

# Novšie metódy v konzervatívnej liečbe diabetickej nohy

E. Martinka, D. Mištuna

## Súhrn

Diabetické komplikácie na nohe sú v rozvinutých krajinách najčastejšou príčinou amputácií na dolných končatinách z iných ako pourazových príčin, pričom riziko amputácie nohy u diabetikov je 15 – 40krát vyššie než v bežnej populácii. V posledných rokoch sa možnosti liečby pacientov s diabeticou nohou rozšírili o niekoľko nových metód, ako je napríklad podpora granulácie riadeným podtlakom, podpora granulácie a epitelizácie u dlhodobu sa nehojajúcich defektov pomocou cytokínov, rastových faktorov a ďalších komponentov prostredníctvom aplikácie živých bunkových línií či liečba defektov a ischemie terapeutickou angiogenezou pomocou autotransplantácie endotelových progenitorových buniek z kostnej drene alebo periférnej krvi. Záujem sa taktiež obnovil o niektoré staronové metódy, ako je biologický debridement s využitím lariev bzučivky zelenej.

## Kľúčové slová

diabetická noha – liečba podtlakom – larvoterapia – Apligraf – endotelové progenitorové bunky

## Summary

**Novel methods in conservative treatment of diabetic foot.** Diabetic foot complications are the most frequent reason for amputations of lower extremities for other than posttraumatic causes in developed countries. Risk of amputation is 15–40 times higher than in the general population. Treatment options in patients with diabetic foot have expanded over the recent years to include new methods, such as the use of negative pressure devices to facilitate granulation, use of cytokines, growth factors and other components to facilitate granulation and epithelisation in long-term poorly healing wounds through application of living cell lines, treatment of wounds and ischemia by therapeutic angiogenesis through bone marrow or peripheral endothelial progenitor cells autotransplantation. Interest has also increased in renewed application of older methods, such as biological debridement using blowfly larvae (Maggot Debridement Therapy).

## Keywords

diabetic foot – negative pressure therapy – maggot therapy – Apligraf – endothelial progenitor cells

Diabetické komplikácie na nohe sú v rozvinutých krajinách najčastejšou príčinou amputácií na dolných končatinách z iných ako pourazových príčin, pričom riziko amputácie nohy u diabetikov je 15 – 40krát vyššie než v bežnej populácii. Drvivá väčšina diabetických komplikácií postihujúcich nohu a vedúcich k amputácii súvisí so syndrómom diabetickej nohy, charakteristickej tvorbou defektu (ulcerácie). Takýto nález predchádza amputácii až v 85 %. Komplikácia označovaná ako syndróm diabetickej nohy je podľa WHO definovaná ako infekcia, ulcerácia a/alebo deštrukcia tkanív nohy v dôsledku neuropatie a/alebo ischemie. Táto komplikácia sa v priebehu ochorenia môže rozvinúť až u 15 % pacientov s diabetes mellitus (DM) (tab. 1).

Z hľadiska pacienta ide o komplikáciu, ktorá silne ovplyvňuje jeho ďalší

život, a to zdravotne, psychicky aj sociálne. Z hľadiska každodennej praxe ide o medicínsky, časovo i finančne veľmi náročný problém a o jednu z najčastejších príčin hospitalizácie diabetickej pacientov. V USA a vo Veľkej Británii hospitalizácie súvisiace s komplikáciami na nohe tvoria až 25 % hospitalizácií diabetikov a finančné náklady na komplikácie postihujúce nohu diabetika sa podľa viacerých prameňov pohybujú od 20 % (v rozvinutých krajinách) po 40 % (v rozvojových krajinách) celkových výdavkov na DM. Hospitalizácie pre diabeticú nohu patria zároveň k najdlhším (obvykle v trvaní niekoľkých týždňov). Priemerná doba hojenia diabetickej ulcerácie býva 11 – 14 týždňov. Rekurencia zhojenej ulcerácie v priebehu piatich rokov je až 50 – 70 %.

Prevalencia diabetickej nohy v rozvinutej forme (prítomnosť defektu/ulcerácie) sa podľa viacerých autorov pohybuje v rozsahu 3 – 10 % všetkých diabetikov, pričom ročná incidencia je 2 – 11 % (tab. 1). Pokročilé štádiá, ako defekty komplikované osteomyelitídou alebo gangrénou, sa vyvinú asi v 2 – 4 % pacientov. Môžu viesť k odumretiu tkanív postihnutej časti nohy s potrebou amputácie, ale tiež k rýchlemu šíreniu infekcie a ohrozovať život pacienta septickou reakciou. Amputačnému výkonu na nohe sa ešte stále nevyhne asi 0,25 – 1,8 % pacientov ročne, pričom ide prevažne o amputácie pod členkom. V rámci celého sveta sa amputačný výkon v dôsledku diabetickej nohy vykonáva zhruba každých 30 sekúnd a opakovanej amputácii v priebehu piatich rokov sa podrobí až 12 % pa-

cientov. Mortalita po amputácii v priebehu piatich rokov sa uvádza u 39 – 68 % pacientov.

Medicínska i celospoločenská závažnosť problematiky diabetickej nohy je teda vysoká. Podľa niektorých autorov riziko amputácie by sa dalo znížiť až o 40 – 85 %. Vyžaduje si to aktívne vyhľadávanie rizikových pacientov, včasnú detekciu defektov, dobrú organizáciu starostlivosti, zakladanie podiatrických centier, fungujúcu medziodborovú starostlivosť (spolupráca medzi diabetológom, chirurgom, podiatrom, neurológom, ortoprotetikom a dermatológom), dobre vedenú liečbu, a najmä edukáciu a spoluprácu pacientov.

## NOVŠIE METÓDY V LIEČBE DIABETICKÝCH ULCERÁCIÍ

Za hlavné patofyziologické momenty vedúce k rozvoju diabetickej nohy sa dlhodobo považujú diabetická neuropatia, deformity a deformácie, makroangiopatia, infekcia a samozrejme zlá metabolická kompenzácia. V poslednej dobe sa však význam pripisuje aj ďalším dôležitým faktorom, ako znížená odolnosť voči infekcii, funkčné zmeny mikrocirkulácie a abnormality v expresii a aktivite rastových faktorov a cytokínov, ktoré sa zúčastňujú hojenia a reparácie. Tieto faktory sa podieľajú predovšetkým na predĺženom hojení diabetickej defektov, resp. ich prechodom do chronicity.

Základom liečby u všetkých pacientov s diabeticou nohou je preto optimalizácia glykemickej kontroly s uprednostnením liečby inzulínom pre viacero priaznivých metabolických, ale aj paraglykemických efektov (napr. na endotel a jeho reparáciu pri poškodení) [20], odľahčenie a rehabilitácia končatiny, liečba infekcie, ischémie, neuroprotektívna liečba a liečba sprievodných ochorení (anémia, hypertenzia, hepatálne ochorenie, dyslipidémia apod.) [9,21–24,26].

V podpornej neuroprotektívnej liečbe sa veľmi dobré výsledky dosahujú podávaním kyseliny tioktovej (napr. Thiogamma), s významným ústupom

**Tab. 1. Epidemiologické údaje o diabetickej nohe.**

Parameter	Hodnota
riziko rozvinutia ulcerácie v priebehu trvania diabetes mellitus (života)	15 %
incidencia ulcerácií za rok	2 – 11 %
prevalencia ulcerácií	3 – 10 %
rekurencia ulcerácie v priebehu piatich rokov	50 – 70 %
priemerná doba hojenia	11 – 14 týždňov
amputácie za rok na počet pacientov	0,25 – 1,8 %
prevažný typ amputácie	pod členkom
rekurencia amputácie za päť rokov	12 %
5-ročná mortalita po amputácii	39 – 68 %
podiel na výdavkoch za diabetes	20 – 40 %
riziko amputácií u Afričanov, resp. Indiánov (verzus kaukazská rasa)	1,6-; resp. 4krát vyššie
muži/ženy	1,6krát vyššie u mužov

subjektívnych ťažkostí (parestézie, dysestézie), ale aj objektívnych prejavov, potvrdených v randomizovaných placebom kontrolovaných štúdiách. Ďalším prípravkom s potvrdeným priaznivým efektom sú vitamíny skupiny B (benfotiamín, cyanocobalamín) vo forme rozpustnej v tukoch (napr. Milgamma). Podľa niektorých autorov benfotiamín môže priaznivo ovplyvňovať aj endotelové progenitorové bunky, ktoré sa zúčastňujú obnovy pri vaskulárnom poškodení [25]. V liečbe neuropatickej bolesti sa s dobrým efektom využívajú antiepileptiká, najmä gabapentín (napr. Gabagamma), pregabalín, a i., a novšie antidepresíva (duloxetin) [21–24].

V rámci lokálnej liečby je kľúčovým faktorom dôsledný debridement (odstránenie nekrotického, devitalizovaného a infikovaného tkaniva). Uprednostňujú sa vlhké, resp. nevysušajúce antimikrobiálne, neadhezívne a neadhézujúce preväzové techniky [9,22–24].

Pri ischemickej nohe a ischemických defektoch je okrem základnej liečby nevyhnutným predpokladom zlepšenie (obnovenie) prekrvenia, pričom za najúčinnější spôsob možno považovať intervenčnú revaskularizáciu. Z farmakologických možností s priaznivým ovplyvnením ischémie treba spomenúť liečbu prostaglandínom – alprostadil. V lokálnej liečbe gangrény dominujú

suché dezinfekčné postupy a nekrektómia s následnou podporou granulácie a epitelizácie nevysušujúcimi prípravkami s antimikrobiálnymi vlastnosťami [9,21–24,26].

Keďže základným terapeutickým prístupom v liečbe diabetickej nohy bolo v posledných rokoch v slovenskej literatúre venované pomerne veľa prác [21–24,26], na tomto mieste sa zaoberáme len niektorými novšími možnosťami liečby, ako je podpora granulácie riadeným podtlakom, biologický debridement s využitím lariev, podpora granulácie a epitelizácie u dlhodobo sa nehojajúcich defektov pomocou cytokínov, rastových faktorov a ďalších komponentov prostredníctvom aplikácie živých bunkových línií, či liečba defektov a ischémie terapeutickou angiogenezou pomocou autotransplantácie kmeňových/progenitorových buniek z kostnej drene alebo periférnej krvi.

### 1. Podpora granulácie riadeným podtlakom

Liečba pomocou riadeného podtlaku – tzv. Vacuum Assisted Closure Therapy (VAC) sa v ostatnom čase čoraz častejšie využíva ako veľmi účinná metóda pre podporu granulácie a urýchlenie prirodzeného hojenia diabetickej rán a postamputačných defektov. K dispozícii je viacero randomizovaných kon-



**Obr. 1a.** Liečba riadeným podtlakom. (a) pred aplikáciou podtlaku, (b) nálež tesne po zložení prevázov po aplikácii podtlaku.



**Obr. 1b.** Liečba riadeným podtlakom. (a) pred aplikáciou podtlaku, (b) priebeh hojenia pri aplikácii podtlaku, (c) priebeh hojenia pri aplikácii podtlaku, (d) stav po opakovaných aplikáciách podtlaku.

trolovaných štúdií, ktoré dokázali, že pri použití podtlaku sa zvyšuje podiel uzatvorených diabetickej defektov, skraca sa čas hojenia a znižuje sa riziko amputácií [2–4,8,10,27]. Pri tejto

metóde sa na celý rozsah defektu (po predošlom dôkladnom debridemente) aplikuje špeciálna podložka zo sieťovaného polyuretánu alebo viacvrstvovej tkaniny, ktorá slúži ako mechanické

zabezpečenie mechanického rozloženia podtlaku a tiež ako „nárazníková“ zóna mechanicky ochraňujúca spodinu a okraje defektu. Na túto podložku a okolie defektu v šírke cca 2 – 3 cm sa adaptuje vzduchotesná fólia a následne sacia/odváždzacia hadička, ktorá sa pripája na samotnú pumpu vytvárajúcu podtlak v rozsahu od mínus 50 po mínus 200 mmHg. Podtlak je možné aplikovať kontinuálne alebo prerušovane. Dnes je na trhu viacero podtlakových púmp (firma K.C.I, Genadyn a iné). Princíp liečby je rovnaký, odlišnosti sú v postupe adaptácie odsávacieho setu na defekt, možnostiach nastavenia niektorých parametrov a prenosnosti pumpy.

Pri aplikácii podtlaku sa v defekte zvyšuje kapilárny prietok krvi, redukuje sa edém interstícia a tiež kolonizácia defektu baktériami odsávaním zápalového detritu, čo komplexným spôsobom prispieva k podpore granulácie spodiny defektu a zásadnému urýchleniu hojenia [3,4,17,27,32]. Systém sa ponecháva 2 – 3 dni, metóda je bezpečná a celý proces možno viackrát zopakovať (obr. 1).

Liečba riadeným podtlakom sa využíva predovšetkým na urýchlenie liečby rozsiahlejších a hlbších neuropatických defektov a postamputačných defektov. Existujú však určité rozdiely v taktike aplikácie podtlaku v závislosti na tom, či sa jedná o postamputačný defekt pre ischémiu alebo osteomyelitídu. Pri neuropatických defektoch, ktoré sú dobre prekrvené, je možné aplikovať vyšší podtlak (obvykle 150 – 175 mmHg), a to kontinuálne, bez prerušenia počas celých troch dní. Pri postamputačných defektoch, dôvodom ktorých bola ischémia (gangréna), indikácia použitia pumpy závisí od kvality prekrvenia a je vhodné, ak súčasťou chirurgického výkonu bol aj revaskularizačný zákrok. Aj v tom prípade je vhodnejšie podtlak aplikovať v nižšej úvodnej intenzite 50 – 75 mmHg (aby nedošlo ku kolapsu mikrocirkulácie) a prerušovane, v trvaní do dvoch dní s následným vyhodnotením efektu. V týchto prípadoch sa ako výhodné javí doplniť liečbu pod-



tlakom paralelným podávaním prostaglandínov v i.v. infúzií. Aplikácia vyššieho podtlaku u pacientov s ischemiou býva bolestivá a výsledok môže byť kontraproduktívny. Granulácie (pokiaľ sa dosiahnu) nie sú plnohodnotné a dobre prekrvené rýchlo zanikajú, čo môže viesť aj k zhoršeniu lokálneho nálezu. Pri defektoch a postamputačných ranách, pri ktorých sú odkryté kosti, resp. ich pahýle, je rozhodujúcim momentom dosiahnutie ich prekrytia plnohodnotným granulačným tkanivom. VAC možno použiť aj na „zlepenie“ podmínovaných okrajov defektu k spodine. Predpokladom je vždy predošlé vyriešenie známkov eventuálnej infekcie. Po vyplnení defektu možno aj u ischemických defektov použiť vyššiu a kontinuálnu aplikáciu podtlaku. Samotné gangrény ani postamputačné ischemické defekty bez súčasnej revaskularizácie a osteomyelitické komplikácie liečiť podtlakom nie je vhodné [22–24].

## 2. Biologický debridement s využitím lariev bzučivky zelenej („Maggot therapy“)

Využívanie lariev bzučivky zelenej „larvoterapia“ alebo v anglickej literatúre „Maggot therapy“ ako metódy biologického debridementu pri liečbe rán má svoju dlhú históriu. Po zavedení antibiotík (ATB) táto metóda ustúpila. V posledných rokoch sa opäť teší záujmu najmä v súvislosti s chronickými, dlhodobo sa nehojacimi diabetickými ulkuzmi infikovanými multi-rezistentnými bakteriálnymi kmeňmi [22–24,33,34].

Debridement (odstránenie devitalizovaných, nekrotických a infikovaných tkanív) sa považuje za základný predpoklad pre hojenie chronických diabetickej defektov. Mnohé neuropatické a venózne defekty sú infikované multi-rezistentnými bakteriálnymi kmeňmi ako *Staphylococcus aureus*, methicilín rezistentný *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* apod. Klasický debridement býva náročný pre bolesť (venózne defekty) alebo anatomický charakter defektu a ATB ani lokálna



Obr. 2a. Larvoterapia. (a) pred aplikáciou lariev, (b) aplikácia lariev, (c) aplikácia lariev, (d) po aplikácii lariev.



Obr. 2b. Larvoterapia. Aplikácia lariev.

liečba nevedú k zlepšeniu klinického nálezu. Alternatívou u takýchto pacientov môže byť práve aplikácia lariev bzučivky zelenej (*Lucilia sericata*), ktoré sa využívajú pre ich schopnosť diferencovane požírať mŕtve a infikované tkanivá, čím ranu dokonale vyčistia

a súčasne eliminujú bakteriálne osídlenie. Zdravé tkanivo zostáva intaktné. Okrem mechanického efektu sa tiež predpokladá, že niektoré výlučky lariev majú antimikrobiálne účinky a podporujú granuláciu, a tým aj hojenie rany [25,30,31,36].

Larvy sa aplikujú priamo na spodinu defektu v počte cca 5 – 8 cm<sup>2</sup> a prekryjú sa preväzom vo forme vzdušnej „klietky“, ktorá im umožňuje dýchať a súčasne bráni ich úniku z defektu. Klietka pozostáva z jednostranne lepivej hydrokoloidnej podložky, ktorá sa adaptuje na okolie defektu ako prstenec. Na túto podložku sa následne pripevní jemná vzdušná tkanina dostatočne hustá, aby larvy cez ňu neunikli. Inou možnosťou je aplikácia lariev v predpripravených „vreckách“. Larvy sa v rane ponechávajú 1 – 3 dni. Počas tejto doby znásobia svoju veľkosť, pričom ich metabolickú aktivitu charakterizuje žltozelený sekrét s charakteristickým pachom. Následne sa z rany vypláchnu a zničia sa ako bio-

logický odpad benzínalkoholom. Podľa potreby možno celý liečebný proces viackrát zopakovať. Po aplikácii lariev je možné konštatovať vyčistenie a oživenie defektu a dochádza k podstatnému urýchleniu jeho hojenia (obr. 2) [15,27,28,31].

### 3. Dermoepidermálne štepy a „mesh“ plastika

V prípade rozsiahlych defektov a post-amputačných rán (nezávisle na etiológii), ktoré by sa hojili veľmi dlho a boli by vystavené riziku infekcie a mechanickému dráždeniu, je potrebné po zvládnutí eventuálnej infekcie podporiť vyplnenie defektu zdravým, dobre prekrveným granulačným tkanivom a následne

podľa klinickej úvahy defekt prekryť dermoepidermálnym autotransplantátom. O spôsobe rozhoduje chirurg. Možno použiť väčšie kožné štepy prekryvajúce celý defekt, alebo viacero menších (niekoľko milimetrov) štepy, ktoré sa transplantujú na spodinu defektu ako ostrovčeky – „mesh“ plastika. Ostrovčeky sa obvykle odoberajú z prednej strany a hornej polovice kože stehna.

Po naložení sa ostrovčeky rozrastú a prepitelizujú okolie, čím sa následne spoja do súvislého kožného krytu (obr. 3) [22–24,26].

### 4. Podpora granulácie a epitelizácie pomocou cytokínov, rastových faktorov a ďalších komponentov prostredníctvom aplikácie živých bunkových línií (Apligraf)

Porucha hojenia rán a ich častý prechod do chronicity je charakteristickým problémom u pacientov s diabetes mellitus. Takéto defekty sú vystavené riziku infekcie a jej progresie na hlbšie štruktúry vrátane kosti a kĺbov, keď často jediným riešením zostáva amputácia.

Pri dlhodobom sa nehojacich defektoch napriek využitiu obvyklých terapeutických postupov, po zvládnutí infekcie a pri dostatočnom krvnom zásobení je aktuálnou metódou snaha o nabudenie hojivých procesov vlastnej kože vytvorením prostredia (cytokíny, rastové faktory) pomocou „donorov“ – živých bunkových prípravkov podobných koži, ktoré takéto prostredie vytvárajú. Takouto metódou je použitie bunkového preparátu Apligraf. Ide o biologicky aktívny preparát – ekvivalent ľudskej kože, pozostávajúci z dvoch vrstiev živých buniek kože (fibroblasty a keratinocyty) získaných z predkožky novorodenca v extracelulárnej matrix. Iné komponenty kože Apligraf neobsahuje, čo znižuje riziko nežiadúcich zápalových a imunologických reakcií. Nejedná sa však o transplantát. Mechanizmus účinku spočíva v tom, že prípravok je zdrojom rastových faktorov, cytokínov, antimikrobiálne a analgeticky pôsobiaceho produktu, ktoré aktivujú hojivé



**Obr. 3.** Príklady „mesh plastiky“ u pacientov po kompletnej TMT amputácii nohy s rozsiahlou zbytkovou ranou. (a) pred aplikáciou, (b) po aplikácii, (c) 3. – 4. týždeň po aplikácii, (d) cca dva mesiace po aplikácii, (e) pred aplikáciou, (f) cca dva mesiace po aplikácii.



procesy v samotnej rane [1,6,29]. Aplikuje sa priamo na spodinu defektu po predošlej príprave, ktorá spočíva v dôslednom „agresívnom“ debrideamente až po zdravé dobre prekrvené tkanivá. Prípravok tak súčasne slúži aj ako bariéra proti infekcii, mechanickému tlaku a vysychaniu defektu [1].

Indikáciou pre Apligraf u pacientov s diabetes mellitus sú dlhodobé sa nehojace neuropatické defekty a venózne defekty (ulcera cruris) napriek využitiu bežných dostupných postupov. Randomizované štúdie v oboch indikáciách dokázali signifikantne väčší podiel vyhojených defektov (cca o 30 – 50 %) v porovnaní so štandardnou liečbou, ako aj signifikantné skrátenie času (cca o 30 – 50 %) potrebného na zhojenie defektu a nižšiu rekurenciu defektov [7,14,35]. Kontraindikáciou použitia je prítomnosť klinicky významnej infekcie a známa alergija na bovinný kolagén obsiahnutý v extracelulárnej matrix prípravku. Efektívnosť liečby tiež znižuje nedostatočné arteriálne prekrvenie.

Apligraf po jeho „vyrobení“ má životnosť cca päť dní a musí byť uskladňovaný pri izbovej teplote. Po otvorení balenia musí byť aplikovaný v priebehu niekoľkých minút. Pred naložením Apligrafu je nutné preparát „aktivovať“ vytvorením drobných rezov pomocou skalpela na niekoľkých miestach. Zmyslom tohto postupu je zvýšiť intenzitu uvoľňovania humorálnych faktorov do rany. Apligraf je potrebné po okrajoch prifixovať k okolitej koži, aby sa zabránilo jeho posunutiu a znehodnoteniu. Na prekrytie Apligrafu sa používajú špeciálne neadhezívne a nesavé silikónové preväzy, aby sa zabránilo odsávaniu humorálnych faktorov do preväzu a prirasteniu preväzu do rany. Na takýto primárny preväz sa potom naloží sekundárny preväz pozostávajúci obvykle zo sterilných štvorcov gázy v niekoľkých vrstvách, ktorý súčasne slúži aj ako tlaková fixácia Apligrafu na ranu. Primárny preväz je potrebné nechať bez zásahu cca 7 – 10 dní. Sekundárny preväz je možné aktualizovať už po 3 – 5 dňoch od naloženia. Ak by sa primárny preväz



**Obr. 4. Podpora granulácie a epitelizácie pomocou cytokínov, rastových faktorov a ďalších komponentov prostredníctvom aplikácie živých bunkových línií (Apligraf).**

vymenil skôr, mohlo by to významne znížiť očakávaný efekt liečby. Ak sa primárny previaz vymení po 8 – 10 dňoch, obvykle sú už znateľné znaky aktivácie epitelizácie defektu po jeho okrajoch a vyplnenie rany granulačným tkanivom (obr. 4) [22–24]. V našej praxi sme sa pri venózných ulkusoch stretli aj so situáciou, keď sa epitelizácia aktivovala nielen po okrajoch, ale aj v strede defektu, kde sa začali vytvárať akési epitelizačné ostrovčeky. Domnievame sa, že by to mohlo súvisieť s aktiváciou a následnou diferenciáciou prítomných prekursorových (kmeňových) buniek kože príslušnými rastovými faktormi. Tieto nálezy však bude potrebné vyhodnotiť u viacerých pacientov. Efekt liečby je v niektorých prípadoch možné zvýšiť opakovaným podaním Apligrafu [35].

### 5. Liečba ischémie dolných končatín autotransplantáciou endotelialných progenitorových buniek z kostnej drene alebo periférnej krvi

Využívanie kmeňových buniek v medicíne je predmetom reálnej nádeje a súčasne témou vážnych etických a právnych diskusií, nakoľko viaceré výskumy predpokladali použitie embryonálnych mezenchýmových kmeňových buniek schopných diferencovať sa na akékoľvek tkanivá. To však predpokladá

zahubenie vyvíjajúceho sa jedinca a je z etického hľadiska neprípustné.

Kmeňové bunky podobné embryonálnym kmeňovým bunkám z rôznym potenciálom diferenciácie, ale aj iné typy kmeňových buniek sa však nachádzajú aj v pupečníkovej krvi a niektoré typy kmeňových (progenitorových) buniek, vrátane endotelových progenitorových buniek, pretrvávajú aj v dospelom organizme. Nachádzajú sa v jednotlivých orgánoch a tkanivách organizmu (vrátane kostnej drene a periférnej krvi) a sú zodpovedné najmä za reparačné procesy po poranení [11–13,20,25].

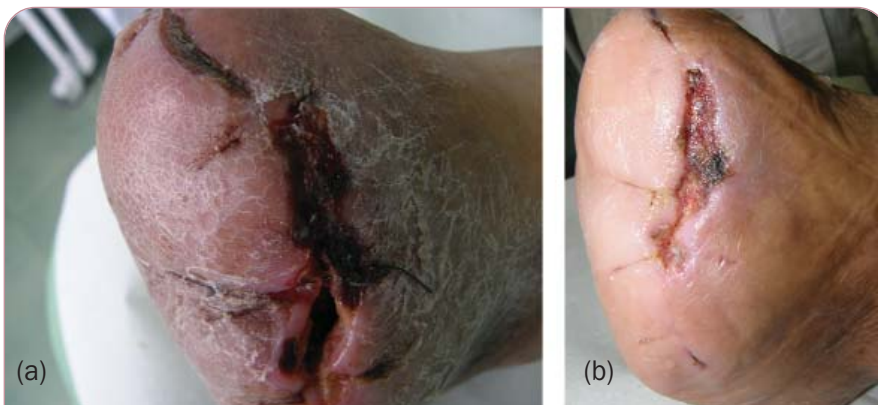
Endotelové progenitorové bunky (EPC) participujú na postnatálnom raste a novotvorbe ciev. Inkorporáciou do poškodených miest endotelu sa zúčastňujú vaskulárnej reparácie, regenerácie a angiogenézy. Prejavujú antitrombotický, antiinflamačný potenciál a vedú tiež k redukcii neointimálnej proliferácie [11–13,20,25].

Ukázalo sa, že hladiny EPC v periférnej krvi silne korelujú s funkciami endotelu a považujú sa aj za nezávislý prediktor (marker) kardiovaskulárneho rizika a vaskulárneho poškodenia. Predpokladá sa, že pokles počtu EPC, resp. ich dysfunkcia má vzťah k ateroskleróze a kardiovaskulárnym ochoreniam vrátane periférnych arteriálnych ochorení dolných končatín [11–14,37].

V súlade s uvedeným sa v posledných rokoch využíva terapeutický potenciál EPC ovplyvnením ich hladín a ich lokálnou aplikáciou najmä pri periférnych arteriálnych ochoreniach s kritickou ischémiou v inoperabilnom teréne. Boli tiež použité u pacientov s koronárnou chorobou srdca [5,16,19,37,38].

U pacientov s diabetes mellitus sú hladiny EPC znížené a negatívne korelujú s hladinami glykémie (FPG aj PPG) [11–14]. Hyperglykémia mechanizmom glukotoxicity poškodzuje viaceré z ich funkčných vlastností, napr. schopnosť diferenciácie [11–14,25]. Naopak liečba inzulínom zvyšuje ich počet v periférnej krvi a má priaznivý efekt aj na ich funkcie [11–14,20].

Viacero štúdií z posledných rokov ukázalo, že autotransplantácia (kmeňových/progenitorových) buniek z kostnej drene alebo mononukleárných buniek periférnej krvi, ktoré obsahujú aj EPC, môže zlepšiť prognózu u pacientov s kritickou ischémiou dolných končatín, u ktorých nie je možná klasická revascularizácia (obvyklým riešením je amputácia s vysokým podielom mortality), a to vďaka novotvorbe ciev, ktoré sú transplantované bunky schopné navodiť v postihnutom tkanive [5,16,18,19,37,38]. Za týmto účelom sa v jednotlivých prácach podávali neselektované bunky kostnej drene, neselektované kmeňové bunky z periférnej krvi alebo novšie, selektované bunky získané z drene alebo periférnej krvi so znakmi CD133+ a CD34+ charakteristickými pre funkčné EPC. Predpokladajú sa viaceré možnosti uplatnenia priaznivého účinku takejto liečby. Jednou z nich je nepriamy, parakrinný efekt. Kmeňové/progenitorové bunky produkujú angiogénne faktory, ako napr. vaskulárny endotelový rastový faktor, základný fibroblastový rastový faktor, ktoré podporujú angiogenézu. Druhou možnosťou je priama tvorba nových ciev (angiogenéza) prostredníctvom prítomných progenitorových endotelových buniek [5,16,18,19,37,38]. Príklad výsledkov liečby pacienta z nášho pracoviska ukazuje obr. 5.



**Obr. 5. Liečba ischémie autotransplantáciou endotelialných progenitorových buniek. (a) pacient po kompletnej TMT amputácii nohy pre gangrénu s kritickou ischémiou v teréne inoperabilnom v zmysle revascularizačného zákroku (vrátane pokusu o takýto zákrok) s pokračujúcou nekrotizáciou spodiny aj okrajov defektu a hroziacou vyššou amputáciou, (b) pacient cca mesiac po aplikácii endotelových progenitorových buniek získaných z periférnej krvi po predošlej stimulácii G-CSF.**





Obr. 6. Príklad výsledku liečby s využitím kombinácie viacerých techník.

Kmeňové/progenitorové endoteliálne bunky za účelom liečby ischémie dolných končatín sa získavajú buď z kostnej drene, alebo z periférnej krvi po predošlej stimulácii humánnym rekombinantným G-CSF (granulocyte – colon-stimulating factor), po ktorej sa zvýšene vyplavujú do krvi. Krvotvorné kmeňové bunky vrátane EPC tvoria v periférnej krvi totiž len veľmi malú populáciu, asi 0,1 %, patriacu medzi mononukleárne bunky. Po stimulácii sa ich podiel násobne zvýši [5,16,19,37,38].

Pri separácii sa využíva diferenciálna centrifugácia (aferéza) s využitím analýzy CD znakov pomocou prietokovej cytometrie, resp. ďalšie selekčné metódy. Získané bunky sa potom aplikujú intramuskulárne do svalov predkolenia a nohy (v niektorých prácach aj intraarteriálne), kde vyvolávajú novotvorbu ciev. Pacientovi sa teda transplantujú jeho vlastné bunky (autológna transplantácia). Keďže pacienti s diabetom a ischémiou dolných končatín obvykle majú aj koronárnu chorobu srdca, pacient by mal byť pred zákrokom vyšetrený kardiológom. Počas stimulácie G-CSF (obvykle 10 ug/kg/deň počas 4 – 5 dní) vzhľadom k potenciálnemu prokoagulačnému vedľajšiemu efektu by mal pacient dostávať terapeutickú antikoagulačnú liečbu [19,37,38].

Kmeňové bunky boli s úspechom použité tiež v liečbe nehojajúcich sa rán a poranení.

Jednotlivé uvedené metódy liečby sa môžu vhodne dopĺňať a nadväzovať na seba. Napríklad pri rozsiahlejších a hlbších v úvode infikovaných defektoch je po využití biologického debridementu vhodné následne podporiť granuláciu riadeným podtlakom a následne aplikovať dermoepidermálny štep, mesh plasty, prípadne podľa charakteru defektu Apligraf. Príklad komplexného postupu u našej pacientky ukazuje obr. 6.

### Literatúra

1. Alvarez OM, Fahey CB, Auletta MJ et al. A novel treatment for venous leg ulcers. *J Foot Ankle Surg* 1998; 37(4): 319-324.
2. Argenta LC, Mokykwas MJ. Vacuum assisted closure – new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg* 1997; 38(6): 563-576.
3. Banwell P, Withey S, Holten I. The use of negative pressure to promote healing. *Br J Plast Surg* 1998; 51(1): 79.
4. Blume PA, Walters J, Payne W et al. Comparison of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure with advanced moist wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a multicenter randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2008; 31(4): 631-636.
5. Burt RK, Testori A, Oyama Y et al. Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45(1): 111-116.

6. DeCarbo WT. Special Segment: Soft tissue matrices – Apligraf bilayered skin substitute to augment healing of chronic wounds in diabetic patients. *Foot Ankle Specialist* 2009; 6(2): 299-302.

7. Edmonds M. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* 2009; 8(1): 11-18.

8. Eneroth M, van Houtum WH. The value of debridement and Vacuum-Assisted Closure (VAC) therapy in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24 (Suppl 1): S76-S80.

9. Frykberg RG. Diabetic foot ulcers, pathogenesis and management. *Am Fam Physician* 2002; 66(9): 1655-1662.

10. Etoz A, Kahveci R. Negative Pressure wound therapy on diabetic foot ulcers: conclusion. *Wounds* 2007; 19(9): 250-254.

11. Fadini GP, Miorin M, Facco M et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(9): 1449-1457.

12. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia* 2007; 50(10): 2156-2163.

13. Fadini GP, Baesso I, Agostini C et al. Maternal insulin therapy increases fetal endothelial progenitor cells during diabetic pregnancy. *Diabetes Care* 2008; 31(4): 808-810.

14. Falanga V, Margolis D, Alvarez O et al. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. *Human Skin Equivalent Investigators Group. Arch Dermatol* 1998; 134(3): 293-300.

15. Fleischmann W, Russ M, Moch D et al. Biosurgery – maggots, are they really the better surgeons? *Chirurg* 1999; 70(11): 1340-1346.

16. Gordon PR, Leimig T, Babarin-Domer A et al. Large – scale isolation of CD 133+ progenitor cells



from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31(1): 17-22.

17. Greene AK, Puder M, Roy R et al. Microdeformational wound therapy: effects on angiogenesis and matrix metalloproteinases in chronic wounds of 3 debilitated patients. *Ann Plast Surg* 2006; 56(4): 418-422.

18. Hirsch AT. Critical limb ischemia and stem cell research: anchoring hope with informed adverse event reporting. *Circulation* 2006; 114(24): 2581-2583.

19. Huang P, Li S, Han M et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28(9): 2155-2160.

20. Humpert PM, Djuric Z, Zeuge U et al. Insulin stimulates the clonogenic potential of angiogenic progenitor cells by IGF-1 receptor dependent signaling. *Mol Med* 2008; 14(5-6): 301-308.

21. Krahulec B. Diabetická polyneuropatia. In: Mokáň M, Martinka E, Galajda P (eds). *Diabetes mellitus a vybrané metabolické ochorenia*. Martin: Vydavateľstvo P+M 2008: 588-608.

22. Martinka E. Syndróm diabetickej nohy a jeho moderná liečba. *Interná Med* 2005; 5: 547-555.

23. Martinka E. Syndróm diabetickej nohy. In: Mokáň M, Martinka E, Galajda P (eds). *Diabetes mellitus a vybrané metabolické ochorenia*. Martin: Vydavateľstvo P+M 2008: 614-637.

24. Martinka E. Manažment a liečba chronických komplikácií diabetes mellitus. *Metodický list racionálnej farmakoterapie* 2007; 11(1-2): 1-8.

25. Marchetti V, Menghini R, Rizza S et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effect on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling. *Diabetes* 2006; 55(8): 2231-2237.

26. Mištuna D. Cievne choroby dolných končatín u diabetikov. In: Mokáň M, Martinka E, Galajda P (eds). *Diabetes mellitus a vybrané metabolické ochorenia*. Martin: Vydavateľstvo P+M 2008: 672-683.

27. Müllner T, Mrkonjic L, Kwasny O et al. The use of negative pressure to promote the healing of tissue defects: a clinical trial using the vacuum sealing technique. *Br J Plast Surg* 1997; 50(3): 194-199.

28. Mumcuoglu KZ, Ingber A, Gilead L et al. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 1998; 21(11): 2030-2031.

29. Organogenesis Inc. Apligraf (graftskin) label. US 2000.

30. Pavillard ER, Wright EA. An antibiotics from maggots. *Nature* 1957; 180: 916-917.

31. Rayman A, Stansfield G, Wooland T et al. Use of larvae in the treatment of the diabetic necrotic foot. *Diabetic Foot* 1998; 1: 7-13.

32. Saxena V, Hwang CW, Huang S et al. Vacuum assisted closure: micro-deformations of wound and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1086-1096

33. Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care* 2003; 26(2): 446-451.

34. Sherman RA, Wyle FA, Vulpe M. Maggot debridement therapy for treating of pressure ulcers

in spinal cord injury patients. *J Spinal Cord Med* 1995; 18(2): 71-74.

35. Veves A, Falanga V, Armstrong D et al. Apligraf diabetic foot ulcers study. Graftskin, a human skin equivalent is effective in management of no infected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 2001; 24(2): 290-295

36. Vistnes LM, Lee R, Ksander GA. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery* 1986; 60: 835-841.

37. Werner N, Kosiol S, Schiegl T et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353(8): 999-1007.

38. Yang X, Wu Y, Wang H et al. Transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for peripheral arterial occlusive disease of the lower extremity. *J Geriatr Cardiol* 2006; 3: 181-183.

doc. MUDr. Emil Martinka, PhD.<sup>1</sup>

doc. MUDr. Dušan Mištuna, CSc.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Národný endokrinologický  
a diabetologický ústav, n.o. Lubochňa

<sup>2</sup>I. Chirurgická klinika

Martinskej fakultnej nemocnice  
a Jesseniovej lekárskej fakulty  
Univerzity Komenského v Martine  
martinka@nedu.sk