

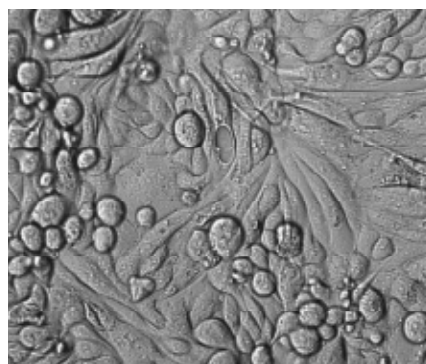
De implanteerbare kunstnier: *quo vadis?*

Tekst: Jasper Boomker *

Een 'implanteerbare kunstnier', een kunstnier die anders dan de huidige kunstnier vrijwel alle functies van de nier kan vervangen, spreekt nu nog tot ieders verbeelding. Een kunstnier die niet alleen stikstofhoudende afvalstoffen uit het bloed kan verwijderen, maar ook de belangrijkste endocriene en metabole functies van de nier kan vervangen, zou een belangrijke doorbraak betekenen voor de behandeling van nierfalen. Voorlopig lijkt deze implanteerbare kunstnier nog verre toekomst. Onderzoekers gaan nu aan de slag met een kunstnier waarin niercellen de functie van de nier nabootsen. Er is goede hoop dat een dergelijke biologische kunstnier de ziektelast van chronisch nierfalen kan verminderen.

Met het programma Implanteerbare Kunstnier wil de Nierstichting innovatief onderzoek naar de ontwikkeling van een biologische kunstnier een forse impuls geven. Het gaat hier om translationeel onderzoek waarin universiteiten, bedrijven en overheid gezamenlijk investeren. In het project 'BioKid' werken met een subsidie van de overheid verschillende universiteiten, bedrijven en de Nierstichting de komende 3 jaar samen aan een dialysemembraan met levende nierbuisepitheelcellen. Het is duidelijk dat met dit project de biologische nierfunctievervanging weer op de kaart staat. In dit artikel wordt een beeld geschetst van de achtergrond van dit thema alsmede de uitdagingen die voor ons liggen.

Wie zich verdiept in de fysiologie van de nier zal zich verwonderen over de enorme complexiteit van de nier. Een nier bestaat uit één miljoen nefronen, de kleinste functionele eenheid van de nier. Elk nefron bestaat uit een nierfilter en een nierbuis hetgeen uiteindelijk uitmondt in het nierbekken van waaruit de urine via de urineleiders wordt afgevoerd naar de blaas. Urine komt tot



Gekweekte niercellen

stand door een ingewikkeld proces van filtratie, reabsorptie en secretie. Door het bloed te filtreren in de nierfilters wordt voorurine gevormd. De epitheelcellen van de nierbuisjes halen nuttige stoffen zoals aminozuren en glucose uit de voorurine terug. In totaal wordt in de nierbuisjes 98% van het vocht in de voorurine gereabsorbeerd en weer opgenomen in het bloed. Deze epitheelcellen zijn bovendien verantwoordelijk voor het verwijderen van grote en eiwitgebonden afvalstoffen die het nierfilter niet kunnen passeren. Deze worden actief in de voorurine uitgescheiden. De nieren produceren niet alleen urine, maar zijn

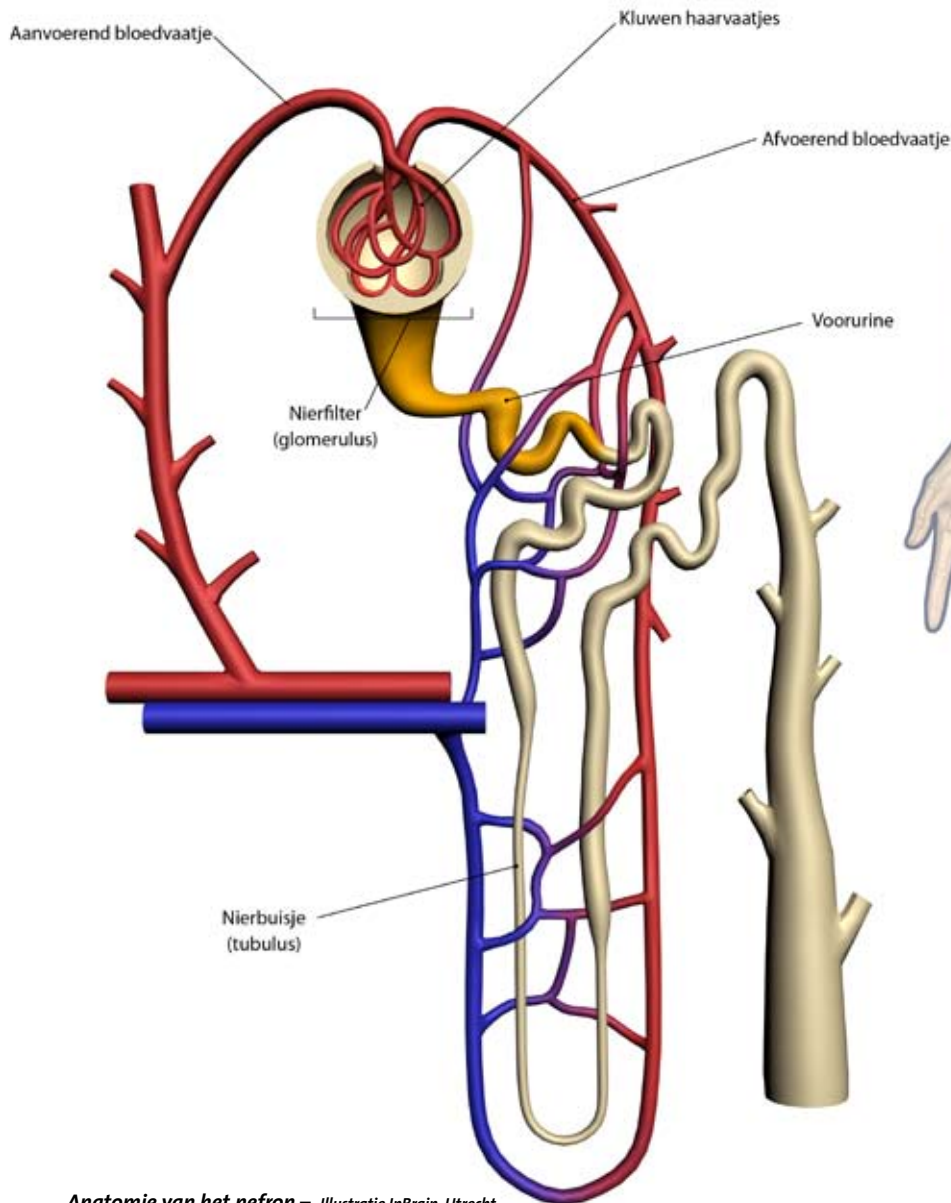


Dr. Jasper Boomker

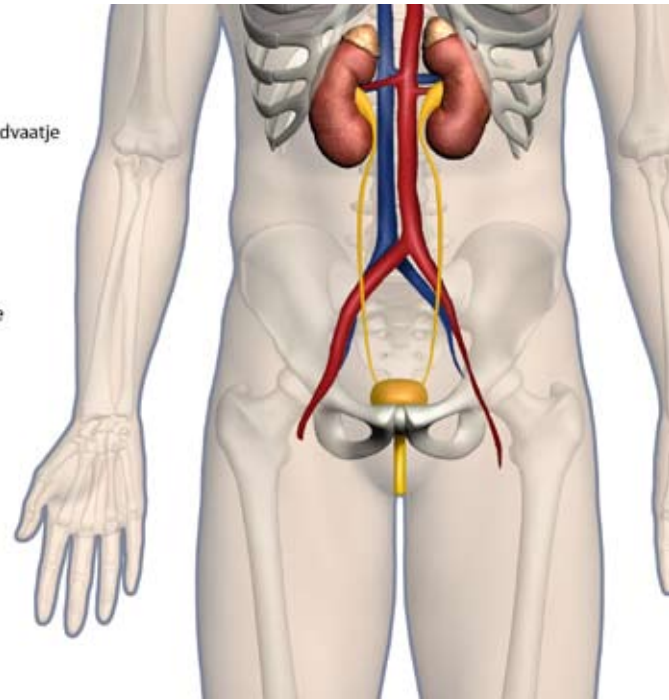
ook verantwoordelijk voor een aantal belangrijke processen in ons lichaam zoals de aanmaak van rode bloedcellen, de regulatie van de bloeddruk en de calcium- en fosfaathuishouding. Ook spelen de nieren een grote rol bij de regulatie van ons immuunsysteem. Wanneer de nierfunctie wegvault, is het onmogelijk om al deze functies op een adequate manier te vervangen. Toch is dat uiteindelijk het doel van een implanteerbare kunstnier; een apparaat of weefsel dat de functie van de nieren op een zo natuurlijk mogelijke manier nabootst.

De noodzaak van een biologische kunstnier

De jonge dokter Kolff was in 1945 de eerste die erin slaagde de nierfunctie van een mens te vervangen met behulp van een kunstnier. Inmiddels is deze vorm van nierfunctievervanging, mede dankzij de uitvinding van de dialysehunt, een routinebehandeling geworden. Echter, de techniek vervangt de functie van de nier maar in beperkte mate en is vooral geschikt voor het verwijderen van kleine afvalstoffen, zoals ureum, uit het bloed. Grote en eiwitgebonden moleculen worden door de dialyse minder goed verwijderd en blijven achter in het lichaam.



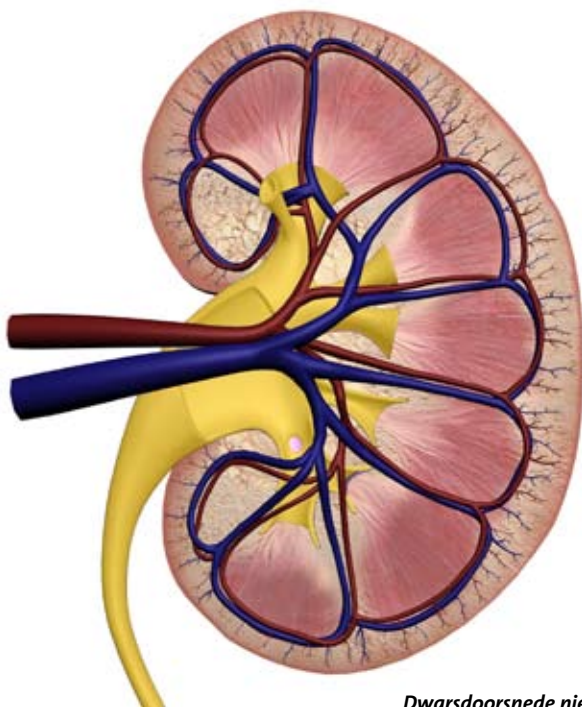
Anatomie van het nefron – Illustratie InBrain, Utrecht



Deze zogenaamde uremische toxines blijken in belangrijke mate bij te dragen aan de cardiovasculaire complicaties die gepaard gaan met de dialysebehandeling. (1) In de nieren worden deze stoffen, als ze niet gefiltreerd worden in de nierfilters, actief uitgescheiden door de cellen van de nierbuisjes. Voorts draagt het verlies van endocriene en metabole nierfuncties bij aan de verdere achteruitgang van de nierfunctie en complicaties. Hoewel het verlies van deze functies in zekere mate is te ondervangen met medicatie blijkt het hebben van zelfs een minimale nierfunctie de overleving aan de dialyse aanzienlijk te verbeteren. De aanwezigheid van restnierfunctie blijkt een goede voorspeller voor lagere morbiditeit en mortaliteit in zowel de peritoneaal dialyse als ook hemodialysepatiëntenpopulatie. (2). Deze bevinding wekt de suggestie dat ook de vervanging van de endocriene en metabole functies van de nier, bijvoorbeeld met behulp van niercellen, in ogenschouw zou moeten worden genomen.

Regeneratieve geneeskunde

Een vakgebied dat de laatste jaren in opmars is en in belangrijke mate bijdraagt aan de biologische kunstorganen is de regeneratieve geneeskunde. De regeneratieve geneeskunde is de wetenschap die onderzoekt hoe we optimaal kunnen profiteren van het natuurlijke vermogen van het lichaam om beschadigde weefsels te herstellen. Het is een interdisciplinair vakgebied dat fundamentele disciplines zoals celbiologie, (bio)chemie



Dwarsdoorsnede nier- Illustratie InBrain, Utrecht

en materiaalkunde verenigt in nieuwe behandelmethoden zoals celtherapie en tissue engineering. Mede dankzij de opkomst van verschillende regeneratieve geneeskundenetwerken in Nederland, waaronder het Dutch Programm for Tissue Engineering (DPTE), het BioMedical Materials Programm (BMM) en Dutch Forum for Regenerative Medicine (DutchFoRM) heeft de regeneratieve geneeskunde een belangrijke plaats verworven in het onderzoekslandschap. Binnen het BMM programma gaan Nederlandse onderzoekers aan de slag met de ontwikkeling van een zogenaamde biologische kunstnier (de BioKid), een extracorporeel apparaat waarbij met behulp van niercellen grote eiwitgebonden afvalstoffen uit het bloed verwijderd kunnen worden. Het consortium hoopt binnen 3 jaar een biologische kunstnier in het lab te kunnen testen.

Eerdere ontwikkelingen

Het idee van een biologische kunstnier is zeker niet nieuw. Al in 1988 verscheen er in het blad van de American Society of Artificial Internal Organs (ASAIO) een artikel over selectieve permeabiliteit van 'levende membranen'. (3) De onderzoekers gebruikten membranen bedekt met cellen van varkensnieren om selectief transport van glucose over een semi-permeabel membraan te bewerkstelligen. Naast glucose bleken deze cellen ook uremische toxines, zoals beta-2-microglobuline te kunnen verwijderen. Men veronderstelde dat de cel-gemedieerde selectieve permeabiliteit voordelen zou hebben ten opzichte van de conventionele dialysemembranen die minder selectief waren. Spoedig werd het idee van de biologische kunstnier geboren. Uiteindelijk duurde het nog verscheidene jaren voordat het concept ook in praktijk werd gebracht.

In 1999 werd in de Verenigde Staten aan de universiteit van Michigan in Ann Arbor de eerste biologische kunstnier ontwikkeld. (4) Goed beschouwd was deze biologische kunstnier niets meer dan een conventionele dialysecartridge met polysulfon membranen die bedekt waren met nierbuisepitheelcellen. Deze cellen werden geïsoleerd en gekweekt uit menselijke nieren en bleken ook buiten het lichaam nog over een aantal belangrijke transportmechanismen te beschikken. De benodigde niercellen waren afkomstig van donornieren die ongeschikt waren voor transplantatie.

Nadat de cellen met behulp van enzymen uit het weefsel waren geïsoleerd bleken de proximale nierbuisepitheelcellen nog enkele weken goed te kweken te zijn op een speciaal daarvoor ontwikkeld kweekmedium. Dit medium was vrij van dierlijke producten zoals foetaal kalverserum, een belangrijke voorwaarde om cellen te mogen gebruiken voor therapeutische doeleinden. Voor 1 biologische kunstnier waren maar liefst 1 miljard cellen nodig. De cellen werden vervolgens uitgezaaid op de membranen zodat er een aaneengesloten laag van cellen was ontstaan. In vitro bleken de cellen in de biologische kunstnier te beschikken over dezelfde functies als die van de nierbuisjes zoals de activatie van vitamine D en selectief transport van bicarbonaat, glucose en glutathion. (5)

De eerste klinische trials met de biologische kunstnier

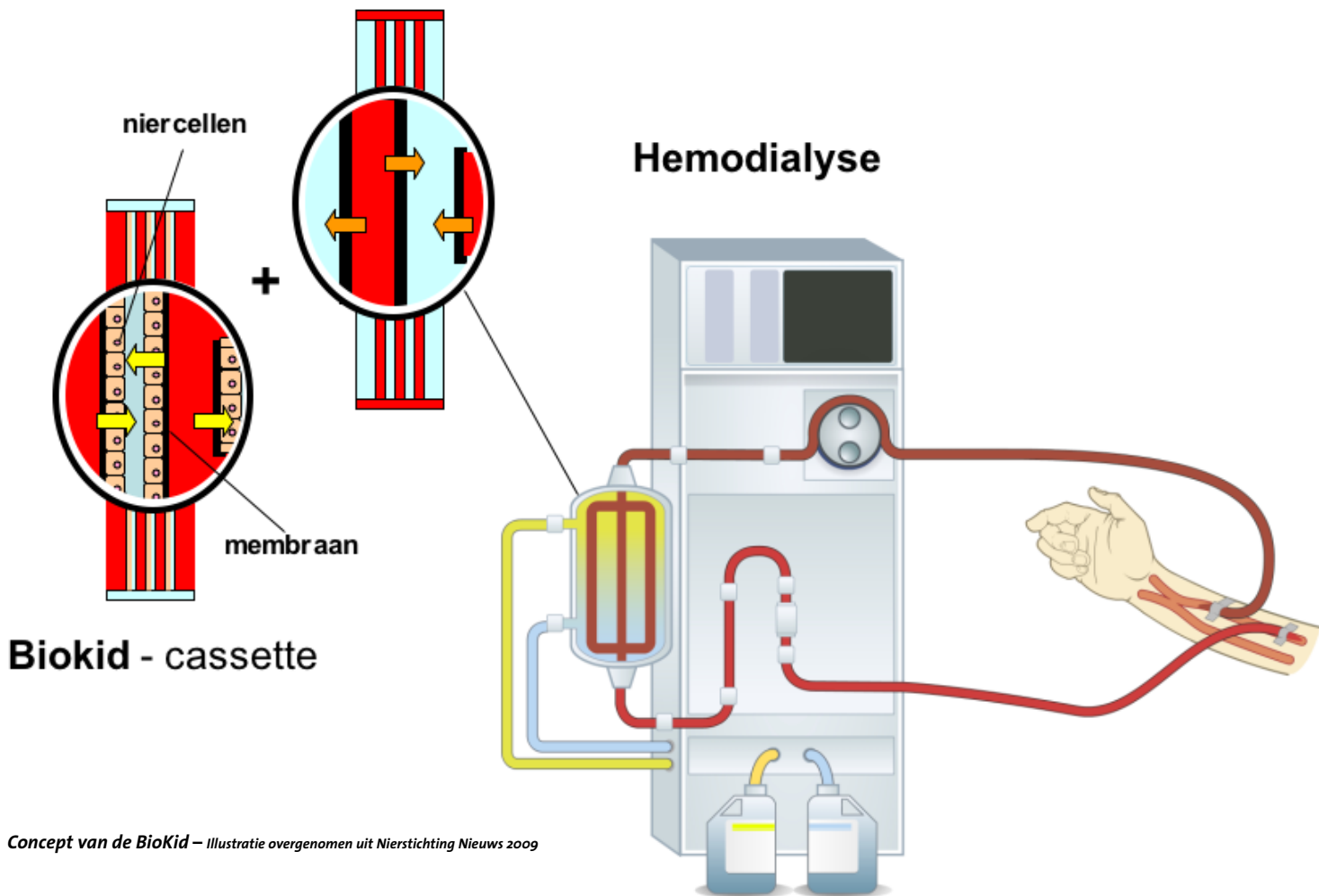
Omdat aanvankelijk de biologische kunstnier maar hooguit enkele dagen kon worden gebruikt, werd deze als eerste getest voor de tijdelijke vervanging van de nierfunctie zoals bij acuut nierfalen. Acuut nierfalen treedt in veel gevallen op als complicatie van een bloedvergiftiging en draagt in grote mate bij aan de verslechtering van de conditie van de patiënt die in meer dan de helft van de gevallen hieraan overlijdt. Een studie in varkens toonde aan dat het gebruik van de biologische kunstnier, ook wel 'renal tubular assist device' (RAD) genoemd, de overlevingskansen van een bloedvergiftiging aanzienlijk verbeterde (6). In een fase I klinische trial met 10 patiënten met acuut nierfalen ten gevolge van ernstige bloedvergiftiging bleek een 24-uurs RAD behandeling een gunstig effect te hebben op het verloop van de ziekte, inclusief de vermindering van spiegels van de cytokines G-CSF, interleukine (IL) -6 en 10 de IL-6/IL-10 ratio in het bloed. (7) Een vervolgstudie waarin 40 patiënten met acuut nierfalen ten gevolge van bloedvergiftiging maximaal 72 uur werden behandeld met de RAD toonde aan dat behandeling met de RAD de sterfte ten gevolge van bloedvergiftiging binnen 28 dagen na behandeling kon reduceren van 61% tot 33%. (8) Helaas bleek in een uitgebreidere trial die erop gericht was de effectiviteit van de RAD na productie op commerciële schaal aan te tonen, geen verschil meer meetbaar ten opzichte van de controlegroep (hemofiltratie zonder RAD), waarna de studie werd gestaakt.

Een fenomeen dat het falen van de laatste trial kan verklaren is het verlies van functionaliteit van de gebruikte cellen op de membranen, waarschijnlijk veroorzaakt door opschaling van de productie van RAD's. De mate waarin cellen in staat zijn om specialistische functies uit te voeren (differentiatie) wordt bepaald door het micromilieu waarin de cellen zich bevinden. In een standaardkweek verliezen cellen doorgaans binnen enkele dagen hun specialistische functies. Het is mogelijk om met behulp van biomaterialen het milieu van de nier zo goed mogelijk na te bootsen, waardoor de functie van de nierepitheelcellen langer behouden blijft. In de nier zijn de cellen in contact met een basaal-membraan dat bestaat uit extracellulaire matrixeiwitten, zoals collagenen en glycoproteïnen. Deze eiwitten worden herkend door receptoren op het celoppervlak, de integrines. De activatie van de juiste integrines is van belang voor het behoud van differentiatie.

Het BioKid project

Het BioKid project beoogt slimme materialen te ontwikkelen die de differentiatie van de cellen ondersteunen. Hiervoor zal gebruik gemaakt worden van zogenaamde bioactieve polymeren. Het unieke van deze polymeren is dat ze erg veel gelijkenis hebben met het natuurlijke basaal-membraan. In de praktijk blijkt het niet mogelijk om het basaal-membraan uit de nier te isoleren. Een kunstmatig basaal-membraan is dan de oplossing. Kleine peptiden die afkomstig zijn van het basaal-membraan van de nierbuisjes worden op het oppervlak van het polymere-membraan gepresenteerd. De peptiden bestaan uit korte ketens van 3-15 aminozuren lang die volgens het sleutel-slot-principe passen in de integrines op het celoppervlak. Omdat het basaal-membraan uit verschillende eiwitten bestaat, zullen er naar verwachting meerdere peptiden gebruikt moeten worden. Chemici hebben nu een methode gevonden om de samenstelling van deze peptiden nauwkeurig te regelen, waardoor het mogelijk wordt de complexiteit van het basaal-membraan te benaderen. In de komende jaren hoopt het consortium een antwoord te vinden op de vraag of en welke combinatie van peptiden bepalend is voor de differentiatie van de cellen.

Naast het presenteren van de juiste peptiden spelen ook de fysisch-chemische



Concept van de BioKid – Illustratie overgenomen uit Nierstichting Nieuws 2009

eigenschappen (o.a. de aanwezigheid van nutriënten, de pH en zuurstof) van de omgeving een rol. Juist de zuurstofvoorziening is kritisch omdat nierbuisepitheelcellen van nature een grote zuurstofbehoefte hebben. Doorgaans ligt een cel nooit verder dan 200 μm van een bloedvat af, de maximale afstand waarover zuurstof uit het bloed door een weefsel kan diffunderen. Bij het ontwerp van een biologische kunstnier zal daar ook rekening mee gehouden moeten worden. In andere kunstorganen zoals de bioartificiële lever is dit probleem opgelost door de cellen via kleine buisjes apart van zuurstof te voorzien. (9)

Naast de ontwikkeling van biomaterialen, zijn er nog verschillende andere uitdagingen. In de eerste plaats zal men een bron van nierbuisepitheelcellen moeten vinden, want waarschijnlijk zal het aantal afgekeurde donororganen niet toereikend zijn om aan de vraag te voldoen. Doorgaans hebben gedifferentieerde cellen maar een beperkte levensduur en delingscapaciteit. Een andere manier om grote hoeveelheden nierepitheelcellen te krijgen is door deze

onsterfelijk te maken. Dit is mogelijk door DNA dat codeert voor een hittegevoelig eiwit dat cellen aanzet tot deling in de celkern te brengen. Doordat het dit eiwit denatureert bij lichaamstemperatuur is onbeperkte celdeling alleen mogelijk bij lagere temperaturen. (10) Men ziet het gebruik van deze cellijnen als een mogelijkheid om een onbeperkte voorraad aan biologische kunstnieren te produceren. Een voorwaarde is wel dat zal moeten blijken of de biologische kunstnier op lange termijn veilig genoeg is voor gebruik in de patiënt. In ieder geval zullen hoge kwaliteitseisen aan de cellen worden gesteld ten aanzien van de overdracht van pathogenen. Ook de immunogeniciteit moet onderzocht worden. De cellen komen niet direct in contact met de leukocyten van de patiënt, maar vreemde eiwitten die het dialysemembraan passeren kunnen mogelijk aanleiding geven tot ongewenste activatie van immuuncellen. Vooralsnog is het gebruik van cellen voor therapie nog aan strenge regels gebonden en zal de veiligheid van het gebruik van deze cellen uitvoerig bewezen moeten worden.

Met het BioKid project is een unieke symbiose ontstaan die de komende drie jaar zijn vruchten zal afwerpen. Dat betekent geenszins dat we binnenkort al een biologische kunstnier in de kliniek kunnen verwachten. De komende 3 jaar zullen de onderzoekers nodig hebben om de BioKid te ontwikkelen en in het lab te testen. Als het succesvol blijkt, zullen studies in proefdieren volgen. Daarvoor zullen zeker ook nog enkele jaren nodig zijn, voordat het klinisch getest zou kunnen worden. Gezien de eerste successen voor de behandeling van acuut nierfalen is te verwachten dat de BioKid daar eveneens als eerste zijn toepassing zal vinden. Of voor patiënten met chronische nierschade de biologische kunstnier kan bijdragen aan een verbeterde klaring van afvalstoffen of dat de immunoregulerende activiteit een verbetering zal zijn, moet nog bewezen worden. In ieder geval zal het met het gereedkomen van de BioKid mogelijk worden om het nut voor de dialysepatiënt op grote schaal vast te stellen.

Uitdagingen voor de toekomst

De volgende stap is een implanteerbare kunstnier die volledig gemaakt is van cellen en die groeit in het lichaam van de patiënt. Op dit moment is het alleen nog mogelijk om met behulp van tissue engineering slechts relatief simpele weefsels zoals bot en kraakbeen te fabriceren.

Een compleet orgaan zoals de nier is nog niet mogelijk, hoewel er veelbelovende resultaten zijn geboekt met het gebruik van embryonale stamcellen. Deze zijn bij uitstek geschikt voor tissue engineering omdat deze cellen nog in staat zijn uit te groeien tot vele verschillende weefsels, ze zijn pluripotent. De grootste belemmeringen voor het succes van deze benadering is de noodzaak voor het gebruik van embryonale stamcellen en de beperkte kennis van de ontwikkeling en aansturing van de embryonale ontwikkeling van de nier. Echter, het is mogelijk om een deel van de embryonale ontwikkeling van de nier in een kweekschakel na te bootsen. Onderzoekers hebben laten zien dat het mogelijk is om twee primitieve embryonale nierweefsels samen te voegen en verder te kweken richting een volwassen nier. Als het weefsel na recombinitie wordt geïmplantatoerd in de volwassen nier van een rat vindt verder ontwikkeling van het weefsel en integratie plaats. (11)

Voorlopig is dit alleen een model waarmee de ontwikkeling van de nier bestudeerd kan worden.

De tijd moet uitwijzen of deze strategie geschikt is om nieuwe nieren te kweken. Naast technische zijn er ook nog ethische beperkingen. Het gebruik van embryonale stamcellen staat volop ter discussie. Een mogelijke uitweg is het gebruik van zogenaamde 'induced pluripotent stem cells' (iPS) uit volwassen weefsels voor het kweken van een kunstnier. Deze iPS cellen worden gevormd door volwassen cellen te herprogrammeren door middel van introductie van vier embryonale transcriptiefactoren. (12)

Men hoopt met deze techniek de noodzaak van embryonaal weefsel voor tissue engineering van complete organen te vermijden. Als dat blijkt te kunnen, ligt het vakgebied open voor geheel nieuwe ontwikkelingen die dichterbij de buurt komen van biologische nierfunctieovergang.

De draagbare kunstnier

Het moge duidelijk zijn dat met de opkomst van de regeneratieve geneeskun-

de het onderzoek naar nierfunctieovergang een andere weg is ingeslagen. Hoewel een 'implanteerbare kunstnier' - een nier die op een zo natuurlijk mogelijke manier de functies van de nier vervangt - nog ver weg is, krijgt met de start van het door de overheid gesubsidieerde BioKid project het onderzoek naar nieuwe vormen van biologische dialyse een enorme impuls. Sinds enkele jaren maakt de Nierstichting zich hard voor meer onderzoek naar experimentele nierfunctieovergangstherapieën. Naast de biologische kunstnier spant de Nierstichting zich in voor de draagbare kunstnier. Langer dialyseren verhoogt de gezondheid, daarom moet je het de patiënt zo comfortabel mogelijk maken om te dialyseren. Een draagbare kunstnier moet de patiënt de mogelijkheid bieden om zelf te bepalen waar en hoelang hij/zij dialyseert.

Nederland biedt bij uitstek kansen om deze innovaties tot stand te brengen. Er bestaat in Nederland een goede kennisinfrastructuur met vele academisch medische centra, technische universiteiten en biotechnologie bedrijven. De afgelopen jaren heeft de overheid miljoenen geïnvesteerd in translationeel onderzoek dat de samenwerking tussen publieke en private partijen moet verstevigen. Voorwaarde voor deelname aan deze consortia is dat de partijen zelf investeren in deze nieuwe projecten. Daarmee hebben alle partners een direct belang in het gereedkomen van het product. Op deze manier probeert de overheid samenwerking voor translationeel onderzoek te stimuleren. Het is onwaarschijnlijk dat een biologische kunstnier of zelfs een implanteerbare kunstnier de eigen nierfunctie kan evenaren. Maar zolang de vraag naar dialyse in de westerse wereld toeneemt en er geen einde lijkt te komen aan de wachtlijsten voor niertransplantatie zullen we moeten blijven zoeken naar andere vormen van nierfunctieovergang.

*Jasper Boomker is programmamanager bij de Nierstichting en als onderzoeker betrokken bij het BioKid project.

*Dr. Jasper M. Boomker
Nierstichting Nederland
Postbus 2020
1400 DA Bussum*

Referenties

1. Vanholder, R., Baurmeister, U., Brunet, P., Cohen, G., Glorieux, G., and Jankowski, J. (2008) *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 863-870
2. Perl, J. and Bargman, J. M. (2009) *Am. J. Kidney Dis.* 53, 1068-1081
3. Ip, T. K., Aebischer, P., and Galletti, P. M. (1988) *ASAIO Trans.* 34, 351-355
4. Humes, H. D., Buffington, D. A., MacKay, S. M., Funke, A. J., and Weitzel, W. F. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17, 451-455
5. Fissell, W. H., Kimball, J., MacKay, S. M., Funke, A., and Humes, H. D. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 944:284-95, 284-295
6. Fissell, W. H., Lou, L., Abrishami, S., Buffington, D. A., and Humes, H. D. (2003) *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 454-461
7. Humes, H. D., Weitzel, W. F., Bartlett, R. H., Swaniker, F. C., Paganini, E. P., Luderer, J. R., and Sobota, J. (2004) *Kidney Int.* 66, 1578-1588
8. Tumlin, J., Wali, R., Williams, W., Murray, P., Tolwani, A. J., Vinnikova, A. K., Szerlip, H. M., Ye, J., Paganini, E. P., Dworkin, L., Finkel, K. W., Kraus, M. A., and Humes, H. D. (2008) *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1034-1040
9. van de Kerkhove, M. P., Poyck, P. P., Deurholt, T., Hoekstra, R., Chamuleau, R. A., and van Gulik, T. M. (2005) *Dig. Surg.* 22, 254-264
10. Wilmer, M. J., Saleem, M. A., Masereeuw, R., Ni, L., van, d., V, Russel, F. G., Mathieson, P. W., Monnens, L. A., van den Heuvel, L. P., and Levchenko, E. N. (2009) *Cell Tissue Res.*
11. Rosines, E., Sampogna, R. V., Johkura, K., Vaughn, D. A., Choi, Y., Sakurai, H., Shah, M. M., and Nigam, S. K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20938-20943
12. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) *Cell.* 131, 861-872