

Naše první zkušenosti s transplantací autologních kmenových buněk kostní dřeně v léčbě pakloubů, opožděného hojení zlomenin a defektních zlomenin dlouhých kostí

M. Šír¹, V. Procházka², J. Gumulec³, L. Pleva¹

¹ Traumatologické centrum FN Ostrava, přednosta doc. MUDr. Leopold Pleva, CSc.

² Radiodiagnostický ústav FN Ostrava, přednostka prim. MUDr. Jana Chmelová, Ph.D.

³ Ústav klinické hematologie FN Ostrava, přednosta prim. MUDr. Jaromír Gumulec

Souhrn: Ačkoliv došlo v posledních letech k velkému rozvoji traumatologie a ortopedie v používání nových sofistikovaných technik, implantátů a navigačních metod, dochází nadále v některých případech k selhání těchto nových metod. Jednou z cest do budoucnosti je regenerativní medicína využívající růstový potenciál kmenových buněk, které mají schopnost obnovovat poškozené tkáně. Nabízí se komplexnější využití kmenových buněk kostní dřeně, které se již řadu let využívají v transplantační medicíně. V traumatologii a ortopedii se kmenové buňky mohou uplatnit v léčbě kostních defektů, tedy v léčbě pakloubů, opožděného hojení zlomenin, defektních zlomenin a aseptických kostních nekroz. Růst a tvorba kosti je složitý proces s převahou anabolických dějů a řadou zpětných vazeb, nicméně právě v kostní dřeni pacienta se nalézají potřebné progenitory kostního růstu. Jsou to mezenchymální kmenové buňky MSCs (Mesenchymal Stem Cells), hemopoetické kmenové buňky HSCs (Hemopoietic Stem Cells) a také trombocyty obsahující řadu potřebných růstových faktorů. Existuje řada prací s pozitivními výsledky léčby pakloubů kmenovými buňkami, pouze několik z nich je však v humánní medicíně statisticky významných. V Traumatologickém centru FN Ostrava jsme v roce 2008 tuto metodu použili u 11 pacientů. Ve sledovaném souboru jsme léčili paklouby dlouhých kostí, opožděné hojení tříštvých zlomenin a defektní zlomeniny dlouhých kostí. Autologní koncentrát kmenových buněk kostní dřeně jsme v jednom sezení v lehké anestezii Propofolem aplikovali do místa kostního defektu. Výsledky tohoto málo početného souboru pacientů ještě nejsou k dispozici, nicméně získali jsme první zkušenosti.

Klíčová slova: regenerativní medicína – kmenové buňky kostní dřeně – léčba pakloubů

Our first experiences with autologous transplantation of bone marrow stem cells to treat pseudarthrosis, delayed fracture healing and long bone defects fracture

Summary: Traumatology and orthopaedics have undergone substantial progress in the use of new, sophisticated techniques, implants and navigation methods. Nevertheless, these new methods continue to fail in some instances. Regenerative medicine using the growth potential of stem cells that possess the ability to regenerate damaged tissues represent one of the possible ways forward. There is a potential for more comprehensive utilization of bone marrow stem cells that had for many years been used in transplant medicine. Traumatology and orthopaedics could utilise stem cells in the treatment of bone defects, i.e. in the treatment of pseudarthrosis, delayed fracture healing, defect fractures and aseptic bone necroses. Bone formation and growth is a complex, predominantly anabolic, process with a range of feedbacks. Nevertheless, it is the bone marrow where the necessary progenitors of bone growth are located. These are mesenchymal stem cells (MSCs), haematopoietic stem cells (HSCs) as well as thrombocytes containing a range of necessary growth factors. A number of studies showed positive results for stem cells treatment of pseudarthrosis, with only a fraction, however, being statistically significant in human medicine. This method was used in 11 patients of the Traumatology Centre of the Faculty Hospital in Ostrava, Czech Republic in 2008. The researched patients were treated for pseudarthrosis of long bones, delayed multifragmentary fracture healing and defect fractures of long bones. Autologous concentrate of bone marrow stem cells was applied in one session into the area of bone defect in a patient lightly anaesthetised with propofol. The results from this small sample of patients are not yet available. However, we are sharing our first experiences with this treatment option.

Key words: regenerative medicine – bone marrow stem cells – pseudoarthrosis treatment

Úvod

V posledních letech se zvyšují požadavky na nákladný osteosyntetický materiál a sofistikované kloubní protézy. Je to důsledkem skutečnosti, že se u mladších lidí zvyšuje počet vysokoenergetických úrazů při rizikových spor-

tovních aktivitách a starší generace touží prožít své stáří aktivně s dokonalými kloubními náhradami. Začínají se ve větší míře používat nové biomateriály a do praxe se zavádí zcela nové, ale finančně velmi nákladné metody (navigace). Jedním z východisek do bu-

doucnosti je nalezení nových medicínských postupů, které by nebyly tolik finančně náročné.

Jako velmi perspektivní se jeví přímé využití růstového potenciálu tkání a orgánů – regenerativní medicína. Nejsnadnější cestou v této oblasti je



Obr. 1. Odběr kostní dřeně.



Obr. 2. Příprava dřeňového koncentrátu.



Obr. 3. Centrifugace.

rozsáhlejší a komplexnější využití kmenových buněk kostní dřeně, které se již řadu let užívají v transplantační medicíně, především v léčbě leukemie.

V traumatologii a ortopedii se výzkum v oblasti autologních kmenových buněk ubírá cestou podpory kostního hojení tam, kde je z nejrůznějších důvodů zpomaleno. Jedná se především o paklouby, opožděné hojení zlomenin, defektní zlomeniny a aseptické kostní nekrózy. Standardní léčba pakloubů představuje obvykle operační léčbu spočívající:

- v odstranění vaziva, které nedovoluje dohojení kosti v místě původní zlomeniny
- dekortikaci, což je oživení obou konců kosti, které ztratily růstový potenciál
- podpoře kostního hojení (produkce kostní hmoty):
 - vložením vitálního štěpu autologní kosti nebo štěpu heterologního
 - distrakční osteogenezou dle Ilizarova
 - kostním štěpem s mikrovaskulární anastomózou
- ve stabilizaci (klid pro hojení) vnitřní nebo zevní fixací

Existuje řada publikovaných prací, které dokazují příznivý účinek aplikace kmenových buněk v léčbě pakloubů, pouze jedna práce prof. Ph. Hernigou a spolupracovníků v léčbě atrofických pakloubů tibie je významná. Autoři zde dosáhli 80% zhojení avitálního pakloubu tibie po perkutánní aplikaci autologních kmenových buněk kostní dřeně v kombinaci s léčbou zevním fixátorem.

Výsledky výzkumu kmenových buněk v traumatologii a ortopedii ukazují, že

jejich aktivitu využíváme 2 základními směry:

1. Přímo perkutánní aplikací autologních kmenových buněk kostní dřeně dostáváme do cílových tkání buněčné progenitory procesu reparace kosti a jiných tkání pojiva.
2. Využíváme kmenových buněk jako vehikula, s jehož pomocí dostáváme do cílových tkání genovou výbavu, která následně ovlivňuje přítomné potenciální buňky k produkci růstových faktorů.

Podle recentních znalostí je reparace kosti proces vyžadující přítomnost progenitorů angiogeneze z hemopoetické části kostní dřeně (charakterizovány stěnovými antigeny CD 34, CD 45), progenitorů kostního růstu z mezenchymálních buněk kostní dřeně (CD 29, CD 44, CD 71, CD 105). Současně je nutná přítomnost růstových faktorů pro angiogenezi a kostní hojení, jejich zdrojem jsou trombocyty obsahující řadu těchto růstových faktorů (VEGF, PDGF, TGF, IGF, FGF, EGF) a také vlastní progenitorové buňky, které secernují další nutné růstové faktory.

Ve zdravé kosti neustále probíhají anabolické i katabolické pochody. Kostní růst je však svou povahou převážně anabolický proces. Existují 4 základní principy umožňující růst, resp. produkci kosti:

- a) osteoindukce, kterou způsobují růstové kostní faktory (růstové kostní faktory jsou přítomny ve vitální kosti, trombocytech, kmenových buňkách kostní dřeně); hlavní úlohu v osteoindukci mají kostní růstové faktory – BMP 2, 7 (Bone morpho-

genetic protein) – regulují chemotaxi, mitózu a diferenciaci kostních buněk, hrají roli v inicializaci kostního hojení, další významnou úlohu mají růstové faktory obsažené v trombocytech

- b) osteoprodukce – tuto schopnost mají především osteoblasty, které jsou obsaženy ve vitálních kostních štěpech a kmenových buňkách kostní dřeně
- c) osteokondukcce je podpora migrace osteogenních buněk do místa kostního defektu (anorganická část kostních štěpů, kalcium trifosfát, hydroxyapatit)
- d) mechanická stimulace – vzniká při zátěži končetiny při chůzi nebo biofyzikální stimulaci (low intensity ultrasound); bylo prokázáno, že mechanická stimulace ovlivňuje proliferaci a diferenciaci osteogenních buněk

Chirurgická technika

Provádí se v šetrné anestezii Propofolem, nejprve se provede perkutánní odběr kostní dřeně z obou lopat kostí kyčelních v pozici na břiše (obr. 1). Získáváme 120–240 ml punktátu kostní dřeně, technika odběru je taková, že odebíráme kostní dřeň po částech, aby nedocházelo k aspiraci většího množství periferní krve. Odebraná kostní dřeň je ihned přemístěna do plastických sáčků s antikoagulačními látkami (obr. 2). Poté je provedena centrifugace trvající 15 min, kdy dochází k separaci buněk s lehčími jádry (bezjaderných buněk), které jsou odstraněny společně s plazmou z koncentrátu (obr. 3). Získáme koncentrát jader-
ných buněk kostní dřeně, který obsahuje asi 16–20% původního objemu



Obr. 4, 5. Kontrola pozice trokáru pod RTG zesilovačem.



Obr. 6. Perkutánní aplikace dřeňového koncentrátu do místa pakloubu.

Tab. 1. Přehled našich pacientů.

P. č.	Rok narození	Datum aplikace	Diagnóza	Metoda stabilizace pakloubu
1.	1957	9. 6. 2008	pakloub proximální tibie	stabilizace hřebem
2.	1979	9. 7. 2008	pakloub distálního femoru	stabilizace hřebem
3.	1973	9. 7. 2008	tříštivý defekt zlomeniny proximální tibie	stabilizace ZF
4.	1978	9. 7. 2008	pakloub kosti člukové	sádrová imobilizace
5.	2000	10. 9. 2008	pakloub diafýzy tibie	stabilizace ZF
6.	1951	10. 9. 2008	pakloub diafýzy femoru	stabilizace hřebem
7.	1967	10. 9. 2008	tříštivý defekt zlomeniny distální tibie	stabilizace ZF
8.	1950	13. 10. 2008	pakloub diafýzy femoru	stabilizace hřebem
9.	1962	13. 10. 2008	tříštivý defekt zlomeniny distální tibie	stabilizace ZF
10.	1960	12. 11. 2008	tříštivý defekt zlomeniny proximální tibie	stabilizace ZF
11.	1936	12. 11. 2008	pakloub diafýzy humeru	stabilizace hřebem

punktátu. Tento koncentrát obsahuje progenitory kostního růstu. 1 ml koncentrátu obsahuje až 20 milionů jader-
ných buněk, z nichž asi 1 500 je kme-
nových buněk mezenchymálních.

Stejným trokárem, který byl použit na aspiraci kostní dřeně, pak provádíme vlastní perkutánní aplikaci do místa pakloubu. Pozice špičky trokáru je kontrolována RTG zesilovačem (obr. 4, 5). Špičkou trokáru nejprve rozrušíme vazivovou tkáň v místě pakloubu a posléze pomalu aplikujeme koncentrát mezi oba konce kosti z laterálního i mediálního přístupu tak, aby byl koncentrát uložen v celém rozsahu pakloubu (obr. 6). Kožní vstup uzavíráme zdrhovacím stehem.

Pooperační péče

Všichni pacienti mají provedenu stabilizaci pakloubu vnitřní nebo zevní fixací, 1. týden není dovoleno končetinu zatěžovat, protože očekáváme vznik vaskularizace. Od 2. týdne dovolujeme postupně se zvyšující zátěž končetiny

při chůzi až do plné zátěže po 5 týdnech. Tímto způsobem jsme léčili celkem 11 pacientů (tab. 1).

Závěr a výsledky

Soubor pacientů nelze prozatím hodnotit, protože uběhla krátká doba léčby, soubor je málo početný a u některých pacientů probíhal současně infekční proces měkkých tkání. Nicméně první zkušenosti jsme již získali.

Všichni pacienti hodnotili vlastní operační aplikaci kmenových buněk jako bezproblémovou.

Zaznamenali jsme velmi dobrý analgetizační efekt. U prvních pacientů jsme nerozrušovali vazivo, u dalších již rutinně vazivo pakloubu perkutánně rozrušujeme trokárem. U 2 pacientů jsme využili klasické součásti léčby pakloubů, byla provedena komprese pakloubu zevním fixátorem s osteotomií fibuly kvůli velkému defektu kosti. U pacientů se současně probíhajícím infektem měkkých tkání tato metoda není vhodná. V budoucnu budeme do koncentrátu

autologních buněk kostní dřeně přidávat osteokonduktivní materiály (tento postup bude vyžadovat otevřenou operační léčbu). Chystáme se vyzkoušet směs autologních buněk kostní dřeně s trombocytárním gelem. Později přidáme i modulaci léčby rekombinantními růstovými faktory (BMP).

Literatura

1. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A et al. JBJS Percutaneous Autologous Bone – Marrow Grafting for Nonunions Puntos. J Bone Joint Surg Br 2005; 87: 1430–1437.
2. Jones E, Tzioupis C, McGonagle D et al. Growing bone and cartilage. The Role of Mesenchymal Stem Cells. J Bone Joint Surg Br 2006; 88: 421–426.
3. Simpson AHRW, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. J Bone Joint Surg Br 2006; 88: 701–705.

MUDr. Milan Šír
www.fnspo.cz
e-mail: milan.sir@fnspo.cz

Doručeno do redakce: 9. 2. 2009