

Revaskularizace CLI s využitím parakrinního

Periferní tepenná obliterace byla rozpoznána jako významný faktor v populaci pacientů s kritickou končetinovou ischemií. Ve skupině pacientů zařazených do evropské studie zaměřené na výzkum onemocnění diabetem a dolních končetin (Eurodiale) bylo u 49 % pacientů přicházejících s nově vytvořeným diabetickým defektem dolní končetiny diagnostikováno periferní tepenné postižení.

K rozvoji kritické končetinové ischemie (CLI) dochází náhle a toto onemocnění je odpovědné za 50–67 % všech netraumatických amputací dolních končetin. Padesát dva procent pacientů s onemocněním diabetem a diagnostikovanou CLI zemírá v průběhu 4,5letého sledování.

Standardní léčba chronických defektů, zejména těch způsobených následkem kritické končetinové ischemie, zahrnuje chirurgickou revaskularizaci (bypass v oblasti distálního bérce nebo pedální bypass), endovaskulární léčbu (rekanalizaci pomocí perkutánní transluminální angioplastiky) nebo maximální možnou podiatrickou péči o defekt (včetně hyperbarické kyslíkové terapie, podávání antibiotik a aplikace vazodilatancí).

Možnosti chirurgické a endovaskulární léčby mají bohužel omezenou efektivitu z pohledu nepříznivé morfologie angiografického nálezu, charakterizované difuzními, multifokálními a multisegmentálními okluzivními lézemi s absentujícími distálními odtokovými tepnami bérce a chodidla. V této kohortě mohou být až u 40 % pacientů vyčerpány všechny možnosti revaskularizační léčby, a tito nemocní tak nejsou vhodnými kandidáty pro další cílenou léčbu tohoto onemocnění a spadají pod obraz „non-option critical limb ischemia“ (NO-CLI). Bez ohledu na dostupné možnosti léčby, 25 % pacientů nadále progreduje do stadia amputace a 25 % z nich zemírá do dvou let. Výsledky jsou ještě méně příznivé u diabetických pacientů s multi-kauzálním onemocněním, u nichž dochází k simultánnímu výskytu neuropatie, chronického defektu a periferní okluzivní nemoci tepen.

Východiska

Preklinické studie ukázaly slibné výsledky nově zaváděné experimentální léčby využívající populace kmenových buněk jako alternativního přístupu pro podporu vaskulární regenerace a zlepšení funkce poškozené tkáně využívající angiogeneze a parakrinního efektu růstových proteinů

Proces angiogeneze vyžaduje nejen úvodní indukci tkáňové degradace, následované vaskulárním pučením, ale také stabilizaci časných výrůstků cév pericyty a remodelací a rovněž opakovaným napojením okolní ischemické tkáně k periferní části nové cévní stěny. Proces zrání a udržování cévy vyžaduje prostorové a časově kontrolované uvolnění pro- a anti-angiogenních růstových faktorů v lokálním prostředí defektu. Zatímco nově pučící céva je závislá na silném koncentračním gradientu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), jak cévy zrají, jejich závislost na VEGF klesá. Zvýšení počtu pericytů a následná stabilizace cévní stěny a perivaskulární hojení jsou závislé zejména na růstovém faktoru krevních destiček (PDGF) a angiopoietinu-1.

Hojení defektu a remodelace tkáně může trvat 8–12 týdnů, v závislosti na stupni úvodní ischemie a hypoxie tkáně. Tento proces je možno urychlit injekčním podáním autologních kmenových buněk získaných například z kostní dřeně, které má za následek významné zlepšení výsledků léčby NO-CLI. Ukazuje se, že autologní povaha buněčné terapie je efektivní pro reperfuzi až do určitého stupně ischemických tkání. Vzhledem k tomu, že hojení a remodelace tkání jsou spojeny s angiogenezí a že angiogeneze vyžaduje sebranou

interakci různých buněk, může být pro zajištění efektivity nutná injekce koncentráту kostní dřeně, obohaceného nejen o progenitorové buňky, ale také o podpůrné buňky, jakými jsou granulocyty, lymfocyty a krevní destičky, ovlivňující mikroprostředí hojícího se defektu.

Materiál a metodika

Kostní dřeň je odebrána z obou lopat kosti kyčelní standardní technikou dle Jamshidiho punkce a aspirace. Pacient je v době odběru uveden do analgosedace intravenózním bolusovým podáním propofolu. V průběhu výkonu jsou monitorovány vitální funkce pacienta, včetně neinvazivního měření krevního tlaku, srdeční frekvence, EKG a saturace pO_2 , parametry jsou v případě potřeby upravovány.

SEPARACE ASPIRÁTU KOSTNÍ DŘEŇ

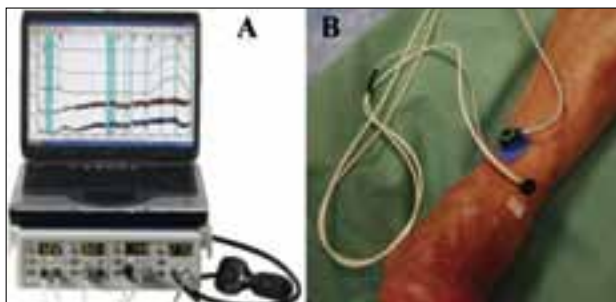
Separáční přístroj Harvest SmartPRE2 se skládá z automatizované specializované dekantační centrifugy a příslušenství v podobě zpracovatelských separačních nádob, sloužících ke zpracování aspirátu autologní kostní dřeně v režimu point-of-care. Výsledný buněčný produkt je znám jako koncentrát aspirátu kostní dřeně (BMAC) a může být využit pro autologní buněčnou terapii.

Centrifuga představuje automatický systém, který je možno obsluhovat po minimálním zaškolení. Systém je přenosný a dostatečně malý na to, aby mohl být trvale umístěn na operačním sále, což umožňuje provedení aspirace kostní dřeně, její zpracování a podání v rámci jednoho operačního výkonu.



Obr. 1 – a) technika punkční aspirace dle Jamshidiho, b) aspirace z obou lopat kosti kyčelní, c) odběr kostní dřeně, d) komponenty pro zpracování kostní dřeně, e) zpracovací nádoba (PD) s komorami pro plazmu a kostní dřeň, f) centrifuga Harvest SmartPRE2, g) aspirace koncentrátu kostní dřeně, h) aplikace BMAC po 1 ml/1 punkce. Zdroj: archiv autora

efektu kmenových buněk kostní dřeně



Obr. 2 – Měření tkáňové perfuze je možno provádět pomocí přístroje PeriFlux System 5000 vybaveného laser-dopplerem, zahřívací sondou a sondou pro měření $TcPO_2$. Zdroj: archiv autora

Po punkci lopaty kosti kyčelní je kostní dřeň natažena do stříkačky (obr. 1 a, b). Do aplikačního setu předem naplněného 30 ml antikoagulačního roztoku ACD-A (obr. 1 c, d) je aspirováno celkové množství 240 ml kostní dřeně, která je následně přenesena do separačních nádob a zpracována pomocí separátoru buněk SmartPreP2 (obr. 1 e, f). Separátor využívá gradientní denzitní centrifugaci pro separaci krevních elementů z aspirátu kostní dřeně, včetně bílých krvinek, krevních destiček a erytrocytů. Doba centrifugace je 15 minut. Následně je celkové množství 40 ml koncentráту kostní dřeně (BMC) aspirováno z centrifugačních kontejnerů do stříkačky a je okamžitě injekčně aplikováno formou vícečetných injekcí do ischemické končetiny v dávce 1 ml/1 punkce (obr. 1 g, h). Celý léčebný výkon trvá méně než jednu hodinu. Je velice důležité, že point-of-care design separačního přístroje umožňuje provedení výše popsaných postupů v rámci jedné návštěvy pacienta na operačním sále a pod dohledem ošetřujícího lékaře.

BUŇKY KOSTNÍ DŘENĚ ZÍSKANÉ PO ZPRACOVÁNÍ BMAC

Gradientní denzitní centrifugace pomocí přístroje SmartPreP2 má za následek min. 7,16násobně vyšší koncentraci buněk CD34+ v koncentráту kostní dřeně a více než 6,2násobně vyšší koncentraci mononukleárních buněk v porovnání se vzorkem aspirátu BMAC před centrifugací.

Úloha krevních destiček v přihojení progenitorových štěpů byla prokázána na preklinických studiích provedených na myších modelech kritické končetinové ischemie, kde podávání mononukleárních buněk z periferní krve (PBMNC) společně s krevními destičkami vykazovalo významně lepší perfuzi v porovnání s výsledky získanými podáváním samostatných PBMC, destiček nebo polymorfonukleárních buněk.

TRANSPLANTACE KONCENTRÁTU AUTOLOGNÍ KOSTNÍ DŘENĚ

Aplikace koncentráту do ischemické končetiny je prováděna v totální intravenózní analgezií dosažené intravenózním bolusovým podáním propofolu a ketaminu. Celkem 40 alikvótů o objemu 1 ml je injekčně aplikováno hluboko do svalu pomocí 23-gauge jehly do prostoru stehna, lýtky nebo nohy, v návaznosti na umístění a rozsahu arteriálních okluzí na diagnostické angiografii. Injekce jsou aplikovány 4–5 cm proximálně od arteriál-

ní obstrukce a pokračují distálním směrem v rozestupech po 1 cm. Injekce jsou umístěny co možná nejbliže (± 1 cm) k původním okludovaným arteriím, jelikož hustota kolaterálních arterií je nejvyšší v blízkosti původních. Pokud je přítomen defekt, je 4–10 injekcí aplikováno podél okraje defektu. V případech, kdy je to nutné, je proveden debridement defektu ostrým nástrojem. Výkon je prováděn pod jednorázově podaným krytím antibiotiky s cílem zabránit rozvoji infekce v průběhu vícečetných intramuskulárních injekcí.

ANALÝZA TKÁŇOVÉ PERFUZE

Kvalitu tkáňové perfuze je možno měřit před a po transplantaci BMAC. Velice důležitými parametry pro zkoumání efektivity aplikace BMAC jsou laser-dopplerometrické měření průtoku pomocí přístroje PeriFlux System 5000, měření hodnot transkutánních tlaků kyslíku ($TcpO_2$) a oxidu uflčitého ($TcpCO_2$) stimulačním testem pomocí inhalace O_2 v objemu 5l/min./10 min., měření kotníko-pažního indexu (ABI), prstového tlaku (TP, v mm Hg), prstového-pažního indexu (TBI) a kožního perfuzního tlaku (SPP, v mm Hg) (obr. 2).

Výsledky

Klinické výsledky buněčné terapie byly analyzovány systematickým vyhledáváním randomizovaných kontrolovaných klinických studií buněčné terapie podáváním BM u pacientů s NO-CLI. Autoři Teraa et al. ve svém výzkumu provedeném v rámci 12 randomizovaných klinických studií zahrnujících 510 subjektů hodnocení, z nichž 301 bylo zařazeno do léčebných větví, verifikovali slibný potenciál těchto způsobů léčby u pacientů s NO-CLI.

V placebem kontrolovaných randomizovaných klinických studiích byl pozorovaný příznivý vliv na snížení procenta amputací ve skupině pacientů léčených buněčnou terapií v porovnání se skupinou léčebnou placebem, pokud byl srovnán s metaanalýzami zahrnujícími všechny randomizované klinické studie s hodnotou RR 0,92 (95% CI 0,51–1,67; $p = 0,78$). V posuzovaných randomizovaných klinických studiích se buněčná terapie pomocí kostní dřeně ukazuje jako relativně bezpečná a pozorované nežádoucí účinky byly většinou mírného charakteru a pouze přechodné.

Benoit et al. ve své systematické rešerši 45 studií zahrnuté do naší analýzy (viz tab.) zjistili významně nižší procento amputovaných pacientů (14,4 %) ve skupině transplantovaných subjektů hodnocení ve srovnání s 27,6 % pacientů amputovaných v kontrolní skupině ($p = 0,0019$), celkové procento amputací ve všech randomizovaných klinických studiích dosáhlo 20,5 %. Ve skupině studií s mononukleárními buňkami z kostní dřeně (BMMNC) dosahovalo procento amputací ve skupině transplantovaných pacientů hodnoty 14,8 % oproti 25,4 % v kontrolní skupině ($p = 0,0278$). V námi provedené studii (Procházka et al.) byl procentní výskyt velkých amputací v transplantované a v kontrolní skupině v průběhu 120denního sledování 21 % vs.

44 % ($p < 0,05$). Pouze ve skupině transplantovaných pacientů, u nichž došlo k záchraně končetiny, došlo ke zvýšení hodnot prstového-pažního indexu (z průměrné hodnoty $22,66 \pm 5,32$ na $25,63 \pm 4,75$ mm Hg). Počty buněk CD34+ v BMC klesaly s věkem ($p = 0,024$), ačkoli nebyla zaznamenána žádná korelace mezi věkem a hojením.

dokončení na následující straně

Analýza klinických studií využívajících léčbu kmenovými buňkami z kostní dřeně

Autor	Rok	Typ studie	Total	Léčeno	Kontrolní
Benoit	2011	RCT	48	34	14
Idei	2011	Cohort	97	51	46
Lu	2011	RCT	82	41	41
Madaric	2011	Case series	31	31	0
Murphy	2011	Case series	30	30	0
Perin	2011	Case series	10	10	0
Powell	2011	RCT	46	32	14
Ruiz-Salmeron	2011	Case series	20	20	0
Subramanian	2011	Case series	6	6	0
Walter	2011	RCT w cross	40	19	21
Burt	2010	Case series	9	9	0
Higashi	2010	Case series	16	16	0
Horie	2010	Case series	162	162	0
Lara-Hernandez	2010	Case series	28	28	0
Mizuno	2010	Case series	8	8	0
Procházka	2010	RCT	96	42	54
Amann	2009	Case series	51	51	0
Franz	2009	Case series	9	9	0
Kawamoto	2009	Case series	17	17	0
Moriya	2009	Case series	42	42	0
Chochola	2008	Case series	24	24	0
Cobellis	2008	Case series	10	10	0
De Vriese	2008	Case series	16	16	0
Matoba	2008	Case series	115	115	0
Motukuru	2008	Case series	36	36	0
Napoli	2008	Cohort	36	18	18
Van Tongeren	2008	Case series	27	27	0
Wester	2008	Case series	8	8	0
Zhang	2008	Case series	15	15	0
Bartsch	2007	Cohort	25	13	12
Hernandez	2007	Case series	12	12	0
Huang	2007	Case series	150	150	0
Saito	2007	Case series	14	14	0
Arai	2006	RCT	25	13	12
Durdu	2006	Case series	28	28	0
Koshikawa	2006	Case series	7	7	0
Miyamoto	2006	Case series	8	8	0
Huang	2005	RCT	28	14	14
Ishida	2005	Case series	6	6	0
Lenk	2005	Case series	7	7	0
Higashi	2004	Case series	7	7	0
Huang	2004	Case series	5	5	0
Saigawa	2004	Case series	8	8	0
Esato	2002	Case series	8	8	0
Tateishi-Yuyama	2002	Case series	45	45	0

Revaskularizace CLI s využitím parakrinního...

dokončení z předchozí strany

Dospěli jsme rovněž k jednomu neočekávanému zjištění spočívajícímu v relativní lymfopenii kostní dřeně v úvodním BMC u pacientů, u nichž došlo k selhání BMSC léčby (21 % vysokých končetinových amputací).

Tento rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,04$), viz reprezentativní obrázky z této studie (obr. 3).

Diskuse

Buněčná terapie využívající BMAC získaného z aspirátu kostní dřeně maximálně zvyšuje reciproční inter-

akce mezi různými druhy transplantovaných buněk z kostní dřeně, stejně tak jako interakci těchto buněk s extracelulární matrix (ECM). Princip „dynamického vzájemného dialogu“ mezi buňkami a jejich mikroprostředím slouží jako soustava, jejímž prostřednictvím dochází k integraci tkáňové architektury a funkce. I malý defekt v jednom z buněčných komponentů tak může mít za následek závažný defekt ve vedení této soustavy a může odklonit signální osu, která je regulována interakcí mezi cytoskeletony jednotlivých buněk a integritou související extracelulární matrix. Mikroprostředí tkáňové prochází v průběhu tkáňové regenerace rozsáhlou remodelací a zahrnuje ukládání, degradaci a strukturální reorganizaci komponentů ECM. Otázka optimální cesty podání zůstává nadále otevřená.

Zdůvodněním intramuskulárního injekčního podání je snaha o vytvoření rezervoáru buněk v blízkosti ischemické oblasti, z něž mohou být tyto buňky získávány pomocí aktivních parakrinních mechanismů. Injekce je rovněž možno aplikovat podél okludovaných nativních arterií, jelikož hustota kolaterálních cév je nejvyšší podél axiálních arterií a ke kolaterálnímu růstu preferenčně dochází v této oblasti. V případě intraarteriální aplikace navádí tok krve injekčně podané buňky do hraniční zóny maximální ischemie. Intraarteriální injekční podání se opírá o skutečnost, že tok krve transportuje buňky do místa ischemie, není však dosud známo, kolik buněk je schopno opustit krevní řečiště a dosáhnout ischemické oblasti.

Rovněž v tomto případě nebyla dosud provedena žádná srovnávací studie hodnotící tři způsoby podání (intravenózní, intramuskulární, intraarteriální), ačkoli stávající trendy poukazují směrem k intramuskulárnímu způsobu podání. Již dříve bylo uváděno, že kombinace obou způsobů podání (intramuskulárního plus intraarteriálního) má za následek významné zlepšení klinických výsledků léčby, avšak tato skutečnost bude muset být potvrzena dalšími rozsáhlými experimenty na preklinických modelech a v klinické studii.

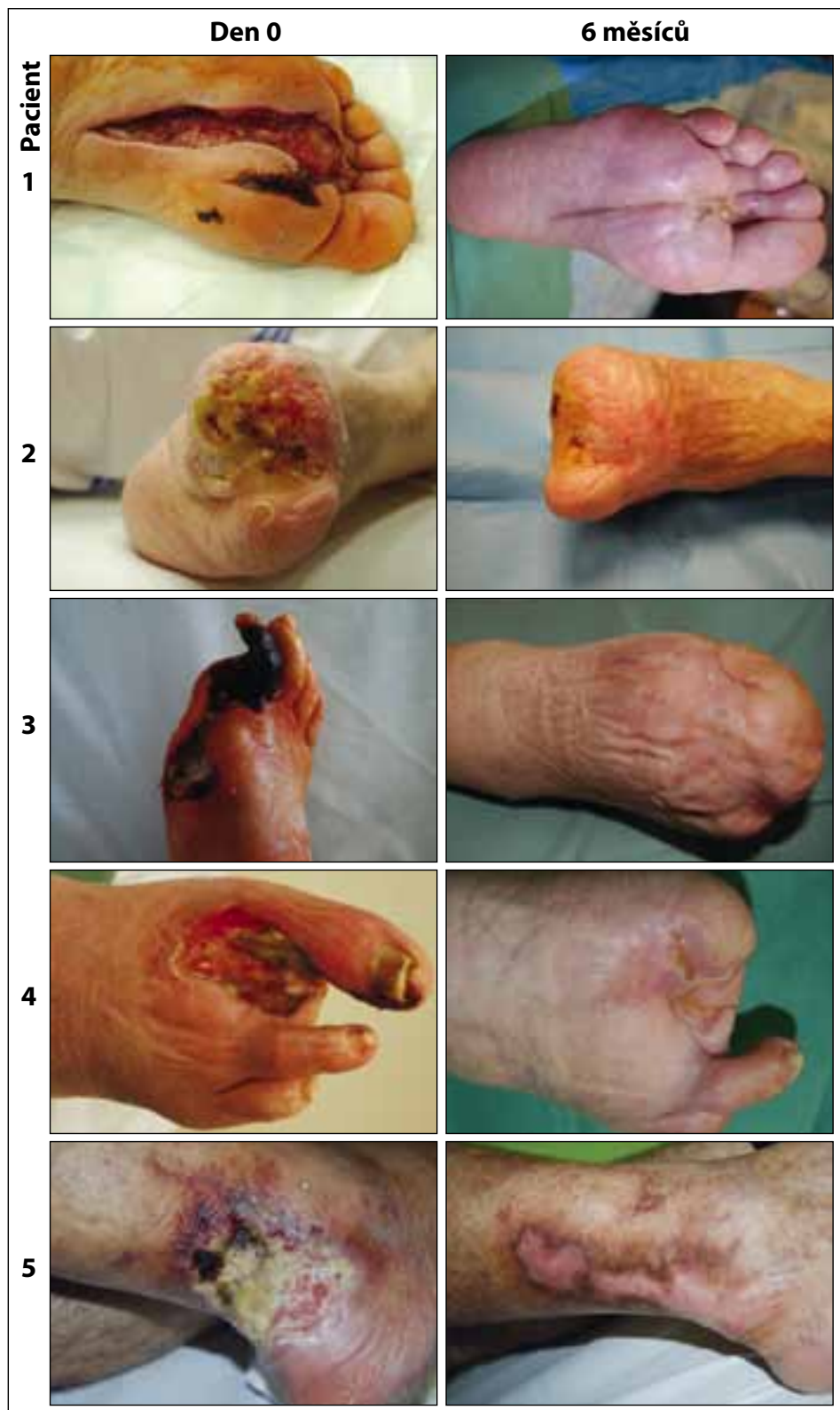
Závěry

Přístupy zahrnující buněčnou terapii mají potenciál naplnit kruciólní klinickou potřebu u populace pacientů s kritickou končetinovou ischemií. Léčba pomocí kmenových buněk se velice rychle objevuje jako nový standard této léčby. Buněčná terapie využívající autologní kostní dřeně, mononukleárních buněk nebo stimulovaných mononukleárních buněk z periferní krve byly použity v průběhu klinických studií a jsou úspěšnější než metody využívající subfrakcionovaných buněčných přípravků.

Intramuskulární a intraarteriální injekční podání nebo kombinace obou těchto způsobů přinesly slibné výsledky. Další výzkum určí úlohu této strategie u vhodných pacientů. Existuje však potřeba provést další optimalizované klinické studie s cílem adresně posoudit různé výše uvedené otázky a definovat léčebné algoritmy u pacientů s různým klinickým stupněm onemocnění.

MUDr. Václav Procházka, Ph.D., et al.,
Radiodiagnostický ústav, FN Ostrava,

Literatura u autora



Obr. 3 – Významné výsledky při 6měsíčním sledování s kompletním zhojením rány po aplikaci BMAC terapie.
Zdroj: archiv autora