

Embryonální kmenové buňky se množí a diferencují v ledvinách zbavených vlastních buněk – cesta k získání imunologicky shodných štěpů pro transplantaci ledviny?

Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 2009, doi:10.1681/ASN.2008111196.

Trvalý nedostatek kadaverózních štěpů a přetrvávající problémy s inkompatibilitou a infekčními riziky xenotransplantace vzbudily v poslední době velký zájem o možnost stimulace renálních kmenových buněk nebo podání kmenových buněk z kostní dřeně (eventuálně mesenchymálních kmenových buněk) nejen k dosažení lepší reparace poškozené ledviny, ale (nepochybně v podstatně delší časové perspektivě) i k potenciální regeneraci renálního parenchymu *in vitro*.

Studie s využitím kmenových buněk pro regeneraci ledvin jsou ale v samém počátku a stále není jasné, zda se kmenové buňky z kostní dřeně mohou diferencovat do různých typů renálních buněk (např. tubulárních buněk v modelech ischemické akutní tubulární nekrózy), nebo zda, jak ukazuje většina studií, tyto extra-renální kmenové buňky mají na reparaci ledvin jen relativně malý vliv a působí spíše uvolňováním solubilních faktorů, které mohou stimulovat proliferaci či diferenciaci renálních buněk (Romagnani a Kalluri, 2009). Větší pozornost je proto věnována identifikaci renálních kmenových buněk (Romagnani, 2009). Zatímco existence kmenových buněk v oblasti Bowmanova pouzdra, jež se zřejmě mohou diferencovat nejen do parietálních epitelů, a dokonce i podocytů, ale i buněk proximálního tubulu, se zdá být již poměrně dobře prokázána, přítomnost renálních kmenových buněk ve dření ledvin (se schopností proliferovat do tubulárních buněk distálního nefronu) se sice předpokládá, nebyla však dosud přesvědčivě dokumentována (Little a Bertram, 2009).

V komentované práci využili autoři poprvé zcela nový způsob možného *ex vivo* vytvoření „vlastních“ ledvin s využitím autologních kmenových buněk. Odebrané ledviny potkana byly postupně perfundovány neiontovými (Triton X-100) a iontovými detergenty (kalcium chloridem a magnesium sulfátem – aktivují endogenní nukleázy s následným natrávením jaderného materiálu), hyperosmolárním roztokem chloridu sodného s cílem osmoticky rozrušit jaderné membrány, deionizovanou vodou s cílem dále osmoticky poškodit přítomné buňky a vypláchnout podané detergenty a deoxyribonukleázou (k enzymatické degradaci jaderného materiálu). Ke všem použitým roztokům byl použit azid sodný jako antimikrobiální agens. Tímto způsobem byly vytvořeny bezbuněčné houbovité kostry zachovávající při histologickém vyšetření (vzhledem k nepoškozené extracelulární matrix a buněčným membránám) tvar původních ledvin a mikroskopicky struktury glomerulů i tubulů. Do této bezbuněčné ledvinové „kostry“ (lešení – „scaffold“) bylo poté intraarteriálně podáno 2×10^6 myších embryonálních kmenových buněk. Jejich lokalizace v bezbuněčné ledvinové kostře byla kontrolována fluorescenčním mikroskopem (buňky byla značeny zeleným fluorescenčním proteinem) a celý tento preparát byl kultivován při teplotě 37 °C v mediu obsahujícím 5% CO₂ bez růstových faktorů a proces proliferace a diferenciaci

podaných kmenových buněk v aceluární ledvinové kostře byl v pravidelných intervalech sledován mikroskopicky. Kultivace delší než 48 hodin ale vyžadovala pro další kultivaci vytvoření tkáňových řezů. V další fázi experimentů byla ledvinová kostra po podání embryonálních kmenových buněk promývána automatickým perfuzním systémem s kolísajícím perfuzním tlakem a kontrolou teploty a obsahu krevních plynů. Získané tkáňové řezy pak byly vyšetřovány mikroskopicky se současným studiem proteinů aktivovaných při diferenciaci (Pax-2 a Ksp-cadherinu), epitelizaci (cytokeratinu) a proliferaci (Ki-67).

Výše popsanou metodou se autorům podařilo opakovaně vytvořit aceluární ledviny (houbovité, komprimovatelné, ale opět se vracející do původního tvaru), které si ale zachovaly díky přítomnosti bazálních membrán a extraceluární matrix základní architekturu normálních ledvin, včetně aceluárních glomerulů, tubulů a vaskulárních struktur. Aceluární ledviny neobsahovaly ani buňky, ani jejich drť, naproti tomu v nich bylo možno imunohistochemicky prokázat v normální lokalizaci základní proteiny bazálních membrán kolagen IV a laminin. V původně aceluárních ledvinách zůstalo retinováno 95,1% intraarteriálně podaných embryonálních kmenových buněk (značených zeleným fluorescencem), a to ve vaskulárních strukturách a glomerulech. Postupně bylo možno pozorovat migraci podaných buněk i do peritubulárních cévních sítí, lepší výsledek poskytovaly aceluární ledviny promývané automatickým perfuzním systémem. V tkáňových řezech bylo možno prokázat nejen migraci, ale i proliferaci injikovaných embryonálních kmenových buněk. Do deseti dnů vyplnily migrující a proliferující embryonální kmenové buňky téměř kompletně glomeruly i peritubulární kapiláry, jejich dělení bylo možno prokázat barvením na proliferační marker Ki-67.

Intraarteriálně podané kmenové buňky ale až na vzácné výjimky nepronikaly do tubulárních struktur. K buněčné repopulaci distálního nefronu (počínaje kortikálním sběrným kanálkem) bylo třeba podat embryonální kmenové buňky cestou ureteru. Podání embryonálních kmenových buněk do kalichů aceluární ledviny vedlo k jejich postupné migraci do sběrných kanálků. Na rozdíl od velmi efektivní retence po arteriálním podání se ale při intraureterálním podání udrželo v aceluární ledvině jen asi 50 % podaných buněk a migrace do sběrných kanálků byla poněkud nehomogenní, což ale (dle autorů) může být způsobeno odlišnostmi v papilární struktuře mezi hlodavci a vyššími savci, jako jsou prasa nebo člověk, kde by teoreticky intraureterální podání embryonálních buněk mohlo být z hlediska retence účinnější.

Embryonální kmenové buňky se ve vaskulárních strukturách diferencovaly do typických endotelových buněk a také do tubulárních struktur, v obou případech s apoptózou centrálně lokalizovaných buněk a vytvářením dutých vaskulárních a tubulárních struktur. Diferenciaci embryonálních buněk bylo možno prokázat i imunohistochemicky, např. objevením cytokeratinu v oblastech, kde docházelo k reepitelizaci, Pax-2 v buňkách adherujících jak k tubulárním, tak vaskulárním bazálním membránám, nebo Ksp-cadherinu (markeru diferenciaci buněk distálního nefronu) v tubulárních buňkách.

■ KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.

Nepostradatelnost extraceluární matrix jak pro reparaci (in vivo), tak pro regeneraci orgánu (ex vivo) je dobře známa. První pokusy s využitím extraceluární matrix ukázaly její možné použití pro překrytí hernií, ale v experimentu také pro rekonstrukci tenkého střeva, a dokonce i srdce (Ott et al., 2008).

Regenerace aceluárních orgánů ex vivo vyžaduje podání kmenových buněk, které musejí být (zejména u komplexních orgánů, jako jsou ledviny) dostatečně pluripotentní, aby byly schopny diferenciaci do všech buněčných subtypů nezbytných pro normální strukturu a funkci orgánu. V tomto směru mohou být zejména v začátečních fázích výzkumu výhodnější embryonální kmenové buňky, i když je jasné, že pokud by měla být repopulace aceluárních orgánů cestou k náhradě orgánů u lidí, bylo by i z etických důvodů podstatně výhodnější používat kmenové buňky získané od dospělých jedinců (optimálně přímo od příjemců připravovaných orgánů). Nedávné první úspěchy s přeprogramováním fibroblastů do pluripotentních embryonálních kmenových buněk (Wernig et al., 2007) dávají naději, že to v budoucnu bude možné.

Tkáňové (a orgánové) inženýrství bude v případě ledvin pravděpodobně narážet vzhledem ke komplexnosti orgánu na ještě větší potíže než např. u střeva či srdce. Regenerace ledvin je komplikovanější i vzhledem ke vzniku ledvin jednak z metanefrického blastému, jednak z ureterálního pupenu (zejména struktury distálního nefronu a papil). Jak bylo demonstrováno i v této práci, pro efektivní repopulaci aceluárních ledvin bude navíc asi potřeba volit kombinaci intraarteriálního a intraureterálního podání kmenových buněk. Velkou pozornost bude nepochybně nutno ještě věnovat i optimálním metodám decelularizace ledvin. Nedokonalé odstranění buněk či celulární debris by výrazně zvýšilo riziko imunitní reakce na ex vivo připravené orgány. I když nelze vyloučit ani reakci proti aceluárním xenotransplantátům, zdá se, že by aceluární xenotransplantáty mohly být imunologicky tolerovány a neaktivují buněčnou imunitu (Allman et al., 2001).

Komentovaná práce je první prací ukazující možnost efektivní repopulace aceluární ledviny potkana. Autoři demonstrovali nejen vysokou (po intraarteriálním podání, resp. relativně vysokou po intraureterálním podání) retenci podaných embryonálních kmenových buněk v aceluární ledvině, ale také migraci kmenových buněk do vaskulárních, glomerulárních i tubulárních struktur a jejich diferenciaci do endotelových i tubulárních buněk.

Další kroky navazující na tuto první studii budou nepochybně muset řešit otázku optimální perfuze aceluární ledviny s dostatečnou dodávkou kyslíku i nezbytných živin a rovněž podání řady diferenciačních faktorů v optimálním pořadí a čase. Diferenciaci embryonálních kmenových buněk do renálních epitelových buněk bylo možno dosáhnout podáním kombinace kyseliny retinové, aktivinu-A a BMP-7 (Kim et al., 2005), eventuálně kombinací BMP-4, BMP-2 a BMP-7 (Bruce et al., 2007). Vývoj tubulů může být podpořen podáním kyseliny hyaluronové a vývoj cév podáním vaskulárního endotelového růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF – Badylak, 2005).

Podání embryonálních kmenových buněk má jistě i závažná potenciální rizika, např. vznik teratomu, tomu však pravděpodobně bude u aceluárních ledvin účinně bránit zachovaná struktura extraceluární matrix a bazálních membrán. Důležitým problémem může být přenos virových infekcí z dárce orgánu, i když příprava aceluárního orgánu (s využitím detergentu a nukleáz) by jistě měla toto riziko výrazně snížit.

Použití aceluárních xenotransplantátů osídlených vlastními kmenovými buňkami připravených ex vivo k náhradě funkce ledvin u dialyzovaných pacientů s terminálním selháním ledvin představuje velmi atraktivní perspektivu, i když eventuální klinické využití takto ex vivo připravených transplantátů si lze jistě představit jen v poměrně vzdálené budoucnosti.

Literatura

Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, et al. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a Th2-restricted immune response. *Transplantation* 2001;71:1631–1640.

Badylak SF. Regenerative medicine and developmental biology: the role of extracellular matrix. *Anat Rec B New Anat* 2005;287:36–41.

Bruce SJ, Rea RW, Steptoe AL, et al. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells toward a renal lineage. *Differentiation* 2007;75:337–349.

Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3527–3534.

Little MH, Bertram JF. Is there such a thing as a renal stem cell? *J Am Soc Nephrol* 2009;20(10):2112–2117, doi: 10.1681/ASN.2009010066.

Ott HC, Matthiesen TS, Goh S, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Med* 2008;14:213–221.

Romagnani P, Kalluri R. Possible mechanisms of kidney repair. *Fibrogenesis Tiss Rep* 2009;2(1):3, doi: 10.1186/1755-1536-2-3.

Romagnani P. Toward the identification of a „renopoietic system“? *Stem Cells* 2009;27:2247–2253.

Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448:318–324.

kreatininu nižší u přeživších. Tekutinové přetížení registrované u pacientů s AKI v době nejvyšší dosažené sérové koncentrace kreatininu bylo rovněž spojeno s menší pravděpodobností zotavení renálních funkcí. Navíc, čím více dní byli nemocní s AKI v tekutinovém přetížení a čím závažnější byla jeho míra, tím horší byla jejich mortalita. Pacienti léčení kontinuálními metodami snáze dosáhli redukce kumulativní pozitivní bilance než nemocní léčení intermitentními metodami. Autoři dospěli k závěru, že tekutinové přetížení, jeho trvání i závažnost jsou nezávisle spojeny s mortalitou kriticky nemocných s AKI. Zda je tekutinové přetížení výsledkem závažnějšího renálního selhání, nebo zda samo o sobě přispívá k jeho příčině, vyžaduje dle autorů klinickou studii, která bude úlohu kumulativní tekutinové bilance přímo testovat.