

Możliwość klinicznego wykorzystania hodowli keratynocytów i komórek macierzystych naskórka w leczeniu przewlekłych owrzodzeń podudzi – doniesienie wstępne

The possibility of the clinical use of keratinocytes and epidermal stem cells cultures in the treatment of chronic leg ulcers – preliminary report

Beata Imko-Walczuk^{1,2}, Aleksandra Okuniewska¹, Michał Pikuła³, Danuta Nowacka-Pikuła⁴, Maria Czubek¹, Janusz Jaśkiewicz⁵, Piotr Trzonkowski³

¹Oddział Dermatologii Pomorskiego Centrum Traumatologii im. M. Kopernika w Gdańsku
Ordynator: dr n. med. Maria Czubek

²Wyższa Szkoła Zdrowia, Urody i Edukacji w Poznaniu, Wydział Zamiejscowy w Gdyni
Rektor: prof. dr hab. n. med. Barbara Raszeja-Kotelba

³Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Piotr Trzonkowski, prof. nadzw. GUMed

⁴Oddział Rehabilitacji dla Dzieci Wojewódzkiego Zespołu Reumatologicznego w Sopocie
Ordynator: dr n. med. Agata Deja

⁵Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. med. Janusz Jaśkiewicz

Przegl Dermatol 2012, 99, 230–234

SŁOWA KLUCZOWE:

owrzodzenia podudzi, terapia ran przewlekłych, hodowla keratynocytów.

KEY WORDS:

leg ulcers, therapy of chronic wounds, keratinocyte culture.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

dr n. med.
Beata Imko-Walczuk
Oddział Dermatologii
Pomorskie Centrum
Traumatologii
im. M. Kopernika w Gdańsku
ul. Nowe Ogrody 1–6
80-803 Gdańsk
e-mail: bimko@wp.pl

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. Leczenie ran przewlekłych nadal stanowi poważny problem współczesnej medycyny. Niepowodzenia terapeutyczne obserwuje się zarówno u chorych leczonych zachowawczo, jak i u tych, u których podjęto leczenie zabiegowe, i dlatego wciąż poszukiwane są nowe metody terapeutyczne.

Cel pracy. Przedstawienie klinicznego zastosowania hodowli keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórka u dwóch pacjentów z przewlekłymi ranami i próba wyznaczenia klinicznych kryteriów włączania oraz wykluczania chorych z tego typu terapii.

Materiał i metodyka. Od chorych uzyskiwano zawiesinę komórkową z pełnej grubości skóry, którą następnie zakładano w dno owrzodzeń. Rany zabezpieczano jałowym opatrunkiem nasączonym solą fizjologiczną.

Wyniki. U obu pacjentów uzyskano częściową epitelizację w obrębie owrzodzenia i znaczną poprawę kliniczną w otoczeniu rany.

Wnioski. Pomimo uzyskania poprawy klinicznej w obu przedstawionych przypadkach autorzy zwracają uwagę na potrzebę poprawy warunków technicznych hodowli komórkowej oraz wypracowania kryteriów klinicznych opisanej procedury terapeutycznej.

ABSTRACT

Introduction. Treatment of chronic leg ulcers is still a serious problem in modern medicine. Therapeutic failures are observed both in patients treated conservatively and in those in whom surgical treatment was undertaken. Therefore there is a need of new methods of therapy.

Objective. To present clinical use of cultured keratinocytes and epidermal stem cells in two patients with chronic leg ulcers. The authors also attempted to determine the clinical criteria for inclusion and exclusion of patients for this type of therapy.

Material and methods. A cell suspension from full-thickness skin was obtained from both patients and placed in the bottom of the ulcers. The wounds were protected with sterile dressings soaked in saline.

Results. In both patients partial re-epithelialisation of the ulcer and significant clinical improvement around the wound were observed.

Conclusions. In spite of clinical improvement observed in both cases, the authors draw attention to the need of improvement of cell culture technique and development of clinical criteria for this therapeutic procedure.

WPROWADZENIE

Owrzodzenia goleni dotyczą około 1% ludności świata. W Europie średnia zachorowalność mieści się w przedziale od 1% do 4% na 1000 osób, ze znaczną przewagą kobiet, a stosunek kobiet do mężczyzn wynosi 2,8 : 1. U osób w wieku 60–80 lat częstość zachorowań zwiększa się do około 6%. W Polsce owrzodzenia goleni występują u 17–20% populacji. Leczenie połowy wszystkich owrzodzeń trwa średnio 9 miesięcy, w 20% przypadków 2 lata, a u 8% chorych ponad 5 lat. Na uwagę zasługuje fakt, że w ponad 70% przypadków owrzodzeń goleni możliwy jest nawrót schorzenia [1].

Etiopatogeneza owrzodzeń goleni jest wieloczynnikowa, a w niektórych przypadkach trudna do jednoznacznego określenia. Należy pamiętać, że rana przewlekła stanowi jedynie objaw, a nie rozpoznanie. Potencjalne przyczyny są różnorodne i obejmują: przewlekłą niewydolność żylną (ang. *chronic venous insufficiency* – CVI), miażdżycę zarostową kończyn, nowotwory, choroby metaboliczne, zapalenie naczyń, infekcje, urazy oraz piodermię zgorzelinową [2, 3].

Najczęstszą przyczyną niegojących się owrzodzeń jest jednak CVI, którą definiuje się jako zespół objawów klinicznych wywołanych nadciśnieniem w układzie żył powierzchownych i głębokich z towarzyszącym refluksem krwi żyłnej [4]. Stanowi ona poważny problem medyczny, który traktowany jest, obok cukrzycy czy otyłości, jako jedna z chorób cywilizacyjnych. W Europie schorzenie to dotyczy 40–60% kobiet i 15–30% mężczyzn, w naszym kraju odpowiednio 47% i 38%. Wyższą zachorowalność u kobiet obserwuje się szczególnie w grupie powyżej 40 lat, co wiąże się z przebytymi ciążami oraz stosowaniem przewlekłej antykoncepcji [4].

U podłoża CVI leży zaburzony i opóźniony powrót krwi żyłnej z kończyn dolnych do serca, co

powoduje nadciśnienie żyłne. Zmiany mogą dotyczyć żył powierzchownych, głębokich lub przeszywających [5]. Do czynników predysponujących zalicza się: obciążenia rodzinne uwarunkowane genetycznie, żyłaki kończyn dolnych, zespół pozakrzepowy, siedzący lub stojący tryb życia, zaburzenia funkcji pompy mięśniowo-stawowej, nadwagę i otyłość, dietę ubogoresztkową, przebyte cięższe, zaburzenia hormonalne, wiek, płeć, urazy i długotrwałe unieruchomienie [6, 7].

Leczenie trudno gojących się ran nadal stanowi poważny problem współczesnej medycyny. W wielu przypadkach leczenie konwencjonalne, mimo zastosowania najnowocześniejszych aktywnych opatrunków, nie przynosi spodziewanych efektów. Niepowodzenia obserwuje się również u chorych, u których stosuje się inwazyjne metody leczenia. Dlatego wciąż poszukuje się nowych, alternatywnych metod terapii, a jedną z nich jest przeszczepianie wyhodowanych *in vitro* keratynocytów.

Do terapii kwalifikuje się pacjentów płci męskiej i żeńskiej w wieku 18–65 lat z owrzodzeniami podudzi o różnorodnej etiologii, o średnicy 1–5 cm, bez limitu czasowego utrzymywania się owrzodzeń. Owrzodzenia pacjentów włączanych do terapii muszą spełniać następujące kryteria kliniczne: czyste, ziarninujące dno bez zmian martwiczych, otoczenie niezmienione zapalnie lub zmienione w niewielkim stopniu, niewielki lub umiarkowany wysięk. W przypadku stwierdzenia nasilonego stanu zapalnego przed włączeniem do badania konieczne jest zastosowanie antybiotykoterapii zgodnej z antybiogramem posiewu z rany. W badaniach laboratoryjnych chory nie może wykazywać cech stanu zapalnego. Do leczenia nie kwalifikuje się pacjentów z ciężkimi chorobami ogólnoustrojowymi, chorobami autoimmunologicznymi, nowotwo-

rowymi, chorych w trakcie terapii immunosupresyjnej oraz cytostatykami, obciążonych zaburzeniami psychicznymi, pacjentów z dodatnim wynikiem badań w kierunku zakażenia HIV, HCV, HBV oraz nierokujących współpracy w trakcie leczenia.

Warunki kliniczne pozyskiwania materiału do hodowli keratynocytów i komórek macierzystych naskórka w ośrodku autorów przedstawiono poniżej. Po poinformowaniu pacjenta o założeniach badania oraz po podpisaniu przez niego świadomej zgody na procedurę naukowo-terapeutyczną pobiera się chirurgicznie około 1 cm² skóry pełnej grubości z okolicy brzucha lub pośladka. Następnie pobrany materiał jest transportowany w roztworze buforowanej soli fizjologicznej (PBS) do laboratorium Zakładu Transplantologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed), gdzie zakłada się hodowlę komórkową trwającą 2–3 tygodni. Hodowlę prowadzi się do drugiego pasażu, otrzymując 5–8 mln komórek – zarówno zróżnicowanych keratynocytów, jak i komórek wykazujących fenotyp komórek macierzystych naskórka. Po

przygotowaniu 5–10 ml zawiesiny komórkowej w roztworze soli fizjologicznej nakrapla się ją wolno przez około 30 min na dno owrzodzenia. Następnie owrzodzenie zabezpiecza się jałowym opatrunkiem nasączonym solą fizjologiczną. Pierwszą zmianę opatrunku wykonuje się dopiero po 3 dniach od aplikacji do rany zawiesiny komórkowej. Kolejne kontrole odbywają się średnio co 2 tygodnie.

Na poniższe badania uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy GUM.

CEL PRACY

Praca jest doniesieniem wstępnym dotyczącym próby klinicznego zastosowania hodowli keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórka u 2 pacjentów z owrzodzeniami podudzi związanymi z CVI. Jednocześnie autorzy podejmują próbę wyznaczenia klinicznych kryteriów włączania oraz wykluczania chorych z tego typu terapii.

OPISY PRZYPADKÓW

Przypadek I.

Kobieta, lat 55, obciążona nadciśnieniem tętniczym, z owrzodzeniem prawego podudzia trwającym od ponad roku, powstałym na tle CVI. Chorą dotychczas leczono zachowawczo opatrunkami aktywnymi (opatrunki hydrożelowe, hydrokoloidowe, alginianowe, zawierające srebro) oraz lekami poprawiającymi przepływ naczyniowy, jednak bez ewidentnej poprawy klinicznej. Owrzodzeniu towarzyszyły nawracające, silne dolegliwości bólowe kończyny dolnej prawej.

Przy przyjęciu na Oddział Dermatologii Pomorskiego Centrum Traumatologii w Gdańsku obserwowano owrzodzenie o wielkości 7 cm × 4 cm z płytkim dnem, wypełnionym czystą ziarniną (ryc. 1).

Od chorej pobrano 1 cm² skóry pełnej grubości i przekazano do Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii GUM. Po 3 tygodniach hodowli zawiesinę komórkową zaaplikowano zgodnie z kryteriami badania (ryc. 2.). Po tygodniu od aplikacji zaobserwowano uniesienie dna oraz zmniejszenie stanu zapalnego obserwowanego w otoczeniu owrzodzenia (ryc. 3.). Po kolejnym tygodniu stwierdzono zmniejszenie wymiarów owrzodzenia w osi długiej o około 1 cm. Po 2 miesiącach od aplikacji zawiesiny komórkowej uzyskano zmniejszenie powierzchni rany do wymiaru 6 cm × 2 cm (ryc. 4.).

W okresie letnim nastąpiło ponowne pogorszenie stanu miejscowego w postaci powiększenia owrzodzenia i nasilenia stanu zapalnego wokół rany.



Rycina 1. Owrzodzenie o wielkości 7 cm × 4 cm przed założeniem hodowli komórkowej

Figure 1. Leg ulcer (7 cm × 4 cm) before the application of cultured cells



Rycina 2. Proces nakładania zawiesiny komórkowej do owrzodzenia

Figure 2. Process of application of cell suspension to the ulceration



Rycina 3. Stan kliniczny owrzodzenia po 7 dniach od przeprowadzenia procedury terapeutycznej

Figure 3. Clinical status of the ulcer seven days after the therapeutic procedure

Leczenie zachowawcze kontynuowano w warunkach ambulatoryjnych.

Przypadek 2.

Mężczyzna, lat 34, obciążony nikotynizmem (nałogowy palacz), z owrzodzeniem lewego podudzia o etiologii żyłnej występującym od 18. roku życia. Chory dotychczas leczony zachowawczo, bez poprawy stanu miejscowego, niezakwalifikowany do zabiegu chirurgicznego przez chirurga naczyniowego.

Klinicznie owrzodzenie o wymiarach 3 cm × 1,5 cm, z głębokim dnem wypełnionym ziarniną oraz otoczeniem zmienionym zapalnie (ryc. 5.).

Po uzyskaniu pisemnej zgody na procedurę badawczo-terapeutyczną u chorego wykonano biopsję skórną. Po 2 tygodniach hodowli komórkowej mężczyźnie nałożono zawieszinę keratynocytów na dno owrzodzenia zgodnie z procedurą terapeutycz-



Rycina 5. Obraz kliniczny owrzodzenia przed aplikacją hodowli komórkowej

Figure 5. The clinical appearance of leg ulcer before application of the cultured cells



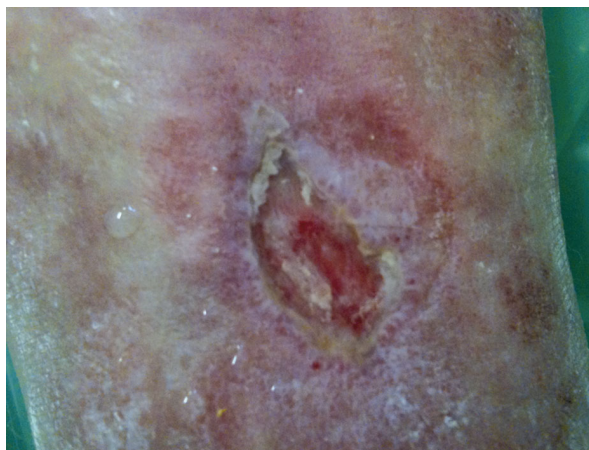
Rycina 4. Stan kliniczny owrzodzenia po 2 miesiącach od przeprowadzenia procedury terapeutycznej

Figure 4. The clinical condition of the ulcer two months after carrying out the therapeutic procedure

ną. Obserwacja kliniczna owrzodzenia po 2 tygodniach od aplikacji keratynocytów wykazała znaczną epitelizację od obwodu rany. Po miesiącu uzyskano zmniejszenie owrzodzenia o około 30% w postaci uniesienia dna i epitelizacji od obwodu rany (ryc. 6.).

OMÓWIENIE

U przedstawionych pacjentów przeprowadzono pierwsze próby klinicznego zastosowania hodowlanych keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórka w leczeniu długotrwałych owrzodzeń podudzi powstałych na tle CVI. Wstępne obserwacje po zastosowaniu tej metody wskazują na pewną poprawę parametrów gojenia się rany. Na tym eta-



Rycina 6. Poprawa stanu klinicznego po miesiącu od wdrożenia procedury terapeutycznej. Obserwuje się znaczne uniesienie dna, epitelizację od brzegów oraz zmniejszenie stanu zapalnego wokół rany

Figure 6. Clinical improvement 1 month after implementation of the therapeutic procedure. A significant reduction of depth, re-epithelialisation of the margins and reduction of inflammatory reaction around the wound are observed

pie uzyskane efekty są z pewnością ograniczone techniką zakładania i efektywnością wzrostu hodowli, możliwością utrzymywania przeszczepu na ranie oraz przygotowaniem samego pacjenta. Szczególnie istotne wydaje się tu nanoszenie komórek na ranę tak, aby uległy one trwałej adhezji do podłoża, co warunkuje ich prawidłową proliferację i gojenie się rany [8]. W kolejnych próbach autorzy zamierzają zmodyfikować formę podania komórek poprzez dodanie kleju tkankowego (żel fibrynowy). Z pewnością kliniczne zastosowanie hodowli keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórka wymaga jeszcze optymalizacji warunków hodowli, zweryfikowania klinicznych kryteriów włączenia i wykluczania pacjentów, wystandaryzowania procedur oraz zasad postępowania po założeniu hodowli komórkowej, tj. zastosowania odpowiednich leków wspomagających i opatrunków. Mimo to autorzy pracy są przekonani, że przedstawiona metoda może stanowić obiecującą alternatywę w leczeniu przewlekłych ran. Szczególnie warta podkreślenia jest rola komórek macierzystych naskórka odpowiedzialnych za prawidłową hodowlę komórkową oraz odtwarzanie struktur naskórka *in vitro* oraz *in vivo* [8–10]. Umiejętna hodowla tych komórek, a następnie aplikacja kliniczna będą z pewnością istotnymi etapami w przyszłych zastosowaniach terapeutycznych.

Otrzymano: 17 X 2011 r.
Zaakceptowano: 20 II 2012 r.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008–2012 jako projekt badawczy nr N N403 089335.

Piśmiennictwo

1. **Czubek M., Okuniewska A.:** Zastosowanie koncepcji TIME w leczeniu różnych rodzajów ran w obrębie goleni. *Zakażenia* 2009, 9, 85-93.
2. **Renner R.:** Aktualne opcje w terapii przewlekłych owrzodzeń podudzi. *Dermatologica Futura* 2008, 4, 14-22.
3. **Jawień A., Szewczyk M.:** Kliniczne i pielęgnacyjne aspekty opieki nad chorymi z owrzodzeniem żylnym. Termedia, Poznań, 2008.
4. **Seneczko F.:** Leczenie zachowawcze owrzodzeń goleni u chorych z przewlekłą niewydolnością żylną. *Dermatol Prakt* 2009, 1, 13-29.
5. **Żmudzińska M., Czarnecka-Operacz M., Silny W.:** Charakterystyka przewlekłej niewydolności żylną u chorych na przewlekłe żyłne owrzodzenia podudzi. Część I. Charakterystyka kliniczna. *Przeegl Flebolog* 2006, 14, 59-64.
6. **Jawień A.:** Epidemiologia przewlekłej niewydolności żylną w Polsce. *Choroby Żył* 2001, 24, 1-3.
7. **Ramelet A.A., Monti M.:** Flebologia. Przewodnik. Via Medica, Gdańsk, 2003.
8. **Lemaître G., Nissan X., Baldeschi C., Peschanski M.:** Concise review epidermal grafting: the case for pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2011, 29, 895-899.
9. **Pikula M., Kondej K., Jaśkiewicz J., Skokowski J., Trzonkowski P.:** Flow cytometric sorting and analysis of human epidermal stem cell candidates. *Cell Biol Int* 2010, 34, 911-915.
10. **Drukala J., Majka M., Ratajczak M.:** Postępy w metodach izolacji i namnażania komórek macierzystych naskórka ludzkiego. *Post Biol Kom* 2003, 30, 37-48.