

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МАТЕРИАЛОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ИММУНОИЗОЛЯЦИИ КЛЕТОК ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск,  
Республика Беларусь

Основной целью технологии клеточной инкапсуляции является «адресная» доставка синтезированных молекул к органу-мишени. В основе метода лежит принцип клеточной иммуноизоляции: перед трансплантацией донорские клетки помещают в полупроницаемую мембрану, что позволяет защитить их от взаимодействия с иммунной системой реципиента. Подобная мембрана селективно проницаема для транспортировки нутриентов и продуктов клеточной секреции и, в то же время, относительно непроницаема для больших молекул и иммунокомпетентных клеток реципиента. Кроме того, в состав большинства иммуноизолирующих устройств входит внутренняя матрица, которая способствует компактной иммобилизации клеток внутри капсулы. Правильный выбор синтетических материалов и методов их обработки оказывает существенное влияние на эффективность функционирования полупроницаемых мембран и матричных компонентов. Современные иммуноизолирующие устройства позволяют воссоздать естественную трехмерную структуру ткани, поддерживая, таким образом, функциональную активность и жизнеспособность инкапсулированных клеток. В обзоре отражены последние достижения в области производства материалов, которые используются в создании устройств для клеточной инкапсуляции.

*Ключевые слова:* клетки, микроинкапсуляция, макроинкапсуляция, альгинат-полилизинные капсулы, трансплантация

The primary aim of the cell encapsulation technology is the “addressed” delivery of the synthesized molecules to the target organ. The principle of the cell immunoisolation is the backgrounds of this method – prior to transplantation donor cells are set in the semi-permeable membrane to protect them against their interaction with the host’s immune system. This membrane is selectively permeable to transport the nutrients and the products of the cellular secretion but relatively impermeable to larger molecules and cells of the hosts’ immune system. Besides the most immunoisolating devices have the internal matrix which contributes to the compact immobilization of cells inside the capsule. The proper choice of the synthetic materials and methods of their processing influences significantly the functioning efficacy of the semi-permeable membrane and matrix components. Up-to-date immunoisolating devices permit to reconstruct natural three-dimensional tissue environment thus maintaining functional activity and viability of the encapsulated cells. This review summarizes recent developments in the field of materials production used to make devices for cell encapsulation.

*Keywords:* cells, microencapsulation, macroencapsulation, alginate-polylysine capsules, transplantation

**Novosti Khirurgii. 2012; Vol 20 (3): 100-116**

**Comparative analysis of materials used for cells immunoisolation at transplantation**

**V.Ya. Khryshchanovich, S.I. Tretyak**

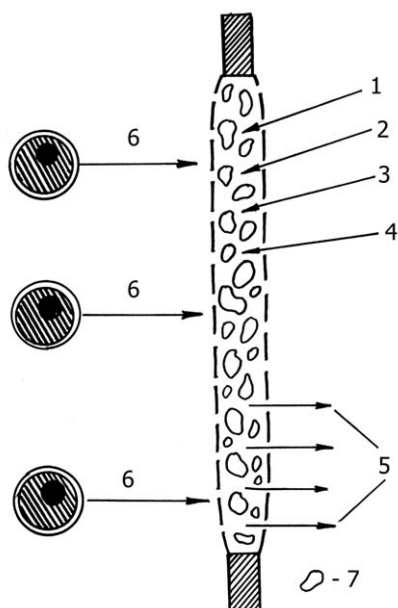
### Введение

#### *1.1. Определение понятия «иммуноизоляция»*

Отличительной особенностью клеточной терапии с использованием принципа иммуноизоляции является предтрансплантационная инкапсуляция аллогенных или ксеногенных клеток. Пересадка ксеногенных клеток осуществляется, минуя видовые барьеры, в то время как аллотрансплантация носит характер внутривидовой. Биокапсула, содержащая живые и функционально активные клетки, имплантируется в организм реципиента. Основной целью пересадки чужеродных клеток или тканей является замещение утраченных функций органов и тканей реципиента вследствие какого-либо заболевания или дегенеративных процессов.

Имуноизоляция пересаженных клеток достигается путем применения селективно проницаемых мембран, конструктивные особенности которых позволяют свободно проникать небольшим нутритивным молекулам внутрь капсулы и, в то же время, препятствуют проникновению крупных молекул и клеток иммунной системы реципиента (рис. 1). К основным принципам клеточной иммуноизоляции относятся: биосовместимость мембран, селективный транспорт, проницаемость для элементарных молекул и непроницаемость для крупных белковых молекул.

Описанная технология позволяет производить межвидовую пересадку клеток, предотвращает реакцию отторжения и не требует применения иммуносупрессивных препаратов. В связи с этим потенциальная возмож-



**Рис. 1.** Определение понятия «иммунизация». Мембрана не препятствует прохождению нутриентов и продуктов секреции инкапсулированных клеток, но непроницаема для компонентов иммунной системы (1 –  $H_2O$ , 2 –  $Na^+ Cl^-$ , 3 – глюкоза, 4 – белок, 5 – продукты секреции, 6 – лимфоцит, 7 – трансплантат)

ность использования ксеногенных клеток или тканей значительно увеличивает доступность донорского материала. В то же время, фармакологическая иммуносупрессия, обладающая высокой эффективностью в предупреждении реакции сверхострого отторжения аллотрансплантатов, оказалась неэффективной в отношении ксеногенных трансплантатов [1, 2]. Следует отметить, что даже после органной аллотрансплантации на фоне применения иммуносупрессивной терапии в половине случаев функционирование трансплантатов ограничивалось только пятилетним периодом [3]. Фетальные ткани, получаемые в результате медицинского аборта, являются наиболее оптимальным аллогенным материалом для лечения болезни Хантингтона и Паркинсона, однако на пути реализации указанной терапевтической альтернативы стоят этические барьеры и дефицит донорского сырья.

**Целью** обзора является сравнительная оценка материалов и биоинженерных технологий, используемых в настоящее время для создания имплантируемых иммуноизолирующих устройств.

*1.2. Прикладное значение технологии «адресной» доставки синтезированных молекул к органу-мишени*

Многочисленными исследованиями последних лет была доказана длительная тера-

певтическая эффективность методов клеточной инкапсуляции при целом ряде патологических состояний. До настоящего времени в клинической практике широко применялись полимерные дозаторы лекарственных веществ, имплантируемые катетеры и насосы. Подобные устройства имели определенные недостатки, связанные с риском инфицирования (имплантируемые катетеры); необходимостью частого пополнения системы лекарственным препаратом (насосы); ограниченной вместимостью аппарата и трудностями с выбором полимера (полимерные дозаторы) [4]. В то же время, весьма перспективной технологией является трансплантация живых клеток, продуцирующих биологически активные факторы с последующей их доставкой непосредственно к органу-мишени.

*1.2.1. Заболевания центральной нервной системы*

Для лечения некоторых неврологических заболеваний предпринимались попытки интрацеребральной трансплантации инкапсулированных клеток, секретирующих нейроактивные молекулы. К настоящему времени в эксперименте были получены положительные результаты после пересадки инкапсулированных клеточных трансплантатов при болезни Паркинсона [5, 6], Альцгеймера [7], Хантингтона [8] и при синдроме хронической боли [9]. Применение технологии клеточной инкапсуляции при лечении заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) имеет ряд преимуществ по сравнению с другими терапевтическими методами, поскольку системная лекарственная терапия ограничена гемато-энцефалическим барьером, в то время как технология клеточной терапии позволяет преодолеть этот барьер путем непосредственной имплантации клеток в очаг нейродегенеративного процесса – головной или спинной мозг. Кроме того, живые клетки идеально подходят для синтеза терапевтических протеинов, которые являются неустойчивыми или имеют непродолжительный период полужизни и, в связи с этим, не могут быть доставлены в активном состоянии другими способами. Последние научные достижения позволили идентифицировать большое количество специфических нейротрофических факторов, важных для развития, жизнедеятельности и функционирования нейронов. С продукцией этих факторов связаны большие надежды в лечении хронических нейродегенеративных заболеваний путем замедления или приостановки дегенерации нейронов. Применение инкапсулированных клеточных линий позволяет надеяться на длительную, безопас-

ную и достаточную секрецию таких факторов для ЦНС [7, 10].

Новой областью применения указанной технологии могут быть дегенеративные заболевания, поражающие орган зрения (например, глаукома или пигментный ретинит). Достаточно часто при этих заболеваниях повреждается сетчатка глаза, имеющая, подобно гемато-энцефалическому, гемато-ретиальный барьер, минуя который можно успешно доставлять терапевтические молекулы [11].

### 1.2.2. Замещение органных функций

Несмотря на то, что стратегия клеточной инкапсуляции неприемлема для органной трансплантации, пересадка относительно небольшого количества инкапсулированной аллогенной или ксеногенной ткани показала свои преимущества в лечении сахарного диабета и печеночной недостаточности. Несмотря на доказанную эффективность инсулинотерапии, отдаленные осложнения гипергликемии по-прежнему остаются проблемой при сахарном диабете I типа. Органная пересадка поджелудочной железы [12] и изолированных островков Лангерганса [13] позволяют успешно контролировать уровень гликемии, однако, до настоящего времени лимитирующими факторами являются потребность в иммуносупрессивной терапии и дефицит донорского материала. В то же время, при сахарном диабете интраперитонеально имплантированные инкапсулированные клетки осуществляли секрецию инсулина в соответствии с уровнем гликемии реципиента, при этом инкапсуляция позволила исключить иммуносупрессию.

С тех пор как органная трансплантация печени широко стала применяться для лечения печеночной недостаточности, временной интервал между потребностью в донорском органе и его пересадке за последние годы только увеличился. В связи с этим была изучена возможность использования гепатоцитов как для трансплантации, так и для экстракорпоральной терапии. Пересадка гепатоцитов может служить «мостом» для органной трансплантации или являться компонентом заместительной терапии хронических заболеваний печени, не требующих трансплантации целого органа. До настоящего времени в качестве стандартного места для имплантации инкапсулированных гепатоцитов использовались селезенка и брюшная полость [14]. Кроме того, эффективность технологии клеточной инкапсуляции для замещения органных функций была изучена при заболеваниях гипофиза [15], парашитовидной железы [16, 17], тимуса [18], сахарном диабете [19].

### 1.3. Конфигурация и компоненты имплантируемых устройств

Наиболее частыми геометрическими конфигурациями имплантируемых иммуноизолирующих устройств являются внутрисосудистые трубчатые или диско-образные имплантаты, пустотелые волокна, микросферы (рис. 2) [11]. Геометрия первых трех имплантируемых устройств соответствует понятию «макрокапсула» и характеризуется определенными размерами (внутренний диаметр  $\approx 0,5-1,5$  мм, длина  $\approx 1-10$  см) и вместимостью (от тысяч до миллионов клеток). Количество макрокапсул, требуемое для имплантации, зависит от их емкостных характеристик. Внутрисосудистые имплантаты представляют собой устройства, непосредственно «подключенные» к системному кровотоку реципиента по принципу артериовенозной фистулы, при этом инкапсулированные клетки расположены снаружи от трубчато-волоконного шунта. Микроинкапсуляция подразумевает иммобилизацию клеток в тонкие сферические мембраны, в результате чего образуются микросферы в виде мелких «бусинок» 0,2–0,8 мм в диаметре, каждая из которых содержит одну или несколько клеток. Требуемый терапевтический эффект достигается путем микроинкапсуляции большого количества клеток – от нескольких тысяч до миллионов.

Вне зависимости от конфигурации имплантируемые устройства состоят из трех основных компонентов: полупроницаемая мембрана, внутренний матрикс, функционирующие клетки. Эффективность клеточной инкапсуляции в немалой степени зависит от конструктивных особенностей капсулы, биосовместимости и химического состава микропористых полимерных мембран. При создании имплантируемых носителей клеток и выборе материала необходимо учитывать целый ряд важных факторов:

- использование высокоочищенных химических материалов;
- при необходимости удаления дополнительных примесей (растворителей, порообразующих веществ, преципитирующих растворов);
- в процессе создания материала беспрепятственное использование необходимых физико-химических параметров (эластичность, пористость, гидрофильность, конфигурация, прочность);
- возможность стерилизации материала и его использование в асептических условиях;
- простота пломбировки полимера при конструировании капсулы;
- отсутствие взаимодействия с биологи-

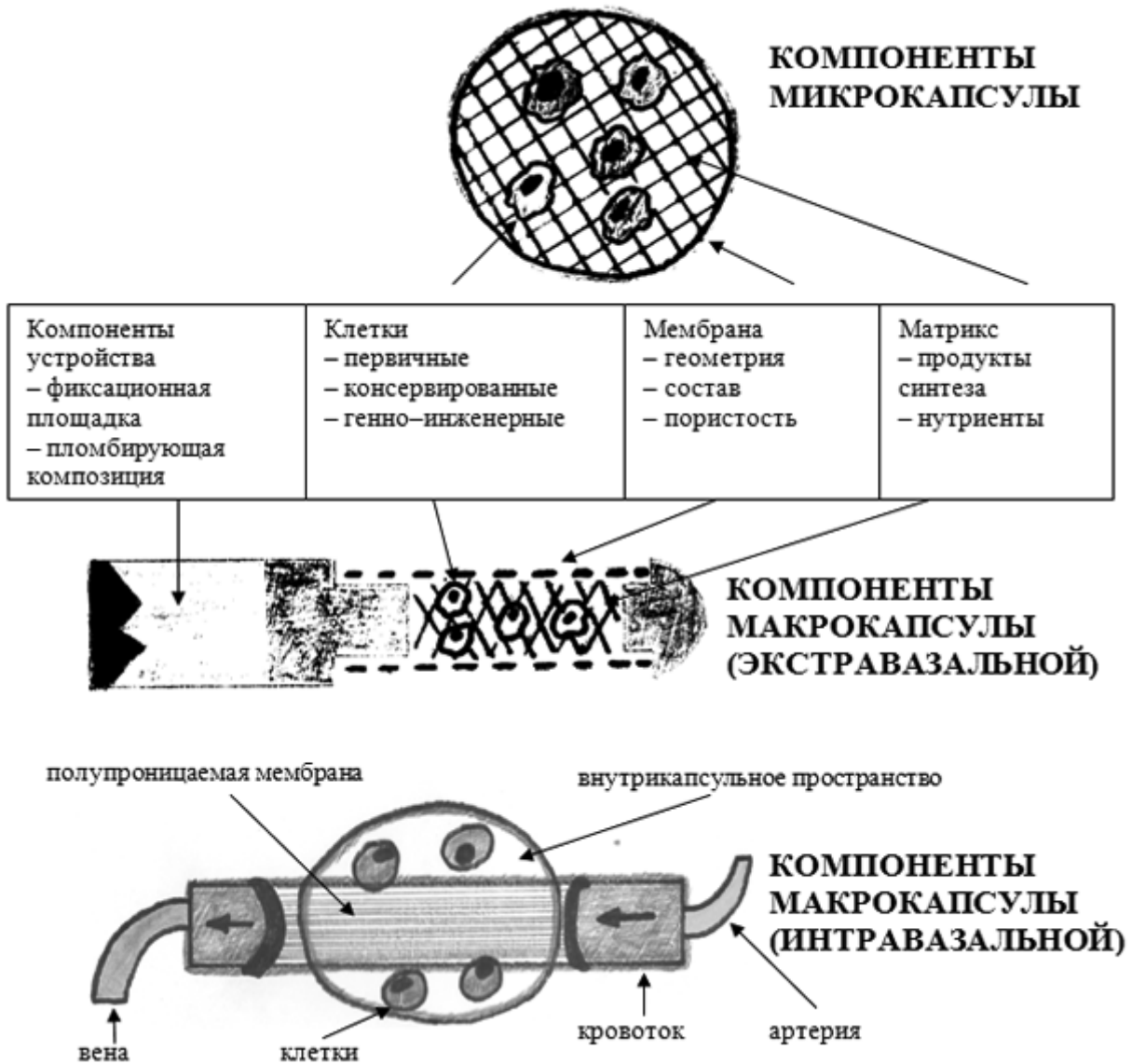


Рис. 2. Наиболее часто используемые конфигурации устройств для клеточной инкапсуляции [11]

ческими жидкостями и тканями реципиента (длительная биологическая стабильность или, наоборот, биодеградация и сохранение физико-химических параметров; атромбогенность, нетоксичность, исключение активации комплемента, а также туморогенного и тератогенного риска);

– отсутствие цитотоксичности в отношении инкапсулированных клеток.

#### Микропористые материалы и их характеристика

В выборе микропористого материала определяющими факторами являются его проницаемость, микроструктура и прочность. Частичная проницаемость мембран должна обеспечивать достаточную иммуноизоляцию клеточного трансплантата, а также беспрепятственную

диффузию необходимых нутриентов и продуктов клеточной секреции. Микроструктура мембран характеризуется строением их стенки и топографией наружной поверхности, от которой зависит степень выраженности реакции реципиента на имплантат. Прочность материала отражает его механическую устойчивость к внешнему физическому воздействию. Для изготовления микро- и макрокапсул используются гидрогелевые и синтетические полимерные материалы, перечень которых представлен в таблицах 1 (микрокапсулы) и 2 (макрокапсулы).

#### 2.1. Микропористые материалы для микроинкапсуляции

##### 2.1.1. Полиэлектролитные гидрогелевые мембраны

Гидрогели относятся к классу синтетических или природных полимерных материалов, которые набухают, но не растворяются в воде.

На протяжении многих лет гидрогели широко применяются для создания иммуноизолирующих устройств и могут служить в качестве компонентов мембраны или матрикса микрокапсул. С целью создания биоискусственных органов T.M.S. Chang [20] впервые использовал полиэлектролитные мембраны на основе гидрогеля.

Основными требованиями, которые предъявляются к материалам, используемым для микроинкапсуляции клеток, являются: биосовместимость, возможность стерилизации, длительная биологическая устойчивость, исключение агрессивных химических веществ и высоких температур в процессе их синтеза. Последнее условие является весьма существенным, поскольку создание микрокапсул сопровождается одновременной инкапсуляцией клеток. Технология изготовления микрокапсул заключается в превращении гидрогеля в биосовместимые и прозрачные микросферы, внутри просвета которых, можно наблюдать инкапсулированные клетки. При этом предпочтение следует отдавать гидрогелям природного происхождения, микросферизация которых не наносит ущерба жизнеспособности клеток.

Диффузионные характеристики микрокапсул зависят от соотношения «площадь поверхности/объем», а геометрические параметры должны соответствовать идеальной сфере [34, 58]. Изменять диффузионные и прочностные свойства микрокапсул можно посредством модификации физико-химических параметров полимера (молекулярный вес, процентное содержание твердых частиц, pH) и технологии его изготовления (степень очистки, дополнительные реагенты, однородная толщина мембраны) [60]. Самым серьезным недостатком сферических микрокапсул является их геометрическая нестабильность, которая носит необратимый характер. Важным условием для эффективного функционирования микро-

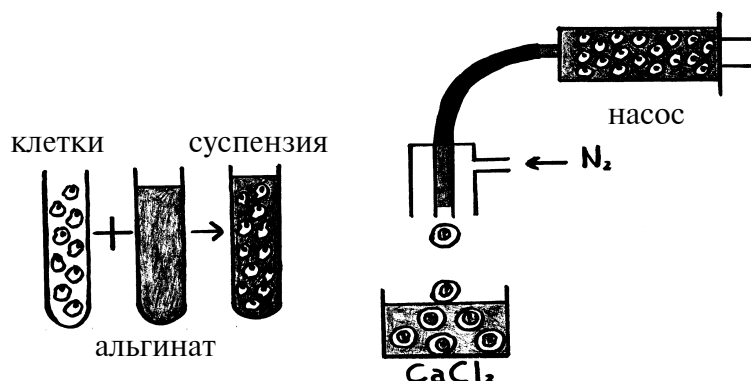
капсул является соблюдение оптимального баланса между степенью проницаемости для нутриентов (предпочтительнее использовать тонкостенные мембраны) и механической прочностью к внешним воздействиям (предпочтительнее использовать толстостенные мембраны).

В настоящее время наиболее часто используемым материалом для клеточной микроинкапсуляции является альгинат и его производные [33]. На рисунке 3 отражена стандартная методика изготовления микрокапсул на основе альгинат-геля.

Альгинат — отрицательно-заряженный полисахаридный гидрогель, полученный из морских водорослей, который может использоваться изолированно или в соединении с позитивно-заряженным полилизинном с формированием альгинат-полилизинных полиэлектролитных комплексов. Кроме того, ионизированный альгинат может связываться с двухвалентными катионами кальция и бария, для чего клетки помещают в 1-3% раствор альгината, затем на  $\approx 5$  минут микросферы вносят в емкость с 1%  $\text{CaCl}_2$ . После этого, с целью формирования внешнего защитного слоя, микросферы погружают в емкость с 0,05-0,1% раствором поли-L-лизина [27].

Описанную методику впервые апробировали F. Lim и A.M. Sun [23] при трансплантации островковых клеток крысам. Через 2-3 недели после имплантации микрокапсул наступала компенсация стрептозотоцинового (STZ) сахарного диабета. Непродолжительный функциональный эффект пересадки авторы объясняют развитием ответной реакции реципиента на инородное тело, обусловленной низкой биосовместимостью капсул. Другими экспериментальными исследованиями на модели сахарного диабета у мышей была показана возможность длительной (от нескольких месяцев до одного года), управляемой нормо-

Рис. 3. Методика инкапсуляции клеток в Ca-связанные альгинатные микросферы [11]



гликемии после трансплантации микроинкапсулированных островковых клеток без применения иммуносупрессии [31] (таблица 1).

В клинических условиях технология микроинкапсуляции на основе альгината, содержащего большое количество гулурановой кислоты, впервые была изучена P. Soon-Shiong et al. при интраперитонеальной аллотрансплантации островковых клеток одному пациенту с сахарным диабетом I типа. На фоне иммуносупрессивной терапии на протяжении 9 месяцев была достигнута инсулинонезависимость, а показатели гликемии находились в физиологическом диапазоне [19].

Микроинкапсуляция с использованием альгината показала также свою эффективность при пересадке гепатоцитов, адреналовой и тиреоидной ткани, гипофизарной недостаточности. V. Dixit et al. [26] и другие авторы внутрибрюшинно имплантировали гепатоциты, инкапсулированные в альгинат-полилизин-альгинат, Gunn-крысам (экспериментальная модель врожденного дисметаболического заболевания печени). В отдаленном периоде наблюдения после пересадки гепатоцитов отмечалось значительное снижение сывороточного билирубина по сравнению с контрольной группой животных. Альгинат-полилизин-альгинат микроинкапсуляция генетически модифицированных клеток мышей, секретирующих

человеческий гормон роста (hGH) [18, 19], позволила значительно увеличить параметры роста у карликовых мышей в отдаленном посттрансплантационном периоде. После извлечения из организма реципиента альгинат-полилизин-альгинат микрокапсулы содержали >60% жизнеспособных клеток, которые сохраняли гормональную секрецию в течение 6 и более месяцев.

В настоящее время большинство научных исследований направлено на достижение длительной биосовместимости и механической стабильности микрокапсул. Вместе с тем, было показано, что микрокапсулы, содержащие клетки, разрушаются быстрее, нежели пустые микрокапсулы. При этом причиной разрушения и гибели клеток [26] являются изменения ионизации и pH-среды во внутрикапсульном пространстве. Подобные химические сдвиги, наряду с механическим стрессом, вызванным интраперитонеальной имплантацией микрокапсул, предположительно приводят к ослаблению защитного слоя полиэлектролитной мембраны. С целью улучшения физико-химических параметров альгинатных микрокапсул было предложено большое количество методологических подходов: формирование ковалентных перекрестных связей в пределах внешнего защитного слоя, связывание альгината с барьером вместо кальция (для повышения

Таблица 1

<b>Материалы, используемые для микроинкапсуляции клеток</b>			
Полимер	Тип инкапсулируемых клеток	Экспериментальная модель	Литературная ссылка
НЕМА-ММА и другие полиакрилаты	PC-12	in vitro	[5]
	СНО, фибробласты человека	in vitro	[21]
	островковые клетки крысы HepG2	in vitro крысы	[5, 21] [22]
альгинат- полилизин- PEI	островковые клетки крысы	крысы с сахарным диабетом	[23]
альгинат- полилизин- альгинат	mGH-C2C12 миобласты	мыши	[24]
	островковые клетки крысы	крысы	[25]
	островковые клетки человека	брюшная полость человека	[19]
	гепатоциты крысы	Gunn крысы	[26]
	гепатоциты крысы	брюшная полость крысы	[20]
телячьи хромаффинные клетки надпочечника	PC-12	головной мозг грызунов	[27, 28]
		головной мозг приматов	[27]
		крысы	[29]
Ва-альгинат	островковые клетки крысы	мыши с STZ-сахарным диабетом	[30]
	свиные островковые клетки	мыши с STZ-сахарным диабетом	[31]
агароза	островковые клетки мышей B6	мыши с STZ-сахарным диабетом	[32, 33]
	островковые клетки хомяков	NOD мыши	[34]
агароза /PSS/PB/	PC-12	морские свинки	[33]
СМС-комплекс	островковые клетки крысы	мыши с STZ-сахарным диабетом	[35]
	MIN 6	in vitro	[36]
PVA- фотополимер	островковые клетки мышей	брюшная полость мышей	[37]

<b>Материалы, используемые для макроинкапсуляции клеток</b>			
Полимер	Тип инкапсулируемых клеток	Экспериментальная модель	Ссылка
Пустотелые волокна PAN/PVC	<i>ЦНС</i>		
	клетки шванномы мышей	желудочки головного мозга крыс	[38]
	ВНК–CNTF	головной мозг крыс и обезьян	[8, 39]
	ВНК–hNGF	головной мозг крыс и обезьян	[7, 40]
	PC–12	стриатум обезьян	
	бычьи клетки надпочечника	субарахноидальное пространство крыс	[6]
	клетки гипофиза человека, овец, крыс		
	бычьи хромоаффинные клетки надпочечника	желудочки головного мозга крыс	[9]
	<i>Сахарный диабет</i>	субарахноидальное пространство человека	[15]
	свиные, бычьи, собачьи островковые клетки	крысы с STZ–сахарным диабетом	[41]
	островковые клетки крысы	мыши с STZ–сахарным диабетом	[42]
	свиные островковые клетки	подвздошная область у собак	[43]
	островковые клетки человека	мышцы бедра человека	[44]
	C2C12–EPO мышей	мышцы спины мышей	[45]
	PES	ВНК–CNTF	поясничная область человека
свиные островковые клетки		мышцы с STZ–сахарным диабетом	[47]
гепатоциты крысы		брыжейка крысы	[48]
островковые клетки		брюшная полость крысы	[49]
островковые клетки крысы		крысы с сахарным диабетом	[50]
свиные островковые клетки		крысы с сахарным диабетом	
RAJI (линия h–лимфобластов)			
MOPC–31C (клетки плазмоцитомы мышей)			[51]
панкреатическая ткань хомяков		крысы с STZ–сахарным диабетом	[52]
свиная фетальная ткань печени		крысы с STZ–сахарным диабетом	[48]
гепатоциты крысы		большой сальник LEW крысы	
		брыжейка крысы	
		крысы	
		крысы	[36, 53–55, 56]
«Bag–type» макрокапсулы поливинилалкоголь– pHEMA Плоские капсулы PTFE		фетальная ткань легкого крысы	Lewis крысы
	человеческая паратиреоидная ткань	человек	[59]

стабильности) [30], добавление альгинатного покрытия в качестве внешнего слоя альгинат-поли-L-лизиновых капсул (для повышения биосовместимости), определение оптимальной вязкости и степени очистки, использование модифицированных поли-L-лизиновых PEG-трансплантатов, удаление митогенных фракций путем электрофореза, оптимальное соотношение гулуруновой и маннуруновой кислот при получении альгината [19].

Другим природным полисахаридом, производным морских водорослей, который используется для изготовления микрокапсул, является агароза [32]. До недавнего времени применение агарозы ограничивалось рамками биологических исследований и культивирования клеток. К основным преимуществам агарозы следует отнести высокую стабильность *in vivo* и возможность получения высокоочищенного материала из нативного сырья. Агароза относится к разряду термолabile полимеров, которые при повышении температуры

превращаются в жидкость, а при охлаждении становятся гелем. В отличие от альгината, агароза, как основной компонент микрокапсул, не обладает длительными иммуноизолирующими свойствами, а, следовательно, не может служить материалом для инкапсуляции ксенотрансплантатов с долгосрочной функциональной перспективой. По данным Н. Iwata, выживаемость ксеногенных островковых клеток в организме мышей–реципиентов составила 11–51 дней, в то время как, аллогенные островки Лангерганса сохраняли жизнеспособность до нескольких сотен дней [32]. Более эффективной для ксеногенной трансплантации оказалась модифицированная многослойная микрокапсула на основе агарозы и полистиринсульфоновой кислоты (PSSa) [35, 36], внешняя оболочка которой состоит из полибрена и карбоксиметилцеллюлозы (СМС). Связываясь с белками, PSSa блокирует активность системы комплемента, что позволяет продлить длительность функционирования ксеногенных

островковых клеток крыс в организме мышей-реципиентов с сахарным диабетом [35]. С целью устранения проблем, связанных с деформацией микрокапсул при имплантации, K. Jain et al. была предложена технология изготовления агарозных микросфер больших размеров (6–8 мм) путем вспенивания гидрогеля или добавления коллагена [11]. Имплантация инкапсулированных подобным образом островковых клеток крыс в брюшную полость мышей с сахарным диабетом привела к длительной нормогликемии (> 170 дней).

### 2.1.2. Мембраны для микроинкапсуляции из термопласта

Для улучшения параметров биосовместимости и стабильности при изготовлении микрокапсул, M.V. Sefton et al. и другими авторами [21, 26] были изучены синтетические нерастворимые в воде полимеры-полиакрилаты: PMMA, НЕМА-ММА и Eudragit®. Потенциальным недостатком таких полимеров является низкая проницаемость для водо-растворимых нутриентов, а также необходимость поддержания жизнеспособности клеток в присутствии гидрофобных растворителей. Процесс формирования подобных микрокапсул заключается в смешивании раствора НЕМА-ММА и полиэтиленгликоля, содержащего клетки. Несмотря на определенные успехи, полученные *in vitro* и *in vivo* при инкапсуляции островковых, СНО [21] и РС-12 [5] клеток, биомеханические свойства гидрофобных полимерных микрокапсул изучены недостаточно.

Принимая во внимание существенный научный прогресс в области клеточной микроинкапсуляции, наиболее серьезной проблемой, сдерживающей ее широкое применение, является развитие фиброза мембраны, снижение ее диффузионных способностей для нутриентов и, как следствие, гибель клеток. Другим лимитирующим фактором является необходимость использования большого количества микрокапсул для достижения требуемого терапевтического эффекта: при сахарном диабете — до сотни тысяч инкапсулированных островковых клеток [29]; в то время как, интрацеребральная имплантация микрокапсул при заболеваниях ЦНС может нарушать отток ликвора из боковых желудочков головного мозга [28].

### 2.2. Синтетические мембраны для макроинкапсуляции из термопласта

W.L. Chick et al. [1] впервые подтвердил возможность успешного применения синтетических волокон для иммуноизоляции при пересадке β-клеток грызунам с сахарным диабетом. Трудности, связанные с применением гидрогелей для макроинкапсуляции, обуслов-

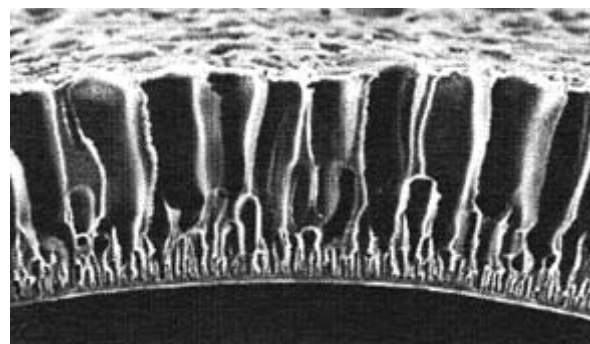
лены невозможностью изготовления больших по размеру и, в то же время, стабильных и герметичных макрокапсул. В связи с этим в процессе получения макрокапсул чаще всего используются водо-нерастворимые синтетические полимеры из термопласта, обладающие большей стабильностью *in vivo*. В сравнении с микрокапсулами, экстравазальные макрокапсулы являются более прочными и устойчивыми к деформации, однако их геометрические параметры негативно сказываются на диффузионных свойствах [51].

В настоящее время для макроинкапсуляции чаще всего используется водо-нерастворимый ко-полимер полиакрилонитрила и поливинил хлорида (PAN-PVC), который впервые был синтезирован A.S. Michaels путем фазовой инверсии [38]. Опытные образцы материала содержат ≈ 40–60% мономера и имеют средний молекулярный вес 30 000–200 000 г/моль. В своих исследованиях большинство авторов использовали модификацию PAN-PVC-мембраны (XM50®, Amicon), полученную в результате фазовой инверсии. Мембрана имеет двухслойную асимметричную структуру (рис. 4) и представлена селективно-проницаемым внутренним защитным слоем и так называемым «анизотропным» или трабекулярным слоем. Микроскопически стенка таких макрокапсул состоит из множества пустотелых волокон, тесно прилежащих друг к другу, которые после стерилизации заполняются клетками и пломбируются (рис. 5). В некоторых случаях процесс синтеза полимера можно сочетать с одновременной инкапсуляцией клеток [28].

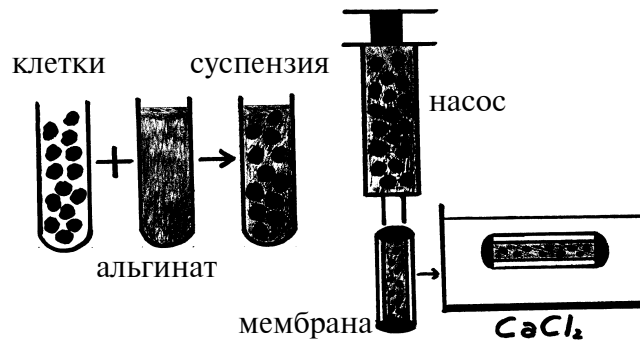
#### 2.2.1. PAN-PVC-мембраны

Внутрисосудистые перфузионные устройства на основе PAN-PVC-мембран, разработанные компанией W.R. Grace and Co., впервые были апробированы при лечении сахарного диабета. Внешняя оболочка макрокапсул подобного типа представлена акриловой тка-

Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия стандартной пустотелой волокнистой мембраны, применяемой для инкапсуляции клеток [11]







**Рис. 5. Методика инкапсуляции клеток в пустотелую волокнистую мембрану с использованием Са-связанной альгинатной матрицы [11]**

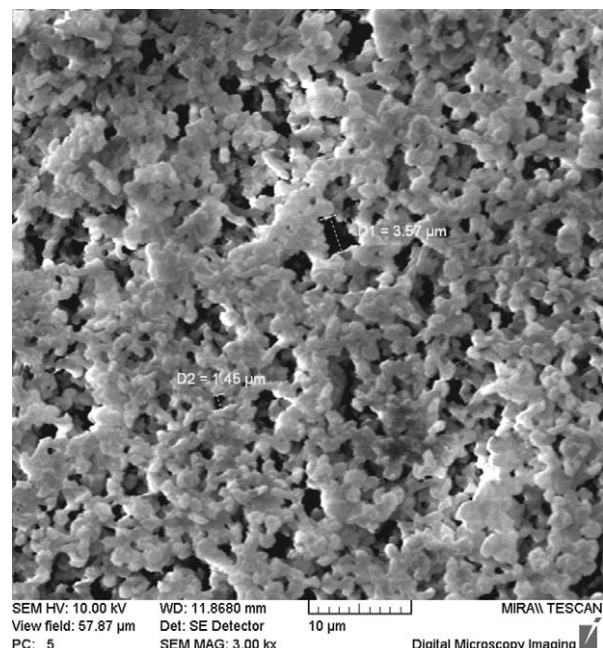
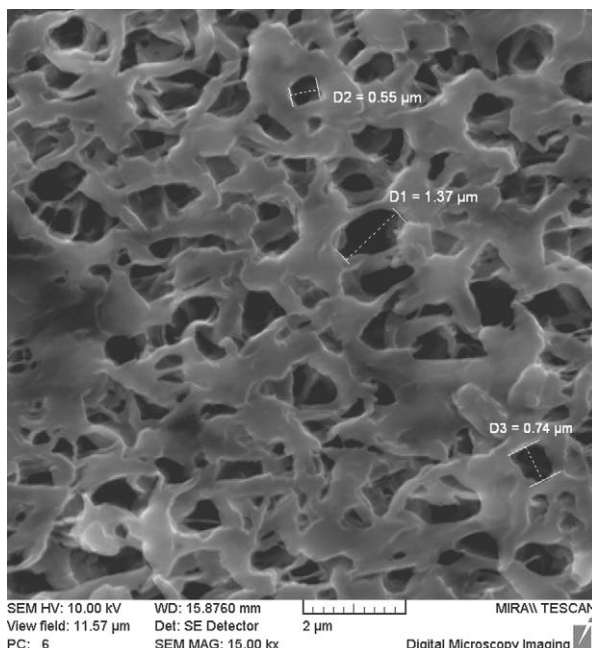
нию, внутри которой содержатся клетки, расположенные на поверхности цилиндрической PAN-PVC-мембраны (внутренний диаметр 5,7 мм). Включение макрокапсулы в системный кровоток реципиента осуществляется посредством трубчатых эксплантатов из политетрафторэтилена (PTFE) в виде артерио-венозной фистулы. Основными преимуществами таких гемо-циркулирующих устройств являются непосредственная близость нутриентов к инкапсулированным клеткам, быстрое и непосредственное высвобождение секретируемых молекул в кровеносное русло, защищенность микропористой мембраны от воспалительного ответа со стороны окружающих тканей. В эксперименте на собаках с тяжелым сахарным диабетом, индуцированным тотальной панкреатэктомией, после имплантации перфузируемых капсул с  $\beta$ -клетками полная инсули-

нонезависимость наблюдалась в течение 7 недель [58]. Существующая вероятность разрыва макрокапсулы, травматичность и сложность хирургического вмешательства, непродолжительность функционирования шунта, потенциальный риск тромбообразования и развития артериальной непроходимости являются серьезными аргументами, лимитирующими широкое применение внутрисосудистых перфузионных устройств [1].

#### 2.2.1.1. Применение PAN-PVC-мембран при заболеваниях ЦНС

Имплантация PAN-PVC-макрокапсул, которые содержали генетически модифицированные клетки, секретирующие нейротрансмиттеры и нейротрофические факторы, позволила получить положительный поведенческий и нейропротективный эффект на модели заболеваний Альцгеймера (крысы, обезьяны) [7,

**Рис. 6. Микроструктура PVDF (слева) и полиамидной мембран (собственные данные)**



40], Хантингтона (крысы, обезьяны) [8, 39], Паркинсона (грызуны, обезьяны) [6].

Клиническими исследованиями P. Aebischer et al. [28] была доказана эффективность применения PAN-PVC-инкапсулированных ксеногенных (бычьих) хромоаффинных клеток надпочечника в лечении синдрома хронической боли у девяти онкологических пациентов с терминальной стадией заболевания. Макрокапсулы длиной 5 см имплантировали в субарахноидальное пространство поясничного отдела спинного мозга, не применяя иммуносупрессию, что позволило уменьшить интенсивность болевого синдрома и сократить потребление наркотических анальгетиков.

#### *2.2.1.2. Применение PAN-PVC-мембран при сахарном диабете*

По данным P.E. Lacy et al., трансплантация PAN-PVC-инкапсулированных островковых клеток крысы мышам с сахарным диабетом приводила к длительной нормогликемии, реакция отторжения при этом отсутствовала [43]. В последующем D. Scharp и P.E. Lacy были проведены предварительные клинические испытания по пересадке человеческих островковых клеток девяти пациентам с сахарным диабетом I и II типа [44]. Длина капсул составляла 1,5 см, просвет которых был заполнен альгинатным матриксом с  $\beta$ -клетками. Имплантированные подкожно капсулы извлекали через две недели для морфологического исследования, по результатам которого жизнеспособность островковых клеток составила 90-95%. Вместе с тем, по мнению исследователей, для инкапсуляции большого объема  $\beta$ -клеток с целью достижения терапевтического эффекта требуется значительное количество (до нескольких метров) синтетических волокон, что ограничивает практическое применение описанной технологии [56]. В настоящее время авторы занимаются разработкой более вместительных интраабдоминальных имплантируемых устройств.

#### *2.2.1.3. Применение PAN-PVC-мембран при гипопитуитаризме*

W.C. Nemer et al. в эксперименте на крысах была изучена возможность интрацеребральной (в желудочки головного мозга) имплантации инкапсулированной в пустотелые синтетические волокна Amicon XM-50 ткани гипофиза. Крысам после гипопизэктомии производили пересадку инкапсулированных клеток (основная группа) и пустых капсул (контрольная группа), при этом в основной группе животных было отмечено статистически достоверное увеличение роста-весовых параметров [15].

#### *2.2.2. PES, PU, PTFE и PP мембраны*

Помимо имплантируемых PAN-PVC-мембран, определенные успехи были достигнуты в результате применения полиэфирсульфона (PES, производитель Akzo Nobel Faser, AG, Wuppertal, Germany) для клеточной инкапсуляции при лечении бокового амиотрофического склероза (БАС). БАС, известный как болезнь Lou Gehrig, характеризуется прогрессирующей дегенерацией моторных нейронов и, как следствие, мышечной дисфункцией с возможным летальным исходом. В экспериментальных условиях на модели БАС были подтверждены нейропротективные свойства нейротрофического фактора CNTF [46], однако, в клинической практике введение больших доз CNTF приводило к побочным эффектам без видимого клинического улучшения. Неэффективность системного введения препарата объясняется весьма коротким периодом его полужизни, в связи с чем, по мнению P. Aebischer et al. [6], более оправданным является прямой путь попадания CNTF в церебро-спинальную жидкость. Авторами было проведено пилотное исследование на 10 пациентах, страдающих БАС, которым имплантировали инкапсулированные CNTF-секретирующие клетки почек молодых хомячков (ВНК) или миообласти мышшей ( $C_2C_{12}$ ). Имплантацию PES-макрокапсул осуществляли в поясничное интракратальное пространство, длина их составляла 5 см, наружный диаметр – 0,6 мм.

Кроме того, PES-мембраны применялись при лечении анемии, обусловленной хронической почечной недостаточностью [45]. До настоящего времени эффективным методом лечения анемии считалось многократное инъекционное введение гликопротеинового гормона эритропоэтина (EPO). P. Aebischer et al. [18] разработали альтернативный терапевтический метод, который заключается в подкожной имплантации PES-макрокапсул с  $C_2C_{12}$  миообластами мышшей, секретирующими человеческий EPO. В эксперименте на мышах было отмечено значительное повышение уровня гематокрита [24].

Полиуретановые синтетические волокна применялись для инкапсуляции островковых клеток [50] и ткани гипофиза [16]. В последние годы полиуретан нашел достаточно широкое применение в качестве медицинского имплантируемого материала при изготовлении катетеров, сосудистых протезов, искусственного сердца. Для синтеза этого сложного ко-полимера используются полигликоль и изоцианаты. Группой исследователей под руководством G.J. Zondervan [11] были синтезированы микропористые полиуретановые полупроницаемые

мембраны путем химического соединения смеси линолевой кислоты и линейного полиэфируретана с дикумил пероксидом. Как показали предварительные результаты инкапсуляции островковых клеток крыс, наилучшей иммунопротекцией и проницаемостью для глюкозы и инсулина обладают мембраны с диаметром пор 0,3-0,7 мкм. Другой группой ученых во главе с R.S. Ward [50] были разработаны непористые эластичные полиуретановые мембраны, свойства которых были изучены при инкапсуляции свиных островковых клеток и пересадке мышам с сахарным диабетом. Результаты исследования подтвердили возможность сохранения жизнеспособности и функционирования имплантированных клеток в течение 4-7 недель. Одним из преимуществ таких мембран является сравнительно, с PAN-PVC-мембранами, небольшая толщина стенки (7-10 мкм [11]; 20-30 мкм [50]). Поскольку степень проницаемости обратно пропорциональна толщине стенки, можно предположить, что более тонкие мембраны будут способствовать ускорению диффузии нутриентов и инсулина. В то же время, серьезной проблемой, связанной с применением полиуретанов, является их ферментативное разрушение *in vivo* — от формирования поверхностных микротрещин до полной биодеградации материала. Возможным решением указанной проблемы может быть совершенствование технологии химического синтеза [11].

Сотрудниками корпорации Baxter Healthcare были разработаны микропористые PTFE-мембраны, стимулирующие процесс неоваскуляризации на их внешней поверхности [57]. Для изготовления Boggs® и TheraCyte™ биокапсул авторы использовали двухслойную PTFE-мембрану, при этом диаметр пор ее наружного слоя составлял 5 мкм, что позволило в 80-100 раз улучшить процесс перикапсулярного неоангиогенеза; внутренний слой капсулы с диаметром пор 0,45 мкм обеспечивал клеточную иммунопротекцию и диффузионное питание трансплантата. Инкапсулированную таким образом аутологичную и аллогенную паратиреоидную ткань имплантировали подкожно 9 пациентам с гипопаратиреозом [16]. Функциональный эффект после пересадки в течение 2-4 недель был отмечен у всех пациентов, еще у двух он прослеживался на протяжении 13-14 месяцев. По мнению авторов, основным фактором, лимитирующим период функционирования паратиреоидного трансплантата, является перикапсулярный фиброз.

Результаты собственных клинических исследований указывают на возможность длительного (более 12 месяцев) сохранения жизнеспособности и функциональной активности

и функциональной активности PVDF-макроинкапсулированных аллогенных паратиреоцитов, помещенных в просвет глубокой бедренной (6) или внутренней подвздошной (1) артерии, без применения иммуносупрессии [59]. В качестве клеточного трансплантата были использованы предварительно культивированные паратиреоидные железы 5 живых неродственных доноров, страдающих вторичным гиперпаратиреозом. У всех семи реципиентов была отмечена положительная клинико-лабораторная динамика: купирование или снижение интенсивности симптомов гипокальциемии, повышение уровня сывороточного кальция и паратгормона до нормальных или субнормальных показателей. В другом нашем исследовании в экспериментальных и клинических условиях была установлена возможность долговременного (2 и более года) сохранения жизнеспособности и функционирования ксеногенной островковой ткани в сосудистом русле реципиента без иммуносупрессивной терапии. Пересадка макроинкапсулированной в полиамидный или нейлоновый контейнер культуры  $\beta$ -клеток привела к выраженному антидиабетическому эффекту, снижению инсулинопотребности на 60-75%, купированию гипо- и гипергликемических состояний, улучшению качества жизни [55].

При пересадке печеночной ткани использовались микропористые полипропиленовые (PP) фибро-волоконистые мембраны. После трансплантации в большой сальник крысы длительность функционирования инкапсулированных фрагментов свиной печени была значительно выше, нежели неинкапсулированных (28 дней vs. 5 дней) [52].

### *2.2.3. Синтетические гидрогели и гидрогель-содержащие мембраны*

S.H. Ronel et al. [11] разработали макропористую мембрану на основе PHEMA, из которой была сконструирована прямоугольная, содержащая клетки, капсула, с запломбированными краями. Однако, каких-либо сведений о результатах применения описываемого устройства *in vivo* авторы не приводят. Изготовление макрокапсул из гидрогелей затруднено в связи с их механической нестабильностью и невозможностью герметизации, поэтому создание нового класса макрокапсул базируется на применении композитных гидрогелей, в состав которых входят поливинилалкоголь (PVA-гидрогель) в качестве иммуноизолирующего компонента и армирующий волоконистый материал [36, 53]. Преимуществами PVA-гидрогелей являются низкая протеин-связывающая активность, высокая гидрофильность и

эластичность, удовлетворительная биосовместимость. Кроме того, плотность PVA-гелей легко изменяется при помощи химических или лучевых воздействий, что позволяет создавать мембраны с широким диапазоном проницаемости. Процесс создания таких иммуноизолирующих устройств заключается в погружении волокнистой трубки из полиэстера в раствор PVA, содержащий глутаральдегид. Как показали предварительные шестимесячные исследования на крысах, имплантированные в брюшную полость PVA-макрокапсулы вызывают развитие хронической воспалительной реакции и через несколько месяцев утрачивают проницаемость [54]. Другими авторами была доказана возможность эффективного функционирования в течение 1-3 месяцев инкапсулированных островковых клеток в организме крыс-реципиентов с сахарным диабетом без применения иммуносупрессии [37].

### 2.3. Изготовление мембран

Большинство пустотелых фибро-волоконных мембран для клеточной инкапсуляции синтезируют путем фазовой инверсии с применением ротационной технологии, предложенной I. Cabasso [11]. В процессе фазовой инверсии используются три основных компонента: полимер, растворитель и вода. Полимер прокачивается через коаксиальный носик насоса, содержащий растворитель, в емкость с водой, в результате чего формируются пустотелые синтетические волокна. Полученные таким образом имплантируемые мембраны в зависимости от диаметра пор делятся на ультра- (1-100 нм) и микрофильтрационные (0,05-10 мкм). Толщина стенки ультра-фильтрационных (УФ) мембран составляет 0,1-1 мкм, а для их производства чаще всего используются такие полимеры, как полисульфон, полиэфирсульфон, поливинилиден фторид, полиакрилонитрил, ацетат целлюлозы, полиамид, полиэфирамид. В качестве растворителя при изготовлении полимерных мембран используются диметилформамид, диметилсульфоксид (DMSO) или диметилацетамид. Стандартная концентрация полимера составляет 10-20 весовых процентов.

Гидрофобные мембраны для клеточной инкапсуляции, указанные в таблице 2 (PTFE, PP, PVDF), получают путем нагревания полимерного порошка до формирования солидной пористой структуры, не допуская ее расплавления. Другим способом изготовления мембран является растягивание полимерной прозрачной пленки в поперечном направлении, в результате чего на месте разрывов материала формируются неправильной формы поры. От-

личительной особенностью таких мембран является превосходная химическая и термическая устойчивость, но гидрофобные свойства материала требуют предварительного увлажнения пор жидкостями с низким поверхностным натяжением [48, 57, 58].

### 2.4. Мембранный транспорт

В настоящее время, стремительно развивающиеся современные технологии производства, включая фазовую инверсию, позволяют создавать микропористые мембраны с различными стандартизированными диффузионными и конвективными свойствами [33]. Конвективный транспорт зависит от трансмембранного градиента давления, в то время как, диффузионный – от трансмембранного градиента концентрации. Функционирование большинства иммуноизолирующих устройств, в том числе микрокапсул и экстравазальных макрокапсул, основано на диффузионном принципе. Интравазальные макрокапсулы чаще всего сочетают оба принципа мембранного транспорта – конвективный и диффузионный. В основе стратегии при создании иммуноизолирующих устройств лежит изготовление высокоселективных мембран, обладающих хорошей диффузионной проницаемостью для низкомолекулярных нутриентов и препятствующую прохождению высокомолекулярных иммуноглобулинов. Предположительно, основным фактором, лимитирующим жизнеспособность клеток, является недостаточная оксигенация трансплантата. В то же время, увеличение степени проницаемости мембран негативно сказывается на их иммуноизолирующих свойствах. Дополнительного изучения требуют вопросы, касающиеся диапазона проницаемости мембран и степени иммуноизоляции, необходимых для сохранения жизнеспособности клеток. Кроме того, до настоящего времени не изучены основные механизмы, лежащие в основе иммунного отторжения инкапсулированных трансплантатов. Имеющиеся в арсенале мембраны, применяемые для макроинкапсуляции, препятствуют проникновению иммуноглобулинов массой  $\geq 100\ 000$  дальтон, в то время как, в процессе иммунного ответа могут принимать участие более мелкие молекулы [58].

### 2.5. Структура мембран

Структурное многообразие мембран достигается благодаря применению технологии фазовой инверсии (примеры изображены на рисунках 4, 6). Внешняя поверхность мембран может быть гладкой, бугристой или пористой. При имплантации полимерных тканей с гладкой поверхностью наблюдается слабовыраженная фиброзная реакция, напротив, мембраны

с пористой фенестрированной поверхностью приводят к развитию выраженной инфильтрации их стенок тканями реципиента. Структура мембранной стенки может быть представлена в виде пены или трабекул.

Морфологическое строение мембран оказывает существенное влияние на жизнеспособность клеток при имплантации в мягкие ткани реципиента. Р.Е. Ласу и соавторы использовали два типа PAN-PVC-мембран, отличающихся только по микроструктуре их внешней поверхности [43]: тип I – неровная, пористая, позволяющая клеткам реципиента проникать внутрь стенки; тип II – более гладкая и менее пористая. В пустотелые PAN-PVC-мембраны были заключены островковые клетки крыс, которые имплантировали мышам с сахарным диабетом. Несмотря на одинаковую биосовместимость капсул, жизнеспособность клеток и их функциональная активность после пересадки в брюшную полость и подкожную клетчатку была выше при использовании мембран I типа.

#### *2.6. Механическая устойчивость мембран*

С точки зрения механической устойчивости, мембрана практически во всех случаях является наиболее слабым компонентом имплантируемых устройств. В частности, целостность пустотелых волокон нарушается при сгибании или скручивании. По данным R.P. Lanza, через 5-7 месяцев после имплантации капсул в мягкие ткани собак  $\approx 80-90\%$  из них были разрушены [42]. В процессе изготовления полупроницаемых мембран всегда существует риск повреждения чрезвычайно тонкого и хрупкого внешнего слоя, который определяет эффективность иммуноизоляции. Мембрана и других компоненты имплантируемых устройств должны обладать достаточной механической устойчивостью в процессе их имплантации и эксплуатации (в случае необходимости), а также во время повседневной физической активности.

Выбор синтетического материала, метод изготовления, пористость, молекулярный вес полимера, размер имплантата и его форма, место и продолжительность имплантации, ответная реакция тканей реципиента являются факторами, определяющими прочность и сроки функционирования имплантируемого устройства [47]. К сожалению, в большинстве случаев проницаемость мембран обратно пропорциональна их механической стабильности.

В настоящее время основными направлениями по улучшению качества мембран, используемых для клеточной инкапсуляции, являются: модификация их поверхностного слоя

или создание новых материалов с целью повышения биосовместимости; увеличение трансмембранной проницаемости; индукция перикапсулярного неоангиогенеза. M.S. Shoichet [11] усовершенствовал поверхность PAN-PVC-мембраны путем добавления полиэтиленоксида (PEO), что позволило на 40% уменьшить пристеночную абсорбцию белков. Создание мембраны AN 69 Hospal позволило улучшить проницаемость для инсулина в условиях поверхностной адгезии протеинов [49].

### **Свойства матрикса**

Помимо мембран, для создания иммуноизолирующих устройств, как правило, используется внутренняя матрица, которая выполняет роль микроокружения клеток тотчас после их инкапсуляции. Естественной окружающей средой клеток является сложный комплекс, состоящий из внеклеточных белков и полисахаридов, называемый внеклеточным матриксом (ЕСМ). ЕСМ формируют три основных соединительнотканых белка – коллаген, эластин, фибронектин, которые соединяясь между собой, образуют гликозаминогликановые цепи. Локальный синтез указанных компонентов ЕСМ осуществляется специальными клетками. Первоначально воспринимаемому в качестве инертной структуры, ЕСМ в настоящее время отводится существенная роль в осуществлении регуляции функции клеток и дифференцированной фенотипической экспрессии. Как было показано, секреторная и метаболическая активность клеток, их созревание, миграция, пролиферация, поляризация происходят при непосредственном участии ЕСМ.

В основе стратегии, направленной на создание матричных компонентов иммуноизолирующих устройств, лежит реконструкция естественной трехмерной структуры ткани, поддерживающей жизнеспособность и функционирование клеток. Благодаря наличию подобного внутреннего матрикса, осуществляющего опорную функцию, клетки внутри устройства сохраняют дисперсионное состояние. В противном случае наблюдается агрегация клеток с формированием крупных ( $>100$  мкм) кластеров с последующим развитием центрального некроза. Биохимическая функция матрикса заключается в стимулировании клеточной секреции компонентов собственного ЕСМ, а также воздействии на скорость пролиферации и фенотипической дифференцировки клеток.

В экспериментальных исследованиях на мышах с сахарным диабетом Р.Е. Ласу [43] обосновал необходимость использования внутрен-

него матрикса. Пересадка инкапсулированных островковых клеток, не иммобилизованных в матриксе, приводила к кратковременной (7-14 дней) нормогликемии. Как показало гистологическое исследование трансплантата, островковые клетки представляли собой крупные очаги некроза, по периферии которых отмечалось небольшое количество жизнеспособных клеток. В аналогичных экспериментах применение матрикса на основе альгинат-гидрогеля для инкапсуляции островковых клеток позволило увеличить период нормогликемии до 60 дней.

С целью воспроизведения физиологического внеклеточного матрикса в условиях инкапсулирующих устройств были изучены как синтетические, так и природные материалы [47]. Выбор матричного материала обусловлен целым рядом важных факторов: его способностью поддерживать жизнеспособность и функциональную активность инкапсулированных клеток; совместимостью с клеточным трансплантатом, тканями реципиента, микропористой мембраной [58]; типом имплантируемых клеток (поскольку некоторые виды клеток не нуждаются в матричной «подушке», либо обладают способностью самостоятельно и быстро ее воспроизводить); долговечность ЕСМ и имплантата должны быть сопоставимы; не препятствовать диффузии нутриентов и секреторных молекул; принимать участие в регуляции процесса клеточной пролиферации [3, 11].

### *3.1. Матричные материалы*

#### *3.1.1. Гидрогели и гидроколлоиды*

Традиционно для иммобилизации инкапсулированных клеток в качестве матрицы применялись производные природных гидрогелей [27]. Коллагены являются весьма важным компонентом естественного внеклеточного матрикса и могут служить материалом для создания ЕСМ при культивировании и инкапсуляции клеток. Существование коллагена возможно в нескольких формах: растворимые коллагеновые гидрогели (Vitrogen 100, Celtrix Laboratories, Palo Alto, CA); коллагеновые губки; нитевидный глютаральдегид-связанный коллаген. Коллагеновые гидрогели нашли широкое применение в области создания «искусственной печени» при микро- [26] и макроинкапсуляции [14] гепатоцитов. Сохранение функциональной активности гепатоцитов наблюдалось при их культивировании в 3-D коллагеновой сэндвич-панели, в то время как, монослойная культура клеток быстро утрачивала функциональную способность [48]. Кроме того, коллаген применяли в качестве матрикса для CNTF-секретирующих клеток при лечении болезни Альцгеймера [7].

Использование Matrigel® (Collaborative Research, Bedford, MA), как сложного внеклеточного матрикса, при микроинкапсуляции гепатоцитов и других типов клеток [27] существенно продлевало жизнеспособность клеточных трансплантатов [26]. Са-связанный альгинат с успехом применялся для иммобилизации макроинкапсулированных бычьих хромаффинных клеток надпочечника при лечении синдрома хронической боли [27, 41]. В асептических условиях получали суспензию хромаффинных клеток в 2% стерильном растворе альгината (Protan Biopolymer; Drammen, Норвегия). Как и другие растворы полимеров, контактирующие с клетками, раствор альгината должен иметь физиологические показатели pH и изотоническое состояние. Суспензию клеток и альгината путем инъекционного введения помещают в просвет макрокапсулы, края отверстия которой герметизируют при помощи температурного воздействия или погружения в раствор PAN-PVC/DMSO. После этого имплантат на 5 минут вносят в емкость с 1% CaCl<sub>2</sub>. Подобным образом производят иммобилизацию и островковых клеток [43].

Хитозан является природным полисахаридом, состоящим из мономеров глюкозамина – производных хитина. Коммерческое производство хитозана осуществляют путем частичного деацетилирования хитина, выделенного из скелета креветок и крабов. Хитозан растворим в слабых кислых растворах (pH < 6,3), имеет положительный заряд и может связываться с отрицательно заряженными ионами, образуя гидрогель. Связанные формы хитозана нашли свое применение в качестве биоматериала при лечении ран, в пластической хирургии и имплантационной стоматологии, для иммобилизации микробных клеток. В то же время, вследствие высокой pH-чувствительности, применение хитозана для иммобилизации клеток млекопитающих было не столь успешным. Повышение pH среды (> 6,3) приводило к преципитации хитозана, что способствовало продлению жизнеспособности и функциональной активности PC-12 допамин-продуцирующих клеток феохромоцитомы крысы, инкапсулированных в пустотелые синтетические волокна [40]. Преципитацию хитозана можно осуществлять до непосредственного контакта с клетками путем смешивания с физиологическим буферным раствором, либо после инкапсуляции путем инкубации капсул в физиологическом солевом растворе при pH 7,4. Следует отметить, что в настоящее время активно изучается возможность применения PC-12 клеток для лечения болезни Паркинсона.

### 3.1.2. Синтетические матричные материалы

Сравнительно недавно в качестве матрикса для клеточной инкапсуляции был исследован новый класс синтетических материалов на основе пенного поливинилалкоголя, который имеет целый ряд потенциальных преимуществ перед гидрогелевыми и гидроколлоидными матрицами: наличие осязаемой поверхности позволяет депонировать секретируемый клетками ЕСМ; контролируемый рост клеток (стабилизация их количества, предсказуемость терапевтического эффекта) [22, 25, 37]; улучшение диффузии нутриентов благодаря сообщающимся пористым каналам; ограничение размера клеточных кластеров, обусловленное размером пор (предупреждение центрального некроза). В настоящее время синтетический PVA-полимер достаточно широко применяется в реконструктивной и сердечнососудистой хирургии. Под воздействием паров формальдегида раствор PVA превращается в пену, которая представляет собой нерастворимую в воде губку. Сравнительный анализ результатов *in vitro* и *in vivo* инкапсуляции PC-12 клеток с использованием двух подложек (PVA vs. хитозан) указал на неоспоримые преимущества PVA-матрикса — сохранение большего количества жизнеспособных клеток и более чем шестикратное увеличение секреции нейротрансмиттеров. Подобные результаты были получены при PVA-иммобилизации C2C12 миобластов мышей, секретирующих нейротрофический фактор, которые имплантировали в интракраниальное пространство овцам с БАС [11].

### Биологическая совместимость

Уже к 1996 году ≈ 11 миллионов пациентов, проживающих в США, являлись носителями медицинских имплантируемых устройств. Успешные терапевтические результаты в области имплантационной медицины были достигнуты, во многом, благодаря высокой биосовместимости используемых синтетических материалов. Трудности возникающие при использовании иммуноизолирующих устройств, наряду с проблемой биосовместимости (реакция организма реципиента на инородное тело), обусловлены иммунным ответом реципиента на инкапсулированные клетки, облигатные антигены и потенциально антигенные молекулы [31]. Развитие реакции инородного тела сопровождается формированием вокруг имплантата аваскулярного слоя клеток, который не только препятствует диффузии нутриентов, но также потребляет их, конкурируя с инкапсулированными клетками. В основе

улучшения биосовместимости материалов, предназначенных для клеточной инкапсуляции, лежит химическая и структурная модификация полимеров, направленная на придание им биоинертных свойств в организме реципиента.

### Заключение

Иммуноизоляция тканевых и клеточных трансплантатов при помощи полупроницаемых мембран показала клиническую эффективность при лечении таких заболеваний, как сахарный диабет I типа, болезнь Альцгеймера, гипопаратиреоз. Было установлено, что такие клеточные трансплантаты, как иммуноизолированные панкреатические островки Лангерганса и гепатоциты, при их стимуляции могут длительно сохранять свою секреторную активность *in vitro* и/или *in vivo*. Однако до настоящего времени реакция иммунного отторжения клеточного трансплантата и перикапсулярный фиброз все еще остаются труднопреодолимой проблемой. Несмотря на определенные положительные результаты клеточной алло- и ксенотрансплантации с использованием полимерных макро- и микрокапсул, основными лимитирующими факторами по-прежнему являются механическая и биохимическая нестабильность капсул, несовместимость с клеточным материалом и тканями реципиента, широко варьирующий диаметр пор, непредсказуемость терапевтического эффекта. В связи с этим, для решения указанных проблем необходимо продолжить изучение фундаментальных механизмов взаимодействия в сложной системе «реципиент-имплантат-клетка».

### ЛИТЕРАТУРА

1. Lanza R. P. Transplantation of encapsulated cells and tissues / R. P. Lanza, W. L. Chick // *Surgery*. — 1997. — Vol. 121. — P. 1–9.
2. Schuurman H. J. Pathology of xenograft rejection: a commentary / H. J. Schuurman, J. Cheng, T. Lam // *Xenotransplantation*. — 2003. — Vol. 10, N 4. — P. 293–299.
3. Microencapsulation of cells producing therapeutic proteins; optimizing cell growth and secretion / A. M. Rokstad [et al.] // *Cell Transplant*. — 2002. — Vol. 11. — P. 313–324.
4. Development of a parathyroid hormone-controlled release system as a potential surgical treatment for hypoparathyroidism / T. Anthony [et al.] // *Journal of Pediatric Surgery*. — 2005. — Vol. 40. — P. 81–85.
5. Roberts T. Dopamine secretion by PC12 cells microencapsulated in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate copolymer / T. Roberts, U. De Boni, M. V. Sefton // *Biomaterials*. — 1996. — Vol. 1996. — P. 267–275.

6. Aebischer P. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells / P. Aebischer, M. Goddard, A. Signore // *Exp. Neurol.* – 1994. – Vol. 126. – P. 151–158.
7. Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue : fundamentals, technologies and applications / H. Zimmermann [et al.] // *Appl. Phys. A-Mater. Sci. Process.* – 2007. – Vol. 89. – P. 909–922.
8. Implants of encapsulated human CNTF-producing broblasts prevent behavioral decits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington’s disease / D. Emerich [et al.] // *J. Neurosci.* – 1996. – Vol. 16. – P. 5168–5181.
9. Transplants of immunologically isolated xenogeneic chromafn cells provide a long-term source of pain-reducing neuroactive substances / J. Sagen [et al.] // *J. Neurosci.* – 1993. – Vol. 13. – P. 2415–2423.
10. Delivery of neurotrophic factors to the CNS using encapsulated cells : developing treatments for neurodegenerative diseases / J. P. Hammang [et al.] // *Cell Transplant.* – 1995. – Vol. 4. – Suppl. 1. – S27–28.
11. Li R. H. Materials for immunisolated cell transplantation / R. H. Li // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 1998. – Vol. 33. – P. 87–109.
12. Robertson R. Pancreas transplantation as therapy for diabetes mellitus / R. Robertson, D. Sutherland // *Ann. Rev. Med.* – 1992. – Vol. 43. – P. 395–415.
13. Results of our rst nine intraportal islet allografts in type I, insulin-dependent diabetic patients / D. Scharp [et al.] // *Transplantation.* – 1991. – Vol. 51. – P. 76–85.
14. Jauregui H. Use of mammalian liver cells for articial liver support / H. Jauregui, N. Chowdhury, J. Chowdhury // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 353–367.
15. Pituitary hollow ber units in vivo and vitro / W. C. Hymer [et al.] // *Neuroendocrinology.* – 1981. – Vol. 32. – P. 350–354.
16. Allotransplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results / I. Nawrot [et al.] // *Transplantation.* – 2007. – Vol. 83, N 6. – P. 734–740.
17. Denitive treatment of persistent hypoparathyroidism: parathyroid allotransplant / N. Torregosa [et al.] // *Cir. Esp.* – 2004. – Vol. 75. – P. 97.
18. Christenson L. Encapsulated thymic epithelial cells as a potential treatment for immunodeficiencies / L. Christenson, P. Aebischer, P. Galletti // *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* – 1988. – Vol. 32. – P. 134.
19. Insulin independence in a type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation / P. Soon-Shiong [et al.] // *Lancet.* – 1994. – Vol. 343. – P. 950–951.
20. Chang T. M. S. Therapeutic uses of microencapsulated genetically engineered cells / T. M. S. Chang, S. Prakash // *Mol. Med. Today.* – 1998. – Vol. 4. – P. 221–227.
21. Sefton M. V. Microencapsulation of mammalian cells in a water-insoluble polyacrylate by coextrusion and interfacial precipitation / M. V. Sefton, R. M. Dawson, R. L. Broughton // *Biotechnol. Bioeng.* – 1987. – Vol. 29. – P. 1135–1143.
22. Babensee J. Allogeneic and xenogeneic transplantation of HEMA-MMA microencapsulated hepatoma cells into rats / J. Babensee, M. Sefton // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 56.
23. Lim F. Microencapsulated islets as bioarticial endocrine pancreas / F. Lim, A. M. Sun // *Science.* – 1980. – Vol. 210. – P. 908–910.
24. Correction of the growth defect in dwarf mice with nonautologous microencapsulated myoblasts – an alternate approach to somatic gene therapy / A. Al-Hendy [et al.] // *Hum. Gene Ther.* – 1995. – Vol. 6. – P. 165–175.
25. De Haan B. J. Factors influencing insulin secretion from encapsulated islets / B. J. De Haan, M. M. Faas, P. De Vos // *Cell Transplant.* – 2003. – Vol. 12. – P. 617–625.
26. Dixit V. Transplantation of microencapsulated hepatocytes for liver function replacement / V. Dixit, G. Gitnick // *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* – 1995. – Vol. 7. – P. 343–357.
27. Winn S. R. Hydrogel applications for encapsulated cellular transplants / S. R. Winn, P. A. Tresco // *Methods Neurosci.* – 1994. – Vol. 21. – P. 387–402.
28. Aebischer P. Cell encapsulation for the nervous system / P. Aebischer, M. Goddard, P. A. Tresco ; ed. M. F. A. Goosen // *Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization.* – CRC Press, Boca Raton FL, 1993. – P. 7–41.
29. An overview on the development of a bio-artificial pancreas as a treatment of insulin-dependent diabetes mellitus / A. I. Silva [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2006. – Vol. 26. – P. 181–222.
30. Barium-alginate beads for immunisolated transplantation of islets of Langerhans / T. Zekorn [et al.] // *Transplant Proc.* – 1992. – Vol. 24. – P. 937–939.
31. Lacik I. Polymer chemistry in diabetes treatment by encapsulated islets of Langerhans : Review to 2006 / I. Lacik // *Aust. J. Chem.* – 2006. – Vol. 59. – P. 508–524.
32. Agarose for a bioarticial pancreas / H. Iwata [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1992. – Vol. 26. – P. 967–977.
33. Uludag H. Technology of mammalian cell encapsulation / H. Uludag, P. De Vos, P. A. Tresco // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2000. – Vol. 42. – P. 29–64.
34. Comparative studies of in vitro and in vivo function of threedifferent shaped bioarticial pancreases made of agarosehydrogel / H. Yang [et al.] // *Biomaterials.* – 1994. – Vol. 15. – P. 113–119.
35. A newly developed three-layer agarose microcapsule for a promising biohybrid articial pancreas: rat to mouse xenotransplantation / T. Tun [et al.] // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 59–63.
36. Application of a novel B cell line MIN6 to a mesh-reinforced polyvinyl alcohol hydrogel tube and three-layer agarose microcapsules: an in vitro study / H. Hayashi [et al.] // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 65–69.
37. The use of photocrosslinkable polyvinyl alcohol in the immunisolation of pancreatic islets / H. Iwata [et al.] // *Transplant. Proc.* – 1990. – Vol. 22. – P. 797–799.
38. Cheung S. Effect of molecular weight exclusion of polysulfone bres on macroencapsulated pig islet xe-



- nograft function in diabetic mice / S. Cheung, J. Tai, W. Tze // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 55.
39. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease / D. Emerich [et al.] // *Nature.* – 1997. – Vol. 386. – P. 395–399.
40. Implants of polymer-encapsulated human NGF-secreting cells in the nonhuman primate: rescue and sprouting of degenerating cholinergic basal forebrain neurons / D. Emerich [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 1994. – Vol. 349. – P. 148–164.
41. Immunisolated xenogeneic chromafin cell therapy for chronic pain / E. Buchser [et al.] // *Anesthesiology.* – 1996. – Vol. 85. – P. 1005–1012.
42. Lanza R. Xenogeneic humoral response to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers / R. Lanza, A. Beyer, W. Chick // *Transplantation.* – 1994. – Vol. 57. – P. 1371–1375.
43. Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets / P. E. Lacy [et al.] // *Science.* – 1991. – Vol. 254. – P. 1782–1784.
44. Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with Type I or Type II diabetes in nondiabetic control subjects / D. Scharp [et al.] // *Diabetes.* – 1994. – Vol. 43. – P. 1167–1170.
45. Continuous delivery of erythropoietin in mice using encapsulated genetically engineered cell lines / N. Deglon [et al.] // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 52.
46. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients / P. Aebischer [et al.] // *Nature Medicine.* – 1996. – Vol. 2.
47. Narang A. S. Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation / A. S. Narang, R. I. Mahato // *Pharmacol. Rev.* – 2006. – Vol. 58. – P. 194–243.
48. Yang M. B. Hollow fibers for hepatocyte encapsulation and transplantation: studies of survival and function in rats / M. B. Yang, J. P. Vacanti, D. E. Ingber // *Cell Transplant.* – 1994. – Vol. 3. – P. 373–385.
49. Influence of corona surface treatment on the properties of an artificial membrane used for Langerhans islets encapsulation: permeability and biocompatibility studies / L. Kessler [et al.] // *Biomaterials.* – 1995. – Vol. 16. – P. 185–191.
50. Development of a hybrid artificial pancreas with a dense polyurethane membrane / R. S. Ward [et al.] // *ASAIO J.* – 1993. – Vol. 39. – P. 261–267.
51. Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets / A. Omer [et al.] // *Transplantation.* – 2005. – Vol. 79. – P. 52–58.
52. Xenogeneic (pig to rat) fetal liver fragment transplantation using macrocapsules for immunoisolation / K. Takebe [et al.] // *Cell Transplant.* – 1996. – Vol. 5. – P. 31–33.
53. Encapsulated cell technology : from research to market / G. Orive [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 382–387.
54. De Vos P Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets / P. De Vos, K. Tatkiewicz // *Diabetologia.* – 2002. – Vol. 45. – P. 159–173.
55. Long-term normalization of diabetes mellitus after xenotransplantation of fetal pancreatic islet cells into the blood stream without immunosuppressive therapy / A. V. Prochorov [et al.] // *Transplantation Proceedings.* – 2004. – Vol. 36. – P. 2855–2856.
56. Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys / R. B. Elliott [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2005. – Vol. 37. – P. 466–469.
57. Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in nonimmunosuppressed humans / A. Tibell [et al.] // *Cell Transplant.* – 2001. – Vol. 10. – P. 591.
58. Colton C.K. Implantable biohybrid artificial organs / C.K. Colton // *Cell Transplant.* – 1995. – Vol. 4. – P. 415–436.
59. Khryshchanovich V. Parathyroid cells allotransplantation in severe postsurgical hypoparathyroidism / V. Khryshchanovich // *Polish J Surgery.* – 2011. – Supl. 1. – S. 35.
60. Multilayer nanoencapsulation. New approach for immune protection of human pancreatic islets / S. Krol [et al.] // *Nano Lett.* – 2006. – Vol. 6. – P. 1933–1939.

#### Адрес для корреспонденции

220116, Республика Беларусь, г. Минск,  
пр-т Дзержинского, д. 83,  
Белорусский государственный  
медицинский университет,  
2-я кафедра хирургических болезней,  
тел. раб.: +375 172 87-86-52,  
тел. моб.: +375 29 624-55-78,  
e-mail: vladimirkh77@mail.ru,  
Хрыщанович Владимир Янович

#### Сведения об авторах

Хрыщанович В.Я., к.м.н., доцент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Третьяк С.И., д.м.н., профессор, заведующий 2-й кафедрой хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Поступила 12.03.2012 г.