

32. Andress D. Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation. Implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs* 2007; 67: 1999–2012.
33. Brancaccio D, Cozzolino M, Pasho S, Fallabrino G, Olivi L, Gallieni M. New acquisitions in therapy of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease and peritoneal dialysis patients: role of vitamin D receptor activators. *Contrib Nephrol* 2009; 163: 219–26.
34. Cardus A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 860–6.
35. Mizobuchi M, Finch J, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification on uremic rats. *Kidney Int* 2007. In press.
36. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117: 503–11.
37. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002; 8: 174–9.
38. Eleftheriadis T, Antomiadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I, Galaktidou G. Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (LPS) TNF- α and IL-8 production by peripheral blood mononuclear cells. *Int Urol Nephrol* 2010; 42: 181–5.
39. Schwartz GG, Eads D, Naczki C, Northrup S, Chen T, Koumenis C. 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₂ (Paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy* 2008; 7: 1–7.
40. Flanagan JN, Zheng S, Chiang KC, Kittaka A, Sitaki K, Nakabayashi S, et al. Evaluation of 19-nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ as a therapeutic agent for androgen-dependent prostate cancer. *Anticancer Res* 2009 Sep; 29: 3547–53.
41. Kumagai T, O'Kelly J, Said JW, Koeffler HP. Vitamin D₂ analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 896–905.
42. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Akizawa T, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1796–806.
43. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 76: 1248–57.
44. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, Wisinger JR, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008; 74: 1394–402.
45. Doorenbos CRC, van den Born J, Navis G, de Borst MH. Possible renoprotection by vitamin D in chronic renal disease: beyond mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 691–700.
46. Nishizawa Y, Shoji T. Does paricalcitol reduce proteinuria in patients with chronic kidney disease? *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006; 2: 352–3.
47. Alborzi P, Patel NA, Peteson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease. A randomised double-blind pilot trial. *Hypertension* 2008; 52: 249–55.
48. Agarwal R, Acharya M, Tian J, Heepensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 2823–8.
49. deZeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, garimella T, et al. The selective vitamin D receptor activator for albuminuria lowering (VITAL) study. *Lancet* 2010; 376: 1543–51.

Od tkivnega inženirstva do regenerativne medicine – sodoben pristop k rekonstrukciji sečil

From tissue engineering to regenerative medicine – a modern approach to the reconstruction of the urinary tract

Urška Dragin Jerman, Mateja Erdani Kreft

Izveček

Izhodišča: Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, ki postaja vedno pomembnejši del regenerativne medicine, saj razviti tkivni nadomestki omogočajo obnove, vzdrževanje in izboljšanje funkcij poškodovanega ali okvarjenega tkiva. Zaradi številnih bolezni sečil, ki zahtevajo obnove ali nadomestitev tkiva ali organa, se tehnike tkivnega inženirstva vedno bolj uveljavljajo tudi v regenerativni medicini sečil.

Zaključki: Študije na živalskih modelih kot tudi klinične študije dokazujejo, da je s tkivnim inženirstvom mogoče vzpostaviti funkcionalna tkiva, primerna za uspešno rekonstrukcijo tkiv in organov sečil. To delo podaja pregled najnovejših spoznanj o uporabi, uspešnosti in omejitvah različnih tehnik tkivnega inženirstva pri rekonstrukciji sečnice, sečnega mehurja, sečevodov in ledvic.

Abstract

Background: Tissue engineering is a rapidly developing interdisciplinary field, which is becoming an increasingly important part of regenerative medicine. The tissue-engineered substitutes enable the restoration, maintenance and improvement of the functions of damaged or defective tissue. Given the number of urinary tract diseases, which require repair or replacement of the tissue or organ, the techniques of tissue engineering are also gaining importance in regenerative medicine of the urinary tract.

Conclusions: A number of animal studies and several clinical studies have shown that it is possible to reconstruct urinary tract tissues and organs using tissue engineering. This review provides a detailed survey of the latest knowledge on the use, effectiveness and limitations of various tissue engineering techniques for reconstruction of the urethra, urinary bladder, ureters and kidneys.

Univerza v Ljubljani,
Medicinska fakulteta,
Inštitut za biologijo
celice, Lipičeva 2,
SI-1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

doc. dr. Mateja Erdani Kreft, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Lipičeva 2, SI-1000 Ljubljana, Tel.: +386 1 543 76 93, Fax: +386 1 543 76 81, Email: mateja.erdani@mf.uni-lj.si

Glavne besede:

tkivno inženirstvo, regenerativna medicina, tkivni nosilec, matične celice, sečila

Key words:

tissue engineering, regenerative medicine, supporting matrix (scaffold), stem cells, urinary system

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81: 735–44

Prispelo: 20. jul. 2011,
Sprejeto: 26. mar. 2012

Uvod

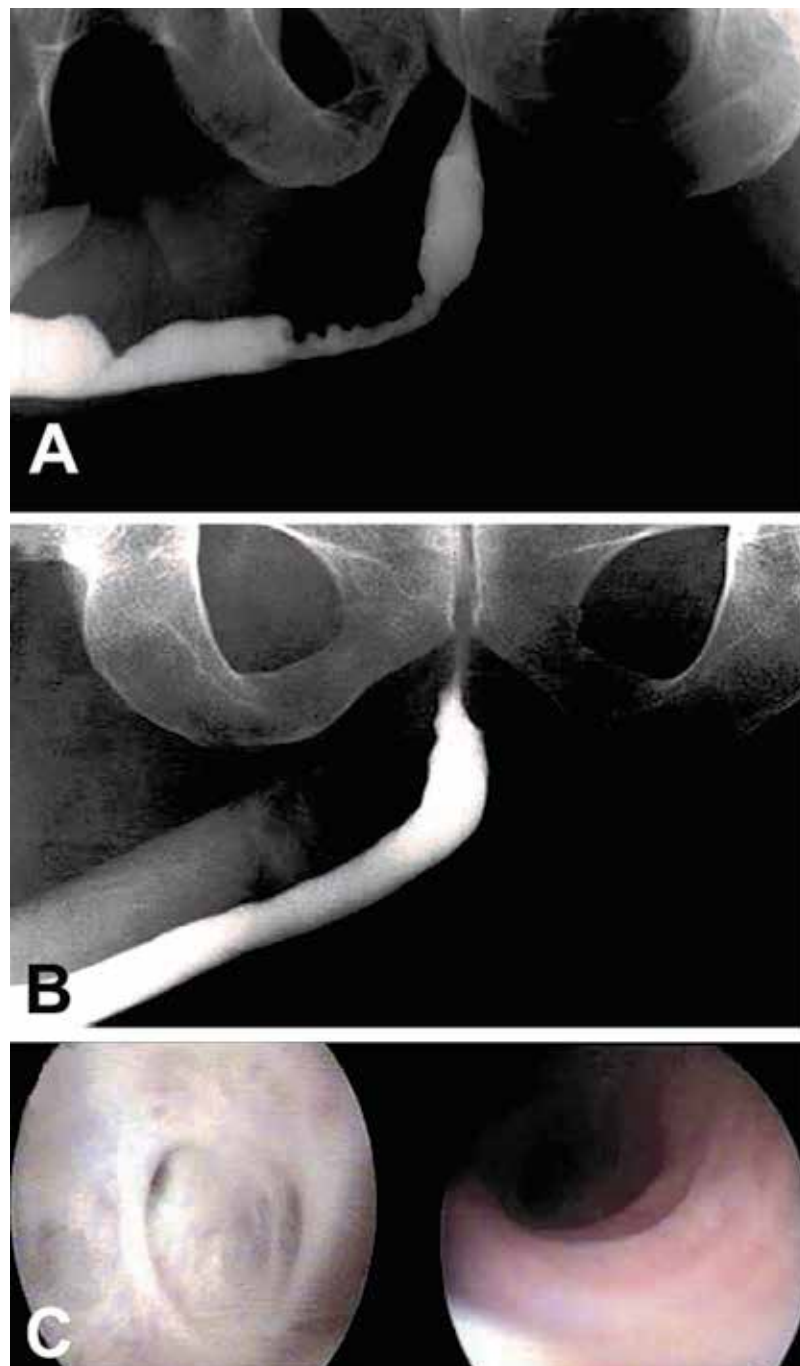
Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, ki uporablja načela bioloških in inženirskih znanosti za razvoj živih tkivnih ali organskih nadomestkov. Postaja vedno pomembnejši del regenerativne medicine, saj terapevtski izdelki tkivnega inženirstva omogočajo obnove, vzdrževanje in izboljšanje funkcij poškodovanega ali okvarjenega tkiva.

Poznamo tri različne pristope tkivnega inženirstva: (1) vsaditev (implantacija) funkcionalnih celic, med drugim tudi matičnih celic, v poškodovano ali okvarjeno tkivo; (2) uporabo različnih sintetičnih materialov ali materialov naravnega izvora, ki pomagajo

pri ponovnem oblikovanju poškodovanega ali okvarjenega tkiva ter (3) uporabo ustreznih nosilcev z nasajenimi tkivno specifičnimi celicami, ki spodbujajo rast in oblikovanje novega tkiva.^{1,2} V vseh treh pristopih tkivnega inženirstva je ključnega pomena nizka imunogenost vsadka, njegova tkivna skladnost z organizmom ter funkcionalna vključitev v celoto organa.²

Tkivni nosilci v tkivnem inženirstvu sečil

Tkivni nosilci so zasnovani tako, da s posnemanjem zgradbe in delovanja zunajceličnega matriksa omogočajo pritrjanje, rast



Slika 1: Rekonstrukcija humane sečnice. (A) Rentgenska slika bolnika z zožitvijo sečnice. (B) 6 mesecev po rekonstrukciji sečnice. Zožen del sečnice so odstranili in ga nadomestili z brezcelično submukoza sečnega mehurja. (C) Pregled sečnice s cistoskopom – levo pred operacijo in desno 4 mesece po rekonstrukciji.²³

in diferenciacijo tkivno specifičnih celic ter obenem predstavljajo oporo pri oblikovanju novo nastajajočega tkiva. Gradijo jih biološko skladni in razgradljivi materiali, t. i. biomateriali, ki so za rast in diferenciacijo tkivno specifičnih celic ključnega pomena.

V tkivnem inženirstvu sečil se za tkivne nosilce uporabljajo: (1) *materiali naravnega izvora*, kot so kolagen, alginat ali amnijska membrana;³ (2) *brezcelična tkiva* – submukoza tankega črevesa (SIS) in submukoza sečnega mehurja ter (3) *sintetični polime-*

ri, med katere spadajo poliglikolna kislina (PGA), polimlečna kislina (PLA) ter kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA).^{1,4}

Ožiljenje in oživčenje s tkivnim inženirstvom vzpostavljenega tkiva ali organa

Izmenjava hranil in kisika z difuzijo je v organizmu mogoča le pri vsadkih prostornine do 3 mm³,⁵ zato je pri oblikovanju kompleksnejših tkiv in organov ožiljenje tkiva ključnega pomena. Za spodbujanje žiljenja tkivnih nadomestkov se uporabljajo različni pristopi: (1) *dodajanje faktorjev angiogeneze*, kot sta bazični fibroblastni rastni faktor (bFGF), in žilni endotelni rastni faktor (VEGF), ki pospešita nastajanje kapilar;^{6,7} (2) *gojenje celic v ko-kulturi z endotelnimi celicami*⁸ ter (3) *ovitje vsadka v omentum*.^{4,7,8} Omentum je del trebušne mreže in je bogato ožiljen. Ob ovitju vsadka v omentum se kapilare iz omentuma razvejajo po vsadku, kar vodi do vzpostavitve ožiljenega tkiva.⁹⁻¹¹

Poleg ožiljenja je za normalno delovanje organa nujno tudi njegovo oživčenje. Oberpenning in sodelavci¹² so pri psih dokazali rast živčevja na periferiji v organizem vsajenih s tkivnim inženirstvom vzgojenih sečnih mehurjev, t. i. neosečnih mehurjev. Kljub temu pa je pot do vzpostavitve funkcionalnega senzorično-motoričnega sistema organov, oblikovanih s tkivnim inženirstvom, najverjetneje še dolga. Bolniki z vstavljenim neosečnim mehurjem so zaenkrat praznjenje mehurja prisiljeni nadzorovati s časovno določenim uriniranjem ali samokatetrizacijo, obetavna pa postaja možnost kontrole uriniranja s pomočjo mikroelektronskih naprav.¹³

Tkivno inženirstvo specifičnih tkiv in organov sečil

Urotelij

Primarna naloga urotelija, t. j. epitela, ki prekriva proksimalno sečnico, sečni mehur, sečevod in ledvični meh,¹⁴ je zagotavljanje krvno-urinske pregrade. Ob poškodbah ali okvarah urotelija je krvno-urinska pregrada



Slika 2: Cistoplastika podganjega sečnega mehurja z uporabo humane amnijske membrane. (A) Amnijska membrana. (B) Avgmentacija sečnega mehurja z amnijsko membrano. (C) Rekonstruiran sečni mehur 6 mesecev po operaciji. Puščice kažejo mesta stikov amnijske membrane s tkivom nativnega sečnega mehurja.⁴⁵

porušena, kar vodi do nekontroliranega prehajanja vode, ionov in strupenih presnovkov iz urina v spodaj ležeče vezivno tkivo in krvnožilje.¹⁵

Za uspešnejšo rekonstrukcijo urotelija je zaželena vsaditev že diferenciranega urotelija, saj visoko diferencirane površinske urotelijske celice zagotavljajo takojšnjo vzpostavitev funkcionalne krvno-urinske pregrade.^{13,16} V izogib zavrtnim reakcijam je za oblikovanje urotelija najprimernejša uporaba avtolognih urotelijskih celic. Humane urotelijske celice lahko pridobimo z biopsijo urotelija (običajno iz sečevoda ali sečnega mehurja)¹³ ali iz izpirkov sečnega mehurja.¹⁷

Urotelij, vzgojen *in vitro*, so uspešno uporabili za rekonstrukcijo humane sečnice,¹⁸ humanega sečnega mehurja¹¹ in prašičjih sečevodov.¹⁰

Sečnica

Za rekonstrukcijo humane sečnice se uporabljajo naslednji biomateriali: ustna sluznica,¹⁹ koža,²⁰ sluznica sečnega mehurja,²¹ amnijska membrana²² ter brezcelična submukoza sečnega mehurja^{23,24} (Slika 1) in tankega črevesa²⁵ (slednji sta v literaturi pogosto navedeni kot kolagenski nosilec). Ustreznost brezcelične submukoze sečnega mehurja so dokazali El-Kassaby in sodelavci,²⁴ ki so z 80-odstotno uspešnostjo rekonstruirali humano sečnico, okvarjeno zaradi obsežnih zožitev. Nasprotno rekonstrukcija sečnice z submukoza tankega črevesa ni bila vedno uspešna, saj Houser in sodelavci²⁵ pri štirih od petih zdravljenih bolnikov opisujejo ponovno zoženje sečnice eno leto po operaciji.

Vedno bolj se uveljavlja tudi pristop rekonstrukcije sečnice s tkivnimi nosilci *z in*

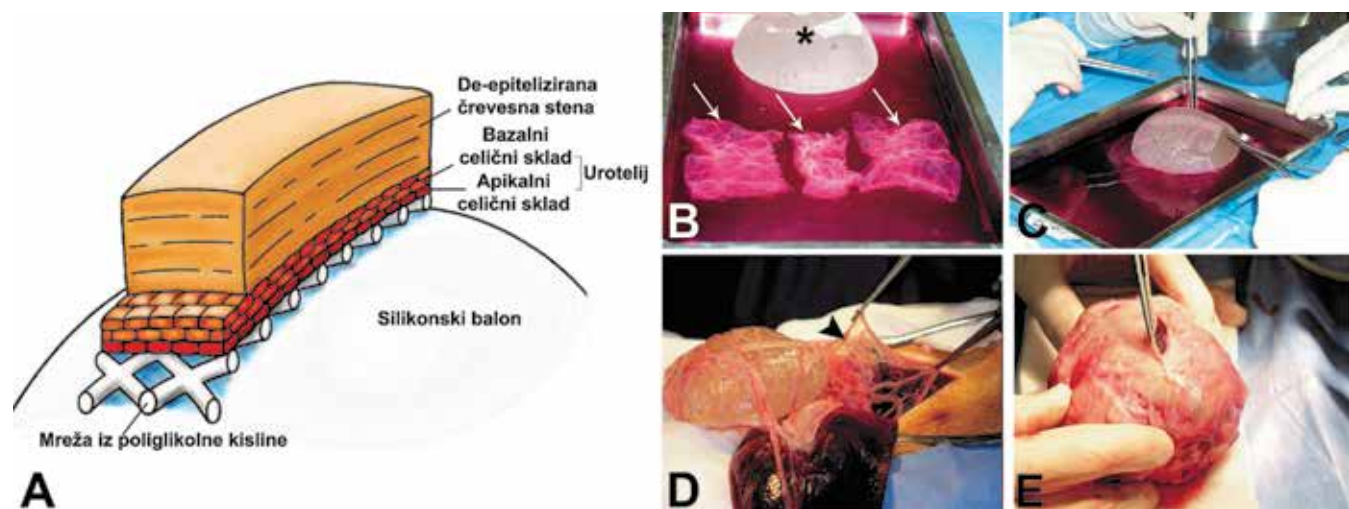
vitro nasajenimi celicami. De Filippo in sodelavci²⁶ so s pomočjo cevastih nosilcev iz submukoze sečnega mehurja z nasajenimi avtolognimi gladkomišičnimi in urotelijskimi celicami uspešno rekonstruirali zajčjo proksimalno sečnico. V podobno zasnovani študiji so za vzpostavitev tkiva sečnice uporabili matične celice, ki so jih osamili iz urina.²⁷ Dokazali so, da se matične celice, pridobljene iz urina, diferencirajo v gladkomišične in urotelijske celice ter nasajene na tridimenzijske nosilce iz brezcelične submukoze tankega črevesa po vsaditvi v telo miši tvorijo gladkomišično in epitelno tkivo.

Nedavno so avtologne gladkomišične in urotelijske celice nasadili tudi na cevasto oblikovane biološko razgradljive nosilce PGA ter z vnosom vzpostavljenih konstruktoev uspešno rekonstruirali okvarjeno človeško sečnico.¹⁸ Po 3 mesecih so vsadki tvorili funkcionalno proksimalno sečnico.

Sfinkter sečnice

Urinska inkontinenca je pogost zdravstveni problem, saj prizadene več kot 30 % ženske in 15 % moške svetovne populacije.²⁸ Zdravljenje obsega kirurške postopke, fizioterapijo in uporabo različnih zdravil, vedno pogosteje pa se uporabljajo tudi tehnike tkivnega inženirstva.²⁹ Ena takih je uporaba sredstev za povečanje volumna tkiva, kot so teflon, goveji kolagen ter silikonski delčki, ki se vsadijo v prizadeto območje.³⁰ Kljub sicer obetavnim preliminarnim študijam pa imajo vsajena sredstva kratkotrajni učinek in lahko zaradi tkivne neskladnosti z organizmom povzročijo vnetni odziv in številne z njim povezane zaplete.³¹

V zadnjem času se je kot uspešno izkazalo zdravljenje urinske inkontinence z avtolognimi matičnimi celicami (op. a. mioblasti),



Slika 3: Rekonstrukcija prašičjega sečnega mehurja s sestavljeno cistoplastiko (A) in uporabo tkivnega nosilca iz brezcelične submukoze tankega črevesa z nasajenimi urotelijskimi in gladkomišičnimi celicami (B-E). (A) Shema konstrukta de-epitelizirane črevesne stene in večskladnega urotelija, nameščenega na silikonski balon, obdan z mrežo iz PGA.⁴⁷ (B-C) Pritrditev tkivnega nosilca iz submukoze tankega črevesa z nasajenimi urotelijskimi in gladkomišičnimi celicami (→) na silikonski balon (*) ter (D) ovitje konstrukta v omentum prašiča (▶). (E) Sečni mehur po 3 tednih razvoja v omentumu.⁹

pridobljenimi z biopsijo prečno-progaste mišice.^{28,32} Vsaditev avtolognih mioblastov v poškodovan podganji sfinkter sečnice na mestu aplikacije sproži nastanek številnih mišičnih vlaken in s tem uspešno regeneracijo tkiva.³³ Strasser in sodelavci³⁴ so prvi zdravljenje z vsaditvijo matičnih celic preizkusili tudi na človeku. Bolnikom s stresno urinsko inkontinenco so v submukozo sečnice vnesli fibroblaste, primešane v kolagenski gel, ter nato v sfinkter sečnice vsadili še mioblaste. Izboljšanje stanja so ugotovili pri vseh zdravljenih bolnikih. Zdravljenje so nato uspešno ponovili še na večjem številu bolnikov ter obenem dokazali dolgoročno delovanje rekonstruiranega tkiva.³⁵ Uspešne rezultate so dosegli tudi Mitterberger in so-

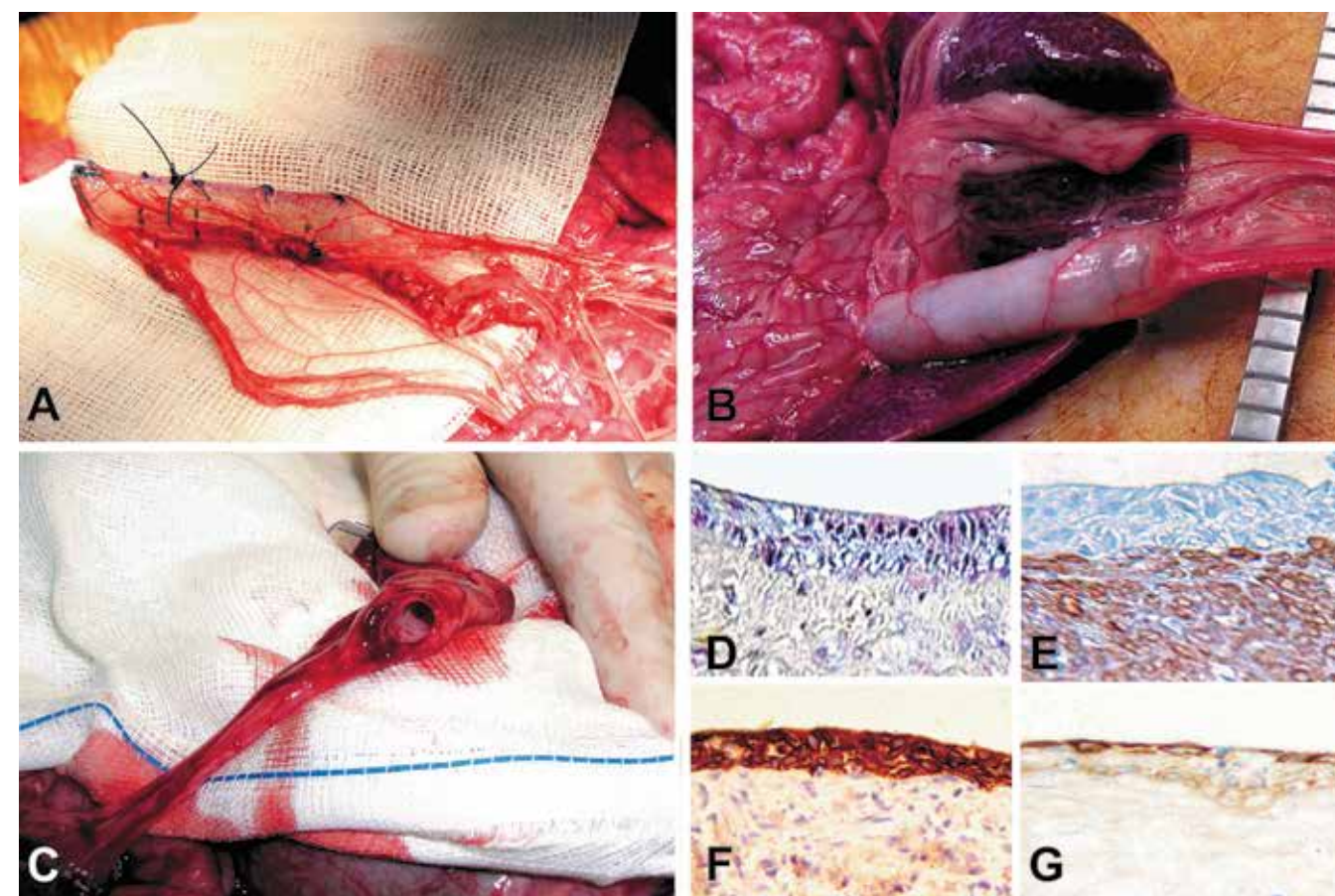
delavci,³⁶ ki so z vsaditvijo avtolognih mioblastov pri 79 % zdravljenih bolnic ugotovili vzpostavitev normalnega stanja, ter Carr in sodelavci,³⁷ ki so izboljšanje opazili v 50 % zdravljenih bolnic.

Čeprav dosedanje klinične izkušnje kažejo na učinkovito zdravljenje urinske inkontinence z vsaditvijo matičnih celic, pa so potrebna dodatna spoznanja o njeni dolgoročni varnosti.

Sečni mehur

Navadno se pri operacijskih posegih prirojjenih okvar ali hujših poškodb sečnega mehurja, ki zahtevajo razširitev ali celo nadomestitev organa, izvaja enterocistoplasti-

Slika 4: Vzpostavitev s tkivnim inženirstvom vzgojenega človeškega sečnega mehurja. (A) Tkivni nosilec v obliki sečnega mehurja z nasajenimi urotelijskimi in gladkomišičnimi celicami. (B) Konstrukt *in vitro* vzpostavljenega sečnega mehurja, spojen z nativnim sečnim mehurjem. (C) Vsajen sečni mehur, prekrit s fibrinskim lepilom in omentumom. (D-E) Cistogram sečnega mehurja pred (D) in 10 mesecev po rekonstrukciji (E).¹¹

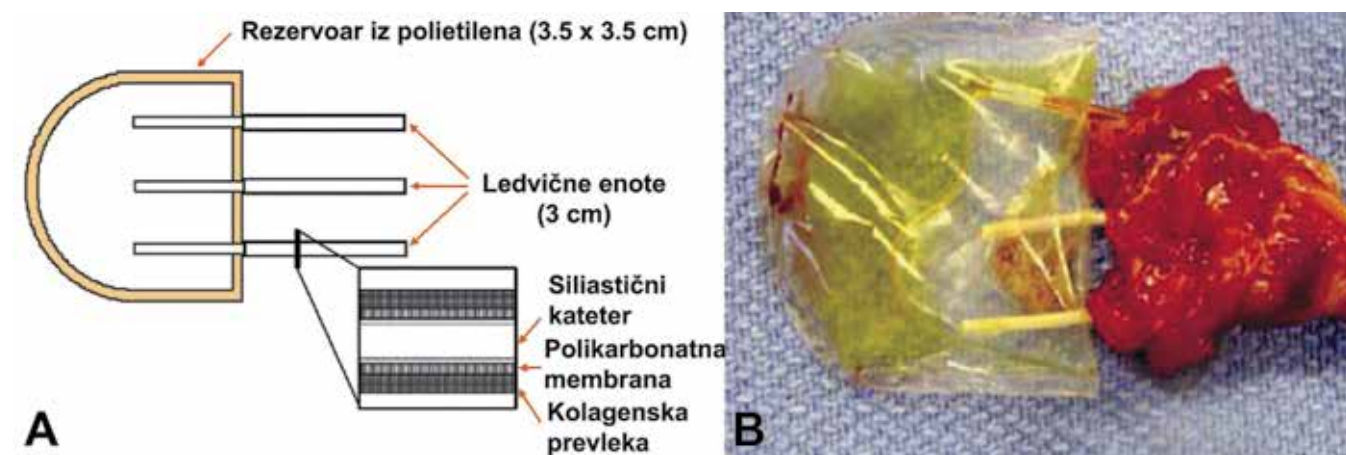


Slika 5: Vzpostavitev prašičjega sečevoda, t. i. neosečevoda v »bioreaktorju iz omentuma«. (A) *In vitro* vzpostavljen konstrukt brezcelične submukoze tankega črevesa z nasajenimi urotelijskimi in gladkomišičnimi celicami, oblikovan okrog drenažne cevke ter ovit v omentum. (B) Neosečevod po 3 tednih razvoja v omentumu. (C) Prečni prerez neosečevoda po 3 tednih razvoja v omentumu. (D) Barvanje s Hematoksilin-eozinom potrjuje razvoj večskladnega urotelija. Vnetni odgovor ni prisoten. (E) Urotelij leži nad gladko mišičnino (rjavo obarvanje). Imunsko označevanje dokazuje prisotnost diferenciranega urotelija, saj je CK7 (citokeratin 7, rjavo obarvanje) prisoten v vseh celičnih skladih urotelija (F), CK20 (rjavo obarvanje) pa le v dobro diferenciranih površinskih urotelijskih celicah (G).¹⁰

ka, pri kateri se kot nadomestno tkivo uporablja segment tankega črevesa.¹ Ker pa sta funkciji črevesnega epitela in urotelija popolnoma različni, lahko pride ob presaditvi do številnih zapletov, kot so vnetje, motnje v presnovi, povečana tvorba mukusa, sečni kamni ter rak.³⁸

Da bi se izognili zapletom enterocistoplastike ter obenem dosegli učinkovito rekonstrukcijo poškodovanega tkiva, se preizkušajo različni sintetični materiali, kot sta na primer tetrafluoroetil³⁹ in silikon,⁴⁰ vendar so ti zaradi tkivne neskladnosti pogosto neprimerni. Sečni mehur je bil na živalskih modelih uspešno rekonstruiran šele z uporabo brezcelične submukoze tankega črevesa^{41,42} ter sečnega mehurja,^{43,44} kot primer na pa se je izkazala tudi uporaba humane amnijske membrane (Slika 2).⁴⁵

Rekonstrukcija sečnega mehurja je še uspešnejša, če v organizem vnesemo nosilce z nasajenimi avtolognimi gladkomišičnimi in urotelijskimi celicami.^{9,12,46} Turner in sodelavci⁴⁷ so na prašičjem modelu izvedli t. i. sestavljeno cistoplastiko, ki predstavlja nov pristop k rekonstrukciji sečnega mehurja. Da bi obšli zahtevno vzpostavitev celotne stene sečnega mehurja, so oblikovali sečni mehur, sestavljen iz gladke mišičnine ter *in vitro* vzgojenega večskladnega urotelija. Ugotovili so, da urotelijske celice v primeru povečanja sečnega mehurja, t. i. avgmentacije s sestavljeno cistoplastiko, popolnoma prekrijejo gladko mišičnino ter tvorijo učinkovito krvno-urinsko pregrado (Slika 3A). Poleg vzpostavitve gladkomišičnega sloja in funkcionalnega večskladnega urotelija, sta za normalno delovanje sečnega mehurja potrebni tudi dobra ožiljenost in oživčenost



Slika 6: S tkivnim inženirstvom vzpostavljena funkcionalna ledvična enota. (A) Shema ledvične enote. (B) 3 mesece po vnosu v organizem ledvične enote z nasajenimi ledvičnimi epitelnimi celicami, pridobljenimi s pomočjo terapevtskega kloniranja, tvorijo tekočino, podobno sekundarnemu urinu.⁵³

tkiva. Baumert in sodelavci⁹ so v ta namen model prašičjega sečnega mehurja ovili v omentum prašiča (Slika 3B-E). Tri tedne po vsaditvi v organizem so opazili gosto ožiljenost tkiva, steno mehurja pa sta tvorila diferencirani večskladen urotelij in gladka mišičnina s celicami, ki so reagirale na živčni prenašalec acetilholin.

O prednostih ovitja v omentum poročajo tudi Atala in sodelavci,¹¹ ki so izvedli prvi klinični preizkus uporabnosti s tkivnim inženirstvom vzpostavljenih sečnih mehurjev. Avtologne gladkomišične in urotelijske celice so nasadili na biološko razgradljive nosilce v obliki sečnega mehurja. Uporabili so kolagenske nosilce ter kombinirane nosilce, sestavljene iz kolagena in PGA. Po 7- do 8-tedenski inkubaciji *in vitro* so konstruirale, same ali ovite v omentum, vsadili v organizem. Pri bolnikih, ki so jim vsadili v omentum ovit sečni mehur, vzpostavljen na nosilcih iz kolagena in PGA, so opazili povečanje razteznosti ter prostornine mehurja ter opazno izboljšanje kontinence (Slika 4). Uspešno vzpostavitev stene sečnega mehurja so potrdili tudi s histološkimi in imunocitokemičnimi analizami. Kljub spodbudnim preliminarnim rezultatom opozarjajo, da raziskava predstavlja le prvi korak do vzpostavitve funkcionalnega organa in bodo dejansko klinično uporabnost pokazale šele študije dolgotrajnega obnašanja vsadka.

Sečevod

Večina poskusov rekonstrukcije sečevodov s pomočjo tkivnega inženirstva je bila zaenkrat izvedena na živalskih modelih. Koziak in sodelavci⁴⁸ so med prvimi poskušali

rekonstruirati sečevod človeka. Z uporabo humane amnijske membrane so desetim od enajstih bolnikov uspešno rekonstruirali zožitve sečevodov. Pri psih so zožitve sečevodov zdravili z uporabo brezcelične submukoze sečevoda.⁴⁹ Zdravljenje je bilo neuspešno, saj je ob vsaditvi v organizem prišlo do skrčenja submukoze sečevoda in s tem do zožitve cevi vsadka.

Da bi povečali možnost vzpostavitve funkcionalnega tkiva, so preizkusili tudi nosilce z že nasajenimi celicami. Baumert in sodelavci¹⁰ so pri prašičih uspešno vzpostavili model sečevoda. Na brezcelični nosilec iz submukoze tankega črevesa so nasadili gladkomišične in urotelijske celice ter konstruirali z nasajenimi celicami prenesli v omentum prašiča (Slika 5). Ovoj v omentum je pospešil ožiljenost tkiva in tako bistveno prispeval k vzpostavitvi sečevoda z razvitim mišičnim tkivom in visoko diferenciranim urotelijem. V podobni študiji so poleg urotelijskih celic na brezcelični nosilec iz submukoze sečevoda nasadili tudi celice kostnega mozga. Ugotovili so, da slednje spodbujajo žiljenje tkiva in s tem prispevajo k uspešnejši regeneraciji tkiva.⁵⁰

Ledvice

Celovita rekonstrukcija ledvic zagotovo predstavlja največji izziv regenerativne medicine sečil. Uveljavljata se dva koncepta vzpostavitve umetnih ledvic. Prvi zajema uporabo zunaj telesnih naprav, ki delujejo po načelu hemodialize, v primeru drugega pa poskušajo vlogo ledvic nadomestiti z vnosom *in vitro* vzpostavljenih ledvičnih struktur.¹

Humes in sodelavci⁵¹ so razvili zunajtelesno napravo, ki poleg hemodializnega mehanizma vsebuje tudi sistem z nasajenimi ledvičnimi epitelnimi celicami in tako učinkoviteje posnema delovanje ledvic. Napravo so preizkusili na psih z akutno uremijo. S pomočjo kombiniranega sistema so uspešno nadomestili filtracijo krvi ter presnovno in hormonsko delovanje ledvic. Podobno zasnovano napravo so preizkusili tudi na bolnikih z akutno odpovedjo ledvic v kritičnem stanju.⁵² Kljub optimističnim rezultatom

Tabela 1: Pregled pomembnejših aplikacij tkivnega inženirstva v regenerativni medicini sečil. Študije, narejene na človeku, so poudarjene.

Referenca	Pristop	Tkivni nosilec/celice	Uporabljeno na:	Organ	Uspešnost rekonstrukcije organa (+/-)
Koziak in sod., 2004 [22]	uporaba tkivnega nosilca	amnijska membrana	človek	sečnica	+
Wu in sod., 2011 [27]	uporaba tkivnega nosilca z nasajenimi celicami / uporaba matičnih celic	3D nosilci iz submukoze tankega črevesa / matične celice izolirane iz urina	miš	proksimalna sečnica	+
Raya-Rivera in sod., 2011 [18]	uporaba tkivnega nosilca z nasajenimi celicami	biorazgradljivi nosilci iz poliglukolne kisline / avtologne mišične in urotelijske celice	človek	proksimalna sečnica	+
Carr in sod., 2008 [37]	vbrizganje matičnih celic	mioblasti	človek	sfinκτηr sečnice	+
Iijima in sod., 2007 [45]	uporaba tkivnega nosilca	amnijska membrana	podgana	sečni mehur	+
Turner in sod., 2010 [47]	uporaba tkivnega nosilca ter <i>in vitro</i> vzgojenega urotelija (sestavljena cistoplastika)	deepitelizirana črevesna stena / avtologne urotelijske celice	prašič	sečni mehur	+
Baumert in sod., 2007 [9]	uporaba tkivnega nosilca z nasajenimi celicami, ovitega v omentum	submukoza tankega črevesa / avtologne mišične in urotelijske celice	prašič	sečni mehur	+
Atala in sod., 2006 [11]	uporaba tkivnega nosilca z nasajenimi celicami, ovitega v omentum	biorazgradljivi nosilci iz poliglukolne kisline / avtologne mišične in urotelijske celice	človek	sečni mehur	+
Koziak in sod., 2007 [48]	uporaba tkivnega nosilca	amnijska membrana	človek	sečevod	+
Baumert in sod., 2007 [10]	uporaba tkivnega nosilca z nasajenimi celicami, ovitega v omentum	submukoza tankega črevesa / avtologne mišične in urotelijske celice	prašič	sečevod	+
Humes in sod., 2003 [52]	uporaba zunajtelesne hemodializne naprave s sistemom z nasajenimi celicami	celice ledvične cevke nefrona	človek	ledvice	-
Lanza in sod., 2002 [53]	terapevtsko kloniranje in uporaba tkivnega nosilca z nasajenimi celicami	nosilec iz polikarbonatne membrane / metanefrične predniške celice	miš	ledvice	+
Ross in sod., 2009 [54]	uporaba tkivnega nosilca / uporaba matičnih celic	decelualizirana ledvica / embrionalne matične celice	podgana	ledvice	+

na živalskih modelih pa odziv zdravljenih bolnikov ni bil enoten. Za popolno razumevanje delovanja sistema ter varno klinično uporabo so zato nujne nadaljnje predklinične raziskave.⁵²

Kompleksnejši pristop izboljšanja delovanja ledvic vključuje prenos *in vitro* oblikovanih tkiv v organizem. Lanza in sodelavci⁵³ so si za vzpostavitev funkcionalnega, biokompatibilnega ledvičnega tkiva pomagali s terapevtskim kloniranjem. Iz zgodnjega govejega zarodka so osamili metanefrične predniške celice ter jih nasadili na cevasto oblikovane sintetične nosilce, povezane z zbiralnikom izcedne tekočine. Konstrukte so zatem prenesli v telo živali, ki je darovala jedro za zarodek. Med *in vivo* inkubacijo so celice oblikovale visoko organizirane cevaste ter ledvičnim telescem podobne strukture, tekočina, zbrana v zbiralniku, pa je bila po sestavi podobna sekundarnemu urinu (Slika 6). Na podlagi rezultatov sklepajo, da ima vzpostavljeni konstrukt sposobnost filtracije, reabsorpcije ter izločanja snovi.⁵³

Nekoliko drugačen pristop so izbrali Ross in sodelavci,⁵⁴ ki so decelularizirali podganjo ledvico in na brezcelični zunajcelični matriks nasadili embrionalne matične celice. Uspešno rast in tkivno specifično diferenciacijo celic so dokazali s histološkimi in imunocitokemičnimi analizami.

Različni modeli umetnih ledvic dokazujejo, da je s tkivnim inženirstvom mogoče vzpostaviti funkcionalno ledvično tkivo. Želja za prihodnost pa je vzpostavitev celostne strukture tega kompleksnega organa.

Zaključki

Tkivno inženirstvo postaja vedno pomembnejši del regenerativne medicine. Študije na živalskih modelih kot tudi klinične študije dokazujejo, da tehnike tkivnega inženirstva omogočajo vzpostavitev funkcionalnega tkiva, primerne za uspešno rekonstrukcijo tkiv in organov sečil (Tabela 1). Kljub obetavnim rezultatom pa se je potrebno zavedati, da bodo za uspešno in predvsem varno uporabo tkivnega inženirstva v regenerativni medicini sečil nujne nadaljnje raziskave razvoja novih biomaterialov in ustreznih celičnih virov kot tudi razumevanje razvojne biologije ter mehanizmov regeneracije tkiv in organov.

Literatura

- Atala A. Regenerative medicine and tissue engineering in urology. *Urol Clin N Am* 2009; 36: 199–209.
- Feil G, Daum L, Amend B, Maurer S, Renninger M, Vaegler M, et al. From tissue engineering to regenerative medicine in urology—the potential and the pitfalls. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 375–8.
- Kreft ME, Dragin U. Amnijska membrana v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini. *Zdrav Vest* 2010; 79: 707–15.
- Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *Word J Urol* 2000; 18: 2–9.
- Folkman J, Hochberg M. Self – regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 1973; 138: 745–53.
- Guan Y, Ou L, Hu G, Wang H, Xu Y, Chen J, et al. Tissue engineering of urethra using human vascular endothelial growth factor gene-modified bladder urothelial cells. *Artif Organs* 2008; 32: 91–9.
- Soker S, Machado M, Atala A. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World J Urol* 2000; 18: 10–8.
- Schultheiss D, Gabouev AI, Cebotari S, Tudorache I, Walles T, Schlote N, et al. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model. *J Urol* 2005; 173: 276–80.
- Baumert H, Simon P, Hekmati M, Fromont G, Levy M, Balaton A, et al. Development of a seeded scaffold in the great omentum: Feasibility of an *in vivo* bioreactor for bladder tissue engineering. *Eur Urol* 2007; 52: 884–90.
- Baumert H, Mansouri D, Fromont G, Hekmati M, Simon P, Massoud W, et al. Terminal urothelium differentiation of engineered neoureter after *in vivo* maturation in the »omental bioreactor«. *Eur Urol* 2007; 52: 1492–8.
- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006; 367: 1241–6.
- Oberpenning F, Meng J, Yoo J, Atala A. De novo reconstruction of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 149–55.
- Wood D, Southgate J. Current status of tissue engineering in urology. *Curr Opin Urol* 2008; 18: 564–9.
- Romih R, Korosec P, de Mello Jr W, Jezernik K. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res* 2005; 320: 259–268.
- Kreft ME, Jezernik K, Kreft M, Romih R. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1152: 18–29.
- Višnjar T, Kocbek P, Kreft ME. Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochem Cell Biol* 2012; 137: 177–86.
- Nagele U, Maurer S, Feil G, Bock C, Krug J, Sievert KD, et al. *In vitro* investigations of tissue-engineered multilayered urothelium established from bladder washings. *Eur Urol* 2008; 54: 1414–22.
- Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* 2011; 377: 1175–82.
- Mungadi IA, Ugboko VI. Oral mucosa graft for urethral reconstruction. *Ann Afr Med* 2009; 8: 203–9.
- Dalpiatz O, Kerschbaumer A, Pelzer A, Radmayr C, Gozzi C, Horninger W, et al. Single-stage dorsal inlay split-skin graft for salvage anterior urethral reconstruction. *BJU Int* 2008; 101: 1565–70.
- Ozögök Y, Ozgür Tan M, Kilciler M, Tahmaz L, Erduran D. Use of bladder mucosal graft for urethral reconstruction. *Int J Urol* 2000; 7: 355–60.
- Koziak A, Marcheluk A, Dmowski T, Szczeniowski R, Kania P, Dorobek A. Reconstructive surgery of male urethra using human amnion membranes (grafts)-first announcement. *Ann Transplant* 2004; 9: 21–4.
- Atala A, Guzman L, Retik AB. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol* 1999; 162: 1148–51.
- El-Kassaby A, AbouShwareb T, Atala A. Randomized comparative study between buccal mucosa and bladder matrix grafts in patients with complex urethral strictures. *J Urol* 2008; 179: 1432–6.
- Hauser S, Bastian PJ, Fechner G, Müller SC. Small intestine submucosa in urethral stricture repair in consecutive series. *Urology* 2006; 68: 263–6.
- De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol* 2002; 168: 1789–92.
- Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, Atala A, Zhang Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32: 1317–26.
- Mitterberger M, Pinggera GM, Marksteiner R, Margreiter E, Plattner R, Klima G, Strasser H. Functional and histological changes after myoblast injections in the porcine rhabdosphincter. *Eur Urol* 2007; 52: 1736–43.
- Lukanović A. Zdravljenje stresne urinske inkontinence z matičnimi celicami-vizija prihodnosti? *Zdrav Vest* 2009; 78: 1423–5.
- Pannek J, Brands FH, Senge T. Particle migration after transurethral injection of carbon coated beads for stress urinary incontinence. *J Urol* 2001; 166: 1350–3.
- Kiilholma PJ, Chancellor MB, Makinen J, Hirsch IH, Klemi PJ. Complications of teflon injection for stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 1993; 12: 131–7.
- Blagajne M, Lukanović A. Intrasphincteric autologous myoblast injections with electrical stimulation for stress urinary incontinence. *Int J Gynaecol Obstet* 2012. In press.
- Cannon TW, Lee JY, Somogyi G, Pruchnic R, Smith CP, Huard J, et al. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology* 2003; 62: 958–63.
- Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Mitterberger M, Pinggera GM, Frauscher F et al. Transurethral ultrasonography-guided injection of adult autologous stem cells versus transurethral endoscopy injection of collagen in treatment of urinary incontinence. *World J Urol* 2007; 25: 385–92.

35. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Mitterberger M, Pinggera M, Frauscher F, et al. Transurethral ultrasound guided stem cell therapy of urinary incontinence. *J Urol* 2006; 175: 219.
36. Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Frauscher F, Ulmer H, et al. Myoblast and fibroblast therapy for post-prostatectomy urinary incontinence: 1-year follow-up of 63 patients. *J Urol* 2008; 179: 226–31.
37. Carr LK, Steele D, Steele S, Wagner D, Pruchnic R, Jankowski R, et al. 1-year follow up of autologous muscle –derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2008; 19: 881–3.
38. McDougal WS. Metabolic complications of urinary intestinal diversion. *J Urol* 1992; 147: 1199–208.
39. Bono AV, De Gresti A. Partial substitution of urinary bladder with Teflon prosthesis. *Minerva Urol* 1966; 18: 43–7.
40. Rohrmann D, Albrecht D, Hannappel J, Gerlach R, Schwarzkopp G, Lutzeyer W. Alloplastic replacement of the urinary bladder. *J Urol* 1996; 156: 2094–7.
41. Kropp BP, Rippey MK, Badylak SF, Adams MC, Keating MA, Rink RC, et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestine submucosa. Urodynamic and histopathologic assessment in log-term canine bladder augmentations. *J Urol* 1996; 155: 2098–104.
42. Ayyildiz A, Akgül T, Huri E, Nuhoglu B, Kiliçoğlu B, Ustün H, et al. Use of porcine small intestinal submucosa in bladder augmentation in rabbit: long-term histological outcome. *ANZ J Surg* 2008; 78: 82–6.
43. Piechota HJ, Dahms SE, Nunes LS, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. In vitro functional properties of the rat bladder regenerated by the bladder acellular matrix graft. *J Urol* 1998; 159: 1717–24.
44. Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU Int* 2000; 85: 362–71.
45. Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, Nikaïdo T, Konishi I, et al. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng* 2007; 13: 513–24.
46. Zhang Y, Kropp BP, Lin HK, Cowan R, Cheng Y. Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa. *Tissue Eng* 2004; 10: 181–7.
47. Turner A, Subramanian R, Thomas DF, Hinley J, Abbas SK, Stahlschmidt J, et al. Transplantation of autologous differentiated urothelium in an experimental model of composite cystoplasty. *Eur Urol* 2011; 59: 447–54.
48. Koziak A, Salagierski M, Marcheluk A, Szczeński R, Sosnowski M. Early experience in reconstruction of long ureteral strictures with allogenic amniotic membrane. *Int J Urol* 2007; 14: 607–10.
49. Osman Y, Shokeir A, Gabr M, El-Tabey N, Mohsen T, El-Baz M. Canine ureteral replacement with long acellular matrix tube: is it clinically applicable? *J Urol* 2004; 172: 1151–4.
50. Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K, Ono Y, Ohshima S, Ueda M. Constructing a tissue –engineered ureter using a decellularized matrix with cultured uroepithelial cells and bone marrow derived mononuclear cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 509–18.
51. Humes HD, Buffington DA, MacKay SM, Funke AJ, Weitzel WF. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 451–5.
52. Humes HD, Weitzel WF, Bartlett RH, Swaniker FC, Paganini EP. Renal cell therapy is associated with dynamic and individualized responses in patients with acute renal failure. *Blood Purif* 2003; 21: 64–71.
53. Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ, Wettstein PJ, Blackwell C, Borson N, et al. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 689–96.
54. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded onto kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2338–47.

Sladkorna bolezen in nosečnost

Diabetes in pregnancy

Simona Kovačec, Mitja Krajnc, Miro Čokolič, Andrej Zavrtnik

UKC Maribor,
Klinika za interno
medicino, Oddelek
za endokrinologijo
in diabetologijo,
Ljubljanska 5,
2000 Maribor

Korespondenca/ Correspondence:

asist. dr. Andrej
Zavrtnik, dr. med.,
Oddelek za diabetologijo
in endokrinologijo,
Univerzitetni klinični
center Maribor,
Ljubljanska 5,
2000 Maribor, Slovenija
Tel.: +386–2–321–23–36;
Fax +386–2–331–23–93;
e-mail naslov: Andrej.
Zavrtnik@ukc-mb.si

Ključne besede:

hiperglikemija v
nosečnosti, nosečnostna
sladkorna bolezen,
diabetična embriopatija,
diabetična fetopatija,
slovenske smernice

Key words:

hyperglycaemia in
pregnancy, gestational
diabetes mellitus, diabetic
embriopathy, diabetic
fetopathy, Slovenian
guidelines

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;
81: 745–52

Prispelo: 21. feb. 2012,
Sprejeto: 13. jun. 2012

Izveček

Zaradi naraščanja prevalence debelosti, sladkorne bolezni tipa 2 (SB2) in nosečnostne sladkorne bolezni (NSB) se s hiperglikemijo v nosečnosti srečujemo vse pogosteje. Sladkorna bolezen (SB) v nosečnosti pomeni večje tveganje za perinatalno smrtnost in obolevnost ter zaplete pri materi. Ker je glavni dejavnik tveganja za zaplete izpostavitve ploda hiperglikemiji matere, je ne glede na tip SB čim prejšnja vzpostavitev normoglikemije ključnega pomena za izboljšanje izidov nosečnosti pri plodu in tudi pri materi. V tej luči je potrebno poudariti pomen zgodnjega odkrivanja verjetne prednosečnostne SB, ki pred zanositvijo ni bila diagnosticirana, večinoma SB2, in pomen prednosečnostnega svetovanja pri bolnicah z znano SB2 in sladkorno boleznijo tipa 1 (SB1).

Namen preglednega prispevka je razpravljati o prednosečnostni SB in NSB ter posledičnih tveganjih za plod in mater. Sočasno želimo poudariti pomen obravnave SB v nosečnosti v skladu s priporočili za zdravljenje SB2, ki jih je pred kratkim objavilo Slovensko endokrinološko združenje v juniju 2011.

Abstract

Given the increasing prevalence of obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and gestational diabetes mellitus (GDM), the number of women who have some form of diabetes during their pregnancies is increasing. Diabetic pregnancy entails an increased risk of perinatal mortality and morbidity, as well as complications in mother. These are mainly the result of fetal exposure to maternal hyperglycaemia. Undelayed achievement of normoglycemia is therefore crucial for optimizing maternal and fetal outcomes in all women with diabetes during pregnancy, regardless of the type of diabetes. In light of this, we would like to address the importance of early detection of likely prepregnancy diabetes – mostly T2DM, and the value of preconception care in women with preexisting T2DM and type 1 diabetes mellitus (T1DM).

This review is aimed to discuss pregestational and gestational diabetes and the associated health risk to the developing fetus and the mother. The management should take account of the clinical evidence-based guidelines for the treatment of T2DM published by the Slovenian Endocrine Society in June 2011.

1. Uvod

Število žensk s sladkorno boleznijo (SB) v nosečnosti narašča kot posledica večjega pojavljanja debelosti, pogostejšega obolevanja žensk za SB tipa 2 (SB2) v rodni dobi in odločitev za nosečnost v kasnejših letih.^{1,2} SB v nosečnosti predstavlja večje tveganje za pojav zapletov v nosečnosti pri materi in pri otroku. Ker je zvečana raven glukoze pri nosečnici glavni vir zapletov, lahko pojavnost

le-teh uspešno zmanjšamo z dobro urejeno glikemijo že v času spočetja in vzdrževanjem le-te med celotno nosečnostjo. Nosečnost je zato potrebno v primeru že znane SB dobro načrtovati, pri nosečnicah, pri katerih SB pred zanositvijo ni bila prepoznana ali se je šele pojavila med nosečnostjo, pa je SB potrebno čimprej prepoznati ter ustrezno zdraviti.^{1–3} Le s takšnim pristopom lahko dosežemo leta 1989 ambiciozno zastavljeni cilj v St. Vincentski deklaraciji, da je potreb-