

### ● مقاله مروری کد مقاله: ۰۲۳

بعد از مطالعه این مقاله خوانندگان محترم قادر خواهند بود:

- با اجزاء و ساختار کبد زیست مصنوعی آشنا شوند.
- نحوه عملکرد انواع سیستم‌های کبد زیست مصنوعی را درک نمایند.
- اهمیت مطالعه و تحقیق در خصوص افزایش کارایی کبد زیست مصنوعی را دریابند.
- مشکلات و چالش‌های طراحی سیستم‌های کبد زیست مصنوعی را بشناسند.
- تأثیر علوم مختلف و ارتباط آنها را بر پیشرفت سیستم‌های حمایتی کبد دریابند.

## پیشرفت‌ها در اجزاء کبد زیست مصنوعی: بیورآکتور، ماتریکس و منبع سلولی

### چکیده

بعضی از بیماری‌ها و اختلالات کبدی در صورت عدم درمان منجر به مرگ می‌گردند و در حال حاضر به دلیل پیچیدگی‌های عملکرد کبد تنها راه درمان برای بسیاری از این بیماران پیوند کبد می‌باشد. استفاده از کبد زیست مصنوعی، به صورت یک روش جهت نگهداری بیماران مطرح است. مطالعات و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه اجزاء مختلف BAL<sup>۱</sup> برای افزایش کارآمدی این سیستم‌ها صورت گرفته است. این مقاله به معرفی و بررسی پیشرفت‌ها در زمینه سه جزء اصلی BAL؛ یعنی بیورآکتور، ماتریکس و منبع سلولی می‌پردازد.

واژه‌گان کلیدی: کبد زیست مصنوعی، نقصان کبدی، بیورآکتور، ماتریکس خارج سلولی،

منبع سلولی

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۲۰

تاریخ اصلاح نهایی: ۸۷/۱۰/۲۹

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۵/۷

نشانی الکترونیکی:

Dhpfurgery@gmail.com

دکتر حبیب‌اله پیروی\*۱

سیدروح‌اله موسوی زاده ۲

۱- استاد جراحی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، رئیس مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت

۲- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت

\* نشانی نویسنده مسئول: تهران- ونجک- خ پروانه- بیمارستان طالقانی- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت

تلفن: ۲۲۴۳۹۸۴۸

فاکس: ۲۲۴۳۹۸۴۷

## مقدمه

بیماری‌ها و نقایص کبدی سالانه جان هزاران نفر را در سراسر دنیا می‌گیرد و بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی<sup>۲</sup>، سیروز کبدی تا سال ۲۰۱۵ نهمین عامل مرگ در جهان غرب خواهد بود. در حال حاضر مرگ‌ومیر ناشی از بیماری FHF<sup>۳</sup> بیش از ۹۰ درصد می‌باشد. همچنین مرگ‌ومیر بیماران مبتلا به ACLF<sup>۴</sup> بین ۵۰ تا ۹۰ درصد است و هر ساله در آمریکا، نقایص کبدی به تنهایی جان ۳۰۰۰۰ بیمار را می‌گیرد (۱ و ۲ و ۳).

کبد عضو اصلی کارکرد متابولیکی و سنتزی می‌باشد و بیش از ۵۰۰ عملکرد مختلف را بر عهده دارد؛ بطوریکه جایگزین نمودن این عملکردها با روش‌های مختلف درمانی مشکل می‌نماید؛ به همین دلیل در حال حاضر تنها راه درمان برای بسیاری از بیماری‌های کبدی که منجر به سیروز و فاز انتهایی نقص کبدی می‌گردند؛ پیوند کبد می‌باشد. در ایران اولین پیوند کبد در سال ۱۹۹۳ در بیمارستان نمازی شیراز توسط تیم جراحان ایرانی به صورت موفقیت‌آمیزی انجام گردید. ولی استفاده از این روش به دلیل کمبوددهندگان عضو و نیاز به استفاده طولانی مدت از داروهای جلوگیری از رد پیوند<sup>۵</sup> که با خطرات جانبی همراه است؛ محدود گردیده است [۴ و ۵]. بر اساس اطلاعات حاصل از پایگاه داده‌های UNOS<sup>۶</sup> در سال ۲۰۰۶، ۶۱۳۴ پیوند کبد انجام شده است؛ اما در مارس ۲۰۰۷، ۱۶۹۹۵ نفر کاندید در فهرست انتظار قرار داشتند و بسیاری از این بیماران آنقدر زنده نمی‌مانند تا برای آنها کبد مناسب جهت پیوند فراهم گردد. همچنین در مورد بیماران مبتلا به بیماری مزمن کبد، برای بازسازی بافت کبد و بهبود عملکرد آن لازم است تا مدت زمان کافی از کارکرد کبد حمایت شود [۵ و ۶]. به دلیل این محدودیت‌ها جستجو برای یافتن درمان‌های جایگزین پیوند کامل عضو، موضوع مهمی در زمینه تحقیقات پیوند می‌باشد [۵].

یک سیستم حمایتی ایده‌آل برای کبد باید بتواند عملکردهای عمده کبد از جمله سم‌زدایی، سنتز و تنظیم متابولیکی را پشتیبانی نماید [۶]. تاکنون سیستم‌های حمایتی گوناگونی برای کبد مورد تحقیق قرار گرفته‌اند؛ مانند: cross-circulation, hem

charcoal, whole liver perfusion, adsorption, plasmapheresis, hemodialysis, hemoperfusion, total body washout و غیره [۳].

اگر چه آزمایش‌های بالینی زیادی نشان داده است که این سیستم‌های سم‌زدایی می‌توانند باعث بهبود هشیاری در بعضی از بیماران گردد؛ ولی بعضی از این سیستم‌ها مثل plasmapheresis که شامل جدا کردن و جایگزین نمودن پلاسماهای بیماران است؛ از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. بسیاری از این سیستم‌ها به دلیل ناکارآمدی در بهبود بعضی از اختلالات متابولیکی و یا جلوگیری از عوارض ناشی از نقصان کبدی مثل عفونت یا فشار خون وریدی، کارآیی محدودی دارند و هیچکدام از این روش‌های درمانی نتوانسته است میزان بقا را در بیماران افزایش دهد؛ بنابراین از لحاظ بالینی قابل قبول نمی‌باشند [۳ و ۴ و ۶].

عملکردهای پیچیده کبد شامل سنتز، سم‌زدایی و تنظیم متابولیکی؛ تنها با استفاده از هپاتوسیت‌های زنده قابل جایگزین است [۷]. توسعه سیستم‌های حمایتی BAL که حاوی هپاتوسیت‌های زنده می‌باشد؛ یک پیشرفت مهم در زمینه درمان بیماران مبتلا به نقایص کبدی است؛ زیرا این سیستم‌ها دارای عملکردهای متابولیکی و سنتزی بالقوه کبد می‌باشند و همچنین می‌توانند مواد مغذی و فاکتورهای ضروری اختصاصی که برای بازسازی بافت کبد لازم است؛ فراهم نمایند [۳]. به طور کلی سیستم BAL از به هم آمیختن هپاتوسیت‌های ابتدایی یا سلول‌هایی با عملکرد هپاتوسیت‌ها در داخل یک بیورآکتور تشکیل شده است؛ به طوری که سلول‌ها در بیورآکتور تثبیت، کشت و القا شده تا عملکردهای کبدی را با فرآوری خون یا پلاسماهای بیماران مبتلا به نقص کبدی انجام دهد [۷ و ۸]. توسعه BAL در دهه ۱۹۸۰ آغاز گردید و در حال حاضر این سیستم‌های حمایتی بیولوژیکی، بیشترین امید را برای پشتیبانی عملکرد کبد ایجاد نمودند [۹]. از زمان انتشار اولین نتیجه در سال ۱۹۸۷ تاکنون، طراحی و نتایج بیش از ۳۰ نوع سیستم BAL برای درمان بیماران مبتلا به نقصان کبدی گزارش گردیده است [۱۰]. کارآیی این سیستم‌ها بستگی به نوع و خصوصیات عملکردی سلول‌های به کار رفته و اجزاء سلولی، طراحی بیورآکتور یا اتاقک کشت هپاتوسیت‌ها، تثبیت فنوتیپ سلول‌ها و میزان توده زنده و کارآمدی آن دارد [۱۱ و ۱۲ و ۱۳]. در این مقاله به معرفی بیورآکتورها و تکامل آنها و بررسی ساختار ماتریکس نگهدارنده

- ۲- World Health Organization (WHO)
- ۳- Fulminate hepatic failure
- ۴- acute-on chronic liver failure
- ۵- Immunosuppressive Drug
- ۶- United Network for Organ Sharing

در این طرح اولیه، بیورآکتور شامل یک ستون است که واجد رشته‌های مویرگی توخالی می‌باشد و خون بیماران درون آن گردش می‌کند و هپاتوسیت‌ها در داخل یا خارج از مویرگ‌ها قرار دارد [۱۲] و [۱۹]. در حال حاضر نیز اکثر سیستم‌های BAL از تکنولوژی رشته‌های توخالی استفاده می‌نمایند؛ ولی ابداعات در زمینه‌های مهندسی و زیست مواد به توسعه بسیاری از سیستم‌های پرفیوژن کمک نموده است [۲۰]. بر اساس این پیشرفت‌ها انواع مختلفی از بیورآکتورها طراحی و ساخته شده‌اند. این بیورآکتورها بر اساس طراحی‌شان در چهار گروه طبقه‌بندی می‌گردند: رشته توخالی<sup>۹</sup>، کشت تک لایه ورقه‌ای یکنواخت<sup>۱۰</sup>، چمبر یا کپسول معلق<sup>۱۱</sup>، داربست یا لایه پرفیوژن<sup>۱۲</sup> (جدول ۱) [۸] و [۲۱]. طراحی بیورآکتورها برای نگهداری هپاتوسیت‌ها، اکسیژن‌دهی خون و حذف توکسین‌ها متفاوت می‌باشد. اغلب آنها دارای یک سمت دیالیز و بعضی واجد ستون فیلتراسیون ذغال فعال<sup>۱۳</sup> می‌باشند [۱۲].

جدول ۱: طبقه‌بندی بیورآکتورها بر اساس طراحی: طراحی کلی بیورآکتورها به چهار گروه طبقه‌بندی می‌گردد که بر این اساس سیستم‌های مختلفی ساخته شده که آرایش و پیکربندی این سیستم‌ها نمایش داده شده است.

### ماتریکس خارج سلولی

در اغلب سیستم‌های BAL، هپاتوسیت‌ها به وسیله یک غشاء نیمه تراوا از پلازما جدا شده است. طراحی مناسب زیست مواد و غشاءها به عنوان ماتریکس خارج سلولی در BAL، اثر قابل توجهی بر پایداری و میزان عملکرد هپاتوسیت‌ها، پایداری مکانیکی و توزیع مناسب تراکم هپاتوسیت‌ها دارد و پرفیوژن و گرادیان‌های انتشار را در درون بیورآکتور تسهیل می‌نماید [۹] و [۱۳] و [۲۲]. هپاتوسیت‌ها در محیط کشت معلق به مرور زمان عملکردهای متمایز خود را از دست داده و بیش از چند ساعت نمی‌توانند زنده بمانند؛ بنابراین حفظ عملکرد و افزایش کارایی هپاتوسیت در بیورآکتور، نیازمند یک بستر مناسب می‌باشد [۱۳] و [۱۹]. همچنین نشان داده شده است که کشت هپاتوسیت‌ها در ماتریکس‌های سه بعدی نسبت به سوبستراهای دو بعدی اثر بارزتری بر حفظ عملکرد متمایز هپاتوسیت‌ها و بقاء آنها

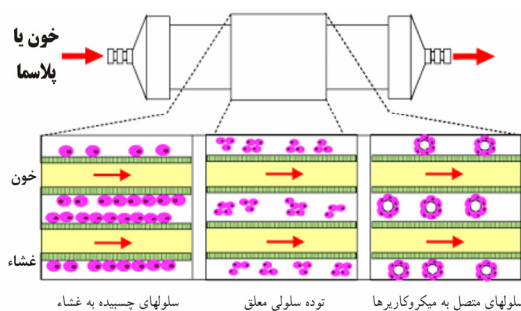
هپاتوسیت‌ها در داخل بیورآکتورها و همچنین توسعه انواع منابع سلولی برای استفاده در سیستم‌های BAL می‌پردازیم.

### طراحی بیورآکتور

به طور کلی شاخص‌های اساسی برای طراحی بیورآکتورها عبارتند از: نسبت جریان خون بر روی توده سلولی به میزان فعالیت فیزیولوژیکی آن، روش اکسیژن‌دهی و انتقال مواد مغذی، انتقال دو طرفه مواد بین هپاتوسیت‌ها و پلاسمای خون بیمار، جدایی از سیستم ایمنی، نوع سلول استفاده شده و حداقل مقدار لازم زیست توده<sup>۷</sup> برای انجام وظایف کبد [۲] و [۹] و [۱۴] و [۱۵].

برای ساخت یک کبد زیست مصنوعی کارآمد از لحاظ بالینی، نیاز به طراحی مناسب قسمت اتاقت کشت سلولی با حداکثر تراکم سلولی می‌باشد و برای دستیابی به این منظور باید از حداقل تورش در توزیع اکسیژن و مواد مغذی در تمام فضای بیورآکتور اطمینان حاصل گردد [۱۶] و [۱۷]. دستیابی به کشت کافی سلول و فراهم نمودن مواد مغذی و اکسیژن برای سلول‌ها به راحتی امکان پذیر نیست و بستگی به پیکربندی و عملکرد بیورآکتور و چگونگی انتقال مواد به داخل و خارج داربست داخلی بیورآکتور دارد [۱۸].

در بیورآکتورهای اولیه، سلول‌های کبد به صورت غوطه‌ور و یا چسبیده به سطوح خارج غشاءهای تجاری دیالیز، فیلتراسیون یا غشاء رشته‌های توخالی پلاسمافریز<sup>۸</sup> کشت داده می‌شوند (شکل ۱) [۱۸].



شکل ۱: شمای کلی بیورآکتورهای اولیه: سلول‌های کبدی بر روی سطح خارجی رشته‌های توخالی به صورت متصل به میکروکاریرها، یا توده‌های سلولی معلق و یا چسبیده به سطح غشاء (از راست به چپ) کشت داده می‌شوند و خون، پلازما یا محیط کشت در درون رشته‌ها جریان می‌یابد.

- ۹- Hallow fiber
- ۱۰- Flat plate monolayer culture
- ۱۱- Suspension encapsulation or chambers
- ۱۲- Perfusion beds/scaffold
- ۱۳- charcoal

- ۷- Biomass
- ۸- plasmapheresis

پایداری مکانیکی و توزیع مناسب تراکم هیپاتوسیت‌ها گردید. همچنین کیا<sup>۲۳</sup> و همکاران هیپاتوسیت‌ها را از طریق لخته شدن یک ترپلیمری و کلاژن متیله شده، در یک غشاء دولایه پلیمری، کپسوله نمودند و پایداری مکانیکی میکروکپسول را با تقویت غشاء میکروکپسول، تا حدی بهبود دادند [۲۷].

کپسوله نمودن سلول، محیط سه بعدی مناسبی را برای رشد هیپاتوسیت‌ها فراهم می‌سازد. همچنین غنی‌سازی محیط کشت هیپاتوسیت‌ها با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی قبل از کپسول نمودن، و یا کشت همزمان با سلول‌های غیرپاراننشیمی در داخل کپسول و نیز تثبیت سلول‌ها در ژل کلاژن، عملکرد و بقاء هیپاتوسیت‌ها را بهبود می‌بخشد که احتمالاً به دلیل اثرات تحریکی فاکتورهای رشد مشتق از سلول‌های غیرپاراننشیمی به صورت اوتوکراین و پاراکراین، و تأثیر ماتریکس خارج سلولی می‌باشد [۱۳] و [۱۹].

تاکنون از مواد مختلفی از جمله پلی‌استیرن، هیدروژل‌ها، فیبرین، رزین متخلخل پلی‌وینیل فرمال، پلیمرهای سنتزی محلول در آب و رشته‌های متخلخل پلی‌سولفون توخالی برای کشت هیپاتوسیت‌ها استفاده شده که باعث افزایش عملکرد و بقاء هیپاتوسیت‌ها گردیده است [۱۹ و ۲۴]. علی‌رغم این موفقیت‌های اولیه، بهینه‌سازی بیشتری از لحاظ مهندسی برای پایداری مکانیکی و توزیع مناسب تراکم میکروکپسول‌ها جهت پرفیوژن یکپارچه در بیوراکتورها لازم است.

روش‌های دیگری مثل استفاده از اسفروئیدها، ارگانوئیدهای استوانه‌ای و کشت ساندویچی نیز برای افزایش عملکرد هیپاتوسیت‌ها در بیوراکتورهایی از جمله FMB-BAL، PUF-BAL، AHS-BAL و LLS-BAL مورد استفاده قرار گرفته است [۸]. همچنین پیشرفت‌ها در زمینه تکنیک‌های ریزسازی<sup>۲۴</sup> سبب ساخت موفقیت‌آمیز داربست‌های میکروکانال بوسیله پلیمرهای زیست سازگار و زیست تجزیه پذیر مثل PDMS<sup>۲۵</sup>، PLLA<sup>۲۶</sup> و PCL<sup>۲۷</sup> گردیده که می‌تواند با سازماندهی مناسب مهاجرت، تکثیر و یا تمایز سلولی، منجر به تشکیل یک بافت سه بعدی متراکم شود و در نهایت می‌تواند سبب بهبود عملکرد سلول‌های کبدی گردد [۲۸].

دارد [۱۹ و ۲۳ و ۲۴]. در اواسط دهه ۱۹۹۰، توسعه دانش در زمینه بر همکنش ماتریکس با هیپاتوسیت‌ها و پیشرفت در زمینه فن‌آوری زیست مواد منجر به پیدایش نسل جدیدی از بیوراکتورها گردید که در آن سلول‌های کبد در داربست‌های سه بعدی که جایگزین ECM<sup>۱۴</sup> طبیعی بود؛ کشت داده شدند [۱۸]. در حقیقت اساس روش‌های جدیدی که برای حفظ بقاء و عملکرد متمایز هیپاتوسیت‌ها توسعه یافتند؛ القاء قطبیت سلولی همانند شرایط موجود در کبد طبیعی در بدن موجود زنده می‌باشد [۱۳]. تاکنون برای بهینه‌سازی شرایط محیطی و ریزمحیط<sup>۱۵</sup> هیپاتوسیت‌ها و به وجود آوردن محیط سه بعدی برای هیپاتوسیت‌ها، از روش‌ها و ساختارهای مختلفی استفاده شده است؛ از جمله میکروکاربرها، کپسول نمودن سلول<sup>۱۶</sup>، گیرانداختن در ژل<sup>۱۷</sup> در فضای داخلی و خارجی مویرگ‌ها، اشکال چند محوری<sup>۱۸</sup>، رشته‌های به هم بافته شده چند قسمتی<sup>۱۹</sup>، ویفرهای بوروسیلیکات با ریزآرایه‌های بیوشیمیایی، فوم‌های سه بعدی، داربست‌های متخلخل پلیمری زیست تجزیه پذیر سه بعدی و ... [۱۸] و [۱۹ و ۲۰].

ریزکپسول‌سازی<sup>۲۰</sup> یکی از روش‌های مهم کاربردی در زمینه زیست صنعتی و زیست پزشکی برای تثبیت محتویات فعال زیستی می‌باشد. غشاء پلیمری نیمه تراوای میکروکپسول می‌تواند سلول‌های کپسول شده را از آسیب‌های ناشی از استرس برش<sup>۲۱</sup> محافظت نماید و انتشار مولکول‌های کوچک و فاکتورهای رشد را ممکن سازد و از مهاجرت آنتی‌بادی‌ها و سلول‌ها از غشاء جلوگیری نماید. همچنین به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم در غشاء کروی میکروکپسول در مقایسه با اشکال دیگر، عبور و مرور مواد غذایی و محصولات از میان غشاء نیمه تراوا افزایش می‌یابد. بنابراین این روش، به کارگیری مقادیر بسیار زیاد هیپاتوسیت‌ها را در یک بیوراکتور کوچک تسهیل می‌نماید. ملاحظات عمده در طراحی میکروکپسول‌ها، پایداری مکانیکی، کپسول شدن کامل، نفوذپذیری انتخابی و ایجاد ریز محیط مناسب سلولی می‌باشد [۲۵ و ۲۶]. سان<sup>۲۳</sup> و همکاران از لخته فیبرینی و نانو ذرات طلا در میکروکپسول استفاده نمودند که باعث

- ۱۴- Extra Cellular Matrix
- ۱۵- microenvironment
- ۱۶- Cell encapsulation
- ۱۷- Gel entrapment
- ۱۸- Multicoaxial configurations
- ۱۹- Multicompartment interwoven fibers
- ۲۰- Microcapsulation
- ۲۱- shear
- ۲۲- Sun

- ۲۳- Chia
- ۲۴- microfabrication
- ۲۵- polydimethylsiloxane
- ۲۶- polylactic acid
- ۲۷- Polycaprolactone

## منبع سلولی

کارایی سیستم‌های BAL بستگی به نوع و خصوصیات عملکردی سلول‌های به کار رفته دارد [۱۱]. یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در ساخت سیستم‌های BAL، یافتن یک منبع سلولی مناسب می‌باشد. در حال حاضر بسیاری از انواع سلول‌های به کار رفته در سیستم‌های BAL، هر کدام با مزایا و معایب خاصی در دست مطالعات بالینی می‌باشند. مجموعه‌ای از شاخص‌های ایده‌آل به طور همزمان در یک منبع سلولی وجود ندارد؛ ویژگی‌هایی از جمله قابل دسترس بودن، کارایی در انجام عملکردهای اختصاصی کبد و جنبه‌های ایمنی، مسائل در پیش‌رو می‌باشد. به همین دلیل هنوز انتخاب یک منبع سلولی مناسب برای استفاده در BAL محل مناقشه و چالش است [۷ و ۲۳ و ۲۹].

اغلب سلول‌ها و منابع سلولی که در سیستم‌های BAL مورد استفاده قرار گرفتند؛ عبارتند از: هپاتوسیت‌های ابتدایی از جنین انسان یا پستانداران دیگر؛ دودمان‌های سلولی مشتق از کارسینومای سلولی کبد انسان؛ سلول‌های نامیرا شده انسانی، سلول‌های کبدی موش صحرایی و خوک؛ سلول‌های بنیادین جنینی؛ سلول‌های اجدادی و سلول‌های دگر تمایز داده شده [۲ و ۳۰].

هپاتوسیت‌های ابتدایی بالغ زئوژنیک و آلوژنیک عملکرد فوق‌العاده‌ای دارند و در این میان هپاتوسیت‌های ابتدایی زئوژنیک می‌توانند به عنوان یک منبع قابل دسترس در BAL به کار رود؛ زیرا این هپاتوسیت‌ها تمام عملکردهای کبد را انجام می‌دهند و فراهم نمودن آن از لحاظ عملی و اخلاقی آسان‌تر از هپاتوسیت‌های ابتدایی انسان است [۳۱]. در اکثر سیستم‌های BAL از هپاتوسیت‌های ابتدایی خوک استفاده می‌شود. گروه دمتریوس<sup>۲۸</sup> توانستند یک سیستم BAL بر اساس هپاتوسیت‌های ابتدایی خوک ابداع کنند و این سیستم توانست به مراحل اولیه بالینی برسد. اگر چه هپاتوسیت‌های جدا شده از خوک در شرایط آزمایشگاهی تکثیر کمی دارند؛ ولی عملکرد طبیعی کبد را دارند و منبع آنها تقریباً نامحدود است. [۳ و ۲۹] ولی استفاده از هپاتوسیت‌های حیوانات به دلیل خطرات مربوط به پیوند بین گونه‌ای<sup>۲۹</sup> چندان مناسب به نظر نمی‌رسد و استفاده از آنها در بسیاری از کشورهای اروپایی بوسیله قوانین پیوند بین گونه‌ای و خطر زئوزیس محدود گردیده است [۹ و ۲۹]. از طرفی دیگر، منابع هپاتوسیت‌های بالغ انسانی نیز کمیاب و محدود به دهنندگان کبد و یا قسمت‌های کوچک به دست آمده از برش کبد می‌باشند. همچنین

هنوز فراهم نمودن سریع هپاتوسیت‌ها با عملکرد بالا، به دلیل عدم وجود شرایط مناسب نگهداری میسر نگردیده است. اگر چه ساده‌ترین راه حل احتمالاً محافظت انجمادی هپاتوسیت‌ها می‌باشد؛ ولی استفاده از این روش باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌ها می‌گردد و پیشرفت‌های بیشتری در این زمینه برای بهبود بقاء و عملکرد هپاتوسیت‌ها پس از این فرایند لازم است [۷ و ۲۹]. از جمله محدودیت‌ها و مشکلات عمده برای استفاده از هپاتوسیت‌های ابتدایی انسان در سیستم‌های BAL عبارتند از: کم بودن فعالیت زیستی اولیه، کاهش فعالیت و عملکرد سلول، مرگ سلولی، آپوپتوز و محدودیت تکثیر سلولی می‌باشد [۳۲]. کشت همزمان هپاتوسیت‌ها با انواع سلول‌های دیگر توانسته بعضی از این مشکلات را تا حدی مرتفع سازد و باعث افزایش عملکرد هپاتوسیت‌ها و طول عمر آنها در محیط کشت گردد [۳۳].

دودمان‌های سلولی به خصوص دودمان‌های سلولی کبد انسان، منبع بالقوه‌ای برای به کارگیری در سیستم‌های BAL می‌باشد و به عنوان یک منبع مناسب سلولی برای استفاده در درمان‌های حمایتی کبد بر پایه سلولی، مورد توجه قرار گرفته است [۹۷ و ۱۱]. اگر چه مشکلات اساسی از جمله پیامدهای ایمونولوژیکی، خطر متاستاز و تومورزایی و عدم کفایت عملکردهای اختصاصی کبد در مورد استفاده از دودمان‌های سلولی وجود دارد؛ ولی مزایای عمده استفاده از این سلول‌ها؛ رشد نامحدود، امکان ذخیره‌سازی به صورت منجمد، حذف عوامل عفونی، مشکلات اخلاقی اندک جهت فراهم نمودن سلول‌ها و کنترل کیفی آسان این سلول‌ها می‌باشند [۳ و ۱۱ و ۳۱ و ۳۴].

ساسمن<sup>۳۰</sup> و کلی<sup>۳۱</sup> توانستند یک سیستم بر اساس دودمان‌های سلولی هپاتوبلاستومای انسان ابداع نمایند که به مراحل اولیه بالینی رسیده است [۳]. دودمان‌های سلولی انسانی مثل دودمان سلولی C3A به دلیل فقدان عملکرد کافی نمی‌توانند جایگزین وظایف کبد گردد. به علاوه این سلول‌ها به علت تغییرات وسیع ژنتیکی قابلیت ایجاد تومور را دارند و تغییرات زیادی در شاخص‌های ژنتیکی متابولیکی و سنتزی نشان می‌دهند [۳ و ۹]. بنابراین برای توسعه دودمان‌های سلولی انسان جهت استفاده در BAL دو شاخص مهم باید مورد توجه قرار گیرد: (۱) عملکرد این سلول‌ها با هپاتوسیت ابتدایی انسان مقایسه گردد. (۲) این سلول‌ها باید ایمن و ترجیحاً غیرتومورزا باشند [۹]. دودمان‌های سلولی هپاتوبلاستومای انسانی به نام HepG2 که ژن HSV/tk به آن منتقل شده بود؛ علاوه بر ایمن بودن، عملکرد بالایی دارند و منبع سلولی بالقوه‌ای برای

۳۰- Sussman

۳۱- Kelly

۲۸- Demetrious

۲۹- xenotransplantation

همچنین تحقیق در مورد ساخت و طراحی بیورآکتورها می‌باشد. به علاوه پژوهش و جستجو جهت یافتن یک منبع سلولی با عملکرد هپاتوسیت‌ها تا دستیابی به یک منبع سلولی در دسترس با حداکثر عملکرد سلول‌های کبدی همچنان ادامه دارد تا مشکلات موجود در زمینه فراهم نمودن منبع سلولی مناسب با کارایی بالا جهت استفاده در انواع سیستم‌های BAL مرتفع گردد.

استفاده در بیورآکتورهای BAL می‌باشند [۳۵]. سلول‌های بنیادین جنینی نیز به نظر می‌رسد منبع نوید بخشی برای سلول‌های کبدی باشند. این سلول‌ها قابلیت تمایز به انواع دودمان‌های سلولی را دارند. این سلول‌ها را می‌توان از بافت‌های مختلف جدا نمود؛ همچنین این سلول‌ها ظرفیت تکثیر بالایی دارند و در بعضی از جنبه‌ها در مقایسه با دودمان‌های سلولی، کارکردهای اختصاصی کبد در آنها بیشتر و بهتر است [۲۹ و ۳۶]. تاکنون برخی از محققین، تمایز سلول‌های بنیادین جنینی موش به هپاتوسیت‌های بالغ را نشان داده‌اند. ماتسوموتو<sup>۳۲</sup> و همکاران، سلول‌های بنیادی جنین موش تثبیت‌شده در فوم پلی اورتان (PFU) را در یک کبد مصنوعی مرکب، با استفاده از فاکتورهای رشد به هپاتوسیت‌های واجد عملکرد تمایز دادند. این مدل به دلیل تراکم بالای سلولی و عملکرد بالای اختصاصی کبد می‌تواند جزء زیستی مناسبی برای استفاده در BAL باشد [۳۶]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و چربی نیز پتانسیل خوبی برای تمایز به سلول‌های کبدی دارند [۳۷].

یکی دیگر از منابع سلولی برای استفاده در BAL، هپاتوسیت‌های نامیرا شده انسان می‌باشد؛ که عملکردهای متمایز کبد را داراست و می‌تواند یک منبع بالقوه برای استفاده در BAL باشد. پیشرفت‌ها در این زمینه نویدبخش می‌باشد؛ اما هنوز تا استفاده به صورت بالینی فاصله دارد [۳۷ و ۳۸]. هپاتوسیت‌های ابتدایی انسان می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی، بوسیله انتقال آنکوژن نامیرا کننده از طریق رتروویروس‌ها در روش نامیرا نمودن برگشت‌پذیر<sup>۳۳</sup> گسترش و توسعه یابند [۳۹].

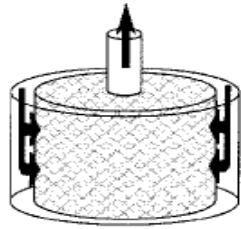
## نتیجه‌گیری

توسعه یک سیستم کارآمد کبد زیست مصنوعی جهت انجام وظایف کبد در بیماران مبتلا به نقایص حاد کبدی، نیازمند طراحی و ساخت یک بیورآکتور مناسب با کارایی بالا در اکسیژن‌دهی و انتقال مواد مغذی در تمام فضای بیورآکتور، و حداقل استرس به سلول‌ها و ایجاد شرایط مناسب برای عملکرد هپاتوسیت‌ها می‌باشد. به علاوه توسعه و تولید یک ماتریکس مناسب و هماهنگ با طراحی بیورآکتور، و با ساختار و جنس مناسب نقش اساسی در افزایش عملکرد متمایز سلول‌های کبدی دارد. ایجاد چنین شرایطی نیازمند گسترش و توسعه دانش در زمینه زیست مواد و زیست شناسی سلولی و

۳۲- Matsumoto

۳۳- Reversible immortalization

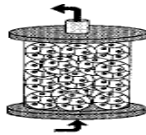
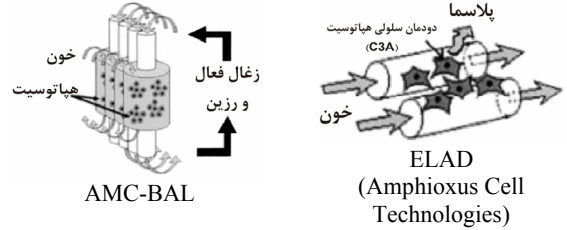
جدول ۱: طبقه‌بندی بیورآکتورها بر اساس طراحی: طراحی کلی بیورآکتورها به چهار گروه طبقه‌بندی می‌گردد که بر این اساس سیستم‌های مختلفی ساخته شده که آرایش و پیکربندی این سیستم‌ها نمایش داده شده است.



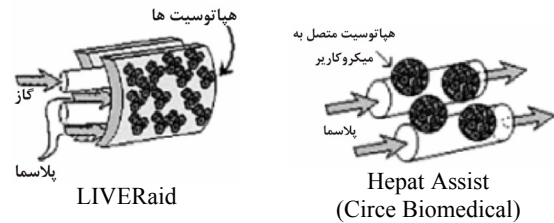
(۲) سیستم داربست یا لایه پرفیوژن



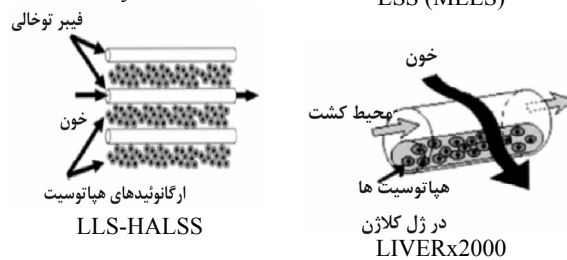
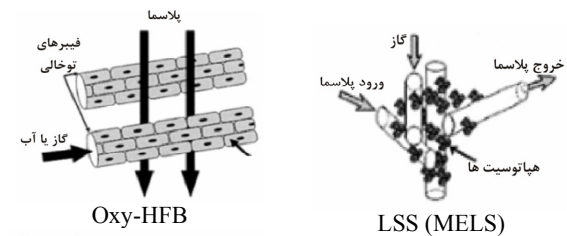
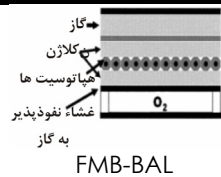
(۱) سیستم رشته توخالی



(۳) سیستم چمبر یا کپسول معلق



(۴) سیستم تک لایه ورقه ای یکنواخت



مراجع

- 1- Stadlbauer V, Davies N, Sen S, Jalan R; Artificial Liver Support Systems in the Management of Complications of Cirrhosis; SEMINARS IN LIVER DISEASE/VOLUME 28, NUMBER 1 2008
- 2- Allen J, Hassanein T, Bhatia S; Advances in Bioartificial Liver Devices; HEPATOLOGY; September 2001
- 3- Ying-Jie W, Meng-Dong L, Yu-Ming W, Qing-He N, Guo-Zheng C; Experimental study of bioartificial liver with cultured human liver cells; World Journal of Gastroenterology; 1999 April; 5(2):135-137
- 4- Naruse K, Tang W, Makuuchi M; Artificial and bioartificial liver support: A review of perfusion treatment for hepatic failure patients; World J Gastroenterol; 2007 March 14; 13(10): 1516-1521
- 5- Fiegel HC, Kaufmann PM, Bruns H, Kluth D, Horch RE, Vacanti JP, Kneser U; Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory; J Cell Mol Med. 2008 Jan-Feb;12(1):56-66
- 6- Ferenci P, Kramer L; MARS and the Failing Liver—Any Help from the Outer Space?; HEPATOLOGY, Vol. 46, No. 6, 2007
- 7- Wigg A.J, Padbury R.T, Liver support systems: Promise and reality, Journal of Gastroenterology and Hepatology (2005) 20, 1807–1816
- 8- Park J.K, Lee D.H; Bioartificial Liver Systems: Current Status and Future Perspective; Journal of Bioscience and Bioengineering; Vol. 99, No.4, 311-319; 2005
- 9- Chamuleau R, Poyck P, Kerkhove M, Bioartificial Liver: Its Pros and Cons, Therapeutic Apheresis and Dialysis, 10(2):168–174, 2006
- 10- Lee W, Squires R, Nyberg S, Doo E, Hoofnagle J; Acute Liver Failure: Summary of a Workshop; HEPATOLOGY, Month 2008
- 11- Poyck P et al; Evaluation of a new immortalized human fetal liver cell line (cBAL111) for application in bioartificial liver; Journal of Hepatology 48 (2008) 266–275
- 12- Singhal A, Neuberger J; Acute liver failure: Bridging to transplant or recovery—are we there yet?; Journal of Hepatology 46 (2007) 553–582
- 13- Mor E; Current Advances in Liver Support Systems; IMAJ 2001;3:41-43
- 14- Jauregui HO; The technology of biological extracorporeal liver assist devices: from infancy to adolescence; Artif Organs. 1997 Nov;21(11):1163-8.
- 15- Dixit V, Gitnick G; Artificial liver support: state of the art; Scand J Gastroenterol Suppl. 1996;220:101-14
- 16- Kanaie H. et al; Thoughts and Progress; Artificial Organs; Vol. 31, No. 2, 2007
- 17- Iwahori T et al; Radial Flow Bioreactor for the Creation of Bioartificial Liver and Kidney; Transplantation Proceedings, 37, 212–214 (2005)
- 18- Catapono J, Gerlach J.C; Bioreactors for Liver Tissue Engineering; Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007.
- 19- Riordan S, Williams R; Bioartificial liver support: developments in hepatocyte culture and bioreactor design; British Medical Bulletin 1997,53 (No 4)

- 20- Allen J, Bhatia S; Engineering Liver Therapies for the Future; TISSUE ENGINEERING; Volume 8, Number 5, 2002
- 21- Allen J, Bhatia S; Improving the next generation of bioartificial liver devices; CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol. 13, 2002: pp. 447-454
- 22- Hochleitner B, Hengster P, Duo L, Bucher H, Klima G, Margreiter R; A novel bioartificial liver with culture of porcine hepatocyte aggregates under simulated microgravity; Artif Organs. 2005 Jan;29(1):58-66
- 23- Chen JP, Lin CT; Dynamic seeding and perfusion culture of hepatocytes with galactosylated vegetable sponge in packed-bed bioreactor; J Biosci Bioeng. 2006 Jul;102(1):41-5
- 24- Sefer S, Kes P; ARTIFICIAL LIVER: PRESENT OR FUTURE?; Acta clin Croat 2002; 41:245-254
- 25- Sun T, Chan M, Quek Yu H; Improving mechanical stability and density distribution of hepatocyte microcapsules by fibrin clot and gold nano-particles; Journal of Biotechnology 11 (2004) 169-177
- 26- Chia SM, Wan AC, Quek CH, Mao HQ, Xu X, Shen L, Ng ML, Leong KW, Yu H; Multi-layered microcapsules for cell encapsulation; Biomaterials; 2002 Feb;23(3):849-56
- 27- Chia SM, Leong KW, Li J, Xu X, Zeng K, Er PN, Gao S, Yu H; Hepatocyte encapsulation for enhanced cellular functions; Tissue Eng. 2000 Oct;6(5):481-95
- 28- Leclerc E et al; Selective control of liver and kidney cells migration during organotypic cocultures inside fibronectin-coated rectangular silicone microchannels; Biomaterials 28 (2007) 1820-1829
- 29- Poyck P et al; Functional and Morphological Comparison of Three Primary Liver Cell Types Cultured in the AMC Bioartificial Liver; LIVER TRANSPLANTATION 13:589-598, 2007
- 30- Kosuge M, Takizawa H, Maehashi H, Matsuura T, Matsufuji S; A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of a bioartificial liver using a radial flowing bioreactor; Liver International (2007)
- 31- Enosawa S, Miyashita T, Saito T, Omasa T, Matsumura T; The significant improvement of survival times and pathological parameters by bioartificial liver with recombinant HepG2 in porcine liver failure model; Cell Transplant. 2006;15(10):873-80
- 32- Monga Sp et al; Mouse fetal liver cells in artificial capillary beds in three-dimensional four-compartment bioreactors; Am J Pathol. 2005 Nov;167(5):1279-92
- 33- Cho C.H et al; Oxygen Uptake Rates and Liver-Specific Functions of Hepatocyte and 3T3 Fibroblast Co-Cultures; Biotechnology and Bioengineering, Vol. 97, No. 1, May 1, 2007
- 34- Anil Kumar PR, Menon B, Anil Kumar TV, Kumari TV; Culture of neonatal rat liver cells: a preliminary observation; Trends of Biomaterials & Artificial Organs. 2002 Jul; 16(1): 34-7
- 35- Harimoto N et al, The newly established human hepatocyte cell line: application for the bioartificial liver; J Hepatol. 2005 Apr;42(4):557-64. Epub 2005 Jan 21
- 36- Matsumoto K, Mizumoto H, Nakazawa K, Jima H, Funatsu K, Kajiwaru T; Hepatic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells in a Bioreactor Using Polyurethane/Spheroid Culture; Transplantation Proceedings, 40, 614-616 (2008)

37- Alison M, Choong S, Lime S; Application of liver stem cells for cell therapy; *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18 (2007) 819–826

38- Lan-Juan L. et al; Evaluation of a bioartificial liver based on a nonwoven fabric bioreactor with porcine hepatocytes in pigs; *Journal of Hepatology* 44 (2006) 317–324

39- Tatsugaw T et al; Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination; *Journal of Hepatology* 47 (2007) 74–82