

Tehnologii de cultivare *in vitro* a fibroblastelor din piele pentru tratamentul pacienților cu ulcere cronice

Tatiana MALCOVA¹, Diana CIRIMPEI², Octavian CIRIMPEI³, Viorel NACU^{1,3}

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

²Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București, România

³Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie, Chișinău, Republica Moldova

Autor corespondent: congres.dermato.2016@gmail.com

Rezumat

Introducere. Deoarece mulți factori duc la formarea ulcerelor cronice de gambă, evaluarea sistematică a pacientului impune o abordare interdisciplinară și are drept scop determinarea patogenezei, confirmarea diagnosticului definitiv și aplicarea tratamentului optim. Unii cercetători propun utilizarea în tratamentul ulcerului a fibroblastelor non-senescente, cultivate *in vitro*. Prin donarea de celule suplimentare, eliberarea factorilor de creștere și reducerea activității antiproliferative a exudatului inflamator pot fi realizate.

Material și metode. Etapele principale de cultivare a fibroblastelor *in vitro* sunt: prelevarea eșantionului de piele, controlul serologic al donatorului, pregătirea vaselor de cultură, separarea epidermului și dermului, cultivarea propriu-zisă, controlul bacteriologic al celulelor și aplicarea lor.

Rezultate. Densitatea finală a celulelor din cultura primară a fost de $4,5 \cdot 10^4$ celule/cm². S-a demonstrat că fibroblastele dermice cultivate *in vitro* pot înlocui derma și oferi factorii esențiali de creștere, stimulatori ai procesului de vindecare a ulcerelor.

Concluzii. Siguranța generală și lipsa reacțiilor de respingere, combinate cu eficacitatea înaltă, încurajează utilizarea largă, în viitorul apropiat, a fibroblastelor în managementul ulcerelor cronice.

Cuvinte-cheie: cultivare *in vitro*, fibroblaste, piele, ulcere trofice.

Introducere

Ulcerile cronice sunt invalidizante și reduc semnificativ calitatea vieții pacienților. Ulcerile cronice ale gabei sunt definite ca defecte la nivelul tegumentului în părțile declive ale membrelor inferioare, cu evoluție prelungită, fără tendință de vindecare după 3 luni de tratament adecvat sau nevindecare deplină la 12 luni de îngrijiri corespunzătoare. Cele mai frecvente cauze sunt cele vasculare (venoase sau arteriale) și neuropatice. Cauze mai puțin frecvente sunt tulburările metabolice, hematologice și bolile infecțioase [1, 2]. Circa 0,6-3,0% din populația cu vârsta de peste 60 de ani suferă de ulcere cronice, acest indice crescând la peste 5% la cei cu vârsta de peste 80 de ani. Prevalența generală în comunitate variază de la 1,9% la 13,1% [3]. Ulcerile cronice rămân a fi o problemă importantă nu numai în practica medicilor de profil dar, de asemenea, și în activitatea de zi cu zi a medicilor de familie și a specialiștilor din diferite alte domenii [4].

Pentru a oferi o tactică corectă de tratament pentru fiecare pacient în parte, planul de management ideal trebuie să implice o abordare timpurie strategică coordonată, bazată pe evaluarea etiologiei și a fiziopatologiei bolii [5]. Acest lucru nu este întotdeauna posibil. Pentru aceste cazuri greu vindecabile există noi opțiuni de tratament cu utilizarea keratinocitelor și/sau fibroblastelor autologice/alogenice cultivate *in vitro*, aplicarea factorilor de creștere și substituenților biologici de piele.

Obiectivul acestui studiu a fost: (1) Descrierea metodologiei de cultivare a fibroblastelor pentru tratamentul pacienților cu ulcere cronice și (2) Oferirea unei prezentări generale a datelor curente privind principalele efecte și avantaje ale tratamentului ulcerului cronic cu fibroblaste cultivate *in vitro*.

Material și metode

Procedura începe după informarea pacientului și obținerea acordului informat.

1. Prelevarea eșantionului de piele. Procesarea primară. Biopsia este efectuată cu respectarea condițiilor sterile. Zona donatoare (axila sau partea interioară a coapsei) este dezinfectată cu etanol timp de 10-15 minute. Locul biopsiei se șterge cu un tampon, îmbibat în etanol de 70% cu mișcări circulare din centru spre periferie. Această procedură se repetă de 10 ori, de fiecare dată folosind un nou tampon. Ulterior, cu dermatomul se prelevează un fragment de piele cu grosimea de 0,4 sau 0,6 mm și suprafața de 1,0-1,5 cm². Eșantionul prelevat se plasează într-un tub conic V 50,0 ml, care conține 25,0 ml de mediu nutritiv pentru cultivarea fibroblastelor. Acesta trebuie să ajungă în laborator în mai puțin de 48 de ore din momentul prelevării.

2. Controlul serologic al donatorului. Teste serologice obligatorii: HIV, HVC, HVB, lues, HTLV. Teste serologice suplimentare: grup sanguin ABO, Rh-rezus, citomegalovirus, toxoplasmă, Ebstein-Barr, West Nile NAT Virus.

3. Obținerea matricelor din gelatină pentru cultivarea celulelor *in vitro*. Pentru atașarea optimă a celulelor, se recomandă acoperirea vaselor de cultură, în care vor fi cultivate celulele, cu soluție de gelatină 0,1%. Lucrând în hotă cu flux laminar, cu respectarea tehnicilor aseptice, se adaugă în flacoane soluție, câte 1,0 ml *per* 10 cm² de suprafață a vasului.

4. Separarea epidermului și dermului. Metoda mecanică. Această metodă este rapidă, simplă, și are puține dezavantaje, cu excepția faptului că necesită un fragment mare de țesut. Pielea se întinde manual pe o suprafață ușor convexă și se fixează cu pioane. Cu o lamă de ras sau bisturiu, la unul din capete, se îndepărtează epiderma de dermă, apoi

epiderma eliberată se prinde cu o pensă și se desprinde ușor într-un strat continuu.

5. Pregătirea mediului pentru cultivarea fibroblastelor. Caracteristică generală. Pentru cultivarea celulelor este utilizat HiFibroXLTM Fibroblast Expansion Medium, suplimentat cu un amestec de antibiotice și antimicotice. HiFibroXLTM Fibroblast Expansion Medium conține un mediu de bază (partea A) și un supliment de creștere a fibroblastelor (partea B). Partea A este formată din săruri anorganice, organice, aminoacizi, vitamine și bicarbonat de sodiu și este lipsită de proteine, hormoni, antibiotice și antimicotice. Partea B este formată din factori de creștere și nutrienții necesari pentru creșterea fibroblastelor. Amestecul de antibiotic - antimicotice constă din Penicilină (100 U/ml), Streptomycină (0,01g/ml) și Amfotericină B (0,25μg/ml).

6. Cultivarea fibroblastelor. Fragmentul de piele este tăiat cu un bisturiu steril în 3-4 fragmente mai mici (1,0-1,5 mm²), apoi fragmentele de țesut sunt plasate în vasele de cultură pregătite anterior. Se adaugă cu atenție 0,5 ml de mediu nutritiv și, ulterior, vasele se transferă în incubator la 37° Celsius, 5% CO₂, pentru minimum 3 zile. La a treia zi, se adaugă cu atenție mediu suplimentar (câte 1,0 ml în cazul, în care celulele încep să se înmulțească și doar 0,5 ml de mediu în cazul, în care celulele încă nu sunt pregătite pentru a împiedica detașarea bucăților de piele). Când vasul este complet umplut cu fibroblaste, celulele trebuie transferate într-un vas mai mare (0,5 ml tripsină + 9,5 ml mediu). Când și acesta este complet umplut, o jumătate din celule pot

fi crioconservate, iar cealaltă jumătate a celulelor se plasează într-un vas nou pentru cultivare ulterioară (acest pas se repetă de câteva ori, până când nu se obțin, cel puțin, patru pasaje diferite).

7. Control bacteriologic al eșantioanelor de celule.

8. Aplicarea celulelor la nivelul ulcerului. Există diferite metode de transfer și aplicare a celulelor pe locul ulcerului: injecțare, aplicare directă, grafting, sisteme de pulverizare; dar, din păcate, niciunul dintre ele nu satisface pe deplin cerințele clinicienilor.

Rezultate

Densitatea celulelor în cultura primară la a 24-a zi de cultivare a fost $4,5 \cdot 10^4$ celule/cm² (fig. 1). Dacă comparăm caracteristicile fibroblastelor prelevate de la nivelul unui ulcer trofic (ulcer-fb) cu fibroblastele normale (normal-fb), putem observa două diferențe majore: (1) normal-fb se replică mai rapid decât rana-fb; și (2), caracteristicile morfologice ale ulcer-fb diferă de caracteristicile morfologice ale normal-fb. Normal-fb sunt compacte și conice, cu nucleu bine definit. Ulcer-fb sunt mai mari și au o formă poligonală, cu nucleu neomogen [6]. În concluzie, s-a demonstrat că ulcer-fb proliferază într-un ritm mai lent și morfologic diferă de normal-fb. Aceste trăsături sunt tipice pentru celulele senescente.

Fibroblastele dermice, cultivate *in vitro*, sunt concepute pentru a înlocui derma și pentru a oferi factorii esențiali de

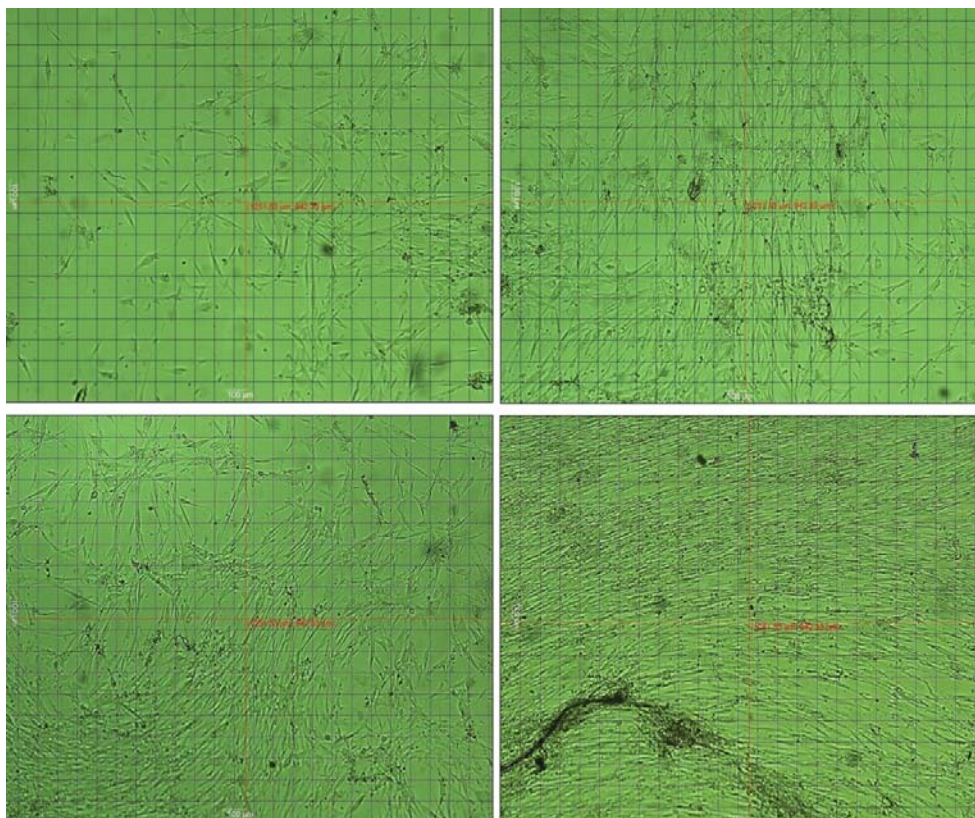


Fig. 1. Cultura primară: a – ziua a 10-a ($1,0 \cdot 10^4$ celulă/cm²), b – ziua a 14-a ($2,5 \cdot 10^4$ celulă/cm²), c – ziua a 19-a ($3,0 \cdot 10^4$ celulă/cm²), d – ziua a 24-a ($4,5 \cdot 10^4$ celulă/cm²).

creștere, stimulatori ai procesului de vindecare a ulcerelor. Fibroblastele vii, nonsenescent sunt capabile să colonizeze patul leziunii și persistă *in situ*, timp de câteva săptămâni. Ele secretă o serie de citokine și factori de creștere, incluzând factorul de creștere derivat din plachete, factori de creștere asemănători cu insulina I și II, heparin-ligand factor de creștere epidermic, factorul de creștere endotelial vascular, cei de transformare *a* și *b*, factorul de creștere a keratinocitelor. Este cunoscut faptul, că factorii de creștere stimulează activitatea fibroblastelor, sinteza țesutului de granulație, formarea matricei extracelulare, angiogeneza și maturizarea celulelor pielii. Fibroblastele produc, de asemenea, proteine cum ar fi colagenul de tip I și III, fibronectina și tenascina, precum și glicozaminoglicanii, care leagă factorii de creștere și intensifică activitatea acestora [7, 8].

Concluzii

Tactica de tratament a ulcerelor cronice, în ultimele decenii, nu s-a schimbat în mod semnificativ și necesitatea elaborării unor noi strategii terapeutice este justificată. Fibroblastele cultivate *in vitro* sunt eficiente, bine tolerate și pot fi utilizate în tratamentul ulcerelor greu vindecabile de diversă origine (venoase, de presiune, diabetice). Studiile retrospective, efectuate în diferite centre științifice, au demonstrat că la pacienții tratați cu celule cultivate, defectul tegumentar se închide semnificativ mai repede decât la pacienții tratați conform metodelor clasice [9]. Astfel, Kirsner și colab. au obținut rezultate bune în vindecarea ulcerelor venoase prin aplicarea produselor, care conțin keratinocite și fibroblaste alogene la o doză optimă de $0,5 \cdot 10^6$ celule/ml la fiecare 14 zile [10]. Siguranța generală și lipsa reacțiilor de respingere, combinate cu eficacitatea înaltă, încurajează utilizarea largă în viitorul apropiat a fibroblastelor în managementul ulcerelor cronice [11, 12].

Bibliografie

1. Evidence-Based Treatment of Chronic Leg Ulcers. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(14):231-237. Published online 2011 Apr 8.
2. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/413604>. Chronic Leg Ulcers: Epidemiology, Aetiopathogenesis, and Management. 2013.
3. Rayner R., Carville K., Keaton J., et al. Leg ulcers: atypical presentations and associated co-morbidities. *Wound Practice and Research.* 2009;17(4):168-185.
4. Rabe E, Pannier-Fischer F, Bromen K, et al. Bonner Venenstudie der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie. Epidemiologische-Untersuchung zur Frage der Häufigkeit und Ausprägung von chronischen Venenkrankheiten in der städtischen und ländlichen Wohnbevölkerung. *Phlebologie.* 2003;32:1-14.
5. Ghauri ASK, Nyamekye IK. Leg ulceration: the importance of treating the underlying pathophysiology. *Phlebology.* 2010;25(1):42-51.
6. Andrew C. Stanley, Hee-Young Park, Tania J. Phillips, Vladimir Rusakovsky, James O. Menzoian, Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. Presented at the Eleventh Annual Meeting of the Eastern Vascular Society, Atlantic City, N.J., May 2-4, 1997.
7. Naughton G, Mansbridge J, Gentzkow GD. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif Organs.* 1997;21:1203-10.
8. Roberts C, Mansbridge J. The scientific basis and differentiating features of Dermagraft. *Can J Plast Surg.* 2002;10(Suppl A):6A-13A.
9. Jason R. Hanft, DPM, FACFAS, Maria S. Surprenant, DPM, FACFAS. Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *J Foot Ankle Surg.* 2002 Sep-Oct;41(5):291-9.
10. Kirsner RS, Marston WA, Snyder RJ, et al. Spray-applied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: a phase 2, multicentre, double-blind, randomized, placebo controlled trial. *The Lancet.* 2012;380(9846):977-985.
11. Cuono CB, Langdon R, Birchall N, et al. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg.* 1987;80:626-7.
12. Eaglstein WH. Dermagraft treatment of diabetic ulcers. *J Dermatol.* 1998;25:803-4.

