

Bone-marrow cells in therapy of critical limb ischaemia of lower extremities — own experience

Komórki macierzyste w terapii krytycznego niedokrwienia — doświadczenia własne

Piotr Barć¹, Jan Skóra¹, Artur Pupka¹, Dominik Turkiewicz², Andrzej T. Dorobisz¹, Jerzy Garcarek³, Beata Tomaszewicz², Piotr Szyber¹

¹Department of Vascular, General and Transplant Surgery, Medical University, Wrocław (Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu)

²Department of Paediatric Haematology/Oncology BMT Unit, Medical University, Wrocław (Katedra i Klinika Hematologii Dziecięcej Akademii Medycznej we Wrocławiu)

³Department of Radiology, Medical University, Wrocław (Zakład Radiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu)

Abstract

Background. In 2003 we started investigations concerning the possibility of using new techniques, including bone-marrow cell implantation, in the therapy of critical leg ischaemia. Safety procedures, scheme of work and inclusion and exclusion criteria were established during the first phase in collaboration with various local departments and laboratories.

Material and methods. Inclusion criteria consisted of critical leg ischaemia, no possibility of surgical operation, no effective 2 months conservative treatment or the possibility of limb amputation in the following months. Exclusive criteria included causes of ischaemia other than atherosclerosis, absence of consent, need for urgent amputation, cancer or poor general condition. After acquiring conscious consent, patients were randomized into two groups: conventional therapy (control group) ($n = 15$), and those treated with bone-marrow cells ($n = 14$). Standard bone marrow collection was performed as early as the first operation (usually about 8 a.m.) under general anaesthesia. Material was then prepared filtration and concentration in a separator — using standard procedure. Morphology and measurement of the amount of nuclear cells and CD34 cells were performed as well as microbiological examination. This material, including progenitor cells, was injected using two methods about 46 hours after bone marrow aspiration. In every case it involved several intramuscular injections into the ischemic limb (thigh and leg). In 4 cases we performed intravascular placement of progenitors using arteriography (in the distal part near the occluded part of the axial limb artery).

Results. Observation was based on several parameters: vital parameters (blood pressure, heart rate, respiratory rate, temperature) measured every day during hospitalisation; ankle/brachial index (ABI), ulcerations or pedal necrosis documented by photography and subjective parameters: feeling of pain (VAS), self care (WHO scale) measured 1, 3 and 6 months after our procedure. Baseline angiography was performed in every case. Control angiography followed bone marrow collection after 3 months in 5 cases. No changes in angiograms were detected. Endpoints were: amputation (10) and death (no observations). In case of amputation, material was histologically examined and signs of angiogenesis (mostly new vein formation) were detected. In the group treated by stem cell implantation we reached greater subjective improvement in 12 cases compared to 7 in the control group; healing of ulcers in 8 cases (complete in 5 cases) compared to 3 cases in the control group. Amputations were performed in 3 patients in the index group compared to 7 in the control group.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Piotr Barć, Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej AM
ul. Poniatowskiego 2, 50–326 Wrocław
tel./fax: +48 (71) 322 32 12
e-mail: piotr@kozle.pl

Conclusions. We think that implantation of patients' bone-marrow progenitor cells in cases of critical leg ischaemia is safe and is a prospective therapeutic method.

Key words: endothelial progenitor cells (EPC), stem cells, critical limb ischaemia

Streszczenie

Wstęp. W 2003 roku autorzy niniejszego artykułu rozpoczęli badania nad możliwościami leczenia chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn za pomocą implantacji własnych komórek macierzystych. Po okresie wstępnych przygotowań ustalono schemat postępowania, kryteria włączenia do leczenia i sposób prowadzenia badań kontrolnych oraz procedur bezpieczeństwa.

Materiał i metody. Kryteria włączenia obejmowały krytyczne niedokrwienie kończyny niekwalifikujące się do leczenia chirurgicznego, po leczeniu zachowawczym nie krótszym niż 2 miesiące, w którym nie nastąpiła istotna poprawa zagrożonych zabiegiem amputacyjnym. Do kryteriów wyłączenia zaliczono: brak zgody chorego, inne powody niedokrwienia niż miażdżycza, znaczne zaawansowanie zmian zmuszające do pilnej amputacji, a także obecność choroby nowotworowej lub stan ogólny nierokujący przeżycia 6 miesięcy. Chorych po poinformowaniu i uzyskaniu od nich świadomej zgody losowo przydzielano do dwóch grup: kontrolnej (15 osób poddano terapii klasycznej) oraz badanej (14 pacjentów). Zastosowano następujący algorytm: w godzinach rannych wykonywano standardowy zabieg pobrania szpiku (z kości biodrowej), następnie przygotowywano w separatorze zawieszinę komórek za pomocą filtrowania szpiku, zagęszczania i separowania komórek CD34+ (frakcja zawierająca progenitory). Uzyskany materiał podawano chorym dwoma drogami miejscowo do tkanki mięśniowej niedokrwionej kończyny ($n = 14$) i podczas angiografii, do końcowego odcinka osiowego naczynia kończyny dostępnego cewnikiem (nad okluzję) ($n = 4$). W obserwacji uwzględniano parametry ogólne (RR, tętno, częstość oddechów, temperatura), wartość współczynnika kostka/ramię (ABI), makroskopowy obraz ewentualnych owrzodzeń i martwicy (fotografie), a także subiektywne odczucia pacjentów (VAS, skala jakości życia wg klasyfikacji WHO). Notowano parametry przed leczeniem, codziennie do momentu wypisu chorego ze szpitala, po 1., 3. i 6. miesiącu terapii.

Wyniki. Angiografię wstępną wykonano u każdego pacjenta (wynik badania dyskwalifikował od przeprowadzenia zabiegu rewaskularyzacyjnego), natomiast badanie kontrolne przeprowadzono po 3 miesiącach u 5 chorych z grupy badanej (nie odnotowano różnic w ich obrazie). Punktami końcowymi obserwacji były amputacje (3 w grupie badanej i 7 w grupie kontrolnej) oraz śmierć pacjenta (nie odnotowano). W przypadku amputacji pobierano do badania histologicznego i w przypadku zastosowania komórek macierzystych obserwowano cechy angiogenezy. W większości przypadków uzyskano poprawę subiektywną (12 osób w grupie badanej vs. 7 w grupie kontrolnej). Zaobserwowano zmniejszenie owrzodzenia (8) oraz wygojenie w grupie leczonej komórkami szpiku (5) w stosunku do grupy kontrolnej (3). Amputacje przeprowadzono u 3 chorych (w grupie kontrolnej u 7 osób).

Wnioski. Implantacja własnych komórek macierzystych uzyskanych ze szpiku kostnego jest bezpieczną i budzącą duże nadzieje metodą leczenia, pomimo znanych ograniczeń. Ze względu na możliwość jej rozwoju powinna stanowić przedmiot dalszych dociekań.

Słowa kluczowe: komórki progenitorowe śródbłonka (EPC), komórki macierzyste, krytyczne niedokrwienie kończyn

Introduction

For more than 20 years no progress in results of critic leg ischaemia treatment have been archived. Vascular surgery supported by interventional radiology allowed 20–50% limbs to be saved successfully. Further progress seems not to have been accomplished using classical methods, mainly because atheromatic and thrombotic occlusions are situated distally in smaller

Wstęp

Od ponad 20 lat nie odnotowano istotnych postępów w leczeniu krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych. Chirurgia naczyniowa wspierana przez radiologię zabiegową pozwala na skuteczne uratowanie krytycznie niedokrwionych kończyn w 20–50%. Dalsza poprawa nie wydaje się możliwa do osiągnięcia za pomocą metod klasycznych. Główną tego przyczyną jest

arteries. Conservative therapy consisting of various pharmacological agents did not bring the appropriate vessel recanalisation, and surgical procedures failed because of the localization of stenoses and occlusions. This results in loss of limb and disability.

New research in basic biological sciences has allowed new access to the therapy of critical ischaemia. The search of new methods of revascularization of ischemic tissues has focused on the process of neoangiogenesis, which is permanently present in the human body. Stimulation of these processes can help in adequate blood supply by replacing occluded arteries with new ones.

Angiogenesis requires cells which become vessels. It has been proven in recent years that both endothelial and smooth muscles cells are formed from bone marrow stem cells [1, 2]. What is even more interesting, endothelial progenitor cells (EPC) [1] and smooth muscle progenitor cells (SPC) [2] are present in human blood. So, in a physiological state cells responsible for the repair and rebuilding of vessels are present in circulating blood. Of course in normal conditions the amount is low, but there are situations in which progenitor cells are released from bone-marrow into circulating blood. These releases include: destruction of endothelium and ischaemia [3, 4], elevation in serum of chemokines such as SDF-1, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and stem cell factor (SCF) [5]. Progenitors of endothelial cells derive from haematopoietic stem cells (HSC) of bone marrow. There are many antigens on EPC membrane, especially CD34(+), Tie-2(+), ACC133(+), VEGFR2(+) and CXCR4(+) [6]. Many of these antigens connecting to ligands play a valid role in angiogenesis. Receptor CXCR4, one of the family of CXCR receptors, is responsible for cell reaction in the presence of SDF-1 [7]. SDF-1 is very strong chemokine, which acts by releasing stem cells from bone marrow [7]. The concentration of this substance in animal models increase 24 hours after experimental damage of the carotid artery, which showed a close correlation between the increase in the number of progenitor cells in circulating blood and their migration to places of vascular destruction [8]. Directed migration of progenitor cells is evoked by increasing concentration of SDF-1 [7]. Thus, experimentally added anti-SDF-1 antibodies result in inhibition of neointima formation and inhibition of rebuilding and repair of vessels [8]. Many publications prove the role of endothelial progenitor cells in rebuilding and repairing vessels [8, 9]. What is more, there are theories that set up the role of EPC in perpetual rebuilding and repairing of endothelium spoiled by cardio-vascular disease risk factors [10]. Thanks to this, EPC ensures continuity of the vascular system and de-

fakt lokalizacji zmian w naczyniach obwodowych (okluzje powodowane przez miażdżycę oraz zakrzepicę). Leczenie zachowawcze obejmujące infuzje płynów, heparynoterapię, prostawazynę, leki: fibrynolityczne, antyagregacyjne, naczyniorozszerzające czy reologicznie czynne często nie wpływają na dostateczną poprawę perfuzji i mikrokrążenia. Obwodowa lokalizacja zmian uniemożliwia zastosowanie właściwej terapii chirurgicznej, w wyniku czego następuje utrata kończyny i inwalidztwo.

Zdobycze nauk podstawowych pozwalają na nowe podejście do terapii krytycznego niedokrwienia. Dzięki poszukiwaniu nowych sposobów rewaskularyzacji niedokrwionych tkanek skupiono uwagę na stałe występowanie procesu neoangiogenezy w organizmie. Za pomocą stymulacji ustroju do formowania nowych naczyń można zabezpieczyć odpowiednie ukrwienie tkanek, zapewnić im nowe naczynia w miejsce trwale niedrożnych.

Do powstania nowych naczyń niezbędna jest pula komórek mogących stanowić podstawowe jego elementy. W ostatnich latach udowodniono, że zarówno komórki śródbłonka, jak i mięśni gładkich, wchodzących w skład naczyń, pochodzą z komórek macierzystych szpiku kostnego [1, 2]. Ponadto wykazano obecność progenitorów śródbłonka (EPC) [1] oraz mięśni gładkich (SPC) [2] krążących we krwi obwodowej u ludzi. Zatem fizjologicznie we krwi krążą komórki odpowiedzialne za odbudowę i naprawę łożyska naczyniowego. Oczywiście w naturalnych warunkach ich liczba jest niewielka, istnieją jednak sytuacje uwalniające progenitory ze szpiku i znaczny wzrost ich liczby na obwodzie. Do takich czynników należy między innymi uszkodzenie śródbłonka i niedokrwienie [3, 4] czy podwyższone w osoczu stężenie takich chemokin, jak SDF-1, GM-CSF, SCF [5]. Progenitory komórek śródbłonka pochodzą z hematopoetycznych komórek pnia (HSC) szpiku kostnego. Posiadają liczne antygeny na powierzchni błony komórkowej. Wśród nich wyróżnia się między innymi CD34+, Tie-2(+), ACC133(+), VEGFR2(+), CXCR4(+) [6]. Większość tych antygenów dzięki łączeniu się ze swoistymi ligandami odgrywa bardzo ważną rolę w angiogenezie. Receptor CXCR4 należy do większej rodziny receptorów CXCR, jest odpowiedzialny za reakcję komórki na SDF-1 — bardzo silną chemokinę powodującą między innymi uwolnienie komórek pnia ze szpiku kostnego [7]. Stężenie tego czynnika według badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym wzrasta już po 24 godzinach od eksperymentalnie wywołanego uszkodzenia tętnicy szyjnej, co koreluje ze wzrostem liczby krążących progenitorów we krwi i ich migracją do ogniska uszkodzenia [8]. Ukierunkowany ruch komórek niezróżnicowanych zależy od interakcji receptora CXCR4 z omawianą chemokiną [7]. Progenitory wykazują migrację w kierunku wzrastającego stężenia SDF-1 [7]. Dlatego doświadczalne

fends against endothelial disorders. Perpetual stimulation by cardiovascular disease risk factors leads to an exhausted reserve of bone marrow progenitor cells and results in loss of haemostasis and acceleration of atheromatic degeneration [10]. It has been proven that the number and activity of blood EPC have a correlation with the estimated risk of atherosclerosis [10, 11]. The recruitment of cells with the ability to transform into vascular smooth muscle (for forming vascular muscular membrane) is performed after the formation of new endothelium by EPC [12].

Material and methods

From 2003, following several papers on the role of stem cells in the therapy of cardiac ischaemia published by cardiologists, we started analogue investigations in the case of critical lower limb ischaemia. We begin by cooperation with several institutions (Department of Paediatric Haematology (Oncology), Institute of Glicochemistry, Institute of Microbiology). In the beginning of 2004 we started the introduction of alternative methods of critical limb ischaemia; first genetic (RNA coding VEGF), then patients' own bone marrow cell implantation, and a combination of these methods. During 2004 we refined our inclusion and exclusion criteria, algorithm of investigations and safety procedures.

Finally we established these inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

- patients with critical lower limb ischaemia with risk of amputation;
- presence of rest pain and/or necrosis lasting longer than 12 weeks;
- no progress after 8 weeks of conventional therapy;
- ankle-brachial index (ABI) below 0.5 in two independent examinations performed during the 7 day interval pre inclusion;
- peripheral type of atherosclerosis and no possibility for operative therapy, confirmed in angiogram.

Exclusive criteria:

- age lower than 18 years;
- need for urgent amputation;
- reasons for ischaemia other than atherosclerosis;
- cancer;
- absence of conscious consent;
- lack of understanding of the idea of therapy by patient;
- poor general condition (life expectation below 6 months).

Of course, in addition we constantly performed conventional therapy (pharmacotherapy, rehabilitation), not only the investigated method, in both groups of patients.

podanie przeciwciał anti-SDF-1 hamowało tworzenie neointymy oraz zmniejszało liczbę komórek mięśniowych w tętnicy po urazie [8]. W wielu pracach udowodniono udział progenitorów śródbłonka w odbudowie i tworzeniu naczyń [8, 9]. Ponadto istnieją teorie zakładające, że komórki te biorą udział w ciągłej naprawie i odbudowie śródbłonka uszkodzanego przez czynniki ryzyka choroby naczyniowo-sercowej [10]. Dzięki temu zapewniają ciągłość łożyska i zapobiegają zaburzeniom funkcji śródbłonka. Natomiast wyczerpanie (poprzez ciągłą stymulację przez czynniki ryzyka) puli progenitorów w szpiku najprawdopodobniej wpływa na zaburzenia homeostazy i przyspiesza rozwój miażdżycy [10]. Wykazano, iż liczba i właściwości biologiczne progenitorów we krwi obwodowej koreluje z szacowanym ryzykiem miażdżycy [10, 11]. Dopiero po składnikach śródbłonka są rekrutowane komórki mogące zarówno przekształcić się w mięśnie gładkie, jak i stanowić elementy błony mięśniowej naczynia [12].

Materiał i metody

Od 2003 roku, po zapoznaniu się z pracami kardiologów, autorzy niniejszego artykułu planowali rozpoczęcie analogicznych badań w terapii krytycznego niedokrwienia kończyn. W sierpniu 2003 roku podjęto współpracę z Kliniką Hematologii Dziecięcej AM i Zakładem Glikochemii Instytutu PAN we Wrocławiu, a także Pracownią Bakteriologii Katedry Mikrobiologii AM we Wrocławiu. Na początku 2004 roku rozpoczęto leczenie krytycznego niedokrwienia kończyn metodami alternatywnymi dla klasycznych: za pomocą terapii genowej, a następnie implantacji komórek macierzystych pochodzących z własnego szpiku kostnego chorego oraz kombinacji powyższych metod. Przez cały 2004 rok precyzowano kryteria włączenia do leczenia i algorytm przeprowadzenia leczenia oraz kontroli i procedur bezpieczeństwa.

Do badania włączano chorych zagrożonych utratą kończyny, z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych na tle zmian miażdżycowych, spełniających następujące warunki:

- obecności bólu spoczynkowego nocnego i/lub niedokrwiennego owrzodzenia/martwicy kończyny dolnej od minimum 12 tygodni;
- brak poprawy po leczeniu konwencjonalnym trwającym minimum 8 tygodni;
- wartość współczynnika kostka/ramię < 0,5 w dwóch niezależnych badaniach w wykonanych w odstępie 7 dni przed włączeniem do badania;
- stwierdzony w badaniu angiograficznym obwodowy typ niedrożności i/lub brak możliwości wykonania zabiegu rewaskularyzacyjnego.

After qualification, randomization (into index or control group) took place and signature of a fully informed patient's conscious consent form (according to principle of Helsinki Declaration).

Bone marrow was harvested under general anaesthesia by multiple aspirations from iliac crests with commercially available Bone Marrow Collection Kits (Baxter, USA). ACD formula A 1:10 was used for marrow preservation and to prevent clotting. After collection, the marrow was filtered with 500 and 200 micron gravitational filters included in the Bone Marrow Collection Kit. Automated isolation of mononuclear cells from collected marrow was performed with Baxter Fenwal CS 3000 plus blood cell separator according to the manufacturer's instruction. The final volume of apheresis product was adjusted to 100–150 ml with autologous plasma. An additional 1 ml sample was withdrawn for CD34 cell enumeration and leukocyte count. The product was finally filtered with 50 microns blood product filter (PALL). Prior to infusion of cells to the patient, samples were collected for microbiological control. CD34 positive cells were enumerated with flow-cytometry according to published guidelines [13].

The product containing progenitor cells (in which no ACC133+ but CD34 positive cells were enumerated) were brought back to the Department of Vascular Surgery. We introduced our concentrate with stem cells 58 hours after bone marrow collection.

We used two means of introduction:

- intramuscular (4–10 injections; 2–4 into thigh and 2–7 into leg), generally on the border of ischemic regions (14 patients);
- intravascular, during catheterization of axis limb artery near to its occlusion (30–50 ml of product) (4 patients).

We performed microbiologic assays of products containing bone marrow cells (no bacterial cultures were detected).

Observation consisted of vital parameters (blood pressure, pulse rate, breath rate, temperature) taken everyday during hospitalization.

Additional observations included:

- ankle-brachial index (ABI) (day 0, 1, 3, 6 months after procedure);
- photographic documentation of ischemic ulcerations and necrosis (day 0, months 1, 2, 3, 6);
- subjective parameters (feeling of pain in VAS, quality of life in WHO scale) (Table I).

Endpoints were: amputation and death.

In case of amputation we performed histological examinations of amputated limbs.

Do kryteriów wyłączenia zaliczono:

- wiek poniżej 18 lat;
- zaawansowanie niedokrwienia zmuszające do pilnej amputacji ze wskazań życiowych;
- inne przyczyny niedokrwienia niż miażdżyca;
- choroba nowotworowa;
- ciąża lub laktacja;
- brak zgody chorego;
- niezdiscyplinowanie chorego;
- stan ogólny nierokujący przeżycia 6 miesięcy.

Oprócz terapii komórkami macierzystymi prowadzono konwencjonalną farmakoterapię i rehabilitację.

Po poinformowaniu chorego o istocie badania i uzyskaniu świadomej zgody uczestnictwa (zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej) pobrano szpik metodą wielokrotnych nakłuć talerzy kości biodrowych z zastosowaniem znieczulenia ogólnego za pomocą komercyjnego zestawu do pobierania szpiku kostnego (Bone Marrow Collection Kit, Baxter, Stany Zjednoczone). W celu uniknięcia wykrzepiania szpiku stosowano preparat do konserwacji krwi ACD-A w proporcji 1:10 ml pobranego szpiku. Szpik kostny pobrany do worka kolekcyjnego przed dalszymi etapami opracowania filtrowano z zastosowaniem filtrów grawitacyjnych o wielkości porów 500 i 200 mikronów (zawartych w zestawie). Komórki jednojądrzaste izolowano ze szpiku kostnego z zastosowaniem automatycznego separatora komórkowego Fenwal CS 3000 plus (Baxter, Stany Zjednoczone) zgodnie z zaleceniami producenta separatora. Aferizat komórek jednojądrzastych zawieszano w objętości 100–150 ml autologicznego osocza, pobierano 1 ml w celu oznaczenia leukocytozy oraz liczby komórek CD34+ otrzymanego koncentratu komórkowego. Końcowy produkt filtrowano za pomocą filtru do produktów krwiopochodnych o wielkości porów 50 mikronów. Przed podaniem preparatu pacjentom pobierano posiewy materiału w celu kontroli jego jałowości.

Liczbę komórek jednojądrzastych oznaczano z zastosowaniem cytometru przepływowego zgodnie z protokołem zalecanym przez ISHAGE [13].

Do Kliniki dostarczano koncentrat zawierający komórki progenitorowe (w którym określano jedynie obecność frakcji komórek CD32+, bez ACC133+) oraz morfologię preparatu, próbkę w celu oznaczeń (do zamrażania) i przeprowadzania posiewów.

W godzinach popołudniowych wykonywano implantację preparatu (58 godz. od pobrania szpiku).

Preparat podawano dwiema drogami:

- domięśniowo w okolice niedokrwione (wyznaczane wcześniej) i na granice strefy zadowalająco i nie-

Table I. Performance and health condition according to WHO and ECOG**Tabela I.** Skala stanu i sprawności chorego według WHO i Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

Scale Scala	Patient's condition Sprawność chorego	Equivalent of Karnofsky scale Odpowiednik wg skali Karnofsky'ego
0	Able to carry on normal activity and to work; no special care needed Normalna aktywność, nie wymaga opieki	100
1	Work activity and efficiency moderately decreased, does not stay in bed during the day, symptoms of disease can be treated in outpatient clinic Umiarkowanie zmniejszona aktywność i wydolność do pracy, podczas dnia nie leży w łóżku, objawy choroby można leczyć ambulatoryjnie	90
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities; varying amount of assistance needed; up and about more than 50% of waking hours Nie jest zdolny do pracy, częściowo zaspokajają potrzeby osobiste, wzrasta potrzeba opieki, a pomoc jest konieczna, przebywa w łóżku mniej niż połowę dnia	70
3	Capable of only limited selfcare, requires equivalent of institutional or hospital care; disease may be progressing rapidly confined to bed more than 50% of waking hours Nie może zaspokoić osobistych potrzeb, wymaga stałej opieki lub hospitalizacji, szybko narastają dolegliwości, przebywa w łóżku dłużej niż połowę dnia	50
4	Completely disabled. Cannot carry on any selfcare. Totally confined to bed Całkowicie uzależniony (obłożnie chory), stale przebywa w łóżku	30

Results

Vital parameters in the index group (after implantation of bone marrow product) and the control group were almost equal.

Objective parameters

We acquired healing (with diminished area of ulceration) of necrotic lesions in the index group in 8 cases (and in 5 of them, complete healing) in comparison to 3 cases in the control group (Figures 1–5, Table II).

Ankle brachial index values were the same from day 0 to 6th month in both groups.



Figure 1. Case 1 — before stem cell implantation

Rycina 1. Pacjent 1 — przed implantacją komórek szpiku

dostatecznie ukrwionej, zwykle 4–12 wkłuc: 2–4 w udo, a 2–7 w podudzie (n = 14);

— dotętniczo podczas kolejnej angiografii (do 24 godz. od pobrania szpiku, średnio 8 godz.) w końcowym odcinku drożnym osiowego naczynia tętniczego kończyny niedokrwionej (30–50 ml) (n = 4).

Zawsze wykonywano posiewy z preparatu szpiku (każdorzowo jałowe).

Codziennie do momentu wypisania ze szpitala kontrolowano parametry ogólne (RR, tętno, częstość oddechów, temperatura).

Dodatkowo w obserwacji uwzględniano:

— wartość współczynnika kostka/ramię (ABI) (przed leczeniem, po 1., 3. i 6. miesiącu stosowania terapii);

— makroskopowy obraz ewentualnych owrzodzeń (fotografie);

— odczucia pacjentów oceniane za pomocą skali wizualno-analogowej (VAS), skali jakości życia według klasyfikacji WHO (tab. I) (przed leczeniem, w 1., 3. i 6. miesiącu stosowania leczenia). Dane te zbierano w formie pisemnej jako ankietę wypełnianą samodzielnie przez chorego.

Punktami końcowymi obserwacji były amputacje i śmierć pacjenta. W przypadku amputacji pobierano preparat do badania histologicznego.

Wyniki

Parametry życiowe notowane podczas hospitalizacji nie odbiegały od siebie w obu grupach (terapia za pomocą przeszczepu komórek szpiku i klasyczne leczenie).



Figure 2. Case 1 — 6 weeks after stem cell implantation
Rycina 2. Pacjent 1 — 6 tygodni po implantacji komórek szpiku



Figure 4. Case 2 — before stem cell implantation
Rycina 4. Pacjent 2 — przed implantacją komórek szpiku



Figure 3. Case 1 — 12 weeks after stem cell implantation
Rycina 3. Pacjent 1 — 12 tygodni po implantacji komórek szpiku



Figure 5. Case 2—12 weeks after stem cell implantation
Rycina 5. Pacjent 2 — 12 tygodni po implantacji komórek szpiku

Subjective parameters

Twelve patients in the index group declared an improvement (including 2 patients after amputations). Seven patients in the control group reported better condition (Table III)

In the index group, the feeling of pain (measured in VAS as 4–6) diminished after 3 months in 12 cases (VAS 0–4, and lower analgetic drug consumption). In the control group, the feeling of pain was reduced from VAS 4–6 to 0–5. No changes in these groups were observed (Table IV)

Quality of life and selfcare in WHO scale (Table I) on baseline was 2.15 in the index group and 2.25 in the control group. After 3 months it was appropriately 1.35 and 1.6 (Table V).

Endpoints

We observed no deaths. Three amputations were performed in the index group, two below the knee and

Parametry obiektywne

Uzyskano zmniejszenie owrzodzenia u 8 pacjentów w stosunku do 3 osób leczonych klasycznie, natomiast wygojenie owrzodzenia uzyskano u 5 chorych (ryc. 1–5, tab. II).

Wartość współczynnika kostka/ramię po 3 i 6 miesiącach terapii nie uległa zmianie istotnej statystycznie.

Parametry subiektywne

U 12 (na 14) badanych osiągnięto poprawę subiektywną, w tym u 2 pacjentów, u których dokonano amputacji! W grupie kontrolnej poprawę zaobserwowano tylko u 7 spośród 15 osób (tab. III).

Odczucie bólu zmniejszyło się u 12 badanych: początkowy wynik według skali VAS wynosił 4–6, a po 3 miesiącach spadał do 0–4, przy mniejszej podaży leków przeciwbólowych. W grupie kontrolnej wynik wyjściowy według skali VAS wynosił 4–6, a po 3 miesiącach terapii 0–5 (tab. IV).

Table II. Amputations, necrosis and healing in 1st, 3rd, 6th months**Tabela II.** Martwica, amputacje i wygojenie w grupie badanej i kontrolnej w 1., 3. i 6. miesiącu terapii

No. Lp.	Treatment period (months) Okres leczenia (miesiące)							
	Control group Grupa kontrolna				Studied group Grupa badana			
	0	1	3	6	0	1	3	6
1		A				P	P	P
2		P	P	P		A		
3						P	P	
4			A			P	P	P/W
5								
6		A					A	
7		A				P	P/W	P/W
8		P	P	P		A		
9								
10		A				P	P	P/W
11						P	P	P
12			A					
13		P	P/W	P/W		P	P/W	P/W
14		A				P	P/W	P/W
15								
Total Razem		7 A/3 P/1 W				3 A/8 P/5 W		

P — healing trophic changes (poprawa miejscowa); A — amputation (amputacja); W — healer trophic changes (wygojenie zmian troficznych)

Tabela III. Poprawa subiektywna w grupie badanej i kontrolnej w 1., 3. i 6. miesiącu terapii**Table III.** Subjective improvement reported in 1st, 3rd, 6th months

No. Lp.	Treatment period (months) Okres leczenia (miesiące)							
	Control group Grupa kontrolna				Studied group Grupa badana			
	0	1	3	6	0	1	3	6
1						1	1	1
2		1	1	1			1	
3		1	1	1		1	1	1
4						1	1	1
5		1	1	1		1	1	1
6								
7						1	1	1
8		1	1	1		1	1	1
9		1	1	1				
10						1	1	1
11		1	1	1		1	1	1
12						1	1	1
13		1		1		1	1	1
14						1	1	1
15		1	1					
Mean Średnia		8	7	7		12	12	11

Table IV. Pain measured in VAS at baseline, 1st, 3rd, 6th months**Tabela IV.** Odczucie bólu według skali VAS w grupie badanej i kontrolnej wyjściowo oraz w 1., 3. i 6. miesiącu terapii

No. Lp.	Treatment period (months) Okres leczenia (miesiące)							
	Control group Grupa kontrolna				Studied group Grupa badana			
	0	1	3	6	0	1	3	6
1	4	5	–	–	4	3	0	0
2	5	3	2	2	5	–	–	–
3	5	2	2	5	6	5	4	2
4	6	4	6	–	6	3	1	0
5	6	3	2	2	4	3	3	2
6	6	6	–	–	4	6	–	–
7	4	6	–	–	5	3	1	1
8	6	3	1	0	5	6	–	–
9	5	3	2	2	5	3	3	3
10	5	6	–	–	6	3	3	0
11	4	2	2	2	4	2	2	1
12	6	6	6	–	4	3	4	4
13	4	3	1	0	5	2	2	1
14	4	6	–	–	4	2	1	0
15	6	2	3	4				

Table V. Quality of life and Selfcare at baseline, 1st, 3rd, 6th months**Tabela V.** Jakość życia (WHO) w grupie badanej i kontrolnej wyjściowo oraz w 1., 3. i 6. miesiącu terapii

No. Lp.	Treatment period (months) Okres leczenia (miesiące)							
	Control group Grupa kontrolna				Studied group Grupa badana			
	0	1	3	6	0	1	3	6
1	3	4	–	–	1	1	0	1
2	3	3	4	4	3	4	–	–
3	2	1	0	0	2	1	1	1
4	3	2	1	1	3	2	2	2
5	4	2	1	1	2	2	3	3
6	2	4	–	–	4	5	–	–
7	1	4	–	–	1	1	1	2
8	2	2	4	4	2	3	–	–
9	2	2	1	2	3	3	4	4
10	1	4	–	–	1	1	0	1
11	3	2	2	2	3	1	2	2
12	3	1	2	–	2	1	1	1
13	2	1	0	1	1	1	0	0
14	3	4	–	–	2	1	1	1
15	2	1	1	1				
Mean Średnia	2.25	2.47	1.6	1.8	2.15	1.93	1.35	1.63

one femoral. In addition, 7 necrotectomies were carried out.

In the control group we performed two below the knee and five femoral amputations.

Histological examination of amputated limbs showed signs of angiogenesis in the index group (but mostly veins).

Discussion

Implantation of bone marrow derived cells was a safe procedure. No serious complications of general anaesthesia, bone marrow aspiration, product implantation or artery catheterisation were observed. We had no septic complications.

Results of delivering mononuclear cell fraction of autogenic bone marrow in our material did not allow us to take an enthusiastic attitude. Whenever patients declared a better quality of life, possibility to selfcare or diminished pain, there were no valid statistical differences. What is significant, is that objective parameters such as arteriograms, ABI or oxymetry (performed only three times) did not change from baseline until the 3rd month in both the index and control groups. Interesting exceptions are the lower rate of amputations and higher rate of healing ulcerations in the index group. Objective judgment is impossible because there were too few cases. Our observations generally cover literature data [7, 14].

Our method seems to rather imprecise. The quality of collected bone marrow was not well estimated. We knew the morphology of the product and the number of mononuclear +Cd34 cells, but we did not have data concerning the amount of ACC133 cells [6]. We hope that in future better instruments of assessment will be available [6, 12]. The amount of implanted progenitor cells is too low for direct revascularisation; they act as an initiating impulse [3, 5].

Ischaemia acts as strong and independent stimulant evoking liberation of progenitor cells from bone marrow to target regions [3, 12]. The reserve of stem cells in bone marrow is difficult to estimate, so we didn't know the amount of progenitor cells collected during bone marrow aspiration. On the other hand, how do we know the nature and real effect of bringing additional progenitor cells into ischemic tissue [3, 9].

Implantation of bone marrow derived cells should bring benefits after a few weeks, according to Japanese authors [14, 15]. In our material, positive changes lasted until the 3rd month, but no longer.

Our experiment seems to be just the first episode of investigations in resolving problems of critical ischaemia on a more fundamental level [12, 15, 16]. Without doubt there are prospects for the improvement of thera-

Jakość życia i zdolność do samoobsługi oceniana według skali WHO wynosiła w obu grupach średnio wyjściowo 2,15 i 2,25 odpowiednio, a po 3-miesięcznym leczeniu — 1,35 i 1,6 (tab. V).

Punkty końcowe

Nie odnotowano zgonów, natomiast przeprowadzono (w grupie leczonej preparatem uzyskanym ze szpiku) 3 amputacje. W 2 przypadkach były to amputacje poniżej kolana, a w jednym — amputacja udowa. Ponadto u 7 osób wykonano ograniczone nekrektomie. W grupie leczonej klasycznie przeprowadzono amputacje u 7 badanych (na 15): udowe (5) i poniżej kolana (2).

W przypadku amputacji pobierano preparat do badania histologicznego i obserwowano znaczące cechy zmiany układu naczyniowego, dotyczące jednak układu żylnego w postaci zwiększenia liczby małych naczyń. Nie ma więc jednoznacznych dowodów histologicznych na stymulację rozplemu układu naczyniowego.

W 3. miesiącu wykonywano kontrolną angiografię (5), która w żadnym przypadku nie różniła się w sposób istotny od wyjściowej.

Dyskusja

Zastosowane postępowanie cechowało pełne bezpieczeństwo. Nie odnotowano poważnych powikłań dotyczących znieczulenia ogólnego ani pobrania szpiku, jak również podania zawiesiny komórek szpiku, czy też angiografii. Materiał zawsze był jałowy i nie wykryto powikłań septycznych.

Rezultaty leczenia z zastosowaniem frakcji komórkowej własnego szpiku kostnego w pobranym materiale nie pozwalają na szczególnie optymistyczną ocenę tej metody. Chociaż zaobserwowano poprawę subiektywną, zmniejszenie odczucia bólu i zwiększoną sprawność chorych, to jednak w porównaniu z grupą kontrolną nie są to różnice istotne statystycznie. Ponadto w większości zastosowanych do oceny badań obiektywnych (kontrolna angiografia, pomiar współczynnika kostka/ramię i sporadycznie stosowana oksymetria) w ogóle nie wykazywano różnic. Znaczącym wyjątkiem było jednak gojenie się owrzodzeń i ran po wykonywanych nefrektomiach, a także mniejszy odsetek amputacji. Ze względu na małą ilość materiału nie można dokonać w pełni obiektywnej oceny. Przeprowadzone obserwacje są jednak zgodne z danymi w piśmiennictwie [7, 14].

Zastosowana metoda jest stosunkowo mało precyzyjna. Nie można ocenić jakości zastosowanego szpiku kostnego, zawartości prawdziwych komórek progenitorowych (EPC) — ACC133, można tylko określić liczbę

peutic effects. The first promising possibility is the combination of stem cell implantation and gene technique using vessel endothelial growth factor (VEGF). This associated method is tested in our department nowadays. Various ways of acquiring and introducing VEGF coding RNA into cells and the low number of patients does not allow us to declare strong opinions, but the effects encourage us to continue our investigations. We realize of course that complication of the molecular mechanism of regulations on a cellular level does not guarantee rapid development of perfect therapeutic methods, but new discoveries always encourage further exploration.

Conclusions

1. Implantation of progenitor cells derived from bone marrow by both intramuscular and intravascular means is a safe procedure.
2. It seems that the implantation of stem cells allows accelerated revascularization of lower limbs in the case of critical ischaemia, and finally helps in the healing of ischemic skin lesions (but the arguments are insufficient because the number of patients is too low).
3. Stimulation of angiogenesis by the introduction of stem cells into an ischemic leg gives rise to the prospect of future development and evolution of this method by means of combination with genetic therapy — the gene coding vessel endothelial growth factor (VEGF) and better control of bone marrow derived product (present and number of real progenitor cells — ACC I 33+).
4. It seems that implantation of bone marrow derived stem cells helps to diminish the amputation's extension in the case of critical lower limb ischaemia.

References

1. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B et al (2002) Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 109: 337–346.
2. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ et al (2002) Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 106: 1199–1204.
3. Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103: 2776–2779.
4. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S et al (2003) Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*, 108: 3115–3121.
5. Hattori K, Heissig B, Tashiro K et al (2001) Plasma elevation of stromal cell-derived factor 1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 97: 3354–3360.

bę komórek CD34, których stanowią frakcję [6]. Nadzieję budzi możliwe w przyszłości lepsze badanie preparatu uzyskanego ze szpiku z dokładną oceną liczby komórek progenitorowych [6, 12].

Ponieważ liczba komórek EPC nie wystarcza do wytworzenia nowych naczyń, w teoretycznym modelu odgrywają one głównie rolę inicjującą [3, 5].

Niedokrwienie kończyny jest samodzielnie silnym bodźcem wywołującym uwolnienie ze szpiku i migrację w okolice niedokrwioną komórek progenitorowych [3, 12]. Trudno ocenić rezerwę szpikową komórek EPC, a także znaczną ich liczbę pozyskiwaną podczas jego pobrania. Należy zastanowić się, czy rzeczywiście zwiększenie liczby komórek progenitorowych w niedokrwionej tkance spowoduje istotną zmianę, ponieważ istnieje przypuszczenie ich obecności w tym miejscu [3, 9].

Istota działania bodźcowego komórek progenitorowych według autorów japońskich powinna przynosić wymierne korzyści po kilku tygodniach [14, 15]. W omawianym materiale poprawa trwała do 3. miesiąca, a w 6. miesiącu nie obserwowano już zmian.

Implantacja komórek pozyskanych ze szpiku stanowi jednak początek nowej eksperymentalnej drogi w rozwiązywaniu problemów klinicznych na innym, bardziej podstawowym poziomie [12, 15, 16]. Niewątpliwie istnieją nadzieje na poprawę efektów terapeutycznych. Można rozważyć zastosowanie dodatkowo techniki terapii genowej z wykorzystaniem RNA kodującego VEGF. Takie badania skojarzonego leczenia prowadzi się w klinice autorów niniejszej pracy.

Różne metody uzyskania genu i jego przeniesienia do komórek oraz skąpy materiał: mała liczebność grup, nie pozwalają na rozstrzygnięcia, jednak kontynuuje się badania ze względu na obiecujące wstępne efekty.

Oczywiście złożoność procesów tworzenia naczyń *de novo*, pomimo coraz lepszego poznania mechanizmów regulacyjnych, nie wydaje się rokować błyskawicznego rozwoju nowych technik terapeutycznych, jednak nowe odkrycia zachęcają do ingerencji na poziomie komórkowym.

Wnioski

1. Implantacja pozyskanych ze szpiku komórek progenitorowych drogą wstrzyknięć domięśniowych i dotętnicznych jest procedurą bezpieczną dla chorego.
2. Wydaje się, że podanie komórek macierzystych pozwala przyspieszyć rewaskularyzację krytycznie niedokrwionej kończyny i ostatecznie zmniejszyć odsetek amputacji, uzyskać zagojenie niedokrwionych zmian skórnych (brak dostatecznych dowodów,

6. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95: 952–958.
7. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O et al (2003) Stromal cell-derived factor 1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 107: 1322–1328.
8. Schober A, Knarren S, Lietz M et al (2003) Crucial role of stromal cell-derived factor 1 in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 108: r108–r114.
9. Takahashi T, Kearney M, Magner M et al (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 4: 434–438.
10. Hill JM, Zalos G, Halcox JJP et al (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 348: 593–600.
11. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89: e1–e7.
12. Biegus J, Skóra J, Rybak Z (2005) Angiogeneza w chorobach naczyń. *Flebologia*, 13: 233–239.
13. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*, 5: 213–226.
3. Technika stymulacji angiogenezy poprzez działanie bodźcowe polegające na podaniu progenitorów w niedokrwioną okolicę rokuje nadzieje ze względu na możliwość udoskonalenia metody przynajmniej na dwa sposoby: pierwszym jest inkubacja z VEGF, a drugim — kontrola preparatu uzyskanego ze szpiku w kierunku liczby komórek o istotnym działaniu progenitorowym (ACC+133).
4. Prawdopodobnie implantacja komórek macierzystych pozwala na obniżenie poziomu amputacji w krytycznym niedokrwieniu kończyn.

14. Higashi Y, Kimura M, Hara K et al (2004) Autogenous bone marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with limb ischemia. *Circulation*, 109: 12151–218.
15. Takeishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 360: 427–435.
16. Griese DP, Ehsan A, Melo LG et al (2003) Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts. *Circulation*, 108: 2710–2715.