

Cell therapy of limb ischemia

Bunková liečba končatinovej ischémie

Maďarič J

Klinika kardiológie a angiológie NÚSCH, a.s. a LF SZU, Bratislava, Slovenská republika

Maďarič J. **Cell therapy of limb ischemia.** Cardiology Lett. 2017;26(1):5–13

Abstract. Cell therapy has been proposed as an alternative strategy in patients with critical limb ischemia not eligible for endovascular or surgical revascularization. Several pre-clinical and clinical studies suggest that delivery of stem cells with regenerative potential and paracrine ability can improve tissue perfusion and thus prevent amputation via the induction of capillary or collateral growth in a process called “therapeutic angiogenesis”. Many cell types have been tested, but results of most clinical trials to date rely on the use of adult autologous bone marrow-derived mononuclear cells or cultured peripheral blood-derived proangiogenic mononuclear cells, all typically delivered unaltered in their native state. Of increasing interest are mesenchymal stem cells with the capability for multipotent differentiation, cytoprotection, and damaged tissue restoration. Although the meta-analyses of randomized clinical trials demonstrate a positive benefit-to-risk ratio of cell-based therapy, its promising potential needs to be confirmed by larger randomized, placebo-controlled trials. This paper provides current evidence about cell therapy of limb ischemia and appraises some of the future perspectives of regenerative therapy. Fig. 3, Tab. 4, Ref. 39, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: critical limb ischemia – angiogenesis – stem cells – neovascularization – paracrine activity

Maďarič J. **Bunková liečba končatinovej ischémie.** Cardiology Lett. 2017;26(1):5–13

Abstrakt. Bunková liečba sa zvažuje ako alternatívny liečebný postup u pacientov s kritickou končatinovou ischémiou nevhodných na endovaskulárnu alebo chirurgickú revaskularizáciu. Viacero predklinických a klinických štúdií naznačuje, že podanie kmeňových buniek s regeneračným potenciálom a parakrinnou schopnosťou môže zlepšiť tkanivovú perfúziu a predísť končatinovej amputácii indukciou rastu kapilár a kolaterál v procese nazývanom „terapeutická angiogenéza“. Testovaných bolo viacero bunkových typov, avšak výsledky väčšiny štúdií sú založené na použití dospelých autológnych mononukleárných buniek kostnej drene, alebo kultivovaných proangiogénnych mononukleárných buniek z periférnej krvi podávaných v ich natívnom stave. Zvýšený záujem sa venuje mezenchýmovým kmeňovým bunkám so schopnosťou multipotentnej diferenciácie, cytoprotekcie a regenerácie poškodeného tkaniva. Hoci metaanalýzy randomizovaných klinických štúdií preukázali pozitívny pomer benefitu a rizika bunkovej liečby, tento sľubný potenciál je potrebné potvrdiť väčšími randomizovanými, placebom kontrolovanými štúdiami. Predkladaná práca podáva výber súčasných poznatkov o bunkovej terapii končatinovej ischémie a niektoré perspektívy budúceho vývoja regeneračnej liečby. Obr. 3, Tab. 4, Lit. 39, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: kritická končatinová ischémia – angiogenéza – kmeňové bunky – parakrinná aktivita

Cieľom regeneračnej medicíny je obnova štruktúry a funkcie zlyhávajúcich orgánov a tkanív podporou a intenzifikáciou prirodzených reparačných procesov. Je jednou z najslubnejších a kľúčových oblastí modernej medicíny v 21. storočí.

V ostatných dvoch desaťročiach nastal progres vo výskume, či už bunkovej alebo génovej terapie širokej oblasti ochorení, kde súčasné spôsoby liečby neposkytujú požadované výsledky. Intenzívne sa skúmajú možnosti uplatnenia regeneračných

postupov u pacientov s infarktom myokardu, srdcovým zlyhávaním, končatinovou ischémiou, cievnu mozgovou príhodou, diabetes mellitus, alebo s neuro-degeneratívnymi ochoreniami.

V oblasti vaskulárnej medicíny sa po neuspokojivých výsledkoch štúdií zameraných na génovú terapiu orientuje výskum predovšetkým na testovanie účinnosti rôznych rastových faktorov a bunkových liečebných stratégií s cieľom indukcie postnatálnej neovaskularizácie a zlepšenia končatinovej perfúzie. V roku 1997 Asahara a Isner identifikovali špecifickú triedu buniek kostnej drene – endotelové progenitorové kmeňové bunky (EPC – endothelial progenitor cells), ktoré prispievajú k angiogenéze v ischemickom tkanive (1). Prvá klinická štúdia s použitím autológnych kmeňových buniek kostnej drene u pacientov s kritickou končatinovou ischémiou (KKI) bola publikovaná v roku 2002 (2). Následne rýchlo rastúci počet štúdií, od retrospektívnych sledovaní po prospektívne randomizované štúdie, demonštroval povzbudivé výsledky dokladajúce efekt kmeňových buniek na obnovenie krvného prietoku a hojenie defektov kriticky ischemickej končatiny (3, 4). Napriek veľkému progresu v základnom, ako aj klinickom výskume a rozvoju nových technológií, ostáva otázka účinnosti bunkovej alebo inej regeneračnej liečby u pacientov s končatinovou ischémiou otvorenou.

Kritická končatinová ischémia

Kritická končatinová ischémia je koncové štádium periférneho artériového ochorenia dolných končatín (PAO DK) charakterizované ischemickou pokojovou bolesťou, ulceráciami alebo gangrénou a výrazným rizikom straty postihnutej končatiny. Ročná incidencia ochorenia je približne 50 – 1 000 nových prípadov na milión obyvateľov a prevalencia bude narastať s nárastom výskytu diabetes mellitus, so starnutím populácie a pokračujúcim vysokým výskytom fajčenia (5). Približne 20 – 30 % z týchto pacientov je vzhľadom na pokročilosť obliteračného procesu na magistralných artériách nevhodných na štandardnú revaskularizačnú liečbu, ktorá tu má byť liečebnou metódou prvej voľby, alebo zrealizovaná revaskularizácia u nich zlyháva. Zároveň je faktom, že nemáme k dispozícii farmakoterapiu schopnú účinnej prevencie progresie končatinovej ischémie. Približne 30 – 40 % z pacientov

s KKI nevhodných na revaskularizáciu (“no-option critical limb ischemia”) musí do šiestich mesiacov od stanovenia diagnózy podstúpiť vysokú končatinovú amputáciu (nad úroveň členkového kĺbu) a 20 % v tomto časovom období zomiera (5). Predstavuje to asi 100 000 prípadov vysokej končatinovej amputácie v Európskej únii ročne, pričom päťročné prežívania pacientov po vysokej končatinovej amputácii pre KKI je len 30 % (6). Možno preto hovoriť o KKI ako o malígnom ochorení, ktoré predstavuje významnú záťaž pre zdravotný systém. Potreba vývoja nových liečebných postupov v tejto oblasti je urgentná.

Koncept bunkovej regeneračnej liečby

Multifunkčné kmeňové bunky sú nediferencované tkanivové prekursor, ktorých hlavnou charakteristikou je vysoký potenciál sebaobnovy a schopnosť diferenciácie smerom k rôznym bunkovým líniam v závislosti od stimulov z okolia prostredia. Sú prítomné takmer vo všetkých tkanivách a sú hlavnou súčasťou endogénnych reparačných procesov. Kmeňové bunky možno rozdeliť na embryonálne a dospelé. Embryonálne kmeňové bunky sú totipotentné prekursor, schopné diferenciácie na akýkoľvek bunkový typ ľudského tela. Preto ich potenciálne použitie v klinickej medicíne je spojené so zásadnými etickými výhradami. Dospelé kmeňové bunky sú multipotentné, schopné diferenciácie na niektoré línie špecializovaných buniek a predovšetkým o tieto bunky sa opiera dnešná regeneračná medicína (**tabuľka 1**).

Dospelé kmeňové bunky možno rozdeliť na kmeňové bunky kostnej drene, cirkulujúce kmeňové bunky a tkanivové (rezidentné) kmeňové bunky. Kmeňové bunky z kostnej drene obsahujú: 1. heterogénnu skupinu hematopoetických buniek, ktorá je základom pre všetky hematopoetické bunkové línie; 2. multipotentné dospelé progenitorové bunky; 3. mezenchýmové (MSC – mesenchymal stem cells) alebo stromálne bunky s vysokou parakrinnou aktivitou a schopnosťou diferenciácie na rôzne somatické bunkové línie (7).

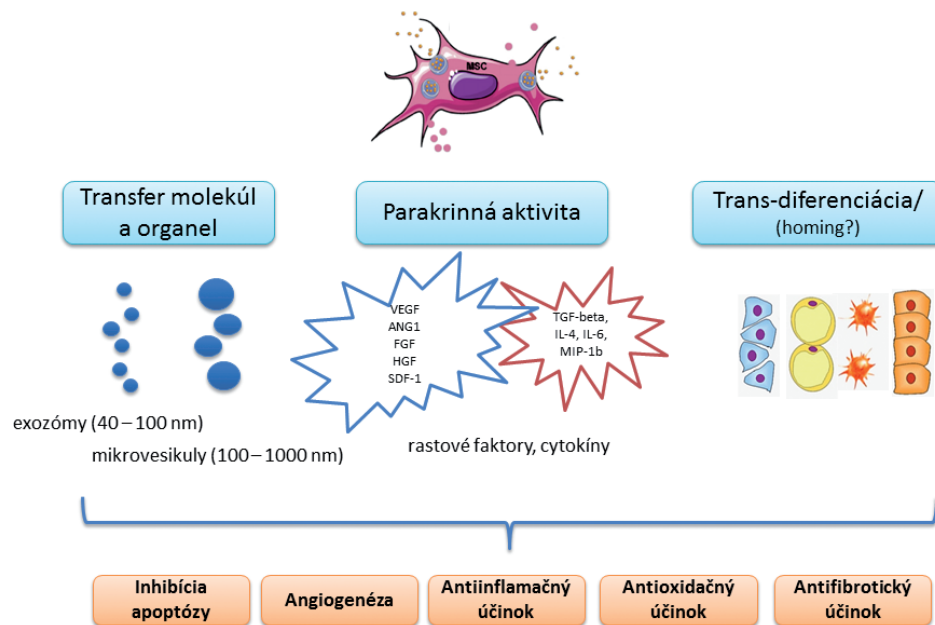
Mezenchýmové kmeňové bunky (MSC). Predovšetkým MSC sa dnes považujú za kľúčové terapeutické bunky v regeneračných procesoch. Ide o nehematopoetické bunky prítomné v kostnej dreni, tukovom tkanive a iných tkanivách, charakterizované expresiou povrchových markerov CD44,

Tabuľka 1 Embryonálne a dospelé kmeňové bunky

Table 1 Embryonic and adult stem cells

	Embryonálne kmeňové bunky	Dospelé kmeňové bunky
Zdroj	Blastocysta, embryo	Kostná dreň, periférna krv po mobilizácii buniek z drene, tukové tkanivo, pупоčí níková krv, placenta atď.
Fyziologická funkcia	Prekursor všetkých buniek organizmu	Zodpovedné za regeneráciu a opravu tkanív (proces starnutia)
Diferenciačný potenciál	Široký (totipotentné bunky)	Nižší (multipotentné bunky)
Etické hľadisko	Významné etické námietky	Etické námietky nie sú opodstatnené

Mechanizmy pôsobenia MSC



Obrázok 1 Mechanizmy účinku mezenchýmových buniek

Figure 1 Mechanisms of action of mesenchymal stem cells

MSC – mezenchýmové bunky

CD105, CD90, CD166 a negativitou pre hematopoetické markery CD34, CD45 a HLA-DR. Považovali sa najmä za bunky podporujúce hematopoézu v kostnej dreni (stromálne bunky), ale postupne boli identifikované aj ich výrazné proliferatívne vlastnosti a schopnosť diferenciácie na rôzne typy bunkových línii (adiopgénne, osteogénne, chondrogénne bunky, bunky kostrových svalov, vaskulárne hladké svalové bunky, neurálne prekursor, kardiomyocyty, perivaskulárne bunky), a to v závislosti od stimulov z okolitého prostredia a potrieb organizmu. Za hlavný mechanizmus, ktorým MSC uplatňujú svoju regeneračnú funkciu, sa považuje parakrinný efekt – sekrécia solubilných faktorov s rôznymi funkciami, či už podpora angiogenézy, modulácia zápalu, imunitnej reakcie, protekcia proti bunkovej apoptóze, alebo stimulácia endogénnych progenitorových buniek (**obrázok 1**). MSC sú schopné expresie a sekrécie cytokínov a rastových faktorov aj v hypoxických podmienkach a ich pôsobením stimulujú migráciu endotelálnych buniek, formáciu vaskulárnych tubulárnych štruktúr a vo forme pericytov stabilizujú novo vytvorené cievné štruktúry (8 – 10).

Endotelové progenitorové bunky (EPC). Endotelové progenitorové bunky sú v kostnej dreni prítomné ako časť mononukleárnej hematopoetickej bunkovej frakcie, cirkulujú v periférnej krvi a nachádzajú sa aj vo forme rezidentných kmeňových buniek v takmer všetkých tkanivách s kapaci-

tou diferenciácie smerom k endotelovej bunkovej línii. Za fyziologických podmienok je počet cirkulujúcich EPC malý a zvyšuje sa ako reakcia na ischémiu mobilizáciou z kostnej drene po sekrécii proangiogénnych cytokínov ako vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), stromálny bunkami derivovaný faktor 1(SDF-1), alebo hypoxiou indukovaný faktor 1 (HIF-1). EPC sú priťahované do miesta ischémie a zúčastňujú sa na angiogenéze sekréciou interleukínov, rastových faktorov a ďalších cytokínov. Aktivujú rezidentné kmeňové bunky, priťahujú cirkulujúce progenitorové bunky a inhibujú bunkovú apoptózu. Týmto nepriamymi mechanizmami akcelerujú formáciu cievnej siete a potencujú hojaci proces (11). Všeobecne sú EPC charakterizované expresiou markerov tak hematopetickej, ako aj endotelovej bunkovej línie (CD34, CD133, VEGF-receptor-2, von Willebrandov faktor a endotelová NO syntáza /eNOS/), no ich presná definícia nie je jednoznačná. Viacerí autori preukázali priamy vzťah medzi počtom podaných CD34+ buniek a klinickým benefitom bunkovej liečby (12, 13). Iní autori demonštrovali pozitívny funkčný efekt CD133+ buniek u pacientov po infarkte myokardu (14).

Súčasný najviac akceptovaný koncept angiogenézy a regenerácie predpokladá vzájomnú kooperáciu rôznych bunkových typov s monocytovým fenotypom, predovšetkým MSC a EPC, pôsobiacich synergicky a predovšetkým produkciu

a sekréciou angiogénnych rastových faktorov (15). Vo vzájomnej koordinácii vedú k regenerácii poškodených tkanív a podpore procesu hojenia ako odpoveď na ischemiu a zápal. Možné mechanizmy bunkovej liečby končatinovej ischemie uvádza **tabuľka 2**.

Výsledky klinických štúdií bunkovej liečby u pacientov s končatinovou ischemiou

Po sľubných výsledkoch predklinických prác začal narastať počet klinických štúdií analyzujúcich bezpečnosť a efektivitu bunkovej liečby u pacientov s KKI. Testované boli predovšetkým mononukleárne bunky kostnej drene (BM-MNC – bone marrow mononuclear cells) (16, 17), mononukleárne bunky periférnej krvi (PB-MNC – peripheral blood mononuclear cells) po stimulácii rastovými faktormi (18), alebo autológne MSC (19, 20). Hlavnými sledovanými parametrami boli redukcia vysokej končatinovej amputácie (nad úrovňou členkového kĺbu), hojenie defektu, vzostup členkovo-ramenného indexu (ABI), vzostup transkutánneho tlaku kyslíka ($tcPO_2$), redukcia bolesti končatiny a prežívanie bez vysokej amputácie (AFS – amputation free survival). Hlavnou limitáciou týchto štúdií však je ich heterogenosť. Rozdiely v skúmanej populácii (aterosklerotická etiológia obliteračného procesu, respektíve Morbus Buerger, ale aj rozdielna pokročilosť končatinovej ischemie), v typoch použitých buniek, v zdroji buniek (kostná dreň, periférna krv, tukové tkanivo), v spôsobe aplikácie buniek (intramuskulárna alebo intraarteriálna aplikácia), v sledovaných cieľových parametroch. Významnou limitáciou je aj nízky počet zaradených pacientov v jednotlivých štúdiách. Vzhľadom na samotnú účinnosť bunkovej liečby prinášajú najhodnotnejšie informácie randomizované kontrolované štúdie (RCT) a predovšetkým placebom kontrolované štúdie.

V metaanalýze, v ktorej bolo spracovaných 45 štúdií vrátane siedmich randomizovaných kontrolovaných štúdií (RCT), bolo hodnotených 1 272 pacientov, ktorí absolvovali bunkovú liečbu. Títo pacienti mali významne nižší výskyt vysokej končatinovej amputácie v porovnaní s kontrolnými súbormi (14 % vs 28 %, $p = 0,002$) pri významnej redukcii

končatinovej bolesti a zlepšení hojenia ischemických defektov. Súčasne došlo k významnému zlepšeniu funkčných parametrov, ako ABI, $tcpO_2$, alebo klaudikačná vzdialenosť. Celkový výskyt komplikácií bol nízky (4,2 %) bez zvýšenia mortality a bez zvýšenia výskytu malignít v porovnaní s bežnou populáciou (3).

Metaanalýza dvanástich RCT hodnotila 510 pacientov s KKI liečených bunkovou terapiou. V šiestich štúdiách boli použité BM-MNC, v dvoch MSC z kostnej drene, dve štúdie PB-MNC po mobilizácii stimuláciou faktorom G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), jedna štúdia použila Ixmyelocel-T bunky (koncentrát autológnych buniek kostnej drene po ich expanzii, predovšetkým CD90+ MSC bunky a CD14+ monocyty a aktivované makrofágy). Výsledky ukázali priaznivý efekt bunkovej liečby na redukciu končatinovej bolesti, na klaudikačný interval, ABI, $tcpO_2$ ($p < 0,0001$). Po podaní bunkových koncentrátov došlo k redukcii vysokej končatinovej amputácie s relatívnym rizikom amputácie RR 0,58 (95 % CI, 0,40 – 0,84; $p = 0,004$). Ak však boli analyzované len placebom kontrolované štúdie, nebol prítomný významný efekt na najdôležitejšie klinické parametre – na redukciu končatinovej amputácie (RR = 0,78; 95 % CI, 0,40 – 1,51; $p = 0,46$), ani na AFS (RR = 1,16; 95 % CI, 0,92 – 1,48; $p = 0,22$) (4).

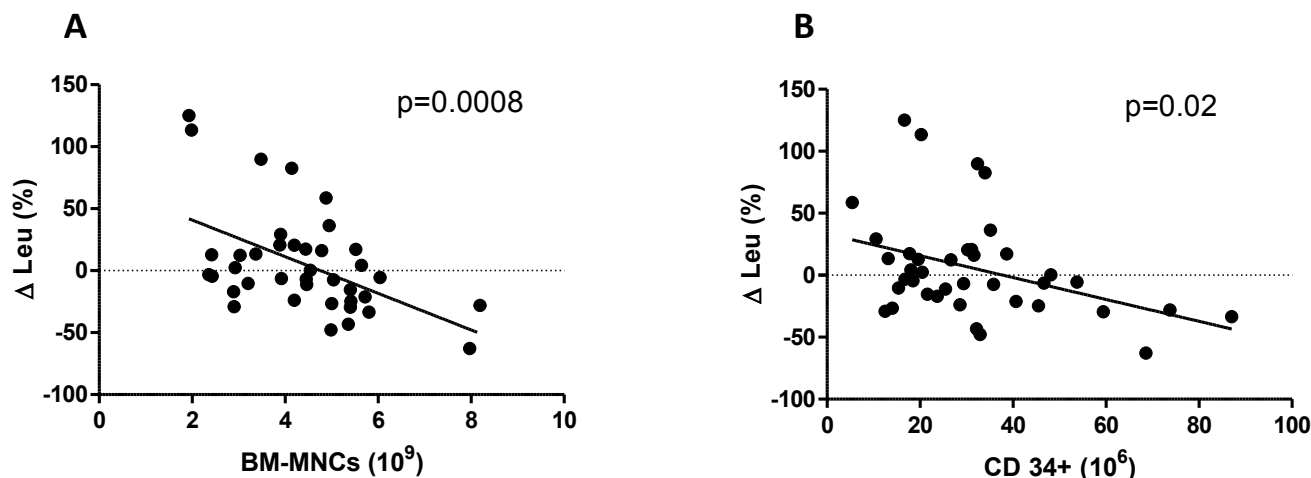
Jednou z posledných publikovaných randomizovaných placebom kontrolovaných štúdií bola štúdia JUVENTAS, ktorá testovala efekt opakovanej intraarteriálnej aplikácie (tri aplikácie v trojtýždňových intervaloch) autológnych BM-MNC u pacientov s KKI bez možnosti revaskularizácie (21). Štúdia nepreukázala benefit bunkovej liečby v porovnaní s placebom, avšak celkový počet podaných buniek bol niekoľkonásobne nižší ako v prácach s účinnou bunkovou liečbou (13, 22). Poukazuje to na už uvedenú výraznú heterogenosť medzi jednotlivými štúdiami a testovanými postupmi a ich problematické vzájomné porovnávanie. Takže výsledky väčšiny realizovaných štúdií demonštrujú pozitívny pomer benefitu a rizika bunkovej liečby u vysokorizikovej populácie pacientov s KKI. Zdôrazňujú jej sľubný potenciál, ktorý však treba potvrdiť väčšími randomizovanými a placebom kontrolovanými štúdiami s dlhším sledovaním na zhodnotenie krátkodobej

Tabuľka 2 Mechanizmy bunkovej liečby končatinovej ischemie

Table 2 Mechanisms of cell therapy of limb ischemia

Mechanizmus	Proces
Angiogenéza/vaskulogenéza	Novotvorba kapilár sprostredkovaná podanými/ cirkulujúcimi/rezidentnými kmeňovými bunkami (EPC, MSC)
Arteriogenéza (?)	Tvorba kolaterál z prexistujúcich arteriál indukovaná parakrinným účinkom stromálnych buniek a strihovým napätím (<i>shear stress</i>)
Anti-apoptóza	Prevenčia alebo inhibícia bunkovej smrti pomocou anti-apoptotických rastových faktorov
Imunomodulácia	Anti-inflamačná a antibakteriálna aktivita
Remodelácia fibrotického tkaniva	Degradácia fibrotického tkaniva proteázami; podpora syntézy kolagénu v procese hojenia
Zlepšenie ischemickej periférnej neuropatie	Neovaskularizácia, sekrécia cytokínov, možná regenerácia poškodených periférnych nervov pomocou regeneračnej schopnosti MSC

EPC – endotelálne progenitorové bunky, MSC – mezenchýmové kmeňové bunky



Obrázok 2 Pokles koncentrácie leukocytov v periférnej krvi šesť mesiacov po aplikácii BM-MNC vo vzťahu k počtu podaných mononukleárných buniek (A) a CD34+ buniek (B) u pacientov so záchranou kriticky ischemickej končatiny (n = 39) (33)

Figure 2 Decrease of leukocyte concentration in peripheral blood 6 months after BM-MNC application in relation to number of delivered mononuclear cells (A) and CD34+ cells (B) in patients with saved critically ischemic limb (n=39); (33)

BM-MNC – mononukleárne bunky z kostnej drene; D Leu – zmena počtu leukocytov

a dlhodobej účinnosti a so snahou o zjednotenie vybraných najúčinnnejších liečebných postupov.

Skúsenosti s bunkovou liečbou NÚSCH

Naše pracovisko sa zaoberá klinickým výskumom v oblasti bunkovej liečby KKI od roku 2009 so zameraním na autológne aplikácie BM-MNC s použitím systému SmartPrep2, Harvest Technologies. Centrifugáciou 240 ml aspirátu kostnej drene získavame 40 ml bunkového koncentrátu bohatého na neselektované mononukleárne bunky, v menšej miere trombocyty. V prvej fáze nášho výskumu sa porovnávala účinnosť

a bezpečnosť intramuskulárnej a intraarteriálnej aplikácie, kde sme nezistili významný rozdiel medzi jednotlivými postupmi a teda možnosť použitia oboch spôsobov aplikácie u pacientov s KKI v závislosti od individuálnej situácie (13). Súčasne sme sa v spolupráci s ďalšími pracoviskami zamerali na charakteristiku responderov na bunkovú liečbu a zdefinovali sme parametre, ktorými sme schopní vyšpecifikovať pacientov s predpokladanou dobrou klinickou odpoveďou na podaný bunkový materiál. Poukázali sme na závislosť klinického efektu od počtu podaných mononukleárných kmeňových buniek, ako aj špecificky CD34+ buniek (**obrázok 2**) (22). Špeciálne sa skúmali mezenchýmové bunky v aplikovanom bunkovom koncentráte s bližšou charakteristikou tejto regeneračnej zložky (19). Popri liečbe pacientov s ischémiou dolných končatín sme popísali aj úspešné prípady aplikácie u pacientov s kritickou ischémiou hornej končatiny (23). Napokon sme bližšie opísali zmeny oxidačného stresu a antioxidačnej kapacity u pacientov s KKI pred a po aplikácii kmeňových buniek (24).

Tabuľka 3 Možné prediktory klinickej odpovede na aplikáciu autológnych BM-MNC u pacientov s kritickou končatinovou ischémiou (13, 22)

Table 3 Possible predictors of clinical response on autologous BM-MNC application in patients with critical limb ischemia (13, 22)

Parameter	Dobrá klinická odpoveď	Nedostatočná odpoveď
Vek (roky)	nižší vek (< 60)	vyšší vek (> 70)
CRP (mg/l)	< 10	> 30
Rutherford kategória KKI	5	6
tcpO ₂ (mmHg)	> 15	< 10
Počet CD34+ buniek (10^6)	> 30	< 20
Počet BM-MNC (10^9)	> 4,5	< 4
Atorvastatín (mg)	> 20	< 20

BM-MNC – mononukleárne bunky kostnej drene; CRP – C-reaktívny proteín; KKI – kritická končatinová ischémia; tcpO₂ – tkanivový tlak kyslíka

Kritériá pre bunkovú liečbu končatinovej ischémie

Vzhľadom na výsledky publikovaných štúdií a vlastné skúsenosti môžeme v súčasnosti definovať nasledovné parametre charakterizujúce pacientov s predpokladanou dobrou klinickou odpoveďou na podanie autológneho bunkového koncentrátu kostnej drene (**tabuľka 3**). Zjednodušene možno povedať, že pacienti s najpokročilejšou formou KKI v štádiu Rutherford 6 (rozsiahly tkanivový defekt s veľkou



Obrázok 3 Kriticky ischemická končatina pred aplikáciou BM-MNC a 12 mesiacov po BM-MNC

Figure 3 Critical limb ischemia before application of BM-MNC and 12 months after MN-MNC

A – intraarteriálna aplikácia (intraarterial application), B – intramuskulárna aplikácia (intramuscular application)

Tabuľka 4 Indikačné kritériá a kontraindikácie na bunkovú liečbu kritickej končatinovej ischemie (klinické štúdie)

Table 4 Indication criteria and contraindications to cell therapy of critical limb ischemia (clinical studies)

Indikačné kritériá

KKI definovaná ako ABI $\leq 0,4$, členkový tlak < 50 mmHg a/alebo prstový tlak < 30 mmHg, tcpO₂ < 30 mmHg

Ischemická nehojaca sa kožná lézia – KKI Rutherford štádium 5

Bez možnosti endovaskulárnej alebo chirurgickej revaskularizácie

Kontraindikácie

Prítomnosť malignity v anamnéze

Kritický koronárny nález, nestabilná angína pectoris, EF < 30 %

Koncové štádium chronického ochorenia obličiek

Závažná anémia, leukopénia, trombocytopenia, ochorenia kostnej drene

Najpokročilejšia forma KKI – Rutherford 6 štádium (rozsiahla tkanivová strata)

Dlhodobé užívanie kortikoidov, imunosupresívnej liečby

EF – ejekčná frakcia; KKI – kritická končatinová ischemia

stratou tkaniva), so silnou zápalovou reakciou s vysokým CRP a s nízkym tcpO₂ v mieste ischemie, nie sú vhodní kandidáti na bunkovú liečbu. Zároveň sa zdá, že mladší pacienti s vyššou koncentráciou mononukleárných buniek v podanom koncentráte, predovšetkým EPC a MSC, sú lepšími respondermi a vhodnými kandidátmi na bunkovú liečbu. Pacienti s arteriálnou obliteráciou na podklade Morbus Buerger odpovedajú na bunkovú aplikáciu lepšie ako pacienti s aterosklerotickým obliteračným postihnutím. Pri postupe používanom na našom pracovisku dochádza k nástupu účinnosti bunkovej liečby v zmysle predovšetkým redukcie bolesti, ale aj k indukciu procesu hojenia počas prvého mesiaca od aplikácie s postupným zvyrazňovaním efektu väčšinou po asi šiesty mesiac od aplikácie. Otázka prípadného opakovaného bunkového podania je všeobecne diskutovanou témou. Najčastejšie definované indikačné kritériá a kontraindikácie na bunkovú liečbu KKI vo väčšine klinických štúdií uvádza **tabuľka 4**. **Obrázok 3** predstavuje pacientov pred a 12 mesiacov po intramuskulárnej, respektíve intraarteriálnej aplikácii BM-MNC.

Perspektívy regeneračnej liečby končatinovej ischemie

Pre pacientov s rizikovými faktormi aterosklerózy je charakteristický redukovaný počet a narušená funkcia BM-MNC (25). Zároveň sa predpokladá, že funkčnosť kmeňových buniek klesá s vekom, čo môže imitovať ich terapeutický potenciál a regeneračnú kapacitu (19). Pokles počtu EPC je úmerný závažnosti končatinovej ischemie a dysfunkcia EPC je zvyraznená najmä u pacientov s diabetes mellitus. U pacientov s KKI je redukovaný počet CD34+ progenitorových buniek kostnej drene a ich parakrinná funkcia je znížená (26). Porucha funkcie progenitorových buniek sa môže prejaviť ich redukovanou mobilizáciou z kostnej drene, zníženou proliferačnou kapacitou, ako aj skráteným prežívaním v periférnej krvi. Z toho vyplývajú inovatívne postupy zamerané na zlepšenie účinnosti regeneračnej terapie.

Stimulácia/modifikácia kmeňových buniek. Dysfunkcia kmeňových buniek môže byť čiastočne reverzibilná ich stimuláciou in vitro pred bunkovou aplikáciou. Ide o prechod od bunkových produktov „prvej generácie“, používaných v ich prirodzenom stave, k bunkovým produktom „druhej generácie“ ich stimuláciou rastovými faktormi, farmakologicky, fyzikálne alebo genetickou modifikáciou smerom k určitej bunkovej línii a tkanivovej alebo orgánovej špecifickosti. V predklinickom výskume boli úspešne testované viaceré modifikačné postupy podporujúce angiogézu. Napríklad predliečenie progenitorových buniek v BM-MSC médiu (27), stimulácia MSC pred aplikáciou pomocou VEGF (28), genetická modifikácia MSC pomocou vírusového vektora podporujúceho expresiu rastových faktorov (29), kultivácia MSC v hypoxických podmienkach (30), alebo mechanická

modifikácia BM-MSC ich enkapsuláciou do alginátových mikrokapsúl s cieľom dlhodobiejšieho parakrinného pôsobenia (31). Bartunek et al. modifikovali autológne BM-MSC pomocou kardiogénneho „koktailu“ rôznych rastových faktorov a cytokínov s cieľom ich transformácie na bunky kardiálneho progenitorového fenotypu, ktoré následne testovali u pacientov so srdcovým zlyhávaním ischemickej etiológie (32, 33).

Alogénne kmeňové bunky. Zásadným riešením dysfunkcie vlastných kmeňových buniek liečeného pacienta je aplikácia alogénnych kmeňových buniek od mladých zdravých darcov. Takýto postup je perspektívou nielen pre pacientov s KKI, ale aj pacientov po IM, či s chronickým srdcovým zlyhávaním. Zdrojom bunkového materiálu môže byť nielen kostná dreň, ale aj tukové tkanivo, pupočníková krv, alebo placentárna krv. „Imunitne zvýhodnené“ bunky sú z tohto hľadiska MSC, ktorých bezpečné darcovské použitie už bolo overené klinickými štúdiami (34, 35). V prípade potvrdenia efektivity takéhoto postupu by išlo o bezprostredne dostupnú liečbu, bez limitácie v počte buniek, s konzistentnou a presne definovanou kvalitou a charakteristikou rovnocennou s farmakologickým produktom. Na druhej strane, možnou výhodou podania neselektovaných autológnych mononukleárných buniek, ktorých darcovská aplikácia nie je z imunitných dôvodov realizovateľná, je heterogenita podaného bunkového materiálu so vzájomnou komunikáciou medzi rôznymi zložkami použitého koncentráту, ktorá môže zabezpečiť komplexnejší účinok a súhrn jednotlivých zložiek zodpovedajúcu prirodzeným reparačným procesom organizmu (36).

Exozómy. Exozómy sú bunkami produkované sekrečné membránové čiastočky (40 – 100 nm), ktoré sú nositeľmi proteínov, lipidov, mRNA/messenger RNA/, miRNA/mikro RNA/ a iných bioaktívnych molekúl, ktoré sa prostredníctvom týchto exozómov transportujú medzi jednotlivými bunkami a ovplyvňujú tak svoje okolie. Exozómy produkované kmeňovými bunkami vylučujú bioaktívne proteíny, lipidy a náklad nukleových kyselín do svojho okolia a po adhézii na receptory okolitých buniek sprostredkujú komunikáciu a funkčné zmeny v prijímajúcich bunkách, napríklad aktiváciou T-lymfocytov stimulujú imunitnú odpoveď. MSC prispievajú sekréciou exozómov k stimulácii neurogenézy a angiogenézy (37 – 39). Koncept liečby pomocou exozómov je v súlade s teóriou parakrinného mechanizmu účinku bunkovej terapie.

Záver

Bunková liečba je nádejou na zlepšenie osudu vysoko-rizikovej skupiny pacientov s KKI. Doposiaľ zrealizovaný výskum konštatuje dobrý bezpečnostný profil bunkovej terapie s nízkym výskytom nežiaducich reakcií, bez zvýšenia mortality a výskytu malignít. Vzhľadom na redukovaný regeneračný potenciál autológnych kmeňových buniek u často výrazne polymorbidných pacientov, sú intenzívne testované možnosti

použitia darcovských alogénnych mezenchýmových buniek, ako aj rôzne spôsoby modifikácie a stimulácie bunkového materiálu. Na ceste od zatiaľ experimentálnych terapeutických postupov po klinicky akceptovanú liečebnú alternatívu je nevyhnutné, aby povzbudivé výsledky z menších štúdií, vrátane randomizovaných, boli potvrdené väčšími a placebom kontrolovanými multicentrickými štúdiami.

Táto práca vznikla na základe projektu podporovaného z operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. (ITMS kód: 26240220023).

Literatúra

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Wittenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
2. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-435.
3. Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant*. 2013;22:545-562.
4. Teraa M, Sprengers RW, van der Graaf Y, Peters CE, Moll FL, Verhaar MC. Autologous Bone Marrow-Derived Cell Therapy in Patients With Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Ann Surg*. 2013;258:922-999.
5. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
6. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006; 113:e463-654.
7. Gopall J, Huang W, Zhao Y. Prospects of adult stem cells therapy in peripheral vascular diseases. *BJMP*. 2010;3:a345.

8. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B, Chen S. 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;92:26–36.
9. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2011;55:261–268.
10. Cobellis G, Maione C, Botti C, Coppola A, Silvestroni A, Lillo S, Schiavone V, Molinari AM, Sica V. Beneficial effects of VEGF secreted from stromal cells in supporting endothelial cell functions: therapeutic implications for critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2010;19:1425–1437.
11. Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res.* 2010;79:200–206.
12. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation.* 2007;115:3165–3172.
13. Klepanec A, Mistrik M, Altaner C, Valachovicova M, Olejarova I, Slysco R, Balazs T, Urandova T, Hladikova D, Liska B, Tomka J, Vulev I, Madaric J. No difference in intra-arterial and intramuscular delivery of autologous bone marrow cells in patients with advanced critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2012;21:1909–1918.
14. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation.* 2005;112:1178–1183.
15. Rookmaaker MB, Verhaar MC, Loomans CJ, Verloop R, Peters E, Westerweel PE, Murohara T, Staal FJ, van Zonneveld AJ, Koolwijk P, Rabelink TJ, van Hinsbergh VW. CD34+ cells home, proliferate, and participate in capillary formation, and in combination with CD- cells enhance tube formation in a 3-dimensional matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1843–1850.
16. Iafra MD, Hallett JW, Geils G, Pearl G, Lumsden A, Peden E, Bandyk D, Vijayaraghava KS, Radhakrishnan R, Ascher E, Hingorani A, Roddy S. Early results and lessons learned from a multicenter, randomized, double-blind trial of bone marrow aspirate concentrate in critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2011;54:1650–1658.
17. Powell RJ, Marston WA, Berceci SA, Guzman R, Henry TD, Longcore AT, Stern TP, Watling S, Bartel RL. Cellular therapy with ixmyelocel-T to treat critical limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled RESTORE-CLI trial. *Mol Ther.* 2012;20: 1280–1286.
18. Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost.* 2007;98:1335–1342.
19. Altaner C, Altanerova V, Cihova M, Hunakova L, Kaiserova K, Klepanec A, Vulev I, Madaric J. Characterization of mesenchymal stem cells of “no-options” patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells. *PLoS One.* 2013;8:e73722.
20. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:37.
21. Teraa M, Sprengers RW, Schutgens RE, Slaper-Cortenbach IC, van der Graaf Y, Algra A, van der Tweel I, Doevendans PA, Mali WP, Moll FL, Verhaar MC. 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 Transcatheter Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial. *Circulation.* 2015;131:851–860.
22. Madaric J, Klepanec A, Valachovicova M, Mistrik M, Bucova M, Olejarova I, Necpal R, Madaricova T, Paulis L, Vulev I. Characteristics of responders to autologous bone marrow cell therapy for no-option critical limb ischemia. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:116.
23. Madaric J, Klepanec A, Mistrik M, Altaner C, Vulev I. Intra-arterial autologous bone marrow cell transplantation in a patient with upper-extremity critical limb ischemia. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2013;36:545–548.
24. Madaric J, Valachovicova M, Pribojova J, Mateova R, Madaricova T, Mistrik M, Sebekova K, Vulev I. Improvement in ADMA and oxidative stress after stem cell therapy in patients with critical limb ischemia. *Eur Heart J* 2015;36 (Suppl.):A610–611.
25. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593–600.
26. Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, Gremmels H, Goumans MJ, Teerlink T, Moll FL, Verhaar MC; JUVENTAS study group. Bone marrow alterations and lower endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients. *PLoS One.* 2013;8:e55592.
27. Poitevin S, Cussac D, Leroyer AS, Albinet V, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Hubert L, Andrieu-Abadie N, Couderc B, Parini A, Dignat-George F, Sabatier F. Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity. *Cardiovasc Res.* 2014;103(1):121–130.
28. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(2):370–379.
29. Yin T, He S, Su C, Chen X, Zhang D, Wan Y, Ye T, Shen G, Wang Y, Shi H, Yang L, Wei Y. Genetically modified human placenta-derived mesenchymal stem cells with FGF-2 and PDGF-BB enhance neovascularization in a model of hindlimb ischemia. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5093–5099.
30. Han KH, Kim AK, Kim MH, Kim DH, Go HN, Kim DI. Enhancement of angiogenic effects by hypoxia-preconditioned human

- umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Biol Int*. 2016 Jan;40(1):27-35.
31. Landázuri N, Levit RD, Joseph G, Ortega-Legaspi JM, Flores CA, Weiss D, Sambanis A, Weber CJ, Safley SA, Taylor WR. Alginate microencapsulation of human mesenchymal stem cells as a strategy to enhance paracrine-mediated vascular recovery after hindlimb ischaemia. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(3):222-232.
32. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 61:2329-2338.
33. Bartunek J, Terzic A, Davison BA, Filippatos GS, Radovanovic S, Beleslin B, Merkely B, Musialek P, Wojakowski W, Andreka P, Horvath IG, Katz A, Dolatabadi D, El Nakadi B, Arandjelovic A, Edes I, Seferovic PM, Obradovic S, Vanderheyden M, Jagic N, Petrov I, Atar S, Halabi M, Gelev VL, Shochat MK, Kasprzak JD, Sanz-Ruiz R, Heyndrickx GR, Nyolczas N, Legrand V, Guédès A, Heyse A, Moccetti T, Fernandez-Aviles F, Jimenez-Quevedo P, Bayes-Genis A, Hernandez-Garcia JM, Ribichini F, Gruchala M, Waldman SA, Teerlink JR, Gersh BJ, Povsic TJ, Henry TD, Metra M, Hajjar RJ, Tendera M, Behfar A, Alexandre B, Seron A, Stough WG, Sherman W, Cotter G, Wijns W; CHART Program. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J*. 2016 Dec 23. pii: ehw543.
34. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottipamula S, Krishnamurthy S, Anthony N, Pherwani A, Majumdar AS. (2013) A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med*. 2013;11:143. doi: 10.1186/1479-5876-11-143.
35. Das AK, Bin Abdullah BJ, Dhillon SS, Vijanari A, Anoop CH, Gupta PK. Intra-arterial allogeneic mesenchymal stem cells for critical limb ischemia are safe and efficacious: report of a phase I study. *World J Surg*. 2013;37:915-922.
36. Kwon SM, Lee JH, Lee SH, Jung SY, Kim DY, Kang SH, Yoo SY, Hong JK, Park JH, Kim JH, Kim SW, Kim YJ, Lee SJ, Kim HG, Asahara T. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of CD34 positive cells. *PLoS One*. 2014;9:e106310.
37. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther* 2015;23:812-823.
38. Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016;18:13-24.
39. Doeppner TR, Herz J, Görgens A, Schlechter J, Ludwig AK, Radtke S, et al. Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression. *Stem CellsTransl Med* 2015;4:1-13.