

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Lenka Skalická

Praha 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc

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

Autor: MUDr. Lenka Skalická

Školitel: prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc

Obsah

1. Abstrakt český.....	5
2. Abstrakt anglický.....	6
3. Úvod.....	7
4. Patogeneze.....	8
4.1. Neovaskularizace.....	8
4.2. Kmenové buňky.....	9
4.3. Vaskulogeneze.....	9
5. Východiska a metodika vlastní vědecké práce.....	11
5.1. Cíle.....	11
5.2. Metodika, materiál, soubor.....	12
5.3. Měření indexu kotník-paže (ankel-brachial index).....	13
5.4. Měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂).....	13
5.5. Hodnocení kvality života.....	14
5.6. Digitální subtrakční angiografie.....	14
5.7. Odběr dřeňové krve.....	14
5.8. Zpracování kostní krve a příprava suspenze jaderných buněk.....	15
5.9. Provedení implantace kmenových buněk.....	15
6. Sledování angiogenních prekurzorů v krvi a kostní dřeni.....	15
6.1. Stanovení endotel. kolonií pomocí CFU-Hill eseje.....	15
6.2. Průtoková cytometrie.....	16
6.3. Kultivace	16
7. Statistické hodnocení.....	16
8. Cílové ukazatele.....	16
9. Výsledky.....	17
10. Další cíle.....	20
10.1. Zjištění optimálních poměrů buněčných populací podílejících se na terapeutickém efektu autologní transplantace.....	20
10.2. Mobilizace angiogenních prekurzorů do oběhu u pacientů s diabetem a bez diabetu.....	20

11. Diskuse a závěrečný souhrn.....	21
12. Literatura.....	23

1. Abstrakt

Cíl. Zjištění účinnosti a bezpečnosti intraarteriální implantace kmenových buněk u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin (DK)

Metody. Bylo léčeno 28 dolních končetin u 24 pacientů s diagnózou chronická kritická ischemie DK. Bylo odebráno v průměru 400ml roztoku kostní krve s heparinem ze zadní horní hrany lopaty kyčelní kosti a dále zpracováno standardním způsobem. Poté byla kostní krev aplikována do tepen DK pod angiografickou kontrolou. Primárním cílem byla účinnost metody měřená hojením defektu, změnou ischemického stupně, frekvencí vysoké amputace. Sekundárními cíly byly bezpečnost metody, angiografické změny a změny kvality života.

Výsledky. 1 rok po léčbě byli všichni pacienti živí, 2 pacienti podstoupili vysokou amputaci. Bylo zhojeno 11 ze 14 defektů (78%) a změny ischemického stupně hodnocené dle Fontaina byly z průměru 3,5 na 2,0 ($P < 0,0001$). Došlo ke zlepšení angiografických nálezů ve všech sledovaných úsecích, nejvíce v distálních částech nohy. 1 rok po implantaci pacienti měli signifikantně lepší kvalitu života ve všech modalitách.

Závěr. Intraarteriální implantace kmenových buněk může vést k signifikantnímu subjektivnímu i objektivnímu zlepšení stavu u pacientů s kritickou končetinovou ischemií. V době vydání naší práce nebyla publikována žádná studie, která by testovala čistě intraarteriální podání kmenových buněk. Také nebyla publikována data o kvalitě života pacientů s chronickou kritickou končetinovou ischemií před a po aplikaci kmenových buněk. Tyto výsledky potřebují ověření randomizovaných placebem kontrolovaných studií na větších počtech pacientů.

Klíčová slova.

chronická kritická ischemie dolních končetin, intraarteriální implantace kmenových buněk, kvalita života

2. Abstract

Aims: The aim of our study was to evaluate an efficacy and safety of intra-arterial injection of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) in patients with chronic critical limb ischemia (CLI)

Methods. In average 400ml bone marrow blood was harvested from posterior iliac crests in 24 CLI patients. BMMCs were obtained from the blood by standard procedure used for bone marrow transplantation. After digital subtraction angiography was performed in each patient, BMMCs were injected into arteries of 28 limbs. Primary outcome was the efficacy of BMMCs injection measured as a successful healing of limb defects, a change of Fontain ischemia grade and a rate of high limb amputations. Secondary outcomes were a safety of the BMMCs injections, changes in angiographic findings after BMMCs injections and changes in quality of life (questionnaire SF-36).

Results: After one year follow-up all patients were alive and 2 patients have undergone high limb amputation. Out of 14 limb defects, eleven have been healed completely and the average Fontain ischemia grade has changed from baseline value of 3.5 to 2.0 after one year ($P < 0.0001$). Angiographic findings have improved in all examined segments of limb vessels. One year after the procedure patients have reported significant improvement.

Conclusion: The intra-arterial limb BMMCs injection decreased the expected rate of high limb amputations, improved the limb defect healing as well as the Fontain grade of limb ischemia. First we used only intra-arterial implantation of BMMCs in human model. Moreover, BMMCs injection improved the quality of life – no study before tested it. Our results should be validated in larger randomized placebo-controlled studies.

Key words.

Chronic critical limb ischemia, intra-arterial injection of bone marrow mononuclear cells, quality of life

3. 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. Prognóza pacientů s chronickou kritickou ischemií dolních končetin je zatížena vysokou mortalitou a je srovnatelná s prognózou pacientů s pokročilým maligním onemocněním (1). Za rok od stanovení diagnózy chronické kritické ischemie dolních končetin prodělá 25% nemocných amputaci nad kolenem, 20% zemře a pouze 55% žije s oběma končetinami. Polovina nemocných s klidovými bolestmi zemře do pěti let.

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 progresu onemocnění, ke zlepšení lokálních i celkových cirkulačních poměrů, odstranění klidových bolestí a lokální péče o bolestivé defekty. Asi 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).

4. Patogeneze

4.1. 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. 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.

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 mononukleárních, což vede ke zvýšení aktivity uvolněných růstových faktorů.

Termínem „vaskulogeneze“ je označována diferenciací mezoderálních prekursorů směrem k angioblastům a následně ke 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 (4).

4.2. 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 diferenciaci 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 dřene s expresí jejich povrchových znaků. Hlavní význam v regeneraci tkání se v současnosti příkládá právě těmto tzv. multipotentním buňkám, které se vyskytují v jednotlivých orgánech (5). 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 reduktázy (statiny) (6, 7).

4.3. Vaskulogeneze

Bylo zjištěno, že dakronové cévní náhrady u pokusných psů nejsou endotelizovány transmurní angiogenezí z okrajů cévní náhrady, ale endotelovými ostrůvky, které postupně vznikaly na různých místech dakronového graftu bez kontaktu s existujícím cévním řečištěm (9). Dále se ukázalo, že tyto endotelové ostrůvky nepocházejí z endotelových buněk náhodně odloučených ze zralých cév, ale mají původ v prekurzorových buňkách z kostní dřene (10). V současné době se předpokládá, že cévní i krve tvorné buňky pocházejí ze společného prekurzoru, takzvaného hemangioblastu (10).

Množství angioblastických prekurzorů je možno zvýšit mobilizací pomocí VEGF, G-CSF či SCF (4). Cévní ischemie rovněž zvyšuje množství angiogenních prekurzorů 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 (11). Kromě dřevných prekurzorů vaskulárních buněk se ovšem mohou na procesu vaskulogeneze podílet i relativně zralé endotelové buňky, odloučené z cévní stěny.

Z výše uvedeného pohledu je logické, že u chorobných stavů, vedoucích k ateroskleróze, jako je například diabetes mellitus, hypercholesterolemie nebo ve vyšší věk, naopak cirkulujících endotelových prekurzorů ubývá. 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 prekurzorů z kostní dřevě do krevního oběhu pomocí cytokinů (13). Pravděpodobně mobilizace endotelových prekurzorů je jedním z mechanismů příznivého účinku statinů u pacientů s normálním cholesterolem a ischemickou chorobou srdeční (14). Druhou možností je sběr vaskulárních prekurzorů a jejich aplikace přímo do místa kritické ischemie. Tímto způsobem bylo dosaženo snížení frekvence amputací v experimentálním modelu cévní ischemie končetiny u myši (15). První klinické studie proběhly i u pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin. Tateishi-Yuyama (16) 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 (AAI) a prodloužení klaudikačního intervalu. Angiograficky bylo zjištěno výrazné zmnožení kolaterál na léčené končetině oproti končetině neléčené.

Nabízí se otázka, proč k regeneraci vaskulogenezy nestačí fyziologicky cirkulující endotelové prekurzory? Jedna z možných odpovědí je, že při

mobilizaci endotelových prekursorů, ať již vznikem akutní ischémie, podáváním statinů či podáváním růstových faktorů nedojde k dostatečné koncentraci těchto prekursorů v postižených oblastech, eventuálně jejich vzájemný poměr s jinými dřeňovými prekurzory 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 dřeňové prekurzory. 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.

5. Východiska a metodika vlastní vědecké práce

5.1. Cíle

Chronická kritická ischémie 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 morbidity 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 dřeňových 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

5.2. Metodika, materiál, soubor

Od 1.9. 2004 do 31.12. 2006 jsme provedli 28 autologních intravaskulárních transplantací dřeňových 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, 4 nemocní měli diagnostikovanou trombangiitis obliterans, 5 (21%) nemocných mělo v anamnéze cévní mozkovou příhodu, 8 (33%) pacientů měli v anamnéze kouření.

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 (AAI), změření transkutánní tenze kyslíku (tcpO₂) a angiografické vyšetření). Pacienti podepsali informovaný souhlas s léčbou a byl jim rozdán k vyplnění dotazník kvality života (SF-36). Po transplantaci kmenových buněk byli pacienti propuštěni druhý den do domácího léčení a byli pravidelně sledováni v šesti měsíčních intervalech v naší angiologické ambulanci. Po roce bylo provedeno kontrolní angiografické vyšetření léčené končetiny se změřením AAI, tcpO₂ a vyplněn dotazník kvality života.

5.3. Měření indexu kotník-paže (ankle-brachial index - ABI)

K měření jsme používali standardní přenosný dopplerovský přístroj Multi Doplex II s 8Mhz sondou, kterou jsme vyhledali pulzový signál na tepně (a.dorsalis pedis, resp. a.tibialis posterior), manžetu tonometru jsme přikládali na distální část lýtko. 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.

5.4. Měření transkutánní tenze kyslíku (TcpO₂)

Měření TcpO₂ je neinvazivní metoda, která nepřímo odráží kožní perfuzi. Měření bylo provedeno v horizontální poloze nemocného na postižené končetině. 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 mezi 1.-2. metatarzem. (obr 1 a, b).



5.5. Hodnocení kvality života

Při hodnocení účinnosti léčby na kvalitu života pacientů s chronickou končetinovou ischémií hraje důležitou roli věk nemocného, kdy zcela odlišné nároky na kvalitu života má pacient ve čtvrtém decéniu ve srovnání s pacientem na konci sedmého decéna, dále je to lokalizace a rozsah tepenného postižení a pohyb omezující defekt. K prospektivnímu hodnocení kvality života jsme použili generický dotazník SF-36. Pacienti vyplňovali dotazník kvality života před implantací kmenových buněk a v odstupu 12ti měsíců po implantaci. 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). 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).

5.6. Digitální subtrakční angiografie

Vyšetření jsme prováděli na přístroji Axiom Multistar 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).

5.7. Odběr dřevňové krve

Po interním 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 2 a, b, c). Porce odebírané kostní krve z jednotlivých punkčních míst/etáží nepřesahovala 4 ml kostní krve. Náběr se prováděl vždy do injekční stříkačky předplněné 1 ml isotonického roztoku NaCl s 20 IU heparinu na 1ml.

5.8. 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. 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. 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.

5.9. Provedení implantace buněk

Po provedené DSA do bočního vstupu 4Fpouzdra zavedeného do tepny byly aplikovány autologní kmenové buňky v autologní plazmě pomocí perfuzoru ASCUS 200 rychlostí 900 ml/hod. Po aplikaci kmenových buněk byla provedena kontrolní angiografie.

6. Sledování angiogenních prekurzorů v krvi a kostní dřeni

6.1. 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). Jako endotelové kolonie byly hodnoceny pouze

shluky minimálně 20 buněk s kulatými buňkami uprostřed a elongovanými buňkami na okrajích. Validita testu byla ověřována souběžným vyšetřováním zdravých dobrovolníků.

6.2. Průtoková cytometrie

Byl používán následující panel protilátek: PE-CD34 (BD), biotinylovaný antiKDR+FITC-značený streptavidin (Sigma), CD133 (Miltényi), 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.

6.3. Kultivace

Byly použity dvě metody kultivace CFU-GM a BFU-E. Dále byla provedena kultivace mezenchymových progenitorových buněk.

7. 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.

8. 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 AAI a tcpO₂, zlepšení kvality života

9. 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 amputací končetiny (ve stehně) podstoupili do 3 měsíců po implantaci 2 pacienti (pacienti s klidovou bolestí nereagující na analgetika). 3 pacienti prodělali amputaci prstů, resp nártu pro již ireversibilní změny před vstupem do studie (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.

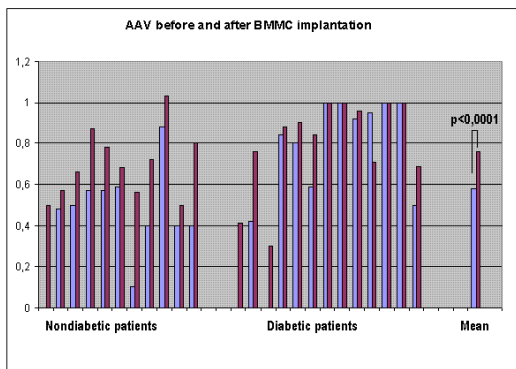
Bezpečnost léčby.

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

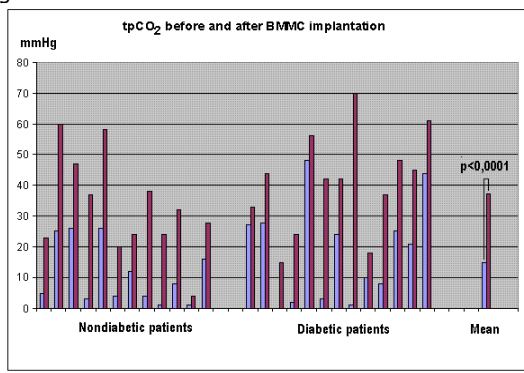
Změny v prokrvení končetiny měřené AAI (ankle – arm index) TcPO₂.

V souboru došlo k vzestupu průměrných hodnot AAI z 0,54 na 0,67 , stejně tak došlo k vzestupu průměrných hodnot TcPO₂ z 14,9 na 37,2 mmHg. Oba vzestupy jsou statisticky významné ($p < 0,0001$) (graf 1 a 2).

graf č.1



graf č. 2

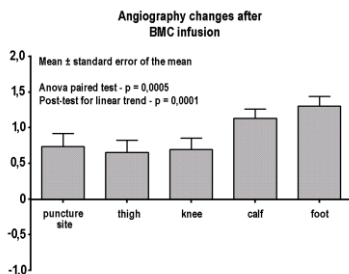


Angiografické nálezy.

Slepé hodnocení angiografických nálezů ukázalo, že rok po implantaci dřevňových 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 3). Nebyla zjištěna žádná korelace mezi zlepšením angiografického nálezu a počtem implantovaných progenitorů.

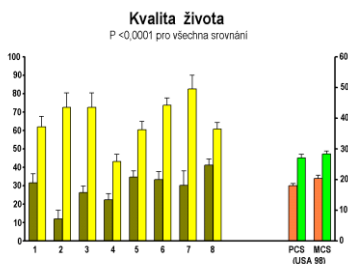
graf č. 3



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 č. 4). Kompozitní skóre fyzické kvality života korelovalo se změnami stupně ICHDK dle Fontainovy klasifikace, zatímco korelace s kompozitním skóre mentální kvality života nebyla zjištěna.

graf č. 4



10. Další cíle:

10.1. zjistit optimální poměry buněčných populací podílejících se na terapeutickém efektu autologní transplantace

V rámci projektu jsme zkoumali korelace kultivací endotelových kolonií z periferie a ze dřene s počtem mezenchymových (fibroblastových) kolonií z periferie a ze dřene, s počtem implantovaných CFU-GM a BFU-E, s počtem implantovaných CD34+ buněk a s počtem cirkulujících endotelových buněk.

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 $0,03$). Dále výsledky svědčí pro pokles dřevných progenitorů jak v důsledku věku, tak v důsledku přidružených onemocnění, podobně jako to popsal Hill pro cirkulující endotelové kolonie (12).

10.2. Mobilizace angiogenních prekurzorů 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 (6-8) mají více cirkulujících endotelových buněk (patrně apoptotického či nekrotického charakteru) než zdraví dobrovolníci.

Naše výsledky ukazují, že všechny tři sledované skupiny pacientů (tedy včetně pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin) mají výrazně sníženou mobilizaci angiogenních prekurzorů 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 ($p = 0,09$).

11. 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 $TcpO_2$ 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 časné 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, $TcpO_2$, angiografický nález, kvalita života. U polymorbidních nemocných je to bezpečná metoda bez závažných nežádoucích účinků.

12. 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, M.Sc., Dame Carol Black, et al :Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis. *International Journal of Angiology*, 2005, 14, p.49–59 .
4. Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11, p.73-911
5. . Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, 361(9351), p.45-46.
6. 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.
7. Shi Q, Rafii S, Hong-De Wu M, et al: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998; 92:, p. 362-367.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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, 413-416.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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
16. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg* 1997;26:517-38