

Bunková liečba kritickej končatinovej ischémie – NÚSCH

Maďarič J, Klepanec A, Olejárová I, Postulková L, Maďaričová T, Tóth M, Hladíková D, Flák L, Necpal R, Vulev I. Národný ústav srdcových a cievnych chorôb

Valachovičová M, Příbojová J, Mateová B. Slovenská Zdravotnícka Univerzita

Mistrík M. Klinika Hematológie a transfuziológie UNB a LFUK

Altaner C, Altanero V, Cihova M, Hunakova L, Kaiserova K. Ústav experimentálnej onkológie
SAV, Onkologický ústav Sv. Alžbety

Bucová M. Ústav imunológie LFUK

Šebeková K, Paulis L. Ústav patofyziológie LFUK

Kyselovič J, Musil P, Gažová A. Ústav farmakológie a klinickej farmakológie LF UK
Bratislava



Vysoká amputácia u pacientov s NO-CLI (no-option critical limb ischemia)

Štúdie (kontrolné skupiny – konzervatívna liečba)	Rutherford štádium	6 mesiacov
Powell RJ, et al. J Vasc Surg. 2011	5-6	43%
O'Donnell TF et al. IC3D 2011	5	39%
Procházka V, et al. 2010	5	45%
Klomp 1999	5	39%
Iafrati MD, et al. J Vasc Surg. 2011	5	57%





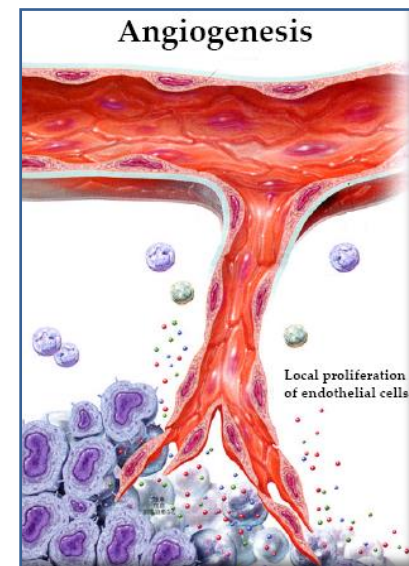
Kmeňové bunky

	Embryonálne kmeňové bunky	Dospelé kmeňové bunky	Indukované pluripotentné kmeňové bunky
Zdroj	Blastocysta, embryo	Kostná dreň, periférna krv po mobilizácii, tukové tkanivo, pupočníková krv	Reprogramované somatické bunky
Fyziologická funkcia	Prekurzor všetkých buniek organizmu	Zodpovedné za regeneráciu a opravu tkanív (proces starnutia)	X
Diferenciačný potenciál	Široký (totipotentné bunky)	Nižší (multipotentné bunky)	Vyšší (pluripotentné bunky)
Počet buniek	Veľký	Veľmi nízky	Vyšší počet
Etické hľadisko	Početné etické námietky	Etické námietky nie sú opodstatnené	Teratogénne riziko?

Mechanizmy bunkovej liečby



*Tvorba kapilárnej siete (angiogenéza) a/alebo kolaterálnej siete (arteriogenéza) cestou aktivácie a proliferácie endoteliálnych buniek v ischemickom tkanive sprostredkovanvej kmeňovými bunkami, cytokínmi a rastovými faktormi (**parakrinný mechaizmus**, „homming“ mechanizmus? - (zabudovanie buniek v miestach neovaskularizácie), + **imunomodulačný mechanizmus** + **protizápalový efekt** + ? (**antioxidačný efekt** ...)*



•Ktorý bunkový typ?

○**mononukleárne bb. kostnej drene (BM-MNC)**

○selektované bb. CD133+ / CD34+ ... EPC

○mezenchýmové bb. MSC (kostná dreň/tukové tkanivo)

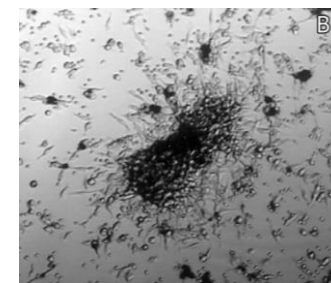
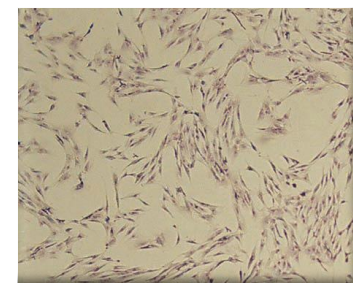
○autológne vezus alogéne MSC

○iPCSs (indukované pluripotentné KB)

○modifikované KB? – zintenzívnenie ich potenciálu pre aplikáciu

○rastové faktory z kmeňových bb?

•**Zdroj kmeňových buniek?** **Kostná dreň**, tukové tkanivo, periférna krv, pupočníková krv, placenta;



Randomizované kontrolované štúdie bunkovej liečby CLI

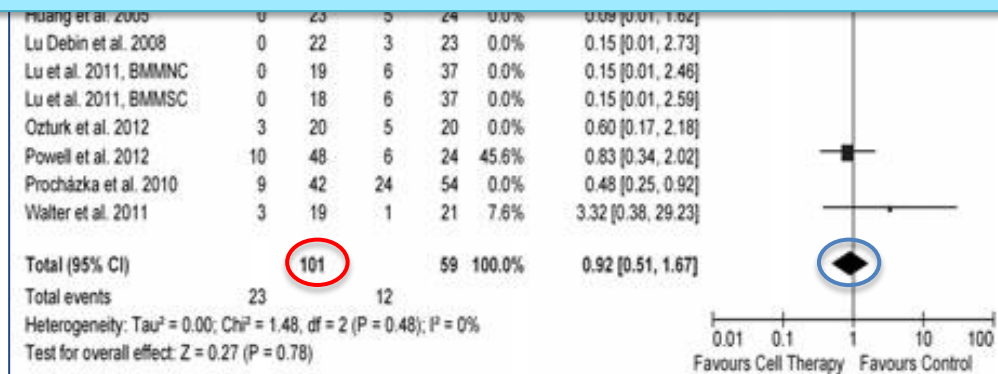


Study or Subgroup	Cell Therapy		Control Group		Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95% CI	Risk Ratio* M-H, Random, 95% CI
	Events	Total	Events	Total			
Barč et al. ²⁰	3	14	7	15	11.0%	0.46 [0.15, 1.44]	
Benoit et al. ⁹	10	34	5	14	18.6%	0.82 [0.34, 1.97]	
Huang et al. ²³	0	23	5	24	1.8%	0.09 [0.01, 1.62]	
Debin et al. ²²	0	22	3	23	1.7%	0.15 [0.01, 2.73]	
Lu et al. ²⁶ BMMNC	0	19	6	37	1.8%	0.15 [0.01, 2.46]	

**Randomizované štúdie
- redukcia rizika vysokej
končatinovej amputácie**

HETEROGENITA ŠTÚDIÍ

- **Závažnosť končatinovej ischémie**
- **Zdroj a druh buniek:** BM-MNC, PB-MNC, BM-MSC, AT-MSC, selektované bunky (CD34+, CD133+), autológne/alogénne bunky, atď.
- **Cieľové parametre:** záchrana končatiny, mortalita, ABI, tcpO₂
- **Spôsob bunkovej aplikácie:** IM, IA





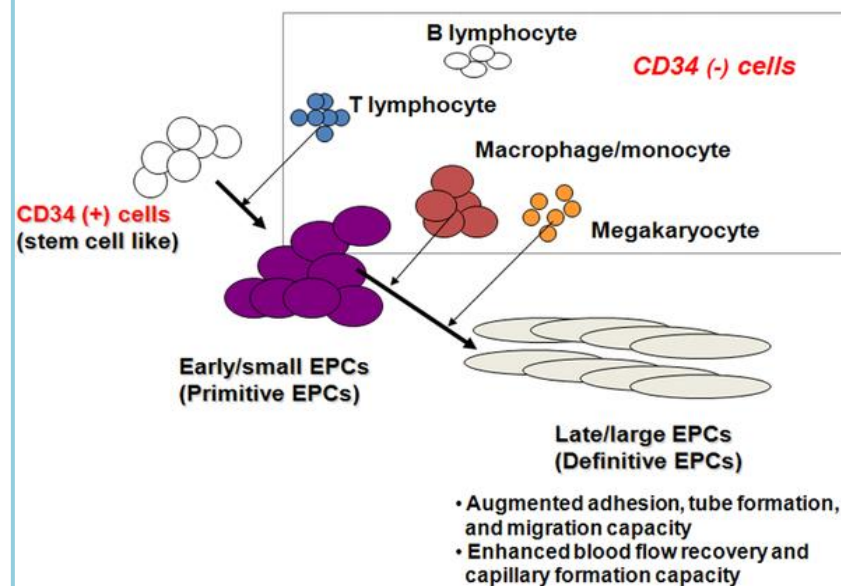
Výhoda autológnych BM-MNC

Komplexnosť bunkového produktu, bez imunologických problémov, už extenzívne otestované

Vzájomná komunikácia medzi bunkami

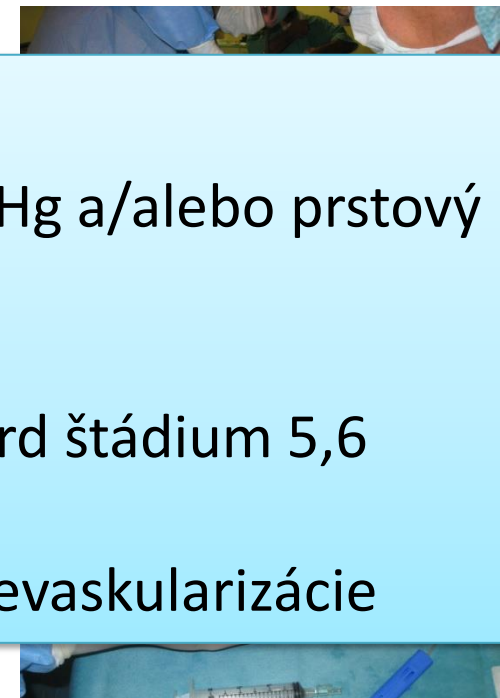
- **Hematopoietic cells – EPCs endothelial progenitors** (CD34+, CD133+, VEGFr2) – angiogenesis
- **Stromal cells – MSCs** (CD34-, CD45-, CD90+, CD44+, CD105+, etc) – immunomodulation, anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-fibrotic, mitogenic and wound healing properties
- **Platelets** – production of growth factors

EPC development from human CD34 (+) cells was regulated by CD34 (-) cells including T cells, Macrophage or Platelets



Podporná úloha CD34- buniek pri diferenciácii a parakrinnej činnosti EPCs
(CD34+)

= Cross-talk between cells

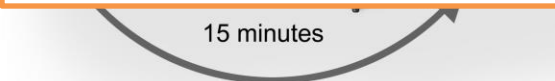


Indikačné kritériá:

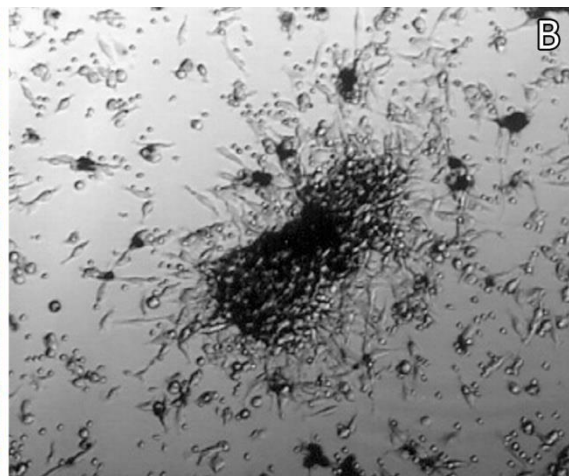
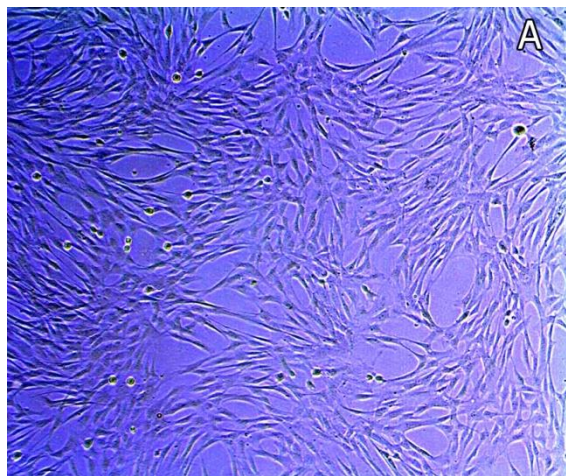
- 1) CLI definovaná ako $ABI \leq 0.4$, členkový tlak $< 50 \text{ mmHg}$ a/alebo prstový tlak $< 30 \text{ mmHg}$, $tcpO_2 < 30 \text{ mmHg}$
- 2) Ischemická nehojacia sa kožná lézia – CLI Rutherford štádium 5,6
- 3) Bez možnosti endovaskulárnej alebo chirurgickej revaskularizácie

Vylučovacie kritériá:

- 1) Prítomnosť malignity v anamnéze
- 2) Kritický koronárny nález alebo nestabilná angina pectoris
- 3) Koncové štádium chronického ochorenia obličiek, pacient v dialyzačnom programe
- 4) Ochorenie kostnej drene (myelodysplastický syndróm), závažná anémia, leukopénia, trombocytopénia



1. Porovnať výsledky IM a IA aplikácie autológnych BMC u pacientov s CLI bez možnosti revaskularizácie
 2. Analyzovať faktory spojené s pozitívnou klinickou odpoveďou na bunkovú liečbu
- **Primárny cieľový parameter:** záchrana končatiny v 12 mesačnom sledovaní



Základné charakteristiky súboru



	All patients (n=70)	Group A (IM, n=36)	Group B (IA, n=34)	p (IM vs IA)
Age (years)	64±11	62±12	66±11	0.08
Sex (males)	62 (89%)	31 (86%)	31 (91%)	0.71
Diabetes mellitus	47 (67%)	24 (67%)	23 (68%)	1.0
Arterial hypertension	54 (77%)	29 (81%)	25 (74%)	0.57
Hyperlipidemia	38 (54%)	22 (61%)	16 (47%)	0.34
BMI	28±4	29±5	27±4	0.08
LVEF (%)	55±8	56±7	54±7	0.07
Smoking	28 (40%)	16 (44%)	12 (35%)	0.47
sCreatinine (μmol/L)	96±45	96±55	93±31	0.37
CRP (mg/L)	23±48	25±60	21±33	0.37
Rutherford category	5.1±0.3	5.1±0.3	5.1±0.2	0.35
tcpO ₂ (mmHg)	15±10	14±9	16±11	0.16
Fbg (g/L)	3.8±0.9	3.7±1.0	4.0±0.9	0.12
CHOL (mmol/L)	4.3±1.2	4.3±1.1	4.4±1.4	0.40

Výsledky

12-mesačné sledovanie



	Celkový súbor (n=70)	IM (n=36)	IA (n=34)	p (IM vs IA)
Mortalita	8 (11%)	4 (11%)	4 (12%)	1.0
Vysoká amput.	14/62 (23%)	8/32 (25%)	6/30 (20%)	0.76
Záchrana končatiny	77%	75%	80%	0.76
AFS	69%	67%	71%	0.8

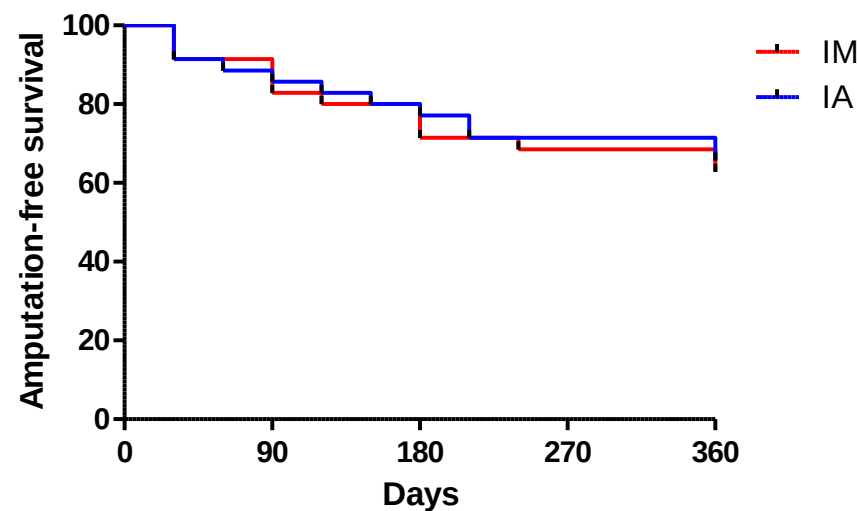
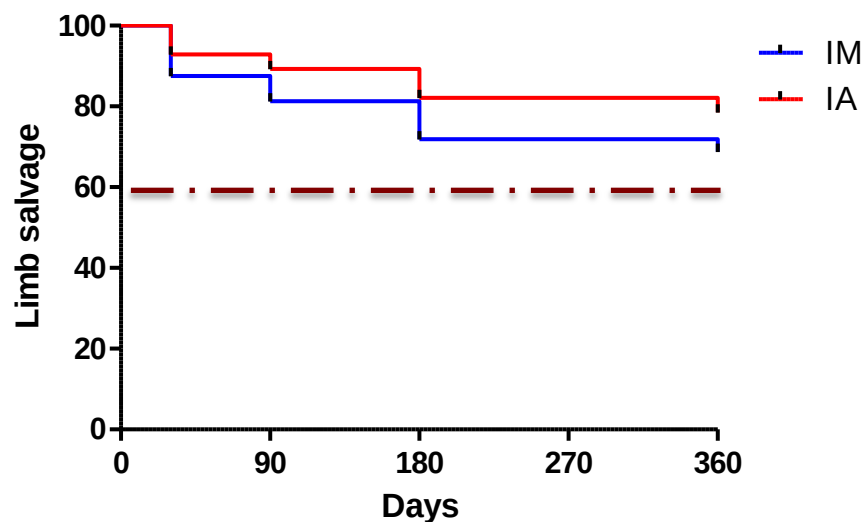
66 ročný pacient – IA BMC podanie



tcpO₂=10mmHg



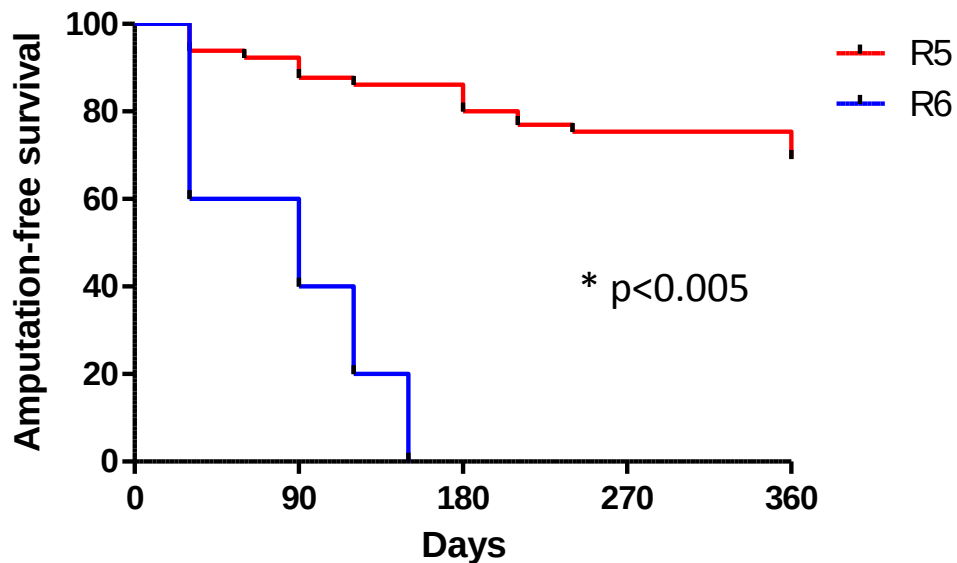
tcpO₂=38mmHg



Výsledok liečby v závislosti od štádia CLI



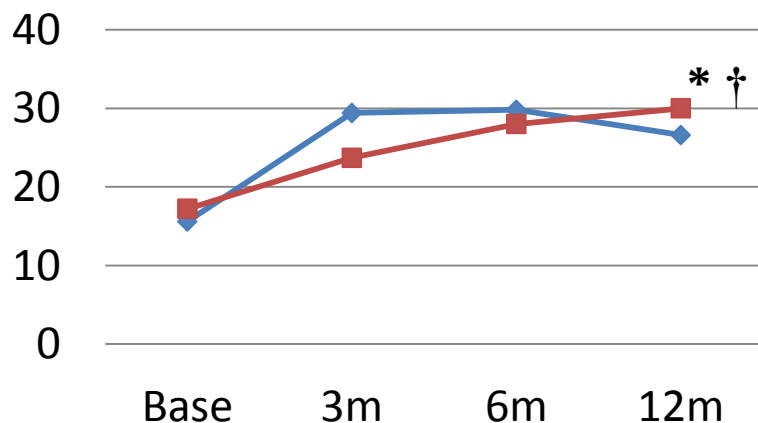
	All patients (n=70)	R5 (n=65)	R6 (n=5)	p (R5 vs R6)
Mortalita	8 (11%)	8 (12%)	0	0.41
Záchrana končatiny	48/62 (77%)	48/57 (84%)	0/5 (0%)	0.0002
AFS	48/70 (69%)	48/65 (74%)	0/5 (0%)	0.001



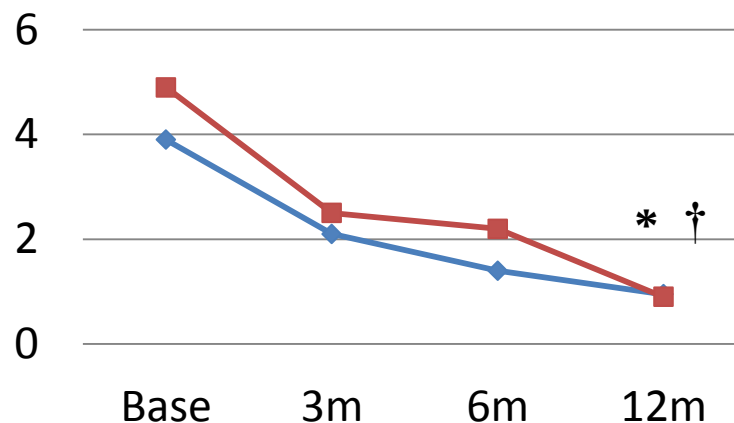
Parametre končatinovej ischémie 6 a 12 mesiacov po bunkovej aplikácii u pacientov so záchranou končatiny



tcpO₂



Pain Scale



* p=NS IM versus IA; ◆ IM ■ IA

† p< 0.001 Base versus 6-month and 12-month

◆ IM ■ IA

	Before BMCs	6-month follow-up	12-month follow up	p
Rutherford category	5.0±0	3.9±1.3	3.1±1.4	<0.001
tcpO₂ (mmHg)	17±10	29±14	27±14	<0.001
ABI	0.8±0.3	0.9±0.3	0.9±0.3	0.14
Pain scale (0-10)	4.4±2.3	1.7±1.6	1.3±1.7	<0.001
QoL (0-100)	55±15	71±11	74±11	<0.001
Wound size (cm²)	6.5±5.9	3.6±7.2	1.7±2.5	<0.001

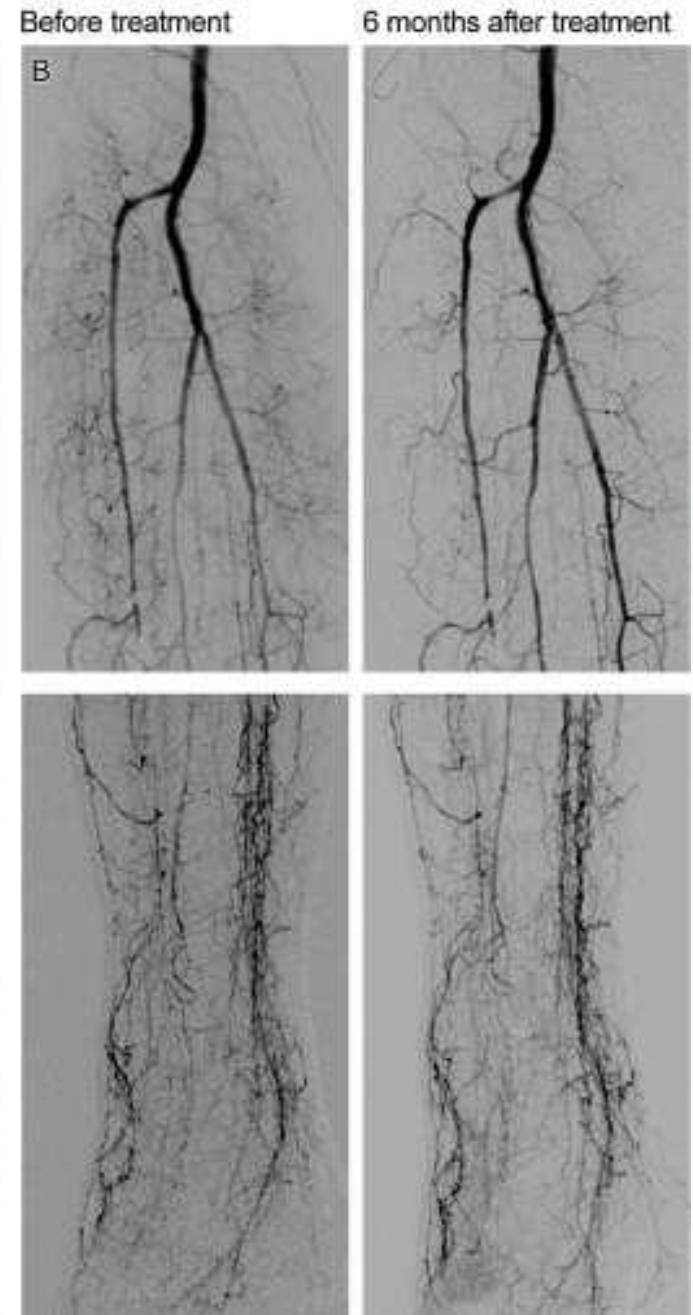
Absencia makrovaskulárnych zmien

DSA nepreukázala rozvoj angiograficky detekovateľných nových kolaterál po 6. mesiacoch od BMC aplikácie

Grade: 0.21 ± 0.43

0 – bez nových kolaterál
+1 – drobné
+2 – mierne
+3 – bohaté

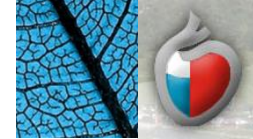
- **Koncept terapeutického efektu BMC na úrovni mikrocirkulácie**
- **DSA nie je vhodná metóda na hodnotenie terapeutickej angiogenézy**



Responderi vs non-responderi na liečbu

BMC – prediktory zlepšenia AFS

(simple binary logistic regression)



	Responderi (n=48)	Non-responderi (n=22)	p
--	----------------------	--------------------------	---

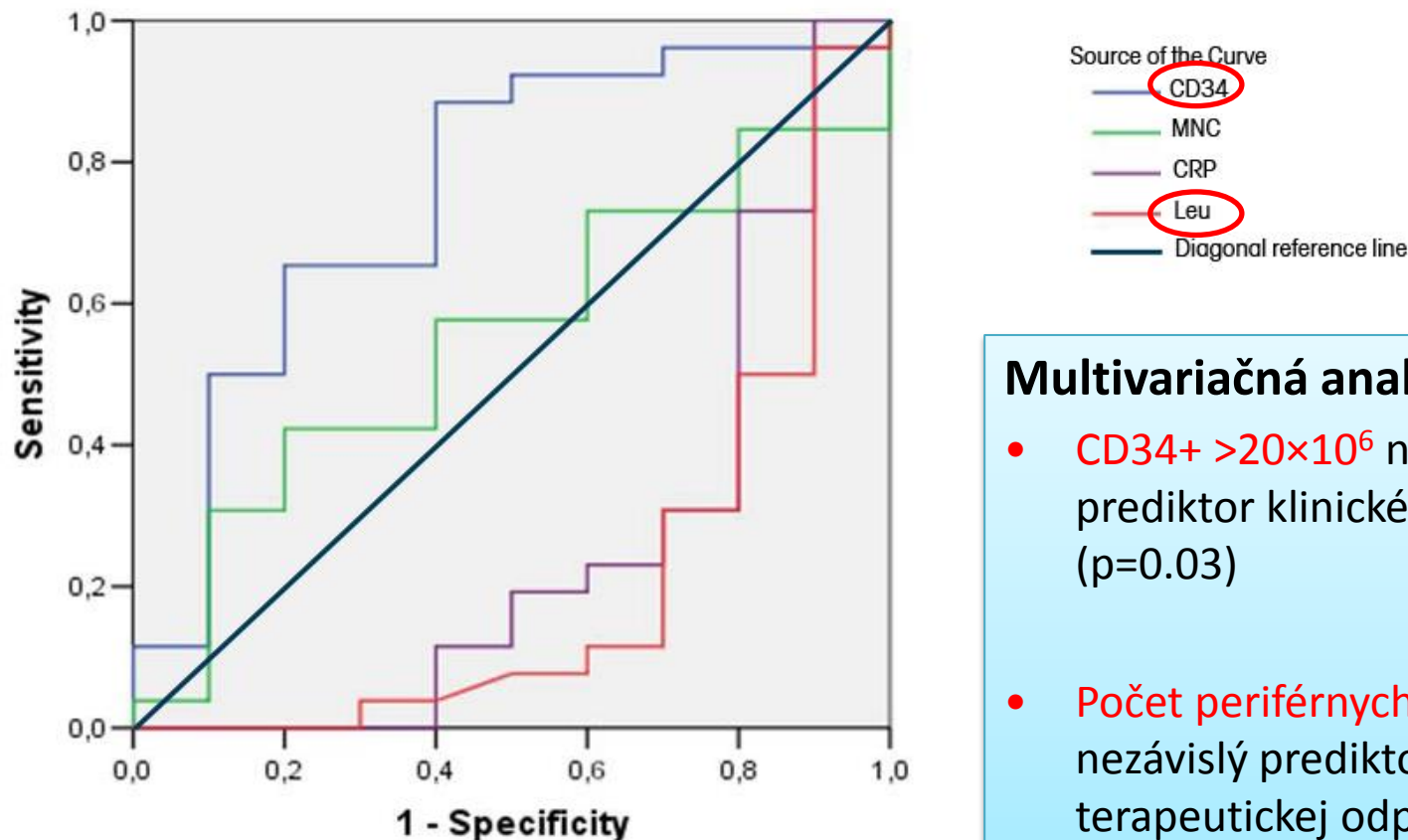
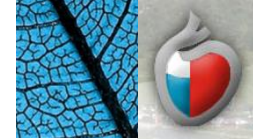
Multivariačný model (multiple binary logistic regression model):

vek (p = 0.025, 95% CI 0.84–0.99) a **CRP** (p = 0.048, 95% CI 0.94–1.00)

nezávislými prediktormi AFS po bunkovej aplikácii

	Responderi (n=34)	Non-responderi (n=18)	p
BM-MNCs (10^9)	4.3±1.5	4.0±1.4	0.46
CD34+ (10^6)	31±16	22±12	0.03

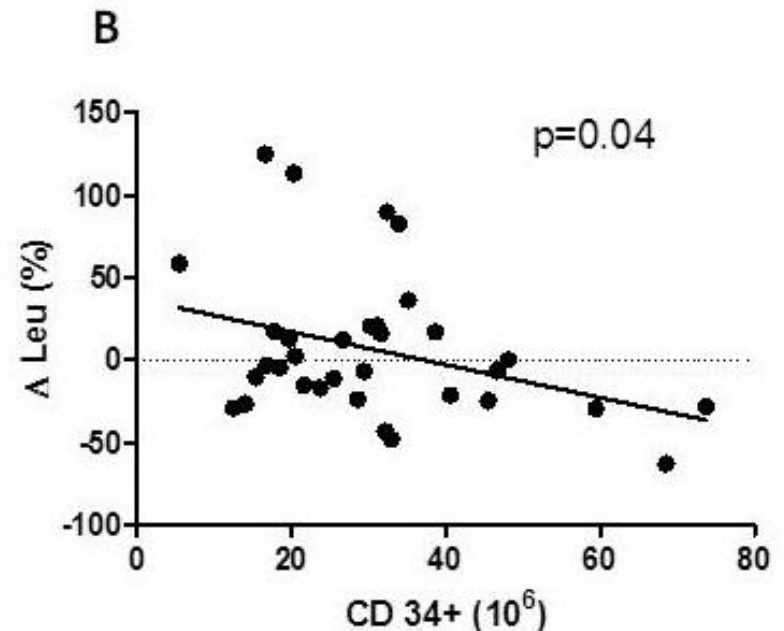
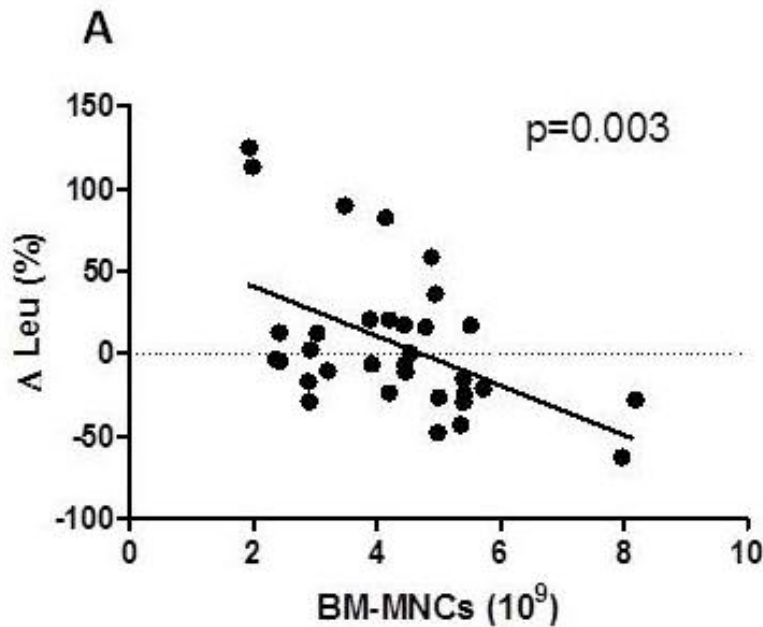
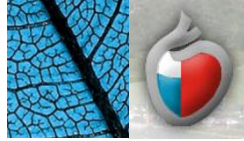
Predikcia prevencie amputácie po BMC aplikácii (6 mes. FU, n=41)



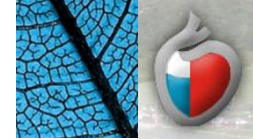
Multivariačná analýza:

- **CD34+ $>20 \times 10^6$** nezávislý prediktor klinického benefitu ($p=0.03$)
- **Počet periférnych Leu $>10 \times 10^9/L$** nezávislý prediktor negatívnej therapeutickej odpovede ($p=0.048$)

Počet podaných BM-MNC významne koreloval s poklesom počtu sérových Leu

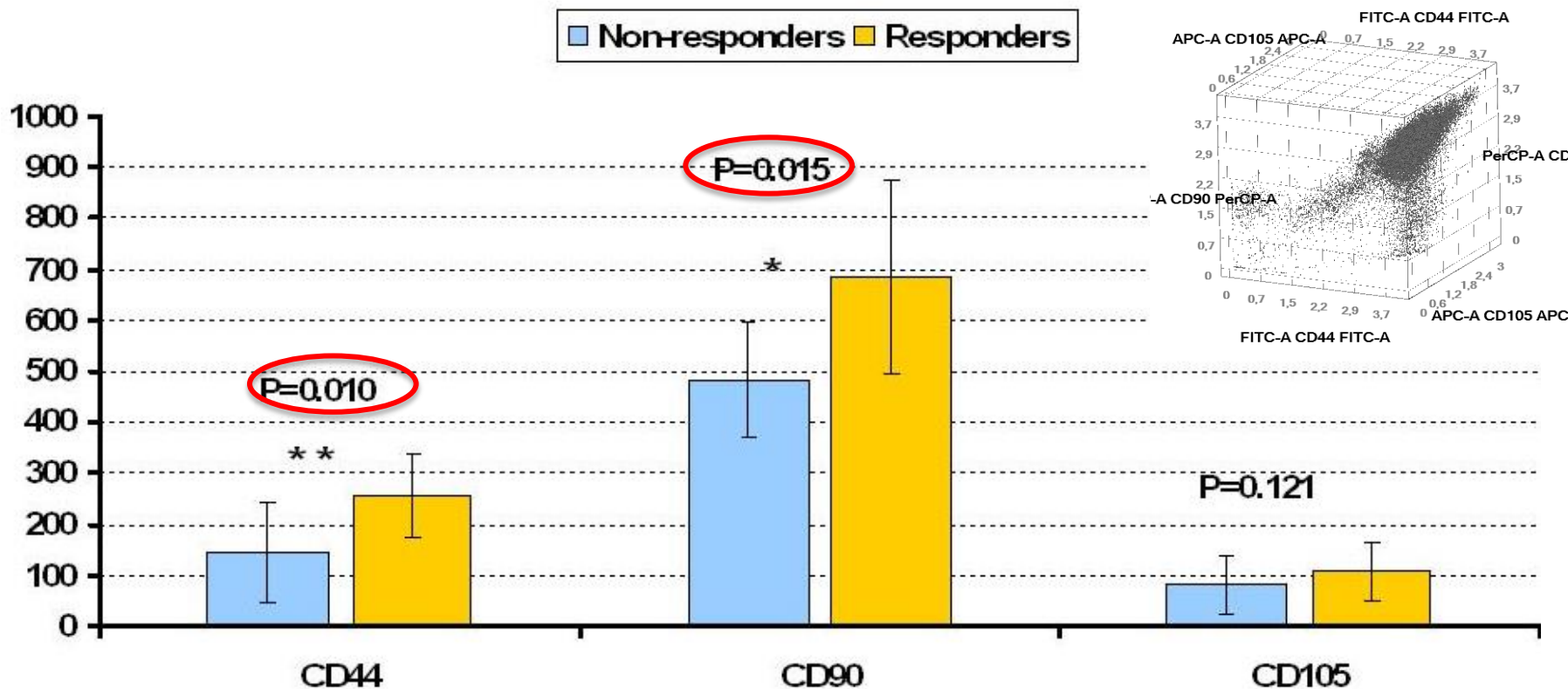


Mezenchýmové kmeňové bunky v BMC koncentráte



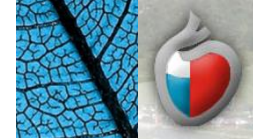
Responderi (n=27) vs Non-responderi (n=14)

MSCs of CLI patients



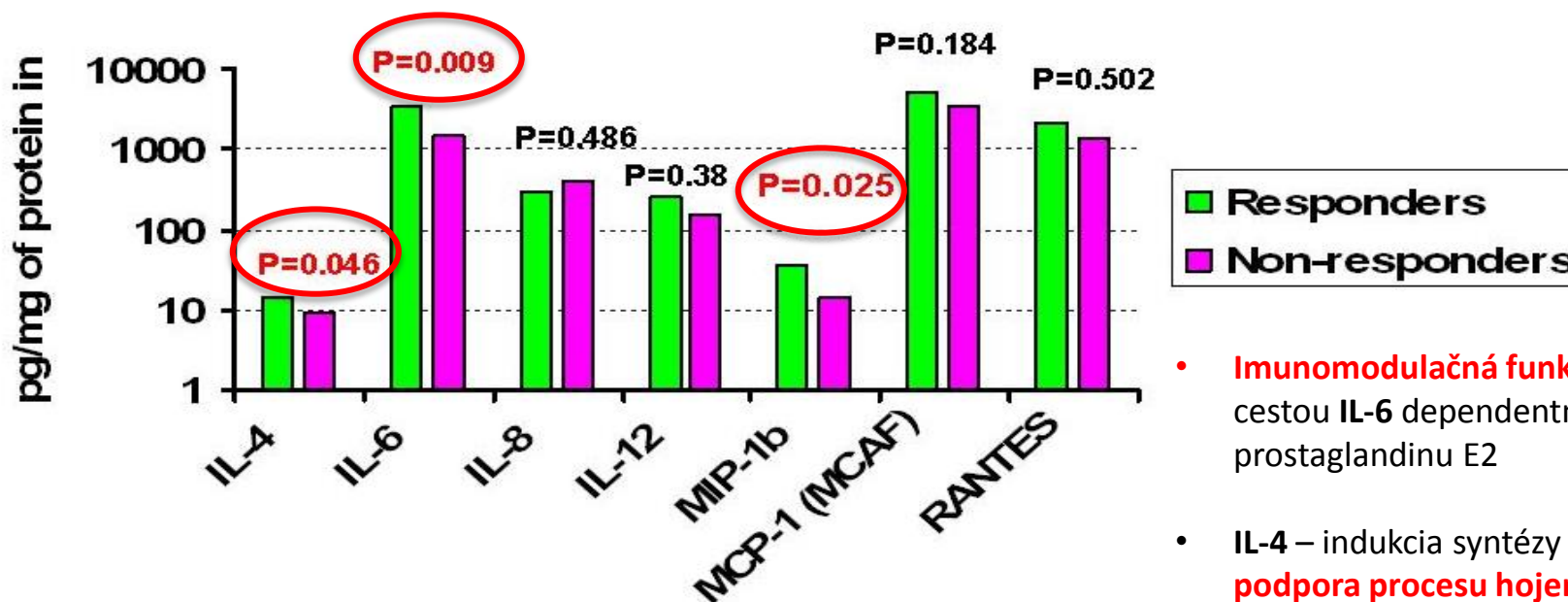
Expresia bunkových markerov mezenchýmových buniek **CD44** a **CD90** u responderov bola vyššia v porovnaní s non-respondermi ($p < 0.05$)

MSC sekretóm – produkcia trofických faktorov



Responderi (27 pts) vs Non-Responderi (14 pts)

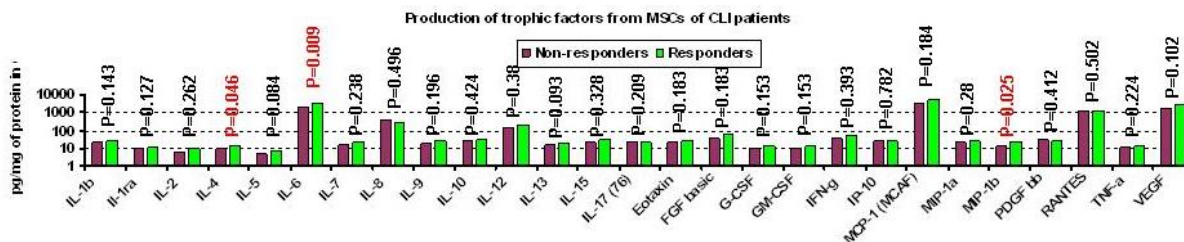
Významne zvýšená koncentrácia **IL-4**, **IL-6** and **MIP-1b** v MSC sekretóme responderov



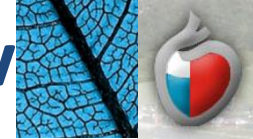
- Imunomodulačná funkcia MSC cestou **IL-6** dependentnej sekrécie prostaglandinu E2

- IL-4** – indukcia syntézy kolagénu – **podpora procesu hojenia**

- MIP-1b (CCL4)** – makrofágový inflamačný proteín 1 beta (chemokín sústred'ujúci makrofágy a bunky endotelovej línie) – **podpora procesu hojenia**



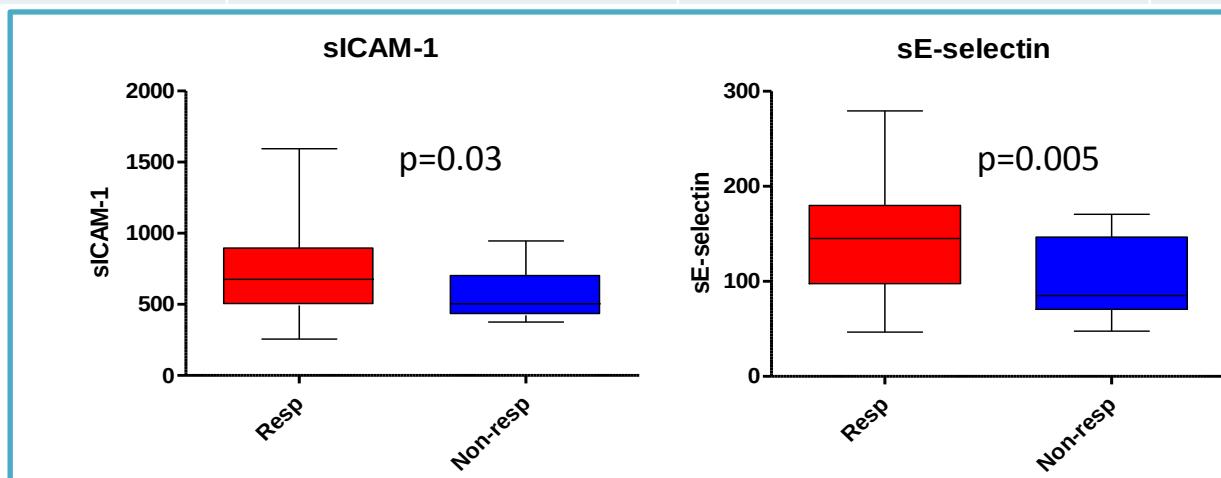
Adhezívne molekuly a VEGF koncentrácia v sére responderov verus non-responderov na bunkovú liečbu



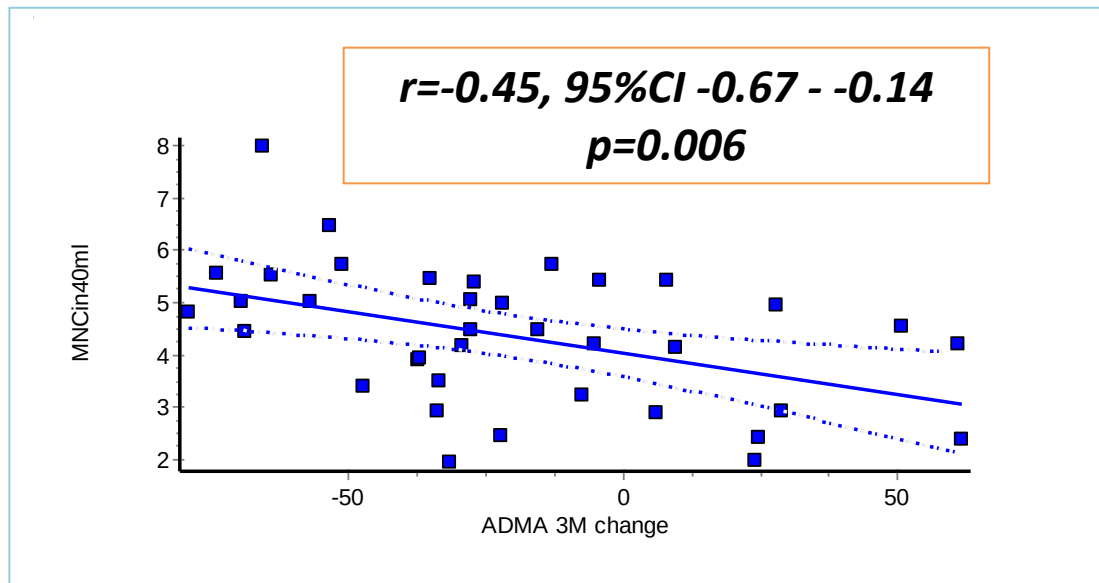
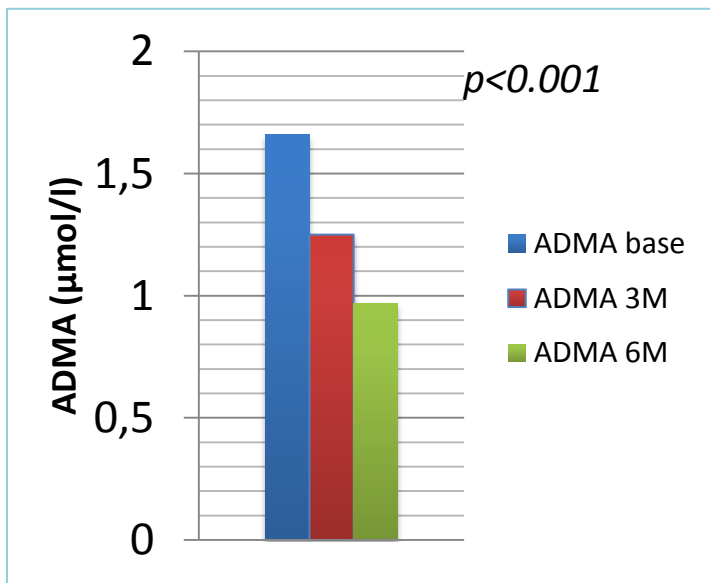
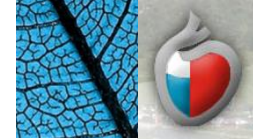
	Responderi (n=34)	Non-responderi (n=18)	p
sICAM-1 (ng/ml)	738±311	569±181	0.03

Adhezívne molekuly – markery endotelovej aktivácie

- **ICAM-1** – signálový receptor endotelových buniek na indukciu expresie Ets-1 (transcripčný faktor regulujúci génovú expresiu proteáz a angiogenézu)
- **E-selektín** – tvorba tubulárnych štruktúr v kultúrach endotelových buniek

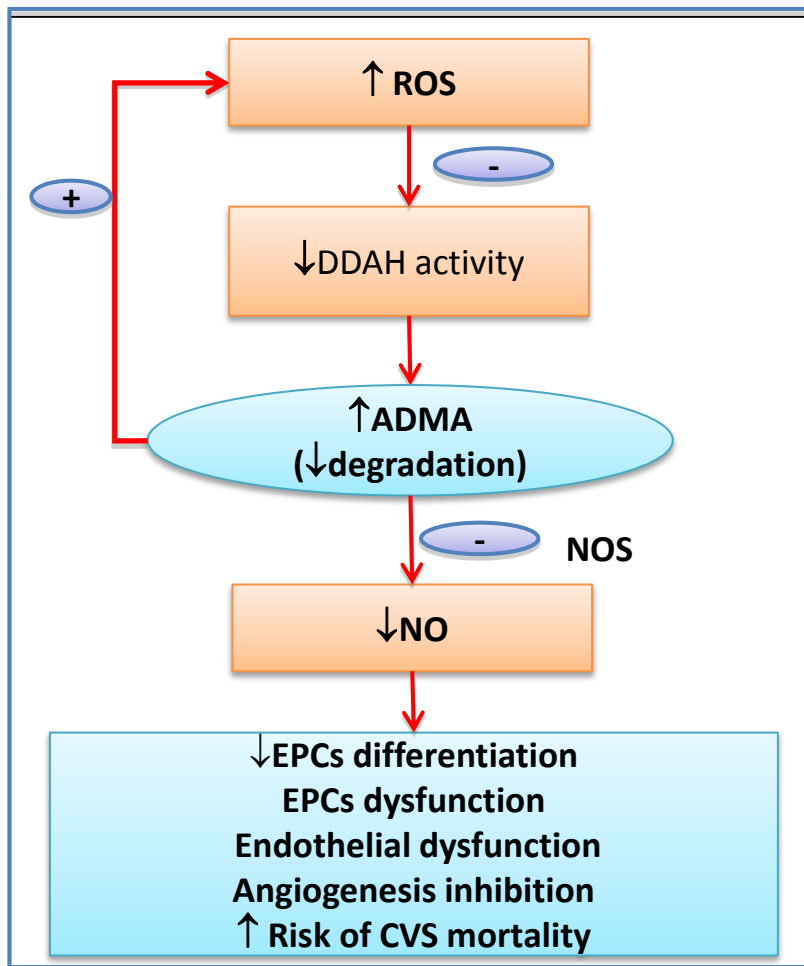
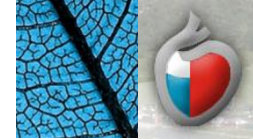


Počet podaných BM-MNC významne koreloval s poklesom koncentrácie ADMA



Asymetrický dimetylarginín (ADMA) – endogénny inhibítor NOS pôsobiaci ako inhibítor angiogenézy, spojený so zvýšenou KVS mortalitou

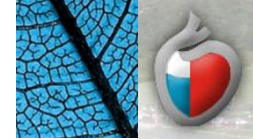
Redukcia oxidačného stresu po bunkovej aplikácii



	Base	6-month FU	p
SOD (U/L)	171±54	210±39	0.01
Reduced glutathione (μmol/L)	6.80±3.0	8.7±4.0	0.008
Apo(a) (g/L)	0.28±0.16	0.35±0.19	0.03
Coenzyme Q10 (μg/L)	416±185	545±287	0.046
Retinol (μmol/L)	2.6±0.9	2.2±0.7	0.005
PC (μmol/L)	128±34	107±18	0.03

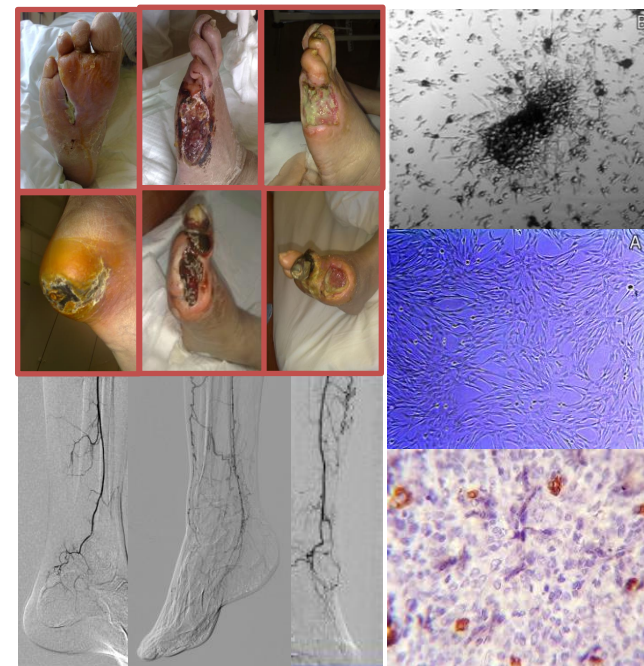
Aplikácia BM-MNC môže pozitívne ovplyvniť angiogénézu a endotelovú dysfunkciu mechanizmom poklesu koncentrácie ADMA a redukciou oxidačného stresu

Otázky a výzvy bunkovej liečby končatinovej ischémie



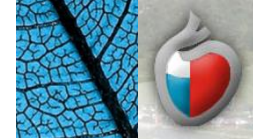
Komplexnosť problému kmeňových buniek
+
Zmeny regulačný podmienok v
EÚ/celosvetovo
=
Pomalý progres výskumu do klinických štúdií fázy 3

- Optimálny typ/zdroj buniek
- Autológne/alogénne bunky
- Modifikované KB
- Dávka/opakované podanie KB
- Mechanizmy účinku

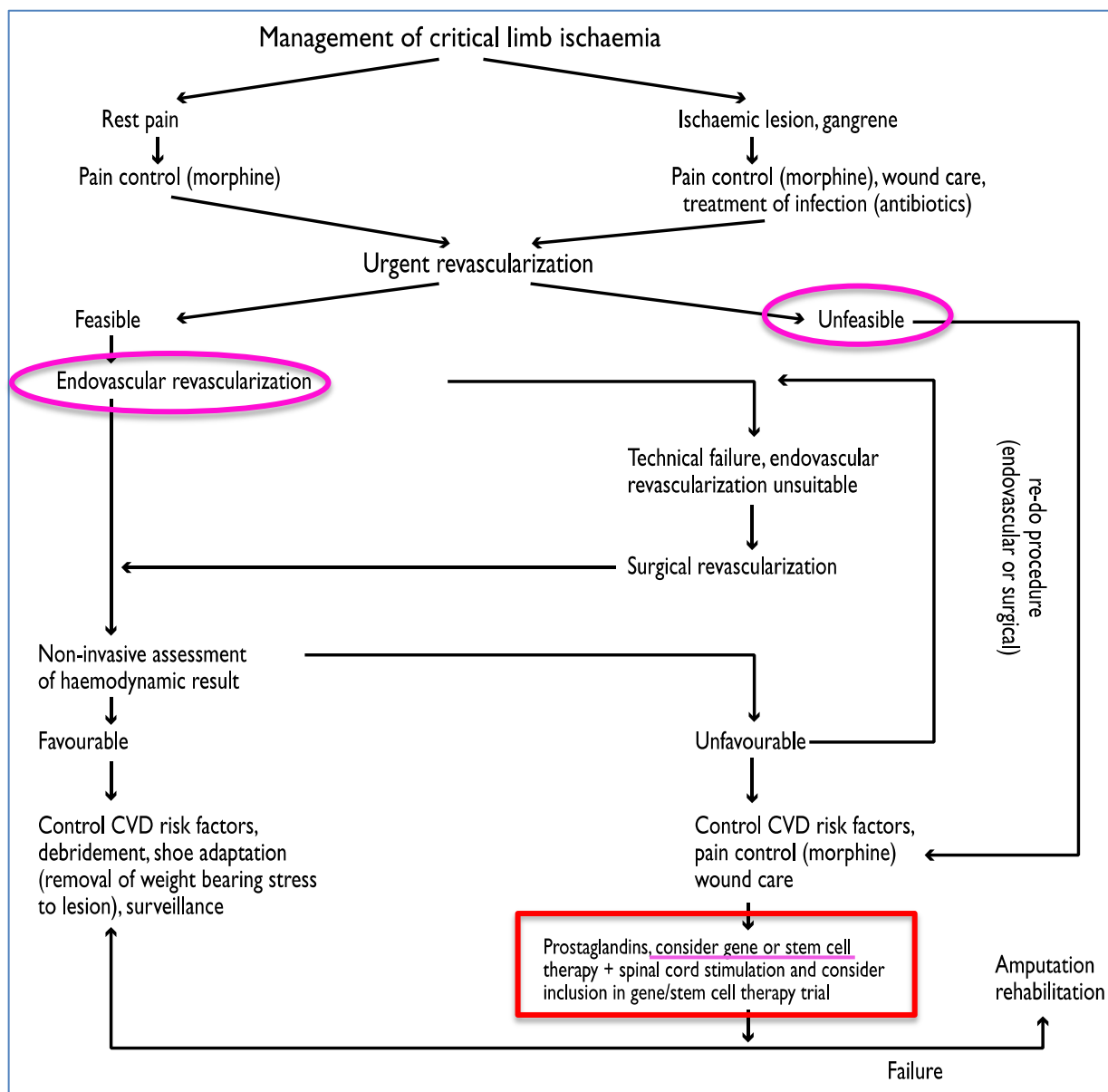


Nezodpovedané

ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD



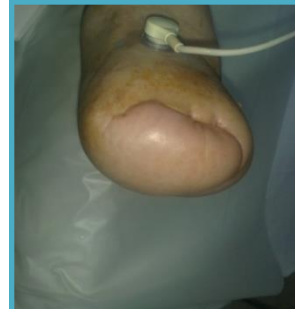
Manažment pacientov s kritickou končatinovou ischémiou



Záver



1. **Synergický efekt endotelových progenitorových buniek (EPC) a mezenchýmových buniek (MSC)** sprostredkovaný ich parakrinnou aktivitou sa zdá byť kľúčový v komplexnom mechanizme bunkovej liečby u pacientov s kritickou končatinovou ischémiou
1. Vyšší vek a pokročilejšie štádium končatinovej ischémie vrátane vyššieho stupňa lokálneho zápalu sú spojené s negatívnou terapeutickou odpoveďou na BMC
2. **IM a IA aplikácia** autológnych BMC sú porovnateľne efektívne a bezpečné liečebné postupy
3. Regulácia osi **ADMA-NO** a zlepšenie antioxidačného statusu participujú na pozitívnom efekte bunkovej liečby kardiovaskulárnych ochorení



VIII. angiologický deň

Národného ústavu srdcových
a cievnych chorôb, a. s.

27. NOVEMBRA 2015

ĎAKUJEM ZA POZORNOSŤ

TÉMY:

- KRITICKÁ KONČATINOVÁ ISCHÉMIA •
– „UP TO DATE“
- VENÓZNY TROMBOEMBOLIZMUS •
- RENÁLNA SYMPATIKOVÁ DENERVÁCIA •
- „VAŠI NAŠI PACIENTI“ •
– KLINICKÉ KAZUISTIKY

ZAHRANIČNÝ HOŠŤ:

MUDr. Václav Procházka, PhD.
FN Ostrava-Poruba, Česká republika

MIESTO KONANIA:

Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a. s.
Pod Krásnou hôrkou 1, 833 48 Bratislava
Konferenčná sála (-2. poschodie)

ORGANIZUJE:

- Pracovná skupina periférnej cirkulácie •
- Slovenskej kardiologickej spoločnosti •
- Slovenská angiologická spoločnosť •
- NÚSCH, a. s. •

KOORDINÁTOR ODBORNÉHO PROGRAMU:

doc. MUDr. Juraj Maďarič, PhD.

HODNOTENIE CME: 6 kreditov

