

Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen

Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011

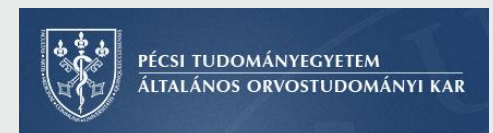


Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen
Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



Dr. Balogh Péter és Dr. Engelmann Péter
Transzdifferentiáció és regeneratív medicina – 12. előadás

VESE REGENERÁCIÓ



A vese

- A vese részt vesz a vér szűrésében, de hormon szekréciót is végez, továbbá a csont metabolizmusában is van szerepe.
- A vese a szervezetünk egyik leginkább differenciálódott szerve.
- Korábban úgy gondolták, hogy a vese nem képes regenerálódásra, mivel a terhesség 36-ik hetétől kezdve nem képződnek új nefronok, miután kimerül a progenitor mezenhima.
- Bár manapság egyre több adat mutat arra, hogy ezt az elképzelést felül kell vizsgálni, mivel a vese egy lassú sejtkecserelődésen megy keresztül a szöveti homeosztázis avagy sérülés után.
- A vesesejtek alacsony osztódási rátája talán a lokális sejtek genetikai programozásának tudható be.

Vesebetegség

- A vesebetegek száma egyre nő világszerte, így igen nagy igény van a hagyományos terápia mellett alternatív megoldásokra.
- Az akut vese elégtelenség (AKF) a vesefunkció igen gyors csökkenését jelenti megemelkedett kreatinin szinttel. Az AKF okai lehetnek a nem megfelelő veseperfúzió, vérveszteség, alacsony szív perctérfogat, alacsony szisztémás ér ellenállás, akut tubuláris károsodás, és glomerulonefritisz.
- A krónikus vesebetegség (CKD) a vesefunkció hosszú ideig fennálló fokozatos romlását jelenti. Ezek a tünetek lassan a végállapotú vesebetegség kifejlődéséhez vezetnek. A leggyakoribb oka a CKD-nak a diabéteszes nefropátia, magas vérnyomás okozta veseér szklerózis és egyéb glomerulopátiák, mint pl. az IgA nefropátia.

Vese terápia I/a.

Hemodialízis:

- Egy régió terápiás módszer, melyhez manapság új fejlesztések járulnak, mint pl. a membránvastagság csönnektése a humán nefron filter (HNF) segítségével.
- A HNF egy patronban található 2 membránból álló sorozat.
- Az első membránt G membránnak nevezik, mivel funkciójában analóg a nefron glomerulus membránjával. A glomerulus funkcióját utánozza egy konvektív mozgással így egy plazma ultrafiltrátumot hoz létre, amely albumin molekula nagyságú oldott anyagokat tartalmaz.
- A második membrán az ún. T membrán, mivel a tubulusok funkcióját utánozza. Ez egy molekuláris alapú membrán, ami szelektíven tartja vissza az oldott anyagokat, és így tartja fent a homeosztázist. Nincs dialízis ebben a rendszerben.

Vese terápia I/b.

Hemodialízis:

- A G membrán a molekulaméret szerint válogatja szét az oldott anyagokat. A vérből létrejött ultrafiltrátum szükséges és szükségtelen anyagokat tartalmaz. Az ultrafiltrátum keresztül megy a T membránon, ami szelektálja a szükséges anyagokat a szükségtelenektől.
- A T membrán szintén képes arra, hogy szelektáljon, mivel mindegyik pórusa egyedi. A pórusok arra készültek, hogy csak a kívánt molekulákat kössék meg.
- Hasonló átmérőjű pórusoknak is nagyon különböző és szelektív szállító képességük van.

Vese terápia II.

Bioarteficiális vese:

- Azon okból, hogy kikerüljék a jelenlegi dialízises rendszerek szabályzó, endokrin és metabolikus hiányosságait, élő vese sejtek és polimer alapváz kombinációját hozták létre (fázis I/II tanulmányok emberben).
- Ez a technika függ attól, hogy érett tubuláris sejteket kell izolálni és *in vitro* tenyészteni. Ezeket a sejteket tovább növesztik a standard hemofiltrációs patron rostjainak belső felszínén. Ez a tubuláris sejt patron sorozatba helyezik egy konvencionális hemofilterrel, így képezve a bioarteficiális vesét, melyet tulajdonképpen vese segítő készüléknek neveznek.
- *In vitro* és *ex vivo* tesztek végeztek ezzel a vese segítő készülékkel állatokon és kritikus állapotban lévő betegeken igen kedvező eredményekkel; javuló kardiovaszkuláris és hemodinamikus paraméterekkel.

Vese terápia III.

Viselhető vese:

- Egy abszorbens rendszert használ, ami regenerálja a dializátumot, a peritoneális viselhető rendszerre emlékeztetve.
- A jelenlegi dialízis rendszerekhez képest ez a rendszer 10 órán keresztül tolerálható volt a betegek számára.
- A kísérletes rendszerben átlagosan 99.8 ± 63.1 mg β_2 -microglobulin lett eltávolítva, átlag 11.3 ± 2.3 ml/min „clearance”-el, 445.2 ± 326 mg foszfát távolítódott el, az átlagos plazma foszfát „clearance” 21.7 ± 4.5 ml/min volt. Ezek a clearance adatok összehasonlíthatóak az átlag urea kreatinin plazma „clearance”-el (21.8 ± 1.6 és 20.0 ± 0.8 ml/min).

Vese „szövetmérnökség” (Tissue Engineering)

Részleges vagy teljes *de novo* rekonstrukciója az egész szervnek vizsgálható potenciális klinikai felhasználással.

Ex novo vese rekonstrukció:

- Igen nagy erőfeszítés fejtenek ki arra, hogy kifejlesszenek *in vitro* funkcionális szervet vagy szövetet ami reprezentálja a vese természetes morfológiáját és élettanát.
- Fontos, hogy ez a szerv beültetés esetén se legyen immunogén.
- Az *in vitro* alapváz („scaffold”) különböző sejtek beültetése után képes lehet a vese 3D struktúrájának a kialakítására.

Embriónális vese kultúra transzplantációs felhasználás céljából

- A megfelelő növekedési faktorok adásával az elágazódó ureterbimbó (a vese gyűjtőcsatorna rendszerének előalakja) sikeresen fenntartható *in vitro*, majd ez indukálhatja a metanefrikus mezenchyma (MM, szövet, melyből a nefron ered) növekedését és differenciálódását egy elsődleges vesévé, ami már felhasználható a transzplantációban.
- Lehetséges, hogy ezeket a embrionális metanefroszokat (maradandó vese) egy *in vivo* rendszerbe ültessék be, és demonstrálható, hogy ezek a vesék életképesek, fejlődnek illetve képesek szűrlet előállítására.

Mesterséges alapvázak a vese transzplantációban I.

- A szöveti mérnökség azon az elképzelésen alapul, hogy egy alapvázat (természetes vagy mesterséges) felhasználva, ami vázként szolgál a beültetett különböző sejtípusok számára, majd egy 3D stúkturát képez az osztódó és differenciálódó sejteknek, hogy egy működőképes szervet hozzanak létre.
- A váz tartalmazhat biológiai anyagokat (szénhidrátokat, fehérjéket, és peptideket); szintetikus anyagokból is állhat, mint polymer, kerámia és fém; illetve emberi és állati eredetű szövetekből.
- *Ex novo* vese rekonstrukcióban, kollagén és matrigél váz, hőérzékeny polimerek, üreges rostok vagy előformázott lebomló polimerek lehetnek használatosak, bár ezek az anyagok nem képesek teljes mértékben reprodukálni a bonyolult szerkezetek pontos, térbeli szerveződését.

Mesterséges alapvázak a vese transzplantációban II.

- Az alapvázak és élő sejtek összevegyítése igen nagy kihívást jelentő feladat.
- Egy kollagén alapú kultúrába sikeresen lehet primér vesesejteket helyezni, illetve hasonló a helyzet vese progenitor sejtek és mesterséges poliészter interstitium esetében.
- A glomeruláris epitél sejtek és mezangiális sejtek is mutattak *in vitro* szöveti rekonstrukciós és polaritás képességet.
- Szarvasmarhában szomatikus sejtmagtranszferrel létrehoztak identikus vesesejteket. A sejtek kinyerése és markerekre (aquaporin 1, AQP2, synaptopodin) való karakterizálása után, egy kollagénnel borított henger alakú polikarbonát membránra helyezték a sejteket és visszajutatták az állatba. A transzplantált sejtek 12 hét múlva képesek voltak vizeletet termelni.

Blasztociszták felhasználása *de novo* vese regenerálásban

- Normál ES sejtek bejuttatása RAG2 deficiens egér blasztocisztáiba (melyeknek normál esetben nincsenek limfoid sejtjük) olyan szomatikus kimérákat eredményezett, melyek rendelkeztek érett B és T sejtekkel.
- Normál ES sejtek injektálása Sall1-null egerekbe, melyeknek nincs veséjük, a ES sejtek által létrehozott metanefridiumokat eredményezett.
- Továbbá az iPS sejtekből leszármaztatható sejtek is képesek, a a vese niche-t elfoglalni és egy komplex szerv létrejötte is megvalósítható donor iPS sejtekkel.

***De novo* vese regeneráció xenoembriókból I**

- A metanephros fejlődése során, a metanefrikus mezenhima elsőként létrehozza a nefrogén húr hátulsó szakaszát és gliális neurotrofikus faktort (GDNF) termel, mely a közeli Wolff-csövet indukálja, hogy létrehozza a ureterbimbót. Amikor ez az epitél-mezenhima indukció jelentkezik, a GDNF molekulának kapcsolódnia kell a Wolff csövön expresszálandó c-ret receptorához.
- GDNF-t expresszálandó hMS sejtek képesek lehetnek vese struktúrákat létrehozni, ha a bimbórégióba kerülnek bejuttatásra és olyan szolúbilis faktorokkal aktiválják őket, ami megfelel térben és időben a fejlődő környezetnek.

De novo vese regeneráció xenoembriókból II

- A vesebimbó kialakulása előtti patkány embriókat izoláltak az anyákból és addig nevelték egy sejtkultúra flaskában, amíg a vese kifejlődött és így egy *in vitro* szervkultúrát hoztak belőlük létre.
- hMS sejteket injektáltak a kezdeti stádiumú embriókba vesebimbójába.
- A kialakult mezonefrosz területén számos riporter gén pozitív sejtet azonosítottak, melyek megfeleltethetőek voltak morfológiailag a tubuláris epitél sejteknek, intersticiális sejteknek és glomerulus epitélsejteknek.
- Ez az adatsorozat azt reprezentálja, hogy egy xenobiotikus fejlődési folyamat is kivitelezhető embriókban humán MS sejteket felhasználva, melyek epitél konverzió esnek keresztül. Így létrejönnek a nefronban glomerulus epitélsejtek (podociták) és tubuláris epitélsejtek is. A hMS sejteket vese alapállomány sejtekké is lehet differenciáltatni.

De novo vese regeneráció xenoembriókból III

- A sikeres fejlődés után a következő lépés annak a tisztázása volt, hogy ezek funkcionális vesék lesznek-e; képesek e vizeletet termelni.
- A létrehozott vesének szüksége van vaszkuláris rendszerre is, a metanefrosz képes nőni és egy funkcionális vesét létrehozni, hogy az omentumba erek kerültek behelyezésre.
- Az újvese érrendszere a befogadó omentumjából ered és kapcsolatban áll a teljes keringéssel, ami azt feltételezi, hogy képest vért szűrni és vizeletet termelni.
- Továbbá az újvese humán eritropoetint (EPO) is termelt, ami elősegíti a vörösvérsejt szintézist, tehát a vese egyéb funkciói is működőképeseek.

Ős/progenitor sejtek a vese regenerációban

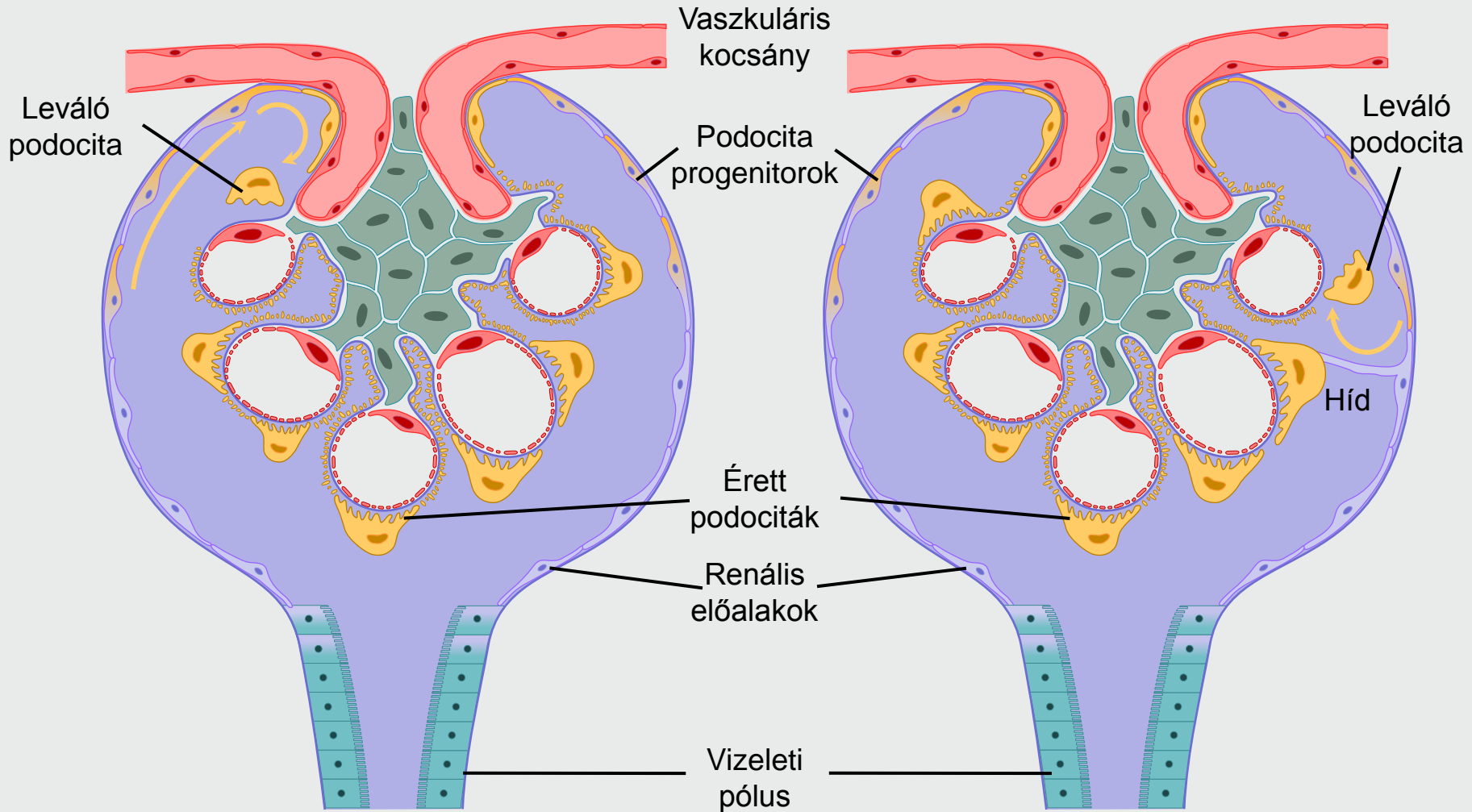
- Különböző őssejt típusok vannak jelen, más-más önmegújító képességgel és pluropotenciális kapacitással.
- Normál fiziológias állapotban a vese nagyon alacsony regenerációs képességgel rendelkezik az egyéb szervekhez hasonlítva.
- Ám sérülés után pl. akut tubuláris nekrozis során, a tubuláris epitél sejtek osztódnak és helyrehozzák a károsodott tubulusokat.
- Kísérletes bizonyítékok vannak arra, hogy in vitro felnevesztett mezenchimális őssejtek, beinjektálva képesek javítani a vese regenerálódást ischaemia és kémiai ágens okozta akut tubuláris sérülés után.

Endogén őssejtek

- Az embriógenézis során a legtöbb renáli parenchyma sejt a metanefridiális mezenhimális sejtekből ered, ezek a sejtek multipotensek és képesek önmegújításra.
- Számos állatmodellben azonosítottak vese progenitor sejteket. A vese különböző területein találhatóak úgy, a tubuláris sejtek mentén, Bowman tokban, a papilláris régióban, és a kérgi interstitiumban.
- Az emberi vesében egy progenitor populáció (CD133+/CD24+) a glomerulus vizeleti pólusában található. Stimulálás során ezek a sejtek tubuláris epitél sejteket és podocitákat hoznak létre.

Egy másik sejtpopuláció (CD133+/CD24+/PDX+) a vizeleti pólus és a vaszkuláris pólus között helyezkedik el és csak podocitákat hoz létre.

Renális előalakok



Exogén őssejtek

- A csonvelőből, amnionfolyadékból izolált őssejtek, MS sejtek lehetnek elsősorban a külső forrásai egy a vesebetegséget célzó megfelelő terápiának.
- Ezen őssejtek bejuttatása a sérült vese funkcionális javulását okozta.
- Nem ismert, hogy ezek a sejtek milyen mechanizmusok révén képesek hatni a degenerálódott szövet területén.
- A lehetséges mechanizmusok között szerepel a transzdifferenciáció és a sérült szövetbe történő beépülés. Ebben az utóbbi esetben a hatékonyság a 2% - 20% között ingadozik.
- Ellentétben az alacsony hatékonysággal a terápiának pozitív a kimenetel, talán a sérült sejtek által szekretált citokinek autokrin és parakrin mechanizmusai is közrejátszanak ebben az eredményben.

Az előalakok által termelt humorális faktorok szerepe a vese regenerációban

- A vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF) csökkenti a glomerulus gyulladását és elősegíti a glomerulus kapillárisainak az újraképződését.
- A hepatocita növekedési faktor (HGF) egy angiogén növekedési faktor, ami megóvja az epitél sejteket a pusztulástól, elősegíti a regenerálódást és újrászervezi a sérült, fibrotikus veseszövetet.
- Inzulin-szerű növekedési faktor (IGF) adása elősegíti a glomerulus szűrési képességét, mitogén a proximális tubuláris epitél sejtek számára
- Ezek a hatások külön-külön kerültek megfigyelésre, az együttes hatás ismeretlen.

Mikrovezikulák és a sejt-sejt kommunikáció

- A sejtek képesek mikrovezikulákat *in vivo* kibocsátani.
- Ezek a mikrovezikulák az endoszomális membránkompartimentből erednek és a plazmamembránnal történt fúzió után a sejtek kibocsátják őket. A mikrovezikulák termelése ligandumok és stressz szignálok általi sejtaktiváció során történik.
- A mikrovezikulák genetikai információ, úgy mint mRNS vagy akár mikroRNS szállítására is képesek a sejtek között.
- Manapság már az is ismert, hogy a mikrovezikulák akár receptor-ligand kölcsönhatásokat is képesek kialakítani a sejtekkel.

Mikrovezikulák és őssejtek

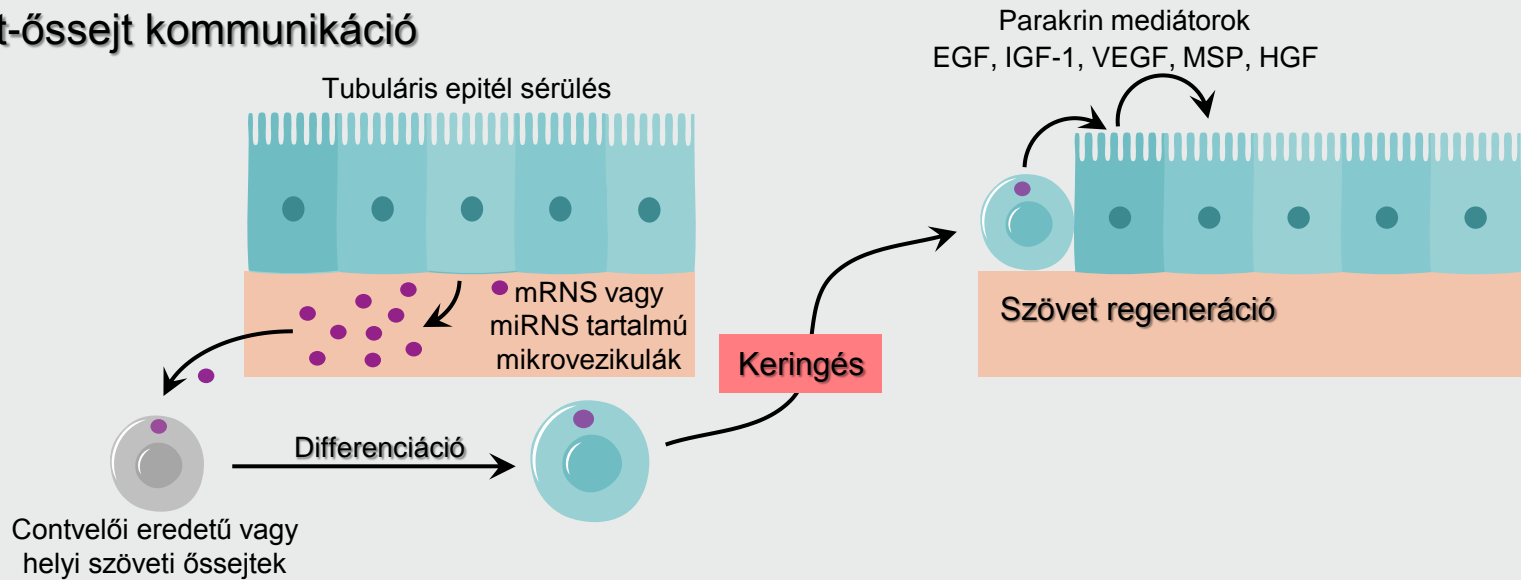
- Az őssejtek fenotípusa reverzibilisen változik a sejtciklus során.
- Ugyanazon őssejt más fenotípussal rendelkezhet különböző funkcionális állapotban függően éppen az aktuális sejtciklus fázistól.
- Ez a dinamikus állapot a mikrokörnyezet és – különösképpen - a mikrovezikulák által, sejtek között közvetített genetikai információ által szabályozott.
- Az endotél progenitor sejtek (EPC) létrehoznak mikrovezikulákat, melyeket felvéve egy horizontális mRNS transzfer során a normál endotél sejtekben egy angiogén program aktiválódik.
- Az ES sejtek által termelt mikrovezikulák képesek mRNS és proteinek segítségével a hematopoietic előalakokat újraprogramozni.
- Ez azt mutatja, hogy az őssejtek feltehetőleg biológiailag aktív mikrovezikulákat bocsátanak ki nemcsak a környezetükbe, hanem a vérbe is, mivel a csontvelőt is képesek aktiválni.

Mikrovezikulák szerepe a vese regenerációban

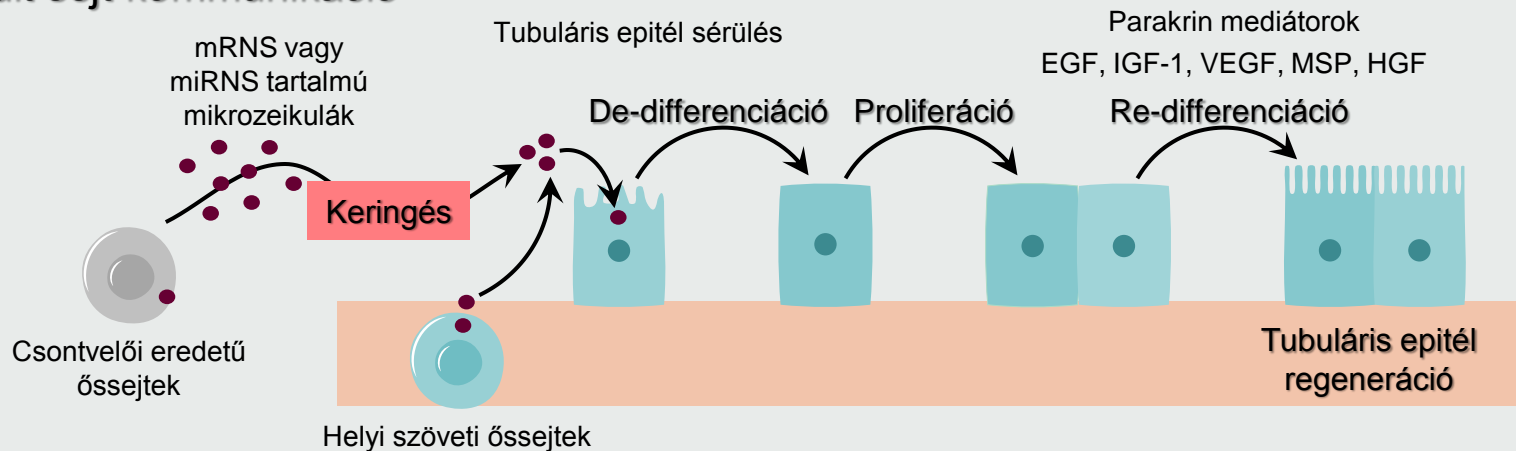
- A humán MS sejtek képesek mikrovezikulákat kibocsátani és a tubular epitél sejtek *in vitro* proliferációját ill. apoptózis rezisztenciáját kiváltani.
- Továbbá, elősegítik *in vivo* SCID egérben a tubuláris sejtek morfológiai és funkcionális regenerálódását kémiaailag indukált AKI után.
- A mikrovezikulák RNáz kezelése megszüntette mind az *in vitro* és *in vivo* hatásait a mikrovezikuláknak, ezzel bizonyítva azt, hogy RNS által indukált folyamatról van szó.
- Az őssejtek által kibocsátott mikrovezikulák a sérülést túlélő helyi sejtek dedifferenciálódását fogják okozni, ezzel tranziensen képesek lesznek egy őssejt-szerű fenotípust felvenni és a szöveti regenerálódási programot aktiválni.

Az őssejtek javító mechanizmusai a vese regenerációban

Sérült sejt-őssejt kommunikáció



Őssejt-sérült sejt kommunikáció



Génterápia a vesebetegségekben I

Génterápia akut vesekárosodás esetén: Az AKF során helyi gyulladás, kemotaktikus, kemoattraktáns faktorok termelése történik a magas apoptózis és károsodott regeneráció mellett.

- Az NF κ B jelátvitel blokkolása gátolja a citokinek/kemokinek (MCP1) termelését, csökkenti a gyulladásos sejtek megjelenését.
- Az ICAM 1 expresszió csökkentése antiszenz oligokkal szintén csökkenti a bevándorló neutrofilek számát.
- A komplement 3 lecsendesítése és a Bcl2 expresszió megemelése adenovírus transzfekcióval megmenti a vese sejteket a kiterjedt apoptózistól.
- A hepatocita növekedési faktor (HGF) kezelés csökkenti a gyulladást és a szöveti degenerációt.

Génterápia vesebetegségben II

Génterápia krónikus vesekárosodásban:

- A gyulladásos és nem gyulladásos folyamatok közötti egyenlőtlenség az alapja a krónikus vesekárosodásnak. Ennek legfőbb résztvevője a TGF- β citokin, ami elősegíti a kollagén lerakódással járó fibrózist.
- A TGF- β jelátvitel komplex mechanizmusai miatt számos elképzelés van, hogy lehetne ennek az aktivációnak az ellenőrzését elérni, különösen a SMAD (2/3, 4, 7) molekulákon keresztül. A SMAD 7 emelkedett expressziója (gátolja a TGF- β SMAD2/3 receptorait) megakadályozhatja a fibrózist és a gyulladást.
- Továbbá, a AP1 és NF κ B molekulákat célzó elképzelés is adott sikeres eredményeket.

Ex vivo génterápia:

- Az elterjedt vese transzplantáció és őssejt terápia esetén előnyös lehet az allogén szövetek immunogenitásának ellenőrzése. Erre vonatkozóva történtek próbálkozások CTLA4-Ig és rIL-10 konstrukciókkal.

Összefoglalás

- A vese a testünk leginkább differenciálódott szerve.
- A különböző háttérű veseelégtelenséggel járó betegségek száma egyre emelkedik a populációban.
- Ezen tényeket figyelembe véve, igen fontos, hogy a hagyományos vese terápiás megközelítéseket, új alternatív megoldásokkal lehessen javítani, kiegészíteni.
- Új adatok vannak arra vonatkozólag, hogy a vese regenerálódásra képes művi alapvázat és szomatikus sejteket felhasználva.
- Továbbá, ígéretes eredmények származnak az exogén és endogén őssejtek illetve gén terápia felhasználásából vese regenerációban.