

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Lenka Skalická

II. interní klinika - klinika kardiologie a angiologie, 1. lékařská fakulta,
Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

**Terapeutická vaskulogeneze u pacientů
s chronickou kritickou ischemií dolních končetin**

Therapeutic vasculogenesis in patients with critical leg ischemia

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc

Konzultant: as MUDr. Miroslav Chochola, CSc

Praha 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Aleši Linhartovi, DrSc. za jeho podporu a odbornou pomoc v mé vědecké práci. Rovněž děkuji mému učiteli MUDr. Miroslavu Chocholovi za vedení a spolupráci. Velký dík patří též Dr. Robertu PYtlíkovi za pomoc při statistickém zpracování a radu v hematologických otázkách. Dále děkuji celému kolektivu angiologické JIP, zejména pak JC Lubandovi za pomoc při technickém zpracování disertační práce.

Lenka Skalická

Obsah

1.	Úvod.....	5
2.	Patogeneze.....	7
2.1.	Neovaskularizace.....	7
2.2.	Kmenové buňky.....	8
2.3.	Vaskulogeneze.....	9
3.	Literární důkazy.....	13
4.	Východiska a metodika vlastní vědecké práce.....	14
4.1.	Cíle.....	14
4.2.	Metodika, materiál, soubor.....	15
4.3.	Podmínky vstupu pacientů do projektu.....	16
4.4.	Měření indexu kotník-paže (ankel-brachial index).....	17
4.5.	Měření transkutánní tenze kyslíku (T _{cp} O ₂).....	17
4.6.	Hodnocení kvality života.....	18
4.7.	Digitální subtrakční angiografie.....	19
4.8.	Odběr dřeňové krve.....	20
4.9.	Zpracování kostní krve a příprava suspenze jaderných buněk.....	22
4.10.	Provedení implantace kmenových buněk.....	22
5.	Sledování angiogenních prekurzorů v krvi a kostní dřeni.....	25
5.1.	Stanovení endotel. kolonií pomocí CFU-Hill eseje.....	25
5.2.	Průtoková cytometrie.....	27
5.3.	Kultivace CFU-GM a BFU-E.....	27
5.4.	Kultivace mezenchymových progenitorových buněk....	27
6.	Statistické hodnocení.....	29
7.	Cílové ukazatele.....	29
8.	Výsledky.....	30
9.	Rozbor pacientů.....	36
10.	Eskalační studie bezpečnosti a účinnosti podávání erythropoetinu u pacientů s ICHDK	38

11. Intravenózní léčba alprostadilem.....	39
12. Další cíle.....	41
12.1. Zjištění optimálních poměrů buněčných populací podílejících se na terapeutickém efektu autologní transplantace.....	41
12.2. Mobilizace angiogenních prekurzorů do oběhu u pacientů s diabetem a bez diabetu.....	43
13. Diskuse a závěrečný souhrn.....	45
14. Seznam použitých zkratk.....	46
15. Literatura.....	47
16. Obrazová dokumentace vybraných pacientů.....	50-97

1. Úvod

Pacienti s ischemickou chorobou dolních končetin (ICHDK) v klaudikačním stádiu mají zhoršenou kvalitu života a jsou ohroženi hlavně následky koronární nemoci a postižením karotických tepen. Chronická kritická ischemie je nejhorší manifestací ICHDK. Je definována jako klidová bolest v trvání minimálně 2 týdnů, vyžadující analgetika a/nebo přítomnost defektu či gangrény. Za objektivní kritéria se považují kotníkové tlaky pod 50mmHg nebo prstové tlaky pod 30mmHg a/nebo hodnoty transkutánního tlaku kyslíku pod 30mmHg. Incidence chronické kritické ischemie se odhaduje v Evropě a Severní Americe na 500-1000 nových případů na 1 milión obyvatel. Progrese ICHDK do tohoto stádia představuje nejen ohrožení končetiny, ale i samotného života. Prognóza pacientů s chronickou kritickou ischemií dolních končetin je zatížena vysokou mortalitou a je srovnatelná s prognózou pacientů s pokročilým maligním onemocněním (1). Přibližně 60% nemocných s kritickou ischemií je léčeno chirurgicky nebo intervenčně, 20% prodělá primární amputaci a 20% pacientů je léčeno konzervativně. Za rok od stanovení diagnózy chronické kritické ischemie dolních končetin prodělá 25% nemocných amputaci nad kolenem, 20% zemře a 55% žije s oběma končetinami. 50% nemocných s klidovými bolestmi zemře do pěti let. S amputací se prognóza těchto pacientů dále zhoršuje. Perioperační mortalita amputací pod kolenem je udávána v rozmezí 5-10%, pro amputace nad kolenem 15-20%. Do dvou let po amputaci zemře 25-30% nemocných a do pěti letech nežije 50-75% pacientů.

Strategie léčby spočívá především ve zlepšení perfúze ischemické oblasti chirurgickou či perkutánní revaskularizací. Pro pacienty s nerekonstruovatelným nálezem na tepnách dolních končetin je určena konzervativní léčba k zastavení nebo zpomalení progrese onemocnění, ke zlepšení lokálních i celkových cirkulačních poměrů, odstranění klidových bolestí a lokální péče o bolestivé defekty, které jsou výrazným stresujícím faktorem zhoršující kvalitu života. Přibližně 20% pacientů není vhodných k žádné léčbě a je u nich provedena amputace končetiny (2).

Tento nepříznivý osud nemocných s chronickou kritickou ischemií dolních končetin vede ke snaze nalézt nové terapeutické postupy, které by vedly k záchraně končetin, resp. ke zlepšení kvality jejich života, snížení morbidity a mortality. Terapeutická angiogeneze vede v experimentu ke zlepšení perfúze v ischemické oblasti končetiny. Tato metoda by se tak mohla stát alternativní metodou konzervativní léčby nemocných s diagnózou chronické kritické ischemie dolních končetin (3).

2. Patogeneze

2.1 Neovaskularizace

Proces růstu nových krevních cév je výsledkem několika procesů, kde zásadní roli hraje angiogeneze, arteriogeneze a vaskulogeneze. Termínem „angiogeneze“ je označována tvorba cév (většinou kapilár) větvením již existujícího řečiště, většinou z postkapilárních venul. Tento proces je stimulován především tkáňovou hypoxií, která vede k aktivaci řady růstových faktorů a jejich receptorů. Především ze skupiny vaskulárních endotelových růstových faktorů (VEGF A-D), placentového růstového faktoru (PIGF), angiopoetinů a inducibilní formy syntázy oxidu dusnatého (iNOS); a je regulována lokální expresí faktoru indukovaného hypoxií (HIF-1alfa). Účinkem růstových faktorů se zvyšuje permeabilita stěny cévy, dochází k průniku plazminogenu a fibrinogenu a k jejich následné přeměně v plazmin a fibrin. Síť fibrinových vláken je pak podkladem pro vytváření nové cévy. Angiopoetiny zřejmě působí proti zvýšení propustnosti cévní stěny. Efekt PIGF je spíše arteriogenní a tento cytokin je schopný uvolňovat cirkulující endoteliální progenitorové buňky (EPC) z kostní dřeně. Zdá se, že se na angiogenezi významně uplatňují i zánětlivé mediátory (MCP-1, monocyte chemotactic protein-1) (4). Angiogeneze byla až donedávna pokládána ze jediný mechanismus novotvorby a obnovování cév v dospělém organismu. Snížení účinnosti angiogenní aktivity má za následek poruchu hojení ran nebo pomalé hojení zlomenin, naopak zvýšená podpora novotvorby cév se může podílet na patogenezi revmatoidní artritidy, diabetické retinopatie nebo chronického zánětu. Angiogeneze hraje také významnou úlohu v růstu nádorového ložiska a v metastazování (5).

Termínem „arteriogeneze“ označujeme proces tvoření kolaterálních spojek de novo ze stávajícího tepenného řečiště, kde došlo k uzávěru či stenóze, které můžeme zobrazit angiograficky. Regulace arteriogeneze není závislá na hypoxii tkáně. Vznik kolaterál je dle experimentu způsoben zvýšením smykových rychlostí při nahromadění mononukleárů, což vede ke zvýšení aktivity uvolněných růstových faktorů jako je fibroblastový růstový faktor

(FGF), VEGF, růstový faktor odvozený od destiček (PDGF) a další. Růstové faktory FGF a PDGF, na rozdíl od VEGF, mají minimální vliv na permeabilitu cév a výrazně potencují aktivaci pericytů, proliferaci fibroblastů s podporou syntézy kolagenu, což vede ke vzniku nové stěny cévní a jejího lumen. PDGF se spolu s hepatocytárním růstovým faktorem (HGF) významně podílí na morfogenezi cévy, ale přesná role a vzájemná interakce zatím nejsou zcela objasněny (6).

Termínem „vaskulogeneze“ je označována diferenciací mezodermálních prekursorů směrem k angioblastům a následně k zralým endotelovým buňkám, které vytvářejí primitivní kapilární síť v časně embryogenezi. Je to tedy proces tvorby krevních cév *in situ* z cirkulujících endoteliálních progenitorových buněk (EPC) a cévních progenitorových buněk

Tyto tři popsané procesy neovaskularizace se mohou navzájem doplňovat, ale i dynamicky měnit dle charakteru poškození tepenného řečiště. Pokud dojde k poškození tkáně, uplatňuje se při hojení nejspíše angiogeneze. Při organických změnách tepenného řečiště se zachováním periferních tepen hraje zásadní roli arteriogeneze tvorbou kolaterálního řečiště. Vaskulogeneze se zřejmě uplatňuje především v novotvorbě cévního řečiště distálně od uzávěru tepenného řečiště (7).

2.2 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou esenciální stavební kameny vícebuněčných organismů a vyskytují se ve většině orgánů. Jejich zásadními vlastnostmi je schopnost dalšího růstu s možností tvorby dalších kmenových buněk a možnost diferenciací ve specializované buňky. Tato tzv. „plasticita“ (multipotence v diferenciaci a množení) znamená, že tyto kmenové buňky mohou být zdrojem všech typů buněk a mohou se uplatňovat např. v regeneraci myokardu, jater, nervové tkáně a dalších orgánů a naopak, kmenové buňky z jednotlivých orgánů mohou vytvářet buňky kostní dřeně s expresí jejich povrchových znaků. Tento fakt byl potvrzen při transplantaci kostní dřeně nebo obohacených hematopoetických kmenových buněk, kdy bylo možno prokázat myoblasty kosterního svalstva nebo myokardu, endotelu, epitelie plic, střeva, žlučových cest a

jater, kůže nebo neuroektodermu. Zásadní význam v regeneraci tkání se v současnosti přikládá právě těmto tzv. multipotentním buňkám, které se vyskytují v jednotlivých orgánech (8). Cirkulující endoteliální progenitorové buňky (EPC) jsou v nízkých počtech přítomny v periferní krvi podobně jako prekurzory hematopoetické. Podobně jako ony jsou mobilizovatelné růstovými faktory (G-CSF- granulocyte-colony stimulating factor, SCF- stem cell factor, erythropoetin) a také inhibitory HMG-CoA reductázy (statiny). Kromě nich byly u některých chorobných stavů, především vaskulitid, ale i u akutních forem tepenných onemocnění, popsány zralé, cirkulující endotelové buňky, většinou apoptotické či nekrotické. U ANCA-asociovaných vaskulitid bylo ve více pracích popsáno zmnožení zralých endotelových buněk v periférii (9, 10), existuje však jen jediná práce zkoumající množství cirkulujících EPC (11). EPC mohou vznikat nejen z primitivních prekurzorových buněk, ale též ze zralých buněk kostní dřeně či periferní krve a usídlit se v již existujících cévách. Na svém povrchu nesou tyto EPC charakteristické znaky, jako jsou CD 133, CD 34 a receptor-2 pro VEGF. Tyto buňky lze získat kultivací hematopoetických progenitorových buněk CD 34+, CD 133+ a dále z buněk mononukleárních. Podobně jako u kmenových buněk, byla u nich prokázána schopnost navodit vaskulogenezu. Buňky hladké svaloviny v tepenné stěně mohou také vznikat z prekurzorů kostní dřeně (4).

2.3 Vaskulogeneze

V roce 1994 skupina biologů ze Seattlu zjistila, že dakronové cévní náhrady u pokusných psů nejsou endotelizovány transmurální angiogenezí z okrajů cévní náhrady, ale endotelovými ostrůvky, které postupně vznikají na různých místech dakronového graftu bez kontaktu s existujícím cévním řečištěm (12). Dalšími sériemi pokusů bylo zjištěno, že tyto endotelové ostrůvky nepocházejí z endotelových buněk, náhodně odloučených ze zralých cév, ale mají původ v prekurzorových buňkách z kostní dřeně (13). V současné době se předpokládá, že cévní i krvetvorné buňky pocházejí ze společného prekurzoru, takzvaného hemangioblastu (4,13). Je prokázáno, že nezralé angioblastové prekurzory

cirkulují v detekovatelných množstvích i v krevním oběhu dospělých jedinců, kde tvoří zhruba 0,002% mononukleárních buněk (14).

Jak už bylo uvedeno, množství angioblastických prekursorů je možno zvýšit mobilizací pomocí VEGF, G-CSF či SCF (4). Cévní ischemie rovněž zvyšuje množství angiogenních prekursorů u pokusných zvířat či u pacientů se srpkovitou anémií, což vede k závěrům, že vaskulogeneze se významnou měrou podílí na cévní obnově i u dospělých jedinců (15). Kromě dřevných prekursorů vaskulárních buněk se ovšem mohou na procesu vaskulogeneze podílet i relativně zralé endotelové buňky, odloučené z cévní stěny. Vzhledem k jejich omezené schopnosti proliferace (14) je však jejich podíl na celkovém výsledku nejasný.

Z výše uvedeného pohledu je logické, že u chorobných stavů, vedoucích k ateroskleróze, jako je například diabetes mellitus, hypercholesterolémie nebo ve vyšší věk, naopak cirkulujících endotelových prekursorů ubývá. Hill a spol. (16) v práci z roku 2003 našli přímou korelaci mezi počtem cirkulujících endoteliálních prekursorů a Framinghamským rizikovým indexem pro aterosklerózu. Z toho ovšem vyplývá, že právě ti jedinci, kteří jsou nejvíce ohroženi cévním onemocněním, mají nejmenší reparační kapacitu cévního řečiště.

Existují dva teoretické způsoby využití vaskulogeneze, které jsou dobře prozkoumány především u ischemické choroby srdeční. První spočívá v mobilizaci endotelových prekursorů z kostní dřeně do krevního oběhu pomocí cytokinů. Orlic (17) mobilizoval dřevné buňky u myší s experimentálně vyvolaným infarktem myokardu pomocí G-CSF a SCF. Mobilizace endotelových prekursorů těmito dvěma cytokiny snížila velikost infarktu o 40%, dilataci komory o 26% a mortalitu o 68%. Na primátech se však tyto výsledky nepodařilo zopakovat vzhledem k excesivní mortalitě pokusné skupiny. Rovněž u člověka bylo prokázáno, že aplikace cytokinů před plánovaným sběrem krvetvorných buněk může vyvolat anginu pectoris či akutní arteriální uzávěr (18). Dále bylo zjištěno, že dřevné prekursorové buňky se mohou diferencovat i do buněk hladké svaloviny a podílet se na vzniku aterosklerotických plátů. Inhibitory HMG-CoA reduktázy rovněž zvyšují počet cirkulujících progenitorů, a to až na

čtyřnásobek v průběhu čtyř týdnů po začátku podávání, což je srovnatelné s použitím VEGF (19). Mechanismus mobilizace není zcela jasný, patrně však souvisí se zvýšeným vyžíváním endotelových prekursorů. Je pravděpodobné, že mobilizace endotelových prekursorů je jedním z mechanismů příznivého účinku statinů u pacientů s normálním cholesterolem a ischemickou chorobou srdeční (20). Druhou možností je sběr vaskulárních prekursorů a jejich aplikace přímo do místa kritické ischemie. Tímto způsobem bylo dosaženo snížení frekvence amputací v experimentálním modelu cévní ischemie končetiny u nahých myší (21). První klinické studie proběhly i u pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin. Tateishi-Yuyama (22) léčil 47 pacientů s chronickou kritickou ischemií injekcemi dřevných buněk do musculus gastrocnemius. U léčených pacientů bylo pozorováno hojení ischemických defektů, zlepšení indexu kotník-paže (ABI) a prodloužení klaudikačního intervalu. Angiograficky bylo zjištěno výrazné zmnožení kolaterál na léčené končetině oproti končetině neléčené. Tato studie, spolu s výše citovanými studiemi kardiologickými, ukázala schůdnost a možný klinický přínos buněčné terapie u pacientů s akutním či chronickým cévním uzávěrem. V experimentu se dá efekt léčby kontrolovat pomocí termografie či pozitronové emisní tomografie.

Výše nastíněné úvahy mohou vést k velmi logické otázce: jestliže je v ischemické oblasti zachován alespoň minimální krevní průtok, proč nestačí k regeneraci vaskulogenezy fyziologicky cirkulující endotelové prekursorů? Jedna z možných odpovědí je, že při mobilizaci endotelových prekursorů, ať již vznikem akutní ischemie, podáváním statinů či podáváním růstových faktorů, nedojde k dostatečné koncentraci těchto prekursorů v postižených oblastech, eventuálně jejich vzájemný poměr s jinými dřevnými prekursorů není optimální. Je totiž prokázáno, že krvetvorné buňky ve středním stádiu vývoje (např. erytroblasty) produkují růstové faktory (např. angiopoetiny, VEGF) podporující vaskulogenezu a endotelové buňky naopak na svém povrchu selektivně zachycují CD34 pozitivní primitivní dřevné prekursorů.

Přes řadu nejasností v celé této složité problematice, je ale možno dnes jednoznačně říci, že orgány dospělého člověka (včetně snadno přístupné kostní dřeně) obsahují nezralé buňky, které jsou schopny v případě potřeby napomáhat regeneraci poškozených orgánů. V případě náhlého, rozsáhlého či chronického poškození a u starších jedinců však není na poškozeném místě dostatečný počet progenitorových buněk k dispozici a jejich mobilizace ze vzdálenějších míst a doprava na místo poškození rovněž není dostačující. V takovém případě by mohlo být prospěšné pěstování uvedených buněk *in vivo* a jejich následná doprava na místo poškození. V současné době se předpokládá, že diferenciaci progenitorových buněk ve funkční buňky poškozeného orgánu je plně řízena vnitřním mikroprostředím. V takovém případě by nebylo třeba progenitorové buňky nijak zvlášť upravovat. Větší problém by mohl být s dopravou dostatečného množství buněk na místo určení. V úvahu připadá buď intravenózní podání (kdy ovšem značná část buněk nemusí dorazit na místo určení) nebo podání přímo do poškozeného místa. Dalším problémem je, že v případě akutního poškození nebudou autologní buňky pacienta k dispozici. Zdá se však, že některé (např. mezenchymové) kmenové buňky nevyvolávají při alogenním podání imunitní odpověď, dokonce podle některých pokusů mohou rovněž navozovat imunitní toleranci. Teoreticky je tedy možné si představit využití jak autologních progenitorových buněk, tak i předem připravených alogenních progenitorových buněk.

3. Literární důkazy

Pilotní klinická práce s kmenovými buňkami u pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin byla publikována r. 2002 japonským autorem E. Tateishi-Yuyamou (TACT study) (19). Tehdy bylo zařazeno 25 pacientů s unilaterální kritickou končetinovou ischémií, kterým byly aplikovány kmenové buňky do musculus gastrocnemius postižené končetiny. Druhá skupina 22 pacientů měla bilaterální postižení končetin, u této populace byly aplikovány kmenové buňky do jedné končetiny (opět do musculus gastrocnemius) a periferní mononukleáry do druhé končetiny. Primárním cílem byla bezpečnost a účinnost léčby založená na hodnocení indexu kotník/paže (ABI), klidových bolestí. Práce prokázala účinnost implantace kmenových buněk u těchto pacientů se zlepšením prokrvení končetiny, ústupu klidových bolestí a hojení defektů. Metoda byla hodnocena jako bezpečná.

V roce 2006 byly publikovány práce, které se zabývaly bezpečností a účinností implantace kmenových buněk u pacientů s trombangiitis obliterans (Buergerova choroba), které rovněž prokázaly zlepšení klidových bolestí u pacientů s tímto postižením (23,24).

Až doposud bylo publikováno 25 prací zabývajících se užitím kmenových buněk u pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin a chronickou kritickou ischémií. Pouze 2 studie byly randomizované, ostatní jsou práce jednotlivých případů a souborů pacientů bez kontrolních skupin. Pro léčbu kritické ischémie byly používány 3 možné cesty aplikace kmenových buněk – intramuskulární, intraarteriální a kombinovaná (intramuskulární a intrarteriální). Žádná studie nesrovnávala tyto cesty aplikace, avšak v modelu na myších způsob aplikace nehrál ve výsledcích roli. (25)

V lednu 2011 byla publikována studie PROVASA – randomizovaná, dvojitě slepá, placebem kontrolovaná studie. Bylo zařazeno 40 pacientů s kritickou končetinovou ischémií. První 3 měsíce byly polovině pacientům aplikovány intraarteriálně kmenové buňky do tepen dolních končetin, polovina dostávala placebo. Za 6 měsíců od začátku studie byly kmenové buňky aplikovány všem pacientům. Primárním cílovým ukazatelem byla změna ABI, sekundárním cílovým ukazatelem bylo hojení defektů, snížení

bolesti, počet amputací. ABI se ukázal jako nevhodný primární cíl, neboť jeho změny nekorelovaly s hojením ran a záchranou končetiny. Dále bylo prokázáno, že intraarteriální aplikace kmenových buněk signifikantně podporuje hojení ran a snižuje bolest po 3 měsících oproti aplikaci placebo. Kompletní zhojení defektů bylo ve většině případů spojeno s opakovanou aplikací kmenových buněk. Dobrá odpověď na aplikaci kmenových buněk byla zjištěna u pacientů s trombangiitis obliterans, u celkově kriticky nemocných s rozsáhlými gangrény a u pacientů s hrozící amputací nebyl předpokládán benefit aplikace kmenových buněk prokázán.

Data ze studií také ukazují, že implantace kmenových buněk indukuje signifikantní histologické změny, které nejsou přítomny u kontrolních pacientů s kritickou ischemií bez implantace kmenových buněk. Zůstává zatím nezodpovězena celá řada otázek souvisejících s těmito změnami, které vedou ke klinickému zlepšení.

Zkoumání a objevování nových léčebných strategií u pacientů s kritickou končetinovou ischemií má velký význam z důvodu závažnosti této diagnózy, stávající špatné prognózy a velmi snížené kvality těchto pacientů. Kmenové buňky jsou možným novým léčebným prostředkem, což naznačují výše zmíněné studie.

4. Východiska a metodika vlastní vědecké práce

4.1. Cíle

Chronická kritická ischemie dolních končetin je závažná diagnóza s velmi nepříznivým osudem pro jejich nositele. Velká část pacientů má nerekonstruovatelný nález na tepnách dolních končetin. Snahou je především zlepšení velmi špatné kvality života těchto nemocných, snížení morbidit a mortality. Hledají se nové terapeutické postupy, které by vedly k záchraně končetiny.

Jako cíle naší práce jsme si stanovili zjistit bezpečnost a účinnost autologní transplantace dřevňových buněk intraarteriální cestou u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin. Dále bylo úkolem srovnat účinnost invazivní transplantace kmenových buněk s neinvazivním podáváním intravenózního alprostadilu (Prostvasin®) – stabilního komplexu obsahující prostaglandin E1 (PGE1), které působí jako účinné vazodilatans. Dalším cílem bylo zjistit optimální poměry buněčných populací podílejících se na terapeutickém efektu autologní transplantace a zjistit rozdíly v mobilizaci angiogenních prekurzorů u diabetiků a pacientů bez diabetu. Hypotézy projektu vyplývají z patogeneze – viz. Výše.

4.2. Metodika, materiál, soubor

Od 1.9. 2004 do 31.12. 2006 jsme provedli 28 autologních intravaskulárních transplantací dřevňových buněk u 24 pacientů (13 mužů a 11 žen) s chronickou kritickou končetinovou ischemií (CHKKI) dolních končetin. Stupeň ICHDK jsme hodnotili dle Fontainovy klasifikace. Stupeň III (klidové bolesti DK) splňovalo 14 (50%) ošetřených končetin, stejný počet i stupeň IV (defekt či ztráta tkáně). Věkový medián souboru byl 68 let (26-85). 15 (62,5 %) pacientů se léčilo pro diabetes mellitus, 11 (46%) pacientů pro ICHS, 18 (75%) pacientů pro hypertenzi, u 13 (54 %) pacientů byla zjištěna porucha metabolismu lipidů, u 5 (21%) pacientů byla zjištěna anamnéza embolizace do tepen dolních končetin při chronické fibrilaci síní, 5 (21%) nemocných mělo v anamnéze cévní mozkovou příhodu, 8 (33%) pacientů bylo kuřáky.

Všichni pacienti byli hospitalizováni na jednotce intenzivní angiologické péče II. interní kliniky 1.LF UK. U všech bylo provedeno při přijetí základní interní a angiologické vyšetření (biochemické, hematologické vyšetření, změření indexu kotník - paže (ABI), změření transkutánní tenze kyslíku (T_{cp}O₂) a angiografické vyšetření). Pacienti podepsali informovaný souhlas s léčbou a byl jim rozdán k vyplnění dotazník kvality života (SF-36). Test klaudikační vzdálenosti na běhátku jsme zpočátku prováděli, ale jelikož většina nemocných nebyla schopna chůze pro defekt na noze nebo klidové bolesti, od dalšího provádění jsme ustoupili. Po transplantaci kmenových buněk byli pacienti propuštěni druhý den do domácího léčení, užívali svoji chronickou medikaci a byli pravidelně sledováni v šesti měsíčních intervalech v naší angiologické ambulanci II. interní kliniky VFN a 1. LF UK, kde jsme kontrolovali vedle celkového stavu i lokální nález na léčené končetině (včetně ABI). Lokální léčba defektů DK byla prováděna specializovanou angiologickou sestrou, monitorována standardním způsobem a byla prováděna jejich pravidelná fotodokumentace. Po roce bylo provedeno kontrolní angiografické vyšetření léčené končetiny se změřením ABI, T_{cp}O₂ a vyplněn dotazník kvality života.

4.3. Podmínky vstupu pacientů do projektu:

Kritéria zařazení: věk do 85 let, souhlas s provedením studie, kritická ischémie DK bez další možnosti endovaskulární či chirurgické revaskularizace, pacient neužívá inhibitor HMG-CoA reductázy alespoň po dobu 1 měsíce, je schopen podstoupit výkon v celkové anestezii, a podepsal informovaný souhlas.

Vyřazující kritéria : kritická stenóza koronární tepny nebo nestabilní AP, maligní onemocnění v anamnéze léčené chemoterapií nebo radioterapií, jiná závažná interní či hematologická onemocnění.

4.4. Měření indexu kotník-paže (ABI, AAI)

K měření jsme používali standardní přenosný dopplerovský přístroj Multi Doplex II s 8 Mhz sondou, kterou jsme vyhledali pulzový signál na tepně (a.dorsalis pedis, resp. a.tibialis posterior), manžetu tonometru jsme přikládali na distální část lýtka. Vzhledem k tomu, že šlo o pacienty s kritickou končetinovou ischémií, neprováděli jsme měření po zátěži, ale jen v klidu. Měřený tlak na dolní končetině jsme srovnávali s tlakem na a. brachialis. Měření ABI jsme prováděli před implantací kmenových buněk, v 6. a 12. měsíci. Jako kotníkový tlak jsme ke statistickému zpracování použili vždy tlak s vyšší hodnotou. U 4 nemocných jsme nemohli změřit hodnoty tlaku pro diabetickou mediokalcinózu (hodnoty byly > 1) v obou měřeních.

4.5. Měření transkutánní tenze kyslíku (TcpO₂, tpO₂)

Dopplerovské měření kotníkového tlaku selhává v přítomnosti mediokalcinózy, hodnota indexu kotník/paže $> 1,15$ je nespolehlivá. Kromě měření palcových tlaků lze použít i měření transkutánního parciálního tlaku kyslíku (TcpO₂). Měření TcpO₂ je neinvazivní metoda, která nepřímo odráží kožní perfuzi. Měření bylo provedeno v horizontální poloze nemocného na postižené končetině. Pacient byl 30 minut v klidovém režimu, v místnosti s teplotou kolem 22 °C s adjustací na aktuální atmosférický tlak. Měření bylo provedeno pomocí tzv. Clarkovy sondy, která pracuje na polarografickém principu a měří parciální tlak kyslíku difundující přes pokožku přístrojem TCM400 Mk2 (Radiometer Copenhagen). Hodnoty TcpO₂ byly měřené na dorsu nohy postižené končetiny (obr 1. a 2).

Obrázek 1 - Příklad přístroje k měření transkutánní tenze kyslíku



Obrázek 2 - technika měření transkutánní tenze kyslíku (sonda k měření uložena na nártu pacienta)



4.6. Hodnocení kvality života

Při hodnocení účinnosti léčby na kvalitu života pacientů s chronickou kritickou končetinovou ischemií je nutné si uvědomit, že významnou roli při hodnocení hraje především věk nemocného, kdy zcela odlišné nároky na kvalitu života má pacient ve čtvrtém deceniu ve srovnání s pacientem na konci sedmého decenia, dále je to lokalizace a rozsah tepenného postižení a pohyb omezující defekt. K prospektivnímu hodnocení kvality života jsme použili generický dotazník SF-36, jehož výpovědní hodnota byla prokázána u několika desítek onemocnění včetně ischemické choroby dolních končetin (obr. příloha dotazníku). Pacienti vyplňovali dotazník

kvality života před implantací kmenových buněk a v odstupu 12ti měsíců po implantaci. Generické dotazníky všeobecně hodnotí celkový stav nemocného bez ohledu na dané onemocnění, všímají si kvality života v co nejširším záběru. Jsou vhodné ke zhodnocení kvality života nevýběrových vzorků nebo ke srovnání velikosti ovlivnění kvality života různými nemocemi. Jsou ale méně citlivé k jemnějším změnám zdravotního stavu dosaženého např. léčbou. V dotazníku je 36 dotazů sdružených do 8 domén (1. fyzické funkce, 2. omezení rolí pro fyzické problémy, 3. omezení rolí pro emoční problémy, 4. omezení sociálních funkcí pro fyzické nebo emoční problémy, 5. fyzická bolest, 6. všeobecné vnímání duševního zdraví, 7. vitalita, 8. všeobecné vnímání vlastního zdraví). Dotazník je hodnocen několika kroky. Nejprve se hodnotí každý dotaz škálou bodů, poté dochází ke sdružení skóre jednotlivých dotazů do souborných domén. Dále se transformuje skóre do škály 0-100% a nakonec se skóre jednotlivých domén vyjádří číselnou nebo grafickou formou. Z osmi vypočtených hodnot je dále možno stanovit kompozitní skóre fyzické kvality života (PCS, physical composite score) a mentální kvality života (MCS, mental composite score).

4.7. Digitální subtrakční angiografie

Vyšetření jsme prováděli na přístroji Axiom Multistar (Siemens, SRN) retrográdní punkcí femorální tepny postižené končetiny po infiltraci místa vpichu anestetikem (10ml 1-2% Mesocain). Vlastní DSA jsme prováděli přes 4F pouzdro kontrastní látkou Iomeron (Bracco, Německo), která byla injikována tlakovou stříkačkou rychlostí 10ml/minutu. Vyšetření bylo provedeno minimálně v 6ti segmentech končetiny, rychlostí 1-3 snímky/sek, aby byla zachycena tepenná i žilní fáze, DSA vyšetření jsme prováděli před a po implantaci kmenových buněk a dále po 1 roce. Kvalitativní hodnocení počtu kolaterál v jednotlivých segmentech vyšetřované končetiny provedli 2 nezávislí radiologové pomocí semikvantitativní škály (-1= zhoršení, 0= beze změn, 1= mírné zlepšení, 2 = výrazné zlepšení). Hodnocení bylo prováděné jak v pozitivu tak

negativu a bylo zaslepeno, takže hodnotitel nevěděl, který AG snímek byl před implantací a který je kontrolní.

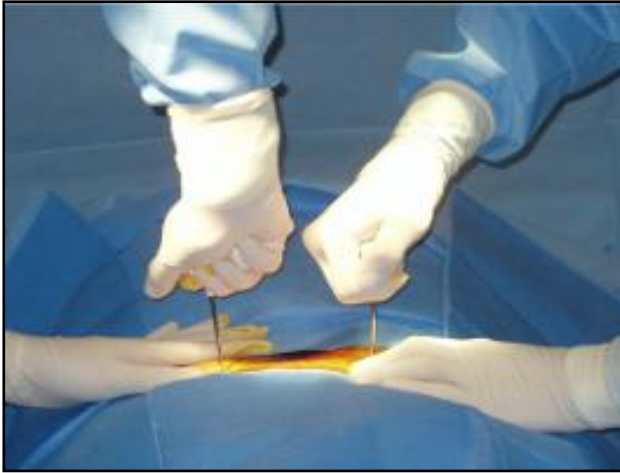
4.8. Odběr dřevné krve

Po důkladném interním, kardiologickém a anesteziologickém vyšetření byl v analgosedaci na chirurgickém operačním sále proveden odběr kostní krve ze zadní horní hrany lopaty kyčelní kosti v epidurální anestézii (obr. 3a, 3b, 3c). Odběr byl prováděn kvalifikovaným hematologem. Porce odebrané kostní krve z jednotlivých punkčních míst/etází nepřesahovala 4 ml kostní krve. Náběr se prováděl vždy do injekční stříkačky předplněné 1 ml isotonického roztoku NaCl s 20 IU heparinu na 1ml. Odebrané porce se shromažďovaly v odběrovém setu Bone Marrow Collection Kit with Pre-Filter and Inline Filters (Baxter R4R2107). Při zachování odběrových objemů jednotlivých porcí (1ml roztoku + 4 ml kostní krve) bylo odebráno v průměru 400 ml roztoku kostní krve s heparinem. Jde o množství, které se běžně odebírá dárčům krve na transfusních stanicích, odebraný volum byl hrazen krystaloidy, u žádného pacienta nedošlo po odběru k projevům ischemie jakéhokoli orgánu a u žádného z nich nebylo nutno podat transfusi. Sběrný vak na konci setu R4R2107 se po skončení odběru uzavřel a celá soustava se při pokojové teplotě v transportním kontejneru byla dopravena k dalšímu zpracování (obr. 4).

Obrázek 3a- technika odběru kostní dřevě



Obrázek 3b



Obrázek 3b



Obrázek 4



4.9. Zpracování kostní krve a příprava suspenze jaderných buněk

K celkovému objemu nesrážlivé kostní krve ve vaku se příslušným portem přidal Gelofusin (B. Braun, Melsungen AG) v objemu 25% celkového objemu kostní krve. Manipulace i následná sedimentace erytrocytů probíhala v laminárním boxu Biohazard. Po sedimentaci erytromasy v průběhu několika desítek minut se supernatant bohatý na jaderné buňky převedl pomocí plasmaextraktoru do transferového vaku. Přes Sampling site coupler EMC1401 (Barter) se sterilně odebral vzorek ke zjištění počtu jaderných buněk a centrifugací s následnou úpravou objemu pomocí plasmaextraktoru se adjustovala koncentrace jaderných buněk na cílový objem. Po odstranění kontaminujících erytrocytů se použila standardní gradientová centrifugace na HISTOPAQUE- 1077 (Sigma) s následným trojím promytím v PBS a 5% LSA a závěrečným převedením do autologní plazmy za současné adjustace na cílovou koncentraci jaderných buněk. Provedl se také odběr vzorku na kontrolu sterility, fenotypizaci jaderných buněk průtokovou cytometrií a kultivační hodnocení. Cílová koncentrace jaderných buněk v roztoku byla cca 10^8 /ml. Po zpracování byl vzorek rozdělen na dvě stejné části. Jedna byla zamražena standardním způsobem programovaného mražení pomocí přístroje IceCube 1810, Sylab-Austria, druhá byla ponechána v uzavřeném systému transportního vaku až do vlastní aplikace na katetrizační jednotce.

4.10. Provedení implantace kmenových buněk

Po provedené DSA do bočního vstupu 4F pouzdra zavedeného do tepny byly aplikovány pomocí perfuzoru ASCUS 200 rychlostí 900 ml/hod autologní kmenové buňky v autologní plazmě (obr. 5a, 5b, 5c). Po aplikaci kmenových buněk byla provedena kontrolní angiografie. Nemocný byl pak převezen na angiologickou jednotku intenzivní péče, kde bylo odstraněno pouzdro z punktované tepny, naložena komprese na punktované třísko, kontrolován TK. Po 8 hodinách nemocný již mohl vstát a chodit. Následující den byly provedeny kontrolní hematologické a biochemické odběry a nemocný byl propuštěn do domácího léčení.

Obrázek 5a – punkce arteria femoralis k zavedení pouzdra



Obrázek 5b – intraarteriální implantace kmenových buněk



Obrázek 5c – použitý perfuzor k implantaci kmenových buněk

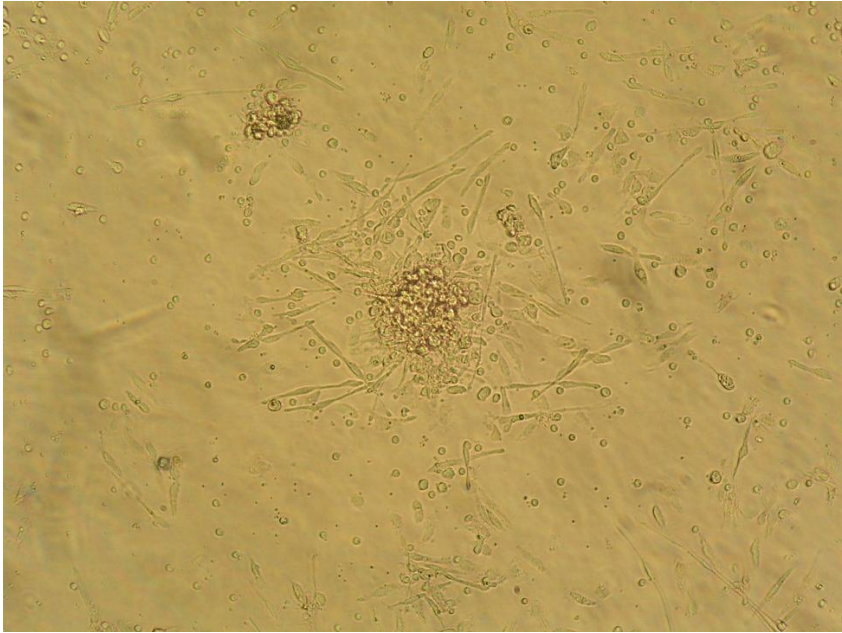


5. Sledování angiogenních prekurzorů v krvi a kostní dřeni

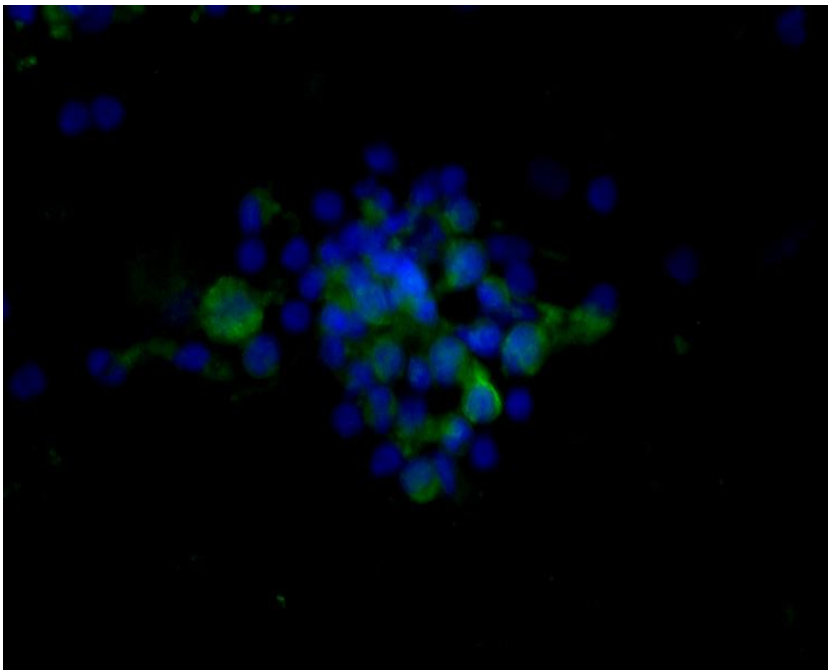
5.1. Stanovení endotelových kolonií pomocí CFU-Hill eseje

20 ml periferní či 10 ml dřeňové krve bylo centrifugováno na rozhraní Ficoll-Histopaque za účelem získání mononukleární frakce. Tato frakce pak byla studována pomocí kultivace angiogenních prekurzorů metodou vyvinutou Hillem (16) a standardizovanou firmou StemCell Technologies (Vancouver, Kanada) jako test Endocult™. Vždy 10×10^6 mononukleárních buněk získaných separací na Ficoll-Histopaque bylo resuspendováno ve 4 ml kompletního média Endocult™ a nasazeno do dvou jamek 6-jamkových kultivačních destiček pokrytých želatinou. Po 48 hodinách byla neadherentní frakce z každé jamky stažena a bez výměny média rozesazena po 10^6 mononukleárních buněk do dvou jamek 24-jamkových destiček potažených fibronektinem. Celkem tedy byly z původního množství 10×10^6 mononukleárních buněk nasazeny čtyři jamky, z nichž každá obsahovala 10^6 buněk v příslušném množství kultivačního média. Za dalších 72 hodin proběhl odečet kolonií, označovaných jako CFU-Hill. Jako endotelové kolonie byly hodnoceny pouze shluky minimálně 20 buněk s kulatými buňkami uprostřed a elongovanými buňkami na okrajích (viz. obr 6). Endotelový fenotyp kolonií byl v některých případech sledován imunofluorescenční detekcí antigenů CD31, VEGFR-1 a VEGFR-2, von Wildebrandtova faktoru a vazby lektinu Ulex Europaenus (viz obr 7). Validita testu byla ověřována souběžným vyšetřováním zdravých dobrovolníků.

Obrázek 6 – typická endotelová kolonie CFU-Hill



Obrázek 7 – pozitivita na endotelový antigen CD31 (zelená fluorescencence, jádra dobarvená, DAPI – modrá fluorescence)



5.2. Průtoková cytometrie

Byl používán následující panel protilátek: PE-CD34 (BD), biotinylovaný antiKDR+FITC-značený streptavidin (Sigma), CD133 (Milténiy), CD62E (E-selectin, BD), CD144 (VE-cadherin, BD), CD31 (PECAM, BD), CD117 (c-kit, BD), vWF (BD). Množství buněk pozitivních na endotelové markery bylo vyjadřováno v procentech buněk souběžně pozitivních na CD34.

5.3. Kultivace CFU-GM a BFU-E

Byly použity dvě metody kultivace CFU-GM a BFU-E.

A) Agarové kultury. CFU-GM byly kultivovány v kompletním médiu kondiciovaném buněčnou linií karcinomu močového měchýře 5637. Vždy 1×10^6 jaderných buněk bylo rozředěno v kompletním médiu pro růst CFU-GM na celkový objem 4,5 ml. K tomuto roztoku bylo přidáno 0,5 ml 0.33% roztoku agaru ve vodě a vždy 1 ml tohoto roztoku byl pipetován do tří jamek v 6-jamkových miskách (TTP). Po týdnu kultivace byly počítány kolonie (více než 20 buněk) a shluky (4-20 buněk). Výsledný počet CFU-GM na 10^5 jaderných buněk byl vypočten z průměrného počtu kolonií a shluků na třech miskách.

B) Metylcelulóзовé kultury. 1×10^6 jaderných buněk bylo rozředěno v 5 ml kompletního média (IMDM + 30% fetální telecí sérum + 1.3% metylcelulózy + SCF 50 ng/ml + erythropoetin 4 U/ml) a pipetováno po 1 ml do 3 jamek 6-jamkových misek (TPP). CFU-GM a BFU-E byly rozlišovány morfologicky a spočteny po dvou týdnech kultivace.

5.4. Kultivace mezenchymových progenitorových buněk

Vždy 7.5×10^6 jaderných buněk v IMDM bylo nasazeno do jedné 75 cm² kultivační láhve s prodyšným filtrovaným uzávěrem a 10^5 do jedné Petriho misky o průměru 100 mm. Obě nádoby byly doplněny 10 ml kompletního kultivačního média (0-MEM s 20% fetálního telecího séra, 100 u/ml penicilínu, 1000 ug/ml streptomycinu a 2 mM L-glutaminu), po 24 hodinách byly odstraněny neadherující buňky. Větší Petriho miska byla obarvena po 2 týdnech 0.5% roztokem krystalové violeti v metanolu.

Počet mezenchymových kolonií z 1. pasáže (CFU-F1) byl počítán manuálně, za kolonii byl pokládán shluk buněk o průměru alespoň 2 mm. V kultivační láhvi byly po 2 týdnech adherující buňky sklizeny inkubací s roztokem trypsin-EDTA. Tyto buňky pak byly rozesazeny v koncentracích 1,5 bb/cm², 3 bb/cm², 5 bb/cm² a 10 bb/cm² ke zjištění tvorby sekundárních kolonií (CFU-F2_1,5, CFU-F2_3, CFU-F2_5, CFU-F2_10). Po dvou týdnech byly tyto misky po opláchnutí PBS obarveny a zhodnoceny výše popsaným způsobem.

6. Statistické hodnocení

Ke srovnání kontinuálních proměnných bude použit parametrický Pearsonův a neparametrický Spearmanův korelační koeficient. Ověření statistické významnosti rozdílů mezi dvěma skupinami bylo provedeno neparametrickým Wilcoxonovým testem a ověření významnosti rozdílů mezi více skupinami pak neparametrickou verzí testu ANOVA s post-hoc Dunnovým srovnávacím testem nebo testem pro trend.

7. Cílové ukazatele

Primárním cílovým ukazatelem je zjistit účinnost léčby kmenovými buňkami u pacientů s chronickou kritickou ischemií, účinnost léčby je měřena změnami ischemického stupně dle Fontainovy klasifikace, hojení trofických defektů, frekvence selhání léčby definované jako vysoká amputace, kardiovaskulární příhoda (mozková příhoda, infarkt myokardu) a úmrtí z jakýchkoli příčin

Sekundárním cílovým ukazatelem je bezpečnost procedury, zlepšení kolaterálního řečiště měřené angiograficky, zlepšení prokrvení končetiny měřené ABI a $TcpO_2$, zlepšení kvality života

8. Výsledky

Primární cílové ukazatelé.

Po roce sledování byli všichni pacienti živí. Dle hodnocení stupně ICHDK se podařilo převést do stadia klaudikací (IIb dle Fontaina) 22 (84,6%) nemocných. U 2 (7,6%) pacientů i když došlo ke zhojení defektu, přetrvávaly klidové bolesti, které ale lépe reagovaly na analgetickou léčbu než před implantací kmenových buněk. Ke zhojení defektu došlo v 11 ze 14 případů (78,9%) během prvního roku. Velkou amputaci končetiny (ve stehně) podstoupili do 3 měsíců po implantaci 2 pacienti (pacienti s klidovou bolestí nereagující na analgetika). 3 pacienti prodělali amputaci (gangréna). Během léčby a následující rok žádný pacient neprodělal infarkt myokardu nebo cévní mozkovou příhodu. Po 2 letech zemřela jedna pacientka z důvodu nesouvisejících s aterosklerózou. U 2 nemocných přetrvával defekt (i když zmenšen) i po roce léčby.

Sekundární cílové ukazatelé.

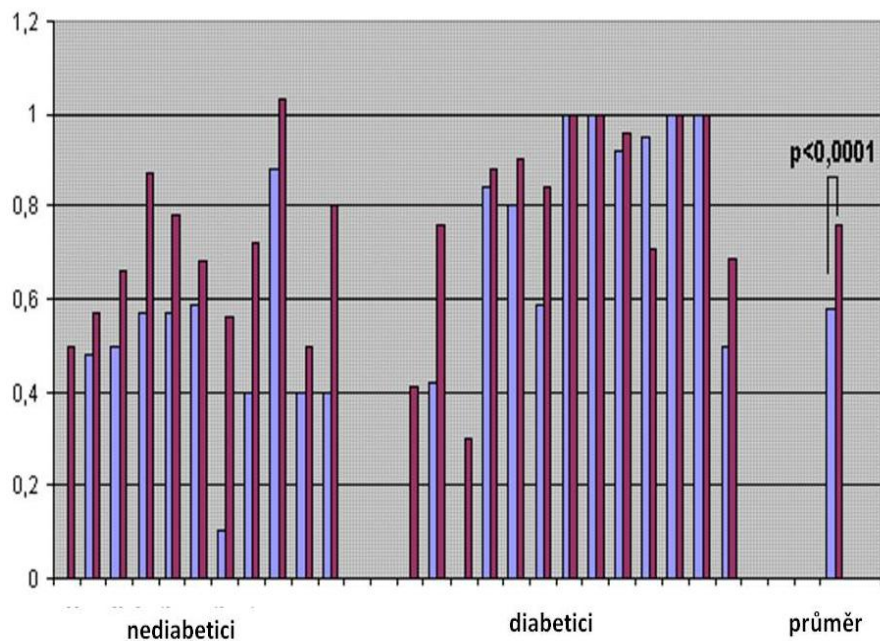
Bezpečnost léčby.

Léčba byla pacienty velmi dobře tolerována. V našem souboru jsme zaznamenali u jednoho pacienta větší hematom v místě punkce po odběru dřeně, ale bez potřeby krevního převodu. Ani u jednoho pacienta nedošlo k významnému poklesu hemoglobinu

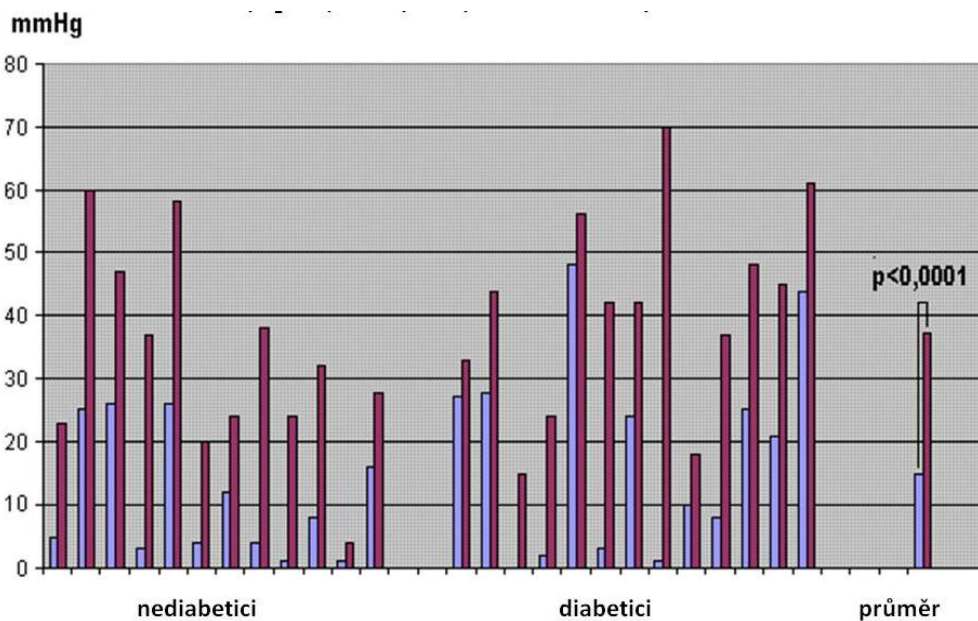
Změny v prokrvení končetiny měřené ABI (AAI) a $TcpO_2$

V souboru došlo k vzestupu průměrných hodnot ABI z 0,54 na 0,67 , stejně tak došlo k vzestupu průměrných hodnot $TcpO_2$ z 14,9 na 37,2 mmHg. Oba vzestupy jsou statisticky významné ($p < 0,0001$) (graf 1 a 2). Vzhledem k tomu, že oba tyto testy odrážejí prokrvení dolních končetin, byla mezi nimi zjištěna předpokládaná signifikantní korelace (Spearmanův test, $r = 0,31$, $p = 0,038$), která však (vzhledem k mediokalcinóze tepen u diabetiků, která znehodnocuje ABI test) byla signifikantní pouze u pacientů bez diabetu mellitu (Spearmanův test, $r = 0,53$, $p = 0,009$ u nediabetiků, $r = 0,11$, $p = 0,58$ u diabetiků - graf 3-5).

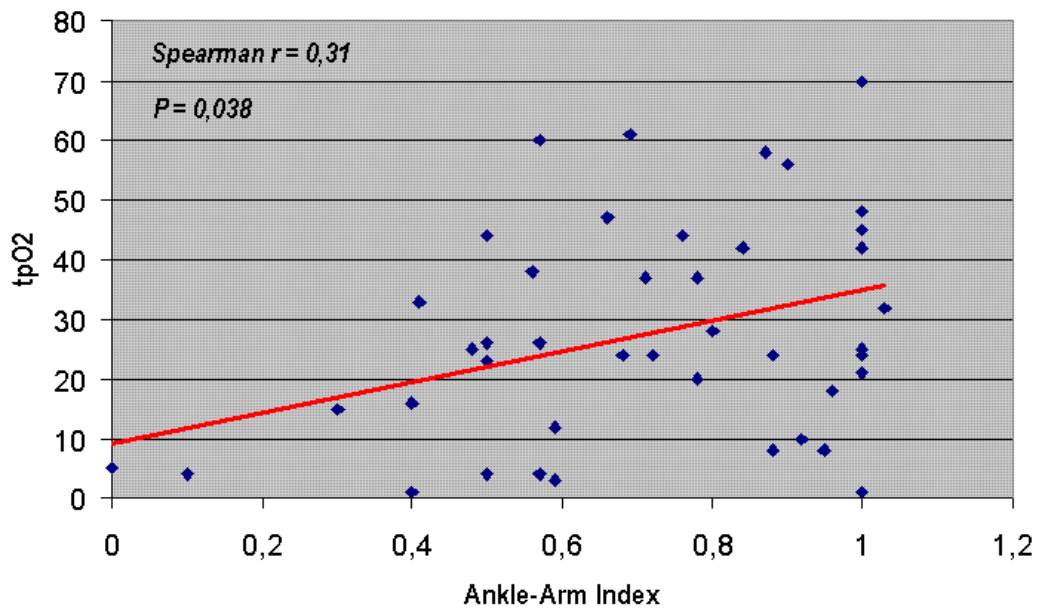
Graf 1 – AAI před (modré sloupce) a po (fialové sloupce) implantaci kmenových buněk



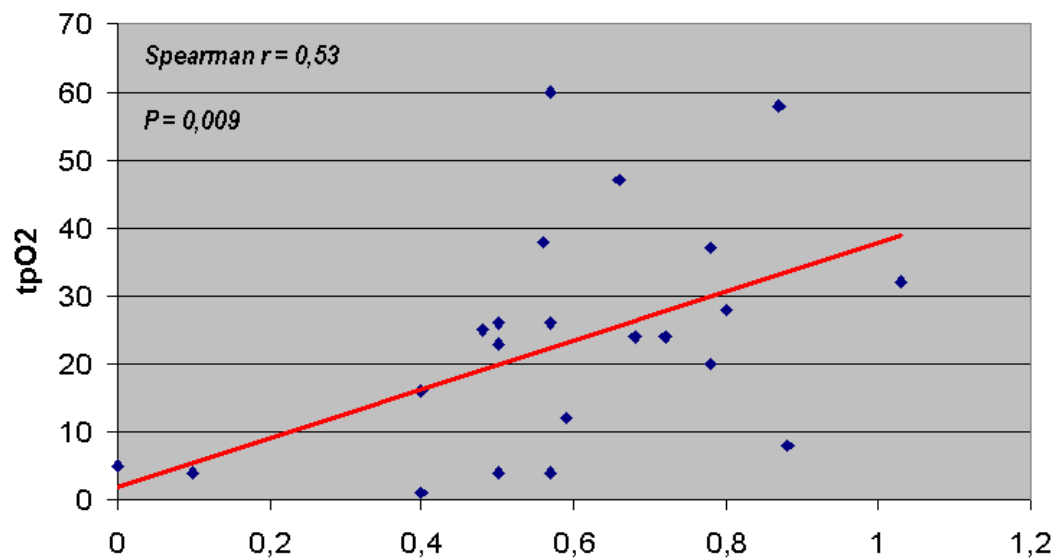
Graf 2 TcpO₂ před a po implantaci kmenových buněk



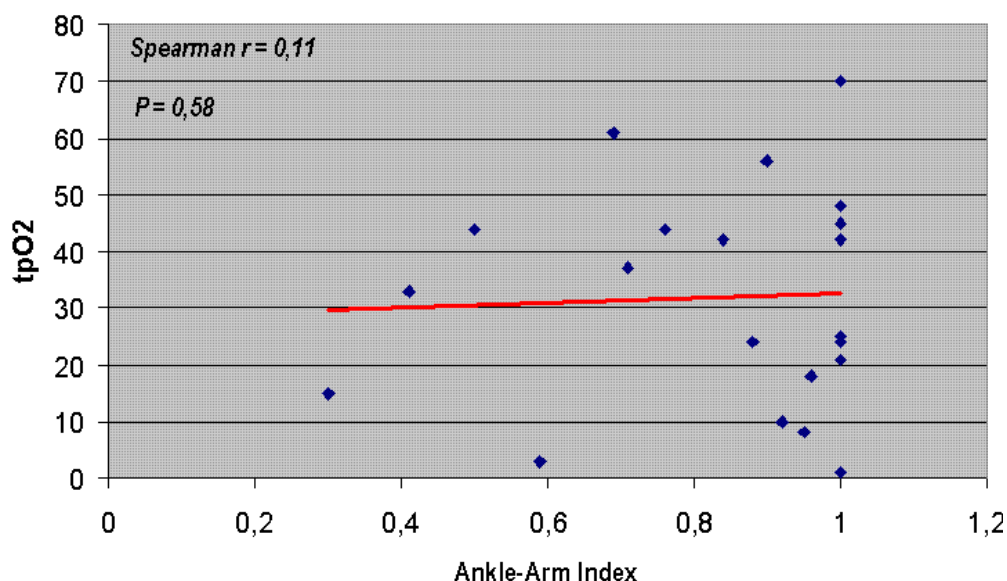
Graf 3 – korelace AAI a tpO₂ u všech pacientů



Graf 4 – korelace AAI a tpO₂ u nediabetiků



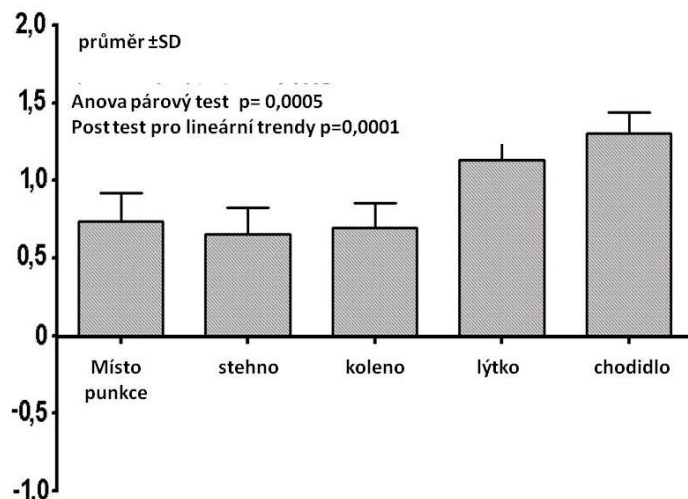
Graf 5 – korelace AAI a tpO₂ u diabetiků 2. typu



Angiografické nálezy.

slepé hodnocení angiografických nálezů ukázalo, že rok po implantaci dřeňových buněk došlo ke zlepšení angiografického nálezu ve všech sledovaných úsecích, přičemž dle předpokladu největší zlepšení bylo pozorováno v distálních částech končetiny (lýtka a nohy). Zatímco v místě punkce došlo ke zlepšení v průměru o 0,732 bodu kvantitativní škály, příslušné hodnoty ve stehně, v kolenu, v lýtku a v noze byly 0,652, 0,692, 1,13 a 1,3 ($p < 0,0001$, opakovaný test ANOVA s post-hoc testem pro trend – graf 6). Nebyla zjištěna žádná korelace mezi zlepšením angiografického nálezu a počtem implantovaných progenitorů. Zlepšení průměrného angiografického nálezu korelovalo jak s Fontainovým hodnocením ICHDK před léčbou, tak i s hodnocením ICHDK po léčbě, avšak nikoli s průměrnou změnou Fontainova hodnocení. Toto znamená, že implantace progenitorových buněk způsobovala zlepšení angiografického nálezu a Fontainova hodnocení jak u pacientů se stupněm IV, tak u pacientů se stupněm III a že výsledný benefit byl pro obě tyto skupiny pacientů stejně dobrý.

Graf 6 – angiografické změny po implantaci kmenových bb

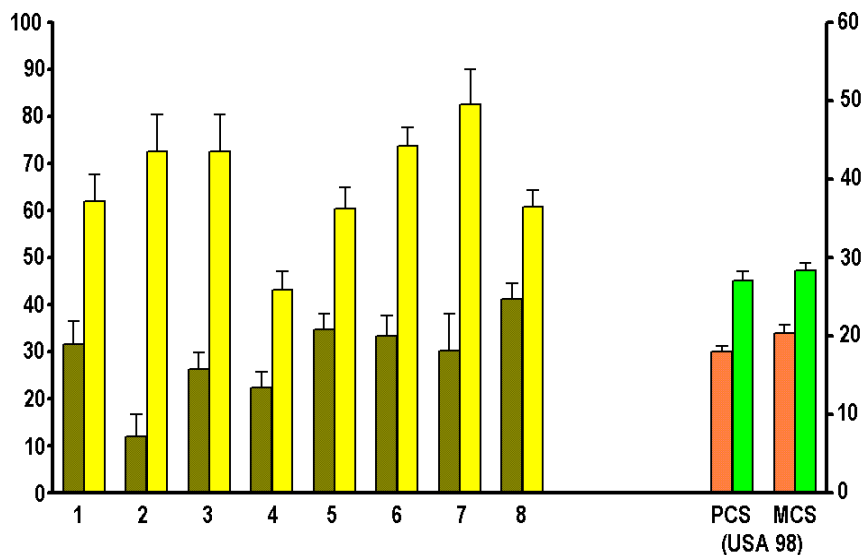


Hodnocení kvality života

Zhodnotili jsme dotazníky kvality života (SF-36) u pacientů před implantací kmenových buněk a po léčbě podle skórovacích vzorců daných pro tento dotazník. Výsledky pak byly statisticky zpracovány pomocí signed rank testu. Bylo zjištěno signifikantní zlepšení kvality života u všech pacientů po léčbě kmenovými buňkami, a to ve všech osmi modalitách hodnocených v dotazníku SF-36 ($p<0,0001$) – graf 7. Dále jsme z osmi vypočtených hodnot stanovili kompozitní skóre fyzické kvality života (PCS, physical composite score) a mentální kvality života (MCS, mental composite score). Obě hodnoty (PCS i MCS) byly signifikantně zlepšeny u pacientů po léčbě kmenovými buňkami. Kompozitní skóre fyzické kvality života korelovalo se změnami stupně ICHDK dle Fontainovy klasifikace, zatímco korelace s kompozitním skóre mentální kvality života nebyla zjištěna.

Graf 7 – změny kvality života před a po implantaci kmenových buněk

P < 0,0001 pro všechna srovnání



Popis grafu Kvalita života:

Z každé dvojice: levý sloupec – před léčbou, pravý sloupec – rok po léčbě

1 = fyzická funkce

2 = omezení rolí pro fyzické problémy

3 = omezení rolí pro emoční problémy

4 = omezení sociálních funkcí pro fyzické nebo emoční problémy

5 = fyzická bolest

6 = všeobecné vnímání duševního zdraví

7 = vitalita

8 = všeobecné vnímání vlastního zdraví

Minimum = 0, maximum = 100

PCS = physical composite score

MCS = mental composite score

vztaženo ke zdravé populaci USA (průzkum z r. 1998),
průměr zdravé populace = 50

9. Rozbor pacientů

A) Z hlediska klinického nejlépe na léčbu reagovali nemocní s trombangiitis obliterans (TAO). Šlo o 4 nemocné ve věku 26, 40, 47 a 49 let. U nich jsme zaznamenali rychlé zhojení defektu resp. ústup klidových bolestí, vynechání analgetické léčby a přechodu do stadia klaudikací. Tato poměrně rychlá změna byla pacienty vnímána zpočátku pozitivně, nicméně omezující klaudikační obtíže byly následně vnímány negativně i přesto, že došlo u nemocného k záchraně končetiny. Tento fakt ovlivňoval u nemocných subjektivní hodnocení ročního efektu léčby při vyplňování dotazníku kvality života. Data se shodují i s recentně publikovanou studií PROVASA, kde pacienti s tímto typem postižení reagovali na léčbu kmenovými buňkami nejlépe. Také angiografické hodnocení byly těchto pacientů příznivé, zlepšení nadprůměrné.

B) Pacientka 8 AH měla při vstupu do studie vlhkou gangrénu distální poloviny nártu, byla jí navržena vysoká amputace ve stehně, kterou odmítla a souhlasila s implantací kmenových buněk jako pokus o záchranu končetiny. Po aplikaci kmenových buněk došlo postupně k demarkaci a mumifikaci gangrény, která byla chirurgicky snesena. Po celou dobu našeho sledování byla nemocná imobilní, většinu dne pobývala na lůžku, takže rozvoj kolaterál pohybovým režimem byl zcela vyloučen. Analgetika užívala jen sporadicky. Defekt byl léčen lokálně pravidelnými převazy a především se snahou eradikovat event. infekci. Při kontrolní angiografii byl patrný rozvoj kolaterálního řečiště a také byla zřejmá i mohutná granulace defektu s okrajovou epitelizací a postupným zmenšováním defektu. Nicméně k definitivnímu zhojení nedošlo. Nemocná se začala pohybovat v chodítku. Stav pahýlu končetiny se dále zlepšoval. Po dvou letech od léčby došlo u nemocné k fraktuře krčku femuru a nemocná zemřela na důvody, které neměly souvislost s kardiovaskulárním onemocněním.

C) Pacient 15 JL byl nemocný sužovaný recidivujícími erysipely a nehojícími se defekty po amputaci prstu. Po implantaci buněk došlo nejen ke zhojení defektů po amputaci, ale i k remisi recidiv erysipelu.

D) Nemocní s velkou amputací končetin. U první nemocné šlo o rozsáhlou gangrénu nohy s reaktivním zánětem zachovalých tkání. I přes léčbu antibiotiky došlo k rozvoji infekce, lymfangoiitidy a následně sepse s algickým syndromem, bylo nutné u nemocné přistoupit z vitální indikace k provedení amputace. Druhý nemocný si pro přetrvávající fantomové bolesti v defektu na noze po snesení gangrény sám vyžádal provedení vysoké amputace.

10. Eskalační studie bezpečnosti a účinnosti podávání erythropoetinu u pacientů s ICHDK

V rámci studie jsme předpokládali provedení eskalační studie bezpečnosti a účinnosti podávání erythropoetinu u pacientů s ICHDK třem skupinám po 4 pacientech v eskalovaných dávkách. Původně plánovaný G-CSF nebyl v době konání studie pro uvedené účely dostupný především z logistických důvodů, kterým bylo předávání distribuce preparátu mezi dvěma firmami a nemožnost získání klinických vzorků. V roce 2005 byl otištěna v N Engl J Med studie, která prokázala, že dlouhodobě podávaný erythropoetin se chová jako angiogenní faktor, který může indukovat vznik diabetické retinopatie, resp. jí může zhoršit. (28, 29) Jelikož v našem souboru je >50% nemocných s diabetem, nechtěli jsme tyto nemocné vystavit tomuto riziku onemocnění, resp. jeho zhoršení, které by mohlo vést až ke ztrátě visu.

11. Intravenózní léčba alprostadilem (Prostavasin®, Schwarz Pharma A.G., Mannheim, Německo)

Dle současných znalostí je možné provádět intravenózní léčbu alprostadilem následujícím způsobem: obsah 2 ampule (odpovídá 40 mg alprostadilu) se rozpustí v 50-250 ml fyziologického roztoku a infunduje se intravenózně po dobu 2 hodin. Tato dávka se aplikuje 2 krát denně. Alternativně je možné i.v. podávat také 1 krát 3 ampulky alprostadilu (odpovídá 60 mg alprostadilu) v 50-250 ml fyziologického roztoku po dobu 3 hodin. Po třítydenní léčbě alprostadilem je nutné rozhodnout, zda jsou další infuze klinicky indikovány. Pokud nebylo dosaženo terapeutického úspěchu, má být léčba ukončena. Celková doba léčby by neměla přesáhnout 4 týdny. Nadějně se zdálo jednání s firmou Schwarz Pharma, která měla záměr provést u nás studii s 4týdenním podáváním tohoto preparátu, ale vše selhalo na zajištění nemocničního lůžka (jeho proplacení pojišťovnou) na celou dobu podávání.

Po zařazení 10 pacientů do studie bylo u 3 z nich nutné přistoupit k amputaci a 1 nemocný zemřel. Průběžné výsledky transplantovaných pacientů byly tak výrazně lepší, že jsem léčbu alprostadilem ukončili. Výsledky mohly být způsobeny špatným výběrem nemocných, ale i nedostatečně dlouhou léčbou alprostadilem. Jelikož jsme nedokázali zajistit pro randomizované pacienty optimální dávkování a délku léčby alprostadilem doporučené výrobcem, od další randomizace jsme ustoupili, aby nedošlo ke zkreslení výsledků studie. Provedli jsme jen rozbor nemocných s CHKKI léčených alprostadilem na naší klinice od 1.1. 2004 do 31.12. 2006. Soubor tvořilo 21 pacientů (14 mužů a 7 žen). Stupeň ICHDK III dle Fontaina splňovalo 9 (42,9%) pacientů, stupeň IV 12 (57,1%) pacientů. Průměrný věk souboru byl 63,1 let (47-82). 12 (57,1%) pacientů se léčilo pro diabetes mellitus, 12 (57,1%) pacientů pro ICHS, 16 (76,2%) pacientů pro hypertenzi, 2 (9,5%) pacienti pro TAO, u 13 (61,9%) pacientů byla zjištěna porucha metabolismu lipidů, 7 (33,3%) pacientů mělo v anamnéze cévní mozkovou příhodu, 12 (57,1%) pacientů bylo stále aktivními kuřáky. Alprostadil byl aplikován za hospitalizace 2x denně 2 amp v 250 ml fyziologického roztoku. Pro přetrvávající bolesti,

progresi gangrény byl u 8 (38,1%) pacientů proveden revaskularizační výkon jako pokus o záchranu končetiny. Do 1 roku byla provedena amputace u 9 (42,9%) pacientů, 1 (4,7%) pacient zemřel do 1 roku, v průběhu následujícího roku další 2 (9,5%) pacienti. Ve sledovaném souboru bylo v průměru podáno 36 ampulí/ na pacienta (8-108). Množství mohlo být zkresleno přerušением léčby z důvodu buď záchrany končetiny ještě revaskularizací nebo nutností provedení amputace, ale především limitací revizním lékařem.

Frekvence primárních endpointů (velká amputace či úmrtí v důsledku aterosklerózy) je statisticky signifikantně vyšší než ve skupině nemocných s transplantací ($p = 0,05$, pravděpodobnost úmrtí či amputace 6,5x vyšší ve skupině s alprostadilem (95% interval spolehlivosti, 1,00-42,5).

Dle zkušeností z našeho souboru je léčba alprostadilem u nemocných s ICHDK v ČR nedostatečná, všeobecně poddávkována a přes značné náklady často nevede ke zlepšení stavu končetiny.

Naše zjištěná data jen potvrdila epidemiologické údaje pacientů s chronickou kritickou ischémií dolních končetin. CHKKI vznikne přibližně u 1% mužů starších 55 let a představuje nejen ohrožení končetiny, ale i ohrožení života nemocného. Za rok po stanovení diagnózy chronické kritické ischémie dolních končetin prodělá 25% nemocných amputaci nad kolenem, 20% zemře a pouze 55% bude žít s oběma končetinami. U diabetiků je minimálně 5krát vyšší riziko pro vznik kritické ischémie než u nediabetiků. Diabetici druhého typu mají 20krát častěji postiženy končetinové tepny ve srovnání s odpovídající nediabetickou populací a častěji mají postiženy tepny v oblasti pod kolenem. Riziko amputace končetiny je u diabetiků 10-20krát vyšší oproti nediabetikům. Amputace končetiny vyhlídky této skupiny nemocných dále zhoršuje. Perioperační mortalita amputací pod kolenem činí 5-10% a nad kolenem 15-20%. Do dvou let po amputaci zemře 25-30% nemocných a do pěti let 50-75%. Po dvou letech je plně mobilních jen 40% pacientů, kteří podstoupili amputaci jedné končetiny, 15% musí podstoupit amputaci i u kontralaterální končetiny a u dalších je nutná vyšší amputace (1).

12. Další cíle:

12.1. Zjištění optimálních poměrů buněčných populací podílejících se na terapeutickém efektu autologní transplantace

V rámci projektu jsme zkoumali korelace kultivací endotelových kolonií z periferie a ze dřeně s počtem mezenchymových (fibroblastových) kolonií z periferie a ze dřeně, s počtem implantovaných CFU-GM a BFU-E, s počtem implantovaných CD34+ buněk a s počtem cirkulujících endotelových buněk. Tyto údaje jsme pak srovnávali se vstupními údaji (věk, přidružená onemocnění) a s výsledky terapie (angiografické změny, kvalita života, změna klasifikace ICHDK dle Fontaina).

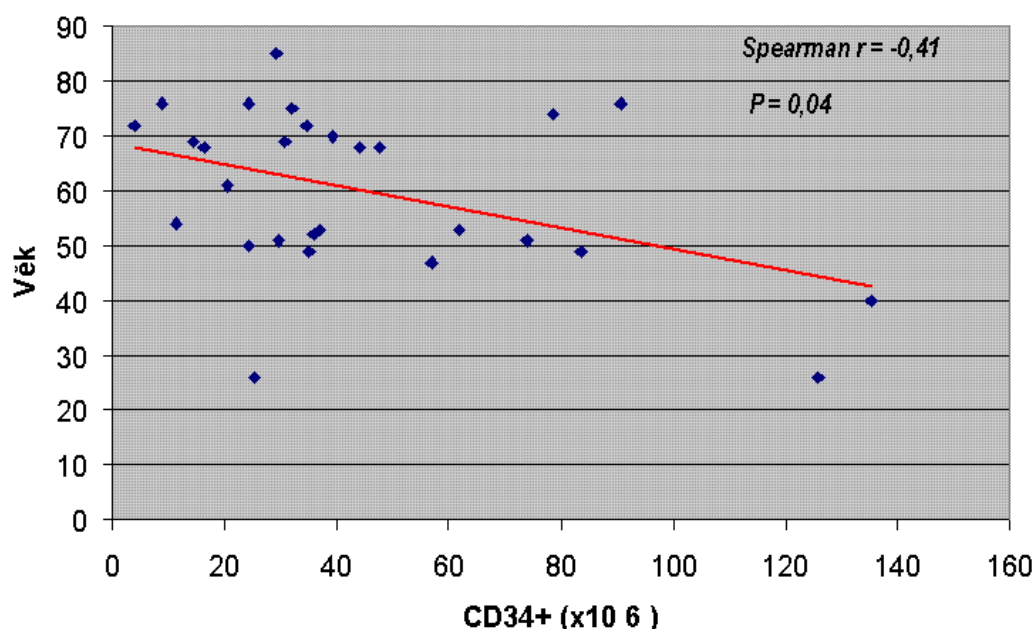
Zjistili jsme signifikantní negativní korelaci počtu implantovaných CD34+ buněk a BFU-E s věkem pacienta ($r = -0,41$ a $-0,44$, $p = 0,04$ a $0,03$ – Graf 7 a 8, dále nižší množství infundovaných CD34+ buněk u pacientů se souběžnou (medián, 27×10^6 v. 53×10^6 u pacientů bez ICHS, $p = 0,019$) a nižší procento CD34+ progenitorů v produktu (avšak nikoli nižší množství implantovaných CD34+ buněk) u pacientů s hyperlipidemií (medián, $0,64\%$ v. $0,77\%$ u pacientů bez hyperlipidémie, $p = 0,03$). Tyto výsledky svědčí pro pokles dřeňových progenitorů jak v důsledku věku, tak v důsledku přidružených onemocnění, podobně jako to popsal Hill pro cirkulující endotelové kolonie (16).

Předpokládaným zjištěním byly pozitivní korelace mezi počtem infundovaných CD34+ buněk a počtem CFU-GM a BFU-E, které neuvádíme, protože jde o obecně známý fakt mnohokrát publikovaný. Na druhé straně jsme nezjistili žádné korelace mezi počtem CD34+ buněk či počtem CFU-GM a BFU-E s počtem mezenchymových kolonií a endotelových kolonií (CFU-F, resp. CFU-Hill), ať již ze dřeně, tak z periferie. Tento jev je vysvětlitelný tím, že ne všechny CD34+ buňky dávají vznik endotelovým prekurzorům a CFU-GM a BFU-E již s mezenchymovými, resp. endotelovými buňkami nemají nic společného. I tento fakt je tedy ve světle stávajících poznatků vysvětlitelný.

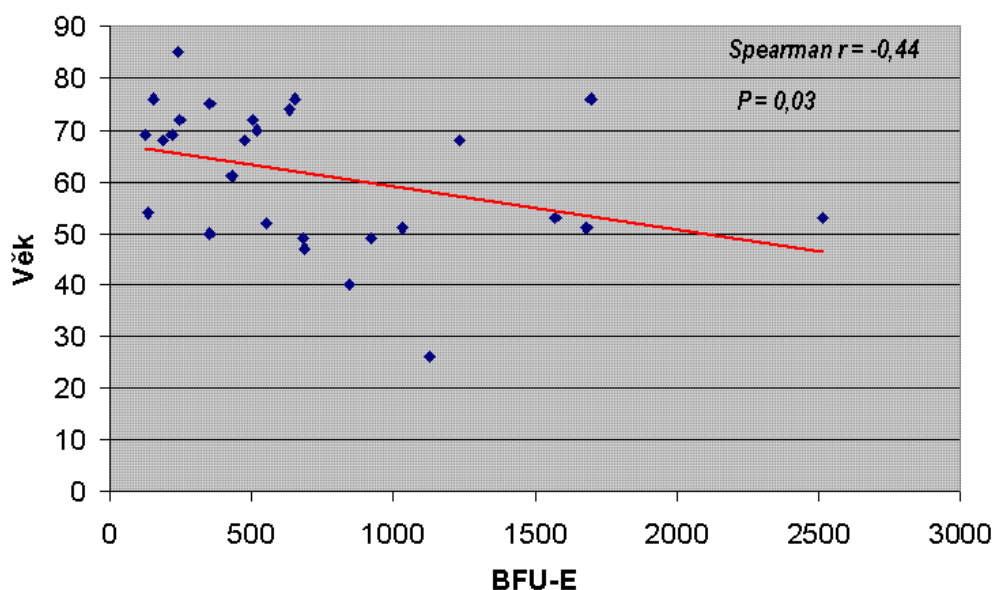
Nedokázali jsme si vysvětlit naprostý nedostatek korelace mezi flowcytometricky zjištěným počtem cirkulujících endotelových buněk a

kultivačně zjištěným počtem endotelových kolonií. Tento výsledek však získal na smysluplnosti díky recentní publikaci práce (26), která ukazuje, že CFU-Hill kolonie nejsou pravé endotelové kolonie, ale spíše kolonie endothel-like monocytů (27), mají na rozdíl od pravých endotelových buněk řadu hematopoetických znaků převážně nalézáných u buněk monocytární řady a jedná se tedy o rozdílné populace. Praktický význam tohoto zjištění je nejasný, protože je prokázáno, že i tzv. endothel-like monocyty mohou hojit defekty intimy způsobené jejím experimentálním poškozením (28).

Graf 8 - korelace sebraných CD34+ buněk s věkem



Graf 9 – korelace sebraných BFU-E s věkem



12.2. Mobilizace angiogenních prekursorů do oběhu u pacientů s diabetem a bez diabetu.

Co se týče počtu endotelových kolonií v periférii a ve dřeni u pacientů s diabetem a bez diabetu, nezjistili jsme žádný významný rozdíl v souvislosti s tímto onemocněním, což mohlo být způsobeno nedostatečnou velikostí vzorku. Rozhodli jsme se tedy rozšířit soubor o pacienty s mikrovaskulárním postižením (tj. pacienty s ANCA-asociovanými vaskulitidami) a o pacienty na hemodialýze. Pacienti s mikrovaskulárním poškozením dle citovaných prací (9-11) mají více cirkulujících endotelových buněk (patrně apoptotického či nekrotického charakteru) než zdraví dobrovolníci. Jedna z uvedených prací ukázala, že pacienti s ANCA-asociovanými vaskulitidami mají rovněž zvýšené množství cirkulujících endotelových progenitorů (11). Pacienti s terminálním ledvinným selháním vyžadujícím hemodialýzu zase trpí mimořádně závažnou formou aterosklerózy, na které se může podílet jak nedostatek sekrece angiogenních faktorů včetně erythropoetinu, tak i hyperlipoproteinémie při nefrotickém syndromu.

Naše výsledky ukazují, že všechny tři sledované skupiny pacientů (tedy včetně pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin) mají výrazně sníženou mobilizaci angiogenních prekursorů do oběhu oproti zdravým

dobrovolníkům. Zjistili jsme, že pacienti s mikrovaskulárním poškozením nemají zvýšenou, ale naopak sníženou mobilizaci těchto prekurzorů do oběhu. Rozdíl mezi pacienty s ICHDK a s ANCA-asociovanou vaskulitidou nebyl statisticky významný, i když i zde bylo možno najít trend směřující k nižšímu počtu periferních endotelových kolonií u pacientů s mikrovaskulárním poškozením oproti poškození makrovaskulárnímu ($p = 0,09$).

13. Diskuse a závěrečný souhrn

Naše výsledky ukazují, že implantace dřevňových prekursorových buněk do ischemické končetiny zlepšuje jak objektivní, tak i subjektivní ukazatele hodnotící tíži poškození končetiny. Bylo zjištěno signifikantní zlepšení tvorby kolaterálního řečiště nejen v místě cévního uzávěru, ale i distálně od něho. Dále bylo zjištěno lepší prokrvení postižené končetiny pomocí ABI a TcPO₂ hodnot. Došlo ke zlepšení stadia Fontainovy klasifikace ICHDK na naprosté většině léčených končetin a došlo ke zhojení téměř 80% defektů. Současně jsme zaznamenali zlepšení kvality života pacientů jak ve všech jednotlivých parametrech sledovaných dotazníkem SF-36, tak i v kompozitních skóre PCS a MCS, udávajících fyzickou a mentální kvalitu života. Naše práce byla první publikovanou prací, která se v souvislosti s tématem implantace kmenových buněk u pacientů s chronickou kritickou končetinovou ischemií současně zabývala i problematikou kvality života.

Transplantace dřevňových progenitorů intraarteriální cestou je léčbou bezpečnou a dobře tolerovanou. S výjimkou jednoho krvácení grade II po odběru kostní krve jsme nepozorovali žádné časně ani pozdní nežádoucí účinky. Úmrtnost pacientů a procento vysokých amputací je nižší než předpokládané. Výsledky léčby pomocí transplantace progenitorových buněk jsou statisticky významně lepší než výsledky léčby alprostadilem, alespoň tak, jak je tato léčba praktikována v České republice. Na rozdíl od léčby alprostadilem nevyžaduje transplantace dřevňových progenitorů dlouhodobou hospitalizaci. V době publikace naší práce jsme byli první, kdo použili čistě intraarteriální cestu aplikace kmenových buněk u pacientů s chronickou kritickou končetinovou ischemií. V dostupné literatuře byla použita buď intramuskulární či kombinovaná intramuskulární a intraarteriální aplikace kmenových buněk.

Uvedená léčba zlepšuje objektivní parametry jako je ABI, TcPO₂, angiografický nálezn, kvalita života. U polymorbidních nemocných je to bezpečná metoda bez závažných nežádoucích účinků.

14. Použité zkratky

ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
G-CSF	růstový faktor stimulující tvorbu granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)
SCF	růstový faktor kmenových buněk (stem cell factor)
HMG-CoA	3hydroxy-3methyl-glutaryl-koenzym A
ABI, AAI	ankle-brachial index / ankle-arm index – index kotník paže
CHHI	chronická kritická končetinová ischemie
TAO	thrombangiitis obliterans
SF-36	short form quality of life questionnaire
TcpO ₂	transkutánní parciální tlak kyslíku
CD	označení povrchových molekul leukocytů (cluster of differentiation)
DSA	digitální subtrakční angiografie
HLA	human leukocyte antigen
F	French (jednotka pro označení průměru jehly či kanyly – 1 F ≈ 1/3 mm)
EPC	endoteliální progenitorové buňky (endothelial progenitors cells)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
iNOS	inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého
MCP	monocyte chemotactic protein
FGF	fibroblastový růstový faktor
PDGF	růstový faktor odvozený od destiček (platelet-derived growth factor)
HGF	hepatocytární růstový faktor
PIGF	placentární růstový faktor
PCS	physical composite score
MCS	mental composite score
CFU-GM	colony forming unit –granulocyte, macrophage
BFU-E	burst forming units- erythrocytes
CFU-F	colony forming unit-fibroblast

15. Literatura

1. Wolfe JH, Wyatt MG: Critical and subcritical ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1997, 3, p.578–582.
2. Rissanen TT, Vajanto I, Yla-Herttuala S: Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb—on the way to the clinic. *Eur J Clin Invest* , 2001, 31, p. 651–666.
3. Teik Kok Ho, Vineeth Rajkumar, MSc, Dame Carol Black, et al: Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis. *International Journal of Angiology*, 2005, 14, p.49–59 .
4. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J*, 1999, 18, p. 3964-3972.
5. Pugh CW, Ratcliffe PJ: Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.*, 2003, 9(6), p.677-684. Review.
6. Ito WD, Arras M, Scholz D, et al: Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am. J. Physiol*, 1997,42, H1255-H1265.
7. Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11, p. 73-911
8. . Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, 361(9351), p. 45-46.
9. Shi Q, Wu MH-D, Hayashida N, et al: Proof of fallout endothelization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg*, 1994, 20, p. 546-557.
10. Shi Q, Rafii S, Hong-De Wu M, et al: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998; 92:, p. 362-367.
11. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95, p.952-958.

12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS*, 2001, 98, p. 10344-10349.
13. Solovey A, Lin Y, Browne P et al: Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*, 1997, 337, p. 1584-1590.
14. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ et al: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348, p.593-600.
15. Kawaichi Y, Watanabe A, Uchida T, et al: Acute arterial thrombosis due to platelet aggregation in a patient receiving granulocyte colony-stimulating factor. *British Journal of Haematology*, 1996, 94, p. 413-416.
16. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al: HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, 108, p. 399-405.
17. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al: HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, 108, p. 391-397.
18. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Med*, 2001, 7, p. 430-436.
19. 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, p. 427-435.
20. Pomyje J, Živný J, Šefc L, et al: Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34+/CD133+ cells. *Eur J Haematol*, 2003, 70, p. 143-150.
21. Lederman R, Mendelsohn F, Anderson R, et al: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*, 2002, 359(9323), p-2053-8.
22. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, et al. Recommended

standards for reports dealing with lower extremity

ischemia: revised version. *J Vasc Surg*, 1997, 26, p. 517-38

23. Ubbink, DT, Jacobs, MJHM, Slaaf, DW: Can transcutaneous oximetry detect nutritive perfusion disturbances in patients with lower limb ischemia? *Microvasc. Research*, 1995, 49, p. 315-324

24. Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*, 1992, 30, p. 473-83

25. Olin JW, Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger`s disease). In: Loscalzo J, Creager MA, Dzau VJ, eds. *Vascular medicine*. 2nd ed. Boston:Little, Brown, 1996, p. 1033-1049.

26. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Eur J Vasc Surg*, 1992; 6 (Suppl. A), p. 1-32.

27. Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N and Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care*, 2001, 24, p. 1433-1437.

28. Lepantalo M, Matzke S. Outcome of unreconstructed chronic critical leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1996; 11, p. 153-157.

16. Obrazová dokumentace vybraných pacientů

Pacient 1. A.J.

A.B. Pacient po amputaci 1.prstu s defektem na hrotu 2.prstu (šipka) s klidovými bolestmi.

C.D. Stav po 1.roce, došlo ke zhojení defektu, ústupu klidových bolestí.



Angiografické vyšetření – pacient 1 A.J.
Vlevo vždy AG vyšetření před implantací kmenových buněk.
Vpravo po 1. roce.

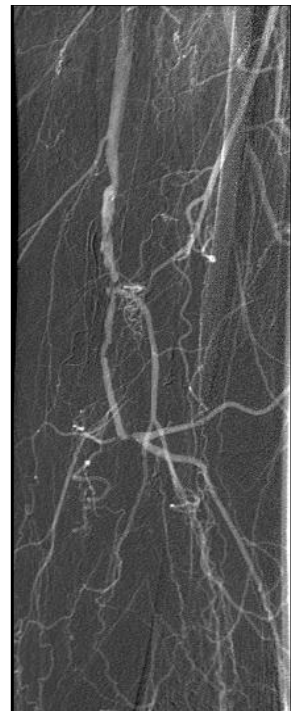
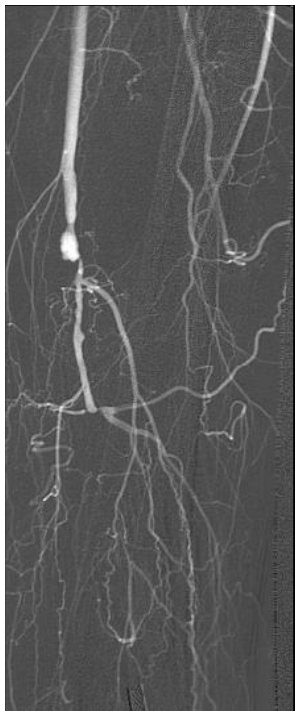
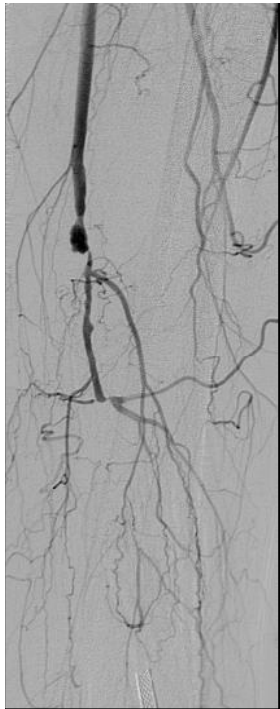


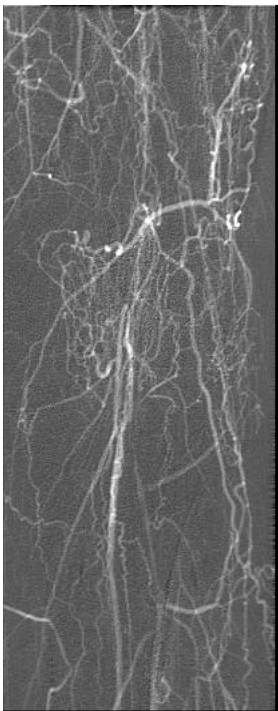
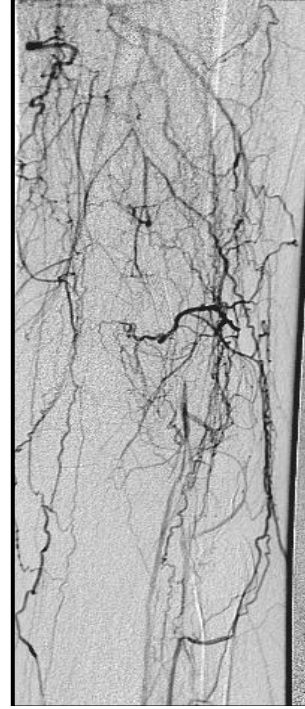
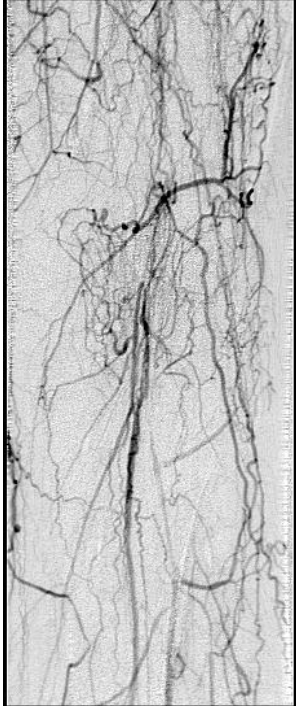
Před implantací

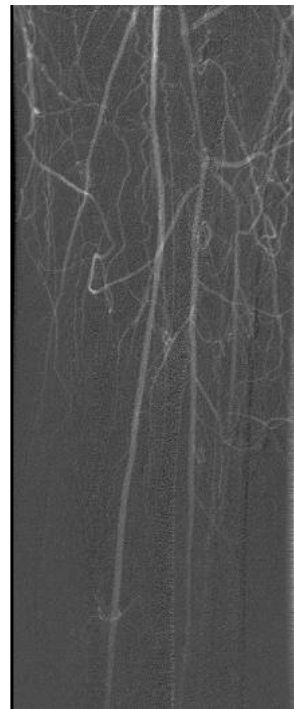
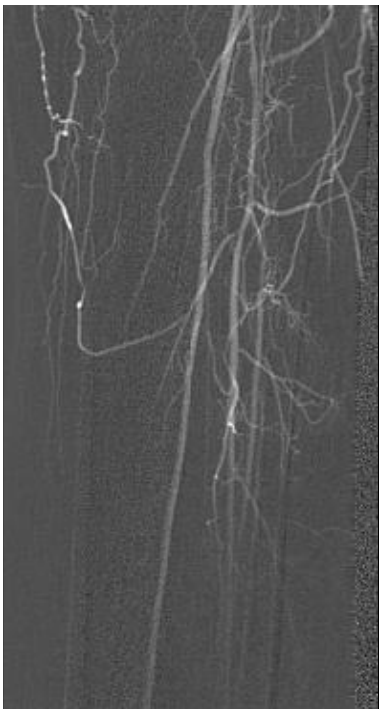
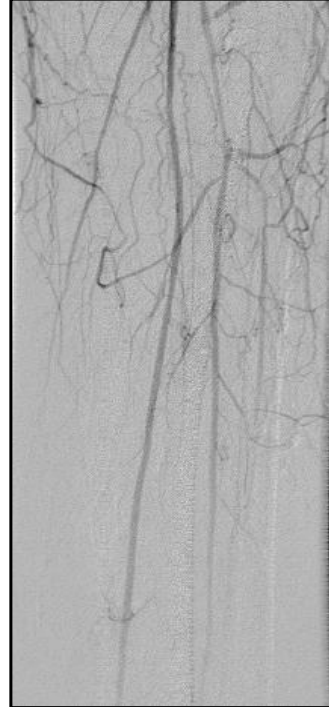


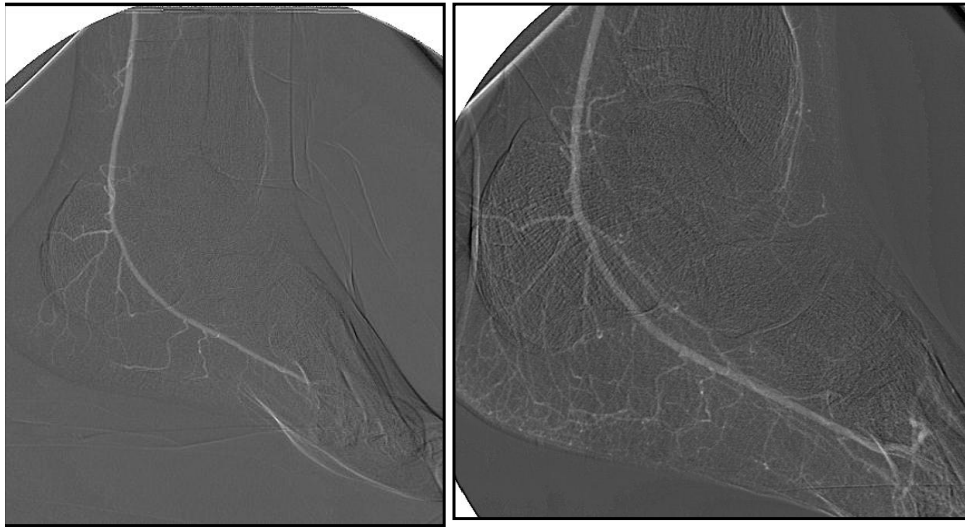
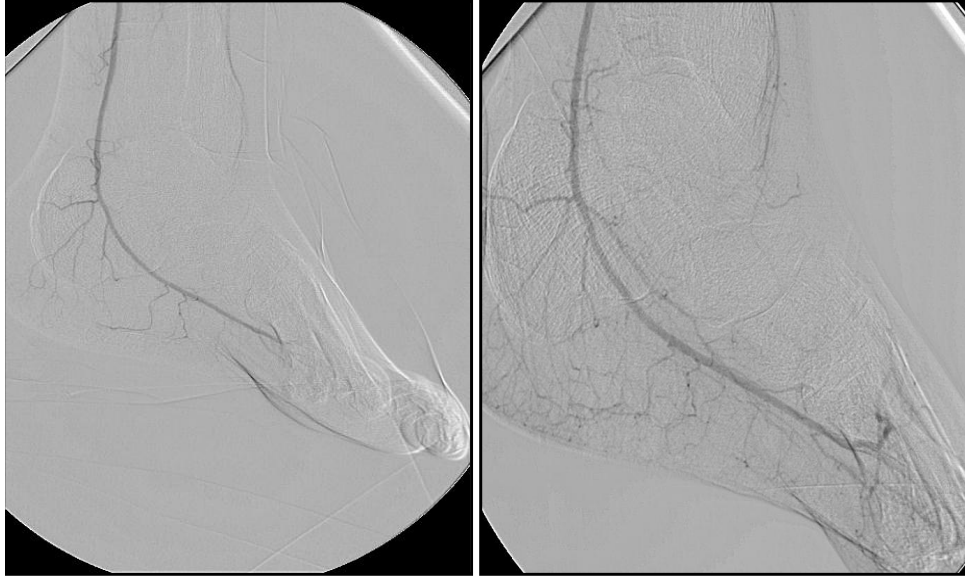
Po 1.roce







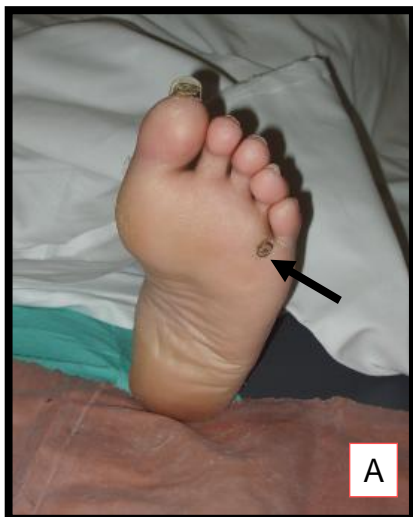




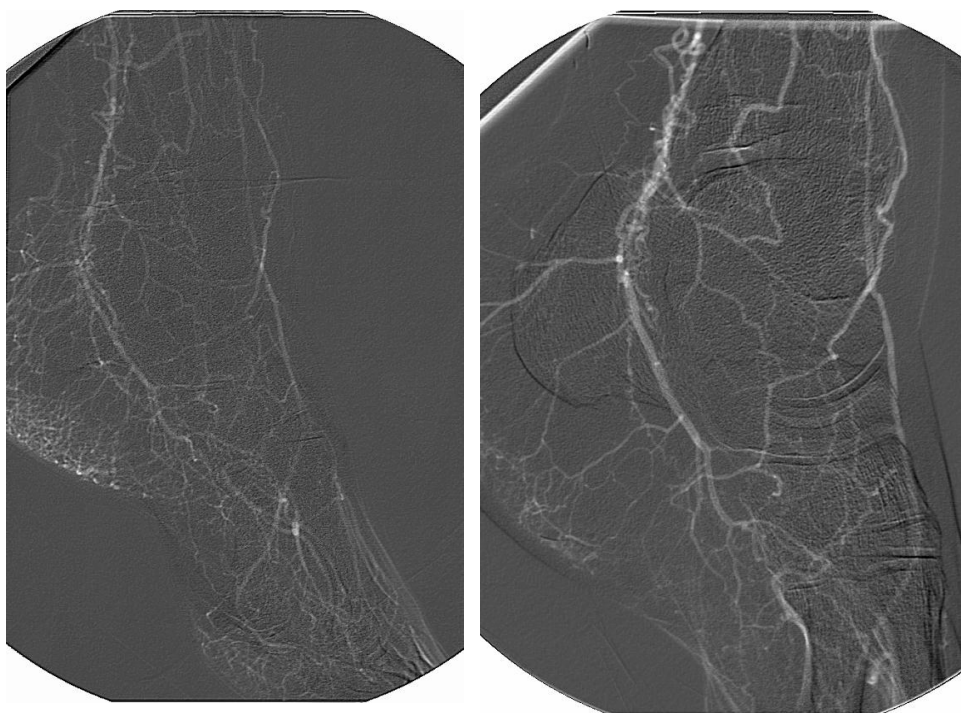
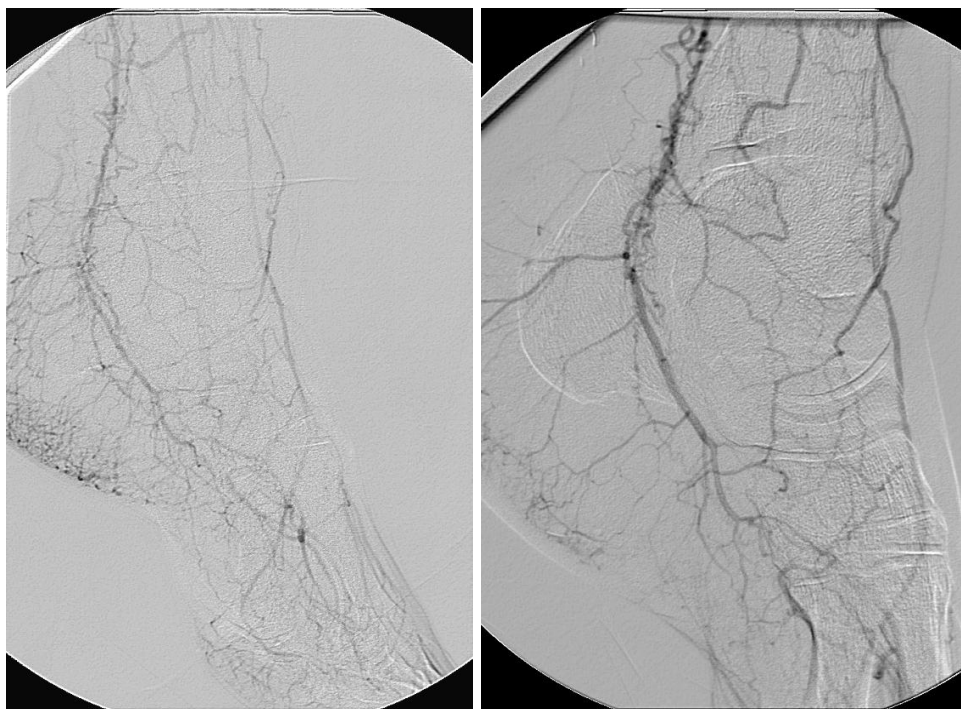
Pacient. 2. E.B.

A. Pacientka s defektem na plosce pod V.prstem levé nohy.

B. Po 1.roce došlo ke zhojení defektu (šipka).



Angiografie distálních tepen nohy – pacient 2 E.B.



Pacient 6 A.G.



A. Nehojící se defekt a gangrena V.prstu s flegmónou nohy pravé dolní končetiny.

B. 6 měsíců po implantaci kmenových buněk, po amputaci V.prstu.

C.D. Stav po 1. roce Zhojení defektu po amputaci, ustoupily klidové bolesti.

Angiografie tepen PDK- pacient 6 A.G.

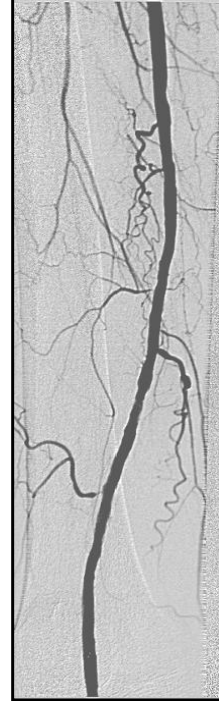
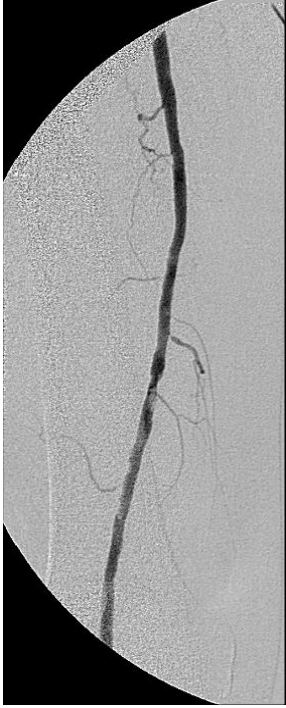


Před implantací

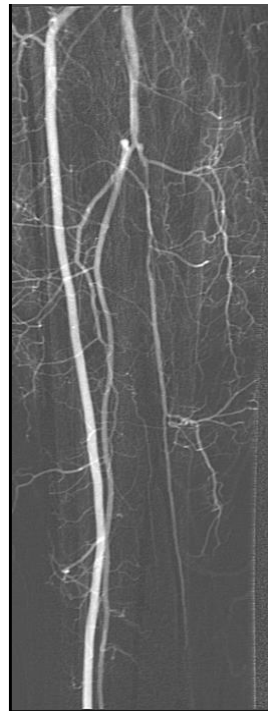


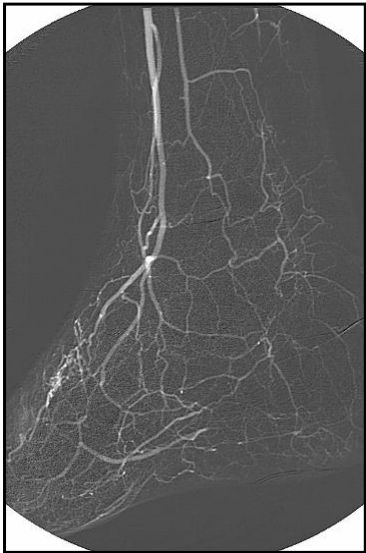
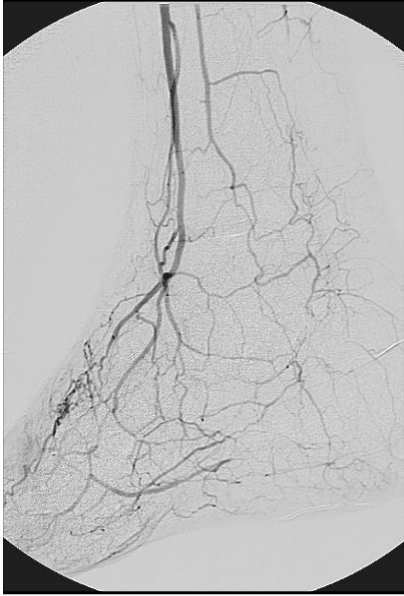
Po 1.roce











Pacient. 8. A.H.



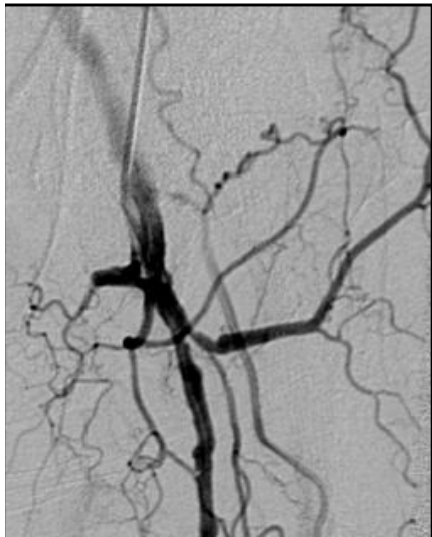
A. 75letá nemocná s vlhkou gangrenou 1-3.prstu a převážné části nártu levé dolní končetiny.

B. Mumifikace gangrény s její demarkací.

C. Stav po implantaci kmenových buněk a odstranění gangrény s ložiskovou infekcí defektu.

D. Stav po lokální léčbě antibiotiky. Je patrné hojení defektu s výraznou granulací spodiny defektu. V další léčbě zvažováno překrytí defektu kožní plastikou.

Angiografie tepen LDK- pacient 8. A.H.

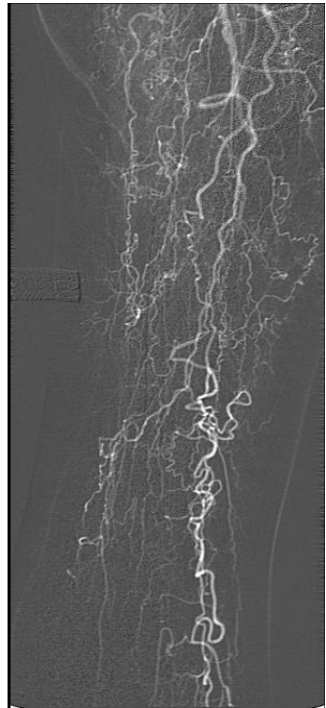
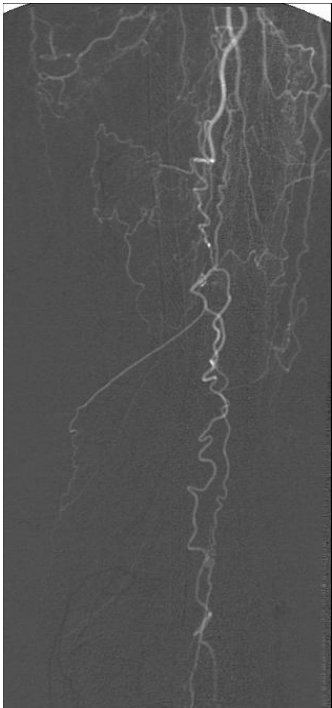
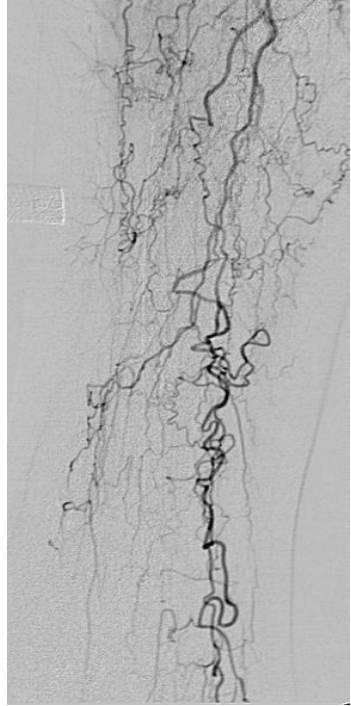
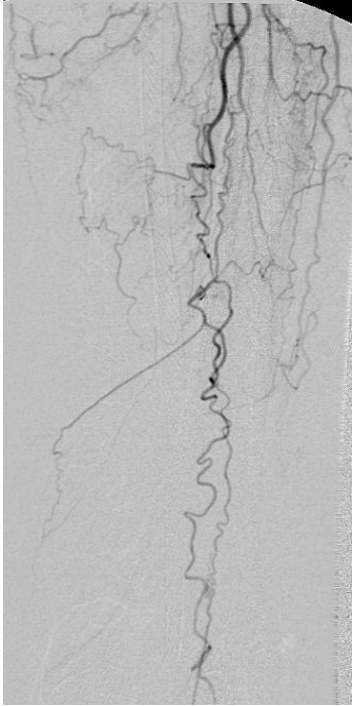


Před implantací

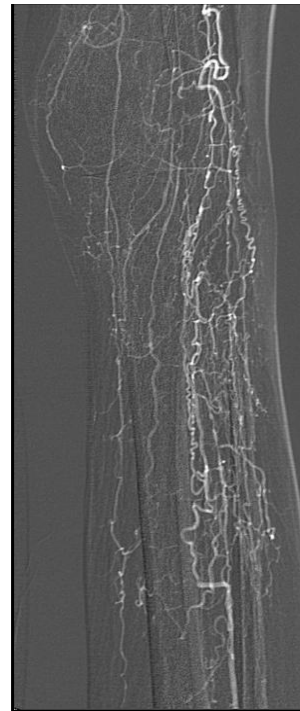
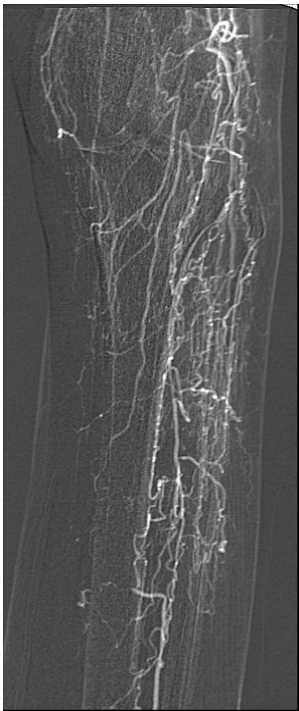
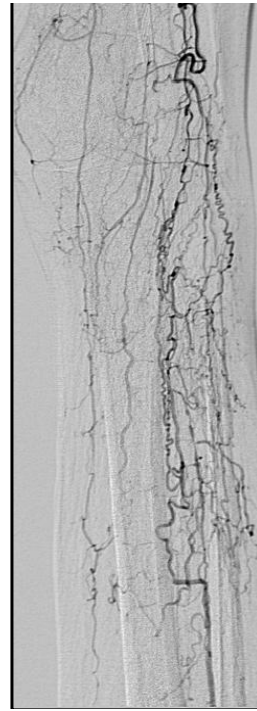
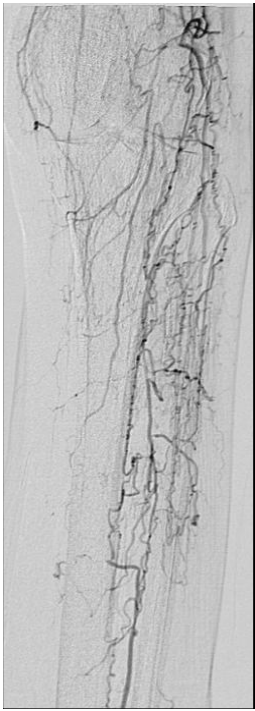


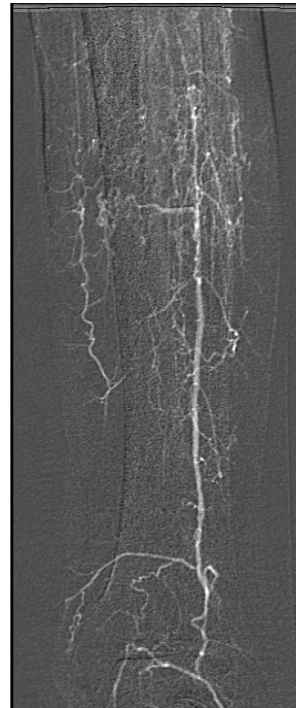
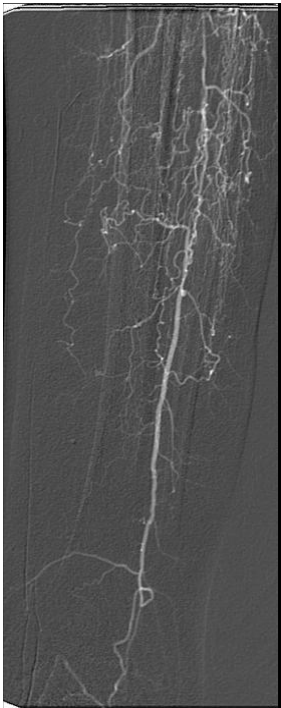
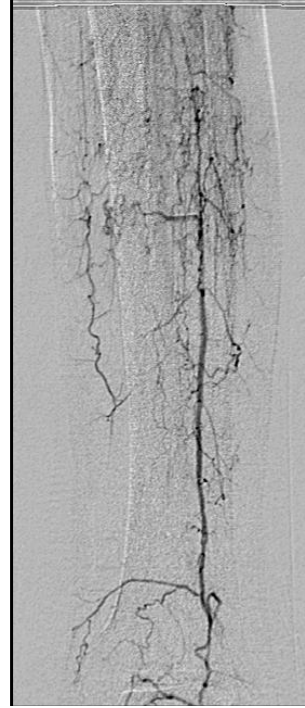
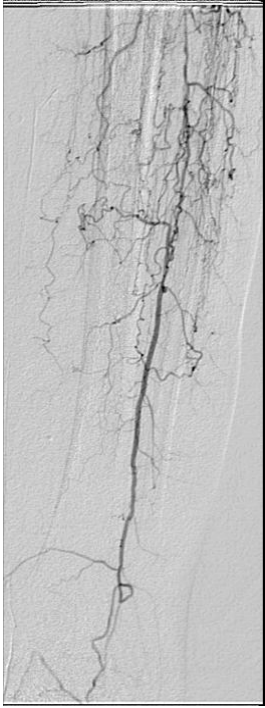
Po 1.roce

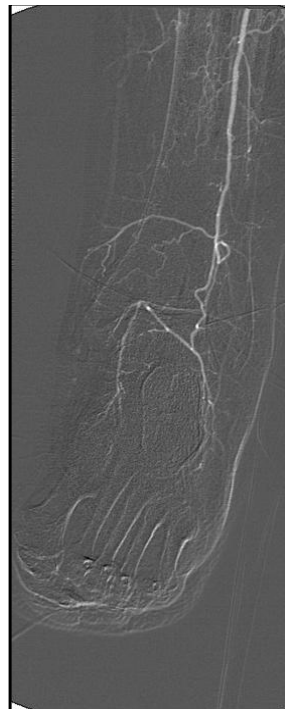
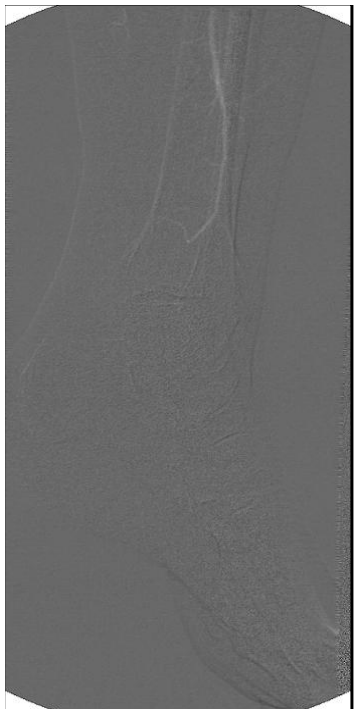
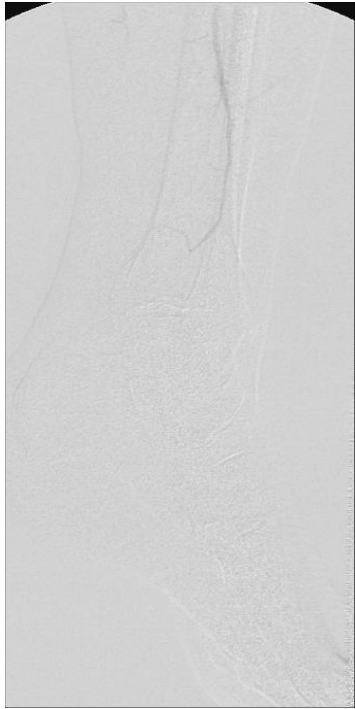












Pacient 10. K.H.



A. Pacient s kritickou končetinovou ischemií po neúspěšné chirurgické revaskularizaci s nehojícím se defektem po amputaci 1.prstu.

B. Stav po 6ti měsících, kdy je patrné hojení.

C. Stav po 1 roce . Jen malé reziduum, prakticky zhojení defektu.

Angiografie tepen LDK - pacient.10. K.H.

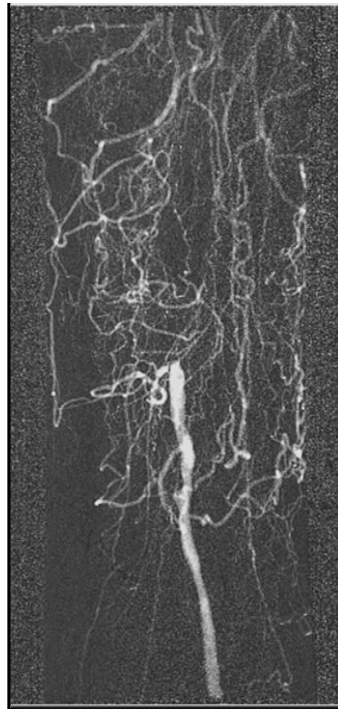
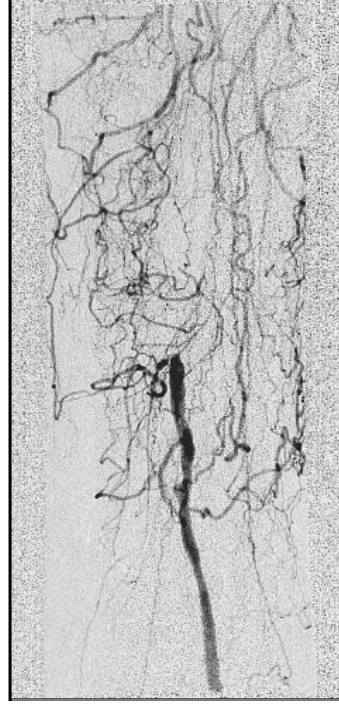


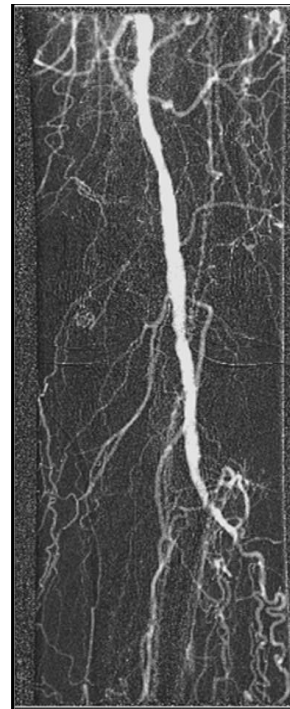
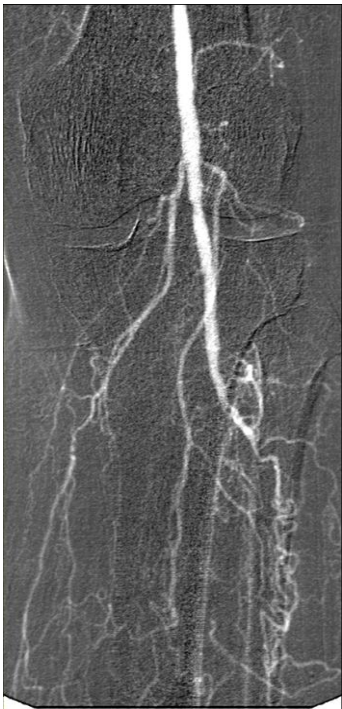
Před implantací

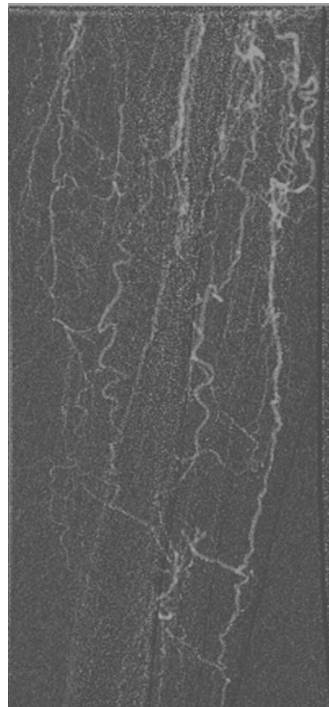
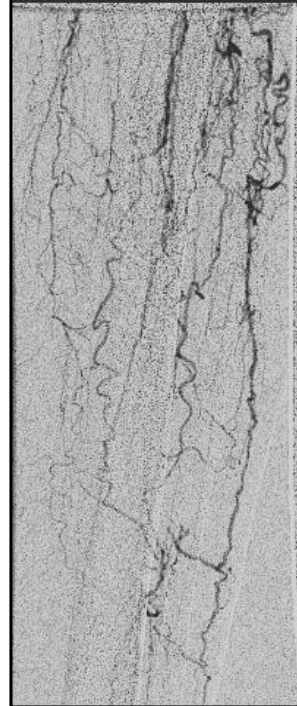


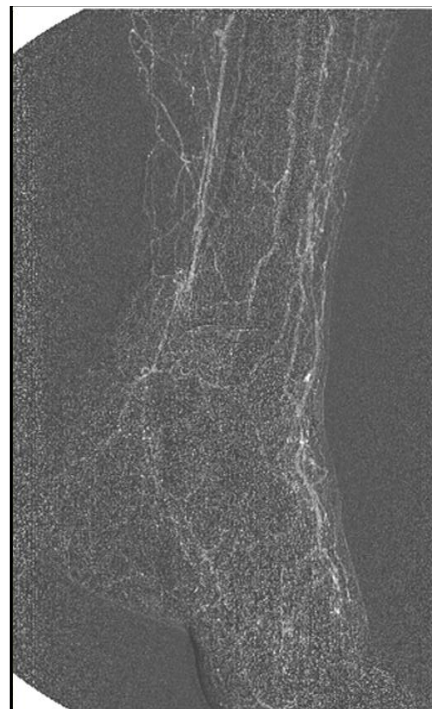
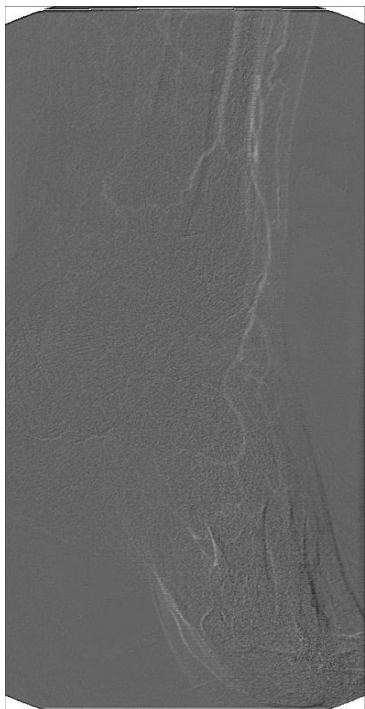
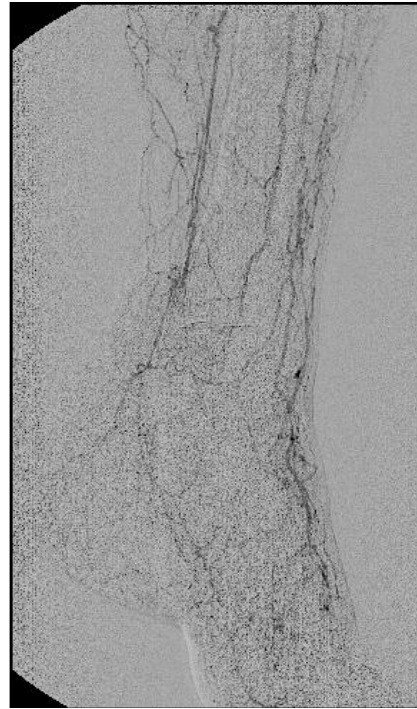
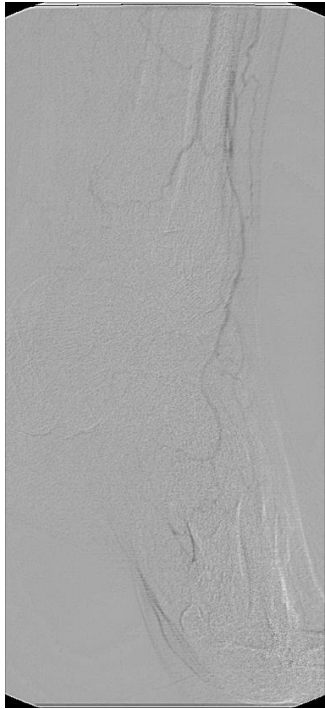
Po 1.roce











Pacient 15.J.L.



A. Před implantací kmenových buněk. Stav po amputaci II.prstu a před amputací III, IV.V.prstu.pro gangrenu.

B.C. Po snesení gangrenózně postižených prstů rychlé zhojení defektů.

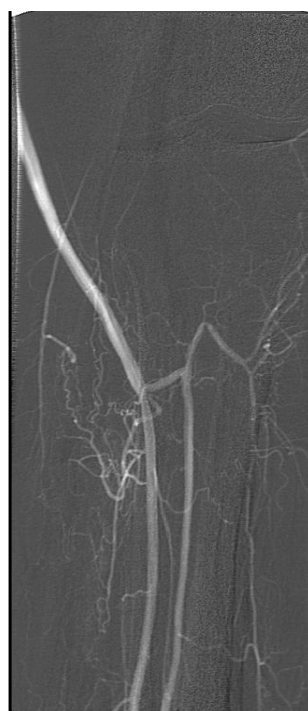
Angiografie tepen LDK – pacient 15. J.L.



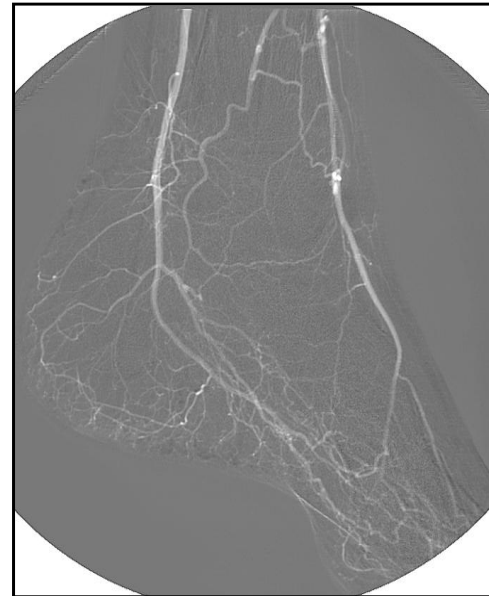
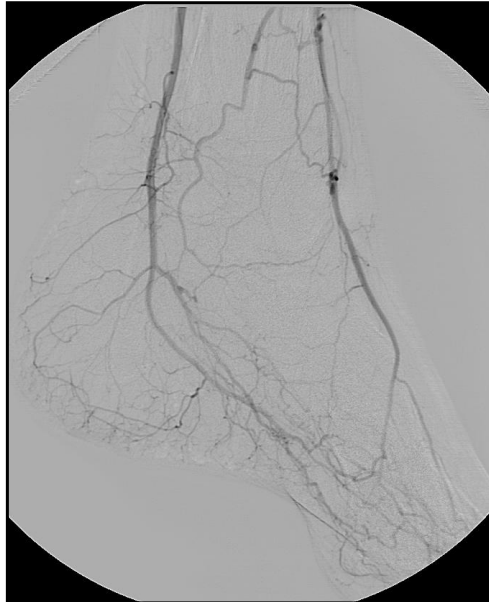
Před implantací



Po 1.roce







Pacient 19. K.O.



A. Nemocný s TAO. Nehojící se vlhký defekt 1. prstu a nehojící se defekt na nártu po biopsii. Pacient má klidové bolesti.

B. Stav po 6ti měsících.

C. D. Po 1 roce došlo ke zhojení defektu, ústupu klidových bolestí.

Angiografie tepen PDK – pacient 19. K.O.

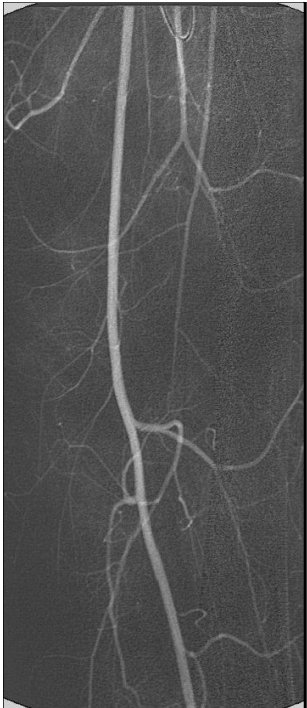


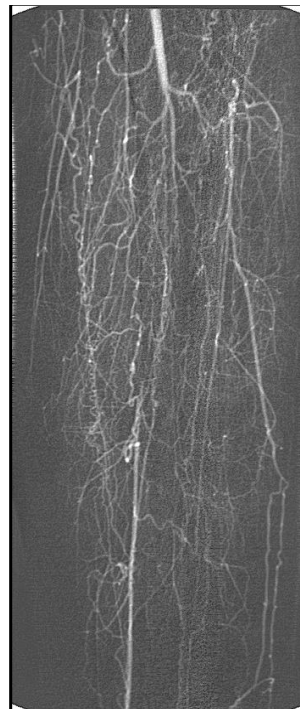
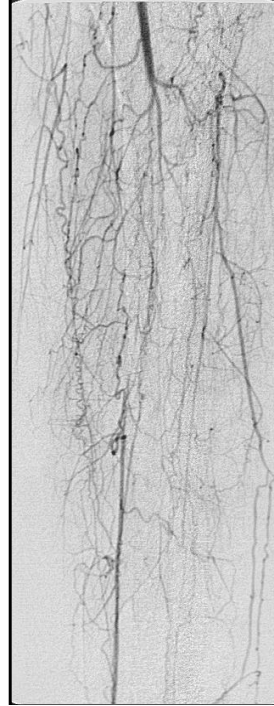
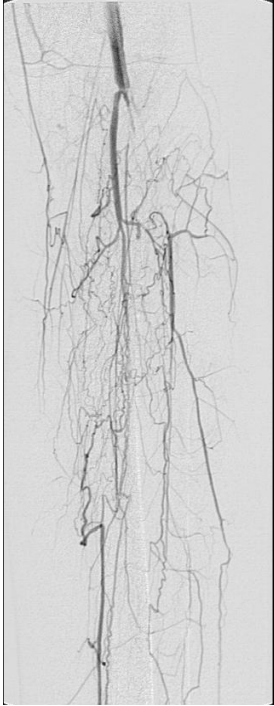
Před implantací

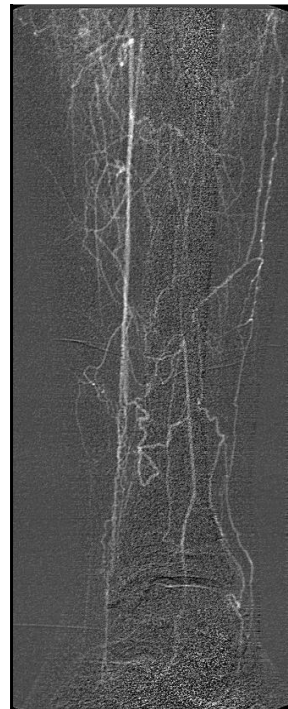
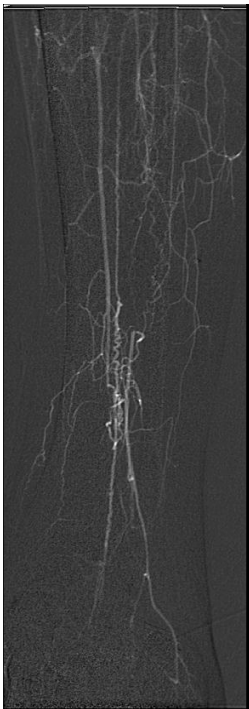
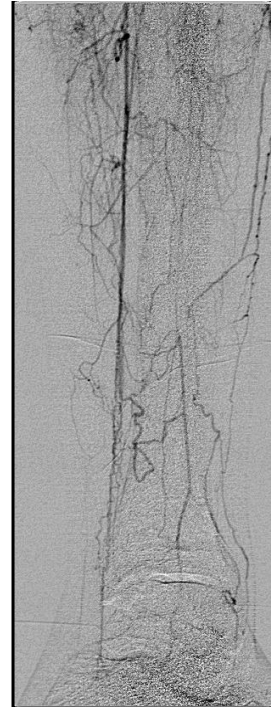
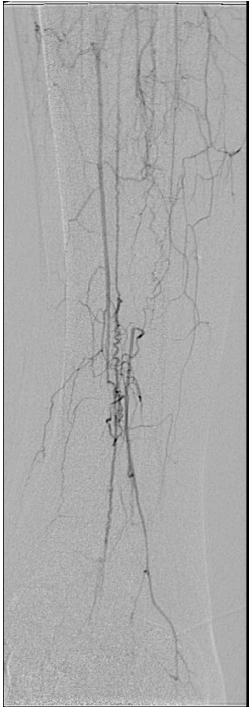


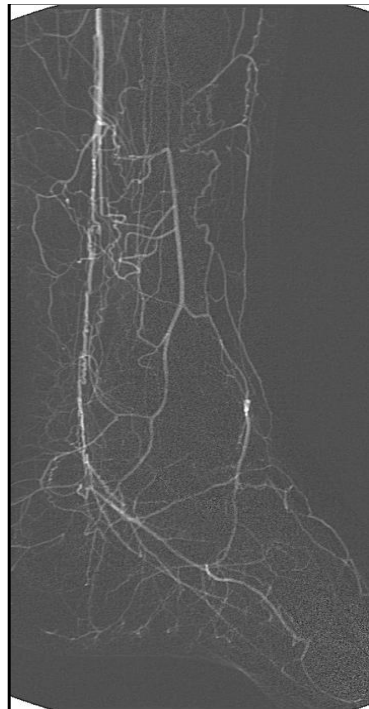
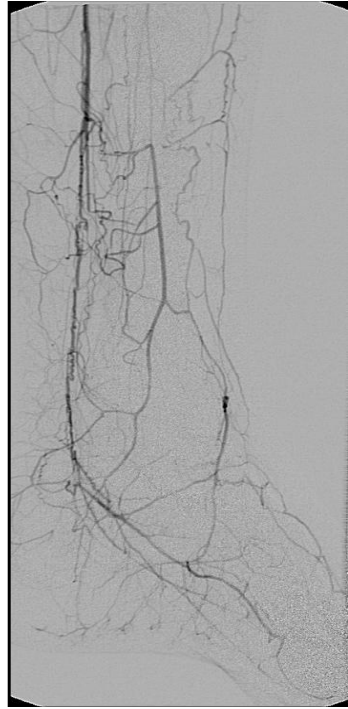
Po 1.roce



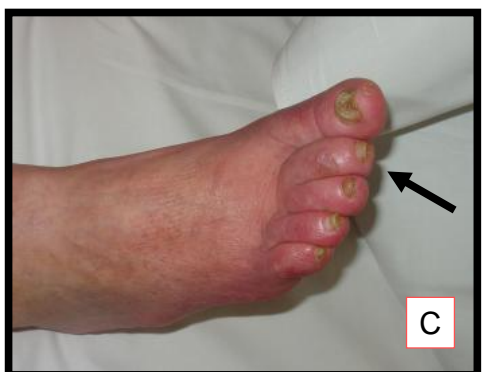








Pacient 23. J.U.

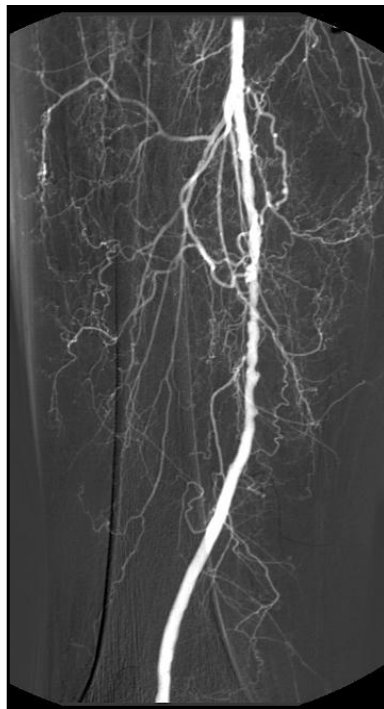
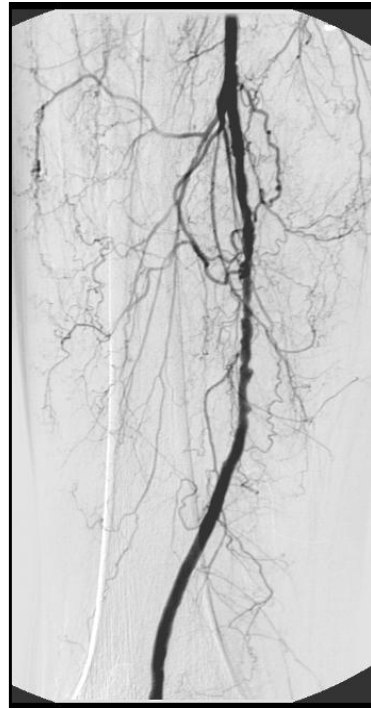


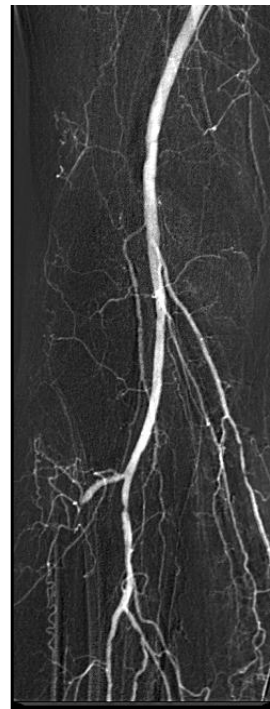
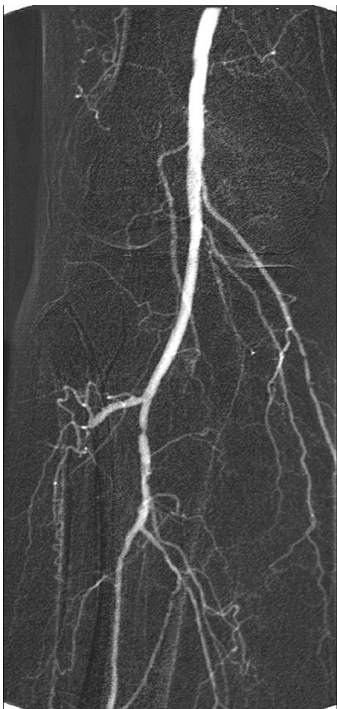
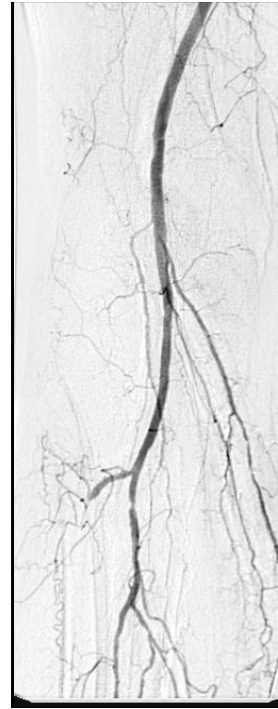
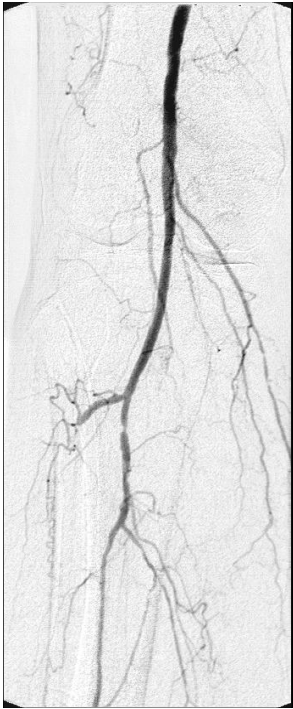
A.B. Nehojící se defekt na II. prstu nohy PDK.

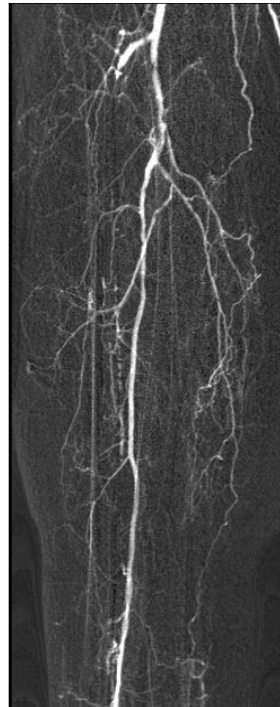
C.D. Stav po implantaci kmenových buněk (1.rok). Došlo ke zhojení defektu ad integrum.

Angiografie tepen PDK - pacient 23. J.U.











Pacient 24 J.U.



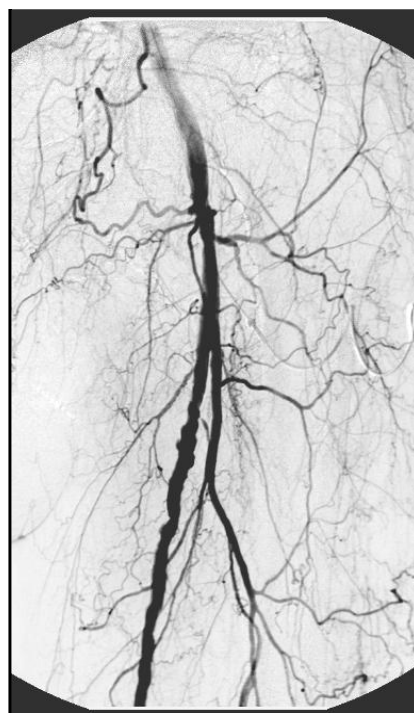
A. Nemocný s kritickou ischémii LDK s defektem v oblasti nehtového lůžka na I. prstu nohy LDK.

B.C. Po 1 roce došlo ke zhojení defektu a ústupu klidových bolestí.

Angiografie tepen LDK – pacient 24 J.U.



Před implantací



Po 1.roce

