

## Эффективность применения криоконсервированных эмбриональных нейрональных клеток в комплексном лечении склеротических макулодистрофий

Ю.А. ДЕМИН<sup>2</sup>, А.Ю. ПЕТРЕНКО<sup>1</sup>, Л.В. ЛИТВИНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковская медицинская академия постдипломного образования

## Efficiency of Applying the Cryopreserved Embryonic Neuronal Cells in Combined Treatment of Sclerotic Macular Dystrophy

YU.A. DEMIN<sup>2</sup>, A.YU. PETRENKO<sup>1</sup>, L.V. LITVINOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education

Показана высокая клиническая эффективность применения криоконсервированных эмбриональных нейрональных клеток в лечении склеротических макулодистрофий методами визометрии, периметрии, окулографии.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, эмбриональные нейрональные клетки, трансплантация, склеротическая макулодистрофия.

Показана висока клінічна ефективність застосування криоконсервованих ембріональних нейрональних клітин при лікуванні склеротичних макулодистрофій методами візометрії, периметрії, окулографії.

**Ключові слова:** криоконсервування, ембріональні нейрональні клітини, трансплантація, склеротична макулодистрофія.

There has been demonstrated a high clinical efficiency of application of cryopreserved embryonic neuronal cells in treatment of sclerotic macular dystrophies by the methods of visometry, perimetry, oculoigraphy.

**Key-words:** cryopreservation, embryonic neuronal cells, transplantation, sclerotic macular dystrophy.

В настоящее время дистрофические поражения сетчатой и сосудистой оболочек глаза являются одной из причин слабовидения и прогрессирующего снижения остроты зрения, вплоть до профессиональной слепоты [5]. Склеротическая макулодистрофия (СМД) относится к наиболее распространенным заболеваниям среди трудоспособного населения европейских стран в возрасте 50-60 лет и старше [4]. В 90-х годах количество больных в Украине выросло с 3 до 4,3%, а уровень заболеваемости на 10 тыс. населения повысился с 24,7 до 28,1 [4].

Патологические изменения, связанные с СМД, вызывают стойкое и необратимое снижение зрения [5]. Неуклонно прогрессирующий характер течения, тяжесть поражения и недостаточная эффективность терапии, раскрытие новых механизмов дегенеративных изменений сетчатки диктуют необходимость поиска и разработки новых патогенетически обоснованных средств, способствующих лечению и профилактике развития данных заболеваний [3]. В последние годы в офтальмологии развивается новое направление – трансплантация эмбриональных клеток и тканей. Появились сообщения об активном использовании

Nowadays dystrophic damages of retina and eye vascular membranes are among the main causes of low vision and progressing reduction of vision acuity up to professional blindness [5]. In European countries sclerotic macular dystrophy (SMD) is referred to the most wide spread diseases among the population aged 50-60 and older with working capacity [6]. In Ukraine in the 90s the number of patients increased from 3 to 4.3% and the disease rate per 10 thousands people of population enhanced from 24.7 up to 28.1 [4].

Pathological changes related to SMD result in a stable and irreversible reduction in vision [5]. Steady progressing character of treatment, severity of damage and slight efficiency of therapy, revealing the new mechanisms of degenerative changes of retina dictate the necessity to search and develop new pathogenetically stipulated means contributing to the treatment and preventive measures of the development of these diseases [3]. Recently in ophthalmology there has been developed a new direction, transplantation of embryonic cells and tissues. There have been reported about an active usage of this treatment method for retina dystrophic diseases [1, 6, 7].

The aim of our research was to study clinical efficiency of application of embryonic neuronal

*Адрес для корреспонденции:* Демин Ю.А., Харьковская медицинская академия постдипломного образования, ул. О. Гончара, 5, Харьков, Украина 61176; тел.: +38 (057)700-54-64

*Address for correspondence:* Demin Yu.A. Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, 5, O. Gonchar str., Kharkov, Ukraine 61176; tel.: +38 (057) 7005464

данного метода лечения при дистрофических заболеваниях сетчатки [1,6,7].

Цель нашего исследования – изучение клинической эффективности применения эмбриональных нейрональных криоконсервированных клеток в комплексном лечении СМД.

### Материалы и методы

Под наблюдением находились 30 больных со СМД в возрасте от 38 до 68 лет, которые получали традиционную комплексную терапию в комбинации с трансплантацией эмбриональных криоконсервированных клеток. В контрольную группу входили 30 пациентов, которым проводилось обычное аллопатическое лечение. Обе группы пациентов были сопоставимы между собой по клиническим показателям, возрасту и полу.

Критерием эффективности проводившейся терапии было улучшение зрительных функций: повышение остроты зрения, распределение суммарного поля зрения, уменьшение площади слепого пятна, увеличение коэффициента Ардена.

Из аллопатических методов использовали: тканевую терапию по методу академика В.П.Филатова в виде подкожных инъекций экстракта алоэ или ФИБС, внутримышечные инъекции витаминов группы В, анаболический стероид “Ретаболил” 1 раз в неделю, прием внутрь ангиопротекторов, сосудорасширяющих и антисклеротических препаратов (милдронат, трентал и др.). Указанная терапия проводилась 2 недели.

Наряду с традиционной терапией больным произведена трансплантация эмбриональных криоконсервированных нейрональных клеток по методу, разработанному в ИПКиК НАН Украины [1]. Все препараты проверяются на отсутствие бактериального, вирусного и микологического загрязнения. Тестирование проводится иммуноферментными методами и методом полимеразной цепной реакции.

Одноразовая офтальмологическая доза эмбриональных клеток составляет 0,5 клеточной суспензии, содержащей  $20 \times 10^6$  ядерных клеток. Пациенты наблюдались в течение 12 мес.

Правомочность использования биопрепаратов подтверждается методическими рекомендациями “Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування ембріональних та фетальних тканин людини в офтальмологічній практиці”, утвержденными МОЗ Украины, а также “Сертифікатом про державну реєстрацію медичного імунобіологічного препарату” [1].

### Результаты и обсуждение

Клинические наблюдения показали, что трансплантацию эмбриональных криоконсервированных нейрональных клеток пациенты переносят удов-

cryopreserved cells in a combined treatment of SMD.

### Materials and Methods

Under observation there were 30 patients with SMD aged from 38 to 68, treated with traditional complex therapy in combination with the transplantation of embryonic cryopreserved cells. The control group comprised 30 patients treated with a common allopathic therapy. Both groups of patients were comparable between each other on clinical indices, age and sex.

The efficiency criterion of the therapy being performed was the improvement of visual functions: a rise in vision acuity, distribution of total vision field, reduction of blind spot area, increase in Arden's coefficient.

As allopathic methods we used: tissue therapy on the Academician V.P. Filatov's method as subcutaneous injections of aloe or FIBS, intramuscular injections of group B vitamin, “Retabolil” anabolic steroid hormone once a week, taking inside angioprotectors, and antisclerotic preparations (mildronat, trental etc.). The mentioned therapy was performed during 2 weeks.

Together with traditional therapy the patients were transplanted with embryonic cryopreserved neuronal cells according to the method developed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [1]. All preparations are tested on the absence of bacterial, virus and mycological contamination. Testing was accomplished with immune enzyme methods and the one of PCR.

Single ophthalmological dose of embryonic cells is 0.5 cellular suspension, containing  $20 \times 10^6$  nucleated cells. The patients were monitored during 12 months.

Eligibility to use biopreparations is confirmed by methodical recommendations “Procurement, cryopreservation and clinical application of embryonic human tissues in ophthalmological practice”, approved by the Ministry of Health Care of the Ukraine, as well as “Certificate on State registration of medical immune biological preparation” [1].

### Results and discussion

Clinical observations have shown that the patients satisfactorily endure the transplantation of embryonic cryopreserved neuronal cells. No negative side reactions and complications after application of these preparations were noted, in contrast to the transplantation of fetal nerve tissue, when the recipients' response on transplantation is probable as eyelid edema, limitation of eye ball mobility.

For all the patients studied there were applied the following research methods: visometry, perimetry, electrooculography before and after the treatment course and monitoring in 3, 6 and 12 months.

летворительно. Негативных побочных реакций и осложнений после применения этих препаратов не наблюдалось, в отличие от трансплантации нервной ткани плода, когда возможна ответная реакция реципиента на трансплантацию в виде отека века, ограничения подвижности глазного яблока.

Всем больным проводились следующие методы исследования: визометрия, периметрия, электроокулография до и после курса лечения и через 3, 6 и 12 мес обследования.

До лечения у всех больных определялись выраженные изменения функциональных показателей органа зрения. Они проявлялись в значительных нарушениях в поле зрения (суммарное ограничение в среднем на 160°), снижении остроты зрения (0,6; 0,05 ед.), расширении площади слепого пятна до 192,3±2,8 мм (таблица), изменении коэффициента Ардена (110,0-120,0).

В процессе лечения в основной группе больных отмечено достоверное улучшение ( $p > 0,05$ ) функций органа зрения по сравнению с группой контроля.

Анализ проведенных наблюдений показал, что у пациентов основной группы под влиянием трансплантации эмбриональных клеток площадь слепого пятна уменьшилась в среднем на 80,3 мм по сравнению с контрольной группой.

У пациентов контрольной группы положительная динамика слабо выражена.

Острота зрения у 84% больных основной группы после комплексного лечения повысилась. У всех пациентов отмечена стабилизация патологического процесса на протяжении последующего периода наблюдений. В 42% больных контрольной группы острота зрения после курса традиционной терапии повысилась, у 40% наблюдалась стабилизация дистрофического процесса. У всех больных основной группы отмечено достоверное расширение суммарного поля зрения на 120°, в то время как у пациентов контрольной группы поле зрения расширилось в среднем на 60° (таблица).

При анализе данных окулографии установлено, что у больных контрольной группы коэффициент Ардена до лечения составлял 120,0±6,8, сразу после лечения – 135,0±0,07 и через 6 мес – 137,0±6,9, что на 17,0 выше

Before treatment for all patients there were found the manifested changes in functional indices of vision organ. They were manifested in significant disorders in vision field (total restriction in average by 160°), reduction in vision acuity (0.6; 0.05 units, correspondingly), widening of the area of blind spot up to 192.3±2.8 mm (Table), change in Arden's coefficient (110.0-120.0).

In the treatment process in the main group of patients there was noted the improvement ( $p > 0.05$ ) of vision organ functions if compared with the control group.

Analysis of the performed observations has shown that in the patients of main group under transplantation effect of embryonic cells the area of blind spot decreased in average by 80.3 mm in comparison with the control group.

In the patients of control group a positive dynamics is slightly manifested.

Vision acuity in 84% of main group patients after complex treatment increased. For all the patients there was noted the stabilization of pathological process within the following observation period. For 42% of the control group patients the vision acuity increased and stabilization of dystrophic process was observed. For all the patients of main group there was noted a statistically significant widening of total vision field by 120°, meanwhile for the patients of control group the vision field became wider in average by 60° (Table).

When analyzing the data of oculoigraphy it has been found that in the patients of the control group the

Влияние трансплантации фетальных нейрональных клеток на функциональные показатели органа зрения при СМД

Transplantation effect of fetal neuronal cells on functional indices of vision organ at SMD

Функциональные показатели органа зрения Functional indices of vision organ	До и после трансплантации Before and after transplantation	Норма Norm	Основная группа Main group	Контрольная группа Control group
Площадь слепого пятна Area of blind spot	До Before	100,2±2,3	240±4,4	253±4,3
	После After	100±2,3	134±1,4*	195±1,7
Суммарное поле зрения, град Total vision field, grad	До Before	558,1±4,7	414,3±3,8	403,2±3,3
	После After	558,1±4,7	506±4,2	460,1±3,4
Острота зрения, ед. Vision acuity, unit	До Before	1,0±0,03	0,6±0,04	0,6±0,04
	После After	1,0±0,03	0,8±0,03	0,7±0,01**

**Примечание:** \* – достоверность различия между основной и контрольной группой при  $p < 0,05$ , \*\* – при  $p < 0,01$ .

**Note:** \* – statistically significant differences between main and control groups at  $p < 0.05$ , \*\* – at  $p < 0.01$ .

исходного уровня. После применения криоконсервированных эмбриональных клеток коэффициент Ардена составлял  $110,0 \pm 6,8$ , после лечения –  $145,0 \pm 7,0$  и через 6 мес –  $168,0 \pm 6,8$ , что достоверно выше исходного уровня на 58,0.

Значительное повышение зрительных функций отмечено в случаях, когда комплексная терапия проводилась в ранние сроки развития заболевания.

Результаты экспериментальных и клинических исследований по трансплантации эмбриональных нейрональных клеток позволяют предполагать, что донорские нервные клетки являются источником трофики для нейроэпителия сетчатой оболочки, оказывая нормализующее действие на метаболические процессы в нейроэпителии сетчатки, стимулируя компенсаторно-восстановительные процессы в поврежденных клетках пигментного эпителия.

По-видимому, трансплантируемые эмбриональные нейрональные клетки активируют региональные ретинальные стволовые клетки, способствуя репарации палочек и колбочек, через систему нейротрофических факторов. При этом достижение требуемой компенсации функциональной недостаточности поврежденных клеток и тканей возможно при условии формирования локальных специализированных межнейрональных взаимодействий тканей донора и реципиента.

Очевидно, трансплантация эмбриональных нейрональных клеток способствует ингибированию апоптоза, активации процессов физиологической и репаративной регенерации, восстановлению местного тканевого гомеостаза.

## Выводы

Следовательно, трансплантация эмбриональных криоконсервированных нейрональных клеток в комплексном лечении больных СМД способствует улучшению функциональных показателей органа зрения, стабилизации дистрофического процесса. Эффективность, малая травматичность, отсутствие побочных реакций, возможность амбулаторного использования позволяют рекомендовать трансплантацию эмбриональных клеток к широкому клиническому применению.

## Литература

1. Грищенко В.І., Снурніков О.С., Дьомін Ю.А. та ін. Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування ембріональних та фетальних клітин людини в офтальмологічній практиці: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 15 с.
2. Жабоедов Г.Д., Цимбалюк В.І., Бондарева Г.С. та ін. Можливість трансплантації тканин при лікуванні дистрофічних захворювань сітківки та зорового нерва // Трансплантологія.– 2000.– Т.1, №1. – С. 180-181.

coefficient of Arden's before treatment made  $120,0 \pm 6,8$ , just after treatment it was  $135,0 \pm 0,07$  and in 6 month it made  $137,0 \pm 6,9$ , that by 17.0 higher than initial level. After applying the cryopreserved embryonic cells the Arden's coefficient made  $110,0 \pm 6,8$ , after treatment it was  $145,0 \pm 7,0$  and in 6 months  $168,0 \pm 6,8$ , that was statistically and significant higher than initial level.

Considerable rise in visual functions was noted in the cases when complex therapy was performed at early terms of disease development.

The results of experimental and clinical investigations on transplantation of embryonic neuronal cells enable to suppose that donor's nerve cells are the sources of trophics for retinal neuroepithelium, causing normalizing effect on metabolic processes in it, by stimulating compensatory and recovering processes in damaged cells of pigment epithelium.

Maybe embryonic neuronal cells being transplanted activate regional retinal stem cells, contributing to reparation of rods and cones via the system of neutrophic factors. In this case achieving the required compensation of functional insufficiency of damaged cells and tissues is possible under condition of the formation of local specialized interneuronal interactions of donor's and recipient's tissues.

Transplantation of embryonic neuronal cells evidently contributes to inhibiting the apoptosis, activation of the processes of physiological and reparative regeneration, recovery of local tissue homeostasis.

## Conclusions

Therefore transplantation of embryonic cryopreserved neuronal cells in a combined treatment of the patients with SMD contributed to the improvement of functional indices of a vision organ, stabilization of dystrophic process. Efficiency, low trauma rate, absence of side reactions, possibility of out-patient treatment usage permits to recommend the transplantation of embryonic cells to a wide clinical application.

## References

1. *Grischenko V.I., Snurnikov O.S., Demin Yu.A. et al.* Procurement, cryopreservation and clinical application of embryonic and fetal human cells in ophthalmologic practice: Method. Recommendations.– Kharkov, 2000.– 15 p.
2. *Zhaboedov G.D., Tsybalyuk V.I., Bondareva G.S. et al.* Possibility of transplantation of tissues when treating dystrophic diseases of retina and visual nerve // *Transplantologiya.*– 2000.– V.1, N1.– P. 180-181.
3. *Logay I.M., Petrunya A.M., Solyannik F.T. et al.* Efficiency of flexital and antioxidants in combined treatment of retinopathies of various genesis // *Ophthalmol. Zhurnal.*– 1998.– N 1.– P. 38-41.
4. *Ferilfain I.P., Kryzhanovskaya T.V., Logay I.M. et al.* Blindness and low vision in Ukraine// *Proc. of Reports, 9<sup>th</sup> Congress of Ophthalmologists of Ukraine, Odessa, 1996.*– P. 92-94.

3. *Логай И.М., Петруня А.М., Соляник Ф.Т. и др.* Эффективность флекситала и антиоксидантов в комплексном лечении ретинопатий различного генеза // *Офтальмол. журн.*– 1998.– №1.– С. 38-41.
4. *Ферфильфайн И.П., Крыжановская Т.В., Логай И.М. и др.* Слепота и слабовидение в Украине // *Тез. докл. 9 съезд офтальмологов Украины – Одесса, 1996.*– С. 92-94.
5. *Bird A.S., Breessler N.M., Breessler S.B. et al.* An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration // *Surv. Ophthalmol.*– 1995.– Vol.39 (5).– P. 367-374.
6. *Little C.W., Castilio B., Diloreto D.A. et al.* Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 1996.– Vol. 37 (1).– P. 204-211.
7. *Vingerling J.R. Dilemans J., Bots M.L.* Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study// *Am. J. Epidemiol.*–1995.–Vol.142 (4).– P. 404-409.
5. *Bird A.S., Breessler N.M., Breessler S.B. et al.* An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration // *Surv. Ophthalmol.*– 1995.– Vol.39 (5).– P. 367-374.
6. *Little C.W., Castilio B., Diloreto D.A. et al.* Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 1996.– Vol. 37 (1).– P. 204-211.
7. *Vingerling J.R. Dilemans J., Bots M.L.* Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study// *Am. J. Epidemiol.*–1995.–Vol.142 (4).– P. 404-409.

*Accepted in 18.11.2003*

*Поступила 18.11.2003*