

ЛЕЧЕНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУР АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК

Макеев О.Г., Зверева А.Е., Васильева М.С., Улыбин А.И.,
Зубанов П.С., Каракина Ю.В., Васьков В.Н.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России
ГУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ГКБ №40
Россия, Екатеринбург

Контактный e-mail: larim@mail.ru

Каждый год около 9 миллионов человек, страдающих сахарным диабетом (СД), становятся инвалидами из-за нейротрофических поражений нижних конечностей. Это население нескольких крупных городов. Причем, наличие нейротрофических язв у больных СД зачастую сопровождается постоянным или периодически возникающим болевым синдромом, ограничением подвижности и при инфицировании – воспалением, что является показанием для ампутации – главной причины инвалидности у этих больных [2].

В последние 30-40 лет получили широкое развитие методы культивирования и трансплантации клеток. У исследовательских групп появилась возможность не только выращивать клетки с заданными параметрами, но и использовать полученный клеточный материал для лечения различных заболеваний, связанных с дегенерацией тканей. Что касается нейротрофических повреждений, оптимальным, с нашей точки зрения, является использование собственных фибробластов человека, способных встраиваться в кожную рану для заместительной терапии. В свою очередь, проблема энgraфмента аутогенных клеток в лишенную адекватного кровоснабжения нейротрофическую язву должна быть обеспечена высоким пролиферативным потенциалом трансплантируемых клеток и трофической подложкой, обеспечивающей его поддержание. В настоящее время существуют технологии лечения поражений кожных покровов в виде коммерческих продуктов Apligraf (Organogenesis Inc.) и Dermagraft (Adv. Bioh. Inc.) с объявленной эффективностью лечения язв нижних конечностей при СД от 56 до 71% в течение 12 недель [8]. Однако, такие методы наиболее пригодны для лечения дефектов кожи раневого и ожогового генеза, так как используются культуры аллогенных клеток, применение которых, как правило, сопровождается их распадом и отсроченной реакцией отторжения.

Таким образом, была определена цель исследования: разработать эффективную технологию лечения нейротрофических язв (НТЯ) у больных СД с использованием аутогенных культивированных клеток.

Материалы и методы

Основанием для проведения испытания явилось одобрение протоколов локальным этическим комитетом ГКБ № 40 г. Екатеринбурга.

Испытание технологии проведено у 10 пациентов с СД II типа тяжелой степени. Возраст пациентов составил от 50 до 79 лет. Стаж СД – от 2 до 25 лет. При обследовании у всех пациентов были выявлены осложнения СД – диабетическая микроангиопатия нижних конечностей и выраженная полинейропатия.

Отбор пациентов проводился при наличии добровольного информированного согласия, подписанного пациентом, на основании анамнестических данных, результатов врачебного осмотра, лабораторных исследований на предмет контаминации инфекционными агентами (ВИЧ, СМВ, гепатиты, мико- и токсоплазма (Axsym, Abbott laboratories)).

Критерием включения в испытание являлись: возраст старше 18 лет, «стаж» СД не менее 1 года, состояние субкомпенсации по СД, наличие язвенного дефекта площадью не менее 35x10 мм (на стопе) или 65x50 мм (на голени) в течение 6 и более месяцев, в анамнезе присутствует опыт

безуспешного консервативного или оперативного лечения НТЯ.

Забор эксплантата выполняли независимо от стадии раневого процесса под проводниковой анестезией. Эксплантацию кожи и подлежащей подкожно-жировой клетчатки производили с язвочной области.

Клетки культивировали при 37°C, концентрации CO₂ 5% и 95% влажности в среде DMEM/Ham F-12 (Sigma) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Nu Clone) по оригинальной методике [4]. Кроме культивирования клеток кожи из незначительного количества подкожно-жировой ткани (ЖТ) ферментативным способом извлекали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) с целью получения воспроизводимой клеточной линии. Ограниченный объем ЖТ обеспечил возможность получения трех таких линий: испытуемых №№ 2, 4 и 5. Принадлежность ММСК к стволовому пулу была подтверждена дифференцировкой клеток в фиброгенном, хондрогенном и остеогенном направлениях [5].

В период культивирования и наращивания клеточной массы (в среднем 37,6 суток) рану санировали с использованием стандартного перевязочного материала и атрауматических повязок. Всем пациентам до трансплантации клеток проведена коррекция сахароснижающей терапии для поддержания субкомпенсированного состояния по углеводному обмену. Необходимым условием для трансплантации клеток являлось наличие «чистого» язвенного дефекта (количество микробных тел не более 150 на см²) и активных грануляций. Пациентам с локализацией язвы на стопе осуществлялась иммобилизация конечности с использованием разгрузочной повязки.

В рамках реализации программы безопасности перед клеточной терапией выполняли трехэтапный контроль полученных клеточных линий на вероятность наличия мутаций генов p53, k-ras, b-raf [6]. Одновременно, среди клеток, собранных с культуральных поверхностей, определяли долю Stro-1 позитивных клеток иммунофлуоресцентным методом.

С целью обеспечения возможности повторного терапевтического применения полученных клеточных линий часть клеток криоконсервировали по стандартной методике [3].

При проведении испытаний было предпринято обогащение культур дермальных фибробластов линиями ММСК строго в аутогенном варианте. При этом доля Stro-1 позитивных клеток в культурах пациентов №№ 2, 4, 5 возросла десятикратно – до 0,6%. Трансплантация обогащенных культур в клинике ГКБ № 40 производилась «слепым» методом с обязательным прохождением всех этапов предтрансплантационного контроля.

Для однократного нанесения на раневую поверхность использовали клеточную суспензию, содержащую не менее 8*10⁶ живых клеток. Количество наносимых клеток варьировало в зависимости от величины язвенного дефекта. Для фиксации клеток на поверхности язвы использовали аутологичную фибриновую подложку, обогащенную тромбозинами, и специальную повязку, обеспечивающую «влажное» заживление раны. Изготовление аутологичной пленки производилось непосредственно перед нанесением клеток на

рану.

Заживление язвы отслеживали в динамике на протяже-

нии 26 недель.

Результаты и их обсуждение

Таблица 1.

Динамика сокращения язвенного дефекта после нанесения на раневую поверхность аутогенных клеток.

№ пациента	До лечения, %	Итоги лечения					
		1 нед., %	3 нед., %	5-6 нед., %	8-9 нед., %	11 нед., %	21 нед., %
1	0	54		73	90	100	
2	0	75	89	98	100		
3	0	10		80			100
4	0	50	100				
5	0	85			100		
6	0	4			40		75
7	0	36		77		98	100
8	0%	46	69		98	100	
9	0%	60	96	100			
10	0%	35		58	80	100	

По итогам первой недели после клеточной трансплантации сокращение язвенной поверхности более чем на 50% наблюдалось у половины пациентов (Таблица 1.). При этом у пациентов, которым на рану наносили культуры, обогащенные ММСК, через семь дней зафиксировано уменьшение площади язвы на 75% (испытуемый № 2), 50% (№ 4) и 85% (№ 5). К концу третьей недели у пациента № 4 зафиксировано полное заживление язвы, у восьми человек – сокращение язвенной поверхности более чем на 60%. Спустя шесть недель у испытуемого № 5 была отмечена полная эпителизация раны, у № 2 – закрытие площади язвы на 98%, а у остальных пациентов – от 58 до 80%. К одиннадцатой неделе у 7 из 10 пациентов зафиксировано полное закрытие раневых дефектов, еще 2 находились на завершающем этапе заживления. Окончательная эпителизация у 9 пациентов была подтверждена к 21 неделе наблюдения. У одной пациентки на этом сроке наблюдалось 75% заживления. Полная эпителизация язвенного дефекта у данной испытуемой не была достигнута в связи с нарушением рекомендованной методики (использование для закрытия раневой поверхности сорбирующей марлевой повязки).

В одном случае через 6 дней после нанесения клеток у пациента отмечалось повышение температуры до фебрильных цифр. При проведении посева раневого отделяемого выявлен рост *Staphylococcus aureus*, что потребовало назначения антибиотиков широкого спектра действия. Других осложнений у испытуемых не выявлено. Аллергических реакций за время исследования отмечено не было.

После эпителизации язвы проводился ежемесячный контроль состояния рубца в течение 6 месяцев. Рецидивов заболевания за период наблюдения не отмечено.

Средняя продолжительность лечения (с момента трансплантации аутофибробластов до эпителизации раны) при локализации язвы на стопе составила 9,5 недель, при локализации на голени – 19,3 недели. При этом средние сроки заживления при использовании обогащенных ММСК культур в аутогенном варианте, составили $4,5 \pm 1,5$ недели, тогда как полное заживление язвенных дефектов монокультурами аутогенных фибробластов составило в среднем 7 недель.

Применение аутологичных клеток со свойствами стволовости способно обеспечить большую эффективность репарации за счет реализации трех основных механизмов:

1. Встраивание в раневую поверхность и замещение поврежденных клеточных структур посредством дифференцировки, направление которой определяется преобладающими элементами культуры – клетками фибробластического дифферона [9, 11, 12, 13].

2. Дифференцировка ММСК в клетки эктодермального происхождения благодаря наличию полного внутриклеточного резерва у стволовых клеток мРНК, обеспечивающего проявление их эпителиального фенотипа в зависимости от клеточного микроокружения [1, 7, 10]. Этот механизм по-

зволяет объяснить не только ускоренное формирование дермального слоя кожи, а также эндотелиальной, соединительной и мышечной тканей питающих сосудов (в рамках направления органогенеза), но и эпителия (в обход органогенеза), что сопровождается ускорением эпителизации раны.

Поддержание высокой пролиферативной активности ММСК с сохранением постоянства их пула при асимметричном делении. Важную роль способна играть и используемая нами аутогенная трофическая подложка (кровая ступка, служащая средой кондиционирования клеток), обогащенная тромбоцитами. При этом выделение тромбоцитарных факторов роста, активирующих ММСК, обеспечивает высокий пролиферативный потенциал клеточного трансплантата.

Полученные результаты по лечению нейротрофических язв у больных СД II типа тяжелой степени свидетельствуют о том, что обогащение ММСК культивируемых фибробластов и их применение в аутогенном варианте, по сравнению с использованием клеток фибробластического дифферона, сопровождается двукратным ускорением процесса заживления раны. Это подтверждает предположение об участии ММСК в формировании дермального и эпителиального слоев кожи, а также сосудистого русла, предупреждающего повторное язвообразование.

Таким образом, нами было установлено, что нанесение на поверхность язв при диабетической стопе аутологичных культивированных дермальных фибробластов, обогащенных ММСК, способствует эпителизации ран, восстанавливает дерму и подлежащие ткани в более короткие сроки по сравнению с использованием небогатых культур.

Это позволяет предполагать ММСК-опосредованную активацию энграфмента трансплантированных клеток и дифференцировки в области повреждения, их пролиферацию с ускоренным замещением зоны тканевой деструкции.

Литература

- Бозо И.Я.. Паравульнарные ткани – новый источник ММСК? //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2008. - Том III. - № 4. - с. 17-19.
- Васютков В.Я. Проценко Н.В. Трофические язвы стопы и голени //Медицина. - 1993. - с. 160.
- Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. с соавт. Перспективы применения аутогенных клеток для коррекции изменений кожи //Вестник УГМА. - 2006. - № 15. - с. 22-38.
- Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. Патент № 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи». //Бюллетень изобретений №4. 10.02.2009.
- Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И., Медведева С.Ю. Возможность получения трехмерной конструкции хряща из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. (статья) / Вестник Уральской академической Науки. – Екатеринбург, 2008. С. 70-73.

6. Makeev O.G., Buxantsev V.A., E.S. Kulikov, I.X. Izmailov, S.V. Kostyukova, A.I. Ulybin, P.S. Zubanov, A.A. Tarasovich. Мониторинг мутаций генов-супрессоров и про-тоонкогенов в структуре безопасности применения клеточных технологий. (статья) / Вестник Уральской медицинской академической науки. – Екатеринбург, 2006. №2. С. 15-22.

7. Репин В.С., Сабурин И.Н.. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2006. - № 3(5). - с. 64-72.

8. Batool Kazmi, PhD; Christopher J. Inglefield, FRCS (Plast); Mark P. Lewis, PhD Autologous Cell Therapy: Current Treatments and Future Prospects //Wounds. 2009 VOLUME: 21 PUBLICATION DATE: Sep 15 2009 pp234-242

9. Prockop S.J., Gregory C.A., Spees J.L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2003. - vol. 100. - p. 11917-23.

10. Seshi B., Kumar S., King D. et al. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis //Blood Cells Mol. Dis. - 2003. - vol. 31. p. 268-85.

11. Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J. Et al. Differentiation, cell fusion and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2003. - vol. 100. - p. 2397-402.

12. Wang G., Bunnell B., Painter R.G. et al. Potential of BM-MSC for cystic fibrosis therapy //Mol. Therapy - 2004. - vol. 9. - Suppl. 1. - p. 195-205.

13. Wang G., Bunnell B., Painter R.G. et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis //Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2005. - vol. 102. - p. 188-91.

STATE EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER PROFESSIONAL EDUCATION "THE URAL STATE MEDICAL ACADEMY" MINISTRY OF HEALTH AND SOCIAL DEVELOPMENT

O.G. Makeev, A.E. Zvereva, M.S. Vasiljeva, A.I. Ulibin, P.S. Zubanov, Y.V. Karakina, V.N. Vasjkov

*General Directorate of Health of Sverdlovsk region "Institute of medical Cell Technology"
City Clinical Hospital № 40*

The problem of the ulcers in diabetes mellitus healing has been and remains relevant, because of the huge number of patients, and high percentage of amputations because of the incurable neurotrophic ulcers. A methods available for the physicians can not ensure reduction in the number of patients with disability nowadays.

It was shown that the method is safe and effective. The epithelization of ulcers occurred within the first 11 weeks in 70% of the cases. So this technique permits the resolution of pathologies frequently encountered in surgery such as burns, ulcers in diabetic patients, ulcers in patients with venous insufficiency, and ulcers due to traumas.

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

²Макеев О. Г., ²Коротких С. А., ³Рахматуллин Р. Р., ¹Князева Е. С., ²Герасимов М. Ю., ¹Зверева А. Е.

1 – ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

2 – ГОУ ВПО "Уральская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

3 – ГОУ ВПО «Оренбургский государственный университет»
Россия, г. Екатеринбург, г. Оренбург.

Контактный e-mail: newcornea@yandex.ru

Лечение эпителиальной патологии роговицы, связанной с нарушением обновления эпителия, является актуальной проблемой офтальмологии [1]. Чаше всего дефицит регионарных стволовых клеток обусловлен ожоговым повреждением, и в основном поражает лиц трудоспособного возраста [2]. В зависимости от объема поражения лимба развивается частичная или полная утрата стволовых клеток эпителия (эпителиальных прогениторов), отвечающих за его пожизненную регенерацию. Это приводит к замещению прозрачного эпителия на непрозрачный конъюнктивальный, что уменьшает светопропускаемость роговицы и резко снижает зрение [3].

В настоящее время перспективной методикой лечения таких состояний, является трансплантация культивированных ex vivo эпителиальных прогениторов роговицы на матрице. При пересадке происходит восстановление популяции утраченных стволовых клеток, за счет чего восстанавливается эпителий. Это увеличивает прозрачность роговицы и улучшает остроту зрения поврежденного глаза в несколько раз [4].

В качестве матрицы нами впервые были изучены свойства уникального биоматериала на основе немодифицированной гиалуроновой кислоты, представляющего собой пленку из упругого материала [5]. Последняя образована нанонитями гиалуроновой кислоты, диаметр которых с гид-

ратной оболочкой не превышает 1 нм. Фотохимическая сшивка нанонитей формирует основу устойчивой пространственной нанокаркасной конструкции. В зависимости от условий получения моноклеточные ячейки имеют размеры от 10 до 100 нм, в исходном исполнении заполненные молекулами воды [6]. В отличие от конкурентных аналогов в биоматериале отсутствуют катализаторы или их примеси, а сохранение высокой пластичности и относительно свободной диффузии кислорода, связанные с применением ультрафиолетовой сшивки молекул нативной гиалуроновой кислоты (фотохимическое наноструктурирование), обеспечивает стерилизацию продукта [7].

Цель исследования: оценить возможность получения тканеинженерной конструкции эпителиальных прогениторов роговицы человека на биоматериале "Гиаматрикс®".

Материалы и методы

Биоматериал в виде пленок размерами 2x2 см закрепляли на поверхности стерильных безадгезивных чашек Петри. Инкубировали в течение суток при 5% CO₂ и 37°C в среде DMEM, содержащей глюкозу 4500 мг/л, пенициллин 100 000 ед./л и стрептомицин 100 мг/л, амфотерицин В 2,5 мг/л, тилозин 10 мг/л с целью насыщения образцов культуральной средой.

По протоколу № 8 от 16.12.2008г., одобренному этическим комитетом ГОУ ВПО УГМА Росздрава, от пациентки