

Experimentálna terapia kmeňovými bunkami je perspektívna v liečbe chronického diabetického vredu – prípadová štúdia

Jozef Lang

Nemocničná, a. s., Nemocnica Malacky

Diabetes mellitus patrí medzi časté choroby v populácii, býva spájaný so závažnými komplikáciami. Práve vasculárne a neuropatické komplikácie sú zodpovedné za morbiditu aj mortalitu diabetických pacientov a sú sprevádzané vysokými nákladmi na liečbu. Diabetická noha patrí medzi najzávažnejšie komplikácie, ktoré často vedú k strate končatiny. V súčasnosti dostupná bežná liečba často nie je úplne úspešná. Hľadanie nových metód terapie chronických diabetických vredov je dôležitým cieľom súčasného výskumu. Sľubnou metódou liečby diabetickej nohy sa ukazuje využitie mezenchymálnych kmeňových buniek. Napriek viacerým klinickým štúdiám doposiaľ neexistujú jednoznačné odporúčania pre prax. Predstavíme prípadovú štúdiu, ktorej cieľom bolo overiť možnosti využitia experimentálnej terapie kmeňovými bunkami v liečbe diabetického vredu v podmienkach Slovenskej republiky. Úspešnosť využitej liečby otvorila možnosti širšej klinickej štúdie, ktorá v súčasnosti prebieha. **Kľúčové slová:** diabetes mellitus, diabetická noha, mezenchymálne kmeňové bunky

Experimental therapy with stem cells is promising in the treatment of chronic diabetic ulcer – a case study

Diabetes mellitus is a frequent disease in the population associated with serious complications. The vascular and neuropathic complications are significantly responsible for the morbidity and mortality of diabetic patients and accompanied by high treatment expenses. The diabetic foot is one of the most severe complications that often lead to limb loss. The currently available routine treatment is often not sufficiently effective. The search for new methods of chronic diabetic ulcer therapy is an important task of contemporary research. The use of mesenchymal stem cells has proven to be a promising method of treating diabetic foot. Despite several clinical studies, there are still no clear recommendations for practice. We present a case study, in which the aim was to verify the possibilities of using experimental stem cell therapy in the treatment of diabetic ulcer in the Slovak Republic. The success of the applied treatment has opened up the possibilities of a broader clinical study that is currently underway.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic foot, mesenchymal stem cells

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 77 – 79

Úvod

Diabetes mellitus patrí k závažným metabolickým chorobám s vysokým výskytom v populácii. Prevalencia diabetu mellitu v Slovenskej republike sa za posledných 30 rokov takmer strojnásobila. V Európe patríme ku krajinám s najvyšším výskytom tejto choroby⁽¹⁾. Aj keď sú k dispozícii možnosti farmakologickej liečby, s ohľadom na rastúcu incidenciu diabetu a predlžovanie života diabetikov sa hlavnou hrozbou stávajú chronické komplikácie diabetu. Tie sú sprevádzané vysokými nákladmi na liečbu a v neposlednom rade sú zodpovedné za zvýšenú mortalitu diabetických pacientov. Jedným z hlavných a najdôležitejších cieľov manažmentu diabetu je preto prevencia vzniku a progresie vasculárnych a neuropatických komplikácií.

Chronické komplikácie vznikajú v súvislosti s postihnutím cievného riečiska pri dlhodobom neuspokojivo kontrolovanej hyperglykémii. Na ich rozvoji sa podieľa aj porucha metabolizmu lipidov, arteriálna hypertenzia, inzulínová rezistencia a obezita, ktoré sú spolu zahrnuté do jednotky zvanej metabolický syndróm. Kardiovaskulárne riziko je u pacientov s diabetom dvoj- až štvornásobne vyššie v porovnaní s celkovou populáciou. Diabetická makroangiopatia vedie k akcelerácii aterosklerózy veľkých a stredne veľkých tepien. Pri diabetickej mikroangiopatii vznikajú komplexné funkčné

a štrukturálne zmeny vedúce k diabetickej nefropatii, retinopatii a neuropatii. Štúdie ukazujú, že v čase diagnostiky diabetu má už 10 % pacientov diabetickú nefropatiu, 6 % diabetickú retinopatiu, až 52 % diabetickú neuropatiu⁽²⁾. Celkovo sa mikrovaskulárne komplikácie u asymptomatických pacientov s novozisteným diabetom vyskytujú takmer v tretine prípadov⁽³⁾.

Medzi časté komplikácie pokročilého diabetu patrí aj diabetická noha. Tá je podľa WHO definovaná ako infekcia, ulcerácia a/alebo deštrukcia tkanív nohy v dôsledku neuropatie a/alebo angiopatie s ischemiou. Napriek pokrokom v diagnostike a liečbe diabetických komplikácií je liečba chronických vredov náročná, nie vždy úspešná a viac ako jedna tretina prípadov vedie k potrebe amputácie postihnutých končatín⁽⁴⁾. Diabetická noha má závažný medicínsky dosah, ovplyvňuje kvalitu života pacientov a možnosti pracovného a spoločenského uplatnenia. Má zásadný vplyv na zvýšenie finančných a personálnych nárokov na zdravotný systém a ovplyvňuje sociálne prostredie pacienta.

Štandardná liečba diabetických vredov nohy podľa súčasných liečebných protokolov zahŕňa najmä odľahčovanie nohy, chirurgické vyčistenie rany a obnovenie prekrvenia. Klinický efekt takejto liečby je limitovaný a komplikovaný časťami recidívami. Hľadanie nových metód terapie chronických

diabetických vredov je dôležitým cieľom súčasného výskumu. Ako jedna zo sľubných metód sa ukazuje liečba diabetickej nohy kmeňovými bunkami⁽⁵⁾. Kmeňové bunky sú schopné ovplyvniť abnormálne zmenené mechanizmy hojenia a porušenu signalizáciu buniek v diabetických ranách a podporovať hojenie. Liečba je založená na mezenchymálnych kmeňových bunkách a na predpoklade, že tieto bunky produkujú modulatory, ktoré ovplyvňujú zápalovú reakciu aj rastové faktory potrebné na regeneráciu tkanív. Mechanizmus účinku týchto buniek spočíva v tom, že priamo tlmia zápalový proces znížením sekrécie prozápalových a zvýšením produkcie protizápalových cytokínov. Mezenchymálne kmeňové bunky vylučujú niekoľko rastových faktorov, a tým podporujú proliferáciu fibroblastov v rane, angiogézu a ukladanie kolagénu^(6,7). V súčasnosti sa uznáva aj ich antimikrobiálna aktivita⁽⁸⁾.

Cieľom predloženej prípadovej štúdie bolo overiť možnosti využitia experimentálnej terapie kmeňovými bunkami v liečbe diabetickeho vredu v podmienkach Slovenskej republiky.

Prípadová štúdia

Prezentujeme prípadovú štúdiu 51-ročnej ženy s diagnózou diabetes mellitus 2. typu a s diabeticou ulceráciou na ľavej nohe pod MTTP v zhybom v trvaní 3 roky, liečenou štandardnými liečebnými postupmi požívanými v terapii chronických vredov (odľahčenie končatiny, chirurgické vyčistenie rany, lokálna a celková ATB liečba, vlhké preväzové techniky, kompenzácia diabetu).

Pred aplikáciou kmeňových buniek boli pacientke urobené štandardné laboratorné odbery, bolo realizované vyšetrenie MRI na vylúčenie osteomyelitídy skeletu, ster z rany na bakteriologické vyšetrenie a excízia z okraja vredu na histologické vyšetrenie.

Použité kmeňové bunky pochádzali z pupočníkovej krvi, ktorá sa odobrala prvoroďičkám rodiacim cisárskym rezom. Vzorky buniek boli spracované do 4 hodín po odbere. Tehotné darkyne boli testované na prenosné choroby HBV, HCV, HIV a syfilis, CMV (s negatívnymi výsledkami na testované infekcie). Izolované bunky boli kultivované a otestované na prítomnosť baktérií, húb a endotoxínov.

Mezenchymálne kmeňové bunky boli pacientke aplikované ako dve liečebné dávky vo forme niekoľkých injekcií do rany a do bezprostrednej oblasti rany. Interval medzi dvoma podaniami bol týždeň. V priebehu každej liečby sa podali bunky v objeme 2,5 ml s počtom buniek 2×10^8 injekčne.

Pacientka bola sledovaná v intervaloch 1, 2 a 3 mesiace po aplikácii mezenchymálnych kmeňových buniek, s viditeľným zmenšovaním kožného defektu, s postupnou reepitelizáciou rany (**obrázok 1**) aj s redukciou bakteriálneho osídlenia rany. Došlo k vymiznutiu masívnej kolonizácie rany *Staphylococcus aureus*. Z výsledkov realizovanej histológie bol evidentný vplyv na akceleráciu angiogézy, tvorbu granulačného tkaniva s jeho vyzrievaním.

Diskusia

Mezenchymálne kmeňové bunky predstavujú skupinu multipotentných buniek s vysokým potenciálom v regeneratívnej medicíne. Získavajú sa najmä z pupočníkovej krvi a z humánnej placenty. Bunky majú potenciál diferenciácie na väčšinu mezodermálnych buniek^(9,10), a tým môžu prispieť

Obrázok 1. Vzhľad ulcerácie pred začatím liečby, 1 a 2 mesiace po aplikovaní mezenchymálnych kmeňových buniek



k efektívnejšej tvorbe granulačného tkaniva, lepšiemu hojeniu rán aj k efektívnejšej revaskularizácii tkaniva⁽¹¹⁾.

Prezentovaná štúdia dokumentuje pozitívny účinok aplikácie mezenchymálnych kmeňových buniek v liečbe diabetickej nohy, a to už v priebehu 1 mesiaca. Podobné výsledky prezentovali aj iní autori^(12,13). Podávanie mezenchymálnych

kmeňových buniek malo pozitívny účinok na podporu revascularizácie hojaceho sa diabetickeho vředu a tvorbu granulačného tkaniva. Diabetes vedie k predĺženiu a zväzneniu zápalovej fázy a k poruchám vaskularizácie⁽¹⁴⁾. Práve porucha tvorby granulačného tkaniva, a to najmä jeho vyzrievania, sprevádzaná zníženou produkciou kolagénu, sa v experimentoch ukazuje ako dôležitý faktor pri zhoršovaní hojenia rán pri diabete⁽¹⁵⁾.

Publikované vedecké práce ukazujú, že podávanie mezenchymálnych kmeňových buniek je sprevádzané aj silným antimikrobiálnym účinkom, ktorý je čiastočne mediovaný vylučovaním chemokínov, lokálnych mediátorov imunitnej reakcie a ďalších antimikrobiálne pôsobiacich peptidov. Ukazuje sa, že mezenchymálne kmeňové bunky majú pozitívny protizápalový účinok v experimentálnych modeloch sepsy v in vitro, ako aj in vivo experimentoch⁽⁹⁾. Už tieto výsledky preduroujú ich možný pozitívny účinok v liečbe chronických, ťažko sa hojajúcich rán. Práve súčasná produkcia rastových faktorov s vplyvom na angiogénu a významný antimikrobiálny účinok predstavujú veľmi zaujímavú kombináciu s ohľadom na využitie v liečbe ťažko sa hojajúcich diabetickech vředov predkolenia⁽⁵⁾.

Štúdiom možností využitia mezenchymálnych kmeňových buniek je v súčasnosti predmetom intenzívneho výskumu. Podľa databázy klinických skúšok spravovanej americkým Národným inštitútom zdravia (clinicaltrials.gov) odštartovalo, prebieha alebo v nedávnej minulosti prebehlo viacerých klinických štúdií aplikácie kmeňových buniek u pacientov

s diabetom mellitom, z toho 31 štúdií sa týka priamo diabetickej nohy. Podľa metaanalýzy 6 klinických štúdií Guo et al.⁽¹⁶⁾ konštatujú, že aplikácia kmeňových buniek zlepšila proces hojenia, a to aj pri léziách väčších ako 5 cm², aj vo vekovej skupine nad 70 rokov. Analýza však poukázala na viaceré limitácie týchto štúdií. Doposiaľ nebol vytvorený vhodný jednotný protokol odporúčanej liečby. Napriek viacerým už ukončeným klinickým štúdiám chýbajú ucelené závery a odporúčania, ktoré by bolo možné priamo aplikovať do praxe. Spoločným menovateľom realizovaných štúdií je taktiež aplikácia samostatných kmeňových buniek.

Výsledky realizovanej prípadovej štúdie potvrdzujú perspektívne pozitívne vplyvy podávania mezenchymálnych kmeňových buniek v liečbe diabetickech ulcerácií. Zaujímavá by mohla byť súčasná aplikácia ďalších podporných liečebných metód vrátane larválnej, prípadne fágovej terapie. V súčasnosti pokračujeme v ďalšom výskume, ktorý by zahŕňal aj tieto metódy.

Štúdia bola realizovaná s podporou projektu APVV-17-0526 „Využitie mezenchymálnych kmeňových buniek v kombinácii s ďalšími podpornými biologickými postupmi v liečbe chronického diabetickeho vředu“ a je súčasťou práce výskumného centra vybudovaného vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: „Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES“, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. European health for all database (HFA-DB). 2018; WHO Regional Office for Europe, Division of Information, Evidence, Research and Innovation: Copenhagen, Denmark.
2. Heydari I, Radi V, Razmjou S, et al. Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2010; 2(1): 61-63.
3. Gupta A, Gupta AK, Singh TP. Occurrence of complications in newly diagnosed type 2 diabetes patients: a hospital based study. *J Indian Med Assoc* 2013; 111(4): 245-7.
4. Margolis DJ, Allen-Taylor L, Hoffstad O, et al. Diabetic Neuropathic Foot Ulcers. The association of wound size, wound duration, and wound grade on healing 2002; 25(10): 1835-1839.
5. Blumberg SN, Berger A, Hwang L, et al. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 96(1): 1-9.
6. Wu Q, Chen B, Liang Z. Mesenchymal Stem Cells as a Prospective Therapy for the Diabetic Foot. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 4612167.
7. Leyla Turker S, Isil A. Challenge of Mesenchymal Stem Cells Against Diabetic Foot Ulcer. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2015; 10(6): 530-534.
8. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Front Immunol* 2017; 8: 339.
9. Schuh EM, Friedman MS, Carrade DD, et al. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. *Am J Vet Res* 2009; 70(12): 1526-35.
10. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5): 1669-75.
11. Tran TC, Kimura K, Nagano M, et al. Identification of human placenta-derived mesenchymal stem cells involved in re-endothelialization. *J Cell Physiol* 2011; 226(1): 224-35.
12. Sener LT, Albeniz I. Challenge of Mesenchymal Stem Cells Against Diabetic Foot Ulcer. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015; 10(6): 530-4.
13. Cao Y, Gang X, Sun C, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 9328347.
14. Tengrup I, Hallmans G, Agren MS. Granulation tissue formation and metabolism of zinc and copper in alloxan-diabetic rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1988; 22(1): 41-5.
15. Yue DK, Swanson B, McLennan S, et al. Abnormalities of granulation tissue and collagen formation in experimental diabetes, uraemia and malnutrition. *Diabet Med* 1986; 3(3): 221-5.
16. Guo J, Dardik A, Fang K, et al. Meta-analysis on the treatment of diabetic foot ulcers with autologous stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 228.

MUDr. Jozef Lang
Nemocničná, a. s.
Nemocnica Malacky
e-mail: jozeflang@gmail.com