

Terapie kmenovými buňkami při léčbě chronické končetinu ohrožující ischemie u diabetiků

Dominika Sojáková^{1,2}, Jitka Husáková^{1,2}, Vladimíra Fejfarová¹, Veronika Wosková¹, Andrea Němcová¹,
Radka Jarošíková¹, Michal Dubský^{1,2}

¹Centrum diabetologie, Institut klinické a experimentální medicíny Praha

²1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Autologní buněčná terapie je už řadu let využívána u pacientů s chronickou končetinu ohrožující ischemií. Byly publikovány četné studie a metaanalýzy, které posuzovaly benefity terapie a představily i její nové možnosti. Kromě standardně využívaných zdrojů kmenových buněk (kostní dřeně a periferní krve) se otevírají nové možnosti využití jiných alternativ – různých typů tkání. Stále však přetrvává otázka porovnání účinků jednotlivých typů buněk a jejich aplikace. Velmi zajímavé jsou i možnosti kombinované terapie hyperbarickou oxygenoterapií společně s buněčnou terapií. Dle zkušenosti našeho pracoviště je autologní buněčná terapie efektivní metoda s nízkým počtem nežádoucích událostí.

Klíčová slova: kmenové buňky, končetinová ischemie, syndrom diabetické nohy, revaskularizace.

Stem cells therapy in patients with chronic limb-threatening ischemia

Autologous cell therapy has been used in patients with chronic limb-threatening ischemia for many years. Numerous studies and meta-analyses assessed benefits of cell therapy and also presented its new possibilities. In addition to the standard sources of stem cells, like bone marrow and peripheral blood, new possibilities of using various types of tissues were considered. There is still question about a comparison of the effect among different types of cells and their administration. The possibility of combined therapy consisting of hyperbaric oxygen therapy and stem cell therapy is also an interesting approach. According to the experience from our centre, autologous cell therapy is an effective method with low rate of adverse events.

Key words: stem cells, limb ischemia, diabetic foot disease, revascularisation.

Úvod

Incidence diabetes mellitus 2. typu i ischemické choroby dolních končetin (ICHDK) celosvětově stoupá. Právě ischemie spolu s neuropatií jsou hlavní příčinou syndromu diabetické nohy, které vedou k ulceracím a v mnoha případech i ke ztrátě končetiny (1). Syndrom diabetické nohy je jednou z nejčasnějších a nejzávažnějších komplikací u diabetiků. Infekce se u pacientů s ulceracemi vyvíjí v 50–60 % případů a v průměru 20 % případů infekce progreduje do stadia, kdy je vysoká amputace nevyhnutelná (2).

Chronická končetinu ohrožující ischemie (Chronic Limb-Threatening Ischemia – CLTI) je považovaná za nejpokročilejší formu ICHDK a je nezávislým rizikovým faktorem pro vysoké amputace u diabetických pacientů (3). I vzhledem k typickému postižení zejména podkolenních

tepen u pacientů s diabetem je první volbou léčby endovaskulární řešení – perkutánní transluminální angioplastika (PTA) se zavedením samo-expandibilního nebo balon-expandibilního stentu. Je možnost použití i lékových balonů nebo lékových stentů (drug-eluting balloons or drug-eluting stents), se kterými je prokázána delší průchodnost a nižší počet opakovaných revaskularizací (4). V poslední době je velká pozornost věnována revaskularizaci dle angiosomů (tzv. přímá revaskularizace). Angiosom představuje oblast tkáně, která je zásobovaná stejnou tepnou. Na rozdíl od nepřímé revaskularizace můžeme dosáhnout zprůchodnění postižené cévy přímo podle postiženého okrsku tkáně. Jongsma et al. publikoval studii, ve které provedení přímé revaskularizace zlepšilo hojení defektů a zredukovalo počet vysokých amputací. V případech nepostižených kolaterál mezi angiosomy byly výsledky

pro přímou i nepřímou revaskularizaci bez signifikantního rozdílu (5). Nadějnou metodou revaskularizace je léčba mimotělovými rázovými vlnami (extracorporeal shockwave – ECSW). Jejich účinek je potvrzen v léčbě muskuloskeletálních nemocí a jiných onemocnění přes potlačení zánětlivé reakce, redukci pocitu bolesti a podporu regenerace tkáně. ECSW je prováděna za pomoci litotriptoru, který generuje rázové vlny do postižené oblasti. Klinická studie potvrdila signifikantní rozdíl stupně stenóz hodnocených Dopplerovským vyšetřením u pacientů léčených ECSW a kontrolní skupinou. Navíc byla u pacientů pozorována redukce klidových bolestí a prodloužený klaudikační interval (6).

Navzdory vysokému využití endovaskulárních metod jsou stále případy, u kterých je preferované provedení cévního bypassu před PTA. Jedná se o pacienty s postižením cév na vícero úrovních nebo s dlouhým uzávěrem cév. Mezi další indikace patří neúspěšný předchozí endovaskulární výkon nebo opakované uzávěry cév po endoskopické revaskularizaci. Provedení bypassu může být dále preferováno u pacientů s rozsáhlými nehojícími se defekty. Studie publikovaná Saanen et al. prokázala, že po jednom roce od provedení bypassu bylo 71,2 % a po pěti letech 76,5 % bypassů klinicky primárně patentních, tj. bez potřebné další revaskularizace. Kromě toho byla sledována delší funkčnost by-passu, když byla preferována popliteální tepna jako přívodní céva před femorální. Prožívání pacientů bez potřeby amputace (amputation-free survival) bylo do jednoho roku 58,4 % (7).

Dle studie Basil, která srovnávala oba přístupy, má chirurgická revaskularizace ve srovnání s endovaskulárním řešením větší riziko perioperačního infarktu myokardu, náhlého úmrtí a mrtvice. Na druhé straně u endovaskulárního přístupu byly pozorované častější revaskularizace (8).

„No-option CLTI“

V průměru u 40 % pacientů s CLTI však není možné provést PTA ani jiný způsob revaskularizace (9). Tyto případy jsou označovány jako „no-option CLTI“ a jsou prediktorem nehojících se defektů a neúspěchu chirurgických zákroků (3). Pacienti s nemožností revaskularizace mají velmi malou šanci se amputací vyhnout. Dle studie Verwer et al. jenom 43 % no-option pacientů s CLTI nepodstoupilo amputaci během pěti let od zařazení do studie (10). Představují skupinu pacientů s vysokou mortalitou (10–54 %) a nejhorší prognózou (11).

V případech nemožnosti revaskularizace se nabízí několik alternativních terapeutických postupů. Benefit vazoaktivních léků jako natriodofuryl, cilostazol nebo pentoxifylin pro hojení defektů a prevenci amputací nebyl potvrzen. Pozitivní efekt na hojení ran a prevenci amputací nebyl prokázán ani u prostainoidů (1).

Hyperbarická kyslíková terapie (HBOT) je založena na mechanismu urychlení procesu hojení defektů skrze stimulaci proliferace fibroblastů, produkci kolagenu, neovaskularizaci a epitelizaci. Kromě toho má i antiedematózní a imunomodulační vliv (12). Podle 10. konsenzuální evropské konference o vhodných a nevhodných klinických indikacích HBOT je doporučeno aplikovat HBOT u obtížně se hojících diabetických ischemických ulcerací bez možnosti provedení revaskularizačního výkonu nebo po provedení cévně-chirurgického výkonu, pokud se rána dále nehojí i při komplexní léčbě po dobu nejméně 4 týdnů (13).

Nedávno publikovaná multicentrická randomizovaná studie Santema et al. neprokázala benefit ve využití HBOT v souvislosti se zhojením defektů a záchranou postižené končetiny (14). Na druhou stranu dle naší umbrella analýzy 8 studií má HBOT statisticky významný přínos jak v hojení ran, tak i v redukci vysokých amputací (15). Realizaci větších randomizovaných zaslepených studií ohledně využití a úspěšnosti HBOT u no-option pacientů s CLTI omezuje nedostatečný přístup pacientů k HBOT, ať už z důvodů nedostatku příslušných léčebných zařízení, nebo v důsledku finančních nákladů. Posouzení indikace HBOT u nehojících se diabetických ulcerací na nohou je i podle našich zkušeností individuální a je dáno zkušenostmi indikujících lékařů.

Jedním z nadějných postupů je také arterializace hlubokých žil dolní končetiny (deep venous arterialization – DVA), při které se vytvoří anastomóza mezi proximálním arteriálním přítokem a žilou a zároveň se odstraní žilní chlopně. Arterializace DVA tedy umožní přítok krve do distálních částí dolní končetiny, čím se dosáhne redukci bolesti a zlepšení hojení defektů. Dnes již je možné provést DVA nejen chirurgickým přístupem, ale i perkutánně a kombinovaně (provedení anastomózy s endoskopickou valvulotomií). Je uvedeno, že 60–70 % pacientů, kteří podstoupili perkutánní DVA, nemuselo následně podstoupit vysokou amputaci, u kombinovaného přístupu je to 46–69 % pacientů (16).

Terapie kmenovými buňkami

V poslední době je velká pozornost věnována terapii CLTI pomocí autologní buněčné terapie (Autologous Cell Therapy – ACT). Kmenové buňky (KB) jsou buňky, které se mají schopnost dělit a diferencovat na jiné buňky. Za nejčastěji používaný zdroj KB se považuje kostní dřev, ze které je možné izolovat mononukleární frakci buněk kostí dřeně (bone marrow-derived mononuclear cells – BMMNC). Pojem BMMNC popisuje buňky s jednolaločným nebo okrouhlým jádrem a malým množstvím granulí v cytoplazmě, které se nacházejí v kostní dřevě a je pro ně typická exprese povrchových markerů CD34, CD45, CD133 a stromálního prekursorového antigenu-1 (STRO1) (9) (17).

Mononukleární frakci buněk je možné využít i z periferní krve (human Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMMNC), avšak je nutné zvýšit jejich počet přes systémové podání kolonie stimulujícího faktoru granulocytů (G-CSF) nebo kolonie stimulujícího faktoru makrofágů a granulocytů (GM-CSF). Bylo uvedeno, že stimulace G-CSF je víc preferovaná kvůli vyšší efektivitě, ale jednotlivé studie jsou zatíženy rozdílem v etnicitě a přítomnosti přidružených nemocí. Po stimulaci se následně buňky odseparují od ostatních buněk aferézou (9).

Již bylo publikováno několik studií a metaanalýz, které porovnávaly účinek BMMNC a PBMMNC. Metaanalýza publikovaná Liew et al. poukázala na snížení výskytu vysokých amputací, lepší hojení defektů a výraznější zvýšení výsledků kotník-paže indexu (ankle-brachial index – ABI index) u pacientů, kteří byli léčeni PBMMNC (18). Studie, která probíhala na našem pracovišti, signifikantní rozdíl mezi efektem léčby BMMNC a PBMMNC neprokázala (19). Při terapii PBMMNC je však méně invazivní odběr a zpracování, a s tím spojený menší počet nežádoucích účinků. Nesmíme ale opomenout, že u podání G-CSF při využití PBMMNC byly popsány také nežádoucí účinky jako bolesti kostí, bolest hlavy, únava a flu-like syndrom (20). Jen ojediněle byly popsány závažné případy

jako ruptura sleziny, akutní poškození plic a přechodný hyperkoagulační stav (9).

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cell – MSC) představují heterogenní podskupinu stromálních buněk, které se mohou vyskytovat téměř ve všech tkáních, ale ve velmi malém množství (přibližně 1 ku 10 000 buněk kostní dřeně). Je však možné namnožit je *in vitro* (9). Pro MSC je charakteristická přítomnost znaků CD29, CD73, CD90, CD44. Zdrojem MSC je kostní dřeň, periferní krev, tuková tkáň, embryonální tkáň a fetální tkáň (krev pupečnicku, Warthonův rosol, amnion, amniová tekutina a placenta). K dalším alternativním zdrojům patří zubní dřeň, periodontální ligamenta, nervová tkáň a endometrium (17, 21). Zvažovala se i možnost použití menstruační krve, čímž by se zjednodušil odběr i pro samotnou pacientku (22).

MSC v porovnání s BMMNC a PBMNC mají několik výhod. Jsou lehko dostupné na odběr a mají širokou schopnost diferenciaci na jiný typ tkáně. Jejich imunosupresivní a protizánětlivé vlastnosti jsou pořád předmětem diskuze (23). Výhodou je také jejich nízká imunogenita, tím pádem je možné zvážit i alogenní ACT od zdravého dárce (21). Nevýhodou je potřeba kultivace, což zvyšuje časovou náročnost jejich využití. Odebraná tkáň je promývána a nařezána na několikamilimetrové části, které jsou následně vloženy do nádob s kultivačním médiem, kde několik dnů rostou. Je možnost tkáň nejprve kultivovat s enzymatickým roztokem (např. Hankův roztok), které z tkáně odstraní zbývající extracelulární matrix. Tím pádem se izolované buňky nebo jejich shluky uvolní od ostatních složek tkáně a můžou být dále kultivovány (24).

Dle metaanalýzy Sun et al. 2022 není zatím jasné, jestli mají větší terapeutický efekt MSC pocházející z kostní dřeně, nebo PBMNC (25). Jiná studie publikovaná Lu et al. z roku 2011 prokázala více zhojených defektů za kratší čas (přesněji o 4 týdny) po aplikaci MSC z kostní dřeně oproti aplikaci BMMNC. Došlo i ke zlepšení perfuze podle měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂), ABI, hodnocení délky chůze bez klaudikací, ABI a magnetické rezonanční angiografie. Na druhé straně nebyl pozorován rozdíl mezi počtem amputací a redukcí bolesti (26).

Byly také identifikovány endoteliální prekursorové buňky (endothelial progenitor cell – EPC), které představují skupinu buněk skládající se z 2 hlavních linií, a to z hematopoetické a endoteliální. Hlavní zástupci hematopoetické linie jsou myeloidní angiogenní buňky (myeloid angiogenic cells – MAC) pocházející z mononukleární frakce periferní krve. Nejsou schopné diferenciaci na endotelové buňky, avšak podporují angiogenezi přes jejich parakrinní aktivitu. Endoteliální linii představují endoteliální kolonie formující buňky (endothelial colony forming cells – ECFC), které pocházejí z pupečnickové krve nebo mononukleární frakce periferní krve. Mají proliferální potenciál a schopnost formace cév *de novo* i reparace poškozených cév (27).

Za pomoci neurálních kmenových buněk (neural stem cell – NSC) je potenciálně možné docílit regenerace postižených periferních nervů (28). NSC se nachází ve ventrikulární, subventrikulární (v-SVZ) a subgranulární zóně (SGZ) mozku (29). Použití těchto buněk má ale několik limitací. První z ní je vysoké riziko při jejich odběru, dále malé množství odebraných buněk, a nakonec i jejich nízký proliferální potenciál (30). Studie ohledně použití NSC při léčbě pacientů s CLTI zatím žádné nejsou. Dosud byla publikovaná pouze studie ohledně použití NSC u pacientů po cévní mozkové příhodě, která popsala určité zlepšení motorické hybnosti u pacientů po ACT, ale je potřeba ještě mnoha dalších studií (31).

Endometriální kmenové buňky (endometrial-derived stem cells – EnSC) mají vysokou schopnost proliferace a diferenciaci, proto představují potenciál pro regeneraci tkáně. Rovněž jako MSC vykazují nízkou imunogenitu a schopnost parakrinní aktivity, což má klíčovou roli v procesu angiogeneze (17). Navíc endometriální progenitorové buňky a mezenchymální buňky pocházející z menstruační krve jsou schopné se *in vitro* i *in vivo* podmínkách transdiferencovat na myoblasty/ myocyty (32). Nakonec v *in vitro* podmínkách byla potvrzena i schopnost diferenciaci EnSC na neurální buňky. Pomocí EnSC by bylo proto potenciálně možné nejenom stimulovat angiogenezi v postižené končetině, ale i zlepšit stav svalové tkáně a periferních nervů (17). Jednotlivé typy kmenových buněk a jejich znaků jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1. Přehled kmenových buněk, jejich zdroje a typické povrchové znaky (17)

Typ kmenových buněk	Zdroj	Povrchové znaky (phenotype)
Mononukleární frakce buněk kostní dřeně (BMMNC)	Kostní dřeň	CD34+, PROM1 (CD133)+, KIT (C-Kit)+, CD14-, CD45-
Frakce jaderných buněk z periferní krve (PBMNC)	Periferní krev, krev z pupečnicku, vyplavené z kostní dřeně	CD34+, CD14-, CD45-
Mezenchymální kmenové buňky (MSC)	Kostní dřeň, periferní krev, pupečník, tuková tkáň, svalová tkáň, kůže, tkáň srdce	CD73+, CD90+, 105+, CD34-, CD45-, D11b-, CD14-, CD19-, CD79a-, HLA-DR-
Myeloidní angiogenní buňky (MAC)	Mononukleární frakce periferní krve	CD45+, CD14+, CD31+
Endoteliální buňky formující kolonie (ECFC)	Pupečnicková krev, mononukleární frakce periferní krve	CD31+, CD105+, CD146+, CD 34+ (exprimace může v průběhu expanze <i>in vitro</i> klesat)
Neurální kmenové buňky (NSC)	Ventrikulární, subventrikulární a subgranulární zóna mozku, neurosféry, prekursorové neurální embryonální kmenové buňky	CD184+, CD24+, nestin+, FGF-R+, GFAP+, SOX1/2+, FOXO-3+, TLX+, CD271+, CD44+
Endometriální kmenové buňky (EnSC)	Endometrium	CD146+, PDGF-, Rβ+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, SSEA-1, CD34-, CD31-, CD45-

CD – the cluster of differentiation, PROM1 – prominin-1, c-Kit – stem cell factor receptor, HLA – hlavní histokompatibilní komplex, FGF-R – receptor pro fibroblastový růstový faktor, GFAP – gliální fibrilární protein, SOX1/2 – SOX transkripční faktor, FOXO-3 – Forkhead box O3, TLX – TLX transkripční faktor, PDGF – destičkový růstový faktor, SSEA-1 – stage-specific mouse embryonic antigen

Mechanismus léčby kmenovými buňkami

Bylo popsáno několik teorií ohledně mechanismu kmenových buněk při léčbě CLTI. Ashara et al. poukazoval na to, že při ACT s využitím BMMNC a PBMNC mají CD34+ buňky v periferní krvi schopnost diferenciaci na endoteliální buňky (33). Jiné studie tuto teorii nepotvrdily, proto zůstává stále kontroverzní (34, 35). Dále bylo publikováno, že neovaskularizace může být dosažena díky diferenciaci pericytů, které mají nezastupitelnou roli ve stabilizaci cévní stěny a taky regulují proliferaci endotelových buněk kapilár (36). Tento mechanismus účinku se zatím jeví jako pravděpodobný. Z toho vyplývá, že BMMNC nebo PBMNC nestimulují vaskulární růst skrze jejich inkorporaci do cévní stěny, ale fungují spíše jako podpůrné buňky. Kromě toho BMMNC i PBMNC mají schopnost sekrece pro-angiogenních faktorů, jako vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor (bFGF), růstový faktor hepatocytů (HGF) a angiopoein-1. Tímto parakrinním účinkem dále přispívají k podpoře neovaskularizace (9).

U MSC byly popsány tři mechanismy neovaskularizace, a to parakrinní aktivita, ke které se radí i jejich imunomodulační účinek, dále přímá diferenciaci a mitochondriální transfer. Detailněji jsou mechanismy popsány na obrázku 1 (21).

Realizace ACT a možnosti jejich podání

Na našem pracovišti Centra diabetologie IKEM pro ACT využíváme BMMNC, které získáváme od pacienta punkcí kostní dřeně z kosti kyčelní ve sterilním prostředí operačního sálu. Výkon se provádí preferenčně v epidurální nebo spinální anestezii, ale je možný i v celkové anestezii. Kostní dřeň se nabírá do stříkaček, ve kterých je přítomen antikoagulant. V odběrovém vaku je následně přenesena do laboratoře, kde se odehrává izolace kmenových buněk. Zpracovanou kostní dřeň s kmenovými buňkami pak chirurg na operačním sále aplikuje stříkačkou pacientovi hluboce intramuskulárně do blízkosti obturovaných cévních kmenů.

Aplikace se provádí v sérii 40–60 vpichů distálně od kolenního kloubu, tedy do obou hlav musculus gastrocnemius, musculus soleus, musculus fibularis a tibialis anterior. Na noze pak do krátkých extenzorů na dorzu nohy a do svalů planty. Pokud je přítomen defekt, tak také do okrajů defektu. Proces ACT s využívanými nebo potenciálně zvažovanými buňkami je znázorněn na obrázku 2.

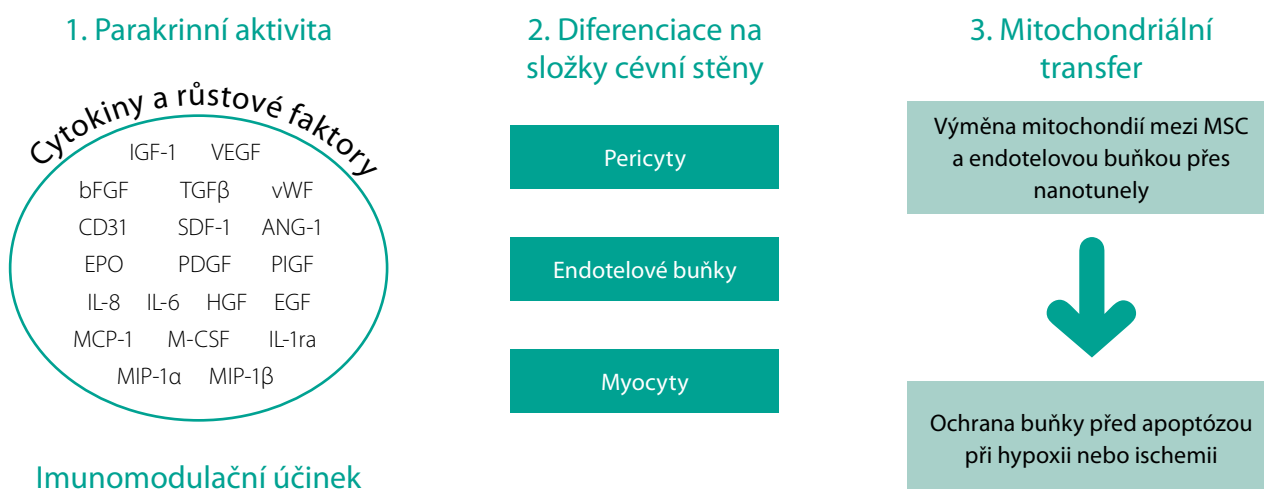
Způsoby aplikace kmenových buněk

Již několik studií porovnávalo různé způsoby podání kmenových buněk. Dodnes neexistuje jednotný názor, jestli je některý způsob efektivnější. Výhodou intramuskulárního podání je možnost vpravit buňky přímo do místa defektu, přičemž se stimuluje i parakrinní aktivita a uvolní se angiogenní cytokiny, jako dříve zmíněné VEGF, bFGF, placentární růstový faktor (PIGF) a (MCP-1) (21). Studie publikovaná Dongem et al. dokonce prokázala signifikantně zvýšené hodnoty ABI a TcPO₂ po podání MSC intramuskulárně. U intraarteriálního podání byly popsány horší výsledky u sledovaných parametrů (37). Na druhou stranu studie publikované Klepance et al. neprokázala signifikantní rozdíl v zachování končetiny a hojení defektů mezi intramuskulárním a intraarteriálním podáním kmenových buněk (38). Celkově je nevýhodou lokálního podání KB jejich častá apoptóza. Méně časté je systémové podání kmenových buněk. U intravenózního systémového podání dochází k signifikantnímu efektu prvního přechodu plícemi, kde část buněk zůstává, a proto je potřebná dávka aplikovaných buněk, aby se co největší větší množství dostalo k místu ischemie. Možností, jak se tomuto efektu vyhnout, je intraarteriální systémové podání, které je pro aplikaci mnohem náročnější (21).

Možnost kombinované terapie ACT a HBOT

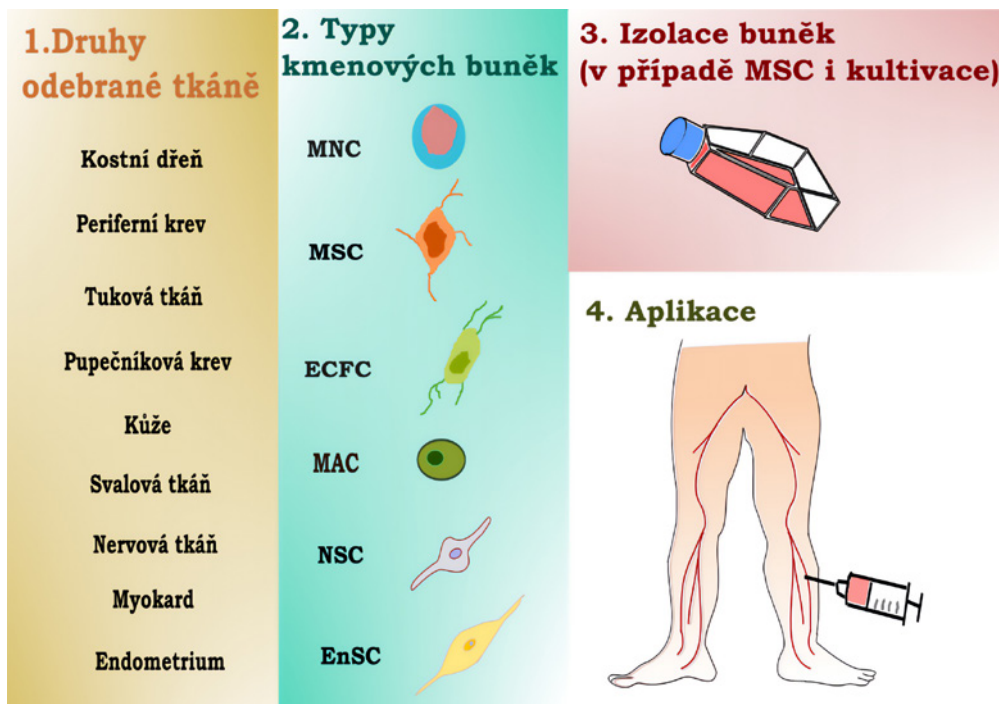
Jak bylo výše zmíněno, HBOT je jednou z možných postupů u no-option pacientů s CLTI. Další vystávající otázkou je využití HBOT v kombinaci

Obr. 1. Mechanismy účinku mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v rámci autologní terapie kmenovými buňkami (21)



IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor 1; VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor; bFGF – fibroblastový růstový faktor; TGFβ – transformující růstový faktor; vWF – von Willebrandův faktor; CD – the cluster of differentiation; SDF-1 – chemokinový faktor-1 odvozený od stromálních buněk; ANG-1 – angiopoetin-1; EPO – erythropoetin; PDGF – destičkový růstový faktor; PIGF – placentární růstový faktor; IL – interleukin; HGF – růstový faktor hepatocytů; EGF – epidermální růstový faktor; MCP-1 – monocytní chemotaktický protein-1; M-CSF – kolonie stimulující faktor makrofágů; IL-1ra – antagonist receptoru pro IL-1; MIP-1α – makrofágový zánětlivý protein-1 alpha; MIP-1β – makrofágový zánětlivý protein-1 beta

Obr. 2. Aplikace, druhy odebrané tkáně a typy kmenových buněk (upraveno podle Beltrán-Camacho L, Rojas-Torres M, Durán-Ruiz MC. Current Status of Angiogenic Cell Therapy and Related Strategies Applied in Critical Limb Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2021;26(22):2335.)



MNC – mononukleární frakce buněk (mononuclear cells); MSC – mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cell); ECFC – endoteliální kolonie formující buňky (endothelial colony forming cells); MAC – myeloidní angiogenní buňky (myeloid angiogenic cells); NSC – neuronální kmenové buňky (neural stem cell); EnSC – endometriální kmenové buňky (endometrial-derived stem cells)

s ACT. V roce 2019 byla publikovaná zajímavá experimentální studie, při které byli použiti potkani s CLTI, kterým byly aplikovány EPC, dále potkani, na kterých byla použita HBOT a skupina s kombinovanou aplikací EPC a HBOT. Jako kontrolní skupina byli vybráni potkani bez CLTI a extra skupinou byli potkani s CLTI, kterým bylo podáváno kultivační médium. Tahle studie přišla s několika tvrzeními. Za prvé zjistili, že hladina cirkulujících EPC byla nižší u potkanů s CLTI oproti kontrolní skupině, avšak hladina EPC vzrostla nejvíce u skupiny s kombinovanou aplikací EPC i HBOT. Ze toho se dá usoudit, že HBOT kromě jiných účinků zvyšuje počet EPC jejich mobilizací z kostní dřeně. Také biomarkery angiogeneze byly nejvyšší u skupiny s kombinovanou aplikací, z toho vyplývá, že HBOT neúčinkuje jen lokálně, ale i systémově. Dále počet EPC v místě ischemie byl vyšší u skupiny s HBOT a EPC, proto předpokládáme, že HBOT zvyšuje expresi EPC v zóně ischemie. A nakonec krevní průtok byl lepší u kombinované aplikace než u ostatních, což potvrzuje synergický efekt EPC a HBOT (39).

Ačkoliv jsou výsledky této studie slibné, je jasné, že je zapotřebí provedení klinických studií na dostatečném počtu pacientů se zhodnocením všech parametrů, jako je např. vliv na transkutánní tenzi kyslíku ($TcPO_2$), hojení ran a snížení vysokých amputací. Otázkou je, zda je možné těchto benefitů kombinované léčby dosáhnout pouze s EPC, nebo i s jinými kmenovými buňkami. Z praktického hlediska by určitě byla nevyhnutelná spolupráce vícero pracovišť, aby nebyla porušena časová návaznost těchto dvou typů léčby. Důležitým by pak také byla compliance pacientů podrobit se oběma léčebným metodám.

Parametry hodnotící ACT a její úspěšnost

Pro posuzování úspěšnosti ACT jsou sledovány parametry ischemie. Nejčastěji se používá $TcPO_2$, která reflektuje množství kyslíku, které

přechází z kapilár přes kůži k „Clark-type“ elektrodám na stranu měření (40). Referenční hodnoty jsou 50–70 mm Hg, hodnoty < 40 mm Hg svědčí pro komplikované hojení defektů a hodnoty < 30 mm Hg poukazují na CLTI (41). Další možností posouzení efektu ACT je magnetická rezonanční spektroskopie s izotopem ^{31}P , která sleduje změny metabolismu svalů nejen v klidu, ale i během fyzické námahy a po ní, což činí tuhle metodu jedinečnou (42). Hodnocení ABI u diabetických pacientů není spolehlivé pro častý výskyt mediokalcinózy, která vede k falešně zvýšeným hodnotám ABI (43). Kromě parametrů ischemie se dále hodnotí parametry rychlosti hojení defektů, počet vysokých amputací provedených po aplikaci kmenových buněk, čas po ACT bez potřeby amputace (amputation-free survival – AFS), redukce bolesti (pokojových i klaudikačních) a zlepšení kvality života pacientů (quality of life – QoL).

První studie, která představila výsledky intramuskulárního podání BMMNC nebo PBMNC, byla publikovaná v Lancetu v roce 2002. Studie prokázala lepší hodnoty ABI, $TcPO_2$ a redukci bolesti. Zlepšení perfuze bylo potvrzeno i angiogramem. U skupiny pacientů, kterým byly aplikovány PBMNC, se pozorovalo méně výrazné zlepšení perfuze než u pacientů s BMMNC (44).

Studie TACT byla první studií, která popisovala benefit aplikace MSC do ischemické končetiny. Prokázala, že 60 % pacientů s kritickou končetinovou ischemií v průběhu tří let po ACT nepodstoupilo amputační zákrok. Popisovala také redukci velikosti defektů, redukci bolesti a prodloužení klaudikační vzdálenosti. Změny v ABI a $TcPO_2$ nebyly signifikantní (45).

Studie PROVASA, u které byly aplikovány BMMNC intraarteriálně, potvrdila benefit léčby pro redukci bolesti postižené končetiny a urychlení hojení chronických defektů. Avšak u pacientů s gangrénou nebo

kritickou ischemií stupně šest dle Rutheforda se benefit dle této studie nepotvrdil. Tato studie ještě poukázala na fakt, že lepší hojení defektů je pozorováno při opakovaní aplikaci kmenových buněk (46). V roce 2015 byla publikována studie JUVENTAS, která sledovala benefit ACT, přesněji BMMNC vs. placebo, přičemž buňky byly aplikované opět intraarteriálně. Podle této studie ACT nevede ke snížení počtu vysokých amputací. Ve skupině pacientů, kterým byly podávány BMMNC, došlo ke zlepšení kvality života, redukcí klidové bolesti a zvýšení hodnot ABI i TcPO₂, avšak rozdíl mezi skupinami nebyl signifikantní (47). Je však potřeba dodat, že tato studie měla zařazeny i pacienty se stenózami proximálně od a. poplitea, přičemž ACT je indikována hlavně u pacientů s postižením bérce a distálně. Aplikovala také menší objem buněčné suspenze, než je standardem (jenom 50 ml oproti standardním 250 ml). Na druhou stranu jedna z nejnovějších metaanalýz, kterou publikoval Pu et al., potvrdila u pacientů léčených ACT signifikantní pokles počtu vysokých amputací, zlepšení ABI, TcPO₂ a snížení klidových bolestí (48). Metaanalýza od Sun et al., 2022 dokonce pozorovala i zlepšení hojení defektů a redukcí klaudikačních bolestí (25). Ve studii Panunzi et al. byla pozorována redukce bolesti po aplikaci PBMNC, snížené užívání opiátů a opětovné možnosti chůze (3).

V roce 2016 až 2019 na našem pracovišti proběhla randomizovaná studie, ve které jsme posuzovali účinek ACT u pacientů s CLTI v porovnání s pacienty léčenými konzervativně. Hodnotili jsme proces hojení ulcerací, výskyt amputací a stupeň bolesti u pacienta dle Visual Analogue Score (VAS). Do studie bylo zařazeno celkem 40 pacientů. U těch, kteří podstoupili ACT (n = 21), byl pozorován vzestup hodnot TcPO₂ oproti pacientům léčených standardně (n = 19), kde vzestup pozorován nebyl. Signifikantně se také zlepšilo hojení defektů a zmírnil stupeň bolesti. Rozdíl v počtu vysokých amputací jsme však na tomto počtu pacientů nepozorovali (43).

LITERATURA

1. Ruemenapf G, Murbach S, Sigl M. Therapeutic Alternatives in Diabetic Foot Patients without an Option for Revascularization. *J Clin Med*. 2022;11(8):2155.
2. Edmonds M, Manu C, Vas P. The current burden of diabetic foot disease. *J Clin Orthop Trauma*. 2021;17:88-93.
3. Panunzi A, Madotto F, Sangalli E, et al. Results of a prospective observational study of autologous peripheral blood mononuclear cell therapy for no-option critical limb-threatening ischemia and severe diabetic foot ulcers. *Cardiovasc Diabetol*. 2022;21(1):196.
4. Lindquist J, Schramm K. Drug-Eluting Balloons and Drug-Eluting Stents in the Treatment of Peripheral Vascular Disease. *Semin Intervent Radiol*. 2018;35(5):443-452.
5. Jogsma H, Bekken JA, Akkersdijk GP, et al. Angiosome-directed revascularization in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2016;65(4):1208-1219.
6. Ciccone MM, Notarnicola A, Scicchitano P, Sassara M, Carbonara S, Maiorano M, Moretti B. Shockwave therapy in patients with peripheral artery disease. *Adv Ther*. 2012;29(8):698-707.
7. Saarinen E, Kauhanen P, Söderström M, et al. Long-term Results of Inframalleolar Bypass for Critical Limb Ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016;52(6):815-822.
8. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, Bell J et al. BASIL Trial Participants. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 366(9501):1925-1934.
9. Yunir E, Kurniawan F, Rezaprasga E, et al. Autologous Bone-Marrow vs. Peripheral Blood Mononuclear Cells Therapy for Peripheral Artery Disease in Diabetic Patients. *Int J Stem Cells*. 2021;14(1):21-32.
10. Verwer MC, Wijnand JGJ, Teraa M, et al. Long Term Survival and Limb Salvage in Patients With Non-Revascularisable Chronic Limb Threatening Ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2021;62(2):225-232.
11. Ilyas S, Powell RJ. Management of the no-option foot: Deep vein arterialization. *Semin Vasc Surg*. 2022;35(2):210-218.
12. Kessler L, Bilbault P, Ortega F, et al. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study. *Diabetes Care*. 2003;26(8):2378-82.

Sledované komplikace při terapii

Murphy et al. se ve své studii zaměřili primárně na bezpečnost ACT s aplikací BMMNC a po dvanácti měsících pozorovali jen 2 případy nežádoucích událostí. U jednoho pacienta se objevily ST deprese bez elevace kardiospecifických markerů s poklesem hemoglobinu s následnou úpravou po transfuzi. U druhého případu byly angiograficky sledované mikroembolismy, které byly úspěšně řešené chirurgicky (49). Jako nežádoucí události při realizaci ACT na našem pracovišti jsme pozorovali inguinální hematom, periferní otok v souvislosti s intramuskulárními injekcemi, hypotenzi při mobilizaci po výkonu a jeden případ dočasně zhoršení kritické ischemie vlivem otoku. Obecně lze tedy shrnout, že terapie kmenovými buňkami je nejen efektivní, ale i dobře tolerovaná a bezpečná metoda (48).

Závěr

Buněčná terapie má nezastupitelné místo v terapii pacientů s no-option CLTI. Nejnovější studie již potvrdily, že ACT zlepšuje parametry ischemie a snižuje počet vysokých amputací, i když ve starších studiích existují ohledně některých benefitů ACT diskrepance. U pacientů je pozorovaná redukce klidových i klaudikačních bolestí, a tím se zvyšuje kvalita jejich života. Stále je však ještě mnoho výzev a nových možností v rámci využití kmenových buněk u pacientů s CLTI. Probíhá několik studií, které stále detailněji popisují benefity, další možnosti i omezení této terapie.

Podpořeno projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, číslo projektu: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a projektem MZO 00023001.

13. Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine: recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. *Diving Hyperb Med*. 2017;47(1):24-32.
14. Santema KTB, Stoekenbroek RM, Koelemay MJW, et al. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of ischemic lower extremity ulcers in patients with diabetes: Results of the DAMOCLES multicenter randomized clinical trial. Commentary on article in *Diabetes Care*. Undersea Hyperb Med. 2018;45(1):114-115.
15. Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V. Syndrom diabetické nohy- prevence, diagnostika a terapie. Adaptovaný doporučený postup na základě mezinárodních guidelines. *Geum: Semily* 2022: 126-127. ISBN: 978-80-87969-61-8.
16. Ho VT. Gologorsky R. Kibrik P. Open, percutaneous, and hybrid deep venous arterialization technique for no-option foot salvage. *J Vasc Surg*. 2020;71(6):2152-2160.
17. Khodayari S, Khodayari H, Barough-Ebrahimi S. Stem Cell Therapy in Limb Ischemia: State-of-Art, Perspective, and Possible Impacts of Endometrial – Derived Stem Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10. Dostupné z DOI <<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.834754>>
18. Liew A, Bhattacharya V, Shaw J, et al. Cell therapy for critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Angiology*. 2016;67(5):444-55.
19. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, et al. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(5):369-76.
20. Hölig K. G-CSF in healthy allogeneic stem cell donors. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(4):225-35.
21. Lozano Navarro LV, Chen X, Viviescas LTG, et al. Mesenchymal stem cells for critical limb ischemia: their function, mechanism, and therapeutic potential. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):345.
22. Galea C, Riva N, Calleja-Aguis J. Non-gynaecological applications of menstrual-derived stem cells: a systematic review. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2022; 14(1):10-29.
23. Kim JH, Park JS. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Dev. Reprod*. 2017;21(1):1-10.

24. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31.
25. Sun Y, Zhao J, Zhang L, et al. Effectiveness and safety of stem cell therapy for diabetic foot: a meta-analysis update. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):416.
26. Lu D, Chcen B, Linag Z, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;92(1):26-36.
27. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6(5):1316-1320.
28. Sullivan, R, Dailey T, Duncan K, et al. Peripheral Nerve Injury: Stem Cell Therapy and Peripheral Nerve Transfer. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2101. Dostupné z DOI <<https://doi.org/10.3390/ijms17122101>>
29. Fuentealba LC, Obernier K, and Alvarez-Buylla A. Adult Neural Stem Cells Bridge Their Niche. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):698-708.
30. Kaneko N, Kako E, and Sawamoto K. Prospects and Limitations of Using Endogenous Neural Stem Cells for Brain Regeneration. *Genes (Basel)*. 2011;2(1):107-30.
31. Muir K, Bulters D, Willmot M. Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(4):396-401.
32. Cui CH, Uyama, T, Miyado K, et al. Menstrual Blood-Derived Cells Confer Human Dystrophin Expression in the Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy via Cell Fusion and Myogenic Transdifferentiation. *Mol Biol Cell*. 2007;18(5):1586-94.
33. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.
34. Göthert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, et al. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood*. 2004;104(6):1769-77.
35. Purhonen S, Palm J, Rossi D, et al. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(18):6620-5.
36. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7(4):452-64.
37. Dong Z, Chen B, Fu W, et al. Transplantation of purified CD34+ cells in the treatment of critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2013;58(2):404-411.
38. Klepanec A, Mistrík M, Altaner C. No difference in intra-arterial and intramuscular delivery of autologous bone marrow cells in patients with advanced critical limb ischemia. *Cell Transplant*. 2012;21(9):1909-18.
39. Hsu SL, Yin TC, Shao PL, et al. Hyperbaric oxygen facilitates the effect of endothelial progenitor cell therapy on improving outcome of rat critical limb ischemia. *Am J Transl Res*. 2019;11(4):1948-1964.
40. Fejfarová V, Matuška J, Jude E, et al. Stimulation TcPO₂ Testing Improves Diagnosis of Peripheral Arterial Disease in Patients With Diabetic Foot. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12. Available from: DOI <<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.744195>>
41. Baláž D, Komorníková A, Sabaka P, et al. Význam transkutánného monitorovania tkanivového kyslíka u pacienta s diabetes mellitus s jeho komplikáciami. *Vnitř Lék*. 2015;61(2):106-113.
42. Hájek M, Šedivý P, Kovář J, et al. Dynamická in vivo ³¹P MR spektroskopie člověka. *Chem Listy*. 2017;111:516-523.
43. Dubský M, Husáková J, Bém R, et al. Comparison of the impact of autologous cell therapy and conservative standard treatment on tissue oxygen supply and course of the diabetic foot in patient with chronic limb ischemia: A randomized controlled trial. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 29. Available from: DOI <<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.888809>>
44. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360 (9331):427-35.
45. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, et al. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*. 2008;156(5):1010-8.
46. Walter DH, Krankenberg H, Balzer J, et al. Intraarterial Administration of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Critical Limb Ischemia. A Randomized-Start, Placebo-Controlled Pilot Trial (PROVASA). *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4(1):26-37.
47. Teraa M, Sprengers RW, Schutgens REG, et al. Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplement. *Circulation*. 2015;131(10):851-60.
48. Pu H, Huang Q, Zhang X. A meta-analysis of randomized controlled trials on therapeutic efficacy and safety of autologous cell therapy for atherosclerosis obliterans. *J Vasc Surg*. 2022;75(4):1440-1449.
49. Murphy MP, Lawson JH, Rapp BM, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy is safe and promotes amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2011;53(6):1565-74.