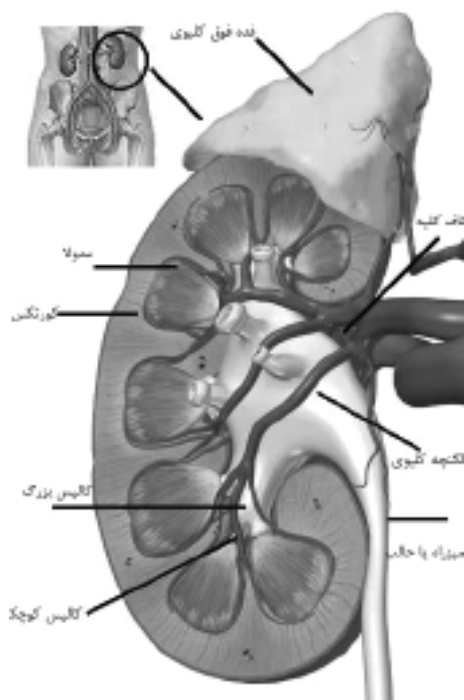


نگاهی اجمالی بر مهندسی بافت کلیه



شکل ۱. محل قرارگیری کلیه‌ها در بدن و برش مقطعی کلیه

از دست دادن بافت یا ارگان به دلیل تخریب جراحی یا غیر جراحی باعث بروز مشکلات عمده‌ای در سلامتی انسان می‌شود که شدیداً بر روی وضعیت بیمار و طول عمر او تأثیر می‌گذارد. روش‌های درمانی به صورت جراحی‌های سنتی، پیشنهاد می‌دهند که از یک ناحیه دوم، بافت‌های خودی برای ترمیم یا جایگزینی بافت‌ها یا ارگان‌های تخریب شده استفاده شود. برای برخی ارگان‌ها مانند کلیه پیوند آلوژنیک اجازه ترمیم کارکردی را می‌دهد. با این وجود، تأمین Allograft محدود است و لیست انتظار طولانی برای پیوند ارگان و بافت نشان‌دهنده نیاز به یک متد جدید به منظور غلبه بر محدودیت‌های درمان‌های قدیمی می‌باشد. کلیه انسانی، یک جفت ارگان لوبیایی شکل است که در ناحیه خلف صفاقی (رتروپریتونال یا پشت شکمی) قرار گرفته‌اند. محل قرارگیری آن‌ها به صورت طبیعی در قسمت فوقانی تا محاذات دنده ۱۲ و قسمت تحتانی تا سومین مهره کمری است. در برش عمودی کلیه‌ها، دو ناحیه مجزا مشاهده می‌شود. ناحیه بیرونی کم‌رنگ‌تر یا کورتکس، حدود ۱ سانتی‌متر ضخامت دارد. ناحیه تیره‌رنگ داخلی مدولا نام دارد و از ۶ تا ۱۵ (به‌طور میانگین تا ۸) ساختمان مخروطی شکل تحت عنوان هرم (پیرامید) تشکیل شده است. قاعده هریک از هرم‌ها در محل اتصال کورتکس و مدولا قرار گرفته است و رأس آن، پایبلا، به سمت ناف کلیه امتداد می‌یابد. مدولا نیز متعاقباً به دو ناحیه خارجی که حاوی رشته‌های خارجی و داخلی مدولای خارجی است و یک ناحیه داخلی که پایبلا را دربر می‌گیرد تقسیم می‌شود. این تمایز که از نظر ظاهری واضح است، حائز اهمیت است چراکه اجزای ویژه عروقی و توبولی هر ناحیه، همگی در عملکرد کلیه مهم هستند.

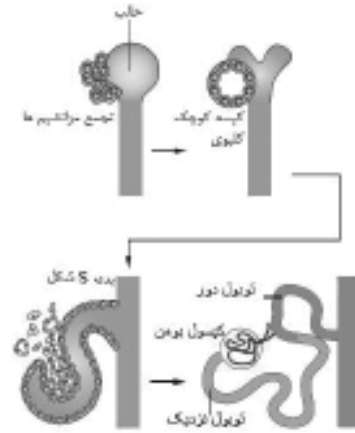
فیزیولوژی کلیه

- دفع محصولات زائد متابولیک، مواد شیمیایی خارجی، داروها و متابولیت‌های هورمون‌ها
- تنظیم تعادل آب و الکترولیت‌ها
- تنظیم فشار شریانی و تنظیم تعادل اسید و باز
- تنظیم تولید گلبول‌های سرخ
- تولید ۱-۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3

روند ترمیم کلیه

برای درک بهتر از توانایی ترمیم کلیه به اطلاعاتی از مراحل تکامل نیاز است. عملکرد کلیه ماهی‌های بدوی توسط پرورن‌ها انجام می‌شود. پرورن‌ها شامل یک مجرای بزرگ نفرون است که ضایعات را از بدن فیلتر می‌کند و به بیرون می‌فرستد، بنابراین تنها می‌تواند آب را به‌خوبی فیلتر کند. در ماهی‌های تکامل‌یافته‌تر، پرورن‌ها تنها در مراحل اولیه تکامل کار می‌کنند و در دوران بزرگسالی با یک عضو تصفیه جدید به نام مزونفرون جایگزین می‌شوند. مزونفرون دارای غده درون‌ریز (اندوکراین)

است و از صدها نفرون تشکیل می‌شود. بعد از ماهی‌های تکامل یافته، دوزیستان قرار دارند که توانایی زندگی در دو محیط آبی و خشکی را دارند. دوزیستان نیز در مراحل اولیه تکامل دارای پرونفرون‌ها هستند که در بزرگسالی به مزونفرون تبدیل می‌شوند.



شکل ۲. شکل‌گیری نفرون‌ها

داده‌های اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی و پیشرو در ترمیم کلیه نقش کلیدی بازی می‌کنند. برای مثال در ماهی‌ها، سلول‌های *Lhxa* +EGFP که سلول‌های بنیادی و *Wt1b* که سلول‌های پیشرو هستند وظیفه ساخت نفرون جدید را برعهده دارند. به‌علاوه، نفرون‌ها در کورتکس و مدولا قرار ندارند بلکه توسط یک بافت میان‌نهاد احاطه شده‌اند که در ساخت نفرون جدید مهم هستند. در حشرات نیز سلول‌های مزانشیم و بنیادی که سیگنال *JAK-STATE* را تولید می‌کنند مسئولیت ساخت نفرون جدید را برعهده دارند؛ اگرچه مطالعات زیادی در مورد دوزیستان صورت نگرفته است اما به‌دلیل شباهت با ماهی‌ها می‌توان گفت روند ساخت نفرون یکسان است ولی در قورباغه بالغ به‌دلیل *Post-metamorphosis* دیگر ساخت کلیه جدید صورت نمی‌گیرد. خونسردان نیز به‌عنوان حیوانات تکامل یافته‌تر دارای کلیه متانفریک هستند اما کورتکس و مدولا ندارند و هر نفرون در لوبول‌ها می‌چرخد و وارد مجرای ادرار می‌شود. در کلیه این موجودات ناحیه نفروژنیک وجود دارد که باعث ساخت نفرون جدید در ایگوآنای سبز، مارمولک و لاک‌پشت سبز می‌شود. البته در مارمولک به‌دلیل افزایش وزن، تعداد نفرون‌ها افزایش می‌یابد. با توجه به بررسی این دسته از موجودات، می‌توان دریافت که در کلیه‌های متانفرون نیز ساخت نفرون جدید ممکن است. پرندگان هم دارای کلیه متانفریک هستند و ساختار کلیه آن‌ها مابین خونسردان و پستانداران است. به این صورت که دارای نفرون‌هایی با لوله هنله و نفرون‌های محیطی هستند. نفرون‌هایی که دارای لوله هنله هستند توسط کورتکس و مدولا احاطه شده‌اند چون لوله هنله در اطراف مجرای ادرار الگوی متشعشعی را می‌سازد که باعث شکل‌گیری ناحیه کوچک مدولا در کلیه پرندگان می‌شود. اما نفرون‌های محیطی لوله هنله ندارند بنابراین کورتکس و مدولا دیده نمی‌شود. پستانداران به‌عنوان تکامل یافته‌ترین موجودات روی زمین، دارای مدولای عمیقی هستند که توسط لوله هنله و مجرای ادرار ساخته می‌شود و به‌شکل هرمی در کل کلیه پخش شده‌اند. تمامی نفرون‌ها لوله هنله دارند ولی طولشان در مدت

رشد متفاوت است، تعداد نفرون‌ها بسیار زیاد است و تنها در دوران جنینی امکان ساخت نفرون جدید وجود دارد و بعد از آن تنها در آسیب‌های نسبی، توانایی ترمیم نفرون‌ها توسط سلول‌های پیشرو دیده می‌شود. پستانداران را می‌توان در دو زیرمجموعه جنندگان و انسان‌ها بررسی کرد. در جنندگان مانند موش‌ها، نفرون‌ها توسط سلول‌های اپیتلیال باقی‌مانده و سلول‌های پیشرو ترمیم می‌شوند. سلول‌های پیشرو در این حیوانات در کنار سلول‌های تمایز یافته در توبول‌ها پراکنده شده‌اند. این سلول‌ها به مرگ مقاوم‌اند و در نواحی ترمیم‌شده معمولاً ۵۰ درصد جمعیت سلولی را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها در کپسول بومن نیز یافت می‌شوند و می‌توانند به دسته‌های مویرگ مهاجرت کنند. بنابراین جمعیت مختلفی از سلول‌های پیشرو در نفرون و شاخه و کپسول بومن پراکنده شده‌اند که توانایی ترمیم سلول‌های اپیتلیال توبول و گلومر را دارند. در انسان‌ها، سلول‌های بنیادی کلیه مارکر *CD133* و سلول‌های مزانشیم متانفریک مارکر *CD24* و سلول‌های پیشرو نیز هر دو را به‌صورت هم‌زمان بیان می‌کند. سلول‌های پیشرو در این موجودات ایزوله شده‌اند و قابلیت تمایز به اپیتلیال توبول و گلومر را دارند. این سلول‌ها در هفته ۸ و ۹ بارداری بسیار زیادند و با رشد انسان تعدادشان کاهش می‌یابد تا جایی که در انسان بالغ تنها ۲ درصد از جمعیت سلولی کلیه را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها به‌صورت‌های مختلف توبولی، پودوسیتی و کلیوی وجود دارند. سلول‌های پیشرو کلیوی در بدنه‌های شکل دارای فنوتیپی مشابه با ماهی‌ها و دوزیستان هستند و به‌عنوان منادی برای تمامی سلول‌های اپیتلیال نفرون غشایی عمل می‌کنند. اما در کلیه بالغ توانایی تمایز به دو سلول اپیتلیال گلومر و توبول را دارد و در نقطه‌ای بین این دو قرار گرفته است. سلول‌های پیشرو پودوسیتی دارای ویژگی‌های انتقالی از پودوسیت و پیشروها هستند و تنها به پودوسیت‌ها تمایز می‌یابند و در کپسول بومن قرار دارند. در آنها، سلول‌های پیشروی توبولی که ویژگی‌های انتقالی اپیتلیال توبول و پیشرو را دارند و تنها به سلول‌های توبول تمایز می‌یابد، فاکتور *CD106* را بیان نمی‌کنند و در توبول پراکنده شده‌اند. این سلول‌ها ۲ تا ۳ درصد از سلول‌های توبول را در کلیه سالم و بالغ تشکیل می‌دهند اما هنگامی که سلول‌های تمایز یافته اطرافشان می‌میرند، تعدادشان افزایش می‌یابد. در نتیجه سلول‌های پیشرو انسانی می‌توانند انسجام توبول را بعد از چند دوره تقسیم، حفظ کنند. در بیمارانی با آسیب حاد، سلول‌هایی که *CD133 + CD24 + CD106* - را بیان می‌کنند، تکثیر می‌یابند. هم‌چنین، افزایش تکثیر در سلول‌های پیشرو توبولی در بیمارانی با نکرز توبول حاد دیده شده می‌شود.

مهندسی بافت برای ترمیم کلیه

کلیه بافت بسیار پیچیده‌ای است و از سلول‌های گوناگون تشکیل شده است که عبارت‌اند از:

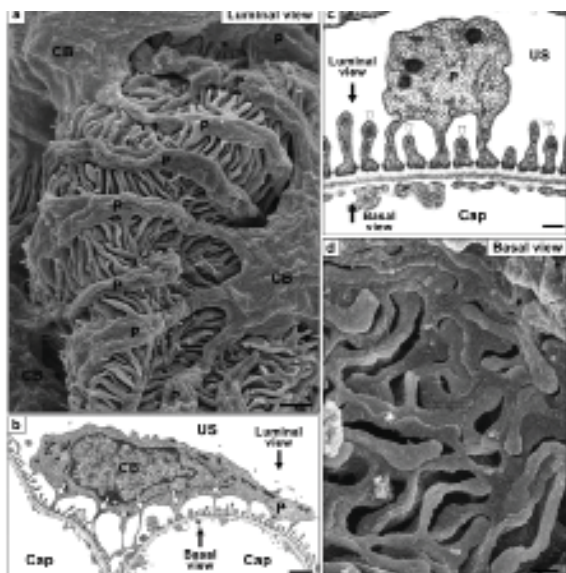
1. Kidney glomerulus parietal cell
2. Kidney glomerulus podocyte
3. Kidney proximal tubule brush border cell
4. Loop of Henle thin segment cell
5. Thick ascending limb cell
6. Kidney distal tubule cell

منابع سلولی

سلول‌های اولیه کلیه: این سلول‌ها را می‌توان از کلیه سالم یا بیمار دریافت کرد. سلول‌های توبول نزدیک نقش مهمی در عملکرد فیزیولوژی کلیه دارند. مشکل اصلی این سلول‌ها این است که بیان ژن‌های اساسی را در پاساژ دادن از دست می‌دهند بنابراین تنها بعد از دو تا پنج پاساژ قابل استفاده‌اند. در روش دیگر، تمامی سلول‌های آتولوگ کلیه استفاده می‌شوند. در این جا، دو زیر مجموعه سلولی داریم؛ یک، جمعیت غنی از سلول‌های توبول و دو، جمعیتی از سلول‌های حساس به اکسیژن که EPO (جمعیت سلولی B4) تولید می‌کنند. استفاده از سلول‌های شاخه صعودی و ضخیم لوله هنله و توبول دور نیز در درمان صدمات کلیوی مؤثر است.

سلول‌های بنیادی پرتوان: سلول‌های بنیادی جنینی یک نوع از این سلول‌ها هستند که برای تمایز به سلول‌های توبول و سلول‌های پرتوان القایی نوع دیگر هستند که برای پودوسیت استفاده می‌شوند. سلول‌های دیگر این دسته یعنی سلول‌های iPSC را می‌توان از مزاتزیوم انسانی، سلول‌های کلیوی موجود در ادرار و فیبروبلاست‌های بیماران کلیوی به‌دست آورد.

سلول‌های بنیادی Fetal و Adult: کار با این سلول‌ها از نظر ایمنی و اخلاقی مطمئن تر است. یک نوع از سلول‌های بنیادی Fetal، سلول‌هایی هستند که از مایع آمنیوم مشتق می‌شوند و توانایی تمایز بالایی دارند ولی تراتوما تشکیل نمی‌دهند. در تحقیقی، سلول‌های به‌دست آمده از آمنیوم نوزاد پسر در هفته ۱۲ تا ۱۸ حاملگی که دارای Lac-Z است را به کلیه جنینی تزریق کردند و آن را در محیط برون‌تنی کشت دادند و توانستند کلیه جنینی را به‌دست آورند. سلول‌های بنیادی Adult مانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان، چربی، عصبی مغز، خونی، کبد و اپیتلیال از رده سلول‌های دیگری هستند که می‌توانند در بازسازی کلیه استفاده شوند.



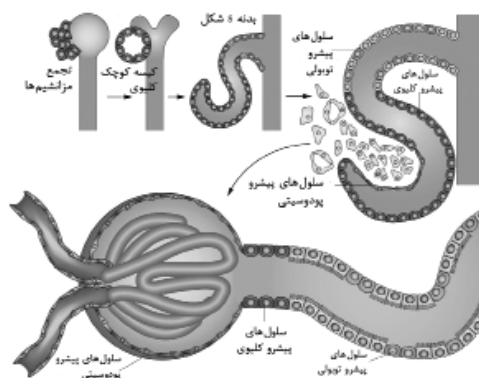
شکل ۴. سلول‌های دیواره جسمک گلومرولی

7. Collecting duct principal cell

8. Collecting duct intercalated cell

9. Interstitial kidney cells

آسیب‌های کلیوی به دو صورت حاد و مزمن است. در نوع حاد نکرور و آپوپتوز توبول، تغییر موانع فیلتراسیون، فیلتراسیون نادرست گلومرول، تنگ‌شدگی و انسداد توبول به‌همراه تورم ایترستیتال و فعال‌شدن آنزیم‌های پروتئولیتیک مشاهده می‌شود. اگر سلول‌های آسیب‌دیده با سلول‌های عملکردی توبول جایگزین نشوند فیروز توبول و ایترستیتال رخ می‌دهد که منجر به آسیب مزمن می‌شود. درمان‌های موجود مانند دیالیز تنها عملکرد فیلتراسیون کلیه را با حذف مواد خاص سمی از خون انجام می‌دهد ولی تولید اریتروپوئین و فعال‌سازی ویتامین D را انجام نمی‌دهد. با توجه به این محدودیت‌ها برای درمان آسیب‌های کلیوی به بازسازی کلیه با سلول‌های خاص و عملکردی کلیه نیاز است. پیشرفت آسیب‌های مزمن به بیماری مرحله نهایی کلیه ختم می‌شود که تنها درمان آن پیوند کلیه است. اما دهنده‌های کلیه تنها، ۲۵ درصد نیاز را برطرف می‌کنند بنابراین مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی راه حل‌های امیدوارکننده‌ای به نظر می‌آیند. اجزای اصلی برای مهندسی عملکرد کلیه سلول زنده، داربست‌ها بر پایه بیومتریال‌ها، فاکتورهای زیست‌فعال و ریزمحیط‌های مناسب هستند که رفتار سلولی را بهبود می‌بخشند. به دلیل مشکل بودن بازسازی ساختار کلیوی آسیب‌دیده، در مطالعات اولیه، بافت کلیوی پاتولوژی را با ساختاری حاوی سلول‌های کلیوی جایگزین می‌کردند. کاشت این سازه در محیط درون‌تنی، تشکیل ساختار کلیوی که مایع مشابه اوره تولید می‌کرد را نشان داد. نتایج حاکی از امکان برگرداندن عملکرد کلیه با این سازه‌های مهندسی شده بود. اطلاعات بیولوژی سلول‌های بنیادی و تکنیک‌های کشت سلولی سبب شد تا مطالعات پایه‌ای برای تعیین نوع سلول مورد استفاده صورت گیرد. برای مثال پودوسیت‌ها جمعیت حائز اهمیت سلولی در گلومرول هستند که در فیلتراسیون گلومرول از سلول‌های اندوتلیال و مزاتزیوم نقش مهم‌تری دارند. اما در کلیه صدمه‌دیده محدودیت تکثیر دارند و کاهش ۲۰ تا ۶۰ درصد از پودوسیت‌ها باعث نکرور گلومرول می‌شود. بنابراین محققان در تلاش هستند تا با استفاده از فاکتورهای زیست‌فعال برونی یا ادغام سلول‌های کشت‌شده در کلیه، عملکرد آن را بازسازی کنند.



شکل ۳. محل قرار گیری سلول‌های پشرو در کلیه انسان

استفاده شده است و تشکیل ساختار مشابه گلومرولی و توبولی، شاخه‌های Ureteric Bud و تشکیل مایع شبیه به ادرار در تمامی موارد مشاهده گردیده است.

اما در مرحله نهایی بیماری کلیه، چندین ارگان تحت تأثیر قرار می‌گیرند. روش‌های جدید که جایگزین پیوند کلیه هستند عبارت‌اند از استفاده از داربستی که سلول‌های اولیه آن برداشته شده و سلول‌های کلیه دوباره روی آن قرار می‌گیرند و چاپ ۳ بعدی زیستی. در روش اول کلیه انسان، خوک، میمون و جوندگان مورد بررسی قرار گرفته است. مزیت این روش این است که شبکه عروقی و ماتریس خارج سلولی بافت را داریم که برای تمایز سلول‌ها به سلول کلیه و ایجاد بافت جدید مناسب است. ولی مشکل این روش ایجاد ترمبوز در رگ‌سازی مجدد و انتخاب منبع سلولی است. با توجه به تکنولوژی تغییر ژنوم و iPSC ها به نظر می‌رسد این سلول بهترین سلول برای ایجاد کلیه جدید خواهند بود. مسیر انتقال سلول‌ها، چالش پیش روی دیگری است. با توجه به این که بیوشیمی و بیوفیزیک در مسیر تکثیر، تمایز و بلوغ سلول‌ها اثر می‌گذارد باید بیش‌تر مورد بررسی قرار گیرند. در مطالعات اخیر از میزراه و سرخرگ کلیه برای انتقال سلول‌ها به داربست استفاده کرده‌اند. بیوراکتورها نیز مسیر مناسب برای انتقال سلول‌ها هستند که می‌توان از تغذیه سلول‌ها هم اطمینان کامل داشت. با این حال اطلاعات کامل تری برای نشان دادن سلول‌ها بر روی داربست نیاز است (چگالی سلول، مسیر و روش کاشت سلول) تا چگالی مناسب سلول را در تمامی قسمت‌های داربست بدون سلول داشته باشیم.

تازه‌ترین روش چاپ ۴ بعدی زیستی است، در رابطه با ترمیم کلیه، به دلیل دشوار بودن تقلید ساختار ECM، جمعیت گوناگون سلول‌ها و سازمان‌دهی فضایی با محدودیت‌های بسیاری روبه‌رو هستیم. بنابراین داربست‌های کلیه‌ای آسولار شده می‌توانند گزینه مناسبی باشند تا سلول‌های مختلف روی آن‌ها چاپ شوند. به‌علاوه، امروزه کلیه‌های چاپ‌شده با استفاده از هیدروژل‌ها و سلول‌های بنیادی در ابعاد مینیاتوری وجود دارند و توانسته‌اند ۵۰ درصد از سلول‌های چاپ‌شده را تا ۳ ماه زنده نگه دارند.

فهرست منابع:

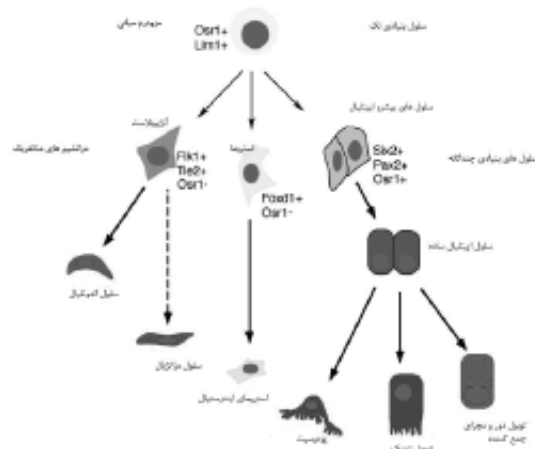
- [1] Amiel, G. E., Yoo, J. J. and Atala, A.: Renal tissue engineering using a collagen-based kidney matrix. Tissue Engineering suppl, 2000.
- [2] Dekel, H. Marcus, B.H. Herzel, et al. In vivo modulation of the allogeneic immune response by human fetal kidneys: The role of cytokines, chemokines, and cytolytic effector molecules Transplantation, 69 (2000), pp. 1470-1478.
- [3] M. Statter, K.J. Fahrner, E.M. Barksdale, et al. Correlation of fetal kidney and testis congenic graft survival with reduced major histocompatibility complex burden Transplantation, 47 (1989), pp. 651-660

زیست فعال‌ها

فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها جز فاکتورهای زیست‌فعال هستند که برای ترمیم بافت‌های گوناگون استفاده می‌شوند. برای ترمیم آسیب‌های کلیوی فاکتورهای رشد مانند EGF برای سلول‌های توبول نزدیک TGF α برای افزایش سنتز DNA بعد از مسمومیت کلیه، IGF1 برای افزایش تکثیر بافت، HGF، FGF، مورد بررسی قرار گرفتند و اثرات مثبت آن‌ها مشاهده شده است.

دستاوردهای مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی برای درمان بیماری‌های کلیوی

باتوجه به مبهم‌بودن سرنوشت سلول‌های بنیادی در بدن، استفاده از این سلول‌ها به مراحل پیش‌بالینی یا آزمون‌های بالینی محدود می‌شود. در مراحل بالینی برای سلول‌درمانی از سلول‌های اولیه کلیه استفاده می‌شود. در چندین مطالعه استفاده از سلول‌های مزانشیمی، مغز استخوان بررسی شده است. تزریق بیرونی این سلول‌ها باعث ترشح آگروزوم‌های شامل microRNA می‌شود که به روند ترمیم در آسیب‌های حاد و مزمن سرعت می‌بخشد.



شکل ۵. تأثیر فاکتورهای رشد در تمایز به سلول‌های کلیه

استفاده از سلول‌های بنیادی چربی در جوندگان و مدل‌های حیوانی بزرگ در فیبروز کلیوی، بهبود مناسبی را پس از ۳ ساعت از جراحی نشان داده است. همچنین اگر این سلول‌ها را در شرایط محیطی سلول‌های مشتق‌شده از اپیتلیال توبول قرار دهیم به سلول‌های اپیتلیال متمایز می‌گردند. اثرهای درمانی مؤثر از سلول‌های بنیادی دیگر مانند iPSC و AFSC و سلول‌های پیشرو اندوتلیال در مدل‌های گوناگون بیماری‌های کلیوی نیز دیده شده است. از داربست‌های سه بعدی و هیدروژل‌هایی از جنس کلاژن (شبیه‌سازی غشای پایه گلومرول) هیالورنیک اسید و PGA هستند با استفاده از سلول‌های اولیه کلیه مانند مزانشیم و اپیتلیال گلومرول، سلول‌های توبول دور و نزدیک، سلول‌های مزانشیم و سلول‌های بنیادی fetal و iPSC