

Záchrana ischemickej končatiny terapeutickou angiogenézou

R. Talapková¹, J. Hudeček², I. Šinák¹, P. Kubisz², L. Laca¹, L. Hlinka¹, K. Zeleňák³

¹ Klinika transplantácie a cievnej chirurgie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika, prednosta doc. MUDr. Ľudovít Laca, Ph.D., mim. prof.

² Klinika hematológie a transfúziológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.

³ Klinika rádiologie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika, prednosta MUDr. Hubert Poláček, Ph.D.

Súhrn: Úvod: Kritická končatinová ischémia (CLI) je definovaná ako chronická ischemická bolesť končatín vyžadujúca pravidelnú analgetickú liečbu v trvaní minimálne 2 týždne, a/alebo s prítomnými kožnými defektmi. U pacientov s CLI je veľká pravdepodobnosť potreby vysokej amputácie končatiny do 6–12 mesiacov, ak nedôjde k zlepšeniu perfúzie. V početných prácach bol zdokumentovaný priaznivý efekt autológnej transplantácie kmeňových buniek z kostnej drene u pacientov s vyčerpanými možnosťami chirurgickej, resp. endovaskulárnej rekonštrukcie. Cieľ: Záchrana končatiny u pacientov s CLI s využitím endotelových progenitorových buniek (EPC) z kostnej drene pacienta a zhodnotenie účinnosti a bezpečnosti terapeutickú angiogenézu u pacientov s CLI. Materiál a metódy: Do štúdie sú priebežne zaradovaní pacienti s CLI bez možnosti chirurgickej, resp. endovaskulárnej rekonštrukcie. Autori prezentujú výsledky 9 odliečených pacientov. EPC boli izolované z autológnej kostnej drene odobratej z lopaty bedrovej kosti a po separácii aplikované intramuskulárne do svalov predkolenia a nohy postihnutej končatiny. Pacienti mali vyšetrené: lokálny nález, index bolesti, index kvality života, potrebu a dávku analgetík, členkovo-ramenný index (ABI), fotopletyzmografiu, markery aktivácie endotelu a trombocytov, digitálnu subtraktívnu angiografiu (DSA). Výsledky: Intenzita bolesti sa znížila u všetkých pacientov, 3 pacienti majú trvalý analgetický efekt bez klaudikácií, 2 pacienti úplne zhojený defekt, 3 pacienti parciálne zhojený defekt, 2 pacienti podstúpili amputáciu na predkolení, 1 pacient na úrovni nohy, 1 pacient exitoval bez súvisu s výkonom. Nezaznamenali sme žiadne nežiaduce účinky, resp. komplikácie. Záver: Autológna transplantácia kmeňových buniek v liečbe CLI sa javí ako potenciálne úspešná a bezpečná metóda na zlepšenie prekrvenia u pacientov so zlyhanými možnosťami chirurgickej a konzervatívnej terapie.

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

The Salvage of Ischaemic Limb by Therapeutical Angiogenesis

Summary: Background: Critical limb ischaemia (CLI) is defined as a chronic rest pain, lasting more than 2 weeks, requiring analgesics and/or with present skin defects. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells has been used successfully in CLI. Aim: The salvage of critically ischaemic limb by endotel progenitory cells (EPCs) from patient's bone marrow. To assess efficacy and safety of critical lower limb ischaemia treatment with marrow stem cell autotransplantation. Methods: 9 patients suffering from CLI have been enrolled. They did not require emergency amputation and had previously been unsuccessfully treated with conventional therapy. Mononuclear cells were isolated from the bone marrow taken from iliac crest and injected in the gastrocnemius muscle and pedal region of the affected limb. Patients have had evaluated: local finding, pain index, quality of life index, ABI, fotopletyzmography, markers of endothelium and trombocytes' activation and digital subtractive angiography. Results: Pain severity decreased in all of patients. Three of them are with no pain and no claudication. Lesions resolved in two patients, partially in three patients. Crural amputation was required in two patients, amputation of leg in 1 patient. No side effects of the therapy were observed. One patient died without connection with procedure. Conclusions: Marrow stem cell autotransplantation into the ischaemic lower limb seems to be a potentially effective method of peripheral perfusion enhancement. Further studies are needed to clarify the underlying mechanisms of such improvement.

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

Úvod

Ochorenia periférnych tepien (PAO), postihujúce prevažne dolné končatiny, sú závažným celosvetovým problémom. Vo svojom terminálnom štádiu, ktorému je vyhradený pojem kritická končatinová ischémia (CLI), ohrozujú pacienta amputáciou. Transatlan-

tický konsenzus liečby PAO (TASC II.), prijatý v roku 2006, definuje CLI ako štádium PAO, ktoré je charakterizované chronickou ischemickou kľudovou bolesťou a/alebo ischemickou kožnou léziou vo forme ulkusu alebo gangrény. Termín je vyhradený len pre prípady chronickej ischemickej cho-

roby s prítomnosťou uvedených symptómov, trvajúcich viac ako 2 týždne. Diagnózu CLI verifikujú hodnoty členkového systolického tlaku, prstového systolického tlaku alebo transkutánneho tlaku kyslíka. Pre ischemickú kľudovú bolesť svedčia členkové tlaky pod 50 mm Hg alebo prstové tlaky nižšie

ako 30 mm Hg alebo transkutánnu kyslík nižší ako 30 mm Hg.

Incidencia CLI sa v Európe a severnej Amerike odhaduje asi na 500–1 000 nových prípadov na 1 milión obyvateľov. Po stanovení diagnózy sa asi polovica pacientov s CLI podrobí určitému typu revaskularizácie. Približne 25% prípadov vyžaduje primárnu amputáciu a zvyšok pacientov s nerekonštruovateľnými pomermi zostáva na medikamentóznej liečbe. V podskupine pacientov s nerekonštruovateľnými pomermi alebo so zlyhaním revaskularizácie do 6 mesiacov približne 40% stratí končatinu a asi 20% zomrie.

Z uvedeného vyplýva, že prognóza pacientov s CLI je veľmi nepriaznivá, pričom počty amputovaných pacientov sú vysoké. Incidencia veľkých amputácií sa pohybuje od 120 do 500/milión obyvateľov a rok.

Úspešná chirurgická alebo endovaskulárna revaskularizácia zachraňuje končatinu, zmierňuje bolesti a zlepšuje kvalitu života, ale často nie je možná pre nerekonštruovateľné arteriálne pomery.

V prípade nedostupnosti revaskularizácie alebo v prípade zlyhania chirurgickej a endovaskulárnej liečby je potrebné hľadať nové alternatívy a postupy. Terapeutická angiogenéza, realizovaná transplantáciou autológnych kmeňových buniek kostnej drene (KD), je nádejnou alternatívnou možnosťou [1].

Angiogenéza je fyziologický proces nevyhnutný na hojenie rán. Nastupuje prakticky ihneď po vzniku poranenia. Je iniciovaný mnohými molekulárnymi signálmi, ako sú faktory hemostázy, zápalu, cytokíny, rastové faktory a interakcie medzi bunkovými matrix. Nové kapiláry proliferujú kaskádou biologických procesov za účelom vytvorenia granulačného tkaniva. Tento proces trvá až do zhojenia rany, kedy je angiogenéza zastavená zníženou hladinou rastových faktorov, ústupom zápalu, stabilizáciou bunkovej matrix a endogénnymi inhibítormi angiogenézy [2].

Kmeňové bunky získané z dospelých kostnej drene významnou mierou prispievajú k angiogenezе. Tieto bunky, známe ako endotelové progenitorové bunky (EPC), môžu byť izolované aj z periférnej krvi zdravých jedincov, avšak tu je ich zachyt extrémne nízky. Po vzniku poranenia sú EPC mobilizované do cirkulácie, usadia sa v mieste potrebnej neovaskularizácie a tu sa diferencujú na zrelé endotelové bunky.

Pluripotentné kmeňové bunky (KB) majú schopnosť sebaobnovy vlastnej bunkovej populácie, klonálnej multilineárnej diferenciácie a obnovy rôznych tkanív. Produkujú množstvo cytokínov (IL-6, GM-CSF, G-CSF a ďalšie), tlmia imunitnú reakciu (T-bunky).

Na novotvorbe ciev sa podieľajú 3 procesy:

1. Angiogenéza hrá úlohu v postnatálnej neovaskularizácii, vzniká aktiváciou preexistujúcich endotelových buniek in situ (proliferácia endometria, postischemické zotavenie tkaniva, hojenie rán, rast karcinómu).
2. Vaskulogenéza je tvorba ciev de novo v postnatálnom období, ide o neovaskularizáciu spúšťanú ischemiou, poranením, rakovinou. Úlohu v nej hrajú EPC z kostnej drene.
3. Arteriogenéza zaisťuje zväčšenie kolaterál, je podnietená „shear“ strešom, nie hypoxiou.

Vaskulárna regresia dáva pokyn na zastavenie novotvorby ciev, keď je už dosiahnutá dostatočná perfúzia [3,4]. Predklinické a početné klinické štúdie ukazujú, že implantácia EPC buniek do ischemickej končatiny zlepšuje tvorbu kolaterálnych ciev [5–11].

Cieľ

Hlavným cieľom našej práce je záchrana ischemickej končatiny pred vysokou amputáciou s využitím EPC z autológnej kostnej drene a zhodnotenie účinnosti terapeutической angiogenézy u pacientov s kritickou končatinovou ischemiou. Okrem toho sledujeme bezpečnosť danej liečebnej modalit

(výskyt angina pectoris, cievnej mozgovej príhody, akútnej arteriálnej, resp. venózne trombózy DK, infekčných komplikácií na postihnutej dolnej končatine apod.).

Materiál a metodika

Do klinického experimentu sú priebežne zaraďovaní pacienti s PAO dolných končatín v III. a IV. štádiu podľa Fontaina, t. j. pacienti s kľudovými bolesťami a/alebo defektom na dolnej končatine. Sú to kandidáti na amputáciu dolnej končatiny z dôvodu nemožnosti chirurgickej, resp. endovaskulárnej revaskularizácie alebo uzáveru predchádzajúcej revaskularizácie.

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

Pacient je vyšetrený pred výkonom, pred prepustením z nemocnice a následne o 1, 3, 6 a 12 mesiacov po výkone.

Sledované kritériá: subjektívne – klaudikačný interval, intenzita bolesti (index bolesti 0–10), druh a dávka analgetík, zmena kvality života vo vzťahu k terapii, objektívne – hojenie lézií, záchrana končatiny pred amputáciou, členkovo-ramenný index (ABI), fotopletyzmografia a markery aktivácie endotelu (TM, t-PA, PAI-1, vWF) a trombocytov (CD 52) [12], stupeň neoformácie kolaterál digitálnou subtrakčnou angiografiou (DSA).

Štúdia je realizovaná na základe grantu Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky (MZSR) a jej protokol bol odsúhlasený etickou komisiou MZSR. Každý pacient má podpísaný informovaný písomný súhlas so zaradením do štúdie.

Výsledky

Charakteristika pacientov

Do štúdie bolo doteraz zaradených 9 pacientov (7 mužov, 2 ženy) vo veku od 44 do 83 rokov (tab. 1). Všetci pacienti mali nerekonštruovateľné arteriálne pomery a zlyhanie komplexnej konzervatívnej liečby, pričom všetci boli bezprostredne ohrození vysokou amputáciou. Všetci mali kľudové bolesti DK, 6 z nich mali trofické zmeny v zmysle defektu, resp. gangrény nohy. Jeden pacient má Burgerovu chorobu. Traja pacienti majú diabetes mellitus. Všetci pacienti mali antitrombotickú a vazodilatačnú liečbu. Všetci boli nútení užívať analgetiká z dôvodu ischemickej bolesti (obr. 1–4).

U všetkých pacientov bola zaznamenaná dobrá tolerancia procedúry. Bezprostredný analgetický účinok, v niektorých prípadoch nevysvetliteľne výrazný, udalo 7 pacientov. Zlepšená trofika končatiny sa prejavila u 5 pacientov. Zlepšenie pohybovej aktivity nastalo u 4 pacientov.

U ani jedného pacienta sme nezaznamenali veľké kardiovaskulárne komplikácie ani iné periprocedurálne komplikácie (infekcia, renálne zlyhanie, výskyt angina pectoris, cievnej mozgovej príhody, akútnej arteriálnej, resp. venózne trombozy DK apod.) (tab. 2).

Diskusia

Dobrá tolerancia procedúry zo strany pacienta, absencia nežiadúcich účinkov, dostupnosť autológnej kostnej drene sú faktory, vďaka ktorým sa aplikácia kmeňových buniek v liečbe kritickej končatinovej ischémie javí ako perspektívna metóda, rozširujúca paletu výkonov v prípadoch, kedy sú možnosti cievnej rekonštrukčnej chirurgie, resp. endovaskulárne výkony vyčerpané. V blízkej budúcnosti je potrebné realizovať randomizované, dvojito zaslepené štúdie. Keďže štúdia nemá kontrolnú skupinu, nemožno klinický efekt pripísať jednoznačne a jedine na vrub podania autológnych kmeňových buniek. Ďalšími potenciálnymi faktormi

Tab. 1. Súbor a charakteristika pacientov.

Pacient	Diagnóza	ABI	Priebeh
1. ♂ 44	M. Burgerl. sin. Stav po lumbálnej sympatektómii, femorotibiálnom prednom bypase, opakovaných kúrach prostavazínom, transmetatarzálny amputácii a amputácii v Chopartovom kĺbe l. sin.	0,6	bez amputácie zmiernenie kľudových bolestí zlepšenie trofiky kože
2. ♂ 75	PAO IV. št. I. dx. Inveterovaná trombóza nepoznanej aneurizmy API. dx.	0,4	bez amputácie zhojený bez kľudíkácií
3. ♂ 69	PAO III. št. I. dx. Stav po aortobifemorálnom bypase – funkčný, uzáver pod ním.	0,3	bez amputácie exitus (bez zjavného vzťahu k výkonu)
4. ♂ 67	PAO IV. št. I. dx. Stav po 4 rekonštrukciách, inveterovaný uzáver bypasu.	0,0	amputácia v predkolení
5. ♂ 70	PAO IV. št. I. dx. Uzáver popliteopodálného bypasu, neúspešná PTA bypasu.	> 1,3	bez amputácie zhojený bez kľudíkácií
6. ♀ 70	PAO IV. št. I. sin. Nerekonštruovateľné pomery.	> 1,3	bez amputácie progredujúce hojenie zmiernenie kľudových bolestí
7. ♂ 55	PAO IV. št. I. dx. Nerekonštruovateľné pomery.	0,0	amputácia v predkolení
8. ♀ 83	PAO III. št. I. dx. Stav po uzávere femoropopliteálneho bypasu dx.	0,0	transmetatarzálna amputácia
9. ♂ 68	PAO III. št. I. sin. Opakovaný uzáver femoropopliteálneho bypasu.	0,3	bezprostredný úplný analgetický efekt

Tab. 2. Výsledky.

	počet
dobrá tolerancia procedúry zo strany pacienta	9
analgetický účinok (z toho úplný)	7 (2)
zlepšená trofika končatiny (z toho úplne zhojený defekt)	5 (2)
zlepšenie pohybovej aktivity (z toho bez kľudíkácií)	4 (2)
komplikácia	0
amputácia (predkolenie/noha)	3 (2/1)

ovplyvňujúcimi klinické zlepšenie by mohli byť:

1. spontánne zlepšenie
2. placebo efekt
3. medikamentózna terapia

Ad 1.

V skutočnosti je viac než zriedkavé, že by sa PAO DK spontánne zmiernilo, resp. zlepšilo bez intervencie alebo

intenzívneho tréningu. Okrem toho nebol v štúdii pozorovaný signifikantný nárast ABI na kontralaterálnej (neliečenej) končatine.

Ad 2.

Placebo efekt hrá významnú úlohu v prípade subjektívnych parametrov, na druhej strane však hojenie rán, ABI a pletyzmografia sú parametrami objektívnymi.



Obr. 1. Pacient č. 2 – pred výkonom.



Obr. 2. Pacient č. 2 – tesne po výkone.



Obr. 3. Pacient č. 2 – pol roka po výkone.



Obr. 4. Pacient č. 2 – rok po výkone.

Ad 3.

Medikamentózna liečba základného ako aj pridružených ochorení nebola periprocedurálne menená, takže nemožno zlepšenie u pacientov vysvetľovať medikamentóznou liečbou.

Vo svetovej literatúre je publikovaných viacero štúdií o využití terapeutickú angiogenezu v liečbe CLI v prípadoch nerekonštruovateľných cievnych pomerov na postihnutej končatine. Podanie kmeňových buniek je realizované dvoma rôznymi spôsobmi. Prvým je intraarteriálna aplikácia [13]. Druhým spôsobom je multilokulárna injekcia do svalov ischemického predkolenia a nohy [5,11]. V našej štúdii realizujeme metodiku intramuskulárnej aplikácie, ktorá je technicky nenáročná, pacientmi veľmi dobre tolerovaná. Zabezpečuje pritom dostatočný transport pluripotentných progenitorových bu-

niak na miesto potreby a ich primeranú koncentráciu v ischemickom svalu, teda na mieste ich určenia, kde očakávame terapeutický efekt angiogenezu.

Záver

Autológna transplantácia EPC z kostnej drene pacienta by mohla byť bezpečnou a efektívnou metódou na zaistenie terapeutickú angiogenezu. Autológna kostná dreň poskytuje endotelové progenitorové bunky, ktoré majú schopnosť sa diferencovať na endotelové bunky a zároveň produkovať množstvo cytokínov.

Podakovanie

Štúdia je realizovaná na základe grantu Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky MZ SR.

Literatúra

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA et al. TASC II Working Group (2007). Inter-Soc-

ciety Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33 (Suppl 1): S1-S75.

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

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

4. Rissanen TT, Vajanto I, Ylä-Herttuala S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb – on way to the clinic. Eur J Clin Invest 2001; 31: 651-666.

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

6. De Vries AS, Billiet J, Van Droogenbroeck J et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for limb ischemia in a caucasian population with atherosclerosis obliterans. J Int Med 2008; 263: 395-403.

7. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A et al. The treatment of advanced chronic

lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. *Kardiol Pol* 2005; 63: 351–360; discussion 361.

8. Semenza GL. Therapeutic angiogenesis. Another Passing Phase? *Circ Res* 2006; 98: 1115–1116.

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

10. Soda T, Suzuki H, Kusuama T et al. Improvement of severe ulcer of buerger's di-

sease by bone-marrow mononuclear cell transplantation: a case report. In: *New Frontiers in Regenerative Medicine*. Springer Japan 2007: 95–100.

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

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

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

MUDr. Renáta Talapková, Ph.D.

www.jfmed.uniba.sk

e-mail: rtalapkova@post.sk

Doručeno do redakcie: 9. 2. 2009

www.geriatrickarevue.cz