

Autológna transplantácia kmeňových buniek pre záchranu ischemickej končatiny – predbežné výsledky

MUDr. Renáta Talapková, PhD.¹, MUDr. Jan Hudeček, PhD.², MUDr. Igor Šinák, PhD.¹,
 prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.², MUDr. Ľuboš Hlinka¹, MUDr. Lenka Patkaňová¹,
 MUDr. Kamil Zeleňák, PhD.³, prof. MUDr. Ľudovít Laca, PhD.¹

¹ Klinika transplantácie a cievnej chirurgie, Martinská fakultná nemocnica, Martin

² Klinika hematológie a transfúziológie, Martinská fakultná nemocnica, Martin

³ Rádiologická klinika, Martinská fakultná nemocnica, Martin

Úvod. Kritická končatinová ischémia (CLI) je definovaná ako chronická ischemická bolesť končatín vyžadujúca pravidelnú analgetickú liečbu v trvaní minimálne 2 týždne, a/alebo s prítomnými kožnými defektami. U pacientov s CLI je veľká pravdepodobnosť potreby vysokej amputácie končatiny do 6 – 12 mesiacov, ak nedôjde k zlepšeniu perfúzie. **Cieľ.** Záchrana končatiny u pacientov s CLI autotransplantáciou endotelových progenitorových buniek (EPC) z kostnej drene pacienta a zhodnotenie účinnosti a bezpečnosti terapeutického angiogenézy u tejto skupiny pacientov. **Materiál a metodika.** Do štúdie sú priebežne zaradovaní pacienti s CLI bez možnosti revaskularizácie. EPC sú izolované z autológnej kostnej drene odobratej z lopaty bedrovej kosti a po separácii aplikované intramuskulárne do svalov predkolenia a nohy postihnutej končatiny. Pacienti sú exaktne klinicky sledovaní. Hodnotili sme lokálny nález, index bolesti, index kvality života, potrebu a dávku analgetík, členkovo-ramenný index (ABI), fotopletyzmografiu, markery aktivácie endotelu a trombocytov, digitálnu subtrahčnú angiografiu (DSA). **Výsledky.** Autori prezentujú predbežné čiastkové výsledky doteraz 20 liečených pacientov. V práci sú vyhodnotené parametre: počet zachránených končatín, klinický nález, ABI, fotopletyzmografia, intenzita bolesti, klaudikačný interval. Z 20 pacientov 3 podstúpili vysokú amputáciu. Úspešnosť liečby v našom súbore (záchrana končatiny pred vysokou amputáciou) je teda 85 %. **Záver.** Autológna transplantácia kmeňových buniek v liečbe CLI sa javí ako potenciálne úspešná a bezpečná metóda na zlepšenie prekrvenia a záchranu končatiny u pacientov so zlyhanými možnosťami chirurgickej, endovaskulárnej a konzervatívnej terapie.

Kľúčové slová: kritická končatinová ischémia, kmeňové bunky kostnej drene, terapeutická angiogenéza.

Autologous stem cells in the salvage of ischaemic limb – preliminary results

Background. Critical limb ischaemia (CLI) is defined as a chronic rest pain, lasting more than 2 weeks, requiring analgesics and/or with present skin defects. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells has been used successfully in CLI. **Aim.** The salvage of critically ischaemic limb by endotel progenitor cells (EPCs) from patient's bone marrow. To assess efficacy and safety of critical lower limb ischaemia treatment with marrow stem cell autotransplantation. **Methods.** 20 patients suffering from CLI have been enrolled. They did not require emergency amputation and had previously been unsuccessfully treated with conventional therapy. Mononuclear cells were isolated from the bone marrow taken from iliac crest and injected in the gastrocnemius muscle and pedal region of the affected limb. Patients have had evaluated: local finding, pain index, quality of life index, ABI, photoplethysmography, markers of endothelium and trombocytes' activation and digital subtractive angiography. **Results.** The authors present the partial results of 20 patients concerning the number of saved limbs, the clinical picture, ABI, photoplethysmography, pain severity, claudication interval. We have treated 20 patients, 3 of them had to undergo the limb amputation. So the therapy was successful in 85%. **Conclusion.** Marrow stem cell autotransplantation into the ischaemic lower limb seems to be a potentially effective method of peripheral perfusion enhancement and the limb salvage.

Key words: critical limb ischemia, bone marrow stem cells, therapeutical angiogenesis.

Vask. med., 2010, 2 (2): 89–92

Úvod

Ochorenia periférnych tepien (PAO), postihujúce prevažne dolné končatiny, sú závažným celosvetovým problémom. Vo svojom termínálnom štádiu, ktorému je vyhradený pojem **kritická končatinová ischémia (CLI)**, ohrozujú pacienta amputáciou. Transatlantický konsenzus liečby PAO (TASC II), definuje CLI ako štádium PAO, ktoré je charakterizované chronickou ischemickou pokojovou bolesťou a/alebo ischemickou kožnou léziou vo forme ulkusu alebo gangrény trvajúcimi viac ako 2 týždne. Pre is-

chemickú pokojovú bolesť svedčia členkové tlaky pod 50 mmHg alebo prstové tlaky nižšie ako 30 mmHg alebo transkutánný kyslík nižší ako 30 mmHg.

Incidencia CLI sa v Európe a v severnej Amerike odhaduje asi na **500 až 1000 nových prípadov na 1 milión obyvateľov**. Po stanovení diagnózy sa asi polovica pacientov s CLI podrobí určitému typu revaskularizácie. Približne 25 % prípadov vyžaduje primárnu amputáciu a zvyšok pacientov s nerekonštruovateľnými pomermi zostáva na medikamentóznej liečbe.

V podskupine pacientov s nerekonštruovateľnými pomermi alebo so zlyhaním revaskularizácie do 6 mesiacov približne 40 % stratí končatinu a asi 20 % zomrie. **Prognóza** pacientov s CLI je **veľmi nepriaznivá**. Incidencia veľkých amputácií sa pohybuje od 120 do 500/milión obyvateľov a rok, čo sú vysoké počty.

Úspešná chirurgická alebo endovaskulárna revaskularizácia zachraňuje končatinu, zmierňuje bolesť a zlepšuje kvalitu života, ale často nie je možná pre nerekonštruovateľné arteriálne pomery. **V prípade nedostupnosti revaskula-**

Tabuľka 1. Súbor pacientov.

Počet pacientov	20
muži	15
ženy	5
Vek	38 – 83 rokov
Dĺžka sledovania	0,5 – 24 mesiacov
Počet diabetikov	6

rizácie alebo v prípade zlyhania chirurgickej a endovaskulárnej liečby je potrebné hľadať nové alternatívy a postupy. **Terapeutická angiogenéza**, realizovaná transplantáciou autológnych kmeňových buniek kostnej drene (KD), je nádejnou alternatívou (1).

Angiogenéza je fyziologický proces nevyhnutný na hojenie rán. Nastupuje prakticky ihneď po vzniku poranenia. Je iniciovaná mnohými molekulárnymi signálmi, ako sú faktory hemostázy, zápalu, cytokíny, rastové faktory a interakcie medzi bunkovými maticami. Nové kapiláry proliferujú kaskádou biologických procesov s cieľom vytvorenia granulačného tkaniva. Proces trvá až do zhojenia rany, keď je angiogenéza zastavená zníženou hladinou rastových faktorov, ústupom zápalu, stabilizáciou bunkovej matrice a endogénnymi inhibítormi angiogenézy (2). Kmeňové bunky z dospelých kostnej drene významnou mierou prispievajú k angiogenéze. Tieto bunky, známe ako endotelové progenitorové bunky (EPC), môžu byť izolované aj z periférnej krvi zdravých jedincov, avšak tu je ich záchyt extrémne nízky. Po vzniku poranenia sú EPC mobilizované do cirkulácie, usadia sa v mieste potrebnej neovaskularizácie a diferencujú sa tam na zrelé endotelové bunky. Pluripotentné kmeňové bunky (KB) majú schopnosť sebaobnovy vlastnej bunkovej populácie, klonálnej multilineárnej diferenciácie a obnovy rôznych tkanív. Produkujú celú radu cytokínov (IL-6, GM-CSF, G-CSF...), tlmia imunitnú reakciu (T-bunky).

Na novotvorbe ciev sa podieľajú tri procesy:

- **angiogenéza** hrá úlohu v postnatálnej neovaskularizácii, vzniká aktiváciou preexistujúcich endotelových buniek *in situ* (proliferácia endometria, postischemické zotavenie tkaniva, hojenie rán, rast karcinómu);
- **vaskulogenéza** je tvorba ciev *de novo* v postnatálnom období, ide o neovaskularizáciu spúšťanú ischemiou, poranením, rakovinou. Úlohu v nej hrajú endotelové EPC z kostnej drene;
- **arteriogenéza** zaisťuje zväčšenie kolaterál, je podnietená „shear“ stresom, nie hypoxiou. Vaskulárna regresia – dáva pokyn na zastavenie novotvorby ciev, keď je už dosiahnutá dostatočná perfúzia (3, 4).

Tabuľka 2. Charakteristika suspenzie kmeňových buniek.

	Množstvo (10 ⁶ /liter)	Koncentrácia
CD34+ bunky v kostnej drene	75,3	
CD34+ bunky v suspenzii	390,4	5,2x
CD133+/CD34- bunky v kostnej drene	15	
CD133+/CD34- bunky v suspenzii	89,8	6x

Tabuľka 3. Výsledky.

	Počet pacientov	%
Dobrá tolerancia procedúry zo strany pacienta	20	100
Analgetický účinok	12	60
Zlepšená trofika končatiny	12	60
Zlepšenie pohybovej aktivity	8	40
Veľká amputácia	3	15
Komplikácia	0	0
Úspešnosť	17	85

Predklinické a početné klinické štúdie ukazujú, že implantácia EPC do ischemickej končatiny zlepšuje tvorbu kolaterálnych ciev a hojenie rán (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15). EPC sa separujú z kostnej drene, odobranej z lopaty bedrovej kosti pacienta postupom štandardne využívaným v hematologickej praxi. Spracovanie kostnej drene sa robí metódou diferenciačnej centrifugácie. Koncentrát kmeňových buniek, pripravený na aplikáciu, má objem 100 – 120 ml. Podanie kmeňových buniek sa v závislosti od skúseností jednotlivých pracovísk realizuje dvoma rôznymi spôsobmi. Prvým je intraarteriálna aplikácia (13). Druhým spôsobom je multilokulárna injekcia do svalov ischemického predkolenia a nohy (5, 11). V našej štúdii realizujeme metodiku intramuskulárnej aplikácie, ktorá je technicky nenáročná, pacientmi veľmi dobre tolerovaná. Zabezpečuje pritom dostatočný transport pluripotentných progenitorových buniek na miesto

potreby a ich primeranú koncentráciu v ischemickom svale, teda na mieste ich určenia – tam, kde očakávame terapeutický efekt angiogenézy.

Cieľ

Hlavným cieľom našej práce je **záchrana ischemickej končatiny pred amputáciou s využitím EPC z autológnej kostnej drene a zhodnotenie účinnosti terapeutической angiogenézy u pacientov s kritickou končatinovou ischemiou**. Okrem toho sledujeme bezpečnosť danej liečebnej modality (výskyt *angina pectoris*, cievnej mozgovej príhody, akútnej arteriálnej, resp. venózne trombozy DK, infekčných komplikácií na postihnutej dolnej končatine a pod.).

Materiál a metodika

Do klinického experimentu sú od novembra 2007, kedy sme ako prví a na dlhý čas jediné pracovisko na Slovensku začali náš projekt realizovať, priebežne zaraďovaní **pacienti s PAO dolných končatín v III. a IV. štádiu podľa Fontaina**, t. j. pacienti s pokojovými bolesťami a/alebo defektom na dolnej končatine. Sú kandidátmi na amputáciu dolnej končatiny z dôvodu nemožnosti chirurgickej, resp. endovaskulárnej revaskularizácie alebo uzáveru predchádzajúcej revaskularizácie.

Exklúzne kritériá pre zaradenie do štúdie sú: ťažký mozgový deficit, imobilita, demencia, závažná komorbidity, predpokladaná limitovaná dĺžka života (< 6 mesiacov), stav vyžadujúci amputáciu pre záchranu života pacienta, nádorové ochorenia krvotvorby, trofické lézie končatiny s panikulitídou, perifokálnou lymfangoitídou, diabetická noha bez známok ischemie, chronická renálna insuficiencia v hemodialyzačnom programe, neoplastický proces v posledných 5 rokoch.

Obrázok 1. Pacient pred výkonom.**Obrázok 2.** Ten istý pacient po štyroch mesiacoch.

Pacient je vyšetrený pred výkonom, pred prepustením z nemocnice a následne o 1, 3, 6 a 12 mesiacov po výkone. **Sledované kritériá** sú: subjektívne – klaudikačný interval, intenzita bolesti (index bolesti 0 – 10), druh a dávka analgetík, zmena kvality života vo vzťahu k terapii, objektívne – hojenie lézií, záchrana končatiny pred veľkou amputáciou, členkovo-ramenný index (ABI), fotopletyzmozgrafia, a markery aktívacie endotelu (TM, t-PA, PAI-1, vWF) a trombocytov (CD 52) (12), stupeň neoformácie kolaterál digitálnou subtrakčnou angiografiou (DSA).

Štúdia sa realizuje s podporou grantu Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky (MZ SR) a jej protokol bol odsúhlasený etickou komisiou MZ SR. Každý pacient podpísal informovaný písomný súhlas so zaradením do štúdie.

Výsledky

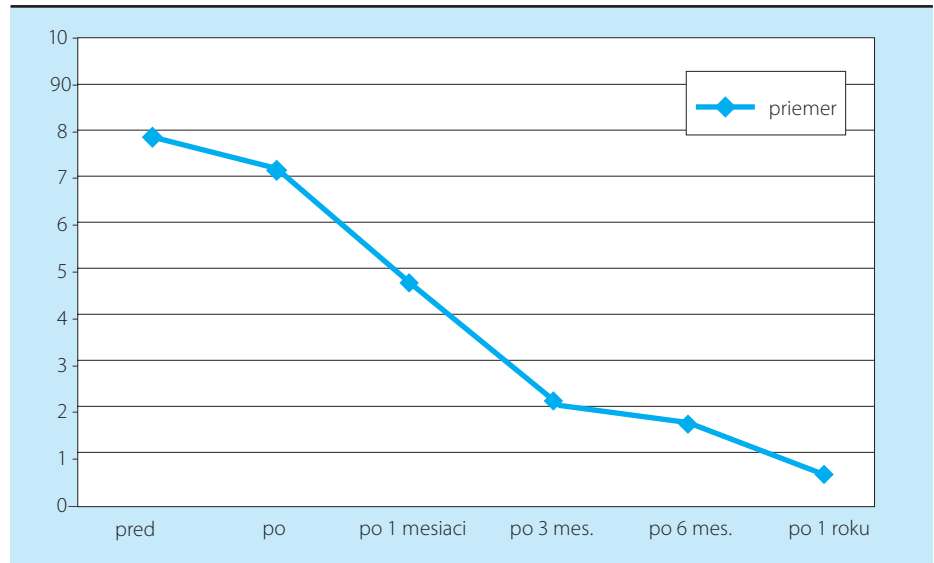
Do štúdie bolo doteraz zaradených 20 pacientov (15 mužov, 5 žien) vo veku od 38 do 83 rokov (tabuľka 1). Dĺžka sledovania je od 0,5 do 24 mesiacov. Všetci pacienti mali nerekonštruovateľné arteriálne pomery a zlyhanie komplexnej konzervatívnej liečby, pričom všetci boli bezprostredne ohrození vysokou amputáciou. Všetci mali pokojovú bolesť DK, z nich 11 mali trofické zmeny v zmysle defektu, resp. gangrény nohy. Jeden pacient má Burgerovu chorobu; 6 pacienti majú *diabetes mellitus*. Všetci pacienti mali antitrombotickú a vazodilatačnú liečbu. Všetci boli nútení užívať analgetiká z dôvodu ischemickej bolesti.

Charakteristika suspenzie kmeňových buniek v odobratej kostnej dreni a následne aj v ich koncentrácii je uvedená v tabuľke 2. Vitalita kmeňových buniek tesne pred ich aplikáciou bola potvrdená na úrovni dosahujúcej takmer 100 %.

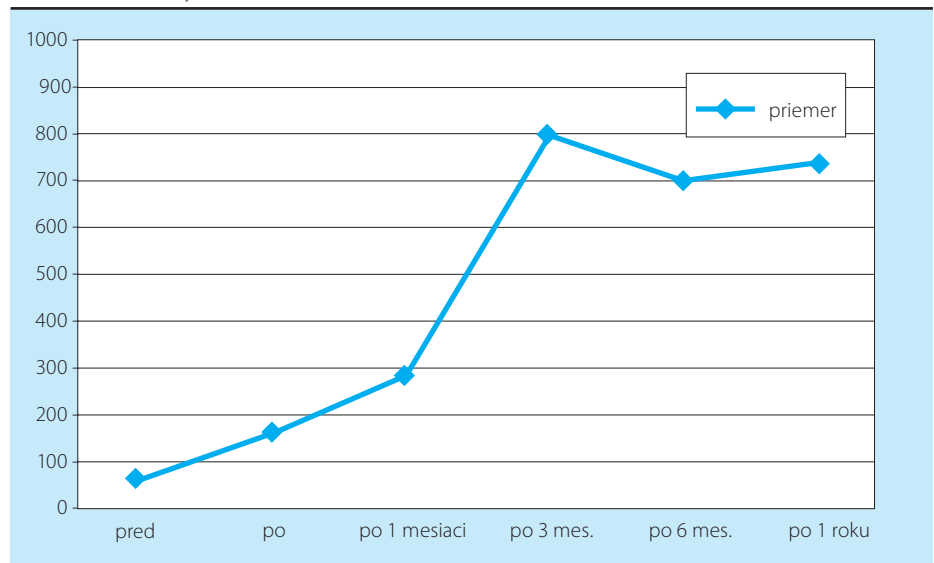
U všetkých pacientov bola zaznamenaná dobrá tolerancia procedúry. Bezprostredný analgetický účinok udalo 12 pacientov (60 %) (graf 1). Zlepšenie pohybovej aktivity nastalo u 8 pacientov (40 %) (klaudikačný interval pozri graf 2). Claudikačný interval nebol hodnotený na treadmill, ale pri bežnej pohybovej aktivite. Zlepšená trofika končatiny sa prejavila u 12 pacientov (60 %). K úplnému zhojeniu defektov došlo u 9 pacientov. Čo sa týka ďalších objektívnych parametrov, zaznamenali sme v našom súbore vzostup ABI (graf 3), ako aj maximálnej amplitúdy prietoku na periférii končatiny nameranej fotopletyzmozgraficky v pokojovom štádiu (graf 4).

U ani jedného pacienta sme nezaznamenali veľké kardiovaskulárne komplikácie ani iné periprocedurálne komplikácie (infekcia, renálne zlyhanie, výskyt *angina pectoris*, cievnej mozgo-

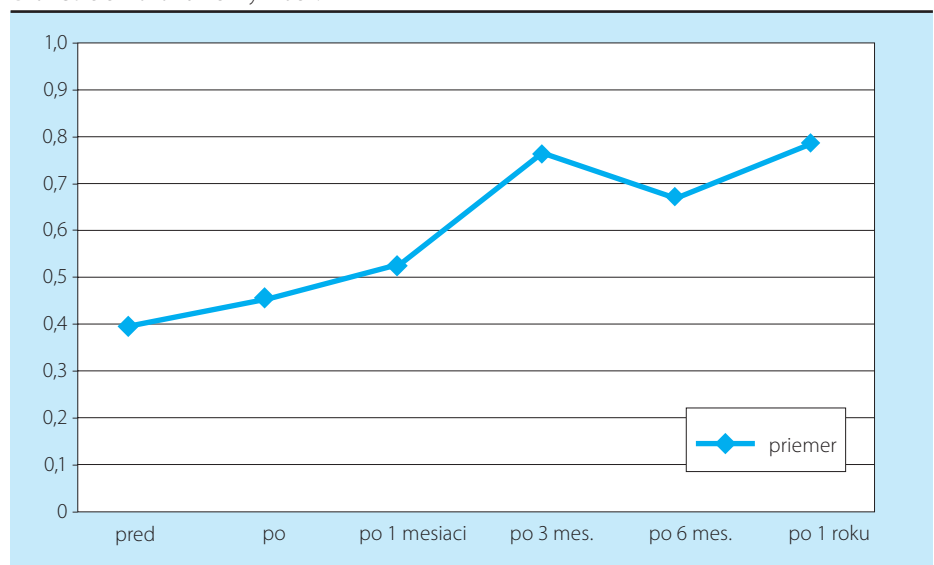
Graf 1. Intenzita bolesti (0 – 10).



Graf 2. Claudikačný interval (m).

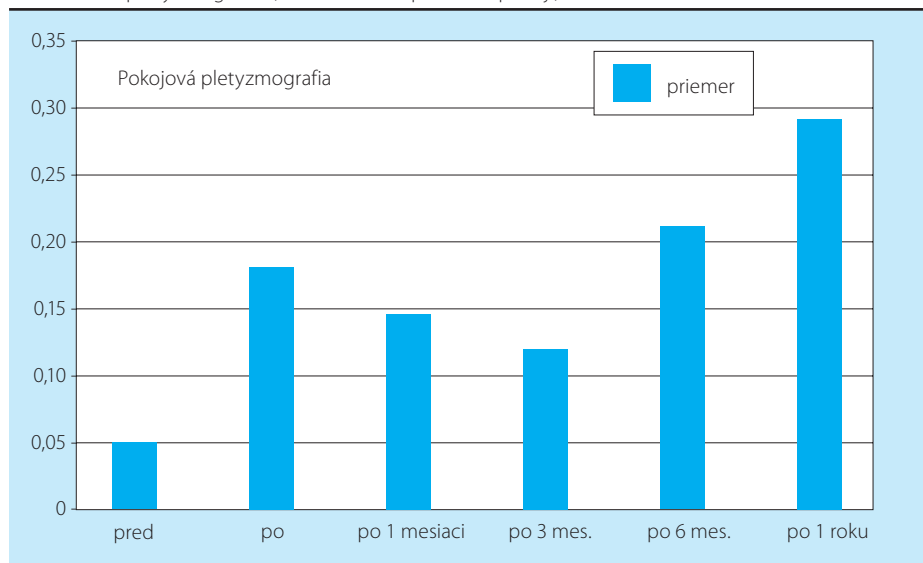


Graf 3. Členkovo-ramenný index.



vej príhody, akútnej arteriálnej, resp. venóznej trombózy dolných končatín a pod.). Jeden pacient exitoval bez zisteného súvisu s procedúrou,

pri progresii chronického nekardiovaskulárneho ochorenia. Traja pacienti museli podstúpiť vysokú amputáciu (2-krát na predkolení, 1-krát

Graf 4. Fotopletyzmografia (maximálna amplitúda v pokoji).

na stehne), čo predstavuje 15 %. **Úspešnosť** v našom súbore (**záchrana končatiny pred vysokou amputáciou**) je teda **85 %** (tabuľka 3).

Diskusia

Dobrá tolerancia procedúry zo strany pacienta, prakticky absencia nežiaducich účinkov a dostupnosť autológnej kostnej drene sú faktory, vďaka ktorým sa aplikácia kmeňových buniek v liečbe kritickej končatinovej ischémie javí ako perspektívna metóda, rozširujúca paletu výkonov v prípadoch, keď sú možnosti cievnej rekonštrukčnej chirurgie, resp. endovaskulárne výkony vyčerpané.

Zistené výrazné zlepšenie hodnôt ABI a predĺženie klaudikačného intervalu je ťažké interpretovať. Na predĺžení klaudikačného intervalu zrejme participuje analgetický efekt, daný iniciálnou parakrinnou funkciou endotelialných progenitorových buniek, ktorý je sprostredkovaný cytokínmi.

Významnejšie angiografické zmeny v zmysle zlepšenia pozorovateľnej kolaterálnej siete tepien sme nezaznamenali. Predpokladáme efekt neovaskularizácie na úrovni kapilárnej siete, ktorá nie je detekovateľná rozlišovacími schopnosťami nám dostupného DSA zariadenia. Klinický benefit pacientov je však evidentný.

V blízkej budúcnosti je potrebné realizovať randomizované, dvojito zaslepené štúdie.

Keďže limitujúcim faktorom našej štúdie je neexistencia kontrolnej skupiny, priaznivý klinický efekt by mohol byť ovplyvnený ďalšími potenciálnymi faktormi: spontánne zlepšenie, placebo efekt, resp. medikamentózna terapia. V skutočnosti je viac než zriedkavé, aby sa PAO DK spontánne zmiernilo, resp. zlepšilo bez intervencie. Placebo efekt by mohol hrať úlohu v prípade subjektívnych parametrov, avšak hojenie rán, ABI a pletyzmografia sú parametrami objektívnymi. Medikamentózna liečba základného ako aj pridružených ochorení sa periprocedurálne nemenila, takže ňou nemožno vysvetľovať zlepšenie u pacientov.

Záver

Autológna transplantácia EPC z kostnej drene pacienta sa javí byť bezpečnou a efektívnou metódou na zaistenie terapeutickú angiogenézy.

Literatúra

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy J A, Nehler M R, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group, Bell K, Caporusso J, Durand-Zaleski I, Komori K, Lammer J, Liapis C, Novo S, Razavi M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sillesen H, Sapoval M,

White C, White J; TASC II Working Group Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33 (Suppl 1): S1–75.

2. Li WW, Li VW, Tsakayannis D. Angiogenesis in Wound Healing. Contemp Surg (Suppl) 2003: 36.

3. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. Exp Physiol 2005; 90(3): 315–326.

4. Rissanen T T, Vajanto I, Yia-Herttuola S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb – on way to the clinic. Eur J Clin Invest 2001; 31(8): 651–666.

5. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet. 2002; 360 (9331): 427–435.

6. De Vriese A S, Billiet J, Van Droogenbroeck J et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for limb ischemia in a caucasian population with atherosclerosis obliterans. Journ Int Med Published Online 2008; 263 (4): 395–403.

7. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A, Szczeklik A. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. Kardiol Pol 2005; 63(4): 351–361.

8. Semenza G L. Therapeutic angiogenesis. Another Passing Phase? Circ Res 2006; 98(9): 1115–1116.

9. Matsuda H. The Current Trends and Future Prospects of Regenerative Medicine in Cardiovascular Diseases. Asian Cardiovasc Thorac Ann 2005; 13: 101–102.

10. Soda T, Suzuki H, Kusuma T et al. Improvement of severe ulcer of buerger's disease by bone-marrow mononuclear cell transplantation: a case report. In: New Frontiers in Regenerative Medicine. Springer Japan 2007: 95–100.

11. Wester T, Jørgensen T T, Strandén E, et al. Treatment with autologous bone marrow mononuclear cells in patients with critical lower limb ischaemia. A pilot study Scand J Surg 2008; 97: 56–62.

12. Dimmeler S. Platelet-Derived Growth Factor CC – A Clinically Useful Angiogenic Factor at Last? N Engl J Med 2005; 352(17): 1815–1816.

13. Lenk K, Adams V, Lurz P et al. Therapeutic potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. Eur Heart J 2005; 26(18):1903–1909.

14. Durdu S, Akar A, R, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III tromboangiitis obliterans. J Vasc Surg 2006, 44(4): 732–739.

15. Roehr B. AAD 2009: Stem-Cell Therapy May Resolve Ulcers Associated With Scleroderma, America Academy of Dermatology (AAD) 67th Annual Meeting: Forum F110 2009, Medscape Clinical News 2009.

MUDr. Renáta Talapková, PhD.

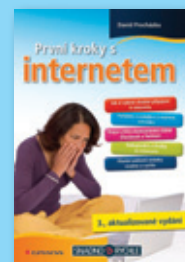
Martinská fakultná nemocnica
a Jesseniova lekárska fakulta
Univerzity Komenského
Kollárova 2, 036 59 Martin
rtalapkova@post.sk



David Procházka: První kroky s internetem

Kniha jedinečným a srozumiteľným spôsobom pomôže nezkušenému užívateľovi s ťažkými začiatkami na internete. Čtenář se dozví, jak využívat internetový prohlížeč, jak nejlépe na internetu nalézt požadované informace, jak založit a využívat e-mail a programy pro textovou a hlasovou komunikaci. Také se v publikaci dočte o nakupování na internetu, o internetových aukcích, specializovaných portálech a dozví se, co je potřeba udělat pro vlastní webovou prezentaci. Kniha bude čtenáře vést ke zvládnutí všech základních služeb internetu, tak, aby byl schopen ovládat internet v pracovních i soukromých aktivitách.

ISBN: 978-80-247-3255, kat. číslo 7611, 112 s.



Distribúcia v SR: Grada Slovakia, s.r.o., Moskovská 29, 811 08 Bratislava, tel.: 02/5564 5189

www.grada.sk