

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Postgraduální doktorské studium

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Autor: MUDr. Jitka Husáková

Název: Faktory ovlivňující mikrocirkulaci v ischemickém svalu u diabetiků

Title: Factors influencing microcirculation in ischemic muscle in diabetic patients

Typ závěrečné práce: Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Michal Dubský, Ph.D., FRSPH, MBA

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Projekt studie 3 byl finančně podpořen granty GAUK projekt č. 304221 Ministerstva zdravotnictví České republiky a zbývající studie byly podpořeny grantem AZV České republiky č. NV16-27262A.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 5.4.2025

MUDr. Jitka Husáková

Podpis:

Identifikační záznam:

HUSÁKOVÁ, Jitka, Faktory ovlivňující mikrocirkulaci v ischemickém svalu u diabetiků. [Factors influencing microcirculation in ischemic muscle in diabetic patients]. Praha, 2024, Počet stran 137, 11 příloh, Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika diabetologie, IKEM. Školitel Dubský Michal.

Souhrn

Ischemie dolních končetin u diabetiků představuje závažné postižení mikrocirkulace, které je spojeno se vznikem defektů až gangrény tkání nohy. Těžké cévní postižení komplikuje proces hojení a vede často k vysoké amputaci dolní končetiny. U vysoce rizikových pacientů s neřešitelným nálezem pomocí standardních postupů je možností léčby autologní buněčná terapie (ACT).

Cílem disertační práce bylo zhodnotit faktory ovlivňující efekt buněčné terapie, která je použita u diabetiků s neřešitelnou ischemií dolních končetin. Studie byly zaměřeny na posouzení buněčné suspenze použité pro ACT, na negativní vlivy na léčbu, ale také na zhodnocení samotné účinnosti této terapeutické metody.

V studii zabývající se **různými druhy izolačních metod ACT** u diabetiků s chronickou končetinovou ischemií jsme prokázali zlepšení prokrvení dolní končetiny na podkladě zvýšení transkutánní tenze kyslíku (klinický efekt na ischemii) u všech použitých metod izolace kmenových buněk. Také jsme pozorovali rozdíl v množství bílých krvinek, lymfocytů a monocytů ve finálním produktu získaném jednotlivými metodami.

Ve studii zaměřené na **faktory ovlivňující klinický efekt** u pacientů s diabetem po ACT jsme našli několik významných korelací mezi hladinami C-reaktivního proteinu, mutací metycylintetrahydrofolát reduktázy, kouřením a vzestupem transkutánní tenze kyslíku a rizikem vysoké amputace. Tyto poznatky vedly k úvahám o dalším postupu u rizikových pacientů zvažovaných k terapii ACT, predikci výsledků léčby a případné úpravě léčby před a po aplikaci buněčné suspenze.

V další výzkumné práci jsme se zabývali **vlivem imunosupresní terapie na kmenové buňky** využívané k ACT. Z výsledků vyplývá negativní efekt imunosupresiv na buněčné vlastnosti kmenových buněk, konkrétně na metabolickou aktivitu, nekrózu a apoptózu. Tyto výsledky jsou významné pro hodnocení koncentrací léčiv sirolimu, tacrolimu a mykofenolát mofetilu používaných v terapii pacientů zažovaných k ACT, kteří podstoupili například transplantaci.

V poslední studii jsme porovnávali **výsledky léčby ACT oproti standardní konzervativní terapii**. Zaměřili jsem se na posouzení efektu léčby na změny hodnot transkutánní tenze kyslíku, vnímání bolesti a hojení defektu. Tato práce popisuje významný efekt ACT již v prvních 12 týdnech po aplikaci kmenových buněk na hojení, bolest i vzestup transkutánní tenze kyslíku oproti standardní terapii.

ACT je efektivní metoda léčby pacientů s nejtěžší formou končetinové ischemie bez možnosti standardní revaskularizace, která vede ke zlepšení parametrů ischemie a jako součást komplexní terapie přispívá ke snížení výskytu vysokých amputací.

Klíčová slova: syndrom diabetické nohy, chronická končetinová ischemie, revaskularizace, buněčná terapie, kmenové buňky, mikrocirkulace.

Summary

Lower Limb Ischemia in diabetic patients represents a severe impairment of microcirculation, which is associated with the formation of ulcers and even gangrene of the foot tissue. Severe vascular involvement complicates the healing process and often leads to major amputation of the lower limb. In high-risk patients who are not eligible for standard procedures, the treatment option is autologous cell therapy (ACT).

The aim of the dissertation was to evaluate the factors influencing the effect of cell therapy used in diabetic patients with irreversible lower limb ischemia. The studies focused on assessing the cell suspension used for ACT, the negative influences on treatment, and the evaluation of the efficacy of this therapeutic method.

In a study addressing various isolation methods of ACT in diabetic patients with chronic limb ischemia, we demonstrated an improvement in the blood supply to the lower limb based on an increase in transcutaneous oxygen pressure (clinical effect on ischemia) in all isolation methods used for stem cells. We also observed differences in the quantity of white blood cells, lymphocytes, and monocytes in the final product obtained by different methods.

In a study focusing on factors influencing clinical outcomes in diabetic patients after ACT, we found several significant correlations between levels of C-reactive protein, mutations in methicillin-tetrahydrofolate reductase, smoking, the increase in transcutaneous oxygen pressure, and the risk of major amputation. These findings led to considerations about further steps in the treatment of high-risk patients considered for ACT therapy, predicting treatment outcomes, and potential adjustments to treatment before and after the application of the cell suspension.

In another research project, we investigated the impact of immunosuppressive therapy on the stem cells used for ACT. The results indicate a negative effect of immunosuppressants on the cell properties of stem cells, specifically on metabolic activity, necrosis, and apoptosis. These results are significant for evaluating the concentrations of drugs like sirolimus, tacrolimus, and mycophenolate mofetil used in the treatment of patients undergoing ACT, such as those who have had transplants.

In the final study, we compared the outcomes of ACT treatment with standard conservative therapy. We focused on assessing the treatment's effect on changes in transcutaneous oxygen pressure, pain perception, and wound healing. This work describes the significant effect of ACT in the first 12 weeks after stem cell application on healing, pain, and the increase in transcutaneous oxygen tension compared to standard therapy.

ACT is an effective treatment method for patients with the most severe form of limb ischemia who have no possibility of standard revascularization. It leads to improvements in ischemia parameters and, as part of comprehensive therapy, contributes to a reduction in the incidence of major amputations.

Keywords: diabetic foot syndrome, chronic limb ischemia, revascularization, cell therapy, stem cells, microcirculation.

Obsah

1	ÚVOD	6
1.1	TYPY DIABETU	6
1.2	KOMPLIKACE DIABETU	6
1.2.1	Syndrom diabetické nohy	6
1.2.2	Diabetická neuropatie.....	7
1.2.3	Patofyziologie vaskulárního postižení	7
	Mikrocirkulace.....	8
	Vyšetření kolaterálního řečiště	8
1.2.3.1	Ateroskleróza	9
1.2.3.2	Ischemická choroba dolních končetin.....	9
1.2.3.3	Chronická končetinu ohoržující ischemie.....	10
	Hodnocení ischemie dolních končetin	10
	Klasifikační systémy	10
	Další vyšetření	11
	Léčba ischemie dolních končetin.....	11
	Revaskularizační metody.....	11
	Angiosomem řízené endovaskulární arteriální rekonstrukce	11
	Genová terapie v léčbě oschemické choroby dolních končetin.....	12
	Autologní buněčná terapie.....	12
	Angiogeneze.....	12
	Arteriogeneze	13
	Zdroje kmenových buněk pro terapii ischemie dolních končetin	14
	Účinky a limitace terapie kmenovými buňkami ve studiích.....	14
	Výsledky randomizovaných studií.....	16
1.2.3.4	Hojení a infekce defektů dolních končetin diabetiků s ischemií	17
1.2.3.5	Amputace	18
2	HYPOTÉZY DISERTAČNÍ PRÁCE.....	19
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	19
4	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	20
5	VYBRANÉ METODY JEDNOTLIVÝCH STUDIÍ	21
5.1	IZOLACE KMENOVÝCH BUNĚK	21
5.1.1	Izolace kmenových buněk z periferní krve (studie 1).....	21
5.1.2	Izolace kmenových buněk z kostní dřeně pomocí gelofusinu (studie 1)	21
5.1.3	Izolace kmenových buněk z kostní dřeně metodou Harvest (studie 1-4)	21
5.2	APLIKACE BUNĚČNÉ SUSPENZE (STUDIE 1-4).....	21
5.3	HODNOCENÍ MIKROCIRKULACE POMOCÍ ZMĚN TRANSKUTÁNNÍ TENZE KYSLÍKU (STUDIE 1,2,4)	22
5.4	KULTIVACE KMENOVÝCH BUNĚK (STUDIE 3).....	23
5.4.1	Fenotypová charakterizace kmenových buněk průtokovou cytometrií	23
5.4.2	Měření metabolické aktivity kmenových buněk vystavených imunosupresivům	24
5.4.3	Stanovení vlivu imunosupresiv na genovou expresi.....	25
5.4.4	Hodnocení vlivu imunosupresiv na produkci cytokinů a růstových faktorů	25
5.4.5	Hodnocení vlivu imunosupresiv na buněčnou smrt	25
6	PŘEHLED STUDIÍ	26
6.1	STUDIE 1: POSOUZENÍ TŘÍ METOD VYUŽÍVAJÍCÍCH BUNĚČNOU TERAPII K LÉČBĚ CHRONICKÉ KONČETINU OHROŽUJÍCÍ ISCHEMIE U DIABETIKŮ	26
6.2	STUDIE 2: FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝSKYT VYSOKÝCH AMPUTACÍ U PACIENTŮ S S DIABETICKÝMI CHRONICKÝMI DEFEKTY PO AUTOLOGNÍ BUNĚČNÉ TERAPII.....	30
6.3	STUDIE 3: VLIV IMUNOSUPRESNÍCH LÁTEK NA FUNKČNÍ VLASTNOSTI KMENOVÝCH BUNĚK .	37
6.4	STUDIE 4: POSOUZENÍ VLIVU AUTOLOGNÍ BUNĚČNÉ TERAPIE A STANDARDNÍ LÉČBY NA OXYGENACI TKÁNÍ A SYNDROM DIABETICKÉ NOHY	43
7	ZÁVĚR A SHRUTÍ DISERTAČNÍ PRÁCE	50

KONFLIKT ZÁJMŮ	52
8 PODĚKOVÁNÍ	52
9 PŘEHLED PUBLIKACÍ	53
10 REFERENCE	65
11 PŘÍLOHY	71

1 Úvod

Diabetes mellitus (DM) představuje metabolické onemocnění charakterizované hyperglykemií vzniklou na podkladě snížené sekrece inzulínu, jeho účinku nebo obou těchto poruch. Na podkladě dlouhodobě trvající hyperglykémie dochází k poškození, dysfunkci a selhání různých orgánů. Velké množství komplikací diabetu je spojeno s endoteliální dysfunkcí a akcelerovanou aterosklerózou malých a velkých tepen [1].

Pacienti s DM jsou ohroženi dvojnásobně ischemií dolních končetin (ICHDK) ve srovnání se zdravou populací. ICHDK představuje závažnou komplikaci zvyšující riziko vzniku defektu dolní končetiny a vysoké amputace [2].

1.1 Typy diabetu

V současné době rozlišujeme několik typů DM, přičemž nejčastěji vyskytujícím se je DM 2. typu (T2DM), a to u více než 90 % pacientů. Genetickou variantou je pak monogenní forma která má v současné době již 14 různých mutací. Dalším významným typem je DM 1. typu (T1DM), který je spojen a autoimunitním procesem se specifickými autoprotilátkami dekarboxylázy kyseliny glutamové poškozujícím beta-buňky pankreatu. Jako jeho varianta je popisován latentní autoimunitní diabetes u dospělých (LADA), pomalu progredující diabetes závislý na inzulínu, pomalý autoimunitní diabetes a také Flatbushův diabetes, který je bez pozitivních protilátek [3]. T1DM je obvykle diagnostikován do 7 let věku, T2DM je zjišťován u osob mezi 30-70. rokem života, ostatní inzulín-dependentní typy diabetu jsou potvrzeny u osob starších 13 let a pro typ LADA je typický věk nad 30 [4] [5].

1.2 Komplikace diabetu

Chronické diabetické komplikace vznikají na podkladě dlouhodobé neuspokojivé kontroly hladin glukózy. Obtíže jsou děleny na mikrovaskulární, mezi které řadíme diabetickou retinopatii, neuropatii, encefalopatii, nefropatii, a na makrovaskulární komplikace, mezi něž spadají kardiovaskulární postižení, infarkt myokardu a iktus [6]. Kombinací mikro- a makrovaskulárních postižení dochází k rozvoji komplexního postižení - syndromu diabetické nohy (SDN) [7-12].

1.2.1 Syndrom diabetické nohy

SDN představuje soubor postižení dolní končetiny distálně od kotníku včetně kotníku vznikající u pacientů s DM s dlouhodobě neuspokojivou kontrolou glykémie, neuropatie, vaskulopatie, nedostatečnou péčí o dolní končetiny a s deformitami dolní končetiny a infekcí. Jedná se o chronické postižení, které ohrožuje 5-25% lidí s DM a u 1% z nich vede k amputaci [13].

Infekce dolní končetiny může mít podobu povrchové celulitidy, chronické osteomyelitidy či gangrény a vyžaduje intenzivní terapeutické postupy. Léčba je aplikována dle specifické mikrobiální flóry od empiricky podávané antibiotické terapie při přítomnosti gram-pozitivních koků, přes agresivní antimikrobiální terapii u rezistentních kmenů až po nutnost využití chirurgických, radiologických a revaskularizačních výkonů. Volba terapie závisí na tíži postižení a

následně je nutné využít dalších možností odlehčení a ošetření, jako prevence dalšího poškození s nutností vysoké amputace. Přítomnost infekce u SDN je příčinou až 60 % amputací u diabetiků [13, 14].

1.2.2 Diabetická neuropatie

Významným rizikový faktorem pro vznik SDN představuje diabetická polyneuropatie (DPN). Distální symetrická polyneuropatie postihuje až 50 % lidí s T2DM po 10 letech a 20% T1DM po 20 letech diagnózy. Je známo, že 6-34% diabetiků trpí bolestivou formou periferní DPN, která jim významně snižuje kvalitu života [15]. Naopak velmi významný faktor pro vznik SDN představuje neuropatii vzniklá ztráta citlivosti na bolest a ztráta ochranné bolesti [16-18]. Ztráta citlivosti dolní končetiny je spojena s abnormalitami ve vnímání teploty, vibrací, citlivosti na dotyk a tlak. Z tohoto důvodu může být DPN zjištěna až při objevení SDN. V kombinaci s dalšími rizikovými faktory spojenými s diabetem vede DPN ke vzniku SDN a amputacím [19, 20]. U diabetiků se nejčastěji setkáváme se symetrickou polyneuropatií, méně často je popisována mononeuropatie, neuropatie indukovaná léčbou a polyradikuloneuropatie. Diabetická neuropatie vzniká na podkladě metabolické dysregulace, působením oxidativního stresu a zánetlivého procesu, které vedou k dysfunkci nervů a buněčné smrti [20].

1.2.3 Patofyziologie vaskulárního postižení

Velmi významnou komplikací diabetu, a obzvláště SDN, představuje mikro- a makrovaskulární postižení. Endoteliální dysfunkce vzniká na podkladě několika faktorů, mezi které patří hypertenze, při níž dochází k poškození zvýšeným smykovým třením při vzestupu průtoku krve. V případě DM je dále endotel poškozován hyperglykemií, vysokou glykemickou variabilitou a sníženou koncentrací endogenního inzulínu, oxidativním stresem, chronickým zánetlivým procesem, nedostatkem oxidu dusnatého, zvýšením vazomotorické dysfunkce. Patofyziologie postižení endotelu je založena na nadprodukci superoxidu mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem a následně dochází k inhibici glykolytického enzymu glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy zvýšenou aktivitou jaderné poly(ADP-ribóza)polymerázy [21]. Dále je vaskulární postižení způsobeno také upregulací proaterogenních genů [22]. Například ve studii Okeke a spol. popisují u myšího modelu kvantitativní změny lokusu 1, znaku souvisejícího se záchranou končetiny na chromozomu 7 jako první genetický modifikátor fenotypů obnovy perfuze a nekrózy tkáně. Kromě toho byla identifikována řada genů v Limb Salvage-associated Quantitative trait locus 1 (LSq-1) jako genetické modifikátory závažnosti onemocnění periferních tepen. Dále byly popsány geny ADAM12, IL-21R α a BAG3, které působí prostřednictvím zachování endoteliálních buněk a buněk kosterního svalstva během ischemie [23].

Jako negativní faktor vzniku vaskulopatie nesmí být opomenuta ani dyslipidémie, abnormální hladiny cirkulujících adipokinů a volných mastných kyselin [21].

Mikrocirkulace

Malé cévy o průměru menším než 20 μm tvoří terminální systémové cévní zásobení kardiovaskulárního systému. Mezi tyto cévy patří arterioly, postkapilární venuly, kapiláry a jejich subbuněčné složky. Mikrocirkulace je nejdůležitějším kompartmentem kardiovaskulárního systému, kdy tyto malé cévy svým kontaktem s parenchymovými buňkami zajišťují správnou funkci orgánů [24]. Nejmenší cévy jsou odpovědné za transport kyslíku k pokrytí energetické potřeby tkání, regulují výměnu rozpuštěných látek mezi intravaskulárním a tkáňovým prostorem a také transportují hormony a živiny k zajištění funkční aktivity tkání, imunitního systému a homeostázy. Dle současných zjištění dochází ke ztrátě hemodynamické koherence, která souvisí se 4 hlavními typy mikrocirkulačních změn (heterogenita, hemodiluce, konstriktce/tamponáda a edém), které jsou pak spojeny se ztrátou kapacity pro extrakci kyslíku ve tkáních. Heterogenita se projevuje změnou hustoty kapilár a průtoku krve a také zkraty v mikrovaskulárním průtoku. K těmto změnám dochází například při sepsi. Hemodiluce je spojena s nedostatečným transportem kyslíku v důsledku anémie. Třetím typem změny je stagnace průtoku krve v mikrocirkulaci při působení vazopresorů či tamponády při zvýšeném venózním tlaku. Jako poslední typ změny průtoku je popisován edém. Pozitivní efekt na krevní průtok mají vazodilatační látky jako dobutamin, nitroglycerin či enoximon, které mají na mikrocirkulaci dilatační a posilující účinek. Poslední změna je typicky pozorována ve stavech edému, kdy je funkční denzita kolaterál nízká [25].

Lumen mikrokapilár je kryto endoteliálními buňkami a glykokalyxem. K narušení struktury stěny mikrokapilár dochází například při ischemii, reperfuzi, zánětu a hypoxii. Během poškození stěny dochází k aktivaci leukocytů, jejich rolování, adhezi, extravasaci do tkání, což akceleruje zánětlivý proces. Během poškození glykokalyxu dochází k vzestupu permeability stěny, uvolnění prozánětlivých cytokinů, prosakování, poškození červených krvinek, přestupu tekutiny, buněk, fibrinu do tkání a tvorbě edému [26].

Vyšetření kolaterálního řečiště

Běžně využívanou metodou ke screeningu ICHDK je dopplerovské vyšetření, které je ale nedostačující ke skutečnému posouzení stavu prokrvení tkání. Zaměřuje se totiž pouze na hodnocení toku a nehodnotí možnosti difúze kyslíku z erytrocytů. Infračervená spektroskopie měří přibližnou saturaci hemoglobinu kyslíkem namísto skutečné dostupnosti kyslíku. Vhodná jsou měření hodnotící kombinaci schopnosti přenosu erytrocyty, jejich dostupnost, difúzní kapacitu, hustotu kapilár a množství hematokritu [27, 28].

V současné době je možné využít software pro automatickou analýzu MicroTools, který umožňuje okamžitou kalkulaci všech požadovaných parametrů [29].

Na mikrovaskulární úrovni je vhodné neinvazivní měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO_2) či dopředná infračervená termografie. Metoda TcPO_2 je použita k predikci potenciálu hojení ran a identifikaci životaschopné tkáně u pacientů s chronickou ischemií končetin a případné stanovení úrovně chirurgické amputace. Pro chronickou končetinu ohrožující ischemií (Chronic Limb-Threatening Ischemia - CLTI) svědčí pokles hodnoty pod 30 mm Hg [9]. Termografie získala oblibu pro schopnost odhalit časně různá infekční onemocnění [30].

1.2.3.1 Ateroskleróza

Aterosklerotické postižení tepen dolních končetin se podílí na vzniku obstrukce arteriálního lumen. Ruptura aterosklerotického plátu nacházejícího se ve stěně tepen vede k částečnému či úplnému uzávěru tepen a tím lokální trombóze. Časnými symptomy aterosklerotického postižení jsou klaudikace, bolest, nehojící se SDN, gangréna a ztráta tkání. Avšak projevy klaudikací jsou u diabetiků vyjádřeny méně než u zdravé populace vlivem současně přítomné DPN, což v důsledku vede k tomu, že pacienti s DM přicházejí k lékaři později a s pokročilejšími trofickými změnami [23, 31].

K rozvoji aterosklerózy mohou přispívat také genetické polymorfismy, jako je tomu u Apo-lipoprotein E, interleukinu-6 a trombinu. Stejně tak mohou genetické polymorfismy ovlivnit závažnost postižení po aterosklerotické okluzi cévy, jako je rozsah obnovení průtoku krve, nekróza nebo ztráta tkáně. Další vývoj také negativně ovlivňuje přítomnost infekce.

Prozatím není zcela zjištěna genetická podstata aterosklerotického postižení, avšak ze studií vyplývá, že slibnými jsou polymorfismy v enzymu regulujícím homocysteinovou dráhu MTHFR26-29, zánětlivý cytokin IL-6 a molekula vaskulární adheze ICAM30 [32].

1.2.3.2 Ischemická choroba dolních končetin

ICHDK a její nejtěžší forma CLTI jsou spojeny s vysokou amputací dolních končetin u 10-40% postižených v období 6 měsíců od rozvoje postižení [33-35]. CLTI představuje nejzávažnější formu ICHDK, která má vysokou morbiditu, mortalitu a počet vysokých amputací, které vedou k významnému snížení kvality života a finanční nákladnosti léčby. ICHDK je charakteristická uzávěrem arterií vzniklým na podkladě aterosklerózy. Je spojena s chronickou klidovou bolestí, SDN a gangrénou [36, 37].

Mezi významné faktory rozvoje ICHDK představují DM a kouření cigaret, které zvyšuje riziko 2-4násobně. Kouření, diabetes a dyslipidémie jsou dále spojovány s progresí ICHDK a zhoršující se arteriální perfuzí dolních končetin. Prevalenci rozvoje ICHDK dále ovlivňuje věk, pohlaví, rasa a socioekonomické faktory [38].

K bližšímu pochopení změn v ischemické tkáni pomáhají ve studiích ischemické zvířecí modely. Systematické review Lovásová a spol. popisuje nejčastěji využívané modely a výsledky jiných studií. Nejčastěji používanými pokusnými zvířaty byly myši, králíci, krysy, prasata a ovce. Častou použitou metodou vzniku ischemické končetiny byla jednoduchá nebo dvojitá arteriální ligace a excize celé stehenní tepny. Dalšími možnými metodami jsou jednoduchá či dvojitá arteriální elektrokoagulace, použití ameroidních konstriktorů, fotochemicky indukovanou trombóza a různé typy endovaskulárních metod. Jednoduchá ligace a excize arteria femoralis je nejběžnější metodou vytvoření ischemické končetiny. Tento výkon však může vyústit v akutní než chronickou ischemii. Dvoustupňový sekvenční přístup a metody využívající ameroidní konstriktory nebo endovaskulárně zaslepené stentgrafty jsou vhodnější pro vytvoření postupné arteriální okluze typicky pozorované u lidí [16].

Pro pacienty s DM je typické ischemické postižení v oblasti pod kolenem a na noze [38]. CLTI je u kuřáků a lidí s hypercholesterolemií specificky lokalizovaná více v oblasti nad kolenem a v třísele, kdežto u hypertenze je ohrožena celá dolní končetina. Vyšší riziko ischemie pak pozorujeme u mužů [39].

1.2.3.3 Chronická končetinu ohoržující ischemie

CLTI je nově používaný termín pro konečné stadium periferního postižení tepen, dříve označovaná jako kritická končetinová ischemie [40]. CLTI je definována přítomností onemocnění periferních tepen, klidovou bolestí, gangrénou či ulcerací dolních končetin trávající déle než dva týdny. Z této klinické jednotky jsou vyloučeny ischemie venózní, traumatické, embolické a neaterosklerotické [9, 39]. Jako doplňová terapie CLTI je užívána protidestičková léčba, statiny a to především po revaskularizačním zásahu. Mezi doporučená léčiva se řadí clopidogrel, rivaroxaban či antagonisté vitamínu K [41]. Přesto je jediným řešením tohoto onemocnění provedení revaskularizace, tedy znovuzprůchodnění uzavřených tepen. Na základě nejnovějších doporučení je vhodné volit revaskularizační postupy na základě konceptu PLAN (Patient risk estimation, Limb staging, ANatomic pattern of the disease). V případě, že u CLTI nedojde k časné revaskularizaci, je až 20 % nemocných ohroženo vysokou amputací končetiny do 1 roku a jednoletá mortalita je až 22% [42]. U mnohých pacientů je však nález CLTI natolik závažný, že není již možné provést standardní revaskularizační výkony, což zvyšuje riziko vysoké amputace a mortality. Tyto nemocné označujeme no-option-CLTI (NO-CLTI) [40].

Hodnocení ischemie dolních končetin

K hodnocení přítomnosti CLTI dolních končetin u pacientů napomáhá řada vyšetření od měření indexu kotníkových - ankle-brachial index (ABI) a prstových tlaků - toe-brachial index (TBI), ultrasonografické vyšetření a vyšetření magnetickou rezonancí (MRI) či počítačovou tomografií (CT). Dále je běžně využívanou metodou duplexní ultrasonografie. Ve specializovaných centrech je používána již zmíněná metoda měření TcPO₂ [30]. K celkovému vyhodnocení nálezu na dolních končetinách v současné době napomáhají klasifikační systémy.

Klasifikační systémy

Využívané klinické klasifikační systémy pro diabetickou nohu jsou Wagnerova klasifikace (The Wagner–Meggitt classification), klasifikace TEXAS, SINBAD a Wifl.

Dnes je již méně využívaný klasifikační systém PEDIS pro posouzení perfuze, rozsah a hloubku defektu při SDN, přítomnost infekce a přítomnost DPN. Nyní je nahrazován klasifikací vytvořenou Americkou společností pro infekční choroby a Mezinárodní skupinou pro diabetickou nohu - IDSA/IWGDF a to především ke zhodnocení lokální infekce i celkových známek zánětu [43].

Klasifikační systém SINBAD se zaměřuje na hodnocení lokalizace defektu na noze, přítomnost ischemie, bakteriální infekce, velikost a hloubka defektu.

Wagnerova klasifikace hodnotí hloubku defektu a přítomnost gangrény. Wifl klasifikační systém ve 3 číslech zvlášť hodnotí hloubku rány, přítomnost ischemie a infekce [44, 45].

Global Anatomic Staging System (GLASS) je klasifikační systém sloužící k odhadu šance na úspěch a možnosti provedení revaskularizace arterií na základě rozsahu a rozložení aterosklerotických lézí [39, 45].

Další vyšetření

K hodnocení přítomnosti ischemie dolní končetiny je využívána řada metod a vyšetření. U pacientů popisujících klidové bolesti nohou, které zlepšuje jejich svěšení trvající déle než 2 týdny by měla být vyšetřena přítomnost pulzací hlavních tepen nohy, ABI a TBI. Hodnoty těchto vyšetření mohou být ovlivněny řadou faktorů, jako je například přítomnost mediokalcinózy, renální insuficience, výkyvy krevního tlaku či kardiální nedostatečnosti. Dále je vhodné nálezy korelovat se sonografickým vyšetřením a nálezem dopplerovských arteriálních křivek [39].

Léčba ischemie dolních končetin

K léčbě ischemie dolní končetiny jsou využívány standardní revaskularizační metody jako je bypass či perkutánní angioplastika. Přesto méně než 45 % nálezů s ICHDK je způsobilých k chirurgickému zákroku. Pro pacienty bez možnosti revaskularizace, se nabízí nové možnosti léčby, jako je genová a autologní buněčná terapie (Autologous Cell Therapy - ACT) [34, 46].

Revaskularizační metody

Perkutánní transluminální angioplastika (PTA) představuje nejčastější standardní revaskularizační metodu využívanou v terapii ICHDK. Efekt PTA je ovlivněn množstvím patentních arterií během revaskularizace, ale také pozdější restenózou tepen, trombózou či proliferací intimy. Tyto změny jsou především rizikové u pacientů s diabetem, u nichž se častěji setkáváme s abnormalitami v koagulační kaskádě [42, 47, 48]. Na základě studie BASIL-2 je doporučováno provedení PTA u osob, které jsou indikovány k provedení infrapopliteální revaskularizace. Tento léčebný postup měl delší dobu přežití bez amputace ve srovnání s žilním bypassesem [49].

Ve srovnání studií BASIL-2 popsali ve studii BEST-CLI týmu Farber a spol. nižší výskyt závažných nežádoucích příhod a úmrtí ve skupině s provedeným bypassesem oproti endovaskulárnímu výkonu. Nutno ovšem zdůraznit, že se jednalo o kohortu pacientů s dobrou vlastní autologní žilou [49-51].

Je tedy nutné k jednotlivým nálezům přistupovat individuálně a volit terapii s ohledem na celkový stav pacienta, nález na dolní končetině a stav cévního a kolaterálního řečiště [52]. Léčba CLTI je také spojena s dlouhodobým podáváním antitrombotických, hypolipidemických, antihypertenzních a antidiabetických léčiv. Dále by měla být léčba doplněna o doporučení odvykání kouření, úpravu životního stylu, dietu, cvičení a preventivní péči o nohy [39].

Angiosomem řízené endovaskulární arteriální rekonstrukce

Cévní zásobení dolní končetiny je zajištěno bérčovými tepnami, které prokrvují tři kompartmenty (angiosomy). Revaskularizaci je možné provádět nepřímou cestou, kdy je zprůchodněna nejlépe přístupná tepna mimo daný angiosom a ten je následně zásoben kolaterálním řečištěm. Nebo je využita metoda přímé revaskularizace, kdy je do postiženého angiosomu obnoven přímý průtok či kolateralizace cestou pedálního oblouku [53, 54].

Genová terapie v léčbě oschemické choroby dolních končetin

Novou slibnou možností léčby ischemie dolních končetin, a to především pro pacienty NO-CLTI, reprezentuje genová terapie. Při této metodě je do postižených nohou aplikován genetický materiál kódující proteiny, napomáhající zlepšení průtoku krve obnovením krevních cév cestou angiogeneze.

Studie využívají různé metody genové úpravy, kdy je nejčastěji do buněk vpraven DNA či RNA materiál. Následně dochází ke změně genové exprese buněk. Účinkem terapie mohou být do ischemické tkáně také následně mobilizovány regenerativní kmenové buňky. Studie využívají například neviróvých fibroblastový růstový faktor, plazmidovou DNA kódující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) s cytomegalovirovým promotorem, angiomatrix proteinem vývojově regulovaný endoteliální lokus 1 (Del-1), plazmidovou DNA exprimující izoforní hepatocytárního růstového faktoru (HGF), neviróvých DNA plazmid kódující lidský faktor 1 odvozený ze stromálních buněk (SDF-1) a další. Pokusy ukázaly, že tato léčba je bezpečná, avšak doposud není jasná její účinnost ke snížení rizika amputace nebo zlepšení kvality života [46].

Autologní buněčná terapie

Pro pacienty bez jiné možnosti revaskularizace představuje v současné době poslední možnost léčby aterosklerotického postižení ACT. Cílem této metody je docílit neovaskularice a revaskularizace tepenného řečiště dolních končetin [47].

Angiogeneze

Tento komplexní proces vedoucí k nárůstu nových cév je indukován ischemií tkání. Ischemií indukovaná angiogeneze napomáhá obnovit přísun kyslíku a nutrientů do tkání a navrátit jim jejich funkci. Proces novotvorby vaskulárního řečiště probíhající z preexistujících cév je řízen souhrou proangiogenních faktorů, kterými jsou VEGF, bazální fibroblastový růstový faktor (bFGF), transformující růstový faktor beta (TGF- β) a růstový faktor endoteliálních buněk derivovaný z krevních destiček (PDGF) a anti-angiogenní faktory, jako je endostatin, angiostatin, tkáňové inhibitory metalloproteináz a interferon- α [55].

Proces je zprostředkován již zmíněnými faktory VEGF, bFGF, ale také hepatocytovým růstovým faktorem (HGF), hypoxií indukovaným faktorem-1a (HIF-1 a), vývojovým endoteliálním lokusem-1 (Del-1) a SDF-1 [56, 57].

Pro tvorbu kolaterálního řečiště je významným faktorem endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS). Její exprese je významně zvýšena během arteriogeneze. Tento proces není pravděpodobně schopen přirozeně kompenzovat tkáňovou ischemii u CLTI. Studie poukazují na snížené uvolňování NO zprostředkované eNOS u myšičího modelu s T1DM a T2DM [56].

Z preklinických a klinických studií vyplývá, že v případě DM dochází ke změnám na úrovni hladin HIF-1 a VEGF, phosphoinositide 3' kinase/AKT/endotheliální syntázy oxidu dusnatého a k anti-angiogennímu vlivu akumulací konečných produktů glykace, nadprodukcí reaktivních forem kyslíku a stresem endoplasmatického retikula [58].

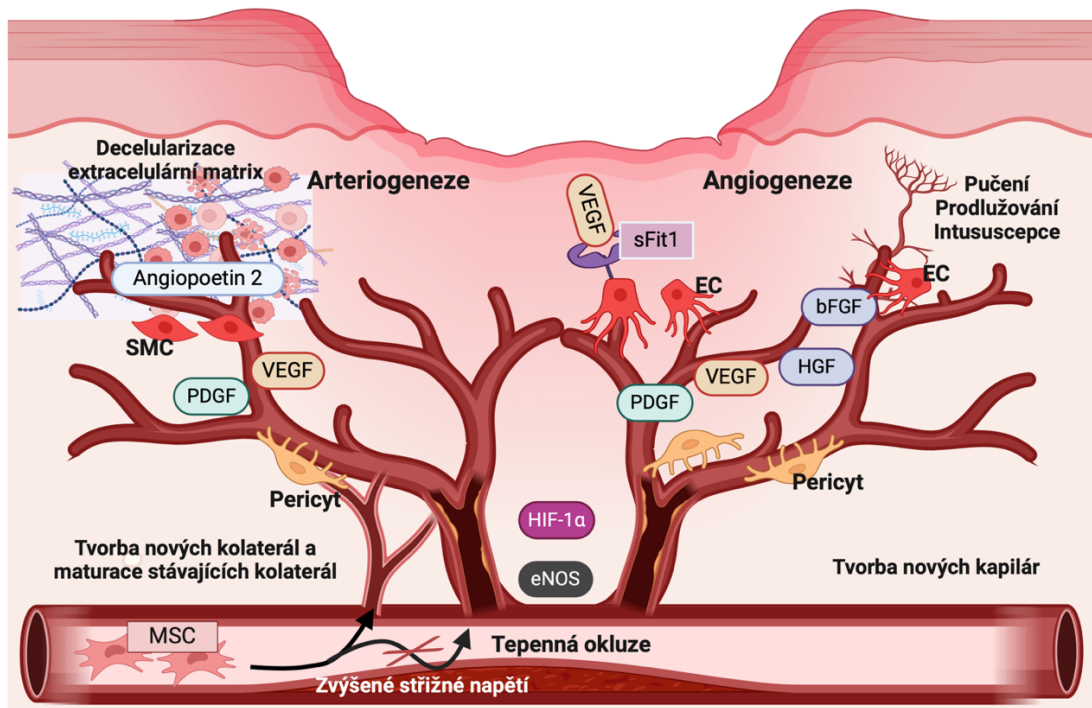
Proces angiogeneze probíhá v několika krocích, od pučení, proliferace a migrace endoteliálních buněk k dotvoření funkčních cév. K procesu růstu endoteliálních buněk je nezbytné dostatečné množství VEGF, kdy jeho množství dodávaného buňkám je zprostředkováno rozspustným VEGF receptorem (sFit1). Proces probíhá v sekvenci pučení kapilár, jejich prodloužení a intususcepci (Obrázek 1) [59, 60].

Arteriogeneze

Arteriogeneze je proces kompletně odlišný od angiogeneze a zahrnuje tvorbu nových kolaterál z již přítomných kapilár v reakci na faktory související s hypoxií a dále maturaci již přítomných kolaterál. Na této cévní remodelaci se podílí NO, aktivace monocytů, změny v extracelulární matrix, růstové faktory a chemokiny společně s alterací již existujících cév. Na procesu se také účastní progenitorové buňky kostní dřeně v ischemické tkáni.

Tvorba nových tepen probíhá na podkladě působení VEGF, který podporuje jejich růst, moduluje expanzi lumen a indukuje tvorbu kolaterál [59]. Po sekvenci pučení kapilár, jejich prodlužování a intususcepci podpořené destrukcí okolní extracelulární matrix při účasti angiotensinu 2 dochází k mobilizaci pericytů a buněk hladké svaloviny [59, 60].

Prozatím není zcela objasněn celý průběh arteriogeneze, proto je předmětem mnoha studií. Je diskutována role zánětlivých procesů a účasti buněk imunitního systému (zejména monocytů-makrofágů), růstových faktorů, microRNA a hypoxie [61]. Arteriogeneze je pravděpodobně procesem, který je navozen při ACT vlivem nově aplikovaných prekurzorových buněk (Obrázek 1) [47].



Obrázek 1: Schéma průběhu arteriogeneze a angiogeneze při ischemickém poškození a zapojení růstových faktorů. EC – endotelové buňky, VEGF – vaskulární endoteliální faktor, sFit1 – rozpustný VEGF receptor, bFGF - bazální fibroblastový růstový faktor, TGF- β - transformující růstový faktor beta, HGF - hepatocytový růstový faktor, PDGF – růstový faktor endoteliálních buněk derivovaný z krevních destiček, MSC – mesenchymální kmenové buňky, SMC – buňky hladké svaloviny, eNOS – endoteliální syntáza oxidu dusnatého, HIF-1 α - hypoxií indukovaný faktor.

Zdroje kmenových buněk pro terapii ischemie dolních končetin

Aplikované buňky mohou být xenogenního, alogenního či autologního původu. Xenogenní podání není doposud schváleno k aplikaci lidem z důvodu velmi vysokého rizika odmítnutí, přenosu infekce a toxicity xenogenní tkáně v lidském těle. Alogenní prekurzorové buňky získané z kostní dřeně zdravých dárců byly již v několika studiích použity s pozitivními výsledky. Přesto stále nejčastěji jsou pro účely léčby CLTI používány autologní zdroje kmenových buněk [62].

V současné době jsou nejčastějším využívaným zdrojem pro terapii NO-CLTI kmenové buňky získávané z kostní dřeně (KD). Mohou být použity jako suspenze obsahující všechny složky KD nebo separovány pouze jednotlivé subpopulace vybraných buněk.

Efektivní se v léčbě NO-CLTI jeví mononukleární buňky kostní dřeně (BMMNC – bone marrow-derived mononuclear cells), periferní mononukleární buňky (PMBNC či PBPC - peripheral blood progenitors) a také mesenchymální stromální buňky (MSC – mesenchymal stem cells), které mohou být izolovány buď z KD nebo z tukové tkáně. Dále jsou slibné subpopulace myeloidních angiogenních buněk (MAC – myeloid angiogenic cells) a endoteliální kolonie-formující buňky (ECFC – endothelial colony forming cells) [9, 10, 62, 63].

Jednotlivé typy progenitorových buněk jsou specifické svými povrchovými znaky a od nich odvíjejícími se vlastnostmi. Buňky BMMNC jsou charakteristické znaky CD34+, CD133+, CD14- a CD45+, další zástupci hojně aplikovaných buněk PBPC nesou znaky CD34+, CD14- a CD45-. Buňky MAC jsou nositeli CD45+, CD14+ a CD31+ a ECFC jsou pozitivní na CD34+, CD31+, CD146+ a CD105+ [9, 10, 62].

Nejdůležitějšími buňkami pro terapii NO-CLTI jsou v současné době BMMNC získávané trepanobiopsií lopaty kyčelní kosti. Frakce mononukleárních buněk PBPC je pro terapeutické účely separována z periferní krve po předchozí stimulaci granulocyty kolonie-stimulujícím faktorem (G-CSF) [46].

Dalším možným zdrojem kmenových buněk je tuková tkáň, pupečnická krev, Whartonův rosol, retinální tekutina, menstruační krev a další experimentální zdroje [55, 62, 64].

Účinky a limitace terapie kmenovými buňkami ve studiích

Buněčná terapie využívající MSC je jednou z regeneračních strategií pro stimulaci terapeutické angiogeneze. MSC představují zásadní roli při hojení ran a stimulaci angiogeneze díky jejich přirozenému potenciálu pro diferenciaci víceřadých buněk, schopnosti vylučovat rozpustné faktory a exozomy cestou parakrinní funkce a imunomodulační a antibakteriální aktivitě. Tyto buňky jsou schopné iniciovat hojení endogenní tkáně tím, že mobilizují buňky zapojené do opravy tkáně a imunomodulace. Jejich nízká imunogenicita a také imunosupresivní schopnosti pomáhají tlumit imunitní odpověď hostitele po transplantaci, což také dělá z MSC atraktivní terapeutickou alternativu ve srovnání s jinými typy buněk. MSC lze dále získávat z různých typů tkání, včetně tukové tkáně, KD, placenty a pupečnickové krve, což může také ovlivnit jejich vlastnosti. Terapie MSC je však významně omezena buněčnou životaschopností, retencí a sníženou nebo nespecifickou buněčnou migrační kapacitou. Omezené funkce MSC jsou popisovány u chronických stavů spojených s tkáňovou hypoxií, hyperglykemií, sníženým průtokem krve a významným lokálním zánětem [65, 66].

Scatena a spol. popisují význam PBMNC, monocytů, makrofágů a populace lymfocytů při regeneraci tkání trofických lézí prostřednictvím polarizace zánětlivých makrofágů [67].

PBPC představují primitivní progenitory endoteliálních buněk. V krevní oběhu jsou obsaženy pouze v malém množství a to <0,1 % cirkulujících buněk. Proto jsou během ACT izolovány z periferní krve (často po předchozí stimulaci G-CSF) a aplikovány lokálně, čímž se docílí silných stimulačních účinků na růstu cév v ischemické tkáni.

Diabetes způsobuje dysfunkci progenitorových endoteliálních buněk, včetně buněk CD34+. Proto se výzkumné práce zabývají monocytárními progenitory, které se zdají být méně negativně ovlivněny tímto onemocněním než jejich primitivní progenitory. Ve studii Awarda a spol. popisují sníženou schopnost produkce endoteliálních buněk při oxidačnímu stresu nebo hypoxii, oproti monocytárním buňkám. Tato studie podává lepší výsledky u CD14+ buněk oproti CD34+ PBPC, ale také informuje o možném pozitivním efektu kombinace obou typů buněk při terapii diabetické tkáně. Konkrétně zjistila u aplikovaných CD14+ a CD34+ buněčných progenitorů zvýšenou agregovanou arteriolární hustotu a zachování svalové tkáně u myši s ischemií a diabetem [68].

Na podkladě již výše uvedených změn a dalších prací je nutné uvažovat o omezené angiogenní kapacitě některých buněčných populací u diabetiků. Změny mohou být způsobeny narušenou architektonikou KD, pozměněnou mobilizací nezralých buněk do krevního řečiště, a tím sníženou zásobou cirkulujících buněk s regeneračním potenciálem. U KD lidí s diabetem a ICHDK byly také zjištěny patologie ve smyslu vaskulopatie, neuropatie a adipózních změn, narušením reparačních mechanismů, které následně negativně ovlivňují i vzdálené orgány a ischemické končetiny a tedy i výsledky terapie ACT.

Studiemi bylo také prokázáno, že DM omezuje terapeutický účinek MSC získaných z tukové tkáně a zhoršuje jejich angiogenní kapacitu [9].

Na podkladě výsledků několika studií je také potvrzen negativní vliv medikace pacientů na efekt použitých kmenových buněk, což je nutno zohlednit při dalším postupu u léčby pacientů s diabetem a přidruženými komorbiditami [10, 69, 70].

Pozitivní výsledky studií využívajících MSC vedly k jejich použití u široké škály onemocnění, jako je leukémie, anémie, autoimunitních, degenerativní a kardiovaskulární onemocnění a maligních nádorů nebo také k léčbě koronavirového onemocnění (COVID-19). Nové klinické studie však uvádějí velké množství nežádoucích a vedlejších účinků léčby založené na MSC. V některých případech se zdá, že účinnost buněčné terapie je přeceňována, což může potenciálně vést k tragickým ztrátám ve výsledcích pacientů [71]. Je tedy velmi důležité pečlivě zvažovat indikaci léčby ve vztahu ke zdravotnímu stavu pacienta a jeho diagnóze pro co nejlepší výsledek léčby.

Výsledky randomizovaných studií

Multicentrická randomizovaná kontrolovaná studie PROVASA, která porovnávala výsledky u pacientů s CLTI, kterým byly intraarteriálně podávány BMMNC, nebo placebo nepozorovali rozdíl mezi ABI mezi skupinami. U pacientů léčených BMMNC sledovali zvýšení TcPO₂, hojení defektů a snížení klidových bolestí. Další randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná multicentrická studie RESTORE-CLI aplikovala progenitorové buňky a buňky vycházející z MSC, které regenerují tkáň. Tato studie ukázala delší dobu do selhání léčby (definováno jako velká amputace, úmrtí, zdvojnásobení velikosti rány a nově vzniklá gangréna) ve skupině ACT ve srovnání s placebem. Do studie byli zařazeni pacienti s TBI ≤ 50 mm Hg a ABI ≤ 70 mm Hg [72]. Studie, která byla randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná, hodnotila účinnost BMMNC vůči placebo. Výsledky byly nejspíše ovlivněny kvalitou buněčného produktu a výběrem probandů u nichž byl nálezh ischemie hodnocen pomocí TcPO₂ s vysokou variabilitou (35 ± 22 mm Hg). Proto byl potenciál ACT ke zlepšení CLTI omezený. Studie neprokázala významný rozdíl v přežití nebo výskytu vysokých amputací ani v ischemických parametrech (ABI a TcPO₂) mezi skupinami ACT a placebo [73]. Studie Sharma a spol. byla randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná, která posuzovala bezpečnost a účinnost intraarteriální léčby BMMNC. Výsledky popisují významné zvýšení ABI a TcPO₂ a výrazně menší počet amputovaných pacientů ve srovnání s placebem [35]. Recentní randomizovaná, kontrolovaná, multicentrická studie PACE nenašla významný rozdíl v míře amputací, přežití bez amputace nebo rychlosti hojení mezi skupinou s MSC a placebem [74].

U všech klíčových studií byla ACT shledána jako bezpečná s významným potenciálem pro léčbu CLTI, přesto výsledky účinnosti terapie závisí na designu studie, kritériích pro zařazení či vyřazení a na výběru hlavních cílů (Tabulka 1) [9, 63].

Z výsledků metaanalýzy 14 studií s 643 pacienty týmu Sun a spol. vyplývá, že ACT byla účinnější než konvenční terapeutické metody, a to na rychlost hojení defektů, zlepšení ischemie, ABI, TcPO₂, klidových bolestí a klaudikačního intervalu. ACT dále vedla ke snížení výskytu vysokých amputací [75].

Studie, autor, rok provedení	Počet pacientů ve studii	Použitý buněčný typ	Léčena skupina	Kontrolní skupina	Hodnocení ischemie	Výsledky léčené skupiny
PROVASA, Walter a spol. 2011[76]	40	BMMNC intraarteriálně	BMMNC	placebo	ABI	Bez rozdílu ABI ↑TcPO ₂ ↑hojení defektů ↓klidových bolestí
RESTORE-CLI, Powel a spol. 2011[72]	46	Tkáň regenerující buňky intra-muskulárně	MSC	placebo	ABI, TBI	↑doby do amputace, smrti, nové gangrény či defektu
JUVENTAS, Teraa a spol. 2015[73]	160	BMMNC intraarteriálně	BMMNC	placebo	ABI, TcPO ₂	Bez rozdílu amputací, ABI, TcPO ₂
Sharma a spol. 2021[35]	81	BMMNC intraarteriálně	BMMNC	placebo	ABI	↑ABI ↑ TcPO ₂ ↓amputací
PACE. Norgren a spol. 2024[74]	213	MSC intramuskulárně	MSC	placebo	ABI, TBI	Bez rozdílu amputací

Tabulka 1. Přehled nejdůležitějších studií hodnotících autologní buněčnou terapii, BMMNC - mononukleární buňky kostní dřeně, MSC - mesenchymální stromální buňky, ABI - měření indexu kotníkových - ankle-brachial index, TBI – měření indexu prstových tlaků - toe-brachial index, TcPO₂ – transkutánní tenze kyslíku

1.2.3.4 Hojení a infekce defektů dolních končetin diabetiků s ischemií

Špatné hojení ran u SDN je ovlivněno hyperglykemií, chronickým zánětem, mikro- a makrovaskulární dysfunkcí a neuropatií. Dalšími faktory zhoršeného hojení a infekčních komplikací jsou imunologické abnormality, jako je narušení funkce makrofágů, snížená baktericidní kapacita a fagocytóza, změněná funkce keratinocytů a fibroblastů a snížené nasměrování kmenových buněk do místa poškození. Jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují hojení defektů při SDN, je perfuze tkání, ICHDK, DPN, infekce nohy, chronické renální selhání, vyšší věk a mužské pohlaví, kouření, deformita nohy, špatná glykemická kontrola, velikost defektu, hypertenze, hyperlipidémie a abnormality v bílé krevní řadě (WBC), albuminu (ALB), sedimentaci erytrocytů a C-reaktivního proteinu (CRP) [66, 77].

Infekce u SDN jsou hlavní příčinou morbiditidy jedinců s diabetem, snížením kvality jejich života. Vyžadují nutnou zdravotnickou péči, antimikrobiální terapii a chirurgické zákroky. Infikované defekty jsou příčinou až 60% amputací dolní končetiny a je tedy spojená i s vysokou ekonomickou zátěží [78].

Pro zvládnutí zánětlivého procesu je vyžadována správná diagnóza, přesná klasifikace lézí, získávání vhodných vzorků pro kultivaci, volba empirické a poté definitivní antimikrobiální terapie a rozhodnutí o chirurgickém zákroku [78].

Metaanalýza Yanga a spol. hodnotila výskyt multirezistentních kmenů u infikovaných diabetických ulcerací. Ze studie vyplývá, že u SDN je sledován vyšší počet gram-negativních

bakteriálních infekcí. Nejčastěji multirezistentní *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus* spp., dále *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* a *Proteus mirabilis*. Studie také ukázala, že onemocnění periferních cév, periferní DPN, nefropatie, osteomyelitida, stupeň Wagnerovy klasifikace, předchozí hospitalizace a předchozí užívání antibiotik byly spojeny s multirezistentními bakteriálními infekcemi u pacientů se SDN [79].

1.2.3.5 Amputace

Celosvětově je popisován více než jeden milion lidí s DM po amputaci dolní končetiny v souvislosti se SDN a jde o nejčastější příčinu netraumatické amputace. Defekt dolní končetiny vede až u 84% diabetiků k amputaci v různých úrovních. Vysoká amputace dolní končetiny je spojena až s 50% mortalitou během 3 let a až 62,2% 5 let po výkonu u pacientů s ICHDK a diabetem [9].

Amputační výkony významně snižují kvalitu života a zvyšují riziko deprese pacientů.

Podiatrické chirurgické výkony prováděné na dolní končetině dělíme na vysoké a nízké amputace. V současné době jsou stále nejvíce prováděny vysoké amputace pod kolenem, poté nad kolenem – ve stehně a nyní také získává na oblibě amputace v kolenním kloubu s disartrikulací. Mezi nízké amputace řadíme amputace prstů, transmetatarsální amputace a amputace v Lisfrankově skloubení [77].

Amputačním výkonem jsou ohroženi více pacienti s vyššími hladinami CRP, s poruchami perfuze na podkladě koagulopatií, trombofilních stavů nebo mutace genu pro methylen-tetrahydrofolát reduktázu (MTHFR) s heterozygotním a homozygotním polymorfismem 1298 a historií kouření [66].

Dále studie popisují, že negativní faktory vysoké amputace jsou zvýšené hodnoty WBC a nízké hladiny ALB, kultivace s pozitivním nálezem gramnegativních bakterií a to především infekce *Staphylococcus aureus*, věk nad 65 let a vysoké Wagnerovo skóre, dlouhé trvání SDN [77].

2 Hypotézy disertační práce

Hypotéza studie 1: Není rozdíl v různých izolačních metodách ACT z pohledu klinického efektu na ischemii u pacientů se SDN.

Hypotéza studie 2: Hlavním faktorem ovlivňujícím amputace po ACT bude tíže vstupní ischemie a přítomnost infekce

Hypotéza studie 3: Sirolimus bude mít největší negativní dopad na růst a proliferaci kmenových buněk, vyšší koncentrace imunosupresiv budou výrazněji toxičtější.

Hypotéza studie 4: ACT bude významně účinnější na parametry ischemie v porovnání se standardní konzervativní léčbou u NO-CLTI.

3 Cíle disertační práce

V **první** studii jsme se zabývali porovnáním různých izolačních metod ACT u diabetiků s CLTI.

Cílem první studie bylo:

- 1) posoudit celkem tři metody odběru a aplikace suspenze autologních kmenových buněk z kostní dřeně a periferní krve.
- 2) vyhodnotit množství buněčné populace v aplikovaném produktu
- 3) posoudit efekt jednotlivých metod na změny hodnot TcPO₂

Ve **druhé** studii jsme se zaměřili na faktory ovlivňující klinický efekt ACT u pacientů s diabetem a to konkrétně na riziko vysoké amputace po aplikaci.

Cíle druhé studie:

- 1) Prvním cílem této studie bylo zhodnotit rizikové faktory vysoké amputace po ACT
- 2) Studie dále diskutuje využití poznatků pro predikci výsledku ACT, úpravu medikace a postupu léčby před a po aplikaci ACT a prevenci u doposud zdravých jedinců s DM

Ve **třetí** studii jsme zkoumali vliv imunosupresivních látek na funkční vlastnosti kmenových buněk.

Cíle třetí studie:

- 1) Cílem bylo posoudit vliv imunosupresiv na jednotlivé subpopulace kmenových buněk používaných při ACT
- 2) Dalším cílem bylo posoudit vliv různých koncentrací imunosupresivních léčiv na kmenové buňky a aplikace výsledků do klinické praxe

Čtvrtá studie porovnávala výsledky léčby ACT oproti standardní revaskularizační terapii.

Cíle čtvrté studie:

- 1) Ve studii byl posuzován efekt ACT oproti konzervativní terapii pomocí změn TcPO₂, změn vnímání bolesti a hojení defektu
- 2) Cílem bylo také zhodnotit vliv terapeutických metod na výskyt vysokých amputací

4 Seznam použitých zkratek

ABI - měření indexu kotníkových tlaků - ankle-brachial index

ACT – autologní buněčná terapie

ALB - albumin

BMMNC - mononukleární buňky kostní dřeně

CLTI - chronická končetinu ohrožující ischemie

CRP - C-reaktivní protein

CT - počítačová tomografie

DM – diabetes mellitus

ECFC - endoteliální kolonie-formující buňky

FGF - fibroblastový růstový faktor

G-CSF - granulocyty kolonie-stimulující faktor

HGF - hepatocytární růstový faktor

ICHDK – ischemická choroba dolních končetiny

IDSA/IWGDF - klasifikační systém Americké společnosti pro infekční choroby a Mezinárodní skupiny pro diabetickou nohu

KD – kostní dřeň

MAC - ubpopulace myeloidních angiogenních buněk

MRI - magnetická rezonance

MSC - mesenchymální stromální buňky

MTHFR - genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu

NO – oxid dusný

NO-CLTI – skupina pacientů s neřešitelnou chronickou končetinu ohrožující ischemií standardními revaskularizačními metodami - „no option pacienti“

PBMNC - periferiální mononukleární buňky

PEDIS - klasifikační systém pro posouzení perfuze, rozsah a hloubku defektu

SDF-1 - faktor 1 odvozený ze stromálních buněk

SINBAD - klasifikační systém

TBI - měření indexu palcových tlaků - toe-brachial index

TcPO₂ – transkutánní tenze kyslíku

TEXAS – klasifikační systém The University of Texas Staging System for Diabetic Foot Ulcers

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

WBC - bílé krvinky

WIFI - klasifikační systém The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification systém

5 Vybrané metody jednotlivých studií

5.1 Izolace kmenových buněk

Pro účely studie byly využívány mononukleární kmenové buňky získané s kostní dřeně a periferní krve pomocí třech izolačních metod.

5.1.1 Izolace kmenových buněk z periferní krve (studie 1)

Kmenové buňky z periferní krve (PBPC) byly získány po předešlé stimulaci subkutánně podávaného granulocyty kolonie formujícího faktoru (G-CSF, filgrastim). Stimulace byla prováděna 3-6 dní subkutánním podáním 5-8 $\mu\text{g/kg/den}$ G-CSF. Celkový počet cyklů byl volen dle váhy pacienta, hematokritu a množství prvního buněčného výtěžku. Buňky byly odděleny přímo z pacientovy cirkulace. Suspenze PBPC byla následně extrahována pomocí leukaferézy na přístroji Haemonectics MSC+ (Multikomponentensystem MSC+, Boston, MA, USA) v 16-20 cyklech do zisku minimální hladiny 2×10^4 /ml CD34+ buněk.

5.1.2 Izolace kmenových buněk z kostní dřeně pomocí gelofusinu (studie 1)

Tato invazivní metoda je založena na zisku mononukleárních kmenových buněk (BMMNC) z kostní dřeně punkcí lopaty kosti kyčelní. Během procedury prováděné v celkové či lokální anestezii bylo odebráno 350-400 ml kostní dřeně z níž bylo extrahováno 40 ml finálního produktu. Aspirát byl již během odběru smíchán s nízkomolekulárním heparinem a filtrován v laminárním boxu. Následně jsme do supernatantu přidali succinyl želatinu (Gelofusine; B. Braun, Melsungen, Německo), která urychlila sedimentaci erytrocytů a nukleárních buněk. Proces trval 40-60 minut do oddělení erytrocytů od plazmy. Poté byla plazma obsahující leukocyty odebrána do centrifugační nádoby a centrifugována rychlostí 1600 otáček po dobu 15 minut při 4°C. Následně byla extrahována plazma a přidána do zbytku erytrocytů. Reziduální sediment o objemu 40-60 ml byl injekčně aplikován do ischemických svalů dolní končetiny.

5.1.3 Izolace kmenových buněk z kostní dřeně metodou Harvest (studie 1-4)

Kmenové buňky byly odebrány obdobně jako v předchozí metodě z lopaty kosti kyčelní za přísných aseptických podmínek pomocí Jamshidiho jehly. Bylo odebráno přesně 250 ml kostní dřeně, která byla smíchána ve sběrném vaku s heparinem a 16 ml kyselého citrátu a dextrózy (ACD-A, Zimmer Biomet, Velká Británie), která byla centrifugována při 4000 otáčkách po dobu 15 minut pomocí přístroje Harvest Smart PReP2 (Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA). Finální produkt byl separován od plazmy a rozdělen do čtyř 10ml injekčních stříkaček a poté intramuskulárně aplikován.

5.2 Aplikace buněčné suspenze (studie 1-4)

Finální produkt o objemu 40-70 ml separovaný pomocí výše popsaných metod (PBPC či BMMNC s Gelofusinem nebo Harvestem) byl aplikován do postižené dolní končetiny hluboce nitrosvalově v sérii 40-50 vpichů po obou stranách musculus gastrocnemius, musculus soleus a také do svalů dorza a plosky nohy v rozestupu 1-2 cm. Suspenze byla také injikována do okrajů defektu.



Obrázek 2: Odběr kostní dřeně z lopaty kyčelní dřeně



Obrázek 3: Sběrný vak s kostní dřeně

5.3 Hodnocení mikrocirkulace pomocí změn transkutánní tenze kyslíku (studie 1,2,4)

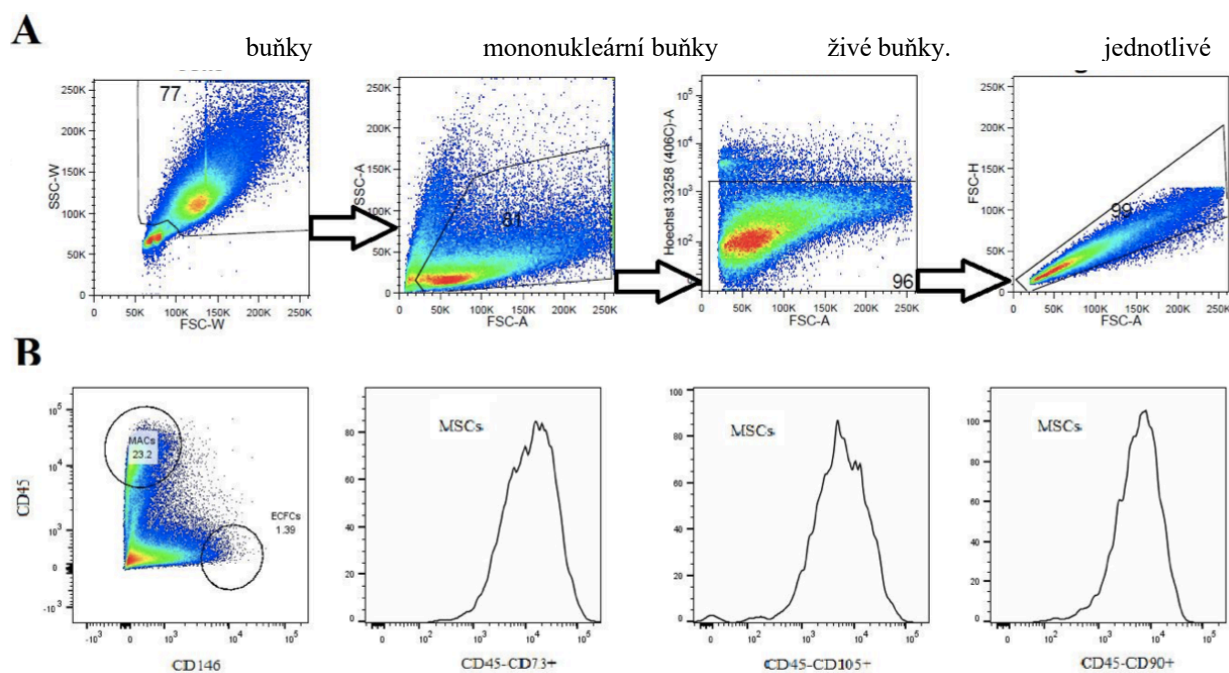
Neinvazivní měření mikrocirkulačních změn v podobě $TcPO_2$ bylo prováděno před aplikací kmenových buněk a následně v předem stanovených intervalech po aplikaci buněčné suspenze. Vyšetření bylo prováděno pomocí přístroje Radiometer TCM400 (Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dánsko) na dorzu nohy mezi 1. a 2. metatarzálními hlavicemi. se standardizovanou pokojovou teplotou ($22^{\circ}C$) a pacient ležel na zádech po dobu 40 minut. Pacienti byli do studií indikováni při hodnotách nižších než 30 mm Hg, což je hranice CLTI v mezinárodních doporučených postupech. Po aplikaci kmenových buněk byl efekt terapie hodnocen změnami hodnot oproti vstupním výsledkům měření $TcPO_2$. Ve studii 1 byly také výsledky korelovány s množstvím buněčných subpopulací v aplikovaném finálním produktu.

5.4 Kultivace kmenových buněk (studie 3)

Buněčná suspenze odebrána Metodou Harvest byla dále zpracována ve studii 3. Zbylý objem několika mililitrů z finálního produktu určenému k aplikaci byl poskytnut k laboratornímu zpracování a hodnocení. Z kostní dřevě byla odebrána frakce bez erytrocytů, které byly odděleny pomocí gelofusinu (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo). Tyto buňky byly dále naočkovány do 15 ml Dulbeccova modifikovaného Eagle Media (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) obsahujícího 10 % fetálního telecího séra, antibiotika (100 μ g/ml streptomycinu, 100 U/ml penicilinu) a 10 mM HEPES pufru (kompletní DMEM). Pro potřeby studie byly použity pouze právě odebrané buňky, žádné buněčné populace nebyly mraženy ani uchovávány pro budoucí experimenty. Buňky byly kultivovány v konečné koncentraci 5×10^6 /ml v lahvích 75 cm² pro tkáňové kultury (Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Švýcarsko). Adherentní a neadherentní buňky byly kultivovány po dobu 14–18 dnů při teplotě 37 °C s pravidelnou výměnou média a pasážováním, aby byl zachován optimální počet buněk. Buňky byly sklizeny ve 3. až 4. pasáži inkubací s 1 ml 0,5% roztoku trypsinu (Sigma-Aldrich) po dobu 5 minut, po které následovalo jemné seškrábávání. Po 14–18 dnech kultivace byla suspenze adherentních a neadherentních buněk použita pro další experimenty.

5.4.1 Fenotypová charakterizace kmenových buněk průtokovou cytometrií

Kmenové buňky byly promyty ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem a inkubovány po dobu 30 minut při 4 °C s monoklonálními protilátkami (alofykocyanin APC-značeným anti-CD146, klon P1H12, BioLegend, San Diego, CA, USA), fykoerythrinem (PE-značeným anti-CD105, klon SN6, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), CA05 Carlsbad Life, anti-CD1 Technologie, CA05 Carlsbad Life, anti-CD1 Technologie USA), fluorescein isothiokyanátem FITC-značeným anti-CD45 (klon HI30, BioLegend), FITC-značeným anti-CD90 (klon 5E10, BioLegend), PE-značeným anti-CD73 (klon AD2, eBioscience, San Diego, CA, USA) a Anti-Leclon HIBIO-značeným 305). Mrtvé buňky byly obarveny fluorescenčním barvivem Hoechst 33,258 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a přidány ke vzorkům 10 minut před průtokovou cytometrií. Data (100 000 událostí na vzorek) byla získána pomocí průtokového cytometru LSRII (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) a analyzována pomocí softwaru FlowJo 10 (Tree Star, Ashland, OR, USA).



Obrázek 4: Charakterizace populací BMMNC. (A) Reprézntativní bodové grafy ukazují vtokovou strategii značení živé jednobuněčné suspenze analyzované průtokovou cytometrií. (B) Reprézntativní histogramy značených živých jednobuněčných suspenzí analyzované průtokovou cytometrií. (B) Reprézntativní histogramy ukazují, že jednobuněčná suspenze kultivovaná po dobu 14–18 dnů obsahovala $CD45^-CD90^+CD73^+CD105^+$ buňky (MSC) a bodový graf ukazuje $CD45^+CD146^-$ buňky (MAC a lymfocytární populace).

5.4.2 Měření metabolické aktivity kmenových buněk vystavených imunosupresivům

Dále byly kmenové buňky v konečné koncentraci 25×10^3 /ml kultivovány v objemu 200 μ l kompletního DMEM v 96-jamkových tkáňových kultivačních destičkách (Nunc, Roskilde, Dánsko) po dobu 48 hodin bez ošetření nebo v přítomnosti tacrolimu, sirolimu a mykofenolát-mofetilu v koncentraci 0,005–500 μ g/ml. Metabolická aktivita buněk byla stanovena pomocí testu WST-1 (Roche, Mannheim, Německo) a spektrofotometru Tecan Sunrise (Life Science, Mannedorf, Švýcarsko) a analyzována softwarem Kim 32 (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika). Roztok WST-1 (10 μ l/100 μ l vzorku) byl přidán ke vzorkům na poslední 3 h z 48 h inkubační doby. WST-1 je tetrazoliová sůl, která je štěpena na formazan buněčným mechanismem, lokalizovaným na buněčném povrchu závislém na produkci NAD(P)H. Tvorba formazanu tedy koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk.

5.4.3 Stanovení vlivu imunosupresiv na genovou expresi

Buňky byly kultivovány v konečné koncentraci 8×10^4 /ml ve 24-jamkových tkáňových kultivačních destičkách (TPP) v objemu 1 ml kompletního DMEM, buď nestimulovaného nebo stimulovaného prozánětlivými cytokiny lidským rekombinantním IFN- γ , konečná koncentrace 10 ng/ml (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) a lidským rekombinantním TNF- α (10 ng/mL) (PeproTech), nebo stimulované cytokiny za přítomnosti imunosupresiv (tacrolimus, sirolimus, mykofenolát-mofetil) v koncentraci v rozmezí 0,005–500 μ g/ml po dobu 48 hodin. Expres genů pro indoleamin 2,3-dioxygenázu (IDO), cyklooxygenázu-2 (COX2), programovaný death-ligand 1 (PD-L1), indukovatelnou izoformu syntázy oxidu dusnatého (iNOS) a transformující růstový faktor- β (TGF- β) (všechny primery z Generi Biotech, Hradec Kralové, Česká republika) byly stanoveny pomocí PCR v reálném čase (RT-PCR). Stručně řečeno, celková RNA byla izolována ze vzorků odebraných v TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Jeden μ g celkové RNA byl smíchan s deoxyribonukleázou I (Promega, Madison, WI, USA) a použit pro reverzní transkripci. RT-PCR byla zpracována pomocí Power SYBR Green PCR master MIX (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) na cykléru StepOne Plus RT-PCR System (Applied Biosystems). Parametry RT-PCR zahrnovaly denuraci při 95 °C po dobu 3 min, 40 cyklů při 95 °C po dobu 20 s, žhání při 60 °C po dobu 30 s a prodloužení při 72 °C po dobu 30 s. Data byla sbírána v každém cyklu po elongaci při 80 °C po dobu 5 s a byla analyzována pomocí StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

5.4.4 Hodnocení vlivu imunosupresiv na produkci cytokinů a růstových faktorů

Kultivace buněk proběhla pomocí stejné metody, jež byla použita u hodnocení exprese genů. Supernatanty byly shromážděny po 48 hodinách kultivace neošetřených kmenových buněk, stejně jako těch, které byly vystaveny imunosupresivům. Produkce hepatocytárního růstového faktoru (HGF), vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), interleukinu 8 (IL-8), IL-6 a chemokinového C-C motivového ligandu 2 (CCL2) byla stanovena pomocí souprav ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

5.4.5 Hodnocení vlivu imunosupresiv na buněčnou smrt

Kmenové buňky byly kultivovány v konečné koncentraci 8×10^4 /ml v 1 ml kompletního DMEM na 24-jamkových destičkách pro tkáňové kultury (TPP). Buňky byly kultivovány buď samostatně bez přítomnosti léčiv, nebo byli vystaveny sirolimu, tacrolimu nebo mykofenolát mofetilu v koncentracích v rozmezí 0,005–500 μ g/ml po dobu 48 hodin. Procento apoptotických buněk bylo stanoveno průtokovou cytometrií s použitím soupravy pro detekci apoptózy Annexin V (Exbio, Praha, Česká republika) v souladu s protokolem výrobce. Annexin V se váže na fosfatidylserin (marker apoptotických buněk), když se objeví ve vnější vrstvě plazmatické membrány. Mrtvé buňky byly obarveny fluorescenčním barvivem Hoechst 33,258 (Sigma-Aldrich) a přidány ke vzorkům 10 minut před průtokovou cytometrií. Data byla shromážděna pomocí cytometru LSRII (BD Biosciences) a analyzována softwarem FlowJo 10 (Tree Star).

6 Přehled studií

6.1 Studie 1: Posouzení tří metod využívajících buněčnou terapii k léčbě chronické končetinu ohrožující ischemie u diabetiků

ACT je využívanou terapeutickou metodou u pacientů s těžkou ischemií dolních končetin. K terapii jsou využívány různé zdroje kmenových buněk a metody jejich zpracování před aplikací do postižené tkáně.

Cílem práce bylo porovnání různých izolačních metod ACT u diabetiků s CLTI. V této studii jsme hodnotili celkem tři metody odběru a aplikace suspenze autologních kmenových buněk z kostní dřeně (BMMNC - metoda Harvest a metoda Gelofusin) a stimulované periferní krve (PBPC). Dále jsme posuzovali množství buněčné populace v aplikovaném produktu a v neposlední řadě také efekt jednotlivých metod na změny hodnot TcPO₂.

Hypotéza: Není rozdíl v různých izolačních metodách ACT z pohledu klinického efektu na ischemii u pacientů se SDN.

Charakteristika souboru

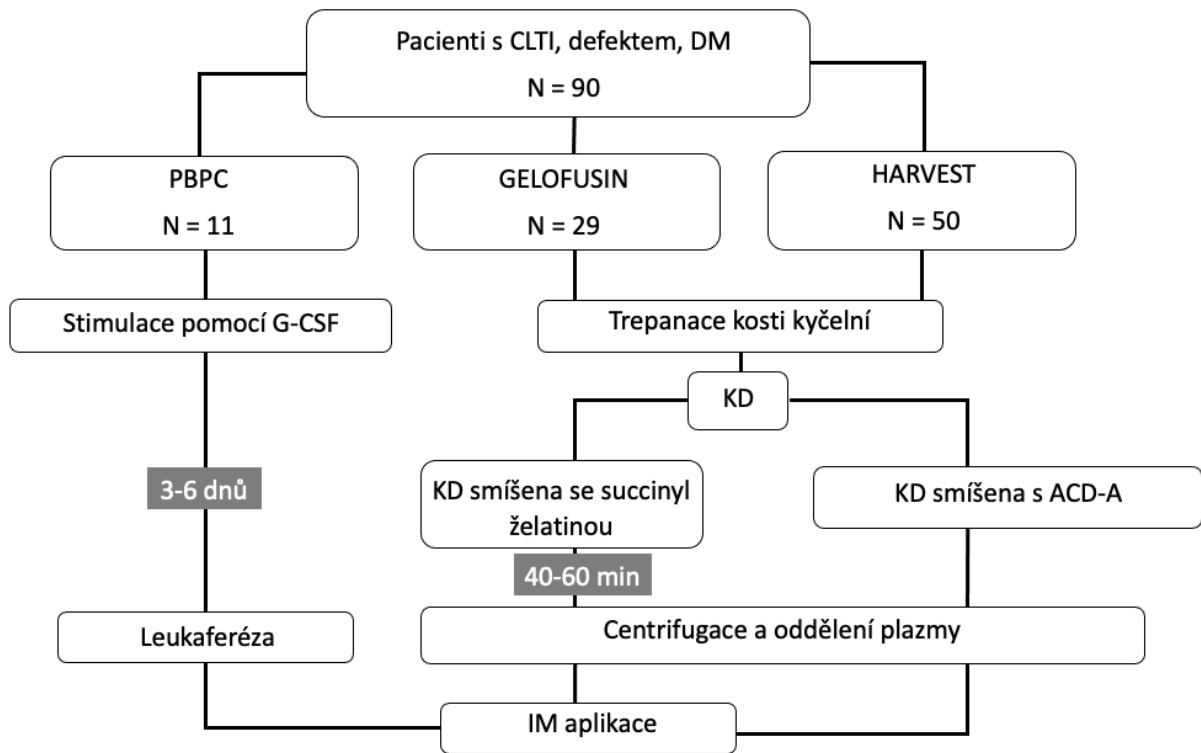
Do studie bylo zařazeno celkem 90 pacientů s diabetem mellitem a NO-CLTI léčených v období 12 let v podiatrické ambulanci Centra diabetologie IKEM. Vstupními kritérii byl chronický, nehojící se defekt dolní končetiny a těžká ischemie s poruchou mikrocirkulace definovanou TcPO₂ pod 30 mm Hg. Charakteristika souboru je uvedena v Tabulce 1. Kritéria vylučující zařazení byla těžká infekce defektu, hluboká žilní trombóza v posledních 6 měsících, rozsáhlý otok dolní končetiny, těžká neléčená diabetická retinopatie vyžadující laserové ošetření či retinopatie s vysokým rizikem krvácení sítnice, těžké hematologické onemocnění, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda v posledních 6 měsících, diagnostikovaný neoplastický proces kteréhokoli orgánu v posledních 5 letech a předpokládaná délka života kratší než 6 měsíců. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií schválenou lokální etickou komisí.

	PBPC	Gelofusin	Harvest
Počet pacientů	11	29	50
Pohlaví			
* muži	9	27	44
* ženy	2	2	6
Věk	63 (±10)	64 (±10)	66 (±12)
Typ diabetu			
* T1D	2	6	9
* T2D	9	23	41
* HbA1c [mmol/mol]	62,2 ± 12,5	57,5 ± 11,4	60,1 ± 14,7
* Trvání diabetu [roky]	20,7 ± 10,1	22 ± 13,5	26,6 ± 13,7
Kouření			
* nekuřák	3	11	23
* ex-kuřák	7	13	19
* kuřák	1	5	8
Dyslipidémie			
* cholesterol [mmol/l]	4,54 ± 0,67 (n = 11)	4,57 ± 1,17 (n = 24)	4 ± 0,96 (n = 46)
* LDL [mmol/l]	2,6 ± 0,6 (n = 11)	2,83 ± 1,03 (n = 24)	2,25 ± 0,81 (n = 46)
Chronická renální insuficience (CKD)			
CKD 1	n = 8	n = 17	n = 18
CKD 2	n = 0	n = 7	n = 10
CKD 3	n = 1	n = 1	n = 6
CKD 4	n = 1	n = 0	n = 2
CKD 5	n = 1	n = 4	n = 14

Tabulka 2: Vstupní charakteristiky pacientů léčených jednotlivými terapeutickými metodami

Schéma studie a metody

Pacienti byli léčeni kmenovými buňkami získanými z kostní dřeně (BMMNC) metodou Smart PReP2 (Harvest) nebo s použitím sukcinyl želatiny (Gelofusin). Třetí použitou metodou byly získány buňky z periferní krve (PBPC) po předchozí stimulaci G-CSF (Obrázek 1). Kritéria pro použití metody PBPC byla: schopnost přijímat G-CSF a pacient bez rizika zavedení centrálního žilního katetru. Transplantovaní pacienti byli považováni za skupinu s vyšším rizikem pro stimulaci G-CSF (kvůli vyššímu riziku odmítnutí štěpu), a proto byli léčeni BMMNC. Vzhledem k tomu, že metoda Harvest je rychlejší proces ve srovnání s metodou Gelofusine, byl tento aspekt důležitý pro použití této léčby u pacientů s vyšším rizikem anestezie.



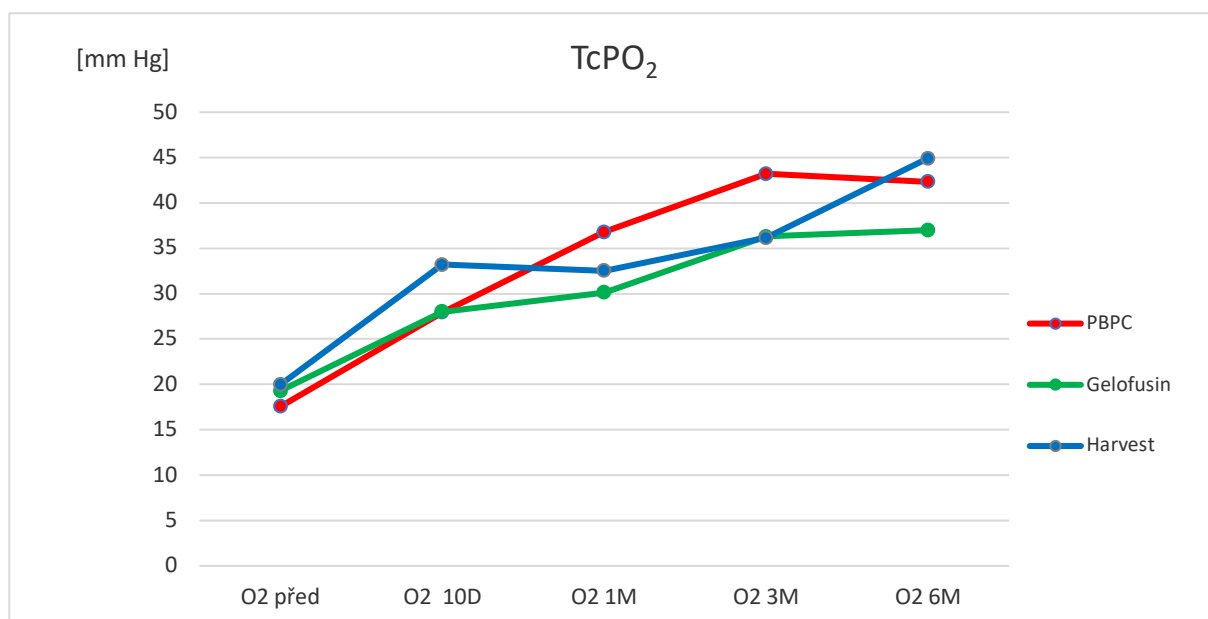
Obrázek 5: Schéma postupu zpracování kostní dřeně (KD) a periferní krve

Výsledky studie

Z celkového počtu 90 pacientů s diabetem a NO-CLTI bylo metodou PBPC léčeno 11 pacientů, Gelofusin metodou 29 a metodou Harvest Smart PReP2 celkem 50. Vzestup hodnoty TcPO₂ byl signifikantní ve všech třech skupinách po aplikaci v období kontrol po 1, 3 a 6 měsících ve srovnání se vstupní kontrolou ($p < 0,01$) a to bez významného rozdílu mezi jednotlivými metodami (Obrázek 6). Nebyla pozorována korelace mezi TcPO₂ a množstvím podaných CD34+ buněk. Také nebyla sledována přímá korelace mezi hodnotou TcPO₂ a množstvím lymfocytů ($r = 0,29$, $p = 0,0034$), bílých krvinek (WBC, $r = 0,32$, $p = 0,073$) a monocytů ($r = 0,27$, $p < 0,001$) obsažených ve finálním produktu. Nejvyšší množství WBC jsme pozorovali ve finálním produktu metody PBPC ($125,6 \pm 70,5 \times 10^9/l$ vs $50,6 \pm 40,7 \times 10^9/l$ vs $54,5 \pm 23,9 \times$

$10^9/l$) ve srovnání s metodou Gelofusin a Harvest Smart PReP2 ($p = 0,016$). Nepozorovali jsme rozdíl mezi TcPO₂ u pacientů s chronickou renální insuficiencí ve srovnání se skupinou bez onemocnění ledvin.

Množství lymfocytů získaných z periferní krve bylo významně nižší než množství získané metodou Gelofusin a Harvest ($1,61 \pm 1,39 \times 10^9/l$ vs. $10,26 \pm 6,84$; $1,61 \pm 1,39$ vs. $13,38 \pm 6,41$ ($p = 0,0002$). Mezi skupinami nebyl pozorován významný rozdíl mezi množstvím vysokých amputací PBPC 2/11 (18,2 %), Gelofusin 10/29 (34,5 %) a Harvest Smart PReP 11/50 (22 %); ($p=NS$), přesto u metody Gelofusin byl pozorován trend k vyššímu počtu amputačních výkonů.



Obrázek 6: Vývoj TcPO₂ po aplikaci ACT v průběhu kontrol 1, 3 a 6 měsíců ve srovnání se vstupní hodnotou

Diskuse ke studii

V naší studii jsme pozorovali signifikantní vzestup TcPO₂, tedy často využívaného ukazatele poruchy mikrocirkulace dolních končetin. Naše studie neprokázala vyšší výskyt vysokých amputací mezi skupinami, avšak nebyla navržena na srovnání s placebo kontrolní skupinou, jako tomu bylo u studie RESTORE-CLI, v níž byla BMMNC suspenze aplikována intramuskulárně s výsledkem sníženého počtu amputací ve srovnání s kontrolní skupinou.

Ve studiích PROVASA a Sharma a spol. byla použita suspenze získaná z kostní dřeně BMMNC, která byla aplikována intaarteriálně [35, 76] popsali vzestup TcPO₂ stejně jako naše studie aplikující suspenzi finálního produktu intramuskulárně. Avšak ve studii JUVENTAS nebyl pozorován významný vzestup TcPO₂ po ACT, tento nálezný mohl být ovlivněn jak vyšší vstupní hodnotou TcPO₂ (35±22 mm Hg), tak i malým množstvím aplikovaných buněk [73].

Studie zaměřené na množství buněčných populací se zabývaly širokým spektrem buněk s různými povrchovými znaky. Studie JUVENTAS také hodnotila rozdíl množství bílých krvinek, hematopoetických progenitorů CD34+ a monocytů. Nepopsali signifikantní rozdíl mezi hodnocenými skupinami, obdobně jako tomu bylo v naší studii [73].

V práci Losordo a spol. prokázali snížení vysokých amputací po intramuskulární aplikaci CD34+ buněk v porovnání s kontrolní skupinou [83]. Naše studie využívala také mimo jiné buňky CD34+ obsažené v aplikované suspenzi, přesto nebyla prokázána přímá signifikantní korelace.

Studie zabývající se léčbou pomocí kmenových buněk se liší v aplikaci suspenze, obsahem buněk a jejich zdrojem a také vstupními charakteristikami probandů. To vede k velmi obtížně uchopitelným výsledkům a jejich hodnocení pro další využití pro praxi. Například studie Aboulhoda a spol. se zabývala studiem rozdílu efektu terapie kmenovými buňkami získanými z kostní dřeně oproti buňkám z tukové tkáně a také rozdílností efektu podáním intradermálně a intravenózně. Výsledky této práce popisují významně lepší efekt intradermálně podávaných

buněk a také vyšší terapeutickou účinnost na hojení ran u buněk z tukové tkáně. Tým zkoumal také expresi povrchových znaků, která byla významnější u buněk podávaných intradermálně [80]. Lu a spol. posuzovali ve své studii efekt mesenchymálních a mononukleárních buněk kostní dřeně aplikovaných intramuskulárně u pacientů s CLTI. Po 24 týdnech pozorovali signifikantní zlepšení perfúze v léčené končetině u skupiny léčené mesenchymálními kmenovými buňkami, také popsali významné zlepšení ABI ($p = 0,017$) a TcO₂ ($p = 0,001$) [81]. Lepší efekt mesenchymálních kmenových buněk byl popsán také ve studii Iwase a spol., kteří porovnávali jejich efekt u ischemického modelu potkanů ve srovnání s mononukleárními buňkami kostní dřeně a to na úrovni zlepšení kapilarizace a růstu endoteliálních buněk. Z výsledků tedy vyplývá, že metody terapie kmenovými buňkami jsou velice slibné v terapii ischemie, angiogeneze a revaskularizace, avšak stále nejsou výsledky jasné stran nejvhodnějších buněčných linií pro tuto léčbu.

6.2 Studie 2: Faktory ovlivňující výskyt vysokých amputací u pacientů s diabetickými chronickými defekty po autologní buněčné terapii

U pacientů s ischemií dolních končetin u nichž bylo nutné provést vysokou amputaci je popisováno zvýšené riziko mortality až u 62% postižených. I přes veškerou snahu o zlepšení perfúze tkání dolních končetin metodou ACT je u některých pacientů nutné tento výkon provést. Je tedy nezbytné pátrat po rizikových faktorech, které mohou negativně ovlivnit výsledek ACT a povedou k provedení amputačního výkonu a tím ohrožují probandy dalšími komorbidity.

Ve druhé studii jsme se zaměřili na faktory ovlivňující klinický efekt ACT u pacientů s diabetem a to konkrétně na riziko vysoké amputace po aplikaci.

Cíle druhé studie:

Prvním cílem této studie bylo zhodnotit rizikové faktory vysoké amputace po ACT

Studie dále diskutuje využití poznatků pro predikci výsledku ACT, úpravu medikace a postupu léčby před a po aplikaci ACT a prevenci u doposud zdravých jedinců s DM.

Hypotéza studie 2: Hlavním faktorem ovlivňujícím amputace po ACT bude tíže vstupní ischemie a přítomnost infekce.

Charakteristika souboru

Do této studie bylo zařazeno celkem 113 pacientů po ACT, kteří byli rozděleni do dvou skupin. V první skupině byli zastoupeni pacienti, kteří prodělali vysokou amputací (AMP; $n = 37$) a ve druhé skupině pacienti bez amputace (nAMP; $n = 76$). Pacienti byli sledováni v intervalech 1, 3 a 6 měsíců a po 1 a 2 letech po terapii. Rizikové faktory pro velkou amputaci byly hodnoceny před ACT a zahrnovaly faktory související s pacientem, SDN a buněčným produktem. (Tabulka 3).

	Amputace (AMP) (n = 37)	Bez amputace (nAMP) (n = 76)	p
Pohlaví			
Muž	30 (81%)	64 (84%)	NS
Žena	7 (19%)	12 (16%)	
Věk (roky)	66 ± 13,7	67 ± 10,5	
Cholesterol (mmol/l)	4,0 ± 0,9	4,2 ± 1,1	
LDL cholesterol (mmol/l)	2,3 ± 0,74	2,4 ± 0,98	
Tělesná hmotnost (kg/m ²)	27,8	26,7	
Podvýživa	8 (22%)	15 (20%)	
Diabetes mellitus			
Diabetes typu 1	5 (14%)	19 (25%)	NS
Diabetes typu 2	32 (86%)	57 (75%)	
HbA1c (mmol/mol)	57 ± 16,7	58,7 ± 13,5	
Délka trvání diabetu (roky)	25,6 ± 13,2	24,9 ± 12,1	
CRP (mg/l)	22,7 ± 28	10,7 ± 12	p = 0,024
Komorbidity			
Chronické onemocnění ledvin (CKD)	2,43	2,63	NS
Studie o úpravě diety při onemocnění ledvin (MDRD)	0,74	0,95	
Chronické srdeční selhání	26 (70%)	41 (54%)	
Kouření			
Kuřák	5 (13%)	9 (12%)	NS
Bývalý kuřák	21 (57%)	22 (29%)	
Počet let kouření	23 ± 20	18 ± 18	
Nekuřák	11 (30%)	45 (59%)	
Léčba			
Acetylsalicylová kyselina	22 (59%)	34 (45%)	NS
Clexane	2 (5%)	6 (8%)	
Clopidogrel	5 (14%)	12 (16%)	
Rivaroxaban	0 (0%)	5 (7%)	
Dabigatran	2 (5%)	12 (16%)	
Warfarin	6 (16%)	7 (9%)	
Statiny	25 (68%)	37 (49%)	
Cévní intervence			
Perkutánní transluminální angioplastika (PTA)	35 (95%)/1,62	29 (38%)/1,74	NS
Bypass	3 (35%)/0,59	25 (33%)/0,36	
Kultivace			
Infekce MRSA nebo ESBL	5 (14%)	7 (9%)	NS
Jiná infekce rezistentní na ATB	6 (16%)	23 (30%)	

Osteomyelitida	6 (16%)	23 (30%)	
Osteomyelitida na RTG	11 (29%)	33 (43,4%)	
Pozitivní test na kost (PTB)	6 (16%)	17 (22%)	

Tabulka 3: Základní charakteristiky pacientů.

Schéma studie a metody

Ve studii byli hodnoceni pacienti léčení ACT v našem podiatrickém centru v průběhu 13 let. ACT byla prováděna metodami již zmíněnými v předchozí studii, buněčná suspenze byla získána z kostní dřevě z ilického hřebene pomocí Jamshidi jehly pod lokální nebo celkovou anestezii. Oddělení mononukleární frakce bylo provedeno buď pomocí Harvest Smart PReP2 (Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA), nebo pomocí sukcinyl želtiny (Gelofusine; B. Braun, Melsungen, Německo). Finální suspenze o objemu 40-60 ml byla injikována intramuskulárně do ischemické dolní končetiny.

Všichni pacienti byli pravidelně sledováni nejprve po 2 týdnech a následně každý měsíc, kdy v průběhu kontrol byl hodnocen stav rány a ischemie pomocí měření TcPO₂, defekty byly odborně ošetřeny (roztoky na bázi jódu pro gangrénu nebo obvazy pro chronické nehojící se vředy); v některých případech byla použita k léčbě hlubokých ran i podtlaková terapie.

Před zahájením terapie byla hodnocena vstupní data. Mezi faktory související s pacientem jsme hodnotili věk pacienta, index tělesné hmotnosti, anamnézu kouření, délku trvání diabetu, kontrolu diabetu, laboratorní výsledky (CRP, počet leukocytů, renální funkce, sérové lipidy, koagulační parametry – hladiny proteinů S, C, fibrinogenu a homocysteinu), a trombofilní mutace (mutace faktoru V Leiden, mutace prothrombinu, MTHFR C677T a A1298C). U faktorů souvisejících s defektem dolní končetiny jsme se zaměřili na velikost a hloubka vředu, přítomnost infekce, edém, perfúzi končetiny, přítomnost ischemie a gangrény, a hodnotu. Nález CLTI byl hodnocen pomocí angiografie, ultrazvuku, výpočetní tomografií nebo magnetickou rezonancí dolní končetiny a také pomocí TcPO₂ nižšího než 30 mm Hg (měřeno přístrojem Radiometer TCM400, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dánsko). Pacienti s CLTI a DFU byli zařazeni k terapii ACT po konzultaci s intervenčními radiology, cévními chirurgy a podiatry po podepsání informovaného souhlasu. Všechny faktory, které by mohly potenciálně zvýšit riziko amputace, byly hodnoceny na začátku studie a před ACT. Vředy na nohou byly klasifikovány podle WIfI skóre, které hodnotí velikost rány, přítomnost infekce a/nebo ischemie, a podle dalších klasifikačních systémů zaměřených na vředy, ischemii a infekce (PEDIS, TEXAS a Wagner; Tabulka 5). Přítomnost lokálního zánětu byla potvrzena, pokud byla přítomna jakákoliv z následujících problematik: hnisavý výtok, erytém, bolestivost, proteplení nebo ztvrdnutí na kůži a tkáních nohy.

	Amputace (AMP) (n = 37)	Bez amputace (nAMP) (n=76)	p
Prothrombofilní faktory			
MTHFR A1298C	22 (61%)	29 (38%)	NS
Homocystein (μmol/l)	12,07	16,51	
MTHFR C677T	13 (35%)	31 (41%)	
Homocystein (μmol/l)	12,8	15,4	
Protein C (%)	105,9 ± 29,1	104 ± 29,6	
Protein S (%)	90,7 ± 31,8	98,8 ± 34,3	
Buněčný produkt			
Viabilita (%)	96,2	93,9	NS
Celkový počet CD34+ v produktu (*10 ⁶)	12,6	13,9	
Celkové leukocyty v produktu (*10 ⁹)	2,6	2,2	

Tabulka 4: Protrombofilní mutace u pacientů a hodnocení buněčného produktu

	AMP				nAMP			
	Vstup (n=37)	1 M (n=35)	3 M (n=29)	6 M (n=14)	Vstup (n=76)	1 M (n=76)	3 M (n=72)	6 M (n=71)
Wagner (průměr)	3,43	3,40	3,14	2,93	2,87	2,79	1,78	1,06
Wagner 3 (%)	6 (16%)	8 (23%)	8 (28%)	3 (21%)	7 (9%)	9 (38%)	5 (7%)	4 (6%)
Wagner 4 (%)	24 (65%)	21 (60%)	11 (38%)	4 (29%)	33 (43%)	30 (12%)	12 (17%)	4 (6%)
Infekce PEDIS	1,54	1,91	2,07	2,00	0,68	0,58	0,22	0,08
Wifl (průměr)								
Defekt	1,81	1,91	2,00	1,93	1,93	1,84	1,74	0,86
Ischemie rány	2,95	2,49	2,31	1,93	2,97	2,20	1,74	1,48
Infekce nohy	0,57	0,91	1,07	1,00	0,64	0,47	0,19	0,07
TEXAS (%)								
TEXAS B pouze infekce	0 (0%)	1 (3%)	5 (17%)	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3%)	2 (3%)
TEXAS C pouze ischemie	28 (76%)	14 (40%)	3 (10%)	4 (29%)	49 (64%)	33 (43%)	26 (35%)	20 (28%)
TEXAS D infekce a ischemie	9 (24%)	17 (49%)	16 (55%)	5 (36%)	27 (36%)	27 (36%)	4 (6%)	1 (1%)

Tabulka 5: Hodnocení nálezu na dolních končetinách klasifikačními systémy

Výsledky studie

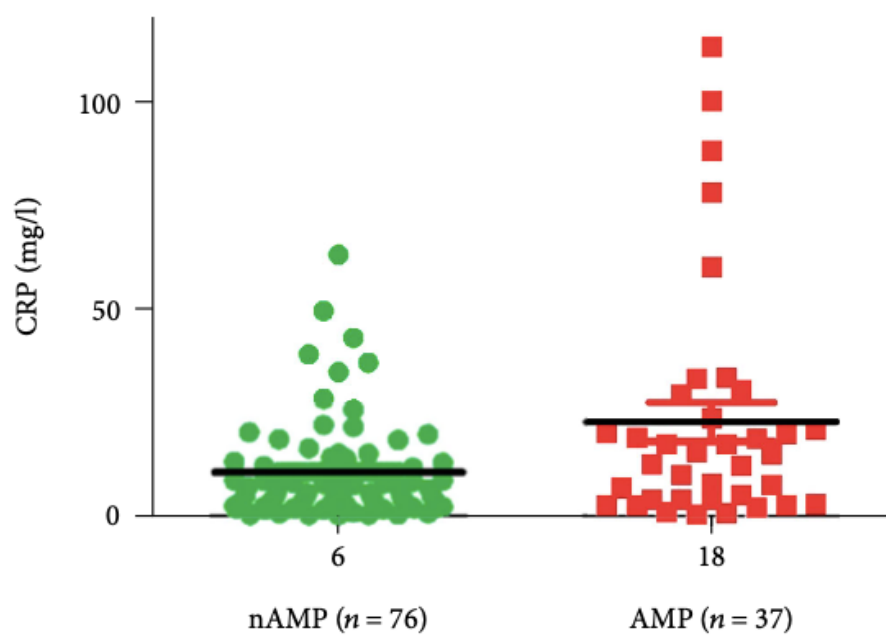
Z výsledků studie vyplývá, že u skupiny AMP byla pozorována výrazně vyšší hladina CRP ve srovnání se skupinou nAMP (22,7 vs. 10,7 mg/L, $p = 0,024$). V postupné logistické regresi byly nezávislými prediktory pro velkou amputaci mutace genu pro MTHFR s heterozygotními a homozygotními polymorfismy 1298 (OR 4,33 [95% CI 1,05-17,6]), kouření (OR 3,83 [95% CI 1,18-12,5]) a CRP > 10 mg/L (OR 2,76 [95% CI 0,93-8,21]). U pacientů ve skupině AMP byly pozorovány nižší hodnoty TcPO₂ ve srovnání se skupinou nAMP za 1 měsíc (24,5 vs. 33,2, $p = 0,012$) a za 3 měsíce (31,1 vs. 40,9, $p = 0,009$) po ACT.

Diskuze ke studii

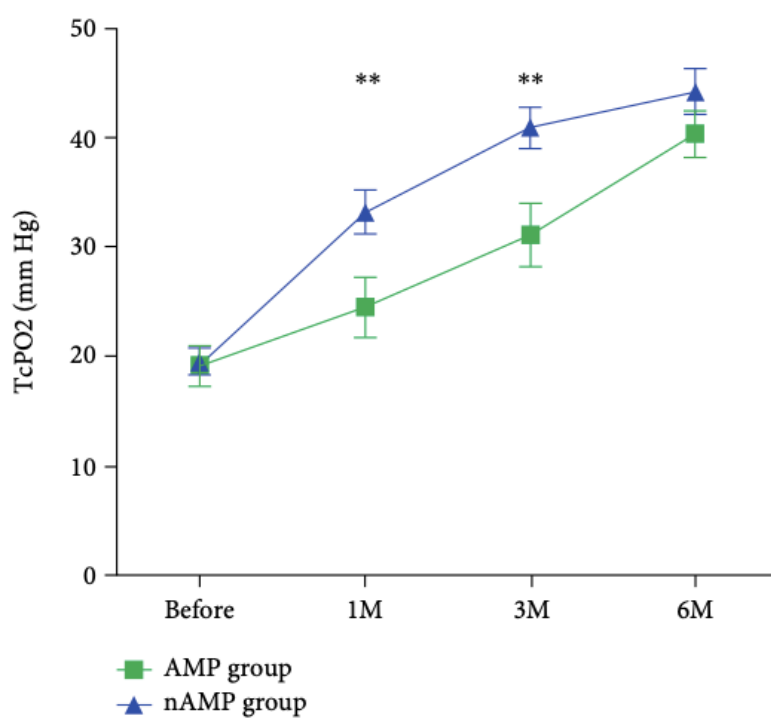
Naše studie ukázala, že riziko vysoké amputace po ACT u pacientů s CLTI a DFU je zvýšeno přítomností mutací genu MTHFR A1928C v heterozygotní a homozygotní formě, kouřením a vyššími hladinami CRP před zahájením terapie. Výsledky potvrzuje také nález studie Arruda a spol., kteří ve své práci porovnávali rizika arteriální postižení a venózní trombózou, kdy nosiči homozygotní formy mutace MTHFR vykazovali hyperhomocysteinémii, arteriálního a venózního postižení (19%). Sledovaní probandi však byli bez nálezu hyperlipoproteinémie, hypertenze, diabetu mellitu či jiných protrombofilních mutací [84]. Další studie týmu Ames a spol. zkoumala rizika u jednotlivých mutací genu pro MTHFR. V této studii výsledky

poukázaly na spojitost konkrétně mutace genu MTHFR T677T oproti MTHFT TC a CC a zvýšení rizika periferní arteriální trombózy s dalšími faktory, jako je hyperhomocysteinémie, kouření, věk, dyslipidémie a další. U MTHFR TT sledovali vyšší hladiny homocysteinu v porovnání s ostatními skupinami (25 ± 19 vs $12,7 \pm 6,7$ vs $11,3 \pm 3,3$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$), Z kategoriálních proměnných MTHFR TT a dyslipidémie nezávisle predikovaly věk při arteriální trombóze ($p = 0,01$, resp. $p = 0,03$), také popsali, že dyslipidémie a homocysteinémie (HC) v plazmě přispívají k časnější arteriální trombóze, zatímco souhra mezi zvýšenou HC a kouřením může ovlivnit typ okluze arteriální oblasti [85].

Metaanalýza skupiny Liu a spol. se také zabývala rizikovými faktory amputací dolní končetiny pacientů s defektem končetiny. Výsledky ukázaly jako významné negativní faktory mužské pohlaví (RR = 1.09; 95% CI, 1.04, 1.14), kouření v anamnéze (RR = 1.17; 95% CI, 1.08, 1.26), vysoké BMI (RR = -0.27; 95% CI, -0.37, -0.17), hypertenzi (RR = 1.09; 95% CI, 1.04, 1.14), kardiovaskulární onemocnění (RR = 1.30; 95% CI, 1.18, 1.43), onemocnění ledvin (RR = 1.29; 95% CI, 1.03, 1.60), počet bílých krvinek (mean differences (MD) = 0.49; 95% CI, 0.14, 0.85), hladinu hemoglobinu (MD = -0.54; 95% CI, -0.9, -0.09) a albuminu (MD = -0.54; 95% CI, -0.72, -0.18) [86]. Tyto výsledky se shodují s naším nálezem u skupiny kuřáků, pacientů s infektem v podobě vyšších hodnot CRP, což koreluje také s vyšší hladinou bílých krvinek. Ve studii Kurniawati a spol. vyhodnotili jako signifikantní risk-faktor CRP hladinu vyšší než 5 mg/l. V této studii porovnávali jako ukazatel ischemie ABI, kdy hodnoty nižší než 0,8 vykazovaly významné riziko amputace dolní končetiny [87]. Naše studie hodnotí ischemii pomocí TcPO₂ (která měří na rozdíl od ABI mikrocirkulaci), kdy jsme se zaměřili na sledování rizika vysoké amputace v porovnání s vývojem hodnoty po aplikaci ACT. Ze studií, jako je práce Salaun a spol. z COPART registru, ve které popisují významné riziko vysoké amputace u lidí léčených chirurgicky i medikamentózně s TcPO₂ pod 30 mm Hg (OR = 3.5 [1.7-7.1]) a (OR 5 [2-12.4]) [88]. Také metaanalýza Sun a spol. posuzovala vzestup TcPO₂ po ACT oproti kontrolní skupině (MD = 4.23 (1.82, 6.65) [75]. Tyto poznatky potvrzují nález naší studie s vyšším počtem amputací ve skupině AMP oproti nAMP, u které došlo k výraznějšímu vzestupu TcO₂ za 1. měsíc po ACT (24,5 vs. 33,2, $p = 0,012$) a za 3 měsíce (31,1 vs. 40,9, $p = 0,009$) po terapii (Obrázek 8).



Obrázek 7: Vstupní hodnoty CRP před ACT. ** představuje významný rozdíl mezi skupinami AMP a nAMP za 1 měsíc a 3 měsíce.



Obrázek 8: TcPO₂ do 6 měsíců po ACT.

6.3 Studie 3: Vliv imunosupresivních látek na funkční vlastnosti kmenových buněk

Pacienti s diabetem a rozvinutými komplikacemi často vyžadují transplantační léčbu a to především transplantaci ledvin, pankreatu a Langerhansových ostrůvků. Imunosupresivní terapie je při této léčbě nezbytnou součástí. Avšak i u těchto pacientů pozorujeme výskyt defektů dolních končetin a nález CLTI, kdy nález vyžaduje také ACT. Z poměrně malého počtu prací však víme, že imunosuprese má negativní vliv na buněčné vlastnosti kmenových buněk. Z toho důvodu jsme se v této práci zaměřili na zkoumání vlivu na BMMNC, růstových faktorů a cytokinů, které jsou nezbytné k terapeutické revaskularizaci tkání.

Cíle **třetí** studie:

Cílem bylo posoudit vliv imunosupresiv (IS) na jednotlivé subpopulace kmenových buněk používaných při ACT.

Dalším cílem bylo posoudit vliv různých koncentrací imunosupresivních léčiv na kmenové buňky a aplikace výsledků do klinické praxe.

Hypotéza studie 3: Sirolimus bude mít největší negativní dopad na růst a proliferaci kmenových buněk, vyšší koncentrace imunosupresiv budou výrazněji toxičtější.

Charakteristika souboru

Pro účely této studie bylo využito vzorků kostní dřevě od šesti pacientů s diabetem ve věku 50-84 let. Tito pacienti byli léčeni pomocí ACT pro nález CLTI a TcPO₂ pod 30 mm Hg. Vzorky dřevě poskytli podepsáním informovaného souhlasu. Dále byly již laboratorně testovány jednotlivé subpopulace kmenových buněk ze vzorku. Cílem studie bylo posoudit negativní vliv imunosupresivní terapie na životaschopnost a buněčné vlastnosti kmenových buněk. Mezi IS zkoumaná v této práci jsme zařadili nejčastěji využívaná léčiva tacrolimus, sirolimu a mykofenolát mofetil.

Schéma studie a metody

U suspenze byly nejprve kultivovány kmenové buňky a následně byla prováděna série laboratorních testů, které jsou již popsány v kapitole 4.4.1. Kmenové buňky byly po pasážování charakterizovány pomocí průtokové cytometrie. Analýza exprese markerů buněčného povrchu byla provedena na populaci jednotlivých živých buněk.

Buňky charakterizované jako CD45⁻CD90⁺CD73⁺ a CD105⁺ byly považovány za MSC; CD45⁺ CD146⁻ jsme stanovili jako MAC; a CD45⁻ a-CD146⁺ byly definovány jako ECFC. Obrázek 4 - 1A znázorňuje strategii gatování adherentních a neadherentních BMMNC.

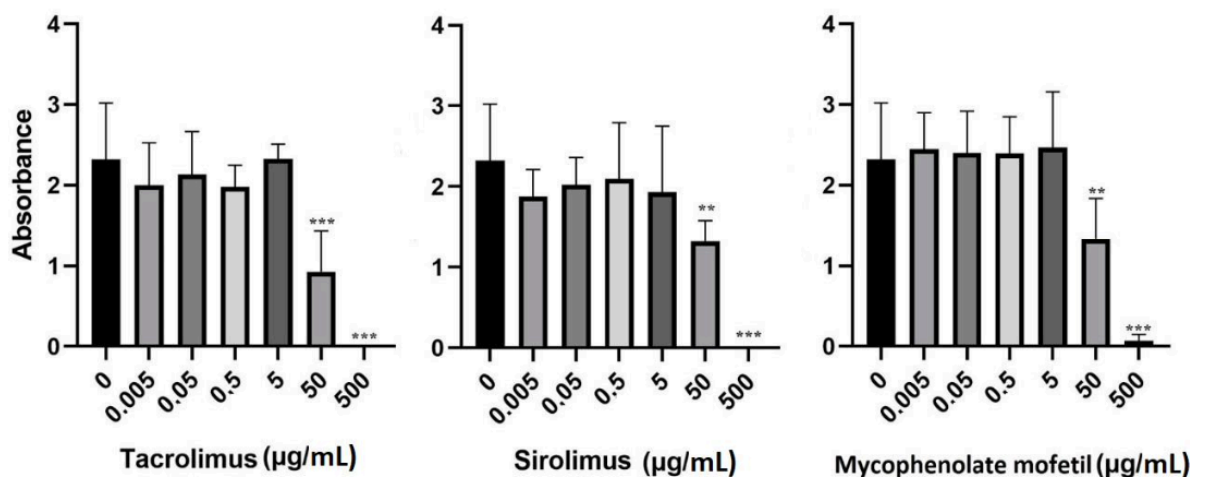
Pro stanovení účinků IS na metabolickou aktivitu byly kmenové buňky kultivovány v přítomnosti jednotlivých IS v různých koncentracích po dobu 48 hodin a metabolická aktivita buněk byla stanovena pomocí testu WST-1.

Výsledky studie

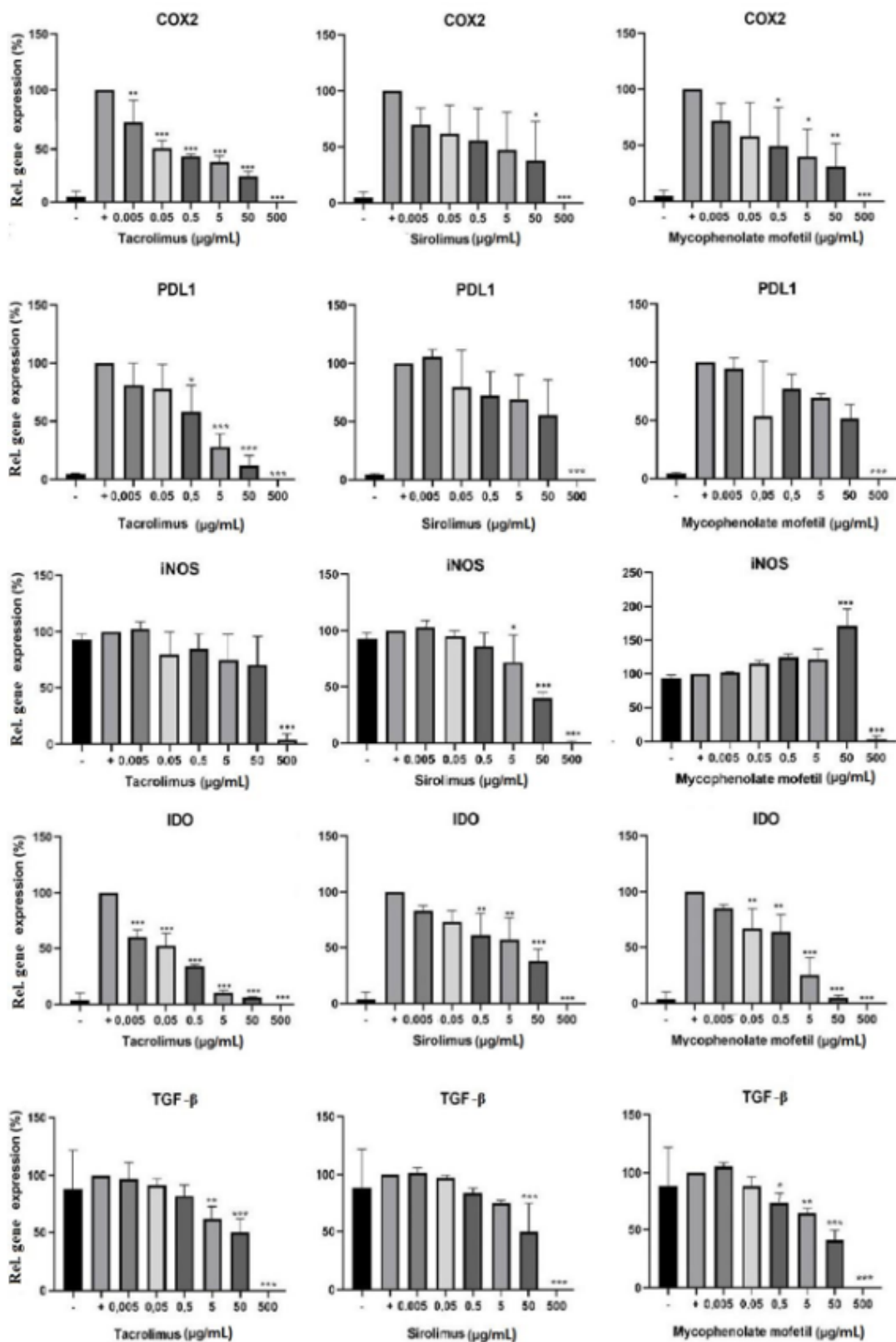
Z charakterizace kmenových buněk jsme odlišili MAC buňky, které tvořily přibližně 23 % buněk CD45+, ECFC+ představovaly 1,3 % buněk z CD45– a MSC představovaly přibližně více než 90 % CD45– (Obrázek 4 -1B).

Účinky IS na metabolickou aktivitu znázorňuje Obrázek 9 pomocí testu WST-1. Výsledky prokázaly negativní efekt všech použitých IS, které významně snížily metabolickou aktivitu buněk v koncentracích 50 µg/ml a vyšších (Obrázek 9).

Dále byl sledován vliv IS na expresi genů imunoregulačních molekul. Buňky byly kultivovány nestimulované, stimulované IFN- γ a TNF- α nebo stimulované cytokiny v přítomnosti sirolimu, tacrolimu nebo mykofenolát mofetilu v koncentracích 0,005–500 µg/ml. Po 48 hodinách kultivace byly kmenové buňky sklizeny a poté umístěny do TRI činidla a exprese genů pro COX2, IDO, PD-L1, TGF- β a iNOS byla stanovena pomocí RT-PCR. Léky IS pozměnily expresi genů imunoregulačních molekul. Tacrolimus inhiboval expresi genů pro COX2, IDO, PD-L1, TGF- β a iNOS způsobem závislým na dávce. Sirolimus měl nejvýznamnější inhibiční účinek na expresi genů pro iNOS. Naopak metabolická aktivita iNOS vzrostla u mykofenolát mofetilu (Obrázek 10).



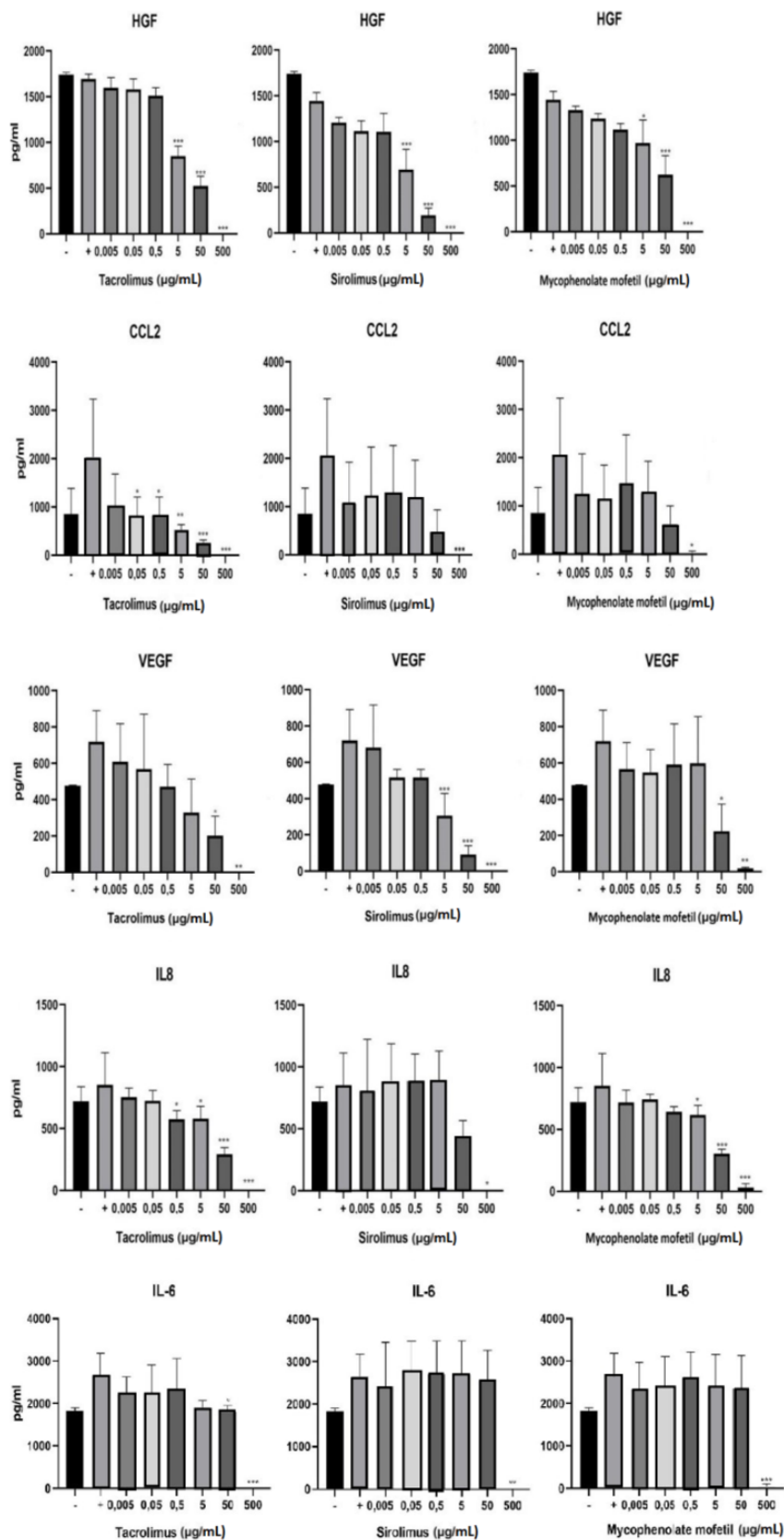
Obrázek 9: Efekt IS na metabolickou aktivitu kmenových buněk testem WST-1. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



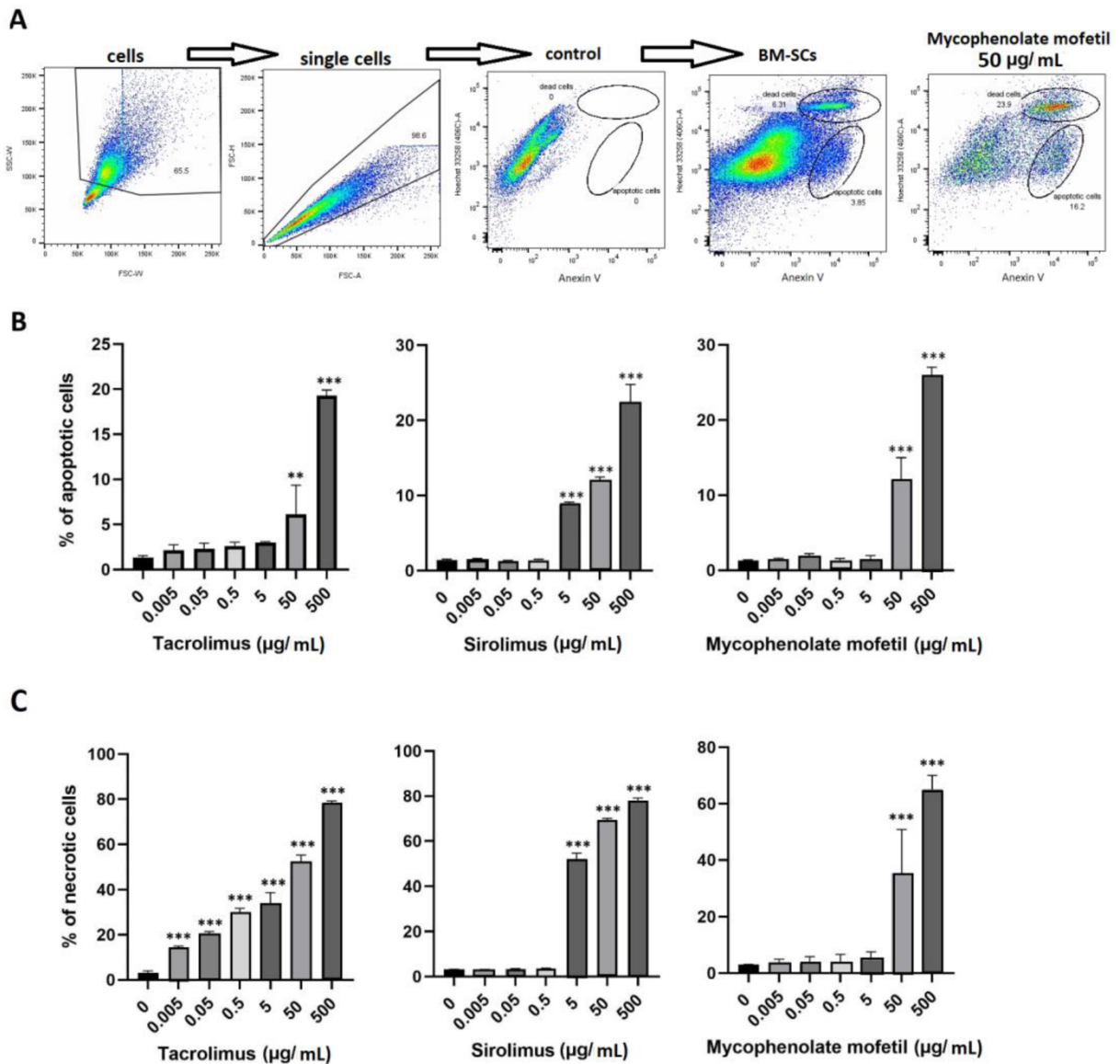
Obrázek 10: Účinek IS léků na exprese genů imunoregulačních molekul v BMMNC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Vliv IS na produkci cytokinů a růstových faktorů byl sledován u BMMNC, které byly kultivovány nestimulované, stimulované pomocí IFN- γ a TNF- α a stimulované cytokiny v přítomnosti různých koncentrací léčiv IS. Produkce cytokinů HGF, VEGF, CCL2, IL-8 a IL-6 byla stanovena pomocí ELISA po 48 hodinách kultivace. IS významně snížily produkci všech těchto cytokinů a růstových faktorů. Produkce HGF byla významně inhibována v přítomnosti sirolimu, mykofenolát mofetilu a tacrolimu v koncentracích 5 $\mu\text{g/ml}$ a vyšších. Ukázalo se, že tacrolimus je nejúčinnějším inhibítozem produkce CCL2, IL-8 a IL-6. Sirolimus způsobil nejvýraznější pokles produkce VEGF (Obrázek 11).

IS snižovaly metabolickou aktivitu a další funkční vlastnosti a na buněčnou smrt kmenových buněk. Stanovili jsme procento apoptotických a mrtvých buněk v přítomnosti tacrolimu, sirolimu a mykofenolát mofetilu. Strategie gatování buněk je znázorněna na Obrázku 11. Apoptóza a počet mrtvých kmenových buněk vzrostly po expozici IS (obrázek 12B a C). Sirolimus měl nejvyšší negativní efekt na apoptózu buněk (obrázek 12B), zatímco tacrolimus nejvíce působil na buněčnou smrt (obrázek 12C).



Obrázek 11: Vliv IS tacrolimu, sirolimu a mykofenolát mofetilu na produkci cytokinů a růstových faktorů kmenových buněk pomocí ELISA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Obrázek 12: Vliv IS na apoptózu (B) a buněčnou smrt (C) kmenových buněk.
 ** $p < 0,01$; *** $p < 0,00$.

Diskuze ke studii

V klinické praxi je využíváno IS tacrolimu po transplantaci ledviny, srdce a jater v dávkách 0,15–0,3, 0,05–0,075 a 0,10–0,2 mg/kg/den, kdy v krvi byly pozorovány koncentrace tacrolimu 10–15 ng/ml při dávkování 0,15–0,2 mg/kg/den. Ve studii Ha a spol. sledovali efekt tacrolimu na MSC gingivy. V této práci nevedl tacrolimus v testovaných koncentracích v rozmezí 0,001 - 10 µg/ml k rozdílům ve životaschopnosti MSC. Pozorovali rozdílnou morfologii buněk při koncentraci 100 µg/ml. Výsledky také ukázaly sníženou proliferaci buněk v koncentracích 10 a 100 µg/ml a buněčný růst byl snížen v přítomnosti tacrolimu v koncentraci 100 µg/ml ($p < 0,05$) [89]. Z našich výsledků vyplývá, že již koncentrace 0,5 µg/ml zvyšovala apoptotické účinky a k apoptóze došlo signifikantně u koncentrace 50 µg/ml a vyšší (tacrolimus $p = 0,003$, sirolimus $p = 0,027$ a mykofenolát mofetil $p = 0,006$).

V práci týmu DeTemple a spol. hodnotili účinky mTOR inhibitorů sirolimu a everolimu na proliferaci, sekreci cytokinů a diferenciaci keratinocytů. Ukazují, že inhibitory mTOR blokují proliferaci keratinocytů a mění produkci cytokinů a cytokeratinu, zejména inhibice mTOR vede k upregulaci IL-6 a downregulaci CK10 [90]. Naše výsledky poukazovaly výrazněji na účinek tacrolimu na IL-6, významné účinky sirolimu jsme pozorovali pouze od koncentrací vyšších než 500 µg/ml. V práci Greenberger a spol. sledovali změny vaskulogenního potenciálu kmenových buněk odvozených od hemangiomu vlivem mTOR rapamycinu, everolimu a temsirolimu. Z výsledků popisují významný efekt na ECFC a CD31+ buňky a sníženou vaskulogenezi buněk při dávce 0,5 mg/kg. Rapamycin (sirolimus) vykazoval významné snížení proliferace až u 55% hemangiomových kmenových buněk a to již při koncentraci 20 ng/ml. Také popisují negativní účinek rapamycinu na růst endotelových prekurzorových buněk blokováním účinku VEGF a PDGF-1 [91]. Tento nálezný koreluje s našimi výsledky týkající se VEGF nejen u sirolimu, ostatní IS měla tento efekt až při vysokých koncentracích.

Skupina Ren a spol. se zaměřila na vliv tacrolimu na TGF-β u alveolárních epiteliálních buňkách, kdy popsali inhibici buněk při 5 µmol/l tacrolimu ($26,56 \pm 4,49$ %). Hladiny exprese TGF-β1, Human Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 (SMAD3) a tkáňový růstový faktor (CTGF), stejně jako jejich koncentrace v kultivačním supernatantu, byly významně downregulovány ve skupině s tacrolimem ve srovnání se skupinou s paraquatem. Celkově tacrolimus ovlivňoval negativně signální dráhu TGF-β1 a tím bránil rozvoji plicní fibrózy v alveolárních epiteliálních buňkách [92]. Z naší práce vyplývá, že regulace buněčného růstu, diferenciaci, produkce extracelulární matrix a migrace buněk byly ovlivněny prostřednictvím TGF-β vlivem všech tří IS a to od koncentrací vyšších 50 µg/ml a v případě mykofenolát mofetilu již u koncentrací 0,5 µg/ml.

6.4 Studie 4: Posouzení vlivu autologní buněčné terapie a standardní léčby na oxygenaci tkání a syndrom diabetické nohy

V rámci podiatrické problematiky je u pacientů s CLTI zavedena standardní péče o dolní končetinu, která však v mnohých případech není dostačující při nálezu těžké ischemie. Volba buněčné terapie při tomto nálezu je však stále velmi diskutovaná a komplikovaně zvažovaná. Je tedy nezbytné jasně potvrdit pozitivní efekt ACT a její přínos pro tuto skupinu pacientů. Hlavním cílem této práce tedy bylo nalezení rozdílu mezi ACT a standardní léčbou (tedy v případě NO-CLTI konzervativní léčbou) a potvrzení přínosu buněčné terapie na zlepšení oxygenace tkáně, její hojení a vnímání bolesti pacientem.

Ve **čtvrté** studii jsme se zaměřili na posouzení efektu ACT oproti standardní revaskularizační terapii.

Cíle čtvrté studie:

Ve studii byl posuzován efekt ACT oproti konzervativní terapii pomocí změn TcPO₂, změn vnímání bolesti a hojení defektu.

Cílem bylo také zhodnotit vliv terapeutických metod na výskyt vysokých amputací.

Hypotéza studie 4: ACT bude významně účinnější na parametry ischemie v porovnání se standardní konzervativní léčbou u NO-CLTI.

Charakteristika souboru

V této práci jsme se zabývali posouzením výsledků mezi účinností standardní léčbě (ST) a autologní buněčné terapie (ACT). Do randomizované studie bylo zařazeno celkem 40 pacientů s diabetem mellitem a NO-CLTI a rozdělení do skupiny ACT (n=21) nebo ST (n=19). Pacienti ve skupině ST byli dále po 12 týdnech v případě nezlepšení nálezu léčeni pomocí ACT. Vstupně byly u probandů hodnoceny základní charakteristiky a také posouzen nález na léčené dolní končetině pomocí klasifikačních systémů a z podiatrického hlediska (Tabulka 6). Dále byly hodnoceny vstupní a kontrolní hodnoty TcPO₂ a počtu vyléčených pacientů po 12 týdnech. Bolest byla hodnocena pomocí Visual Analogue Scale (VAS). V obou skupinách byly hodnoceny četnosti amputací a přežití bez amputace (AFS).

Parameter	ACT (n=21)	ST (n=19)	p value
Věk (roky)	69,9 ± 9,7	66,2 ± 10,1	0,25
Ženské pohlaví	2 (9,5)	2 (10,5)	1,00
Trvání diabetu [roky]	22,0 ± 7,8	22,6 ± 9,2	0,71
HbA1c [mmol/mol]	59,9 ± 13,3	58,4 ± 16,7	0,68
Koronární srdeční onemocnění	15 (71,4)	14 (73,7)	1,00
Hemodialýza	3 (14,3)	5 (26,3)	0,44
Imunosupresivní terapie	4 (19,0)	4 (21,1)	1,00
Diabetická neuropatie	20 (95,2)	18 (94,7)	1,00
Hypertenze	20 (95,2)	18 (94,7)	1,00
Faktory související s končetinami			
TcPO ₂ [mmHg]	18,7 ± 9,9	21,1 ± 11,4	0,42
Doba trvání vředu/gangrény [měsíce]	8,0 ± 4,2	9,4 ± 4,7	0,32
Rezistentní mikrobi	4 (19,0)	4 (21,1)	1,00
Osteomyelitida	6 (28,6)	6 (31,6)	1,00
CRP [mg/l]	8,9 (10,1)	20,4 ± 21,1	0,058
Klasifikace dle Rutherforda			
4	2 (9,5)	1 (5,3)	1,00
5	19 (91,5)	17 (89,4)	1,00
6	0 (0)	1 (5,3)	0,48
Klasifikace Graziani			
4	4 (19)	1 (5,3)	0,35
5	10 (47,6)	12 (63,2)	0,36
6	6 (28,6)	6 (31,6)	1,00
7	1 (4,8)	0 (0,0)	1,00
Wifl – Klinický nález			0,35
3	6 (28,6)	3 (15,8)	
4	15 (71,4)	16 (84,2)	
Wifl – Defekt			0,81
1	4 (19,0)	3 (15,8)	
2	15 (71,4)	14 (73,7)	
3	2 (9,5)	2 (10,5)	
Wifl – Ischemie			1,00
3	21 (100,0)	19 (100,0)	
Wifl – Infekce			0,24
0	11 (52,4)	7 (36,8)	
1	9 (42,9)	9 (47,4)	
2	1 (4,8)	3 (15,8)	

Tabulka 6: Charakteristika pacientů a nálezu na dolních končetinách.

Schéma studie a metody

Práce byla zaměřena na skupinu NO-CLTI s nehojícími se defekty nebo gangrénou s objektivně prokázanou arteriální okluzí a $TcPO_2 < 35$ mm Hg léčení v našem podiatrickém centru v letech 2016 až 2019. Všichni pacienti splňující kritéria pro zařazení byli diskutováni na setkání multidisciplinárního týmu, kde specialisté na péči o nohy (diabetolog, intervenční radiolog, cévní chirurg a všeobecný chirurg) rozhodli, zda pacient s CLTI není kandidátem na revascularizaci (CLTI „no-option“) a může být zařazen do studie. Po informovaném souhlasu byl pacient vyšetřen a podstoupil vyšetření: $TcPO_2$, periferní angiogram, krevní testy (krevní obraz, CRP, kreatinin), standardní onkologický screening (nádorové markery, krev ve stolici a gynekologické vyšetření a mamograf u žen), zhodnocení stavu nohy a vyšetření očního fundu. Když předscreeningová vyšetření neodhalila žádnou kontraindikaci, byla provedena všechna další plánovaná vyšetření před zařazením do studie: elektrokardiogram, RTG hrudníku a nohy, ultrazvuk břicha, testy na poruchy koagulace, renální a jaterní testy, volitelný duplexní ultrazvuk dolní končetiny (se zaměřením na infrapopliteální tepny) a hematologické vyšetření.

Po vyšetření následovala dvoutýdenní doba sledování a při nálezů $TcPO_2$ na konci tohoto období pod 35 mm Hg, byl pacient randomizován k léčbě ACT v kombinaci se standardní péčí, nebo pouze ke standardní péči. Standardní terapie pacientů s CLTI bez možnosti volby sestávala z medikace (obvykle antiagregační nebo antikoagulační léčba, analgetická léčba), zvládání infekce, odlehčení a lokální léčby diabetické nohy.

Čtyřicet pacientů bylo náhodně rozděleno pomocí počítačové blokové randomizace s proměnlivou velikostí bloků do dvou léčebných skupin; 21 pacientů bylo přiřazeno k ACT a 19 k ST.

Účinek ACT byl srovnáván s ST po 12 týdnech a pacienti původně dostávající standardní léčbu byli následně léčení ACT.

Buněčná suspenze byla připravena standardní procedurou výroby Advanced Therapy Medicinal Product v souladu s pokyny Evropské lékové agentury a Státního ústavu pro kontrolu léčiv. Odběr a aplikace ACT byl proveden metodou Harvest, jak je popsáno v kapitole 4.1.3.

Účastníci byli sledováni v podiatrické ambulanci ve 2., 4. a 12. týdnu s hodnocením $TcPO_2$, vyplněním dotazníku na subjektivním vnímáním pocitu bolesti a kvalitu života. U dolní končetiny bylo posuzováno hojení ran, četnost amputací a nežádoucí příhody.

Hojení rány (definované jako kompletní reepitelizace rány po dobu minimálně 4 týdnů) a změna celkové velikosti rány.

Kvalita života byla hodnocena dvěma standardizovanými dotazníky, dimenze EuroQoL-5 (EQ-5D) a Short-form (36) Health Survey (SF-36), a speciálním dotazníkem zaměřeným na bolest pomocí Visual Analogue Scale (VAS, škála 1-10).

Výsledky studie

Mezi studijními skupinami nebyl žádný rozdíl ve výchozích charakteristikách zahrnujících věk, pohlaví, kontrolu a trvání diabetu, léčbu a přítomnost komorbidit, stejně jako parametry nohy a ischemie (Tabulka 6). Během prvních 12 týdnů se $TcPO_2$ zvýšilo ve skupině ACT z $20,8 \pm 9,6$ na $41,9 \pm 18,3$ mm Hg ($p=0,005$), zatímco ve skupině ST nedošlo k žádné změně (z $21,2 \pm 11,4$ na $23,9 \pm 13,5$ mm Hg). Rozdíl v $TcPO_2$ ve skupině ACT oproti skupině ST byl 21,1 mm Hg ($p=0,034$) po 12 týdnech. V období od 12. do 24. týdne, kdy ST skupina dostávala ACT, se $TcPO_2$ v této skupině zvýšilo z $20,1 \pm 13,9$ na $41,9 \pm 14,8$ ($p=0,005$), přičemž v ACT

se v tomto období významně neměnilo. Ve 24. týdnu nebyl mezi těmito dvěma skupinami žádný významný rozdíl v průměrném TcPO₂ (Tabulka 7).

Pozorovali jsme významný rozdíl v počtu zhojených defektů mezi skupinami ACT a ST u pacientů, kteří nepodstoupili amputaci ve 12. týdnu (5/16 [31,3 %] vs. 0/13 [0 %], p= 0,048, Fisherův exaktní test). Plocha rány se významně zmenšila ve skupině ACT (z 36,3 ± 14,4 na 24,2 ± 8,3 mm²) ve srovnání se skupinou ST (31,9 ± 15,6 až 31,1 ± 12,7 mm²) po 12 týdnech (míra zmenšení plochy byla 12,1 mm ± 2 ± 0,2 vs. 0,001). Mezi těmito dvěma skupinami nebyl ve 12. týdnu žádný rozdíl v malých a velkých amputacích nebo času bez amputace.

Frekvence vysokých amputací (4/20 vs. 4/17) a AFS (16/20 vs. 13/17) se po 12 týdnech mezi skupinami ACT a ST významně nelišila. AFS byla počítána pomocí Kaplan-Meierovy metody bez signifikantního rozdílu (p = 0,74). Hlavní indikací pro vysokou amputaci ve skupině ACT byla progresse infekce (3/4 [75 %]); a ve skupině ST to byla progresse ischemie (3/4 [75 %]) (Obrázek 12).

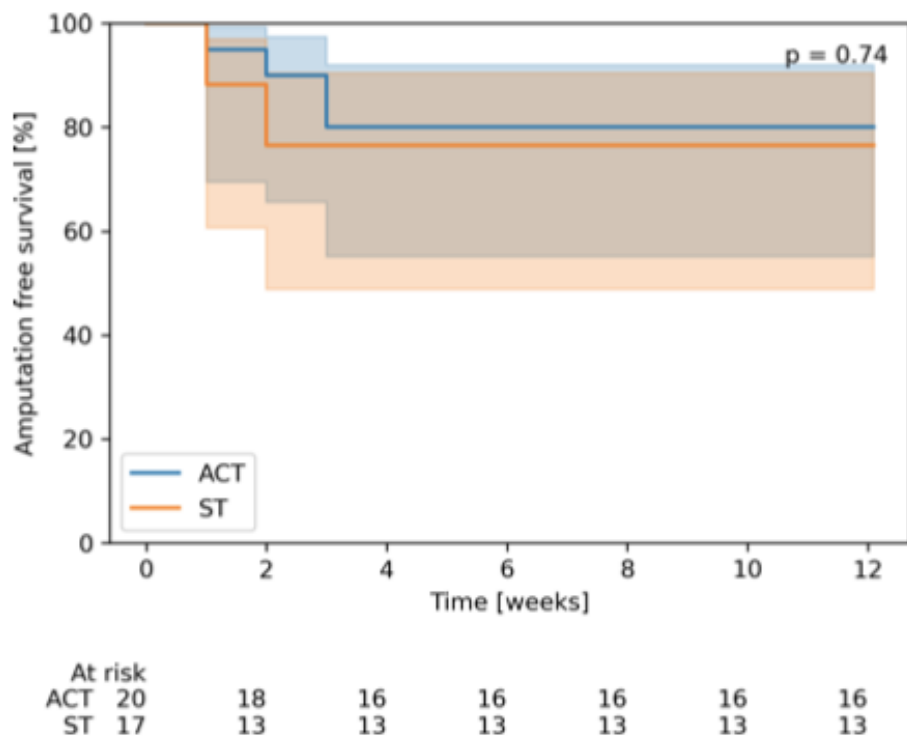
U pacientů původně léčených ACT došlo během prvních 12 týdnů k významnému snížení bolesti měřené pomocí VAS (z 5,5±2,5 na 2,3±2,1, p = 0,002). U pacientů ve skupině ST však došlo k významnému zvýšení bolesti (z 5,0±2,2 na 5,9±1,7, p = 0,003).

Došlo k významnému zvýšení kvality života 12 týdnů po ACT na EQ-5D ve srovnání s výchozí hodnotou EQ-5D (z 48,0 ± 12,0 na 69,6 ± 13,2 %, p < 0,001). Změna kvality života ve skupině ST nebyla významná (z 47,1 ± 10,2 na 41,8 ± 9,6 %). Pomocí SF-36 skupina ACT popsala svůj zdravotní stav jako „velmi špatný“ u 90,5 % na začátku a pouze u 15 % po 12 týdnech (p < 0,001). Ve skupině ST se 100 % pacientů cítilo jako na začátku studie, tak po 12 týdnech.

Nežádoucí účinky po ACT byly zaznamenány u malého počtu účastníků: krvácení po trepanaci kostní dřeně u 1 pacienta (5 %) a dočasné zhoršení otoku končetiny po injekci buněčné suspenze u 1 účastníka (5 %).

Týden	Nejprve standardní terapie (ST)		Nejprve autologní buněčná terapie (ACT)	
	n	průměr ± sd	n	průměr ± sd
0	19	21,1 ± 11,4	21,00	18,7 ± 9,9
4	17	22,7 ± 17,2	20,00	35,5 ± 17,5
12*	13	20,1 ± 13,9	16,00	41,9 ± 18,3
24	13	41,9 ± 14,8	15,00	44,7 ± 14,2

Tabulka 7: Průběh hodnot TcPO₂. *Pacienti ve skupině ST dostávali ACT ve 12. týdnu.



Obrázek 12: Srovnání přežití bez amputace s 95% intervaly spolehlivosti. Modrá barva představuje skupinu původně léčenou ACT, oranžová představuje skupinu původně na standardní terapii.

Diskuze ke studii

Naše studie prokázala po 3 měsících významný vzestup TcPO₂, snížení bolesti a zlepšení hojení ran u pacientů léčených ACT oproti konzervativní léčbě, významný rozdíl v AFS jsme však nepozorovali. V práci Rodriguez a spol. sledovali pozitivní efekt buněčné terapie na TcPO₂, kdy použili BMMNC (30.43 mm Hg ± 25.65, $p < 0,05$) a Whartonova rosolu (59.67 mmHg ± 16.05, $p < 0,05$) [95]. Naše výsledky popisují obdobnou elevaci TcPO₂ během prvních 12 týdnů ve skupině ACT z 20,8 ± 9,6 na 41,9 ± 18,3 mm Hg ($p=0,005$). Hodnoty TcPO₂ stouply také v metaanalýze Sun a spol. (MD 4.23, 95% CI 1.82 to 6.65, což potvrzuje i nález naší práce [75]. Rozsáhlá práce Lawall a spol. hodnotící výsledky studií využívající PBPC i BMMNC popisuje také vzestup TcPO₂ oproti kontrolním skupinám [93].

Metatanalýza Dong a spol. zhodnotila 10 studií zaměřených na buněčnou terapii s pozitivními výsledky v rychlosti hojení defektů a také zmenšení plochy defektů ve prospěch skupiny buněčné léčby [94]. I naše výsledky ukázaly signifikantní rozdíl v počtu zhojených defektů ve skupině ACT oproti kontrolní skupině (31,3 % vs. 0 %, $p= 0,048$). Studie Sun a spol. ve své metaanalýze popsala také pozitivní efekt ACT na hojení defektů oproti kontrolním skupinám (76 vs. 34%, $p < 0,001$) [75]. Práce týmu Rodriguez a spol., ve které podávali Whartonův rosol a kostní dřev do periadventiciální oblasti arterií u CLTI skupin, popsali zlepšení nálezu defektů hodnocené Rutherford klasifikací již první měsíc po léčbě s efektem až do 12 měsíců po aplikaci oproti placebo skupině ($p < 0,05$). Dále bylo v této práci popsáno rychlejší hojení defektů (53.02 ± 40.85% a 68.86 ± 43.23%) oproti placebo. Také hodnotili vnímání bolesti pomocí VAS skórovacího systému a popsali významné snížení vnímané bolesti již 1 měsíc po aplikaci, ale i v průběhu kontrol 3., 6. a 12. měsíc oproti placebo ($p < 0,05$) [95].

Také metaanalýza Sun a spol. se zabývala vnímáním bolesti. Výsledky ukázaly delší interval bezbolestné chůze (MD 220.79, 95% CI 82.10 to 359.48) a také snížení klidové bolesti (MD - 1.94, 95% CI - 2.50 to - 1.39). Pozitivní efekt buněčné terapie na vnímání bolesti hodnotili také v již zmíněné práci Lawall a spol. [93]. Vnímání bolesti bylo u našich výsledků také zlepšeno po ACT za 12 týdnů ($p = 0,002$). Naopak ve skupině ST popsali pacienti významné zhoršení bolesti ($p = 0,003$).

Dále došlo k významnému zvýšení kvality života 12 týdnů po ACT na EQ-5D ve srovnání s výchozí hodnotou EQ-5D (z 48,0 ± 12,0 na 69,6 ± 13,2 %, $p < 0,001$) oproti ST skupině. Práce Rodriguez a spol. se zaměřila také na hodnocení pomocí EQ-5D a zhodnotili zlepšení kvality života po aplikaci BMMNC i MSC z Whartonova rosolu ($p < 0,05$) [95]. V námi prováděné studii jsme také pozorovali zlepšení zdravotního stavu hodnoceného SF-36 již po 12 týdnech po ACT ($p < 0,001$). Práce Zhu a spol. hodnotila účinek MSC získaných z pupečnickové krve a aplikovaných intravenózně u křehkých geriatrických pacientů ($p < 0,042$) již týden po aplikaci a i v dalších kontrolách [96].

7 Závěr a shrnutí disertační práce

V této kapitole budou shrnuty výsledky jednotlivých hodnocených studií.

Posouzení tří metod využívajících buněčnou terapii k léčbě chronické končetinu ohrožující ischemie u diabetiků

Tato práce ukázala, že je v současné době možné pro buněčnou terapii v klinické praxi použít různé zdroje kmenových buněk, jejich zpracování a případně možnosti podání. V naší studii jsme se zaměřili na intramuskulární podání autologních buněk, které byly zpracovány odlišnými metodami. Z našich výsledků vyplývá, že všechny tři izolační metody měly stejně významný vliv na vzestup TcPO₂. Nebyl však pozorován rozdíl mezi složením buněčného produktu ani ve spojitosti s efektem jednotlivých metod zpracování.

Naše vstupní hypotéza tedy byla potvrzena jelikož jsme nepozorovali významný rozdíl u různých metod zpracování kmenových buněk aplikovaných do ischemického svalu diabetiků.

Faktory ovlivňující výskyt vysokých amputací u pacientů s diabetickými chronickými defekty po autologní buněčné terapii

Z výsledků této studie vyplývá, že mezi významné rizikové faktory vysoké amputace u pacientů s CLTI po ACT patří vyšší hladina CRP, mutace genu pro MTHFR s heterozygotními a homozygotními polymorfismy 1298 a kouření. Dále byl u amputovaných pacientů sledován nižší vzestup TcPO₂ oproti neamputovaným probandům. Díky těmto výsledkům je vhodné v klinické praxi vyšetřovat pacienty s CLTI na protrombofilní mutace a zavést včasné správnou antitrombotickou terapii, adekvátně léčit infekci a tím snížit riziko infekčních komplikací u defektů dolní končetiny. Dále je klíčové edukovat pacienta o nutnosti ukončit rizikové chování užíváním tabáku a případně doporučit postupy odvykání. Stran hypotézy druhé studie bylo potvrzeno, že tíže vstupní infekce měla významný negativní vliv na vývoj výsledku terapie, ale překvapivě jsme nepozorovali negativní vliv tíže vstupní ischemie na účinek ACT.

Vliv imunosupresivních látek na funkční vlastnosti kmenových buněk

Tato práce popsala jednotlivé subpopulace kmenových buněk, přičemž nejvýznamnější zastoupení měly MAC a MSC buňky. Dále byl zjištěn negativní efekt IS u všech tří použitých léčiv a to v konkrétních koncentracích, což je možné dále aplikovat do klinické praxe u transplantovaných pacientů indikovaných k ACT. Byla také pozorována změněná exprese genů imunoregulačních molekul a to především u COX2, IDO, PD-L1, TGF- β a iNOS tacrolimem a u iNOS i sirolimem. Produkce cytokinů HGF, VEGF, CCL2, IL-8 a IL-6 byla významně snížena všemi použitými IS. Imunosupresivní terapie dále zvyšovala výskyt apoptózy buněk, přičemž nejvýznamnější vliv měl sirolimus, ale i tacrolimus způsoboval buněčnou smrt.

Byla tedy potvrzena naše hypotéza, že vyšší koncentrace IS mají významně horší negativní efekt na funkční vlastnosti kmenových buněk. Obecně lze říci, že toxická koncentrace IS na BMMNC je nad 50 $\mu\text{g/ml}$.

Posouzení vlivu autologní buněčné terapie a standardní léčby na oxygenaci tkání a syndrom diabetické nohy

Z výsledků této práce vyplývá, že zavedení ACT do terapie NO-CLTI pacientů má významný efekt na zlepšení oxygenace tkání, zvýšení počtu zhojených defektů a zmenšení plochy rány oproti standardní péči. Pacienti léčení ACT také subjektivně popisovali snížení vnímané bolesti a zlepšení kvality života v průběhu celého období kontrol po aplikaci buněčné terapie.

Přesto jsme nepozorovali mezi skupinami rozdíl v prvních třech měsících ve výskytu vysokých amputací. Pouze jsme vyhodnotili rozdíl v indikaci k vysoké amputaci, kdy hlavním důvodem amputace byla v ACT skupině infekce, kdežto s ST skupině progresse ischemie. Potvrdili jsme naši hypotézu, že ACT je efektivní metodou v případě těžké ischemie dolních končetin diabetiků a je významně účinnější než standardní konzervativní léčba NO-CLTI.

Konflikt zájmů

Prohlašuji, že nemám žádné konkurenční finanční ani jiné vztahy s žádnou organizací, která by mohla mít zájem na předložené práci v předchozích pěti letech.

8 Poděkování

V první řadě musím své poděkování vyjádřit svému školiteli doc. MUDr. Michalu Dubskému, Ph.D., FRSPH, MBA, který mi byl během mé pracovní a vědecké cesty skvělým mentorem a rádcem. Pod jeho vedením bylo mé postgraduální studium vedeno na vysoké vědecké úrovni a výsledky mých vědeckých prací byly pozitivně hodnoceny mezi vědeckými pracovními na světové úrovni. Jsem vděčná za jeho podporu v realizaci mých návrhů na jiné směřování našich studií a ochotu se na každém projektu podílet.

Také bych ráda poděkovala prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. a doc. MUDr. Peteru Girmanovi, Ph.D, za možnost pracovat v klinické praxi a také vědecké práci na špičkovém pracovišti Kliniky Centra diabetologie IKEM.

Mé další poděkování bych ráda směřovala k mým kolegům doc. MUDr. Vladimíře Fejfarové, Ph.D. MUDr. Robertu Bémovi, Ph.D., MUDr. Veronice Woskové, MUDr. Radce Jarošíkové a MUDr. Karolu Sutorisovi, Ph.D. za pomoc v péči o podiatrické pacienty a dále spolupráci na vědeckých studiích.

Toto poděkování bych také ráda věnovala podiatrickým sestřám Jitce Danielové, DiS., Haně Tibenské, Markétě Kopecké a Martě Křížové za jejich významnou spolupráci v klinice i vědecké práci.

V neposlední řadě bych velice ráda poděkovala své rodině, především rodičům za dlouholetou podporu ve studiu a mému manželovi a dětem za pochopení, neutuchající oporu a motivaci k další práci.

9 Přehled publikací

Články publikované v impaktovaných časopisech

1. Husakova J, Bem R, Jirkovska A, Nemcová A, Fejfarová V, Sutoris K, Kahle M, Jude EB, Dubsky M. Comparison of Three Methods for Preparation of Autologous Cells for Use in Cell Therapy of Chronic Limb-Threatening Ischemia in People with Diabetes. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2022 Apr 24;15347346221095954. doi: 10.1177/15347346221095954. ISSN 1534-7346. eISSN 1552-6941. IF 2,057 z r. 2020. Q3,
2. Husakova J, Bem R, Fejfarová V, Jirkovska A, Wosková V, Jarošíková R, Lovásová V, Jude EB, Dubsky M. Factors Influencing the Risk of Major Amputation in Patients with Diabetic Foot Ulcers Treated by Autologous Cell Therapy. *Journal of diabetes research*. 2022 Apr 11;2022:3954740. doi: 10.1155/2022/3954740. ISSN 2314-6745. e-ISSN 2314-6753. IF 4,011. Q2
3. Husakova J, Echalar B, Kossl J, Palacka K, Fejfarova V, Dubsky M. The Effects of Immunosuppressive Drugs on the Characteristics and Functional Properties of Bone Marrow-Derived Stem Cells Isolated from Patients with Diabetes Mellitus and Peripheral Arterial Disease. *Biomedicines*. 2023 Jun 30;11(7):1872. doi: 10.3390/biomedicines11071872. PMID: 37509511; PMCID: PMC10377428. IF 3,9 z r.2023
4. Dubský M., Jirkovská, A., Bém R., Němcová, A., Fejfarová, V., Hazdrová, J., Sutoris, K., Chlupáč, J., Skibová, J., Jude, EB. Impact of severe diabetic kidney disease on the clinical outcome of autologous cell therapy in people with diabetes and critical limb ischaemia. *Diabetic medicine*. 2019, 36(9), 1133-1140. ISSN 0742-3071. e-ISSN 1464-5491. IF 3,083. Q3
5. Dubský, M., Šedivý, P., Němcová, A., Drobný, M., Hazdrová, J., Fejfarová, V., Bém, R., Jirkovská, A., Dezortová, M., Hájek, M. Clinical and(31)P magnetic resonance spectroscopy characterization of patients with critical limb ischemia before and after autologous cell therapy. *Physiological research*. 2019, 68(4), 559-566. ISSN 0862-8408. e-ISSN 1802-9973. IF 1,655. Q4
6. Dubský, M., Fejfarová, V., Bém, R., Jirkovská, A., Němcová, A., Sutoris, K., Husáková, J., Skibová, J., Jude, EB. Main Factors Predicting Nonresponders to Autologous Cell Therapy for Critical Limb Ischemia in Patients With Diabetic Foot. *Angiology [online]*. 2021 Mar 30;33197211005614. [cit. 2021-04-16]. doi: 10.1177/00033197211005614. ISSN 0003-3197. eISSN 1940-1574. IF 3,619 z r. 2020. Q3
7. Dubský M, Husáková J, Sojákova D, Fejfarová V, Jude EB. Cell Therapy of Severe Ischemia in People with Diabetic Foot Ulcers-Do We Have Enough Evidence? *Mol Diagn Ther*. 2023 Nov;27(6):673-683. doi: 10.1007/s40291-023-00667-w. Epub 2023 Sep 22. PMID: 37740111; PMCID: PMC10590286. 4,1 z r. 2023
8. Pyšná, A., Bém, R., Němcová, A., Fejfarová, V., Jirkovská, A., Hazdrová, J., Jude, EB., Dubský, M. Endothelial progenitor cells biology in diabetes mellitus and peripheral arterial disease and their therapeutic potential. *Stem cell reviews and reports*. 2019, 15(2), 157-165. ISSN 1550-8943. e-ISSN 1558-6804. IF 4,697. Q1

9. Fejfarová, V., Pavlu, J., Bém, R., Wosková, V., Dubský, M., Němcová, A., Jirkovská, A., Sixta, B., Sutoris, K., Thieme, F., Armstrong, DG., Vrátná, E., Hazdrová, J., Lánská, V. The superiority of removable contact splints in the healing of diabetic foot during postoperative care. *Journal of diabetes research*. 2019, 2019(15 September), art. no. 5945839. ISSN 2314-6745. e-ISSN 2314-6753. IF 2,965. Q3
10. Fejfarová V, Jarošíková R, Polák J, Sommerová B, Husáková J, Wosková V, Dubský M, Tůma P. Microdialysis as a tool for antibiotic assessment in patients with diabetic foot: a review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Apr 17;14:1141086. doi: 10.3389/fendo.2023.1141086. ISSN 1664-2392. eISSN 1664-2392. IF 6,055 z r. 2021. Q1
11. Fejfarová V, Matuška J, Jude E, Piřhová P, Flekač M, Roztočil K, Wosková V, Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Husáková J, Lánská V. Stimulation TcPO2 Testing Improves Diagnosis of Peripheral Arterial Disease in Patients With Diabetic Foot. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2021 Dec 10;12:744195. doi: 10.3389/fendo.2021.744195. ISSN 1664-2392. eISSN 1664-2392. IF 5,555 z r. 2020. Q1
12. Fejfarová V, Bieliková J, Voska L, Diamantová D, Dubský M, Wosková V, Bém R, Husáková J, Vrátná E, Jirkovská A. Verrucous Skin Lesions on the Feet in Diabetic Neuropathy in the Context of Podiatric Practice - Our Pilot Experiences. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2022 Jul;30(1):49-53. PMID: 36153719. IF1,054
13. Fejfarová V, Jarošíková R, Antalová S, Husáková J, Wosková V, Beca P, Mrázek J, Tůma P, Polák J, Dubský M, Sojáková D, Lánská V, Petrлік M. Does PAD and microcirculation status impact the tissue availability of intravenously administered antibiotics in patients with infected diabetic foot? Results of the DFIATIM substudy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 May 7;15:1326179. doi: 10.3389/fendo.2024.1326179. PMID: 38774229; PMCID: PMC11106387. IF 3,82 z r.2023
14. Vrátná E, Husáková J, Králová K, Kratochvílová S, Girman P, Saudek F, Dubský M, Bém R, Wosková V, Jirkovská A, Dad'ová K, Vařeková J, Lánská V, Fejfarová V. Incidence and Risk Factors of Diabetic Foot Syndrome in Patients Early After Pancreas or Kidney/Pancreas Transplantation and its Association with Preventive Measures. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2021 Nov 1:15347346211052155. doi: 10.1177/15347346211052155. ISSN 1534-7346. eISSN 1552-6941. IF 2,057 z r. 2020. Q3
15. Vrátná E, Husáková J, Jarošíková R, Dubský M, Wosková V, Bém R, Jirkovská A, Králová K, Pyšková B, Lánská V, Fejfarová V. Effects of a 12-Week Interventional Exercise Programme on Muscle Strength, Mobility and Fitness in Patients With Diabetic Foot in Remission: Results From BIONEDIAN Randomised Controlled Trial. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 5;13:869128. doi: 10.3389/fendo.2022.869128. PMID: 35865313; PMCID: PMC9294221. IF 3,519
16. Lovasova V, Bem R, Chlupac J, Dubsky M, Husakova J, Nemcova A, Fronek J. Animal experimental models of ischemic wounds - A review of literature. *Wound Repair and Regeneration*. 2022 Feb 9. doi: 10.1111/wrr.12996. ISSN 1067-1927. eISSN 1524-475X. IF 3,617 z r. 2020. Q2
17. Sechovcová H, Mahayri TM, Mrázek J, Jarošíková R, Husáková J, Wosková V, Fejfarová V. Gut microbiota in relationship to diabetes mellitus and its late complications with a focus on diabetic foot syndrome: A review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2024 Apr;69(2):259-282. doi: 10.1007/s12223-023-01119-y. Epub 2023 Dec 14. PMID: 38095802, IF 2,4 z.r. 2024

18. Jarošíková R, Roztočil K, Husáková J, Dubský M, Bém R, Wosková V, Fejfarová V. Chronic Venous Disease and Its Intersections With Diabetes Mellitus. *Physiol Res*. 2023 Jul 14;72(3):280-286. doi: 10.33549/physiolres.935033. PMID: 37449742; PMCID: PMC10668996, IF 1,94 z.r.2023
19. Sojakova D, Husakova J, Fejfarova V, Nemcova A, Jarosikova R, Kopp S, Lovasova V, Jude EB, Dubsky M. The Use of Autologous Cell Therapy in Diabetic Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Int J Mol Sci*. 2024 Sep 23;25(18):10184. doi: 10.3390/ijms251810184. PMID: 39337669; PMCID: PMC11431855. IF 5,6 z r. 2022, Q1

Články publikované v tuzemských časopisech

1. Husáková J, Sochorová K, Fejfarová V, Dubský M. Záchyt, vyšetření a terapie sexuálních dysfunkcí u pacientů s diabetem [Detection, examination and therapy of sexual dysfunctions in patients with diabetes]. *Vnitr Lek*. 2022 Fall;68(E-3):18-21. Czech. PMID: 36208914
2. Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Husáková J, Wosková V. Technologie v terapii syndromu diabetické nohy. *Farmakoterapeutická revue* 2020;1(1):52-56
3. Bém R, Piřhová P, Dubský M, Fejfarová V, Husáková J, Koliba M. Organizace péče o pacienty se syndromem diabetické nohy v České republice. *DMEV* 2020; 23(1):11-17
4. Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Husáková J, Wosková V. Diabetic foot. *Vnitr Lek*. 2020 Spring;66(2):92-97
5. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Husáková J, Jirkovská A. Novinky v angiologii. *Léčba ran* 2020; 7(2):4-8

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Hazdrova J, Bem R, Nemcova A, Fejfarova V, Jirkovska A, Woskova V, Sutoris K, Thieme F, Dubsky M. Assessment of Systemic Vasculogenesis After Autologous Cell Therapy of Ischemic Diabetic Foot (Abstract). *ISDF Abstract Book 2019*; 8(O7.2):15 8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019
2. Husakova J, Bem R, Nemcova A, Fejfarova V, Jirkovska A, Dubsky M. Does Cell Therapy Improve the Quality of Life of Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia? A Randomized Controlled Trial (Abstract). *Diabetes* 2020;69(Suppl1):221-OR 80th Scientific Sessions American Diabetes Association, Chicago, USA, 12. - 16. 6. 2020
3. Husáková J, Bém R, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Jarošíková R, Dubský M. Factors influencing the risk of major amputation of patients with diabetic foot disease treated by autologous cell therapy (Abstract). *DFSG Abstract Book 2021*; 17(1):OP28 17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
4. Husáková J, Echalar B, Bem R, Jarošíková J, Fejfarová V, Jirkovská A, Koss J, Holan V, Dubský M. Impact of immunosuppressive drugs on the metabolic activity and functional properties of stem cells isolated from the bone marrow of diabetic patients (Abstract). *Diabetologia* 2021;64(Suppl1):576 57th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Virtual Meeting, 27. 9. - 1. 10. 2021

5. Husáková J, Echalar B, Bem R, Jarošíková R, Fejfarová V, Jirkovská A, Kossl J, Pa-lacká K, Dubský M, Holáň V. Does the immunosuppressive treatment reduce the healing potential of stem cells separated from bone marrow of diabetic patients? (Abstract). EWMA Abstract Book 2022;22(1):S169
32nd European Wound Management Association, Paříž, Francie, 23. – 25. 5. 2022
6. Husáková J, Bém R, Jirkovská A, Wosková V, Jarošíková R, Fejfarová V, Dubský M. The major amputation risk stratification using diabetic foot ulcer classificatios in pa-tients with critical limb-threatening ischemia after autologous stem cell therapy (Abs-tract). DFSG Abstract Book 2022; 18(1):58
18th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko 16. - 18. 9. 2022
7. Dubský M, Bem R, Jirkovská A, Nemcová A, Hazdrová J, Fejfarová V, Woskova V, Sutoris K, Thieme F, Skibova J. Impact of Severe Diabetic Kidney Disease on the Effect of Autologous Cell Therapy in Diabetic Paitents with Chronic Limb-Threatening Ische-mia (Abstract). ISDF Abstract Book 2019; 8(O7.1):16
8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019
8. Dubsky M, Bem R, Nemcova A, Husakova J, Fejfarova V, Jirkovska A, Sutoris K. Comparison of the Impact of Autologous Cell Therapy and Conservative Treatment on Chronic Limb-Threatening Ischemia in Patients with Diabetic Foot: A Randomized Controlled Trial (Abstract). Diabetes 2020;69(Suppl1):219-OR
80th Scientific Sessions American Diabetes Association, Chicago, USA, 12. - 16. 6. 2020
9. Dubský M, Husáková J, Bém R, Fejfarová V, Jirkovská A, Jarošíková R, Wosková V. Impact of Global Limb Anatomic Staging System on the indication of cell therapy in diabetic patients with no-option chronic limb-threatening ischemia (Abstract). DFSG Abstract Book 2021; 17(1):OP04
17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
10. Dubský M, Husáková J, Bem R, Fejfarová V, Jarošíková J, Jirkovská A, Wosková V. Long-term outcomes of autologous cell therapy, angioplasty and conservative therapy in patients with chronic limb-threatening ischemia and diabetes (Abstract). Diabetologia 2021;64(Suppl1):197
57th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Virtual Meeting, 27. 9. - 1. 10. 2021
11. Dubský M, Husáková J, Bem R, Fejfarová V, Jirkovská A, Jarošíková R, Sutoris K, Wosková V. Impact of autologous cell therapy on wound healing in diabetic patients with chronic limb-threatening ischemia. A randomized controlled trial (Abstract). EWMA Abstract Book 2022;22(1):S183
32nd European Wound Management Association, Paříž, Francie, 23. – 25. 5. 2022
12. Dubský M, Husáková J, Neškudla T, Bém R, Fejfarová V, Jirkovská A, Jarošíková R, Řezaninová L, Wosková V. One-year hospitalization data and follow-up of discharged patients - outcomes from level 3 foot centre (Abstract). DFSG Abstract Book 2022; 18(1):38
18th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko 16. - 18. 9. 2022

13. Dubský M, Bem R, Jirkovská A, Nemcová A, Hazdrová J, Fejfarová V, Woskova V, Sutoris K, Thieme F, Skibova J. Impact of Severe Diabetic Kidney Disease on the Effect of Autologous Cell Therapy in Diabetic Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia (Abstract). ISDF Abstract Book 2023; 8(O7.1):16
9th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 10. - 13. 5. 2023
14. Dubský M, Sojáková D, Husáková J, Fejfarová V, Jarošíková R, Kopp Š, Němcová A, Sutoris K, Wosková V. Cell subpopulations responsible for revascularization effect during therapeutic arteriogenesis of ischemic limbs in people with diabetes (Abstract). RMSC Abstract Book 2024;14(1):019 BIT's 14th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2024, Nagoya, Japonsko, 22. - 24. 4. 2024
15. Dubský M, Husáková J, Sojáková D, Fejfarová V, Jarošíková R, Němcová A, Lovásová V, Sutoris K, Wosková V. Efficacy of autologous cell therapy in the treatment of chronic limb-threatening ischaemia in people with diabetes: a randomised controlled trial (Abstract). Diabetologia 2023;66(S16)
59th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Hamburg, Německo, 2. - 6. 10. 2023
16. Bém R, Wosková V, Fejfarová V, Teyssler P, Jarošíková R, Husáková J, Sutoris K, Sixta B, Dubský M. Audit of active Charcot feet: characteristics, treatment outcomes and complications (Abstract). DFSG Abstract Book 2021; 17(1):OP08
17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
17. Fejfarová V, Vrátná E, Husáková J, Kratochvílová S, Girman P, Saudek F, Dubský M, Bém R, Wosková V, Jirkovská A, Jarošíková R, Lánská V. Incidence and risk factors of diabetic foot disease in patients early after pancreas or simultaneous pancreas and kidney transplantation (Abstract). DFSG Abstract Book 2021; 17(1):OP20
17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
18. Fejfarová V, Jarošíková R, Husáková J, Wosková V, Fialová M, Krupičková L, Mrázek J, Nováková I, Tůma P, Polák J, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Lánská V. Tissue availability of intravenously administered antibiotics in patients with infected diabetic foot ulcers in the context of PAD and microcirculation status – pilot data (Abstract). DFSG Abstract Book 2022; 18(1):57
18th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko 16. - 18. 9. 2022
19. Jarošíková R, Husáková J, Dubský M, Bém R, Jirkovská A, Wosková V, Lánská V, Fejfarová V. Small artery disease and its possible impact on diabetic foot ulcers outcomes and microcirculation - a pilot study. (Abstract). DFSG Abstract Book 2021; 17(1):TOP5ORAL5
17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
20. Jarošíková R, Turza P, Adla T, Husáková J, Dubský M, Bem R, Jirkovská A, Wosková V, Fejfarová V. A pilot study – healing of diabetic foot ulcers, microcirculation status and their possible correlate with small artery disease (Abstract). EWMA Abstract Book 2022;22(1):S184
32nd European Wound Management Association, Paříž, Francie, 23. – 25. 5. 2022

21. Dubský M, Husáková J, Sojáková D, Fejfarová V, Jarošíková R, Němcová A, Lovásová V, Wosková V. Comparison of autologous cell therapy with conservative treatment in people with chronic limb-threatening ischemia and diabetes. A randomised controlled trial (Abstract). D&CVD Abstract Book 2024;16(14)
16th Annual International Conference of the D&CVD Study Group, Praha, 29. – 31. 5. 2024

Postery s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Hazdrová J, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. Does foot infection influence the effect of autologous cell therapy on ischemic diabetic foot ulcers? (Abstract). IDF Abstract Book 2019. 25(1):OP-0117
25th International Diabetes Federation Congress, Busan, Jižní Korea, 2. – 6. 12. 2019
2. Husáková J, Bem R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. Impact of osteomyelitis on the clinical outcome of autologous cell therapy in patients with diabetic foot disease and severe ischemia (Abstract). DFSG Abstract Book 2020; 16(1):P37
16th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Virtual Meeting, 18. - 20. 9. 2020
3. Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Hazdrová J, Sutoris K. Can inherited thrombophilia influence the effect of autologous cell therapy in patients with ischemic diabetic foot? (Abstract). IDF Complications Abstract Book 2018; 1(1):P-019
1st International Diabetes Federation Complications Congress, Hyderabad, Indie, 25. – 27. 10. 2018
4. Dubský M, Ogurtsova K, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Hazdrová J, Fejfarová V, Icks A, Morbach S. Comparison of diabetic foot ulcer recurrence over a 15-year follow-up period in Czech and German diabetic foot centers (Abstract). IDF Abstract Book 2019. 25(1):OP-0115
25th International Diabetes Federation Congress, Busan, Jižní Korea, 2. – 6. 12. 2019
5. Dubský M, Bem R, Husáková J, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V. Comparison of the impact of autologous cell therapy on tissue oxygen supply and course of the diabetic foot in patients with chronic limb-threatening ischemia. A randomized controlled trial. (Abstract). DFSG Abstract Book 2020; 16(1):P72
16th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Virtual Meeting, 18. - 20. 9. 2020
6. Dubský M, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Husáková J, Jirkovská A, Wosková V. Impact of immunosuppressive therapy on healing and clinical course of diabetic foot ulcers (Abstract). Diabetologia 2020;63(Suppl1):859
56th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Virtual Meeting, 21. - 25. 9. 2020
7. Dubský M, Husáková J, Fejfarová V, Sutoris K, Sojáková D, Jarošíková R, Kahle M. Is it reasonable to treat infected diabetic foot ulcers by autologous cell therapy in patients with severe ischemia? (Abstract). Diabetes 2023;72(Suppl. 1):511-P.
83rd Scientific Sessions American Diabetes Association, San Diego, USA, 23. – 26. 6. 2023

8. Bem R, Dubský M, Fejfarová V, Husáková J, Wosková V. Lessons from podiatric care during the COVID-19 pandemic (Abstract). DFSG Abstract Book 2020; 16(1):P41
16th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Virtual Meeting, 18. - 20. 9. 2020
9. Bem R, Husáková J, Dubský M, Jarošíková R, Fejfarová V, Wosková V. Ambulatory negative pressure wound therapy in patients with diabetic foot (Abstract). DFSG Abstract Book 2022; 18(1):70
18th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko 16. - 18. 9. 2022
10. Fejfarová V, Matuška J, Piřhová P, Flekač M, Roztočil K, Wosková V, Dubský M, Bém R, Hazdrová J, Jirkovská A, Lánská V. Does stimulation testing performer during TcPO2 measurement improve the diagnosis arterial disease, especially its latent form, in patients with diabetic foot? A multicenter trial (Abstract). IUA Abstract Book 6(1):107
European Society for Vascular Medicine, International Union of Angiology Eurochop 2019, Lublaň, Slovinsko, 10. – 12. 10. 2019
11. Fejfarová V, Vrátná E, Husáková J, Veleba J, Dubský M, Wosková V, Bém R, Jirkovská A, Lánská V. Effect of a 12-week interventional exercise programme on the fitness, biomechanics and safety in patients with diabetic foot in remission: the Bionedian randomized controlled trial (Abstract). DFSG Abstract Book 2020; 16(1):P11
16th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Virtual Meeting, 18. - 20. 9. 2020
12. Fejfarová V, Jarošíková R, Husáková J, Wosková V, Mihálová V, Polák J, Tůma P, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Mrázek J. MICRODIALYSIS TECHNIQUES IN DIABETIC FOOT SYNDROME – FIRST EXPERIENCES (DFIATIM STUDY). ATTD 2021 Virtual konference. Diabetes Technology & Therapeutics, 2021; 23(2): A205
14th Advances Technologies & Treatments for Diabetes Conference, Virtuální, 26. – 29. 5. 2021
13. Fejfarová V, Jarošíková R, Husáková J, Wosková V, Nováková I, Polák J, Tůma P, Jirkovská A, Dubský M, Bem R, Mrázek J. A novel method for the assessment of effectiveness of antibiotic therapy in diabetic foot – preliminary data (Abstract). EWMA Abstract Book 2022;22(1):S89
32nd European Wound Management Association, Paříž, Francie, 23. – 25. 5. 2022
14. Fejfarová V, Jarošíková R, Kepertová J, Husáková J, Wosková V, Beca P, Tůma P, Polák J, Dubský M, Sojákova D, Lánská V, Petrlík M. Have PAD and microcirculation status impact on tissue availability of intravenously administered antibiotics in patients with infected diabetic foot? (Abstract). Diabetologia 2023;66(S461)
59th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Hamburg, Německo, 2. - 6. 10. 2023
15. Woskova V, Jirkovska A, Bem R, Dubsky M, Fejfarová V, Navratil K, Němcová A Sutoris K. One-Year Outcomes of External Fixation Treatment in Infected Charcot Foot Patients (Abstract). ISDF Abstract Book 2019; 8(O40.03):129
8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019

16. Wosková V, Jirkovská A, Bem R, Dubský M, Fejfarová V, Husáková J, Malušková J, Mírejovský T, Sixta B. A comparison of bone histopathology and microbiology in the diabetic patient with suspected foot osteomyelitis (Abstract). DFSG Abstract Book 2020; 16(1):P47
16th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Virtual Meeting, 18. - 20. 9. 2020
17. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Husáková J, Jarošíková R, Teysler P, Sutoris K. Orthopedic Surgery in the Management of the Diabetic Foot – A Five-year Experience (Abstract). DFSG Abstract Book 2021; 17(1):EP18
17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
18. Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Jarošíková R, Husáková J, Wosková V, řezaninová L, Koloničný P, Skiobá J. Can the duration of hospitalization be related to major or minor amputation in patients with diabetes? (Abstract). DFSG Abstract Book 2022; 18(1):119
18th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko 16. - 18. 9. 2022
19. Sojáková D, Fejfarová V, Husáková J, Němcová A, Jarošíková R, Wosková V, Sutoris K, Kahle M. Main factors influencing limb salvage in patients with chronic limb-threatening ischaemia after autologous cell therapy (Abstract). Diabetologia 2023;66(S461)
59th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Hamburg, Německo, 2. - 6. 10. 2023

Přednášky s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Hazdrová J, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. Posouzení systémové vaskulogeneze po autologní buněčné terapii diabetiků s těžkou ischemií dolních končetin (Abstract) DMEV 2019; 22(Suppl. 1):23-24 LV.
Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. – 13. 4. 2019
2. Hazdrová J, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. Ovlivní infekce efekt autologní buněčné terapie syndromu diabetické nohy? (Abstract). Vnitřní lékařství 2019;65(S1):9
XXXVIII. Dny mladých internistů, Olomouc, 6. – 7. 6. 2019
3. Husáková J, Rázus M, Fejfarová V, Osadcha T, Dubský M. Faktory ovlivňující vznik sexuálních dysfunkcí u pacientů s diabetem (Abstract) DMEV 2024; 27(Suppl. 1):22-60.
Diabetologické dny v Luhačovicích, 24. - 27. 4. 2024
4. Dubský M, Hazdrová J, Němcová A, Bém R. Implementation of good manufacturing practice for advanced therapy medicinal product – the clinical point of view (Abstract). Sborník přednášek Stem Cells and Cell Therapy 2018;7(1):11
7th Stem Cells and Cell Therapy: From research to Modern Applications, Černá Hora, 11. – 12. 10. 2018
5. Dubský M, Fejfarová V, Bém R, Hazdrová J, Němcová A, Jirkovská A, Wosková V. Klasifikace syndromu diabetické nohy a jejich prediktivní hodnota v hojení ulcerací. (Abstract). Léčba ran 2019;4(1):26
XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019

6. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Hazdrová J, Fejfarová V, Icks A, Ogurtsova K, Morbach S. Porovnání recidiv syndromu diabetické nohy a jejich rizik během patnáctiletého sledování v českém a německém podiatrickém centru (Abstract) DMEV 2019; 22(Suppl. 1):23LV.
Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 13. 4. 2019
7. Dubský M, Fejfarová V, Bém R, Hazdrová J, Němcová A, Jirkovská A, Wosková V, Sixta B, Sutoris K. Vliv imunosupresní léčby na hojení a klinický průběh syndromu diabetické nohy (Abstract). Léčba ran 2020;5(1):2
XVIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 23. - 24. 1. 2020
8. Dubský M, Husáková J, Bém R, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Jarošíková J. Porovnání buněčné léčby kritické končetinové ischemie u diabetiků a konzervativní léčby v randomizované studii (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2021;19(Suppl 1):O10
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 26. 11. 2021
9. Dubský M, Husáková J, Echalar B, Kossl J, Palacka K, Holan M. Vliv imunosupresní léčby na funkční vlastnosti kmenových buněk u pacientů s diabetem (Abstract). Abstract Book Jizerka 15(1): 21
15.výzkumné fórum Pyramida, Jizerka, Horní Polubný, 5. – 7. 1. 2023
10. Dubský M, Husáková J, Sojákova D, Fejfarová V, Sutoris K, Jarošíková J, Kahle M. Má smysl indikovat autologní buněčnou terapii u pacientů s infikovaným defektem a závažnou ischemií? (Abstract) DMEV 2023; 26(Suppl. 1):23
59. Diabetologické dny v Luhačovicích, 26. - 29. 4. 2023
11. Dubský M, Husáková J, Sojákova D, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Sutoris K. Zkušenosti s autologní buněčnou terapií těžké ischemie a perspektivy do budoucna (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2023;21(Suppl 1):13-14
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 2. 6. 2023
12. Sojákova D, Husáková J, Fejfarová V, Wosková V, Jarošíková R, Dubský M: Porovnání efektu léčby autologními kmenovými buňkami a konservativní léčby u diabetiků s chronickou končetinu ohrožující ischemií – randomizovaná kontrolovaná studie (Abstract). Vnitřní lékařství 2023;69 (4, Supp B): 55 - 56.
XXXX. Dny mladých internistů, Olomouc, 1. – 2. 6. 2023
13. Sojákova D, Husáková J, Fejfarová V, Jarošíková R, Kopp Š, Němcová A, Wosková V, Sutoris K, Fialová M, Fáberová E, Kahle M, Dubský M. Která buněčná subpopulace je zodpovědná za efekt autologní buněčné terapie? (Abstract) DMEV 2024; 27(Suppl. 1):30
60. Diabetologické dny v Luhačovicích, 24. - 27. 4. 2024
14. Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Hazdrová J, Wosková V. Pokroky regenerativní medicíny v hojení ran (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2018;16(Suppl 1):S8-9
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018
15. Bém R, Buncová M, Dubský M, Fejfarová V, Hazdrová J, Wosková V. Úloha kvantitativních parametrů kostní scintigrafie v diagnostic Charcotovy neuropatické osteoartrózie (Abstract) DMEV 2019; 22(Suppl. 1):21LV.
Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 13. 4. 2019

16. Bém R, Dubský M, Wosková V, Fejfarová V, Husáková J, Jarošíková J. Telemedicina v podiatrii – fikce či budoucnost? (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2021;19(Suppl 1):O5
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 26. 11. 2021
17. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Hazdrová J, Jirkovská A. Novinky v angiologii (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2018;16(Suppl 1):S23-28
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018
18. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Hazdrová J, Jirkovská A, Bieliková J. Atypické rány u pacientů se syndromem diabetické nohy (Kazuistiky) (Abstract). *Léčba ran* 2019;4(1):26
XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019
19. Fejfarová V, Matuška J, Piřhová P, Flekač M, Venerová V, Roztočil K, Wosková V, Dubský M, Bém R, Hazdrová J, Jirkovská A, Lánská V. Zlepší stimulační test prováděný během měření transkutánní tense kyslíku diagnostiku ischemické choroby dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy? Multicentrická studie (Abstract) *DMEV* 2019; 22(Suppl. 1):22 LV.
Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 13. 4. 2019
20. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Jirkovská A, Wosková V, Němcová A, Hazdrová J, Vrátná E, Tibenská H, Kopecká M, Lánská V. The occlusive plethysmography and its association with micro- and macrocirculation parameters in patients with diabetic foot (Abstract) *Kazuistiky v angiologii* 2019; 6(1):17
44. Angiologické dny, Praha, 28. 2. – 2. 3. 2019
21. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Husáková J. Novinky v doporučení mezinárodního konsenzu: odlehčení (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2019;17(Suppl 1):S20-23
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 29. 11. 2019
22. Fejfarová V, Matuška J, Piřhová P, Flekač M, Roztočil K, Wosková V, Dubský M, Bém R, Husáková J, Jirkovská A, Lánská V. Zlepší stimulační test prováděný během měření transkutánní tense kyslíku diagnostiku ischemické choroby dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy? Multicentrická studie (Abstract) *Kazuistiky v diabetologii* 2019;17(Suppl 1):S24
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 29. 11. 2019
23. Fejfarová V, Wosková V, Dubský M, Bém R, Hazdrová J, Jirkovská A. Možnosti diagnostiky infekce u syndromu diabetické nohy – první zkušenost s přístrojem Moleculight (Abstract). *Léčba ran* 2020;5(1):25
XVIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 23. - 24. 1. 2020
24. Fejfarová V, Jarošíková J, Kepertová J, Husáková J, Wosková V, Tůma P, Petrlík M, Polák J, Mrázek J, Dubský M, Lánská V. Tkáňová dostupnost vybraných antibiotik a jejich efektivita u pacientů s infikovanými diabetickými ulceracemi v kontextu stavu makro- a mikrocirkulace – studie DFIATIM (Abstract) *DMEV* 2023; 26(Suppl. 1):24-59. Diabetologické dny v Luhačovicích, 26. - 29. 4. 2023

25. Fejfarová V, Jarošíková J, Kepertová J, Husáková J, Wosková V, Mrázek J, Tůma P, Polák J, Dubský M, Lánská V, Petrlík M. Tissue availability of intravenously administered antibiotics and their efficacy in patients with infected diabetic foot ulcers in the context of PAD and microcirculation status (DFIATIM study) (Abstract) *Kazuistiky v angiologii* 2023; 10(1):13
48. Angiologické dny, Praha, 2. 3. – 4. 3. 2023
26. Fejfarová V, Sutoris K, Sixta B, Wosková V, Jarošíková R, Dubský M, Sojáková D, Němcová A, Husáková J, Kopp Š, Lánská V. Surgical site infections u nemocných se syndromem diabetické nohy a možné rizikové faktory jejich vzniku (Abstract) *DMEV* 2024; 27(Suppl. 1):20
60. Diabetologické dny v Luhačovicích, 24. - 27. 4. 2024
27. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Hazdrová J. Diagnostika osteomyelitidy u syndromu diabetické nohy a její dopad do klinické praxe (Abstract). *Léčba ran* 2019;4(1):27
XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019
28. Jarošíková R, Husáková J, Dubský M, Wosková V, Bém R, Jirkovská A, Fejfarová V. Můře za nedostatečný efekt revaskularizace Small artery disease? (Abstract). *Abstract Book Jizerka* 15(1): 23
15.výzkumné fórum Pyramida, Jizerka, Horní Polubný, 5. – 7. 1. 2023
29. Jarošíková J, Husáková J, Dubský M, Wosková V, Sojáková D, Mrázek J, Fejfarová V. Vliv antibiotické terapie na střevní mikrobiom u pacientů s infikovanými ulceracemi v rámci syndromu diabetické nohy – studie DFIATIM (Abstract) *DMEV* 2023; 26(Suppl. 1):27
Diabetologické dny v Luhačovicích, 26. - 29. 4. 2023
30. Jarošíková R, Sojáková D, Husáková J, Kopp Š, Němcová A, Wosková V, Dubský M, Lánská V, Mareš J, Fejfarová V. Vliv parametrů kompenzace diabetu na prognózu hojení syndromu diabetické nohy (Abstract) *DMEV* 2024; 27(Suppl. 1):22
Diabetologické dny v Luhačovicích, 24. - 27. 4. 2024
31. Dubský M, Sojáková D, Husáková J, Němcová A, Fejfarová V, Jarošíková J, Sutoris K, Kopp Š, Wosková V. Efekt buněčné léčby na těžkou ischemii končetin – randomizovaná kontrolovaná studie (Abstract) *DMEV* 2024; 27(Suppl. 1):20
60. Diabetologické dny v Luhačovicích, 24. - 27. 4. 2024
32. Němcová A, Osadcha T, Sojáková D, Fejfarová V, Wosková V, Jarošíková J, Kopp Š, Gorman P, Dubský M. Vliv imunoprese na hojení syndromu diabetické nohy u transplantovaných pacientů (Abstract) *DMEV* 2024; 27(Suppl. 1):25
60. Diabetologické dny v Luhačovicích, 24. - 27. 4. 2024

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Hazdrová J, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Sutoris K, Thieme F, Dubský M. Zhojení chronického defektu paty u transplantovaného pacienta pomocí metod moderní terapie (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2018;16(Suppl 1):S30-31
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018

2. Hazdrová, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Sutoris K, Thieme F, Dubský M. Autologní buněčná terapie hemodialyzované pacientky se syndromem diabetické nohy a kritickou končetinovou ischemií bez možnosti revaskularizace. (Abstract). *Léčba ran* 2019;4(1):38
XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019
3. Husáková J, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Sutoris K, Thieme F, Lovásová V, Dubský M. Význam komplexního vyšetření a pečlivý odběr anamnézy u pacienta se syndromem diabetické nohy (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2019;17(Suppl 1):S25
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 29. 11. 2019
4. Husáková J, Bém R, Fejfarová V, Jarošíková R, Wosková V, Jirkovská J, Sutoris K, Borovička V, Dubský M. Náhodné odhalení utmoru podiatrem (Abstract). *Kasuistiky v diabetologii* 2021;19(Suppl 1):P2
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 26. 11. 2021
5. Sojáková D, Němcová A, Husáková J, Fejfarová V, Wosková V, Jarošíková J, Dubský M. Autologní buněčná terapie vs. konzervativní léčba u pacientů s diabetem a neřešitelnou ischemií – randomizovaná kontrolovaná studie (Abstract). *Kasuistiky v diabetologii* 2023;21(Suppl 1):24
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 2. 6. 2023
6. Jarošíková R, Husáková J, Dubský M, Bém R, Jirkovská A, Wosková V, Fejfarová V. Od distorze nohy k diagnóze primární hyperparatyreózy (Abstract). *Kasuistiky v diabetologii* 2021;19(Suppl 1):P1
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 26. 11. 2021
7. Jarošíková R, Husáková J, Dubský M, Wosková V, Sojáková D, Mrázek J, Fejfarová V. Střevní mikrobiom a antibiotická terapie u pacientů se syndromem diabetické nohy – studie DFIATIM (Abstract). *Kasuistiky v diabetologii* 2023;21(Suppl 1):22
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 2. 6. 2023
8. Vrátná E, Bém R, Dubský M, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Hazdrová J, Lánská V, Fejfarová V. Pohybová aktivita a její vztah k psychosociálním změnám u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2018;16(Suppl 1):S35
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018

10 Reference

1. Zhou, X., et al., *Panvascular medicine: an emerging discipline focusing on atherosclerotic diseases*. Eur Heart J, 2022. **43**(43): p. 4528-4531.
2. Wu, S.C., et al., *Foot ulcers in the diabetic patient, prevention and treatment*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(1): p. 65-76.
3. Hoogwerf, B.J., *Type of diabetes mellitus: Does it matter to the clinician?* Cleveland Clinic Journal of Medicine, 2020. **87**(2): p. 100-108.
4. Leslie, R.D., *Editorial: Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA)*. Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 1002776.
5. Al-Zubairi, T., M. Al-Habori, and R. Saif-Ali, *Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) and its Metabolic Characteristics among Yemeni Type 2 Diabetes Mellitus Patients*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2021. **14**: p. 4223-4232.
6. Dal Canto, E., et al., *Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications*. Eur J Prev Cardiol, 2019. **26**(2_suppl): p. 25-32.
7. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S81-90.
8. Bailes, B.K., *Diabetes mellitus and its chronic complications*. AORN J, 2002. **76**(2): p. 266-76, 278-82; quiz 283-6.
9. Dubsky, M., et al., *Cell Therapy of Severe Ischemia in People with Diabetic Foot Ulcers-Do We Have Enough Evidence?* Mol Diagn Ther, 2023. **27**(6): p. 673-683.
10. Husakova, J., et al., *The Effects of Immunosuppressive Drugs on the Characteristics and Functional Properties of Bone Marrow-Derived Stem Cells Isolated from Patients with Diabetes Mellitus and Peripheral Arterial Disease*. Biomedicines, 2023. **11**(7).
11. Li, Y., et al., *Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 152.
12. Licata, G., et al., [*Diabetes mellitus and stroke*]. Ital Heart J Suppl, 2002. **3**(5): p. 471-7.
13. Oliver, T.I. and M. Mutluoglu, *Diabetic Foot Ulcer (Archived)*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Mesut Mutluoglu declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
14. Hassanin, A., et al., *Predictors of Successful Antibiotic Treatment of Osteomyelitis in Diabetic Forefoot Infection*. Acta Diabetol, 2024.
15. Chang, M.C. and S. Yang, *Diabetic peripheral neuropathy essentials: a narrative review*. Ann Palliat Med, 2023. **12**(2): p. 390-398.
16. Bus, S.A., et al., *Guidelines on the prevention of foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update)*. Diabetes Metab Res Rev, 2020. **36 Suppl 1**: p. e3269.
17. Bus, S.A., et al., *Guidelines on the prevention of foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2023 update)*. Diabetes Metab Res Rev, 2024. **40**(3): p. e3651.
18. Trocha, A., et al., *The value of loss of protective pain sensation in predicting a first ulceration of the foot in people with diabetes*. Diabet Med, 2024. **41**(4): p. e15241.
19. Boulton, A.J., *Diabetic neuropathy and foot complications*. Handb Clin Neurol, 2014. **126**: p. 97-107.
20. Hicks, C.W. and E. Selvin, *Epidemiology of Peripheral Neuropathy and Lower Extremity Disease in Diabetes*. Curr Diab Rep, 2019. **19**(10): p. 86.

21. Hermans, M.P., *Diabetes and the endothelium*. Acta Clin Belg, 2007. **62**(2): p. 97-101.
22. Dubsky, M., et al., *Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus: New Insights*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(13).
23. Okeke, E. and A.O. Dokun, *Role of genetics in peripheral arterial disease outcomes; significance of limb-salvage quantitative locus-1 genes*. Exp Biol Med (Maywood), 2018. **243**(2): p. 190-197.
24. Liu, H., et al., *Evaluation of wound temperature monitoring at various anatomical sites in the management of patients with diabetic foot undergoing microcirculation reconstruction*. J Orthop Surg Res, 2024. **19**(1): p. 776.
25. Guven, G., M.P. Hilty, and C. Ince, *Microcirculation: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Application*. Blood Purif, 2020. **49**(1-2): p. 143-150.
26. Liao, Y., et al., *[Overwork induces vascular endothelial barrier dysfunction in mice]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2024. **44**(9): p. 1814-1820.
27. Bateman, R.M., M.D. Sharpe, and C.G. Ellis, *Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide*. Crit Care, 2003. **7**(5): p. 359-73.
28. Ince, C., *Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation*. Crit Care, 2015. **19 Suppl 3**(Suppl 3): p. S8.
29. Hilty, M.P., et al., *MicroTools enables automated quantification of capillary density and red blood cell velocity in handheld vital microscopy*. Commun Biol, 2019. **2**: p. 217.
30. Nam, H.J., et al., *The correlation between transcutaneous oxygen pressure (TcPO₂) and forward-looking infrared (FLIR) thermography in the evaluation of lower extremity perfusion according to angiosome*. Int Wound J, 2023. **21**(2).
31. Manfredini, F., et al., *Reliability of the vascular claudication reporting in diabetic patients with peripheral arterial disease: a study with near-infrared spectroscopy*. Angiology, 2015. **66**(4): p. 365-74.
32. Leeper, N.J., I.J. Kullo, and J.P. Cooke, *Genetics of peripheral artery disease*. Circulation, 2012. **125**(25): p. 3220-8.
33. Beltran-Camacho, L., M. Rojas-Torres, and M.C. Duran-Ruiz, *Current Status of Angiogenic Cell Therapy and Related Strategies Applied in Critical Limb Ischemia*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(5).
34. Nordanstig, J., et al., *Peripheral arterial disease (PAD) - A challenging manifestation of atherosclerosis*. Prev Med, 2023. **171**: p. 107489.
35. Sharma, S., et al., *Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate Safety and Therapeutic Efficacy of Angiogenesis Induced by Intraarterial Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells in Patients with Severe Peripheral Arterial Disease*. J Vasc Interv Radiol, 2021. **32**(2): p. 157-163.
36. Dormandy, J.A. and R.B. Rutherford, *Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC)*. J Vasc Surg, 2000. **31**(1 Pt 2): p. S1-S296.
37. Patoulias, D., et al., *Prognostic value of arterial stiffness measurements in cardiovascular disease, diabetes, and its complications: The potential role of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2020. **22**(4): p. 562-571.

38. Barnes, J.A., et al., *Epidemiology and Risk of Amputation in Patients With Diabetes Mellitus and Peripheral Artery Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. **40**(8): p. 1808-1817.
39. Conte, M.S., et al., *Corrigendum to "Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischaemia" [Eur J Vasc Endovasc Surg 58 (1S) (2019) 1-109>]*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2020. **60**(1): p. 158-159.
40. Dubsky, M., et al., *Comparison of the impact of autologous cell therapy and conservative standard treatment on tissue oxygen supply and course of the diabetic foot in patients with chronic limb-threatening ischemia: A randomized controlled trial*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022. **13**: p. 888809.
41. Eikelboom, J.W., et al., *Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(14): p. 1319-1330.
42. Huang, Q., et al., *Endovascular revascularisation versus surgical revascularisation in patients with lower limb atherosclerosis obliterans: a protocol for systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis and meta-regression*. *BMJ Open*, 2022. **12**(12): p. e066903.
43. Senneville, E., et al., *IWGDF/IDSA guidelines on the diagnosis and treatment of diabetes-related foot infections (IWGDF/IDSA 2023)*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2024. **40**(3): p. e3687.
44. Nita, O., et al., *Evaluating Classification Systems of Diabetic Foot Ulcer Severity: A 12-Year Retrospective Study on Factors Impacting Survival*. *Healthcare (Basel)*, 2023. **11**(14).
45. Wijnand, J.G.J., et al., *The Global Limb Anatomic Staging System (GLASS) for CLTI: Improving Inter-Observer Agreement*. *J Clin Med*, 2021. **10**(16).
46. Forster, R., et al., *Gene therapy for peripheral arterial disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018. **10**(10): p. CD012058.
47. Dubsky, M., et al., *Cell therapy of critical limb ischemia in diabetic patients - State of art*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017. **126**: p. 263-271.
48. Staffa, R., J. Leypold, and B. Vojtisek, *[Pedal bypass versus PTA (percutaneous transluminal angioplasty) of the crural arteries]*. *Rozhl Chir*, 2003. **82**(10): p. 516-21.
49. Bradbury, A.W., et al., *Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL)-2 Trial: Analysis of the Timing and Causes of Death in Participants Randomised to an Infra-popliteal Vein Bypass or Best Endovascular Treatment First Revascularisation Strategy*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2024.
50. Farber, A., et al., *Surgery or Endovascular Therapy for Chronic Limb-Threatening Ischemia*. *N Engl J Med*, 2022. **387**(25): p. 2305-2316.
51. Pegler, A.H., et al., *Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials Comparing Bypass and Endovascular Revascularisation for Peripheral Artery Disease*. *Vasc Endovascular Surg*, 2024: p. 15385744241292123.
52. Fitridge, R., et al., *The intersocietal IWGDF, ESVS, SVS guidelines on peripheral artery disease in people with diabetes and a foot ulcer*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2024. **40**(3): p. e3686.
53. Chuter, V., et al., *Effectiveness of revascularisation for the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral artery disease: A systematic review*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2024. **40**(3): p. e3700.

54. Kurianov, P., et al., *Propensity-matched analysis does not support angiosome-guided revascularization of multilevel peripheral artery disease (PAD)*. *Vasc Med*, 2022. **27**(1): p. 47-54.
55. Zhao, L., T. Johnson, and D. Liu, *Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases*. *Stem Cell Res Ther*, 2017. **8**(1): p. 125.
56. Singh, M.V. and A.O. Dokun, *Diabetes mellitus in peripheral artery disease: Beyond a risk factor*. *Front Cardiovasc Med*, 2023. **10**: p. 1148040.
57. Yu, Q., et al., *Stem Cell-Based Therapy for Diabetic Foot Ulcers*. *Front Cell Dev Biol*, 2022. **10**: p. 812262.
58. Howangyin, K.Y. and J.S. Silvestre, *Diabetes mellitus and ischemic diseases: molecular mechanisms of vascular repair dysfunction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(6): p. 1126-35.
59. Kofler, N.M. and M. Simons, *Angiogenesis versus arteriogenesis: neuropilin 1 modulation of VEGF signaling*. *F1000Prime Rep*, 2015. **7**: p. 26.
60. le Noble, F. and C. Kupatt, *Interdependence of Angiogenesis and Arteriogenesis in Development and Disease*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(7).
61. Deindl, E. and P.H.A. Quax, *Arteriogenesis and Therapeutic Angiogenesis-An Update*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(24).
62. Husakova, J., et al., *Comparison of Three Methods for Preparation of Autologous Cells for Use in Cell Therapy of Chronic Limb-Threatening Ischemia in People with Diabetes*. *Int J Low Extrem Wounds*, 2022: p. 15347346221095954.
63. Sojakova, D., et al., *The Use of Autologous Cell Therapy in Diabetic Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia*. *Int J Mol Sci*, 2024. **25**(18).
64. Miyamoto, Y., et al., *Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 627-35.
65. Huerta, C.T., et al., *Mesenchymal stem cell-based therapy for non-healing wounds due to chronic limb-threatening ischemia: A review of preclinical and clinical studies*. *Front Cardiovasc Med*, 2023. **10**: p. 1113982.
66. Husakova, J., et al., *Factors Influencing the Risk of Major Amputation in Patients with Diabetic Foot Ulcers Treated by Autologous Cell Therapy*. *J Diabetes Res*, 2022. **2022**: p. 3954740.
67. Scatena, A., et al., *Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells for Limb Salvage in Diabetic Foot Patients with No-Option Critical Limb Ischemia*. *J Clin Med*, 2021. **10**(10).
68. Awad, O., et al., *Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(4): p. 758-64.
69. Javorkova, E., et al., *The effect of clinically relevant doses of immunosuppressive drugs on human mesenchymal stem cells*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **97**: p. 402-411.
70. Qu, Y., et al., *Cyclosporin A inhibits adipogenic differentiation and regulates immunomodulatory functions of murine mesenchymal stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **498**(3): p. 516-522.
71. Baranovskii, D.S., et al., *Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies*. *Stem Cell Investig*, 2022. **9**: p. 7.

72. Powell, R.J., et al., *Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia*. J Vasc Surg, 2011. **54**(4): p. 1032-41.
73. Teraa, M., et al., *Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial*. Circulation, 2015. **131**(10): p. 851-60.
74. Norgren, L., et al., *PACE: randomized, controlled, multicentre, multinational, phase III study of PLX-PAD for critical limb ischaemia in patients unsuitable for revascularization: randomized clinical trial*. Br J Surg, 2024. **111**(2).
75. Sun, Y., et al., *Effectiveness and safety of stem cell therapy for diabetic foot: a meta-analysis update*. Stem Cell Res Ther, 2022. **13**(1): p. 416.
76. Walter, D.H., et al., *Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PRO-VASA)*. Circ Cardiovasc Interv, 2011. **4**(1): p. 26-37.
77. Okur, K.T., et al., *Assessment of the risk factors determining the prognosis of major and minor limb amputations in patients with diabetic foot ulcers*. Adv Clin Exp Med, 2024. **33**(1): p. 21-30.
78. Noor, S., R.U. Khan, and J. Ahmad, *Understanding Diabetic Foot Infection and its Management*. Diabetes Metab Syndr, 2017. **11**(2): p. 149-156.
79. Yang, S., et al., *Prevalence of multidrug-resistant bacterial infections in diabetic foot ulcers: A meta-analysis*. Int Wound J, 2024. **21**(4): p. e14864.
80. Aboulhoda BE, Abd El Fattah S. *Bone marrow-derived versus adipose-derived stem cells in wound healing: value and route of administration*. Cell Tissue Res. 2018, 374(2): p. 285-302.
81. Lu D, Chen B, et al., *Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial*. Diabetes Res Clin Pract. 2011, 92(1): p. 26-36.
82. Iwase T, et al., *Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia*. Cardiovasc Res. 2005, 66(3): p. 543-51.
83. Losordo DW, et al., *Autologous CD34+ Cell Therapy for Critical Limb Ischemia Investigators. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia*. Circ Cardiovasc Interv. 2012, 5(6): p. 821-30.
84. Arruda VR, et al., *The mutation Ala677-->Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis*. Thromb Haemost. 1997, 77(5): p. 818-21.
85. Ames PRJ, et al., *Earlier onset of peripheral arterial thrombosis in homozygous MTHFR C677T carriers than in other MTHFR genotypes: a cohort study*. Clin Exp Med. 2023 23(2): p. 03-509.
86. Luo Y, et al., *The incidence of lower extremity amputation and its associated risk factors in patients with diabetic foot ulcers: A meta-analysis*. Int Wound J. 2024, 21(7): p. e14931.

87. Kurniawati A, Ismiarto YD and Hsu IL. *Prognostic Factors for Lower Extremity Amputation in Diabetic Foot Ulcer Patients*. J Acute Med. 2019, 9(2): p. 59-63.
88. Salaun P, et al., *Comparison of Ankle Pressure, Systolic Toe Pressure, and Transcutaneous Oxygen Pressure to Predict Major Amputation After 1 Year in the COPART Cohort*. Angiology. 2019, 70(3): p. 229-236.
89. Ha DH, et al., *Effects of tacrolimus on morphology, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells derived from gingiva tissue*. Mol Med Rep. 2016, 14(1): p. 69-76.
90. DeTemple V, et al., *Effects of mammalian target of rapamycin inhibitors on cytokine production and differentiation in keratinocytes*. Exp Dermatol. 201, 25(10): p. 775-82.
91. Greenberger S, et al., *Rapamycin suppresses self-renewal and vasculogenic potential of stem cells isolated from infantile hemangioma*. J Invest Dermatol. 2011, 131(12): p. 2467-76.
92. Ren Y, et al., *Effects of tacrolimus on the TGF- β 1/SMAD signaling pathway in paraquat-exposed rat alveolar type II epithelial cells*. Mol Med Rep. 2020, 22(5): p. 3687-3694.
93. Lawall H, Bramlage P and Amann B. *Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal*. Thromb Haemost. 2010, 103(4): p. 696-709.
94. Dong Y, Yang Q and Sun X. *Comprehensive Analysis of Cell Therapy on Chronic Skin Wound Healing: A Meta-Analysis*. Hum Gene Ther. 2021, 32(15-16), p. 787-795.
95. Arango-Rodríguez ML, et al., *A novel therapeutic management for diabetes patients with chronic limb-threatening ischemia: comparison of autologous bone marrow mononuclear cells versus allogenic Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther. 2023, 25;14(1): p. 221.
96. Zhu Y, et al., *Safety and efficacy of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of patients with aging frailty: a phase I/II randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Stem Cell Res Ther. 2024, 29;15(1): p. 122.

11 Přílohy

11.1 Comparison of Three Methods for Preparation of Autologous Cells for Use in Cell Therapy of Chronic Limb-Threatening Ischemia in People with Diabetes.

Husakova J, Bem R, Jirkovska A, Nemcová A, Fejfarová V, Sutoris K, Kahle M, Jude EB, Dubsy M. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2022 Apr 24;15347346221095954. doi: 10.1177/15347346221095954. ISSN 1534-7346. eISSN 1552-6941. IF 2,057 z r. 2020. Q3

11.2 Factors Influencing the Risk of Major Amputation in Patients with Diabetic Foot Ulcers Treated by Autologous Cell Therapy.

Husakova J, Bem R, Fejfarová V, Jirkovska A, Wosková V, Jarošíková R, Lovásová V, Jude EB, Dubsy M. *Journal of diabetes research*. 2022 Apr 11;2022:3954740. doi: 10.1155/2022/3954740. ISSN 2314-6745. e-ISSN 2314-6753. IF 4,011. Q2

11.3 The Effects of Immunosuppressive Drugs on the Characteristics and Functional Properties of Bone Marrow-Derived Stem Cells Isolated from Patients with Diabetes Mellitus and Peripheral Arterial Disease.

Husakova J, Echalar B, Kossl J, Palacka K, Fejfarova V, Dubsy M. *Biomedicines*. 2023 Jun 30;11(7):1872. doi: 10.3390/biomedicines11071872. PMID: 37509511; PMCID: PMC10377428. IF 3,9 z r.2023

11.4 Comparison of the Impact of Autologous Cell Therapy and Conservative Treatment on Chronic Limb-Threatening Ischemia in Patients with Diabetic Foot: A Randomized Controlled Trial

Dubsy M, Bem R, Nemcova A, Husakova J, Fejfarova V, Jirkovska A, Sutoris K. *Diabetes* 2020;69(Suppl1):219-OR
80th Scientific Sessions American Diabetes Association, Chicago, USA, 12. - 16. 6. 2020

11.5 Does foot infection influence the effect of autologous cell therapy on ischemic diabetic foot ulcers?

Hazdrová J, Bém R, Němcová A. Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. *IDF Abstract Book 2019*. 25(1):OP-0117
25th International Diabetes Federation Congress, Busan, Jižní Korea, 2. – 6. 12. 2019

11.6 Assessment of Systemic Vasculogenesis After Autologous Cell Therapy of Ischemic Diabetic Foot

Hazdrova J, Bem R, Nemcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Woskova V, Sutoris K, Thieme F, Dubsy M. *ISDF Abstract Book 2019*; 8(O7.2):15
8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019

- 11.7** Does Cell Therapy Improve the Quality of Life of Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia? A Randomized Controlled Trial
Husakova J, Bem R, Nemcova A, Fejfarova V, Jirkovska A, Dubsky M. Diabetes 2020;69(Suppl1):221-OR
80th Scientific Sessions American Diabetes Association, Chicago, USA, 12. - 16. 6. 2020
- 11.8** Factors influencing the risk of major amputation of patients with diabetic foot disease treated by autologous cell therapy
Husáková J, Bém R, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Jarošíková R, Dubský M. DFSG Abstract Book 2021; 17(1):OP28
17th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, virtual, 24. - 25. 9. 2021
- 11.9** Impact of immunosuppressive drugs on the metabolic activity and functional properties of stem cells isolated from the bone marrow of diabetic patients
Husáková J, Echalar B, Bem R, Jarošíková J, Fejfarová V, Jirkovská A, Kossl J, Holan V, Dubský M. Diabetologia 2021;64(Suppl1):576
57th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Virtual Meeting, 27. 9. - 1. 10. 2021
- 11.10** Does the immunosuppressive treatment reduce the healing potential of stem cells separated from bone marrow of diabetic patients?
Husáková J, Echalar B, Bem R, Jarošíková R, Fejfarová V, Jirkovská A, Kossl J, Palacká K, Dubský M, Holáň V. EWMA Abstract Book 2022;22(1):S169
32nd European Wound Management Association, Paříž, Francie, 23. – 25. 5. 2022
- 11.11** The major amputation risk stratification using diabetic foot ulcer classifications in patients with critical limb-threatening ischemia after autologous stem cell therapy
Husáková J, Bém R, Jirkovská A, Wosková V, Jarošíková R, Fejfarová V, Dubský M. DFSG Abstract Book 2022; 18(1):58
18th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko 16. - 18. 9. 2022