

# ENKAPSULACJA KOMÓREK W CELU OTRZYMANIA HYBRYDOWYCH SZTUCZNYCH NARZĄDÓW

M. KOZICKI\*, P. KUJAWA\*, L. PAJEWSKI\*\*,  
M. KOŁODZIEJCZYK\*\*\*, J. NARĘBSKI\*\*\*, J. M. ROSIAK\*

\* INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ  
POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ W ŁÓDZI

\*\* UNIWERSYTET L'AQUILA W L'AQUILA, WŁOCHY

\*\*\* INSTYTUT CHIRURGII ENDOKRYNOLOGII  
AKADEMII MEDYCZNEJ W ŁÓDZI

## Streszczenie

Komórki, zabezpieczone przed atakiem ze strony układu odpornościowego biorcy poprzez umieszczenie wewnątrz kapsuł polimerowych, stanowią obiecujący materiał w dziedzinie badań nad poszukiwaniem optymalnych układów, zdolnych do zastępowania uszkodzonych narządów. W artykule opisano dwie metody enkapsulacji komórek z użyciem alginianu sodu, usieciowanego jonami wapnia, jako wewnętrznej matrycy, w której znajdują się komórki. Stwierdzono, że dodatkowe otoczenie takiej kapsuły poli(alkoholem winylowym), usieciowanym za pomocą aldehydu glutarowego, powodowało denaturację białek komórki. Zastąpienie tej otoczki błoną z polimeru hydrofobowego, wytwarzaną metodą wytrącania międzyfazowego, zwiększało przeżywalność komórek. Dobierając odpowiednio warunki procesu uzyskano membrany przez które przenikały związki niskocząsteczkowe (np. składniki odżywcze) i białka o małej masie cząsteczkowej. Otoczki te były natomiast nieprzenikalne dla dużych białek układu odpornościowego. Metoda ta stanowi obiecujący sposób enkapsulacji komórek, które nie byłyby uszkodzane i charakteryzowałyby się długoterminową przeżywalnością po implantacji.

**Słowa kluczowe:** hybrydowe sztuczne organy, enkapsulacja, immobilizacja, alginian sodu, żele jonowe, sieciowanie

## Wprowadzenie

Skutki wielu chorób natury endokrynologicznej (np. choroby trzustki, przytarczyc i tarczycy) można złagodzić lub wyeliminować na drodze przeszczepienia komórek narządowych. Podjęcie funkcji przez przeszczep allogeniczny lub ksenogeniczny uwarunkowane jest brakiem dostępu układu immunologicznego biorcy do transplantowanych komórek. Cel ten może zostać osiągnięty bez potrzeby stosowania środków immunosupresyjnych poprzez izolację przeszczepianych komórek przy użyciu materiałów polimerowych. Komórki zabezpieczone przed ingerencją układu immunologicznego powinny, po wszczepieniu do

# ENCAPSULATION OF LIVING CELLS TOWARDS ...!!... ARTIFICIAL, HYBRID ORGANS

M. KOZICKI\*, P. KUJAWA\*, L. PAJEWSKI\*\*,  
M. KOŁODZIEJCZYK\*\*\*, J. NARĘBSKI\*\*\*, J. M. ROSIAK\*

\* INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY,  
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

\*\* UNIVERSITY L'AQUILA, L'AQUILA, ITALY,

\*\*\* INSTITUTE OF ENDOCRINAL SURGERY,  
MEDICAL ACADEMY IN ŁÓDŹ

## Abstract

Living cells, protected from host immune system response in a manner of encapsulation inside polymer matrices, can provide surrogate device for maintaining or replacement of broken-down organs. In this paper two methods of living cells encapsulation are described. These methods are based on sodium alginate cross-linking induced by calcium cations. First attempt is based on an additional covering of alginate matrix by poly(vinyl alcohol) layer cross-linked with glutaraldehyde. However, this procedure caused denaturation of cellular proteins. Cells survived the process of encapsulation when the outer layer of the capsules was replaced by hydrophobic polymer membrane. This cover was produced using interfacial precipitation method. By selecting the appropriate conditions of encapsulation, the membranes permeable for low-molecular weight compounds (nutrients) and low-molecular weight proteins were developed. However, the high-molecular weight immune system proteins (g-globulin) could not diffuse through the formed layer. Described method could be a convenient tool for the encapsulation of living cells which are not damaged and are characterised by long-term survival.

**Keywords:** hybrid artificial organs, encapsulation, immobilisation, sodium alginate, ionic gels, cross-linking

## Introduction

The consequences of many endocrine diseases, like pancreas, thyroid or parathyroid disorders, can be alleviated or removed by transplantation of the appropriate organ cells. Normal functioning of an allogenic or xenogenic transplant is possible only if the host immune system has no access to the transplanted cells. This can be achieved, without application of immunosuppressants, by isolation of the transplanted cells with polymeric materials. The implanted cells, protected from the immune system reaction, should perform their usual functions, i. e. to secrete specific products, depending on the external stimuli. In addition, polymeric shell should be biocompatible and non-biodegradable, permeable for oxygen, nutrients, products of cell metabolism, and compounds, that stimulate its action.

organizmu biorcy, spełniać swoje normalne funkcje tj. wydzielać specyficzne dla nich produkty w ilości zależnej od stymulacji zewnętrznej. Z kolei otoczka polimerowa powinna być biokompatybilna i niebiodegradowalna, przepuszczalna dla tlenu i substancji odżywczych, produktów przemiany materii wydzielanych przez enkapsulowane komórki oraz związków stymulujących ich pracę. Oplaszczająca membrana nie powinna przepuszczać jednakże składników układu immunologicznego biorcy.

Pierwsze próby wytwarzania enkapsulowanych komórek podejmowane były już w latach 60 i 70-tych. Jednak dopiero propozycje Lima dotyczące wytwarzania hybrydowej sztucznej trzustki [1] spowodowały wzrost zainteresowania tym kierunkiem badań biomedycznych. Lim zaproponował umieszczenie komórek w otoczce alginianu sodu usieciowanego jonami wapnia. Dodatkowo układy takie otaczane były poli(L-lizyną) lub innymi polikationami (chitozaniem, dekstranem) [2]. W praktyce okazało się jednak, że po stosunkowo krótkim czasie kapsułki były otorbiane przez tkankę łączną, co uniemożliwiało ich funkcjonowanie [3]. Inne podejście prezentowane jest w pracach Seftona [4], w których komórki otaczane są polimerami syntetycznymi: kopolimerem metakrylanu metylu i metakrylanu hydroksyetylu z domieszką poli (N-winylopirolidonu).

W niniejszej pracy opisane są alternatywne metody enkapsulacji komórek oraz badania przenikalności wybranych związków przez powstałe membrany. Metoda enkapsulacji poprzez sieciowanie alginianu sodu za pomocą jonów wapnia została zmodyfikowana poprzez zastosowanie polimerów syntetycznych - poli(alkoholu winylowego) (PVAL) i polimeru hydrofobowego.

## Materiały i metodyka

### **Otrzymywanie kapsułek alginianowych.**

Do przygotowania kapsułek używano 3% roztworu alginianu sodu (Alg, Aldrich) w 0,9% wodnym roztworze chlorku sodu. Roztwór ten był wkraplany z biurety do naczynia zawierającego 0,15 mol  $\text{dm}^{-3}$  chlorku wapnia. Po wytworzeniu, kapsułki (średnica 2-3 mm) były pozostawione przez pewien czas (20 min.) w roztworze  $\text{CaCl}_2$ , a następnie przemywane 0,9% roztworem chlorku sodu.

### **Otrzymywanie kapsułek alginianowych otaczanych usieciowanym poli(alkoholem winylowym) (PVAL).**

Przygotowany poprzez rozpuszczenie w podwyższonej temperaturze roztwór Alg (3%) i PVAL (3%) w 0,9 % NaCl był wkraplany jak w metodzie poprzedniej, do roztworu  $\text{CaCl}_2$ , a następnie przemywany roztworem NaCl. Kapsułki były zanurzane przez 1 minutę w roztworze aldehydu glutarowego (1%, pH 1,0) i przemywane roztworem soli fizjologicznej. Następnie były one umieszczane w roztworze PVAL (5 min, 3-8%), przenoszone ponownie do roztworu aldehydu glutarowego i ponownie przemywane. pH roztworów było ustalane przez dodanie odpowiedniej ilości kwasu solnego.

### **Otrzymywanie kapsułek alginianowych otaczanych polimerem hydrofobowym.**

Wstępny etap polegał na przygotowaniu kapsułek alginianowych jak opisano wyżej używając 2% roztworu Alg w 0,9 % NaCl. Następnie były umieszczane w 3% roztworze Alg i przeniesione do roztworu  $\text{CaCl}_2$  (czas kontaktu 3 min.). W ten sposób na kapsułkach powstawała dodatkowa, zewnętrzna otoczka usieciowanego alginianu. Tak przygotowane kapsułki wprowadzane były do roztworu polimeru hydrofobowego w acetonie (stężenie 7-15%). Umieszczenie kapsułek w wodzie powodowało wytrącanie zaadsorbowanego na powierzchni polimeru. Dwukrotna kąpiel w acetonowym roztworze polimeru, połączona z wytrącaniem

However, this polymeric membrane cannot be permeable for the components of the host immune system.

Although the first attempts to produce the encapsulated cells were made in the 1960-ties and 1970-ties, the growing interest in this research area started with the pioneering work of Lim, concerning preparation of artificial pancreas [1]. The proposed system is based on the cross-linking of sodium alginate with calcium ions in aqueous solution in which the encapsulated cells are placed. Additionally, such capsules can be modified with a supplemental layer of poly(L-lysine) or other polycations (chitosan, dextran) [2]. However, the systems of this type cannot be successfully applied in practice because of the capsules encystment with connective tissue [3]. Different approach to the encapsulation problem is presented by Sefton [4] who describes a system in which the cells are closed in synthetic polymer capsules. In this case, copolymers of methyl methacrylate and hydroxyethyl methacrylate with poly(N-vinylpyrrolidone) were used as the coating materials.

In this paper we describe an alternative method of cells encapsulation as well as studies on permeability of the formed membranes by the compounds of different size. The improvement of the method of sodium alginate cross-linking by an addition of poly(vinyl alcohol) (PVAL) or hydrophobic polymer is also reported.

## Materials and methods

### **Alginate capsules formation.**

Solution of 3% (w/v) sodium alginate (Alg, Aldrich) in 0.9% sodium chloride was dropped from burette or Pasteur pipette in a glass vessel containing  $\text{CaCl}_2$  (0.15 M). The droplets (diameter ca. 2-3 mm) jellied. The formed calcium alginate beads were then kept for some time (20 min) in the  $\text{CaCl}_2$  solution. Finally, they were washed with 0.9% NaCl solution.

### **Alginate capsules covered with crosslinked poly(vinyl alcohol) (PVAL).**

Mixture of Alg (3% w/v) and PVAL (3% w/v) in 0.9% sodium chloride aqueous solution was prepared at elevated temperature. Resulting solution was dropped in calcium chloride solution, followed by washing of resulting droplets with 0.9% NaCl. Subsequently, the capsules were kept in glutaraldehyde solution (1%, pH 1.0) for 1 min, in order to form crosslinks between PVAL chains, and washed again. Next, the beads were immersed for 5 min. in PVAL solution (3-8%), then transferred once more to glutaraldehyde solution. The pH of glutaraldehyde solutions was adjusted with HCl.

### **Alginate capsules covered with hydrophobic polymer**

The initial stage was identical with the one described above, except that 2% Alg solution in 0.9% NaCl was used. Additionally, capsules were placed in 3% Alg solution and transferred to  $\text{CaCl}_2$  solution for 5 min. in order to form new, outer layer of crosslinked alginate. Beads prepared in such way were placed in acetone solution of polymer, concentration 7-15%, and subsequently immersed in water. As this polymer is not soluble in water, it precipitates at the surface of alginate capsules. Repetition of this procedure results in thicker and more mechanical resistant coating.

### **Permeability studies.**

Permeability of model compounds and cells through the walls of the formed beads was measured spectrophotometrically. As a model for low-molecular compounds the well-known dye, rhodamine B (Allied Chemical), was chosen. Its molecular weight is 395  $\text{g mol}^{-1}$  and the absorbance can be measured at  $\lambda=556 \text{ nm}$  (extinction coefficient  $\epsilon=1.1 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [5]). As model proteins, human albumin (ZLB, Swiss Red Cross, molecular weight

otoczki w wodzie, powodowała tworzenie się powłoki o większej grubości i wytrzymałości na mechaniczne uszkodzenia.

### Badanie przepuszczalności ścian kapsulek.

Przenikalność modelowych związków przez wytworzone membrany była mierzona spektrofotometrycznie. Modelowym związkiem niskocząsteczkowym był barwnik rodamina B (Allied Chemical,  $M=395 \text{ g mol}^{-1}$ ), którego widmo absorpcyjne posiada maksimum przy 556 nm (współczynnik absorpcji  $\epsilon=1 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [5]). Modelowymi białkami były: albumina ludzka (ZLB Centralne Laboratorium Krwiodawstwa Szwajcarskiego Czerwonego Krzyża, 68 tys. Da) oznaczana przy  $\lambda=220 \text{ nm}$  ( $\epsilon=1,5 \cdot 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [6]) i  $\gamma$ -globulina ludzka (Biomed, 180 tys. Da) oznaczana przy  $\lambda=210 \text{ nm}$  ( $\epsilon=3,4 \cdot 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [6]). Jako modelowe komórki posłużyły czerwone ciała krwi królika. Gdyby komórki te przenikały przez ścianki kapsułki do wody lub ulegały uszkodzeniu podczas ich enkapsulacji natychmiast następowałaby ich hemoliza i uwalnianie hemoglobiny, której absorbancję można łatwo oznaczać. Stężenie hemoglobiny było mierzone przy 540 nm ( $\epsilon=820 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Barwnik, modelowe białka lub erytrocyty dodane były do roztworu Alg lub Alg/PVAL przed przygotowaniem kapsulek, które, po utworzeniu i przemyciu, były zanurzane w znanej objętości wody. Próbkę tego roztworu były pobierane, a ich absorbancja mierzona za pomocą spektrofotometru Hewlett Packard 84524.

### Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).

Zdjęcia powierzchni i przekrojów poprzecznych kapsulek wykonane były za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Jeol 35C w Instytucie Włókien Chemicznych w Łodzi. Przed wykonaniem zdjęć próbki były liofilizowane i suszone. Następnie na ich powierzchni napyłane było złoto.

## Wyniki i dyskusja

Łańcuchy polimerowe alginianów mają charakter anionowy i łatwo żelują w obecności kationów wielowartościowych metali, np. jonów wapnia. Właściwość ta jest szeroko wykorzystywana do wytwarzania jonowych żeli, stosowanych m. in. do otrzymywania hybrydowych sztucznych organów [1,7,8]. Z kolei usieciowany PVAL jest dogodnym i nietoksycznym biomateriałem używanym m. in. do produkcji membran sztucznej trzustki i nerki, opatrunków i materiałów kontaktujących się z krwią [9,10].

68 000 Da) and  $\gamma$ -globulin (Biomed, Poland, molecular weight - 180 000 Da) were chosen. The concentration of albumin and  $\gamma$ -globulin was determined at  $\lambda=220 \text{ nm}$  ( $\epsilon=1.5 \cdot 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [6]) and  $\lambda=210 \text{ nm}$  ( $\epsilon=3.4 \cdot 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [6]), respectively. Rabbit erythrocytes were chosen as model cells. In case they diffuse through capsule walls to water outside the beads, immediate haemolysis and haemoglobin release occur. The concentration of released haemoglobin can then be measured spectrometrically at  $\lambda=540 \text{ nm}$  ( $\epsilon=820 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The dye, model proteins and erythrocytes were added to the alginate or alginate/PVAL solution before preparation of the beads. After formation and washing of spheres, they were kept in a known amount of water. Samples of the solution were collected at different intervals of time and absorbance was measured with use of Hewlett Packard 84524 spectrophotometer.

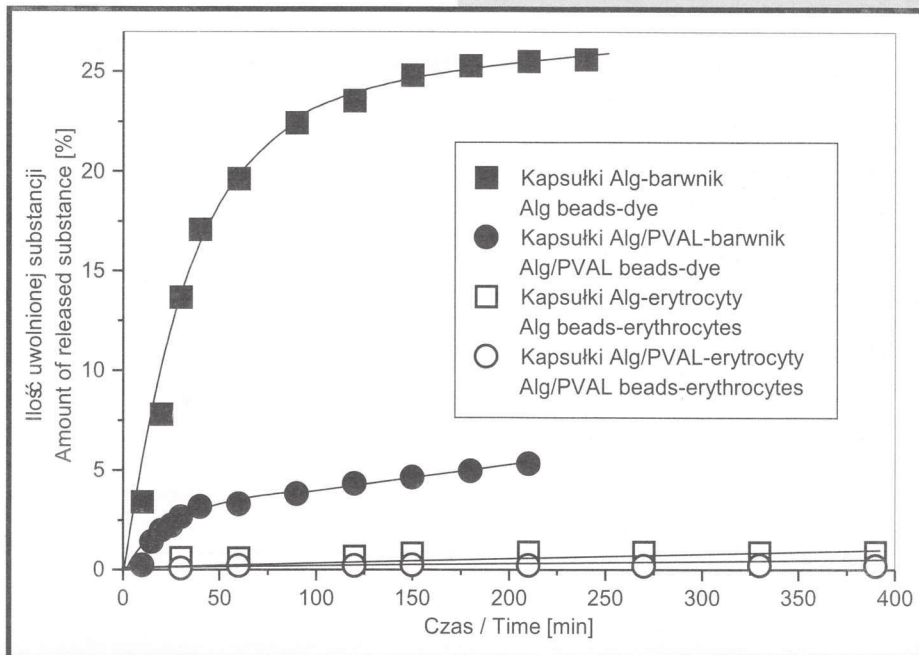
### Scanning electron microscopy (SEM).

Pictures of surface and cross-sections of capsules were taken using scanning electron microscope Jeol 35C in the Institute of Chemical Fibres, in Łódź. Samples were prepared by freeze-drying. The fractured surfaces were coated with gold.

## Results and discussion

The polymeric chains of alginate have anionic character and can be easily cross-linked in the presence of multivalent metal cations, e. g. calcium cations. This makes these systems very useful for preparation of ionic gels used for in the formation of artificial, hybrid organs [1,7,8]. Additionally, cross-linked PVAL is a convenient and non-toxic biomaterial applied as a membrane in artificial pancreas or kidney, wound dressing and materials designed for contact with blood [9,10]. PVAL undergoes cross-linking reaction with glutaraldehyde in acidic solution [11]. The produced capsules consisted of the inner opaque alginate layer, in which the studied compounds or cells were placed, and inner transparent and soft coating of cross-linked PVAL. In the studied time-scale the dye diffuses rapidly through the capsule walls, but the erythrocytes release was not observed

(FIG.1.). The red blood cells are big enough to be effectively restrained by the polymer network. The various PVAL concentration in forming solution does not change significantly the rate of studied compounds release, but the harsh conditions of the process (low pH value,



RYS. 1. Kinetyka uwalniania rodaminu B i czerwonych ciałek krwi z kapsulek alginianowych (Alg) i z kapsulek alginianowych z zewnętrzną otoczką wykonaną z PVAL usieciowanego aldehydem glutarowym (Alg/PVAL).

FIG. 1. Kinetics of rhodamine-B and erythrocytes release from alginate capsules (Alg) and from alginate capsules additionally coated with the outer layer formed by PVAL crosslinked with glutaraldehyde.

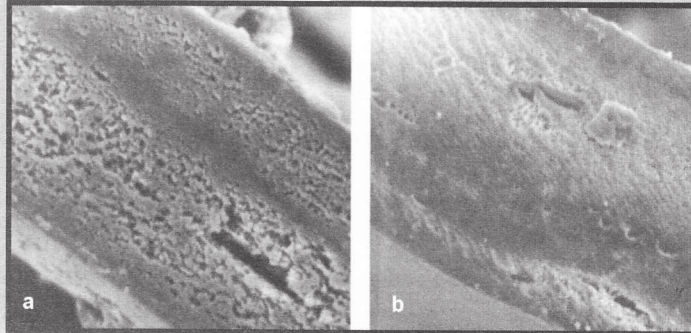
Polimer ten łatwo sieciuje w kwaśnym środowisku w obecności aldehydu glutarowego [11]. Otrzymane kapsułki zbudowane były z wewnętrznej, mętej sfery alginianowej, w której umieszczone były związki lub komórki, których dyfuzję badano. Na zewnątrz były one otoczone przezroczystą i miękką warstwą usieciowanego PVAL. W badanej skali czasowej barwnik łatwo przenikał przez ścianki kapsulek, natomiast uwalnianie czerwonych ciałek krwi praktycznie nie było obserwowane (RYS. 1.). Komórki erytrocytów są na tyle duże, by ich przenikanie przez sieć polimerową było w znacznym stopniu zahamowane.

Stężenie PVAL w roztworze formującym nie miało znacznego wpływu na szybkość uwalniania badanych substancji, jednak drastyczne warunki procesu (niskie pH, obecność glutaraldehydu) powodowały obumieranie immobilizowanych komórek [12]. Ze względu na to, podjęte zostały próby opracowania technologii wytwarzania kapsulek używając metody wytrącania międzyfazowego przy zastosowaniu innego polimeru [4]. Kapsułki otrzymane tą metodą mają stosunkowo mocne, nieprzezroczyste ścianki, wewnątrz których zamknięty jest żel alginianowy z enkapsulowanym materiałem. Stwierdzono, że otoczki wykonane z polimeru hydrofobowego nie stanowią istotnej przeszkody dla dyfuzji zawartego wewnątrz barwnika, który ze względu na niewielkie rozmiary może łatwo przenikać przez sieć

glutaraldehyde presence) caused protein denaturation and cells haemolysis [12]. For that reason, different attempts to establish a new technology of capsule formation were implemented. The chosen method is based on interfacial precipitation of hydrophobic polymer [4]. The beads produced with use of this method have relatively strong opaque walls, inside of which alginate gel together with encapsulated material is placed. It was stated that covering of the alginate capsules with this polymer does not inhibit significantly the dye diffusion. With regard to small dimensions compared to the mesh size in polymer network, it can easily permeate through the Alg gel and the outer polymer layer. This feature is of great importance, because described membranes should be permeable by the compounds of low-molecular weight. Increasing number of outer polymer layers or increasing the concentration of this polymer in the forming solution results in significant retardation of diffusion [6]. It is connected with decreasing of pore diameter and narrowing of its size distribution, as the concentration of forming solution increases. This can be seen while comparing the SEM micrograph of the polymer coating produced with 7% and with 15% solution (FIG. 2.).

Observed diffusion retardation was even more pronounced in the case of albumin and  $\gamma$ -globulin macromolecules. The higher was the concentration of the forming solution, the

**RYS. 2.** Zdjęcia SEM fragmentów polimerowej membrany zewnętrznej wykonanej z polimeru hydrofobowego (powiększenie 1000 razy). Stężenie roztworu formującego - a) 7%, b) 15%.

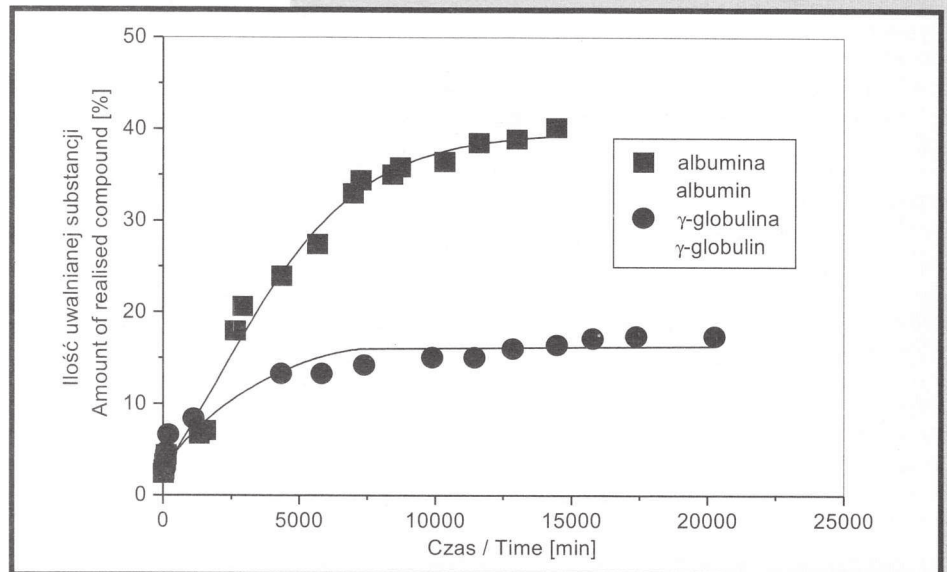


**FIG. 2.** SEM micrographs of the outer polymeric membrane (magnification 1000 times). Concentration of forming polymer solution - a) 7%, b) 15%.

polimerową. Jest to zaletą badanego materiału, jako że membrany takie powinny być przenikalne dla związków o niskich masach cząsteczkowych. Zwiększenie grubości otoczki i stężenia roztworu formującego powoduje znaczące spowolnienie procesu dyfuzji [6]. Jest to związane ze zmniejszaniem średnicy porów w miarę zwiększania stężenia roztworu formującego otoczkę, co jest widoczne na zdjęciach mikroskopowych (RYS. 2.).

Obserwowane spowalnianie przenikania było jeszcze bardziej widoczne w przypadku cząsteczek białek - dyfundowały one tym wolniej, im większe było stężenie roztworu użytego do wytwarzania zewnętrznej otoczki. Co więcej, maksymalny poziom uwolnionej  $\gamma$ -globuliny był niższy w porównaniu z albuminą, pomimo tego, iż w początkowym etapie przebieg kinetyki uwalniania był jednakowy dla obu białek (RYS. 3.).

slower they permeated through the capsule walls. Moreover, the maximum amount of released  $\gamma$ -globulin was lower than in the case of albumin, in spite of the same kinetic pattern in the early stages of their release (FIG. 3.).



**Rys. 3.** Kinetyka uwalniania albuminy i  $\gamma$ -globuliny ludzkiej z kapsulek alginianowych pokrytych dodatkową podwójną otoczką wykonaną z polimeru hydrofobowego (stężenie polimeru w roztworze formującym - 15%).

**Fig. 3.** Kinetics of albumin and  $\gamma$ -globulin release from alginate capsules covered with twofold polymer coating (concentration of forming solution - 15%).

Wynika to z różnicy wielkości cząsteczek badanych związków. Mniejsza albumina uwalniana jest z wnętrza i wmywana z powierzchni kuleczek, natomiast większa cząsteczka  $\gamma$ -globuliny właściwie nie wydostaje się z zamkniętego wnętrza kapsułek, a jej początkowe uwalnianie związane jest z wymywaniem z powierzchni membrany i z jej porów.

## Wnioski

Przedstawiona metoda enkapsulacji żywych komórek w żelach alginianowych otoczonych powłoką polimeru hydrofobowego stanowi obiecujący sposób otrzymania hybrydowych sztucznych narządów. Dobór odpowiednich warunków zapewnia swobodne przenikanie przez wytworzone membrany związków niskocząsteczkowych, jak również dyfuzję białek o niewielkiej masie cząsteczkowej (albuminy). Jednocześnie, przez tak wytworzoną powłokę praktycznie niemożliwa jest dyfuzja  $\gamma$ -globuliny, białka charakterystycznego dla układu odpornościowego. Zastosowanie do wytwarzania zewnętrznej otoczki PVAL usieciowanego aldehydem glutarowym powoduje obumieranie komórek, znajdujących się wewnątrz kapsułek, ze względu na drastyczne warunki sieciowania.

Istotnym problemem jest zapewnienie enkapsulowanym komórkom możliwie najlepszych warunków rozwoju i uniknięcie ich wzajemnego zatrucia przez produkty przemiany materii, tak aby mogły one rosnąć i dzielić się. Prowadzone w chwili obecnej badania polegające na wytwarzaniu żelu alginianowego o specjalnej, komorowej strukturze stanowią obiecujące rozwiązanie tego problemu.

## Podziękowania

Autorzy dziękują Profesorowi Henrykowi Struszczykowi z Instytutu Włókien Chemicznych w Łodzi za możliwość użytkowania skaningowego mikroskopu elektronowego i pomoc w wykonaniu zdjęć. Badania wykonane zostały w ramach polsko-włoskiej umowy rządowej, projekt nr 260/R99/R00.

## Piśmiennictwo

- [1] Lim F. i Sun A. M., Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas. *Science*, 210 (1980), 908-910.
- [2] Huget M. L., Neufeld R. J., i Dellacherie, Calcium-Alginate Beads Coated with Polycationic Polymers: Comparison of Chitosan and DEAE-Dextran. *Process Biochem.*, 31 (1996), 347-353.
- [3] O'Shea G. M. i Sun A. M., Encapsulation of Rat Islets of Langerhans Prolongs Xenograft Survival in Diabetic Mouse. *Diabetes*, 35, (1986), 943-946.
- [4] Uludag H., Kharlip L. i Sefton M. V., Protein Delivery by Microencapsulated Cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 10 (1993), 115-130 i literatura tam cytowana.
- [5] Gal M. E., Kelly G. R. i Kurutsev T., Derivation and interpretation of the spectra of aggregates. Part 2. Dimer of rhodamine B in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, 69 (1973), 395-402.
- [6] Kozicki M., Praca Magisterska, Politechnika Łódzka, 1998.

It is probably caused by different sizes of the studied proteins. Smaller albumin molecules are released from the inner space of the beads and washed away from the surface, while bigger  $\gamma$ -globulin ones cannot escape from the inside and are only delivered from the membrane surface and from its pores.

## Conclusions

The described method of living cells encapsulation in alginate gels coated with hydrophobic polymer layer is a promising way in order to produce artificial, hybrid organs. The choice of appropriate conditions ensures free diffusion of low-molecular weight compounds through formed membranes, as well as their permeability by small proteins (albumin). At the same time, the diffusion of the immune system protein ( $\gamma$ -globulin) through the bead walls is constrained. Application of cross-linked PVAL to the production of the outer layer results in encapsulated cell damage. This is because of the very rough cross-linking conditions.

The problem, which should be resolved in our further investigation, is how to provide the cells with the most suitable living conditions and how to avoid their damage caused by the products of the metabolism. Studies connected with these questions are currently performed by our group. They are connected with a development of a new system of alginate gel with special, spherical chamber structure.

## Acknowledgements

Authors would like to thank to Prof. Henryk Struszczyk from the Institute of Chemical Fibres, Łódź, for the kind possibility of using scanning electron microscope and assistance in the analyse. This work is partially financed by the Polish-Italian government agreement (project No. 260/R99/R00).

## References

- [7] Dumitriu S., Vidal P. F i Chornet E., Hydrogel Based on Polysaccharides. W: Dumitriu S. (Ed.), *Polysaccharides in Medical Applications.*, Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
- [8] Cohen S., Bano C., Visscher K. B., Crow M., Allock M. R. i Langer R. S., U.S. Patent nr 54944682 (1996).
- [9] Peppas N. A. Hydrogels of poly(vinyl alcohol) and its copolymers. W: Peppas N. A. (Ed.), *Hydrogels in medicine and pharmacy.*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987.
- [10] Burczak K., Gamian E i Kochman A., Long-term In Vivo Performance and Biocompatibility of Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Macrocapsules for Hybrid-type Artificial Pancreas. *Biomaterials*, 17 (1996), 2351-2356.
- [11] Toyoshima K., Acetalization of Polyvinyl Alcohol. W: Finch C. A. (Ed.), *Polyvinyl Alcohol. Properties and Applications.*, Wiley & Sons, London, 1973.
- [12] P. Kujawa, M. Lemiesz, M. Kołodziejczyk, J. Narębski, L. A. Pajewski i J. M. Rosiak, Encapsulation of Living Cells in Alginate and Alginate/PVAL Hydrogels. *International Workshop Bioencapsulation VI*, Barcelona, Hiszpania, T2.4 (1997).