

Jednym z pierwszych materiałów wykorzystywanych do modelowania tego typu protez był kwas poliglikolowy – PGA (*polyglycolic acid*). Wykorzystali go, m.in. Hoerstrup i wsp. do konstrukcji zastawki trójpłatkowej [16]. Zastawka ta była następnie pokrywana funkcjonalną warstwą komórek autologicznych, którymi były komórki szpiku HMSC (*human marrow stromal cell*). Wzrastały one na powierzchni materiału w warunkach *in vitro* w bioreaktorze z przepływem pulsacyjnym. Wnioski, jakie nasuwały się z przeprowadzonych *in vitro* badań wskazywały, że zastosowanie PGA jako materiału biodegradowalnego, z nahodowanymi na jego powierzchni komórkami szpiku, pozwala na uzyskanie bioprotezy o właściwościach morfologicznych i mechanicznych podobnych do tkanki własnej. Obiecujące wyniki otrzymano też w eksperymentach na zwierzętach, którym wszczepiano bioprotezy zastawkowe, konstruowane na bazie PGA [17]. W tym wypadku materiał biodegradowalny pokrywano najpierw fibroblastami, a następnie na takie podłoże nahodowywano komórki endotelialne. Tak przygotowane zastawki wszczepiano zwierzętom. Analiza zawartości 4-hydroksyproliny, badania immunohistochemiczne na obecność włókien fibrynowych oraz czynnika VIII na powierzchni tkanki świadczyły o istnieniu aktywnych procesów remodelowania tkanki i wzrostu komórek.

W konstrukcji bioprotez zastosowanie znajdują też potężniejsza biodegradowalnych polimerów, takie jak PGA, np. z kwasem polilaktamowym – PLA. Ciekawych wyników dostarczyły eksperymenty, w których porównywano zdolność komórek do wzrostu i różnicowania w zależności od metody nahodowywania komórek. Na szkielet z kwasów poliglikolo-

wego i polilaktamowego nasiewano fibroblasty i komórki śródbłonka w następujący sposób: codzienne zasiedlanie fibroblastami przez 10 dni, jednokrotne zasiedlenie fibroblastami, a następnie hodowla polimeru z komórkami przez 14 dni. W tym drugim wypadku w jednej grupie użyto standardowego medium, w drugiej natomiast zastosowano medium z kolagenem. Wyniki w sposób jednoznaczny wykazały, że stosując medium suplementowane kolagenem, udało się najskuteczniej zasiedlić polimer, można więc przypuszczać, że w tym wypadku również synteza macierzy zewnątrzkomórkowej będzie efektywna [18]. Znacznie gorsze rezultaty uzyskano natomiast po zastosowaniu w układzie *in vivo* konstrukcji złożonych z kwasów PGA łącznie z PLA. Bioprotezy tego rodzaju charakteryzowała znaczna trombogenicność. Zwierzęta, którym wszczepiano zastawki z tych materiałów, ginęły w krótkim okresie po operacji (12, 24, 36 godz.), a przyczyną śmierci był zawał mięśnia sercowego w przebiegu niewydolności oddechowej [19]. Zastosowanie w konstrukcji bioprotez mają również rusztowania złożone z PGA i kwasu poli-4-hydroksymasłowego P4HB (*poly-4-hydroksybutyrate*) lub kwasu polihydroksyoctowego-PHO (*polyhydroksyoctanoate*). Zastosowanie tego rodzaju polimerów istotnie poprawia właściwości biomechaniczne protez, istotnie jednak wydłuża się czas biodegradacji polimeru [20]. Znacznie bardziej obiecującym materiałem są rusztowania, w których PGA pokrywany jest cienką warstwą kwasu polihydroksymasłowego – P4HB. Materiał tego rodzaju łączy porowatość PGA z elastycznością i wytrzymałością P4HB. Ponadto polimer ten charakteryzuje się szybszym czasem biodegradacji w porównaniu z PHO. Termoplastyczność P4HB powoduje, że stosunkowo łatwe jest uformowanie bioprotezy [21]. W badaniach Hoerstrup i wsp. [21] na uformowane z PGA i P4HB zastawki nasiewano komórki endotelialne i miofibroblasty. Następnie bioprotezy wszczepiano owcom. Mniej więcej po 20 tyg. odnotowano w badaniach echokardiograficznych obecność w pełni funkcjonalnej zastawki. Można zatem przypuszczać, że charakterystyka wzrostu i remodelowania tego rodzaju bioprotez, opartych na polimerach biodegradowalnych jest zbliżona do tkanek własnych [22].

Często zwraca się uwagę na konieczność mechanicznego kondycjonowania bioprotez sercowych na etapie ich tworzenia w warunkach *in vitro*, co jest możliwe dzięki zastosowaniu konstrukcji bioreaktorów z przepływem pulsacyjnym. Jak się wydaje, niewystarczająca wytrzymałość mechaniczna bioprotez z materiałów biodegradowalnych może być spowodowana brakiem stymulacji mechanicznej na etapie ich powstawania. Zastosowanie bioreaktorów z przepływem pulsacyjnym istotnie poprawia biomechaniczne właściwości protez [23].

Wadą materiałów biodegradowalnych jest brak na ich powierzchni ligandów białkowych, które w normalnych warunkach są w zastawkach biologicznych i odpowiadają za właściwą adhezję pomiędzy komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową [24]. Znacznie bardziej obiecujące wydaje się wykorzystanie w konstrukcji bioprotez rusztowań acellularnych.

Wykorzystanie matryc acellularnych w technikach inżynierii tkankowej

Acellularne bioprotezy, pokrywane komórkami autologicznymi powstały jako alternatywa, m.in. wobec protez ksenogennych konserwowanych chemicznie oraz opartych na materiałach syntetycznych. Konserwacja chemiczna może pozytywnie oddziaływać na właściwości mechaniczne tkanki, gdyż redukuje jej immunogenność. Wadą tego rodzaju konserwacji jest jednak relatywnie szybko postępujący proces degradacji oraz kalcyfikacji tkanek [25, 26]. Bioprotezy, w których są żywe komórki, zachowują z kolei na swojej powierzchni komórki endotelialne, wykazujące wysoką ekspresję antygenów HLA zarówno klasy I, jak i II, co może stanowić potencjalne źródło indukcji reakcji immunologicznej, a w konsekwencji być czynnikiem decydującym o zmianach degradacyjnych bioprotezy w okresie odległym po implantacji [27]. W tym wypadku grupą szczególnie narażoną na wczesną dysfunkcję są dzieci, co wynika z dużej reaktywności ich układu immunologicznego [28, 29]. Udowodniono, że proces acellularyzacji przyczynia się z kolei do istotnego obniżenia liczby antygenów MHC klasy I i II [30], ponadto nie narusza stabilności i funkcjonalności bioprotez [31].

Najprostszą metodą acellularyzacji jest cykliczne zamrażanie i rozmrażanie tkanki [32, 33]. Takie postępowanie sprawia jednak, że duża część komórek pozostaje niewyizolowana [34], obserwowane są też zmiany struktury kolagenu w obrębie traktowanych tkanek i mało skuteczne jest nahodowywanie komórek endotelialnych na tak przygotowane tkanki [34]. Inną metodą usuwania komórek jest inkubacja tkanki w roztworze NaCl, a następnie w detergencie, którym jest SDS [34, 35]. Wykazano, że płatki zastawek, inkubowane w roztworach NaCl-SDS mogą być całkowicie pozbawione komórek i wykazują zdolność do zasiedlenia ich komórkami śródbłonna [34].

Jedną z najczęściej stosowanych metod usuwania komórek jest inkubacja tkanek w roztworze trypsyna/EDTA. Dane literaturowe wskazują, że pozwala to na całkowite usunięcie komórek bez widocznych zmian w macierzy zewnątrzkomórkowej [36–38].

Do acellularyzacji stosowane są też detergenty. Jednym z nich jest Triton-X 100, który – zdaniem niektórych autorów – pozwala zachować natywną strukturę białek macierzy, a jednocześnie skutecznie usuwa komórki [39]. Dla kontrastu badania Kim i wsp. [34] wskazują, że stosując Triton-X 100, trudno uzyskać powtarzalny efektywny poziom acellularyzacji tkanek. Innym powszechnie stosowanym detergentem jest SDS, którego działanie pozwala uzyskać acellularną tkankę o właściwościach mechanicznych zbliżonych do tkanki własnej [40]. Inne badania wykazały natomiast, że SDS jest czynnikiem powodującym denaturację białek kolagenowych i ich destabilizację [41]. SDS może prowadzić do fragmentacji i obrzęków w obrębie kolagenu i do istotnej utraty jego stabilności hydrotermalnej [42]. Skuteczność acellularyzacji powinna być oceniana nie tylko poprzez efektywność usuwania komórek z tkanek przy zachowaniu inte-

gralności i stabilności macierzy zewnątrzkomórkowej, ważnym kryterium jest też zdolność do ponownego zasiedlenia przygotowanych rusztowań bezkomórkowych przez komórki. W wypadku tkanek ksenogennych zastosowanie może mieć chemiczna konserwacja bioprotezy. Próby endotelializacji tkanek konserwowanych chemicznie prowadzono m.in. na tkankach zastawek, wykorzystując jako czynnik konserwujący aldehyd glutarowy. Badania wykonywano zarówno na pojedynczych płatkach, jak i całych zastawkach [43]. Przed nahodowaniem komórek endotelialnych zastawki poddawane były detoksyfikacji. Jednak pomimo dużej gęstości komórek użytych do hodowli, prowadzenia jej w bioreaktorze w warunkach dynamicznych, po 7 dniach hodowli na zastawkach uwidoczniło jedynie nieopłaszczone lub martwe komórki. Wydaje się zatem, że bardziej obiecujące jest zastosowanie jako rusztowań tkanek allogennych. W badaniach Cebotari i wsp. [44] użyto zastawek ludzkich, z których usunięto komórki poprzez inkubację w roztworze trypsyna/EDTA. Zastawki te przed acellularyzacją umieszczano w sterylnych warunkach w roztworze antybiotyku penicylina/streptomycyna, w takiej formie mogły być przechowywane ok. miesiąca bez widocznej utraty integralności macierzy zewnątrzkomórkowej. Następnie acellularne rusztowania pokrywano ludzkimi komórkami endotelialnymi. Komórki te tworzyły na powierzchni tkanki regularną monowarstwę, pozytywnie reagującą z PECAM-1, Flk-1, VE-kadherynami.

Zdolność do zasiedlenia przez komórki tkanek bezkomórkowych zależy może również od sposobu konserwacji tkanki. Z badań Eberl i wsp. [45], w których porównywano różnice w zdolności do wzrostu, proliferacji oraz adhezji komórek na płatkach świeżych i konserwowanych w sposób właściwy dla zastawek dostępnych komercyjnie wynika, że na świeżych, niekonserwowanych tkankach komórki wykazywały prawidłową adhezję i proliferację, tworząc pomiędzy 6. a 10. dniem hodowli tzw. monowarstwę na powierzchni tkanki. Nie obserwowano natomiast tworzenia się monowarstwy komórek i ich proliferacji na powierzchni tkanek konserwowanych. W innych doświadczeniach z płatków zastawek usuwano komórki poprzez inkubację w roztworze SDS, a dodatkowo pierścienie aorty inkubowano wcześniej w roztworze trypsyna/EDTA [46]. Na tak przygotowaną tkankę nasiewano zastawkowe komórki interstycjalne (VIC), komórki mięśniówki gładkiej (SMC) oraz fibroblasty. W przypadku wszystkich tkanek odnotowano ich prawidłowe zasiedlenie przez komórki. VIC i SMC migrowały w głąb tkanki, natomiast fibroblasty zasiedlały jedynie jej powierzchnię. Tkanki acellularne są często wykorzystywane w technikach inżynierii tkankowej. Prace koncentrują się na uzyskaniu matryc kolagenowych o różnej porowatości, które mogłyby być zasiedlane komórkami. Mimo że w procedurach pozyskiwania tkanek acellularnych zwraca się uwagę, by wykazywały one właściwości biomechaniczne zbliżone do tkanek natywnych, to jednak część z tych matryc cechują słabe właściwości mechaniczne [47–49].

Doświadczenia własne

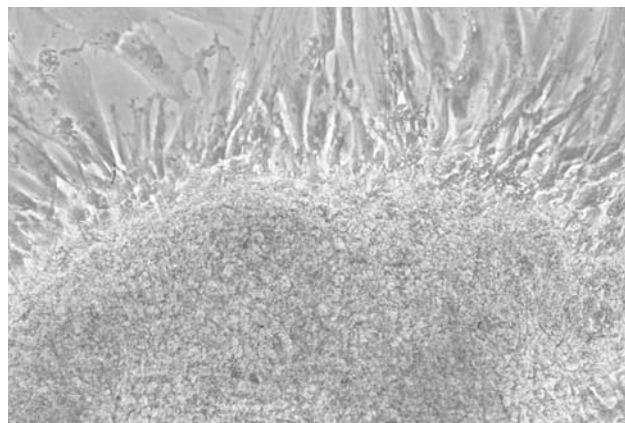
W ramach wspólnego projektu Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu i Pracowni Biotechnologii Fundacji Rozwoju Kardiologii w Zabrzu prowadzone są prace, mające na celu stworzenie łąty biologicznej, pokrywanej komórkami pacjenta. Taka łąta mogłaby być wykorzystywana w zabiegach chirurgicznej rekonstrukcji lewej komory serca.

Celem metody jest przywrócenie właściwego eliptycznego kształtu komory i likwidacja niekorzystnych naprężeń. Trwałość tego efektu możliwa jest, m.in. dzięki wszyciu łąty, pozwalającej na utrzymanie zadanego kształtu. Do tej pory łąty wykorzystywane w praktyce klinicznej tworzone były z materiałów syntetycznych typu Dacron. Materiał tego rodzaju ma dobre właściwości mechaniczne, nie ma jednak zdolności do wzrostu, remodelowania czy samonaprawy. Dlatego prowadzone są prace, mające na celu wykonanie łąty biologicznej, która pokrywana byłaby komórkami pacjenta. Pełniłaby ona nie tylko funkcję mechaniczną, ale i w aktywny sposób pozwalałaby na przywrócenie kurczliwości lewej komory serca. łąta składałaby się z dwóch komponentów: komponenty komórkowej oraz elementu rusztowania, na którym osadzane byłyby komórki autologiczne. Jako rusztowanie wykorzystuje się osierdzie pacjenta, tkankę, która poddana byłaby procesowi usuwania komórek. Wydaje się, że dobrym materiałem, relatywnie łatwo dostępnym, może być osierdzie pozyskiwane z serc eksplantowanych. Ten rodzaj tkanki ma dobre właściwości mechaniczne, a jednocześnie pozwala na nahodowanie na nim warstwy żywych komórek. W celu poprawy właściwości mechanicznych możliwe jest dodatkowe usieciowanie struktury przy użyciu czynników nietoksycznych, które nie wpłynęłyby niekorzystnie na żywotność nahodowanych komórek. Jako materiał komórkowy wykorzystywane mogą być komórki mięśniówki gładkiej izolowane z naczyń żylnych (ryc. 1). Mają one cechy funkcjonalne zbliżone do kardiomiocytów, natomiast ich dodatkową zaletą jest większy w porównaniu z kardiomiocytami potencjał prolife-

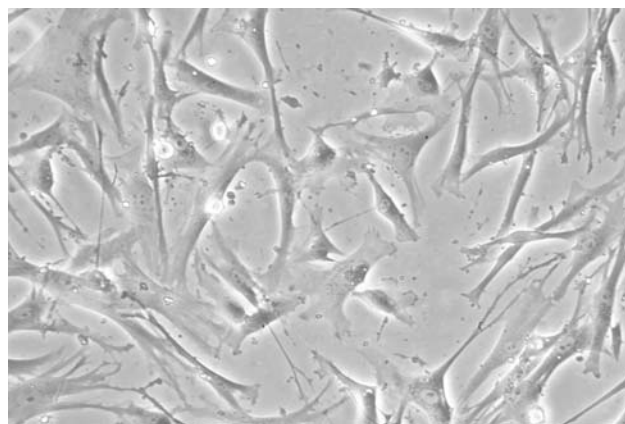
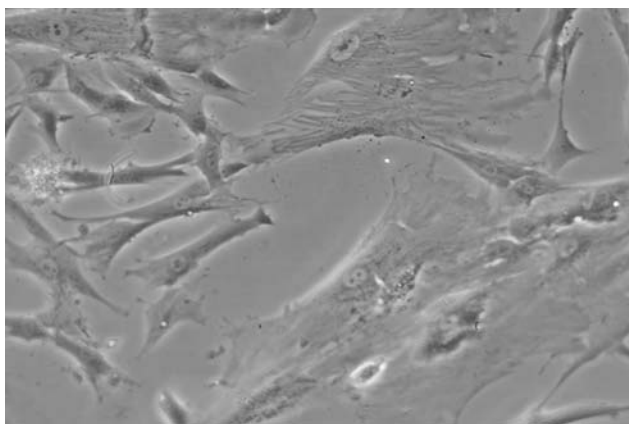
racyjny oraz ich łatwiejsze pozyskanie. Do tej pory zakończony został pierwszy etap prac, w którym:

- opracowano metodę izolowania i hodowli komórek mięśniówki gładkiej (VSMC), wykorzystywanych następnie do pokrywania łąty,
- wykonano wstępne badania efektywności wzrostu tych komórek,
- wykonano wstępne badania morfologiczne i histologiczne VSMC,
- opierając się na doświadczeniu własnym i danych literaturowych, przygotowano rusztowania bezkomórkowe, na których osadzane będą komórki,
- wyizolowane i hodowane komórki nasiewano na rusztowania bezkomórkowe.

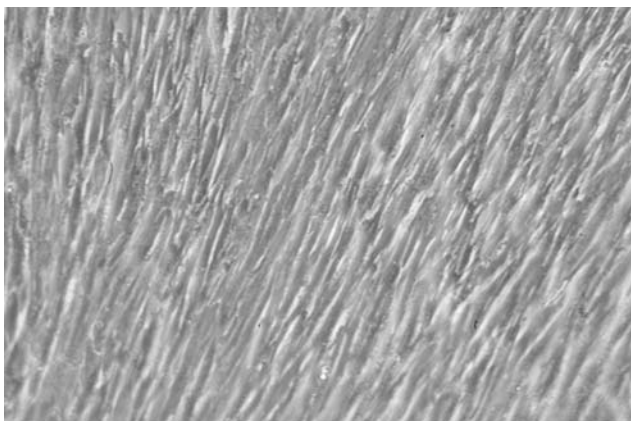
Wstępne wyniki badań wydają się obiecujące. Izolowane komórki wykazują prawidłową morfologię komórek mięśniówki gładkiej (ryc. 2.). Cechuje je również duży potencjał proliferacyjny, co pozwala przypuszczać, że liczba izolowa-



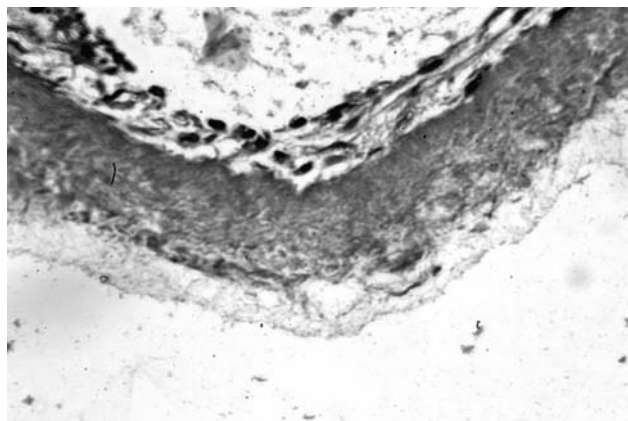
Ryc. 1. Izolacja komórek mięśniówki gładkiej. Fragmenty naczyń żylnych wielkości ok. 1 x 1 mm² umieszczane są w naczyniu hodowlanym w specjalnie dobranym medium odżywczym, suplementowanym surowicą i czynnikami wzrostu. Mniej więcej po tygodniu komórki zaczynają migrować na zewnątrz fragmentu tkanki



Ryc. 2. Izolowane ze ściany naczyń krwionośnych komórki mięśniówki gładkiej (VSMC) w hodowli komórkowej. Zdolność do wykonywania skurczów tonicznych przy relatywnie małym wydatku energetycznym oraz cechy funkcjonalne zbliżone do kardiomiocytów sprawiają, że mogą one stanowić ciekawą alternatywę w terapiach komórkowych, mających na celu poprawę kurczliwości mięśnia sercowego. Dodatkową zaletą VSMC jest większy w stosunku do kardiomiocytów potencjał proliferacyjny oraz ich łatwiejsze pozyskanie



Ryc. 3. Komórki mięśniówki gładkiej po 3–4 tyg. hodowli *in vitro* tworzą w naczyniu hodowlanym zwartą monowarstwę. Liczba komórek uzyskana w hodowli jest po tym czasie wystarczająca do pokrycia jednolitą warstwą acellularnego rusztowania łąty



Ryc. 4. Acellularna tkanka zasiedlona komórkami mięśniówki gładkiej. Mniej więcej po tygodniowej hodowli *in vitro* nahodowane na tkanę komórkami tworzą ciągłą warstwę komórek, trwale zintegrowaną z podłożem

nych komórek będzie wystarczająca do pokrycia łąty (ryc. 3). Wstępne badania wykazały też, że izolowane komórki po nasianiu na rusztowanie bezkomórkowe tworzyły mniej więcej po tygodniu hodowli konfluentną mono- lub dwuwarstwę (ryc. 4). Ponadto obserwacja komórek w hodowli wykazała, że są one w pełni funkcjonalne, o czym świadczy ich zdolność do syntezy i reorganizowania macierzy zewnątrzkomórkowej. Zbadano również właściwości biomechaniczne tkanki po acellularyzacji wykazując, że właściwości te nie różnią się istotnie od cech tkanki własnej.

Dotychczasowe wyniki skłaniają do podjęcia dalszych prac, mających na celu stworzeniu łąty biologicznej, która mogłaby być wykorzystywana podczas zabiegów chirurgicznej rekonstrukcji pozawałowo uszkodzonej lewej komory serca.

Piśmiennictwo

1. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264: 98-101.
2. Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Pride HP, Cooper BJ, Zipes DP, Field LJ. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J Clin Invest* 1995; 96: 2034-2042.
3. Sakakibara Y, Tambara K, Lu F. Combined procedure of surgical repair and cell transplantation for left ventricular aneurysm: an experimental study. *Circulation* 2002; 106 (12 suppl): I193-I197.
4. Nomoto T, Nishina T, Miwa S. Angiotensin-converting enzyme inhibitors helps prevent late remodeling after left ventricular aneurysm repair in rats. *Circulation* 2002; 106 (12 suppl): I115-I119.
5. Yoo K-J, Li R-K, Weis RD, Mickle DAG, Li G, Yau TM. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 859-65.
6. Yoo K-J, Li R-K, Weis RD, Mickle DAG, Jia ZQ, Kim EJ. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamster. *Circulation* 2000; 102: III51-55.
7. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996; 94 (suppl 9): II-332-II-336.
8. Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L, Menasche P. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation* 1996; 94 (suppl9): II-337-II-340.
9. Connold AL, Frischknecht R, Dimitrakos M, Vrbová G. The survival of embryonic cardiomyocytes transplanted into damaged host rat myocardium. *J Muscle Res Cell Motil* 1997; 18: 63-70.
10. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, Rao V, Ivanov J. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 654-661.
11. Watanabe E, Smith DM, Delcarpio JB, Sun J, Smart FW, van Meter CH, Claycomb WC. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant* 1998; 7: 239-246.
12. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE, MD. Survival, Integration, and Differentiation of Cardiomyocyte Grafts A Study in Normal and Injured Rat Hearts. *Circulation* 1999; 100: 193-202.
13. Guyton AC, Contraction and excitation of smooth muscle. *Textbook of Medical Physiology*. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1991. 87-95.
14. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Tomita S, Ohno N, Fujii T. Smooth muscle cell transplantation is better than heart cells transplantation for improvement of heart function in dilated cardiomyopathy. *Yonsei Med J* 2002; 43: 296-303
15. Matsubayashi K, Fedak PMW, Mickle DAG, Weisel RD, Ozawa T, Li R-K. Improved left ventricular aneurysm repair with bioengineered vascular smooth muscle grafts. *Circulation* 2003; 108 [S II]: II-219-II-225.
16. Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Vissjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 2002; 106: I143-50.
17. Shinoka T. Tissue engineered heart valves: autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold. *Artif Organs* 2002; 26: 402-406.
18. Kim WG, Park JK, Park YN, Hwang CM, Jo YH, Min BG, Yoon CJ, Lee TY. Tissue engineered heart valve leaflets: an effective method for seeding autologous cells on scaffolds. *Int J Artif Organs* 2000; 23: 624-628
19. Kim WG, Cho SK, Kang MC, Lee TY, Park JK. Tissue engineered heart valve leaflets-animal study. *Int J Artif Organs* 2001; 24: 642-648.
20. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS. Early in vivo experience with TE trileaflet heart valves. *Circulation* 1999; 100: I-211.
21. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE. Functional Living Trileaflet Heart Valves Grown In Vitro. *Circulation* 2000; 102: III-44-III-49.
22. Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis* 1997; 6: 1-6.
23. Niklason LE, Gao J, Abbott WM. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489-493.
24. LeBaron RG, Athanasiou KA. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional application in orthopedic materials. *Tissue Eng* 2000; 6: 85-103.
25. Simionescu TD, Lovekamp JJ, Vyavahare RN. Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissue is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. *J Heart Valve Dis* 2003; 12: 226-234.
26. Simionescu TD, Lovekamp JJ, Vyavahare RN. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: Implication for bioprosthetic heart valve degeneration. *J Heart Valve Dis* 2003; 12: 217-225.

27. Yamkach AC, Wottge HU, Muller-Hermelink HK. Transplantation of aortic and pulmonary allografts, enhanced viability of endothelial cells by cryopreservation, importance of histocompatibility. *J Card Surg* 1987; 2: 209-220.
28. den Hammer I, Hepkema B, Ebles T. HLA antibodies specific for cryopreserved heart valves homografts in children. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 417-419.
29. Clarke DR, Campbel DN, Hayward AR. Degeneration of aortic valve allografts in young recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 934-941.
30. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: S428-S432.
31. Goldstein S, Clarke DR, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of bioengineered xeno-autografts. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 1962-1969.
32. Grillo HC, McKhann CF. The acceptance and evolution of dermal homografts freed of viable cells. *Transplantation* 1964; 2: 48-59.
33. Fang CH, Robb EC, Yu GS, Alexander JW, Wadden GD. Observation on stability and contraction of composite skin grafts: xenodermis or allogenodermis with an isograft onlay. *J Burn Care Rehab* 1990; 11: 538-542.
34. Kim WG, Park JK, Lee WY. Tissue engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts. *Int J Artif Organs* 2002; 25: 791-797.
35. Walter RJ, Matsuda T, Reyes HM, Walter JM, Hanumadass M. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. *Burns* 1998; 24: 104-113.
36. Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: Human cell seeding of decellularized porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000, 19: 381-386.
37. Steinhoff G, Stock U, Karim N, et.al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. *Circulation* 2000, 102 (S III): 50-55.
38. Bader A, Steinhoff G, Strobl K. Engineering of human vascular aortic tissue based on xenogenic starter matrix. *Transplantation* 2000, 70: 4-14.
39. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Simon P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003; 26: 421-427.
40. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized aortic heart valve. *J Heart Valve Dis* 2002; 11: 463-471.
41. Samouillan V, Dandurand-Lods J, Lamure A, Maurel E, Lacabanne C, Gerosa G, Venturini A, Casarotto D, Gherardini L, Spina M. Thermal analysis characterization of aortic tissue for cardiac valve bioprotheses. *J. Biomed Mater Res* 1999; 46: 531-538.
42. Bodnar E, Olsen EGJ, Florio R, Dobrin J. Damage of porcine aortic valve tissue by the surfactant sodium dodecylsulfate. *Thorac Cardiovasc Surg* 1986, 34: 82-85.
43. Bengtson L, Radegran K, Haegerstrand A. In vitro endothelialization of commercially available heart valve bioprotheses with cultured adult human cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 8: 393-398.
44. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Bartinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation* 2002, 106: I 63-I 68.
45. Eberl T, Siedler S, Schumacher B, Zilla P, Schlaudraff K, Fasol R. In vitro experimental endothelialization of cardiac valve leaflets. *Ann Thorac Surg* 1992; 53: 487-492.
46. Wilcox WE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham J. Tissue engineering of living heart valve: biological and biomechanical assessment of an acellular, porcine valve matrix. *European Cells and Materials* 2003; 6 (suppl. 2): 8
47. Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 2002; 23: 1205-1212.
48. Feng Z, Yamato M, Akutsu T, Nakamura T, Okano T, Umezumi M. Investigation on mechanical properties of contracted collagen gels as scaffold for tissue engineering. *Artif Organs* 2003; 27: 84-91.
49. Pei M, Solchaga LA, Seidel J, Zeng L, Vunjak-Novakovic G, Caplan AI, Freed LE. Bioreactors mediated the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *FASEB J* 2002; 16: 1691-1694.