
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**ANGIOGENEZA TERAPEUTICĂ CU
CELULE STEM ÎN ISCHEMIA
CRITICĂ A MEMBRELOR
INFERIOARE**

Doctorand **Grad Nicolae Ovidiu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA 2013

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Ischemia critică a membrelor inferioare	21
1.1. Introducere	21
1.2. Epidemiologia ischemiei critice aterosclerotice a membrelor inferioare	22
1.3. Factorii de risc	22
1.3.1. Factorii de risc majori	22
1.3.2. Factorii de risc minori	23
1.4. Diagnosticul ischemiei critice a membrelor inferioare	24
1.5. Prevenția în ischemia critică a membrelor inferioare	25
1.6. Tratamentul ischemiei critice aterosclerotice a membrelor inferioare	26
1.6.1. Tratamentul factorilor de risc	26
1.6.2. Tratamentul comorbidităților	26
1.6.3. Tratamentul durerii	26
1.6.4. Tratamentul local al leziunilor ischemice	27
1.6.5. Tratamentul farmacologic al ischemiei critice a membrelor inferioare	27
1.6.6. Revascularizarea în ischemia critică a membrelor inferioare	27
1.6.7. Amputația în ischemia critică a membrelor inferioare	27
1.6.8. Angiogeneza terapeutică în ischemia critică a membrelor inferioare	28
1.7. Prognosticul ischemiei critice aterosclerotice a membrelor inferioare	28
2. Angiogeneza	29
2.1. Mecanismele de reglare ale angiogenezei	29
2.2. Factorii mecanici hemodinamici ai angiogenezei	30
2.3. Factori ai transcripției implicați în angiogeneza	30
2.4. Factori proangiogenetici	30
2.4.1. Ischemia și hipoxia	30
2.4.2. Citochinele, chemochinele și factorii de creștere	31
2.5. Inhibitorii angiogenezei	33
3. Celulele stem și angiogeneza terapeutică	33
3.1. Celulele stem	33
3.2. Angiogeneza cu celule stem	35
4. Modele experimentale pentru studiul ischemiei critice a membrelor posterioare	
5. Etica transplantului de celule stem	36

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru	41
2. Studiul 1 - Model experimental de ischemie critică la șobolanul de laborator	42
2.1. Introducere	42
2.2. Ipoteza de lucru	42
2.3. Material și metodă	42
2.4. Rezultate	49
2.5. Discuții	60
2.6. Concluzii	61
3. Studiul 2 - Recoltarea și cultivarea celulelor stem necesare terapiei proangiogenetice în ischemia critică a membrelor	63
3.1. Introducere	63
3.2. Ipoteza de lucru	63
3.3. Material și metodă	63
3.4. Rezultate	67
3.5. Discuții	80
3.6. Concluzii	81
4. Studiul 3 -Angiogeneza terapeutică cu celule stem în ischemia critică a membrelor	83
4.1. Introducere	83
4.2. Ipoteza de lucru	83
4.3. Material și metodă	83
4.4. Rezultate	86
4.5. Discuții	93
4.6. Concluzii	94
5. Studiul 4. -Provocări etice în terapia cu celule stem	95
6. Discuții generale	101
7. Concluzii generale	103
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	104
REFERINȚE	105
ANEXE	

CUVINTE CHEIE: ischemia critică a membrelor, angiogeneza terapeutică, model experimental, celule stem, terapie regenerativă

INTRODUCERE

Ischemia critică a membrelor inferioare reprezintă stadiul cel mai sever de arteriopatie cronică obliterantă a membrelor inferioare și este asociată cu un risc crescut de amputație și mortalitate. Angiogeneza terapeutică prin utilizarea celulelor stem are scopul de a stimula dezvoltarea circulației colaterale și de a diminua astfel efectele ischemiei.

Obiectivul principal al prezentei teze a constat în evaluarea caracterului causal al legăturii dintre transplantarea de celule stem și angiogeneza terapeutică, iar obiectivele secundare s-au axat pe investigarea siguranței și a implicațiilor etice ale transplantării de MSCs în țesuturile ischemice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Ischemia critică a membrelor inferioare este forma cea mai severă de arteriopatie cronică a membrelor inferioare și este rezultatul deteriorării progresive a circulației arteriale periferice, până când rata fluxului este atât de redusă încât apar dureri ischemice cronice de repaus.

Arteriografia continuă să fie metoda de referință în stabilirea indicației de revascularizare la pacienții cu ischemie critică datorită acurateții măsurătorilor hemodinamice, mai ales dacă este vorba despre arteriografia tri-dimensională rotațională.¹

Tratamentul actual în ischemia critică a membrelor inferioare vizează repermeabilizarea durabilă a axului arterial prin tehnici chirurgicale clasice, tehnici endovasculare sau tehnici hibride cu scopul de a menține viabilitatea membrului, de a aduce vindecarea leziunilor ischemice și dispariția durerii.

Prognosticul deprimant, caracteristic pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare, atât în ceea ce privește calitatea vieții cât și evoluția tabloului clinic, este de multe ori asemănător cu cel al afecțiunilor maligne în fază terminală, indiferent de tratamentul administrat.^{2,3}

Ca alternativă terapeutică terapia celulară presupune administrarea unor celule cu proprietăți de proliferare și reînnoire cu scopul de a înlocui țesuturile distruse ireversibil de boală.

Principalele aspecte problematice din perspectivă etică referitoare la celulele stem umane sunt sursa și folosirea acestora. Astfel, noile dezvoltări în cercetarea referitoare la terapiile cu celule stem ridică probleme delicate atât pentru cercetători și clinicieni, cât și pentru pacienți, legislatori și bioeticieni, probleme care vor fi atinse într-o parte ulterioară a lucrării noastre.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Scopul și obiectivele propuse în prezenta teză au fost atinse prin experimente care sunt redată în partea a doua a tezei referitor la Contribuții personale. Această parte a tezei este structurată pe patru capitole, fiecare capitol abordând un studiu experimental distinct. Primul capitol își propune obținerea modelului experimental de ischemie critică, capitolul al doilea abordează obținerea materialului biologic celular necesar transplantului pe modele experimentale prestabilite. În capitolul trei studiul experimental se referă la angiogeneza terapeutică cu celule stem în ischemia critică a membrelor, iar capitolul patru descrie provocările etice în terapia cu celule stem, urmată de discuțiile și concluziile generale.

Model experimental de ischemie critică la șobolanul de laborator

Obiectivul principal a fost acela de a găsi un model experimental de ischemie critică, model pe care ulterior să se poată demonstra efectele noilor terapii angiogenetice.

S-au folosit șobolani din linia Wistar proveniți din Biobaza de Cercetări Experimentale a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Protocolul experimental a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină „și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Animalele luate în studiu au fost examinate clinic după care au fost randomizate în trei loturi experimentale. Ischemia cronică a membrelor a fost realizată prin trei modele experimentale și anume: dubla ligatură și excizia între ligaturi pe o lungime de 5 mm a arterei femurale comune (AFC) stângi (**LOT I**, n=30), arterei iliace comune (AIC) stângi (**LOT II**, n=30) și modelul progresiv prin ligatura și excizia între ligaturi pe o lungime de 5 mm a arterei femurale comune stângi inițial, iar după două săptămâni a arterei iliace comune stângi (**LOT III**, n=30).

S-a determinat presiunea arterială sistolică la nivelul arterelor tibiale ale membrului ischemic, s-a calculat un raport similar indicelui gleznă/braț, un raport între presiunea sistolică măsurată la nivel tibial/presiunea sistolică măsurată la nivel brahial, atât la membrul ischemic cât și la membrul contralateral.

Arteriografiile s-au realizat cu angiograful Cardiovascular X-ray System Philips Allura Xper FD10 C după descoperirea aortei abdominale transperitoneale.

În scopul evaluării modificărilor post ischemice pe model animal s-au efectuat preparate histologice.

Modelul experimental prin ligatură și excizia succesivă a arterelor femurale și iliace comune, datorită valorii medii a indicelui TAST/TASB, poate fi considerat un model de ischemie cronică comparabilă cu ischemia critică arterosclerotică la om.

Recoltarea și cultivarea celulelor stem necesare terapiei proangiogenetice în ischemia critică a membrelor

Obiectivele acestui studiu sunt reprezentate de de obținerea, caracterizarea fenotipică și funcțională a celulelor mezenchimale recoltate de la șobolan și de la pacienți cu ischemie critică în vederea utilizării lor ulterioare în terapia regenerativă pe model animal..

Caracterizarea celulelor recoltate s-a realizat prin evaluarea capacității de proliferare și a capacității clonogenice a celulelor în cultură (P0-P6).

Pentru evidențierea multilinearității celulelor stem izolate de la șobolani și de la om, culturile celulare din pasajul 6 au fost prelucrate cu ajutorul citometriei în flux utilizând BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, Ca) din dotarea Departamentului de Reproducție Obstetrică și Ginecologie Veterinară din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Datele obținute au fost prelucrate cu programul FACS Diva.

Prin analiza imunofenotipică a celulelor izolate de la șobolan s-au evidențiat un procent de 95,1% de celule CD44 pozitive; examinând celulele de origine umană s-a constatat negativitate pentru CD34/45 și un procent de 75% pozitivitate pentru CD44.

Angiogeneza terapeutică cu celule stem în ischemia critică a membrelor

Obiectivul principal a constat în demonstrarea rolului angiogenetic al terapiei cu celule stem în ischemia critică indusă la șobolani.

Pentru efectuarea studiului, materialul biologic a fost reprezentat de șobolani din linia Wistar la care s-a indus experimental ischemia critică prin ligatura progresivă a arterei femurale stângi, urmată la 2 săptămâni de ligatura arterei iliace comune stângi (lotul III, protocol descris în capitolul 2, studiul 1). Materialul biologic celular a fost reprezentat de liniile MSCs obținute de la șobolani din linia Wistar și de la pacienții cu ischemie critică care au avut indicație de amputație, conform protocolului de izolare și cultivare a MSCs descris în capitolul 3 studiul 2.

În vederea evaluării gradului de grefare a MSCs în urma injectării pe model animal, celulele transplantate (1×10^6) au fost marcate cu colorantul intranuclear specific, BrdU (5-bromo-2-deoxyuridină, Sigma).

Celulele marcate specific după injectare au fost detectate pe secțiuni seriate prin metoda imunohistochimică, utilizând anticorpi anti BrdU, iar mugurii vasculari au fost puși în evidență cu ajutorul anticorpilor CD 31, CD34, CD 105, actină, VEGF.

În cadrul studiului s-a ajuns la următoarele concluzii: celule izolate sunt celule multipotente cu capacitate de proliferare *in vitro* și păstrarea acestui caracter după pasaje multiple. Prin injectare intramusculară aceste celule induc miogeneză și neovascularizație cu restabilirea funcției membrului lezat. Atenuarea ischemiei tisulare apare nu numai datorită diferențierii lor endoteliale și miocitare, dar și secreției unor factori trofici capabili să protejeze celulele lezate.

Provocări etice în terapia cu celule stem

Discuțiile referitoare la terapia cu celule stem au evoluat de la controversele asupra celulelor stem embrionare la interesul pentru utilizarea etică a celulelor stem în cercetarea clinică. Alături de dezvoltarea cercetării asupra celulelor stem, alte probleme etice apar privind trecerea de la preclinic la clinic a informației referitoare la celulele stem în terapii sigure și eficiente.⁴ În încercarea de a evita provocările etice ridicate de utilizarea celulelor stem embrionare, oamenii de știință propun surse alternative de celule pluripotente care nu implică distrugerea embrionilor umani, precum: celule stem obținute de la embrioni deja decedați; celule stem obținute de la embrioni vii prin biopsie nondistructivă, celule stem obținute prin inginerie genetică.

Discuții generale

Ischemia critică aterosclerotică a membrelor inferioare, a cărei evoluție și prognostic sunt de multe ori similare neoplaziilor aflate în stadiul terminal, este o boală tot mai răspândită, asociată cu o morbiditate și mortalitate crescută.

Terapiile actuale vizează revascularizarea prin diferite metode, și totuși într-un procent mare pacienții ajung la amputație.

Angiogeneza cu celule stem ar putea să revoluționeze tratamentul ischemiei critice aterosclerotice a membrelor inferioare.

Necesitatea obținerii unor modele animale la care s-a indus ischemia critică este indispensabilă pentru testarea potențialului terapeutic al celulelor stem.

Rezultatele noastre indică un grad de ischemie mai avansată în cazul efectuării ligaturii duble, iar gradul cel mai mic de ischemie a fost înregistrat la animalele din lotul în care s-a făcut ligatura simplă a arterei femurale.

Pe baza similitudinii dintre indicii gleznă/braț măsurat la pacienții cu ischemie critică cu indicii reprezentat de raportul dintre presiune măsurată la nivel tibial și presiune măsurată la nivel brahial în membrele ischemice la lotul de șobolan cu ligatură dublă progresivă, putem să considerăm ca model de ischemie critică acest lot.

Angiogeneza prin transplantarea de celule stem mezenchimale a fost demonstrată și de studiile noastre, angiogeneza care constă în stimularea formării de

mici tuburi endoteliale favorizată de prezența celulelor MSCs și eliberarea unor citokine prin preferențierea acestora spre linie endotelială.

Transplantul alogen și cel xenogen efectuat în studiul nostru a favorizat în egală măsură angiogeneza. Acest fapt este explicabil prin capacitatea lor imunogenă și prin faptul că MSCs sunt privilegiate imunologic. Aceste terapii bazate pe utilizarea celulelor stem mezenchimale le considerăm o abordare inovatoare pentru tratamentul ischemiei critice și nu numai. Dar utilizarea lor în terapia curentă necesită cercetări aprofundate și studii clinice numeroase pentru evaluarea și înțelegerea tuturor mecanismelor implicate.

Concluzii

Modelul experimental prin ligatură și excizia progresivă a arterelor femurale și iliace comune poate fi considerat un model de ischemie cronică comparabilă cu ischemia critică arterosclerotică de la om. Considerăm că este aproape imposibilă inducerea unei model experimental de ischemie cronică la care să fie asociate comorbiditățile și factorii de risc prezenți la pacienții cu ischemie critică; în legătură cu materialul biologic utilizat putem să concluzionăm ca nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește morfologia, caracterele culturale și imunofenotipice evaluate; creșterea indicelui reprezentat de raportul dintre presiunea măsurată la nivel tibial și presiunea măsurată la nivel brahial ca rezultat al terapiei cu MSCs pe modelul experimental de ischemie critică susține ipoteza angiogenezei; analiza angiografiilor prin compararea intensităților luminoase ale pixelilor de la nivelul membrului ischemic raportate la membrul contralateral relevă o scădere a diferențelor dintre cele două membre examinate la lotul transplantat în comparație cu lotul martor; în ceea ce privește angiogeneza terapeutică și homingul celulelor stem transplantate pe modele de ischemie au fost demonstrate prin tehnica imunohistochimică a secțiunilor seriate utilizând anticorpi specifici pentru celule stem și pentru endoteliul vascular. Eficiența transplantului de MSCs a fost dovedită atât în cazul celulelor MSCs umane cât și în cazul celulelor izolate de la șobolan. Nu au fost identificate complicații asociate transplantării celulare; considerăm că sunt necesare studii clinice aprofundate pentru înțelegerea tuturor mecanismelor implicate în obținerea unui răspuns regenerativ eficient. De asemenea, sunt necesare trialuri clinice randomizate dublu orb în vederea demonstrării efectelor benefice și posibilelor complicații pe termen lung cu care sunt înzestrate aceste celule; noile dezvoltări în cercetarea referitoare la terapiile cu celule stem schimbă accentul dezbaterii etice, mutându-l de la bietica lui *dacă*, la bioetica lui *cum*,⁵ și ridică probleme delicate atât pentru cercetători și clinicieni, cât și pentru pacienți, legislatori și bioeticieni.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Modelul experimental descris în studiul 1 de inducere a ischemiei critice realizat prin ligatura și excizia AIC stângi urmată la două săptămâni de ligatura și excizia AFC stângi a reușit să facă trecerea de la o ischemie acută spre una cronică, critică.

Indicele reprezentat de raportul TAST/TASB precum și indicele reprezentat de raportul INTm/INTi au cuantificat severitatea ischemiei cronice a membrelor induse la șobolan.

În studiul 2, MSC au fost izolate de la nivelul măduvei osoase a femurului provenit de la șobolan și pacient cu ischemie critică a membrelor inferioare, iar capacitatea multipotentă a acestora a fost caracterizată prin imunofenotipizare.

În studiul 3 a fost demonstrată eficacitatea xenotransplantului de MSC recoltate de la pacient cu ischemie critică a membrelor inferioare în tratamentul ischemiei critice a membrelor la șobolan.

Celulele stem mezenchimale, recoltate din măduva osoasă a diafizei femurale în timpul amputației de coapsă la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare, ar putea fi ulterior folosite în tratamentul membrului contralateral.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, Rutherford RB. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 2007; 26:81-157.
2. The I.C.A.I. Group: Long-term mortality and its predictors in patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:91-95.
3. Mironiuc IA, et all. Ischemia critică aterosclerotică a membrelor inferioare. Cluj-Napoca:Ed. Casa Cărții de Știință. 2008;75-84.
4. Jens S, Lucatelli P, Koelemay MJ, Marquering HA, Reekers JA. Three-dimensional rotational angiography of the foot in critical limb ischemia: a new dimension in revascularization strategy. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2013; 36:797-802.
5. Lawall H, Zemmerich C, Bramlage P, Amann B. Health related quality of life in patients with critical limb ischemia. *Vasa*. 2012; 41:78-88.
6. Sprengers RW, Teraa M, Moll FL. Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment. *Journal of Vascular Surgery*. 2010; 52:843-
7. Grad NO, Pop IC, Mironiuc IA. Stem cells therapy and research. Benefits and ethical challenges. *Journal for the Study of Religions and Ideologies*. vol. 11, issue 32 (Summer 2012): 190-205
8. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 71-75.
9. Atala A. et. al. *Principles of Regenerative Medicine*, Second edition, (San Diego: Elsevier, 2011), part VII.
10. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 75.

11. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, Rutherford RB. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 2007; 26:81-157.
12. The I.C.A.I. Group: Long-term mortality and its predictors in patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:91-95.
13. Mironiuc IA, et all. Ischemia critică aterosclerotică a membrelor inferioare. Cluj-Napoca:Ed. Casa Cărții de Știință. 2008;75-84.
14. Jens S, Lucatelli P, Koelemay MJ, Marquering HA, Reekers JA. Three-dimensional rotational angiography of the foot in critical limb ischemia: a new dimension in revascularization strategy. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2013; 36:797-802.
15. Lawall H, Zemmrch C, Bramlage P, Amann B. Health related quality of life in patients with critical limb ischemia. *Vasa*. 2012; 41:78-88.
16. Sprengers RW, Teraa M, Moll FL. Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment. *Journal of Vascular Surgery*. 2010; 52:843-9.
17. Grad NO, Pop IC, Mironiuc IA. Stem cells therapy and research. Benefits and ethical challenges. *Journal for the Study of Religions and Ideologies*. vol. 11, issue 32 (Summer 2012): 190-205
18. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 71-75.
19. Atala A. et. al. *Principles of Regenerative Medicine*, Second edition, (San Diego: Elsevier, 2011), part VII.
20. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 75.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

THERAPEUTIC ANGIOGENESIS WITH STEM CELLS IN CRITICAL LIMB ISCHEMIA

PhD Candidate **Grad Nicolae Ovidiu**

PhD Scientific Coordinator **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA 2013

Contents

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Critical limb ischemia	21
1.1. Introduction	21
1.2. Epidemiology of atherosclerotic critical limb ischemia	22
1.3. Risk factors	22
1.3.1. Major risc factors	22
1.3.2. Minors risc factors	23
1.4. Diagnosis of critical limb ischemia	24
1.5. Prevention of critical limb ischemia	25
1.6. Treatment of atherosclerotic critical limb ischemia	26
1.6.1. Treatment of risk factors	26
1.6.2. Treatment of comorbidities	26
1.6.3. Pain treatment	26
1.6.4. Local treatment of ischemic lesions	27
1.6.5. Pharmacological treatment of critical limb ischemia	27
1.6.6. Revascularization in critical limb ischemia	27
1.6.7. Amputation in critical limb ischemia	27
1.6.8. Therapeutic angiogenesis in critical limb ischemia	28
1.7. The prognosis of atherosclerotic critical limb ischemia	28
2. Angiogenesis	29
2.1. Regulatory mechanisms of angiogenesis	29
2.2. Hemodynamic mechanical factors of angiogenesis	30
2.3. Transcription factors involved in angiogenesis	30
2.4. Pro angiogenic factors	30
2.4.1. Ischemia and hypoxia	30
2.4.2. Cytokines, chemokines and growth factors	31
2.5. Angiogenesis inhibitors	33
3. Stem cells and therapeutic angiogenesis	33
3.1. Stem cells	33
3.2. Angiogenesis with stem cells	35
4. Experimental models for the study of critical hind limb ischemia	
5. Ethics of stem cell transplantation	36
PERSONAL CONTRIBUTION	

1. Working hypothesis	41
2. Study 1. -Model of critical ischemia in laboratory rats	42
2.1. Introduction	42
2.2. Working hypothesis	42
2.3. Materials and methods	42
2.4. Results	49
2.5. Discussion	60
2.6. Conclusions	61
3. Study 2. -Harvesting and cultivation of stem cells needed pro angiogenic therapy in critical limb ischemia	63
3.1. Introduction	63
3.2. Working hypothesis	63
3.3. Materials and methods	63
3.4. Results	67
3.5. Discussion	80
3.6. Conclusions	81
4. Study 3. Therapeutic angiogenesis with stem cell in critical limb ischemia	83
4.1. Introduction	83
4.2. Working hypothesis	83
4.3. Materials and methods	83
4.4. Results	86
4.5. Discussion	93
4.6. Conclusions	94
5. Study 4.- Ethical challenges in stem cell therapy	95
6. General discussion	101
7. Overall conclusions of the Thesis	103
8. Originality and innovative input of the Thesis	104
REFERENCES	105
ANEXE	

KEYWORDS: critical limb ischemia, therapeutic angiogenesis experimental model, stem cell, regenerative therapy

INTRODUCTION

Critical lower limb ischemia is the most severe stage of chronic occlusive arterial disease associated with an increased risk of amputation and mortality. Therapeutic angiogenesis using stem cells aims to stimulate the development of collateral circulation and thus to reduce the effects of ischemia. The main objective of this thesis is to assess the causal nature of the link between stem cell transplantation and therapeutic angiogenesis, and the secondary objectives focus on investigating the safety and ethical implications of transplantation of MSCs in ischemic tissues.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Critical lower limb ischemia is the most severe form of chronic lower limb arterial disease is the result of progressive deterioration of peripheral arterial circulation until the flow rate is so low that chronic ischemic rest pain occurs.

Arteriography remains the reference method in determining the indication for revascularization in patients with critical limb ischemia due to accuracy of the hemodynamic measurement, especially three-dimensional rotational arteriography.

The current treatment of lower limb critical ischemia is based on lasting repermeabilization of arterial axis by classical surgical techniques, endovascular techniques and hybrid techniques in order to maintain the viability of the member, to achieve healing ischemic lesions and the disappearance of pain.

Depressing prognosis characteristic of patients with critical lower limb ischemia, both in terms of quality of life and evolution of the clinical picture is often similar to the terminal malignancies, irrespective of the treatment administered. Alternatively, cell therapy involves the administration of therapeutic cells with proliferate and renewability properties in order to replace the irreversible destroyed tissue by the disease.

The major problems in terms of ethical perspective on human stem cells are the source of this cells and their usage. The new developments in research based on stem cell therapies raise sensitive issues not only for researchers and clinicians, but also for patients, legislators and bioethicists, issues that will be detailed in a subsequent part of our work.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The purpose and the objectives of this thesis were achieved by experimental studies presented in the second half of the thesis, in the personal contributions part, which is divided into four chapters, each of them addressing a distinct experimental study. The first of these chapters aims to obtain an experimental model of critical ischemia, the second one deals with obtaining biological material necessary for cell transplantation in preset experimental models. The third chapter covers an experimental study about therapeutic angiogenesis with stem cells in critical limb ischemia while chapter four describes the ethical challenges in stem cell therapy, followed by discussion and general conclusions.

Model of critical ischemia in laboratory rats

The main objective of this study was to find a model of critical ischemia, an experimental model that later can be used to prove the effects of the new angiogenic therapies. We used rats of Wistar line from Experimental Research Biobase of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. The experimental protocol was approved by the *Ethical Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca*.

The animals involved in the study were clinically examined and then randomized into three experimental groups. Chronic limb ischemia was performed in three experimental models namely: double ligation and excision between ligatures over a length of 5 mm of the left common femoral artery (CFA) (group I, n = 30), left common iliac artery (CIA) (group II, n = 30) and progressive model by ligation and excision between ligatures over a length of 5 mm initially left common femoral artery, and after two weeks left common iliac artery (group III, n = 30).

Systolic blood pressure was determined in the tibial arteries of the ischemic limb, an ankle/arm-like index was calculated, a ratio between systolic pressure measured at tibial level/and systolic pressure measured at brachial level both in the ischemic limb and the contralateral limb. Arteriographies were performed with Cardiovascular X-ray Angiography System Philips Allura Xper FD10 C after discovering transperitoneal abdominal aorta. In order to evaluate post-ischemic changes in the animal model histological preparations were made. The experimental model obtained by ligation and successive excision of the femoral and iliac arteries can be considered a model of chronic ischemia comparable with atherosclerotic critical limb ischemia in humans based on the average value of the index TAST / TASB.

Harvesting and cultivation of stem cells needed pro angiogenic therapy in critical limb ischemia

The objectives of this study are represented by the obtaining and the phenotypic and functional characterization of mesenchymal cells harvested from rats and patients with critical ischemia for use in future regenerative therapy in the animal model. Characterization of the harvested cells was achieved by assessing the ability of proliferation and clonogenic capacity of cells in culture (P0-P6). For assessment of multilinearity capacity of isolated cells from rats and humans, cell cultures from passage 6 were processed by flow cytometry using BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, Ca) from Department of Reproduction, Obstetrics and Veterinary Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine Cluj- Napoca . The results were processed with FACS Diva software. The immunophenotypic analysis of cells isolated from rat bone marrow showed a rate of 95.1% CD44 positive cells; examining the cells from human origin was found negativity for CD34/45 and a percent of 75% positive for CD44.

Therapeutic angiogenesis with stem cell in critical limb ischemia

The primary objective of the study was to demonstrate the angiogenic role of stem cell therapy in critical limb ischemia induced in rats.

The biological material for the study was represented of the Wistar line rats in which experimental critical limb ischemia were induced by gradually ligation of the left femoral artery followed 2 weeks later by ligation of left common iliac artery (group III protocol described in Chapter 2, Study 1). The cellular biological material was represented by the MSCs cell lines derived from Wistar rats and from patients with critical limb ischemia who had indication for amputation, according to the protocol of isolation and cultivation of MSCs described in Chapter 3 Study 2. In order to assess the degree of MSCs grafting after injection in the animal model, transplanted cells (1×10^6) were labeled with the specific intranuclear dye, BrdU (5-bromo-2-deoxyuridină, Sigma). The specifically labeled cells after injection were detected on serial sections by immunohistochemistry technique using antibodies against BrdU and vascular buds were highlighted using antibodies for CD 31, CD34, CD 105, actin, VEGF. The study reached the following conclusions: isolated cells are multipotent with the capacity to proliferate *in vitro* and to keep this character after multiple passages. After intramuscular injection these cells induce miogenesis and therapeutic neovascularization of injured limb. The attenuation of tissue ischemia occurs not only because of their endothelial and myogenic differentiation but also through of secretion of trophic factors able to protect damaged cells.

Ethical challenges in stem cells therapies

Discussions on stem cell therapy have evolved from the controversy over embryonic stem cells to the interest about the ethical usage of stem cells in clinical research. Along with the development of stem cell research, other ethical issues arise concerning the transition of the information on stem cells from preclinical to clinical, in safe and effective therapies. In an attempt to avoid the ethical challenges raised by embryonic stem cells, scientists suggest alternative sources of pluripotent cells that do not involve the destruction of human embryos, such as: stem cells obtained from embryos already dead; stem cells obtained from embryos by nondestructive biopsy, genetically engineered stem cells.

General discussions

Atherosclerotic lower limb critical ischemia, whose evolution and prognosis are often similar to end-stage malignancies, is a progressively common disease associated with increased morbidity and mortality.

Current therapies aim at revascularization through different methods and yet a large percentage of patients come to amputation.

Angiogenesis with stem cells could revolutionize the treatment of atherosclerotic critical limb ischemia.

The need to obtain animal models in which critical ischemia was induced is essential for testing the therapeutic potential of stem cells.

Our results indicate a more advanced degree of ischemia when performing double ligation and the lowest degree of ischemia was recorded in animals in the group with simple ligation of the femoral artery.

Based on the similarity between the index ankle/arm measured in patients with critical ischemia with the index represented by the ratio of the pressure measured at the tibial level and the pressure measured at the brachial level in ischemic limbs from the group of rats with progressive double ligation, we can consider this group as the model of critical ischemia.

Angiogenesis through transplantation of mesenchymal stem cells was demonstrated also by our studies, angiogenesis which consist in the stimulation of the formation of small endothelial tubes favored by the presence of MSCs and the release of cytokines by their predifferentiation to endothelial line.

The allogeneic and xenogeneic transplantation performed in our study equally favored angiogenesis. This situation is explained by their immunogenic ability and by the fact that MSCs are immunologically privileged. We consider these therapies based on mesenchymal stem cells an innovative approach for the treatment of critical limb ischemia. But their usage in the current therapy requires extensive research and numerous clinical trials for the evaluation and understanding of the involved mechanisms.

Conclusions

The experimental model by progressive ligation and excision of the common femoral and iliac arteries can be considered a model of chronic ischemia comparable with atherosclerotic critical limb ischemia in humans. We consider that is almost impossible to induce an experimental model of chronic ischemia that is associated with the comorbidities and risk factors present in patients with critical ischemia; with reference to the biological material used, we can conclude that there were no significant differences in terms of morphology, cultural and immunophenotypic characteristics evaluated; the augmentation of the index represented by the ratio of the pressure measured at tibial level and the pressure measured at the brachial level as a result of therapy with MSCs in experimental model of critical ischemia supports the hypothesis of angiogenesis; angiography analysis through the comparison of the light intensities of the pixels at the level of the ischemic limb related to the contralateral member shows a decrease in the difference between the two examined limbs in the transplanted group compared to the control group; the therapeutical angiogenesis and the homing of stem cells transplanted in models of critical limb ischemia were demonstrated by immunohistochemical technique of the serial sections using antibodies specific for stem cells and vascular endothelium. The efficiency of MSCs transplantation has been demonstrated both in the case of human MSCs cells and in the case of the cells isolated from rat. No complications associated with cell transplantation were identified; we believe that in-depth studies are needed to understand all the mechanisms involved in obtaining an effective regenerative response. Equally, double-blind randomized clinical trials are necessary in order to demonstrate the beneficial effects and the possible long-term complications that are endowed these cells; The new developments in stem cells research change the emphasis of the ethical debate from the bioethics of *wether*, to the bioethics of *how*⁶ and raise difficult questions for the researchers, clinicians, patient, advocates, regulators, and bioethicists.

Originality and innovative input of the thesis

The experimental model described in study 1 of inducing critical ischemia through ligation and excision of the left CIA followed, two weeks later, by ligation and excision of the left CFA succeeded to make the transition from an acute ischemia to a chronic critical ischemia.

The index represented by the ratio TAST/TASB and index represented the ratio INTm/INTi quantified the severity of chronic limb ischemia induced in rats.

In Study 2, MSC were isolated from bone marrow cells from rat femur and from patient with critical ischemia of the lower limbs and their multipotent capacity was characterized by immunophenotyping.

In Study 3 was demonstrated the efficacy of xenotransplantation of MSC harvested from the patient with critical lower limb ischemia in the treatment of critical limb ischemia in rats.

Mesenchymal stem cells harvested from bone marrow of femoral diaphysis during thigh amputation in patients with critical ischemia of the lower limbs, could ulterior be used to treat the contralateral limb.

Selective bibliography

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, Rutherford RB. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 2007; 26:81-157.
2. The I.C.A.I. Group: Long-term mortality and its predictors in patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:91-95.
3. Mironiuc IA, et al. Ischemia critică aterosclerotică a membrelor inferioare. Cluj-Napoca:Ed. Casa Cărții de Stiință. 2008;75-84.
4. Jens S, Lucatelli P, Koelemay MJ, Marquering HA, Reekers JA. Three-dimensional rotational angiography of the foot in critical limb ischemia: a new dimension in revascularization strategy. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2013; 36:797-802.
5. Lawall H, Zemmrich C, Bramlage P, Amann B. Health related quality of life in patients with critical limb ischemia. *Vasa*. 2012; 41:78-88.
6. Sprengers RW, Teraa M, Moll FL. Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment. *Journal of Vascular Surgery*. 2010; 52:843-
7. Grad NO, Pop IC, Mironiuc IA. Stem cells therapy and research. Benefits and ethical challenges. *Journal for the Study of Religions and Ideologies*. vol. 11, issue 32 (Summer 2012): 190-205
8. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 71-75.
9. Atala A. et. al. *Principles of Regenerative Medicine*, Second edition, (San Diego: Elsevier, 2011), part VII.
10. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 75.
11. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, Rutherford RB. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 2007; 26:81-157.
12. The I.C.A.I. Group: Long-term mortality and its predictors in patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:91-95.
13. Mironiuc IA, et al. Ischemia critică aterosclerotică a membrelor inferioare. Cluj-Napoca:Ed. Casa Cărții de Stiință. 2008;75-84.
14. Jens S, Lucatelli P, Koelemay MJ, Marquering HA, Reekers JA. Three-dimensional rotational angiography of the foot in critical limb ischemia: a new dimension in revascularization strategy. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2013; 36:797-802.
15. Lawall H, Zemmrich C, Bramlage P, Amann B. Health related quality of life in patients with critical limb ischemia. *Vasa*. 2012; 41:78-88.
16. Sprengers RW, Teraa M, Moll FL. Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment. *Journal of Vascular Surgery*. 2010; 52:843-9.
17. Grad NO, Pop IC, Mironiuc IA. Stem cells therapy and research. Benefits and ethical challenges. *Journal for the Study of Religions and Ideologies*. vol. 11, issue 32 (Summer 2012): 190-205
18. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 71-75.
19. Atala A. et. al. *Principles of Regenerative Medicine*, Second edition, (San Diego: Elsevier, 2011), part VII.
20. Insoo Hyun. The bioethics of stem cell research and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010;120: 1: 75.

