

Aus der Klinik für Gefäßchirurgie  
des Isarklinikums München  
Direktor: PD Dr. med. Peter Heider

**Wirksamkeit und Sicherheit von autologen CD34-negativen mesenchymalen  
Stammzellen zur begleitenden Behandlung von Patienten mit fortgeschrittener  
peripherer arterieller Verschlusskrankheit nach Intervention**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Katarina Gröbl  
aus Bratislava, Slowakei

**2022**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

<b>Berichterstatter:</b>	PD Dr. med. Peter Heider
<b>Mitberichterstatter:</b>	Prof. Dr. med. Thomas Koeppl PD Dr. Maximilian Pichlmaier, MA (Cantab) Prof. Dr. med. Nikolaos Tsilimparis
<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. Thomas Gudermann
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	20.10.2022

1. Einleitung	6
1.1. Die periphere AVK	6
1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie	6
1.1.2. Diagnostische Methoden	7
1.1.3. Therapie der peripheren AVK	8
1.1.4. Die Re-Stenose	8
1.2. Stammzellen und Stammzelltherapie	10
1.3. Zielsetzung der Studie	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Studiendesign	15
2.2. Patienten	16
2.3. Knochenmarkspende und MSC-Apceth Infusion	17
2.4. Labor	18
2.5. Studienverlauf	18
2.6. Statistische Auswertung	23
2.6.1. Datenverarbeitung	23
2.6.2. Datenanalyse	23
2.6.3. Statistische Auswertung	23
3. Ergebnisse	25
3.1. Charakteristika des Studienkollektivs	25
3.2. Basisdaten	27
3.3. primäre Offenheitsrate nach interventioneller Revaskularisation	28
3.4. Technische Untersuchungen	31
3.4.1. Verschlussdruckindex	31
3.4.2. tcPO <sub>2</sub>	32
3.5. Entwicklung von VEGF, PDGF und IL1-ra	33

3.6. Schmerzerfassung	34
3.7. Unerwünschte Ereignisse	35
4. Diskussion	39
5. Limitationen der Studie	50
6. Zusammenfassung	51
7. Literaturverzeichnis	53
8. Anhang	58
8.1. Einschluss und Ausschlusskriterien für die Studie	58
8.1.1. Einschlusskriterien für die Studie	58
8.1.2. Ausschlusskriterien für die Studie	58
8.2. Laboruntersuchungen	60
8.3. PAVK 86 - Fragebogen	61
8.4. SOP's für die Aufbereitung und Rückgabe der Stammzellen	62
8.4.1. Zusammensetzung der Stammzellbeutel	62
8.4.2. Allgemeine Maßnahmen	62
8.4.3. Handhabung des Cryobags	63
8.4.4. Auftauen des Zellprodukts	63
8.4.5. Wiederherstellung	64
8.4.6. Infusion	64
8.4.7. Mehrfache Infusion	65
8.5. Übersicht der Follow-Up Termine	65
8.6 Aufgaben der Doktorandin	66
9. Tabellenverzeichnis	67
10. Abkürzungsverzeichnis	68
11. Danksagung	71
12. Lebenslauf	72



# 1. Einleitung

## 1.1. Die periphere AVK

### 1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Die periphere AVK (arterielle Verschlusskrankheit) bezeichnet die Einschränkung der Durchblutung der Extremitäten. In 95% der Fälle geschieht dies durch den chronischen komplexen Prozess der Atherosklerose. Diese führt über einen fibrösen Umbau der Gefäßwand zu Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust mit der Folge der Einengung des Gefäßlumens bis hin zum Verschluss [1]. Dieser wird durch verschiedene Risikofaktoren, wie beispielsweise Nikotinkonsum, Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperhomocysteinämie und Hyperlipidämie unterstützt. Die periphere AVK kann Arterien in jeder Körperregion betreffen. Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere AVK sind unterschiedliche Manifestationsformen derselben Erkrankung [2].

Die periphere AVK findet sich zu 30% in den Beckenarterien, zu 50% in den femoropoplitealen Arterien und zu 20% in den Arterien des Unterschenkels [3].

Die Arteriosklerose ist eine der häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen. Die Prävalenz der peripheren AVK steigt mit höherem Lebensalter an. In der prospektiven, nicht-interventionellen bundesweiten German epidemiological trial on Ankle Brachial Index (getABI-Studie) wurden 6880 Patienten ab 65 Jahren eingeschlossen. Die Prävalenz der peripheren AVK, definiert durch einen Verschlussdruckindex  $< 0,9$ , betrug 19,8% bei Männern und 16,8% bei Frauen [4]. In der Heinz Nixdorf Recall Studie, die 4.814 Teilnehmende im Alter zwischen 45-75 Jahren in der Allgemeinbevölkerung untersuchte, fand sich ein ABI  $< 0,9$  bei 6,4% (Männer) bzw. 5,1% (Frauen) [5]. Bis zu 7% der 50-75-jährigen leiden an einer Claudicatio intermittens [6], wobei die symptomatische periphere AVK in der männlichen Bevölkerung fünf mal häufiger auftritt [7].

Die Mortalität von AVK-Patienten liegt mit 2,4%/Jahr höher als bei Patienten mit KHK (1,8%/Jahr). Besonders hoch ist das Mortalitätsrisiko bei proximalen Lokalisationen einer

AVK und besonders ungünstig ist die Konstellation bei begleitendem Diabetes mellitus Typ II [8].

Die klinische Einteilung der peripheren AVK erfolgt nach der Stadieneinteilung nach Fontaine bzw. international gebräuchlich ist die Rutherford-Klassifikation [9, 10].

*Tabelle 1: Stadieneinteilung der peripheren AVK*

Fontaine		Rutherford		
Stadium	Klinisches Bild	Grad	Kategorie	Klinisches Bild
I	asymptomatisch	0	0	asymptomatisch
IIa	Gehstrecke > 200 m	I	1	leichte Claudicatio intermittens
IIb	Gehstrecke < 200 m	I	2	mäßige Claudicatio intermittens
		I	3	schwere Claudicatio intermittens
III	ischämischer Ruheschmerz	II	4	ischämischer Ruheschmerz
IV	Ulkus, Gangrän	III	5	kleinflächige Nekrose
		III	6	großflächige Nekrose

### 1.1.2. Diagnostische Methoden

Die Diagnostik erfolgt anfangs über eine sorgfältige Anamnese hinsichtlich Claudicatosymptomatik sowie körperliche Untersuchung der Beine im Seitenvergleich mit Hinblick auf den Auskultations- und Pulsstatus, Hautfarbe und -temperatur, Behaarung und Fehlstellungen. Im Weiteren kommen nicht invasive technische Untersuchungsmethoden wie die ABI-Messung, Laufband, tcPO<sub>2</sub>-Messung, die farbkodierte Duplexsonographie, die CT-Angiographie und MR-Angiographie hinzu. Die invasive intraarterielle Angiographie gilt immer noch als Goldstandard der Gefäßdarstellung [11]. Allerdings können heutzutage mittels MR-Angiographie hochwertige Gefäßrekonstruktionen mit hoher Spezifität und Sensitivität erzeugt werden. In einer kleinen Metaanalyse von Healy et. al., die drei Studien einschliesst, zeigte die MR-Angiographie bei 83 Patienten mit Diabetes mellitus eine gepoolte Sensitivität von 86% und eine gepoolte Spezifität von 93% im infragenualen Bereich [12]. Die schnelle

Verfügbarkeit, fehlende Strahlenexposition, fehlende Nephrotoxizität des gadoliniumhaltigen Kontrastmittels sowie gute Verträglichkeit des Kontrastmittels lösen die invasive DSA als Goldstandard der Gefäßdarstellung zunehmend ab. Die Nachteile der MR-Angiographie sind eine eingeschränkte Bildqualität bei Bewegungsunruhe, die Kontraindikation bei metallischen Implantaten sowie eine eingeschränkte Beurteilbarkeit des Stenosegrades bei hochgradig kalzifizierten Arterien.

### **1.1.3. Therapie der peripheren AVK**

Die deutsche Leitlinienempfehlung umfasst die konservative und medikamentöse Therapie, die interventionelle und chirurgische Behandlung der peripheren AVK im asymptomatischen Stadium, den Stadien der Claudicatio intermittens sowie der kritischen Extremitätenischämie. Neben dem Gehtraining und der medikamentösen Behandlung sind endovaskuläre und operative Behandlungsverfahren feste Bestandteile der gefäßmedizinischen Behandlung von Patienten mit peripherer AVK. Gerade bei Hochrisikopatienten (Patienten mit ASA III / IV) ist eine operative Vorgehensweise mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Durch eine endovaskuläre Behandlung mittels Angioplastie und/oder Stentimplantation kann das perioperative Patientenrisiko deutlich reduziert werden. Allerdings sind diese Verfahren im Vergleich zur operativen Therapie vielfach noch mit einem höheren Re-Stenose-Risiko verbunden, so dass bei den meisten Patienten eine offene Revaskularisation mittels Bypassanlage bzw. eine Majoramputation langfristig nicht zu vermeiden sind [11].

### **1.1.4. Die Re-Stenose**

Die Re-Stenose wird durch eine Intimahyperplasie verursacht. Die Induktion der Intimahyperplasie erfolgt durch den Reiz auf die Gefäßwand (shear stress) entweder durch die passagere Einwirkung des Dilatationsballons, durch den permanenten Reiz eines Stents oder durch die veränderte Hämodynamik an den Anastomosen bei der Bypassanlage. Bei einer Schädigung des Endothels wird von den Gefäßzellen (Endothelien und glatte Muskelzellen) sowie von den Thrombozyten der PDGF (platelet-



derived growth factor) freigesetzt. Dadurch wird die Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media sowie die Migration derselben in die Intima stimuliert. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix [13-16]. Sekundär kommt es zu einer Infiltration der Gefäßwand durch Monozyten, T-Zellen und anderen Leukozyten aus dem Plasma. Etwa nach drei Monaten stellt sich ein „steady-state“ ein [14, 17]. Im unverletzten Gefäß wird die Proliferation der glatten Muskelzellen von den Endothelzellen unterdrückt [13-15]. Es konnte festgestellt werden, dass eine rasche Reendothelialisierung die Intimahyperplasie reduzieren kann [14]. Die Intimahyperplasie ist von der Neoendothelialisierung zu unterscheiden. Die Neoendothelialisierung geht von vorhandenen Endothelzellen der Intima im nicht verletzten Gefäßabschnitt aus [18], ist erwünscht und gilt als Voraussetzung für eine regelhafte Funktion der vaskulären Rekonstruktion [19]. Sowohl die Proliferation der Endothelzellen zur Neoendothelialisierung als auch die Aktivierung der glatten Muskelzellen mit nachfolgender Ausbildung der Intimahyperplasie beginnen rasch nach der Gefäßverletzung [14]. Zusätzlich sind weitere Wachstumsfaktoren in den Prozess involviert.

In Studien konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass sich bei Muskelischämie eine erhöhte Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) zeigt [20, 21]. Zu der Familie der VEGF-Gene gehören mehrere Wachstumsfaktoren, z.B. P1GF, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D. Die Bezeichnung VEGF wird mit VEGF-A gleichgesetzt. Das VEGF-A ist das Schlüsselmolekül sowohl der natürlichen, als auch der abnormalen Angiogenese [22, 23]. Erhöhte VEGF-A Werte fanden sich bei verschiedenen Tumorprozessen oder intraokularen Syndromen [24-26]. Außerdem fand sich ein Zusammenhang zwischen VEGF-A und der Funktion des Corpus luteum und Fertilität [27, 28]. Bezüglich Re-Stenose konnte ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhten VEGF-Werten und Re-Stenose-Rate nach koronarer Intervention gezeigt werden [29]. In anderen Studien mit Tiermodellen zeigten sich nach i.v., i.m. und lokaler Gabe von VEGF oder von VEGF-Inhibitoren divergente Ergebnisse bezüglich der Ausbildung einer Re-Stenose. In der Arbeit von Hutter et. al. zeigte sich nach einer arterieller Verletzung eine beschleunigte endotheliale Reparatur und reduzierte neointimale Verdickung nach systemischer Gabe von VEGF. Durch Inhibition des VEGF zeigte sich ein Rückgang der endothelialen Proliferation und eine Zunahme der Intimahyperplasie [20]. In der Arbeit von Khurani

wurde VEGF lokal in die arterielle Wand nach Gefäßverletzung appliziert und in der Arbeit von Ohtani wurde ein löslicher VEGF-Rezeptor, der VEGF bindet, intramuskulär verabreicht. In beiden Arbeiten zeigte sich nach Hemmung der VEGF-Aktivität ein Rückgang der neointimalen Verdickung [30, 31].

Ein Zusammenhang zwischen Intimahyperplasie und Interleukinen wird ebenfalls vermutet [32, 33]. Interleukin-1 ist ein Schlüsselmediator bei verschiedenen Immunreaktionen sowie Entzündungsreaktionen [34, 35]. Interleukin-1 kann in glatten Muskelzellen produziert werden und über lokale autokrine und parakrine Signalwege die Proliferation der glatten Muskelzellen induzieren [36, 37]. Der Interleukin-Rezeptor, an dem die Interleukine binden, wird an der Zellmembran von verschiedenen Zellen exprimiert [34]. Durch die Blockade der Interleukin-Rezeptoren kann die Wirkung der Interleukinen gehemmt werden. Dies hat man sich bei Autoimmunerkrankungen sowie bei chronischen entzündlichen Prozessen zu Nutze gemacht [38-41]. Außerdem konnte ein protektiver Effekt der IL-Rezeptor-Antagonisten bei myokardialer Ischämie gezeigt werden [42].

In der nicht-randomisierten prospektiven multizentrischen DURABILITY Studie zeigte sich nach 6 bzw. 12 Monaten eine Re-Stenose-Rate von 8,7% bzw. 17,8% nach Stentangioplastie der A. femoralis superficialis [43]. Die randomisierte multizentrische RESILIENT Studie zeigte nach 12 Monaten eine primäre Offenheitsrate von 81,3% nach Stentangioplastie bzw. 36,7% nach Ballonangioplastie der A. femoralis superficialis und der A. poplitea. [44] Nach 3 Jahren betrug die Reinterventionsfreiheit 75,5% für die Stentangioplastie bzw. 42% für die Ballonangioplastie [45].

## **1.2. Stammzellen und Stammzelltherapie**

In den letzten Jahren brachte die Forschung in der Stammzelltherapie neue Hoffnung bei chronischen und terminalen Erkrankungen.

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich uneingeschränkt teilen können. Jede Stammzelle kann sich entweder erneut in Stammzellen teilen, oder sich mit zunehmendem ontogenetischen Alter in verschiedene Zelltypen differenzieren.

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen. Diese können sich in jeden Zelltyp weiter differenzieren [46-49]. Adulte Stammzellen sind multipotente Zellen, die sich zu allen Zelltypen eines bestimmten Gewebetypes differenzieren können [50, 51]. Im Rahmen der klinischen Anwendung erweisen sich die adulten Stammzellen besser als die embryonalen Stammzellen, da einerseits das Risiko einer Teratombildung niedriger ist und andererseits die Stammzellentnahme aus dem Knochenmark deutlich einfacher ist [52, 53].

Die CD34-positiven Stammzellen des Knochenmarks sind Stammzellen des hämatopoetischen Systems. In der Transplantationsmedizin werden isolierte CD34-positive Stammzellen selektiv nach einer Hochdosischemotherapie im Rahmen der Knochenmarktransplantation verwendet [54]. Die CD34-negativen Stammzellen des Knochenmarks sind dagegen mesenchymale Stromazellen, die sich in verschiedene Zellarten des nicht-hämatopoetischen Systems differenzieren können [55]. Aus ihnen können Endothelzellen, Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Osteozyten sowie Myofibroblasten entstehen [56-58]. Mesenchymale Stammzellen können relativ einfach isoliert werden, da sie in vitro plastikadhärent sind [59]. Bereits 1978 wurde vom Schofield die Existenz von Stammzellnischen beschrieben [60]. Stammzellnischen sind Orte im Knochenmark, in denen hämatopoetische Zellen wachsen und ausreifen. Die Stammzellnischen werden von verschiedenen Stromazellen, zu denen mesenchymale Stammzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten gehören, gebildet. Diese produzieren eine extrazelluläre Matrix, die optimale Bedingungen für die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen des blutbildenden Systems schafft [60-63].

Es ist bekannt, dass Stromazellen in der Stammzellnische des Knochenmarks die Hämatopoese beeinflussen [64]. Außerdem zeigte sich, dass mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, durch Zellmigration in unterschiedliches, geschädigtes Gewebe zu gelangen [65-67]. Es wird angenommen, dass die Vorgänge durch autokrine und parakrine Mechanismen gesteuert werden. Als Botenstoffe dienen verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren. Folglich besteht die Möglichkeit, dass mesenchymale Stammzellen in der Peripherie ebenfalls über diese und ähnliche Mechanismen in ihrer Differenzierung beeinflusst werden, z.B. im Rahmen der Neoendothelialisierung nach Gefäßtrauma. In einer tierexperimentellen Studie an Schweinen zeigte sich 3 Monate nach

einer frühen systemischen Gabe von Stammzellen nach Myokardinfarkt eine geringere Wandverdickung des nicht-infarzierten Myokards sowie eine bessere linksventrikuläre Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe [68].

Im Rahmen der Therapie einer chronischen Extremitätenischämie ist der Einsatz autologer Knochenmarkstammzellen zur Induktion einer Angiogenese ein neuer, vielversprechender Behandlungsansatz. Die Stimulation der Angiogenese durch Stammzellen ist zwar noch nicht vollkommen klar, verschiedene Studien konnten jedoch den parakrinen Effekt der Zellen sowie der Signalproteine auf das Wachstum von Kollateralen zeigen [69-72].

Die erste große Studie über Anwendung von autologen mononukleären Stammzellen zur Therapie der chronisch kritischen Extremitätenischämie beim Menschen war die TACT-Studie. Hierbei wurden Patienten mit bilateraler Beinischämie als Kontrollgruppe eingeschlossen. Es erfolgte der Vergleich nach intramuskulärer Gabe von mononukleären Knochenmarkszellen versus Kochsalzlösung, bzw. mononukleären Zellen peripheren Blutes. Nach 24 Wochen zeigte sich eine Verbesserung des Verschlussdruckindex, des  $tcPO_2$ , der Ruheschmerzen sowie der Gehstrecke [73]. In den nachfolgenden 3 Jahren konnte in 60% eine Majoramputation vermieden werden. Außerdem zeigten sich eine deutliche Verbesserung auf der Schmerzskala, Verminderung der Ulkusgröße sowie eine Verbesserung der schmerzfreien Gehstrecke 2 Jahre nach der Behandlung, auch wenn der Verschlussdruckindex und der  $tcPO_2$  sich nicht signifikant verändert haben [74].

Die BONMOT-1 Studie untersuchte die Wirkung der intramuskulären autologen Stammzellgabe. Bei 51 Patienten mit einer drohenden Majoramputation aufgrund einer schweren kritischen Extremitätenischämie konnte diese in 59% der Fälle in den folgenden 6 Monaten und in 53% der Fälle bis zum letzten Follow-up vermieden werden. Bei Patienten mit Extremitätenerhalt zeigte sich eine Verbesserung der gemessenen Arm-Knöchel-Indices und des  $tcPO_2$  innerhalb von 6 Monaten. Die Parameter änderten sich kaum bei Patienten mit durchgeführter oder weiterhin drohender Amputation. Bei Patienten, die von vornherein keine Amputation benötigten, zeigte sich eine Besserung des Rutherford Stadiums von 4,9 auf 3,3 innerhalb von 6 Monaten [75].

Die RESTORE-CLI Studie untersuchte als randomisierte, doppelt-blinde Phase IIb Studie die Sicherheit und Wirksamkeit einer intramuskulären Injektion von Stammzellen bei 77 Patienten. Hierbei zeigte sich in der Therapiegruppe ein deutlich besseres Outcome hinsichtlich Majoramputation des behandelten Beins, der Gesamtmortalität, der Entwicklung der Wundfläche bei bestehenden Ulcera und einer de-novo Gangrän. Die Amputationsrate fiel um 32%, obwohl dies statistisch nicht signifikant war ( $p=0,3$ ). Der Behandlungseffekt war bei Patienten in Stadium IV nach Fontaine deutlich ausgeprägter [76].

In der Arbeit von lafrati et al. wurde bei 34 Patienten mit einer „no option“ kritischen Extremitätenischämie (d.h. eine operative oder interventionelle Therapieoption bestand nicht mehr) eine Therapie mittels intramuskulärer Gabe von Stammzellen in die betroffene Extremität untersucht. Es zeigte sich eine Verbesserung der Lebensqualität, der Rutherford Klassifikation und der Verschlussdruckindices, Schmerzlinderung sowie eine niedrigere Amputationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe [77].

In der PROVASA Studie wurden 40 Patienten zur intraarteriellen Stammzellgabe oder zur Placebogabe randomisiert. Bei Patienten mit Stammzellbehandlung zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ruheschmerzen sowie der Heilung der Ulzerationen gegenüber der Placebogruppe. Die Studie zeigte auch, dass sich durch eine multiple Gabe von Stammzellen eine noch größere Verbesserung dieser Parameter erzielen ließ. Kritisch kranke Patienten mit ausgedehnter Gangrän und drohender Amputation (Rutherford Stadium 6) sprachen auf die Therapie gar nicht an und erhielten bereits in den ersten 3 Monaten eine Majoramputation [78].

In einem neueren Review wurde zusammenfassend die positive Wirkung der mesenchymalen Stammzellen auf das Endothel bei Atherosklerose beschrieben. Durch Freisetzung von Mediatoren, das Potential zum geschädigten Gewebe zu wandern und auch proportional zur Größe des Gefäßtraumas zu reagieren, können mesenchymale Stammzellen die Funktion des Endothels verbessern. Auch durch die Modulation von LDL-Spiegel durch die Stammzellen wird eine plaquestabilisierende Wirkung und somit sogar eine Verbesserung der Atherosklerose angenommen [79].

Die bestehenden Studien zeigen, dass die Stammzelltherapie eine vielversprechender Therapieansatz bei Patienten mit peripherer AVK darstellt.

### **1.3. Zielsetzung der Studie**

In dieser Studie wird die Anwendbarkeit patienteneigener Stammzellen zur Verbesserung der distalen Perfusion hinsichtlich der Verbesserung der Offenheitsraten nach interventioneller Therapie überprüft. Hierzu wird eine offene, randomisierte, monozentrische investigator initiated Studie mit zwei Parallelgruppen im Rahmen einer Prüfung der Phase I/II zur Untersuchung der Verträglichkeit und Wirksamkeit einer intravenösen Infusion autologer, CD34-negativer mesenchymaler Stammzellen aus menschlichem Knochenmark zur Behandlung der kritischen Ischämie der Extremität (Stadium  $\geq$  IIb nach Fontaine und  $\geq$  3 nach Rutherford) bei Patienten mit fortgeschrittener peripherer arterieller Verschlusskrankheit und mit einer vorausgegangenen perkutanen transluminalen Angioplastie bzw. Stentangioplastie durchgeführt.

Primäres Studienziel sind die Bestimmung der Sicherheit und Verträglichkeit der Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen zur Infusion bei Patienten mit vorausgegangener Angioplastie bzw. Stentangioplastie durch Erfassung der Sicherheitsparameter und unerwünschter Ereignisse in beiden Behandlungsgruppen über 12 Monate nach Eingriff.

Sekundäres Studienziel ist der Einfluss der Stammzelltherapie auf die Offenheitsrate nach Intervention, auf die Entwicklung der Verschlussdruckindices, auf die Reduktion des Schmerzniveaus im Bereich der betroffenen Extremität sowie auf die Expression proinflammatorischer Biomarker.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um einen offenen, randomisierten, prospektiven Vergleich zweier Patientengruppen in einer monozentrischen investigator initiated klinischen Prüfung der Phase I/II. In der Testgruppe Gruppe A erfolgte eine Stammzellentnahme aus dem Knochenmark mit simultaner endovaskulärer Intervention der betroffenen Becken- und/oder Beinarterien. Patienten dieser Gruppe erhielten 12 Wochen nach dem Eingriff eine autologe Stammzellrückgabe in Form einer i.v. Infusion (MSC-Apceth Infusion). Patienten der Kontrollgruppe Gruppe B erhielten eine alleinige Intervention. Die Eingriffe in beiden Gruppen sowie die Stammzellrückgabe der Gruppe A erfolgten unter einem kurzzeitigen Klinikaufenthalt. Der Beobachtungszeitraum betrug 12 Monate postinterventionell. Beginn der Studie war im Jahr 2011. EudraCT-Nr.: 2010-021821-10. [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Identifier: NCT01351610. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer genehmigt, Genehmigungsnummer: 10065.

Die Gesamtdauer der klinischen Prüfung betrug ca. 30 Monate:

- 12 Monate Patientenrekrutierung
- 12 Monate Nachbeobachtung ab dem Zeitpunkt der PTA (3 Monate nach PTA + 9 Monate für Gruppe A ab MSC-Apceth zur Infusion)
- 6 Monate für die statistische Auswertung und das Anfertigen des integrierten statistisch-medizinischen Abschlussberichtes.

Die Dauer der Teilnahme eines einzelnen Patienten an der klinischen Prüfung beläuft sich auf ca. 12 Monate:

- Eine Woche Vorbereitung zur PTA und Knochenmarkspende
- 12 Monate (Gruppe A: 3 Monate nach PTA plus 9 Monate nach Verabreichung von MSC-Apceth zur Infusion; Gruppe B: 12 Monate nach PTA) mit kurzzeitiger stationärer Aufnahme (bei Gruppe A: zweimal für 24 Stunden jeweils nach PTA und Verabreichung von MSC-Apceth zur Infusion; bei Gruppe B: nur nach PTA) und ambulante Nachbeobachtungsphase

- Innerhalb der letzten 2 Wochen der vorgenannten 3 Monatsperiode nach PTA findet vor Applikation der MSC-Apceth zur Infusion die endgültige Auswahl der Patienten in der Gruppe A statt.

## **2.2. Patienten**

In dieser klinischen Prüfung werden weibliche und männliche Patienten in einem Alter zwischen 40 und 80 Jahren mit einer diagnostizierten kritischen Extremitätenischämie bei fortgeschrittener peripherer arterieller Verschlusskrankheit mit stark eingeschränkter Gehstrecke und beginnenden Ruheschmerzen (Rutherford Stadium 4) untersucht. Bei allen Patienten erfolgte im Rahmen der Diagnostik eine MR-Angiographie der retroperitonealen Arterien und der Beinarterien. In beide Gruppen wurden nur Patienten mit TASC II A bis TASC II C Läsionen der Becken- oder Beinarterien [80], bei denen die Indikation für eine interventionelle Therapie gestellt worden ist, eingeschlossen. Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien für die Studie sind im Anhang 8.1. aufgeführt.

### *Ausschlusskriterien für die Knochenmarkspende:*

Vor der Entnahme von Knochenmark wurden die Patienten klinisch untersucht sowie ein Laborscreening (Organ- und Knochenmarkfunktion, Infektstatus, Tumorscreening) durchgeführt. Ebenso durften keine pathologischen Befunde im Fragebogen zur Knochenmarkspende dokumentiert sein. Bei Vorliegen einer unklaren Anamnese, von diversen Vorerkrankungen sowie Abweichungen in den Laborwerten (siehe Anhang 8.2.) wurde nach Maßgabe des verantwortlichen Prüfarztes über die Teilnahme an der klinischen Prüfung entschieden. Patienten ohne Einschluss wurden als "primary screen failure" bezeichnet.

### *Ausschluss durch nicht erfolgte Freigabe des Stammzellpräparates:*

Die angereicherte Zellsuspension in MSC-Apceth zur Infusion wurde vor Applikation auf ihre Spezifikationen (Anzahl der CD34-negativen mesenchymalen Stammzellen, Zellvitalität, unauffällige Karyotypisierung, Keimfreiheit) hin analysiert und frei gegeben. Falls die Spezifikationen nicht erfüllt waren, konnte keine Anwendung erfolgen. In diesem



Fall war der Patient von der weiteren Teilnahme an der klinischen Prüfung ausgeschlossen und wurde als „secondary screen failure“ bezeichnet.

### **2.3. Knochenmarkspende und MSC-Apceth Infusion**

Die Knochenmarkspende erfolgte unter sterilen Bedingungen im Operationssaal in Allgemeinanästhesie vor der Intervention. Unter sterilen Kautelen erfolgte die Punktion der spina iliaca anterior superior und die Entnahme von ca. 60 ml Knochenmark mit entsprechenden heparinbeschichteten Spritzen. Das entnommene Knochenmark wurde umgehend zur Apceth GmbH & Co KG (Haidgraben 5, 85521 Ottobrunn, Deutschland) zur weiteren Aufbereitung transportiert. Durch eine spezielle, durch Apceth GmbH & Co KG entwickelte Technologie, wurden humane autologe CD34-negative mesenchymale Stammzellen aus dem entnommenen Knochenmark isoliert und angereichert. Die MSC-Apceth für Infusion wurden in 50 ml Cryobags bereitgestellt. Jeder Beutel beinhaltete eine konzentrierte Suspension mit mesenchymalen Stammzellen zwischen  $15 \pm 3$  ml und  $25 \pm 5$  ml, entsprechend  $75 \times 10^6 \pm 15 \times 10^6$  mesenchymaler Stammzellen oder  $125 \times 10^6 \pm 25 \times 10^6$  mesenchymaler Stammzellen. Die Anzahl der zu infundierenden Stammzellen wurde während des Herstellungsprozesses so kalibriert, dass man mindestens  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  und maximal  $2 \times 10^6$  Zellen/kg Körpergewicht erreicht. Die Beutel wurden bis zur Infusion eingefroren eingelagert.

Patienten, die in Gruppe A randomisiert wurden und sich weiterhin für eine Stammzellgabe eigneten, erhielten 12 Wochen nach der Intervention die MSC-Apceth Infusion. Am Tag der Verabreichung wurden die entsprechenden, patienteneigenen aufbereiteten Stammzellen aufgetaut. Die Anzahl der vitalen Stammzellen wurde ermittelt und die Infusion für die Rückgabe nach den SOP's des Herstellers aufbereitet (Anhang 8.4). Anschließend erfolgte die i.v.-Applikation der Stammzellsuspension unter kontinuierlichem Kreislaufmonitoring (EKG, Blutdruckmessung, O<sub>2</sub>-Sättigungsmessung). Ebenso erhielt der Patient unmittelbar vor der Applikation eine intravenöse Allergieprophylaxe mit 250mg Soludecortin + 50mg Ranitidin + 10 mg Metoclopramid. Der Prozess wurde ab dem Zeitpunkt des Auftauens des Beutels bis zur Verabreichung auf 60 Minuten limitiert.

## 2.4. Labor

Die Blutabnahmen erfolgten bei nüchternen Patienten an den Unterarm- und Ellbogenvenen bei nur mäßiger Stauung in dafür vorgesehene Monovetten (Sarstedt, Deutschland). Die Auswertung der Standardlaborwerte (siehe Anhang 8.2.) erfolgte über die Routinelaboruntersuchung der Klinik. Zur Evaluierung der spezifischen Laborparameter erfolgte die Asservierung und Weiterverarbeitung bei Apceth GmbH. Die laborchemische Bestimmung des VEGF-A, PDGF-BB und IL1-ra erfolgte mittels ELISA-Tests (VEGF-A und IL1-ra: eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich; PDGF-BB: R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK). Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem ELISA-Reader (Dynatech Laboratories, USA). Die Ablesung erfolgte bei 450nm Wellenlänge, der Korrekturwert lag bei 620 nm. Die untere Nachweisgrenze lag bei 7,9 pg/ml für VEGF-A, 1,0 pg/ml für IL1-ra und 15,0 pg/ml für PDGF-BB. Die intra- und interassay Fehlerquote der Tests lag bei < 8%.

## 2.5. Studienverlauf

### Abschnitt I (Screening Abschnitt): Tag -7 bis Tag -1

Anamnese, aktuelle Medikation, EKG-Auswertung, laborchemische Blutuntersuchungsergebnisse, Vitalparameter und körperliche Untersuchungsbefunde wurden erfasst und geprüft.

Der Verschlussdruckindex (ABI) wurde mit einem computergesteuerten System Angiolab 1DL (Spead-Doppler-Systeme Vertriebs-GmbH, Deutschland) gemessen. Nach einer 10-minütigen Ruhepause im Liegen erfolgte die Messung zuerst des Blutdruckes an beiden Aa. brachiales und danach an der A. dorsalis pedis und A. tibialis posterior beidseits. Alle Werte wurden dokumentiert, der niedrigere periphere Verschlussdruckwert wurde jeweils für die ABI-Messung herangezogen.

Das tcPO<sub>2</sub> wurde mit einem 5-Elektrodenmodul (TCM 400, Radiometer, Dänemark) gemessen. Nach automatischer Gerätekalibrierung wurden modifizierte Clark-Elektroden an die rasierte und mit Alkohol gereinigte Haut angebracht. Danach erfolgte eine 15-

minütige Ruhepause in Rückenlage, damit ein steady state der tcPO<sub>2</sub>-Werte erreicht werden konnte. Die Referenzelektrode wurde im Brustbereich angebracht. Die peripheren Elektroden wurden dorsal des medialen Malleolus und zwischen Os metatarsale II und III positioniert. tcPO<sub>2</sub>-Werte > 65 mmHg wurden als normal betrachtet, Werte zwischen 50 mmHg und 65 mmHg als akzeptabel.

Der Laufbandtest erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit einer Geschwindigkeit von 3 km/h und 12% Steigerung. Es wurde jeweils die Zeit bis zum Auftreten von Claudicatosymptomatik und bis zum Abbruch der Untersuchung dokumentiert.

Die Erfassung der Wundsituation erfolgte mithilfe der Wagner-Armstrong-Skala [81, 82]. Beide Unterschenkel und Füße wurden fotografiert und die digitalen Aufnahmen pseudonymisiert gespeichert.

*Tabelle 2: Wagner-Armstrong-Wundskala*

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>A</b>	prä- oder postulzerative Läsion	oberflächliche Wunde	tiefe Wunde bis zur Sehne oder Kapsel reichend	tiefe Wunde bis zum Knochen oder Gelenk reichend	Nekrose von Fußteilen	Nekrose des gesamten Fußes
<b>B</b>	mit Infektion	mit Infektion	mit Infektion	mit Infektion	mit Infektion	mit Infektion
<b>C</b>	mit Ischämie	mit Ischämie	mit Ischämie	mit Ischämie	mit Ischämie	mit Ischämie
<b>D</b>	mit Infektion und Ischämie	mit Infektion und Ischämie	mit Infektion und Ischämie	mit Infektion und Ischämie	mit Infektion und Ischämie	mit Infektion und Ischämie

Die Ultraschalluntersuchungen sowie die farbkodierte Duplexsonographie und Frequenzspektrumanalyse erfolgten an einem Logiq 7 Ultraschallgerät (GE Healthcare, Deutschland) mit einer 3,5 MHz konvexer Ultraschallsonde für die Abdomenuntersuchung und mit einer 7,5 MHz linearer Ultraschallsonde für die vaskuläre Untersuchungen der Peripherie.

Die Erfassung der aktuellen Lebensqualität erfolgte durch den standardisierten Quality of Life Questionnaire (PAVK-86 Fragebogen, siehe Anhang 8.3.). Die aktuelle Schmerzerfassung erfolgte mit der visuellen Schmerzskala.

In dieser Phase erfolgte die Bestätigung der Diagnose und Evaluierung, ob der Patient für die Studie geeignet ist.

Die Randomisierung erfolgte online (Metronomia Clinical Research GmbH, München, Deutschland) nach Überprüfung der Einschluss- und Ausschlusskriterien und nach Einwilligung des Patienten zur Studie.

*Abschnitt II (Knochenmarkspende, Intervention, 24-stündige Hospitalisation): Tag 0 und Tag 1*

Am Tag 0 erfolgte bei Patienten der Gruppe A die Knochenmarkentnahme wie in Kapitel 2.3. beschrieben mit anschließender Intervention. Patienten der Gruppe B erhielten die alleinige Intervention in Lokalanästhesie.

Die interventionelle Therapie erfolgte mittels der Angiographieanlage Siemens Axiom Artis zee (Siemens AG, München, Germany) mit benutzerspezifischer Einstellung für Angiographie der peripheren Arterien. Alle Aufnahmen wurden auf der Workstation MagicView (Siemens AG, München, Germany) begutachtet und im PACS-System gespeichert.

Für die Intervention wurde die Leiste der entsprechenden Seite abgewaschen und steril abgedeckt. Nach setzen der Lokalanästhesie mit üblicherweise 10ml Ropivacain (10mg/ml) erfolgte die Punktion der A. femoralis communis sowie das Setzen einer 6 French-Schleuse in Seldinger Technik. Die Angiographie der unteren Extremität wurde mit jodhaltigem Kontrastmittel Imeron® 300 M (300 mg Jod/ml, Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Nach schrittweiser Darstellung der Beinarterien bis zum Fußbogen erfolgte die selektive Darstellung der Stenose. Diese wurde nach Ausmessen mit einem kaliberäquivalenten Ballon ggf. mit Stent behandelt. Danach erfolgte eine Abschlussangiographie der betroffenen Extremität. Nach Entfernen der Katheterinstrumente und der Schleuse erfolgte die Anlage eines Druckverbandes. Alle

Interventionen wurden durch einen erfahrenen endovaskulären Gefäßchirurgen durchgeführt.

Patienten der Gruppe A wurden aufgrund der Allgemeinanästhesie postinterventionell zuerst im Aufwachraum überwacht. Patienten der Gruppe B wurden nach einer kurzen 15-minütigen Überwachungsphase auf der Intermediate Care direkt auf die Normalstation verlegt. Alle Patienten mussten eine 6-stündige komplette Bettruhe mit anschließender eingeschränkter Bettruhe für insgesamt 12 Stunden einhalten.

Am Tag 1 wurde der Druckverband abgenommen. Eine standardmäßige Blutabnahme zur Kontrolle von Blutbild, Elektrolyten und Nierenwerten wurde durchgeführt. Ebenfalls erfolgte die postinterventionelle Bestimmung der ABI-Werte sowie eine sonographische Kontrolle der Punktionsstelle hinsichtlich AV-Fistel und Aneurysma spurium.

### Abschnitt III (Follow-up): Tag 2 bis 12 Monate postinterventionell

Patienten der Gruppe A erhielten in der 12. Woche postinterventionell die MSC-Apceth Infusion. Entsprechend wurde dieser Abschnitt in der Gruppe A untergliedert in *Abschnitt IIIa: Tag 2 bis Woche 11 postinterventionell*, *Abschnitt IIIb: Woche 12 mit autologer Stammzelltransplantation* und *Abschnitt IIIc: Woche 12 bis 9 Monate nach autologer Stammzellgabe*.

Die Stammzellgabe mit MSC-Apceth-Infusion (Abschnitt IIIb) erfolgte im Rahmen eines kurzen stationären Aufenthaltes. Unmittelbar vor der Applikation erhielt jeder Patient eine intravenöse Allergieprophylaxe mit 250mg Soludecortin + 50mg Ranitidin + 10 mg Metoclopramid. Die Gabe der aufbereiteten MSC-Apceth Infusion erfolgte als i.v.-Applikation unter Monitoring der Kreislaufparameter auf der Intermediate Care. Jeder Beutel beinhaltete eine konzentrierte Suspension mit mesenchymalen Stammzellen zwischen  $15 \pm 3$  ml und  $25 \pm 5$  ml, entsprechend  $75 \times 10^6 \pm 15 \times 10^6$  mesenchymaler Stammzellen oder  $125 \times 10^6 \pm 25 \times 10^6$  mesenchymaler Stammzellen. Die Kreislaufüberwachung erfolgte bis zur einer Stunde nach Infusion, danach wurden die Patienten auf Normalstation verlegt.

Tabelle 3: Studienabschnitte

Gruppe A: Intervention + Stammzellgabe			Gruppe B: alleinige Intervention		
Abschnitt	Bezeichnung	Dauer	Abschnitt	Bezeichnung	Dauer
I	Screening	7 Tage vor Intervention	I	Screening	7 Tage vor Intervention
II	Knochenmarkspende + Intervention	24 Stunden nach Intervention	II	Intervention	24 Stunden nach Intervention
IIIa	postinterventionelle Beobachtung bis zur Stammzellgabe	bis zu 12 Wochen nach Intervention	III	postinterventionelle Beobachtung	12 Monate nach Intervention
IIIb	Stammzellgabe	12te Woche nach Intervention			
IIIc	postinterventionelle Beobachtung nach der Stammzellgabe	bis zu 9 Monate nach Stammzellgabe			
IV	Langzeitbeobachtung außerhalb der Studie	unbegrenzt	IV	Langzeitbeobachtung außerhalb der Studie	unbegrenzt

Abschnitt IV (unbegrenzter Langzeit Follow-up): ab Monat 13 postinterventionell

In diesem Abschnitt erfolgte eine langfristige Beobachtung der Patienten beider Gruppen ohne festgelegte Follow-up Termine. Bewertet wurde die klinische Situation hinsichtlich Schmerzempfinden, Verschlussdruckindices und Offenheit der Revaskularisation nach sonographischen Kriterien.

Die Follow-up Termine beider Gruppen erfolgten entsprechend dem Studienprotokoll. Die Übersicht der Follow-Up Termine ist im Anhang 8.5. aufgeführt.

## **2.6. Statistische Auswertung**

### **2.6.1. Datenverarbeitung**

Die Daten für diese Arbeit wurden den Patientenakten des Computerprogramms MediStar (CompuGroup AG, Koblenz, Deutschland) entnommen.

Bei der initialen Datenerfassung wurde zur Erstellung einer Übersicht eine Tabelle mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, USA) angelegt.

### **2.6.2. Datenanalyse**

Die Datenanalyse wurde mit Vorlage der vollständigen Microsoft Excel Tabelle durchgeführt.

### **2.6.3. Statistische Auswertung**

Die vorliegenden Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) analysiert. Es erfolgte die Auswertung der demographischen Daten, die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen, sowie die Analyse hinsichtlich der Abhängigkeit von Risikofaktoren. Kontinuierliche Verlaufsparemeter wurden mittels gepaartem t-Test verglichen, nicht parametrische Daten wurden mit dem Mann-Whitney Test verglichen. Die Überlebenszeit innerhalb des Beobachtungszeitraums, die in dieser Arbeit den Offenheitsraten nach Angioplastie bzw. Stentangioplastie gleicht, kann graphisch mittels einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt werden. Dazu wird auf der x-Achse die Offenheit in Zeit (Tage) und auf der y-Achse die mit dem Kaplan-Meier Verfahren berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit eingetragen. So lassen sich mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode Überlebenswahrscheinlichkeiten bestimmen und es kann angegeben werden, bei wie vielen Patienten bis zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Ereignis, in unserer Arbeit eine Re-Stenose oder Verschluss des Gefäßes in der behandelten Region, stattgefunden hat oder noch nicht eingetreten ist. Mit Eintreten des Ereignisses fällt die Überlebenskurve zum Zeitpunkt des Ereignisses nach unten ab. So können aus der Kaplan-Meier Kurve zu beliebigen Zeitpunkten die Überlebensraten abgelesen werden. Der Zeitpunkt an dem die Überlebenswahrscheinlichkeit 0,5 beträgt bezeichnet man als mediane Überlebenszeit. Diese hängt vom Zensierungsmuster der

Daten ab. Daher werden bei Überlebenszeiten immer die medianen Werte mit angegeben, sodass einsehbar ist, ab welchem Zeitpunkt die Hälfte aller Patienten ein Ereignis erlitten haben.

Da nicht alle Probanden beim Eintreten des Ereignisses symptomatisch waren, wurde bei diesen Patienten die Überlebenszeit bis zum Zeitpunkt der Feststellung einer Re-Stenose bzw. eines Verschlusses der Indexrekonstruktion im Rahmen der Follow-Up Untersuchung berechnet. Bei symptomatischen Patienten wurde die Zeit bis zum Auftreten der Beschwerden als Zeitpunkt des Ereignisses berechnet.

Um für einen Schätzwert plausible Werte für einen bestimmten Bereich angeben zu können, kann ein Konfidenzintervall als Maß für die Präzision der Schätzung angegeben werden. Es werden die Ober- und Untergrenze des Konfidenzintervalls angegeben, wobei es wahrscheinlicher ist, dass die Werte in der Mitte, als an den Grenzen des Konfidenzintervalls liegen. Um Unterschiede zweier oder mehrerer Gruppen von Ergebnissen als signifikant benennen zu können, darf die Wahrscheinlichkeit, dass es nur durch Zufall beobachtet wird, gering sein. Bei den beschriebenen statistischen Verfahren wurde ein  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakteristika des Studienkollektivs

Insgesamt wurden 35 Patienten für die Studie rekrutiert. Davon zeigten sich 12 Patienten für die Studie bereits während der Screeningphase nicht geeignet. 23 Patienten konnten für beide Gruppen randomisiert werden, 12 Patienten für Gruppe A und 11 Patienten für Gruppe B. 3 Patienten der Gruppe A erhielten schlussendlich keine Stammzellgabe, da in zwei Fällen die Stammzellsuspension die Kriterien zur Rückgabe nicht erfüllt hat und in einem Fall der Patient die Rückgabe abgelehnt hat. Diese 3 Patienten wurden der Gruppe B zugeordnet. In der Gruppe A verblieben 9 Patienten. Von den 23 Patienten beendeten 17 Patienten die Studie. Von den 6 vorzeitig ausgeschiedenen Patienten war 1 Patient in der Gruppe A und 5 Patienten in der Gruppe B.

Tabelle 4: Demographische Daten der Patienten

	Gruppe A (n = 9)	Gruppe B (n = 14)	Insgesamt (n = 23)	p-Wert
<b>Patientenzahl</b>	9(39,1%)	14 (60,9%)	23 (100%)	0,297
<b>Geschlecht</b>				
weiblich	5 (55,6%)	6 (42,9%)	11 (47,8%)	
männlich	4 (44,4%)	8 (57,1%)	12 (52,2%)	
<b>Alter</b>				
50 - 59 Jahre	2 (22,2%)	1 (7,1%)	3 (13%)	
60 - 69 Jahre	3 (33,3%)	5 (35,7%)	8 (34,8%)	
70 - 80 Jahre	4 (44,4%)	8 (57,1%)	12 (52,2%)	
Mittleres Alter	68,44 ± 6,89	69,43 ± 6,58	69,04 ± 6,57	0,499

Tabelle 5: Patientenüberblick

	Gruppe A (n = 9)	Gruppe B (n = 14)	Insgesamt (n = 23)
<b>Studie beendet</b>			
ja	8 (88,9%)	9 (64,3%)	17 (73,9%)
nein	1 (11,1%)	5 (35,7%)	6 (26,1%)
<b>Grund für vorzeitige Ausscheidung aus der Studie</b>			
MSC-Apceth Infusion erfüllte nicht die Kriterien zur Rückgabe	0 (0%)	2 (14,3%)	2 (8,7%)
Patientenwille	1 (11,1%)	2 (14,3%)	3 (13%)
Kontaktverlust	0 (0%)	1 (7,1%)	1 (4,3%)

Tabellen 6 und 7 zeigen die Verteilung der Hauptrisikofaktoren der Studienpatienten sowie die Begleitmedikation zu Studienbeginn.

Tabelle 6: Atherogene Risikofaktoren

Risikofaktor	Gruppe A (n = 9)	Gruppe B (n= 14)	Insgesamt (n = 23)	p-Wert
<b>Bluthochdruck</b>	6 (66,7%)	13 (92,9%)	19 (82,6%)	0,388
<b>Diabetes mellitus</b>	4 (44,4%)	7 (50,0%)	11 (47,8%)	0,511
<b>Hypercholesterinämie</b>	5 (55,6%)	10 (71,4%)	15 (65,2%)	0,487
<b>Nikotinkonsum</b>	6 (66,7%)	5 (35,7%)	11 (47,8%)	0,511
<b>KHK</b>	3 (33,3%)	4 (28,6%)	7 (30,4%)	0,487

Tabelle 7: Begleitmedikation

Medikation	Gruppe A (n = 9)	Gruppe B (n= 14)	Insgesamt (n = 23)	p-Wert
<b>TAH</b>	8 (88,9%)	12 (85,7%)	20 (86,9%)	0,344
<b>Betablocker</b>	3 (33,3%)	6 (42,8%)	9 (39,1%)	0,499
<b>ACE-Hemmer</b>	4 (44,4%)	6 (42,8%)	10 (43,5%)	0,507
<b>Statine</b>	5 (55,6%)	8 (57,1%)	13 (56,5%)	0,507
<b>Vasodilatoren</b>	4 (44,4%)	2 (14,3%)	6 (26,1%)	0,487

### 3.2. Basisdaten

Zu Beginn wurde bei allen 23 Patienten eine periphere AVK im Stadium Rutherford 4 am betroffenen Bein diagnostiziert. Die durchschnittliche Gehstrecke betrug in der Gruppe A 67 Meter und in der Gruppe B 51,8 Meter. Der durchschnittliche Verschlussdruckindex betrug in der Gruppe A 0,44 und in der Gruppe B 0,46. Die durchschnittliche Schmerzintensität betrug in Gruppe A 6,24 und in Gruppe B 6,52.

*Tabelle 8: Basisdaten zu Studienbeginn*

	<b>Rutherfordstadium</b>	<b>Laufbandtest</b>	<b>Ruhe-ABI</b>	<b>VAS</b>
<b>Gruppe A (n = 9)</b>	4	67 Meter	0,44	6,24
<b>Gruppe B (n = 14)</b>	4	51,8 Meter	0,46	6,52

Bei allen 23 Patienten wurden insgesamt 33 Becken- und Beinarterien behandelt, TASC-II A bis TASC-II C Läsionen.

*Tabelle 9: Verteilung der Patienten zwischen den Gruppen hinsichtlich TASC-II-Klassifikation*

	<b>Gruppe A (n = 9)</b>	<b>Gruppe B (n = 14)</b>	<b>Insgesamt (n = 23)</b>
<b>TASC-II A</b>	5	9	16
<b>TASC-II B</b>	2	4	6
<b>TASC-II C</b>	2	1	3

Insgesamt wurden 21 Stentimplantationen und 12 Ballonangioplastien durchgeführt. Die Stentlängen betragen zwischen 20 mm und 120 mm mit einem Durchmesser zwischen 5 mm und 9 mm. Die mittlere Länge der Stents betrug 55,24 mm  $\pm$  32,19 mm. (55 mm  $\pm$  42,43 mm in Gruppe A; 55,39 mm  $\pm$  26,02 mm in Gruppe B) und der mittlere Durchmesser der Stents betrug 6,19 mm  $\pm$  1,99 mm (5,25 mm  $\pm$  2,92 mm in Gruppe A; 6,77 mm  $\pm$  1,42 mm in Gruppe B). Die Ballone für die alleinige Angioplastie waren alle 40 mm lang  $\pm$  0 mm mit einem mittleren Durchmesser von 5,42 mm  $\pm$  1,73 mm (4,33 mm  $\pm$  1,16 mm in Gruppe A; 5,78 mm  $\pm$  1,79 mm in Gruppe B).

Tabelle 9a: Aufteilung der Interventionen in den Gruppen

	Gruppe A (n = 9)	Gruppe B (n = 14)	Insgesamt (n = 23)
<b>behandelte Arterien</b>	11	22	33
<b>alleinige Angioplastie</b>	3	9	12
<b>Stentangioplastie</b>	8	13	21

### 3.3. primäre Offenheitsrate nach interventioneller Revaskularisation

Die mittlere primäre Offenheit in Gruppe A betrug 229,82 Tage und in Gruppe B 187,64 Tage. In den einzelnen Subgruppen war der Unterschied zwischen den alleinigen Angioplastien am größten. Hierbei wurden mittels alleiniger Angioplastie in beiden Gruppen Patienten mit TASC-II A und TASC-II B Läsionen behandelt. Mittels Stentangioplastie wurden Patienten mit Läsionen TASC-II A bis TASC-II C interveniert. In Gruppe A zeigte sich eine mittlere primäre Offenheit mit 279 Tagen und in Gruppe B mit 176 Tagen. Bei den Patienten mit durchgeführter Stentangioplastie zeigte sich ein Unterschied in der primären Offenheit von 15,69 Tagen (Gruppe A 211,38 Tage; Gruppe B 195,69).

In Gruppe A war ein Patient mit einer frustraner Stentangioplastie der rechten A. femoralis superficialis. In Gruppe B war ein Patient mit einem sofortigen Verschluss der angioplastierten A. femoralis superficialis rechts mit einer nachfolgenden offenen chirurgischer Revaskularisation mittels infragenualer Bypassanlage.

Tabelle 10: Stentoffenheit Gruppe A (8 Patienten, 8 behandelte Gefäße)

behandeltes Gefäß	Stentlänge	Stentdurchmesser	primäre Offenheit (Tage)
AFS links	120 mm	5 mm	292
AIE links	40 mm	6 mm	182
AFS rechts	40 mm	5 mm	162
AFS rechts	40 mm	5 mm	162
AFS rechts	x	x	0
AIE links	40 mm	8 mm	267

Tabelle 10: Stentoffenheit Gruppe A (8 Patienten, 8 behandelte Gefäße)

AFS rechts	120 mm	5 mm	316
AIE rechts	40 mm	8 mm	310
<b>Mittelwert</b>			<b>211,38</b>

Tabelle 11: Offenheit nach Angioplastie Gruppe A (3 Patienten, 3 behandelte Gefäße)

behandeltes Gefäß	Ballonlänge	Ballondurchmesser	primäre Offenheit (Tage)
AFS links	40 mm	5 mm	182
ATA links	40 mm	3 mm	345
AFS rechts	40 mm	5 mm	310
<b>Mittelwert</b>			<b>279</b>

Tabelle 12: Stentoffenheit Gruppe B (10 Patienten, 13 behandelte Gefäße)

behandeltes Gefäß	Stentlänge	Stentdurchmesser	primäre Offenheit (Tage)
AIC links	60 mm	9 mm	82
AIC rechts	40 mm	9 mm	82
AFS rechts	60 mm	5 mm	180
A. poplitea links	60 mm	6 mm	75
AFS links	40 mm	6 mm	75
AIC links	40 mm	8 mm	357
AFS links	60 mm	5 mm	134
AFS rechts	120 mm	6 mm	0
AIE links	20 mm	8 mm	329
AFS rechts	60 mm	6 mm	309
AFS links	20 mm	6 mm	315
AIE rechts	80 mm	8 mm	241
AIE rechts	60 mm	6 mm	365
<b>Mittelwert</b>			<b>195,69</b>

Tabelle 13: Offenheit nach Angioplastie Gruppe B (6 Patienten, 9 behandelte Gefäße)

behandeltes Gefäß	Ballonlänge	Ballondurchmesser	primäre Offenheit (Tage)
AIC links	40 mm	8 mm	26
AIC rechts	40 mm	8 mm	26
AIE rechts	40 mm	8 mm	26
AFC links	40 mm	5 mm	157
AFS links	40 mm	5 mm	157
AFS links	40 mm	5 mm	202
TTF links	40 mm	3 mm	315
All rechts	40 mm	5 mm	365
A. poplitea links	40 mm	5 mm	310
<b>Mittelwert</b>			<b>176</b>

In der Testgruppe (Gruppe A) zeigten sich alle Rekonstruktionen bis zum Tag 160 offen ohne erneute Stenose oder Verschluss. Nach 6 Monaten betrug die primäre Offenheit 90% in der Testgruppe und 55% in der Kontrollgruppe. Am Ende der Beobachtungsphase nach 12 Monaten zeigte sich eine primäre Offenheit von 10% in der Testgruppe und 5% in der Kontrollgruppe.

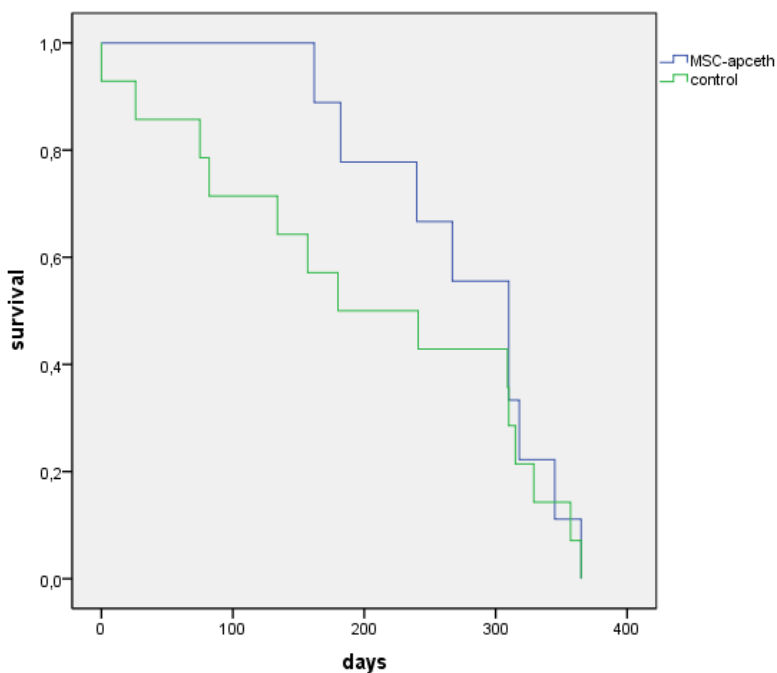


Tabelle 14: Kaplan-Meier-Kurve

zur primären Offenheitsrate beider Gruppen. Blau: Gruppe A (Testgruppe), grün: Gruppe B (Kontrollgruppe)

### 3.4. Technische Untersuchungen

#### 3.4.1. Verschlussdruckindex

Nach der Intervention zeigte sich bei Patienten beider Gruppen eine signifikante Verbesserung der Verschlussdruckindices, allerdings war diese in der Gruppe A deutlich höher. Im weiteren Verlauf kam es zur Annäherung der Werte beider Gruppen. Nach der MSC-Apceth Infusionsgabe zeigte sich in der Testgruppe A eine erneute deutliche Verbesserung der ABI-Werte. Am Ende des 12-monatigen Beobachtungszeitraums zeigten sich die Verschlussdruckindices in beiden Gruppen etwa gleich (letzter Follow Up Termin: Gruppe A  $0,775 \pm 0,121$  vs. Kontrolle  $0,757 \pm 0,162$ ).

*Tabelle 15: Entwicklung der ABI-Werte im Verlauf*

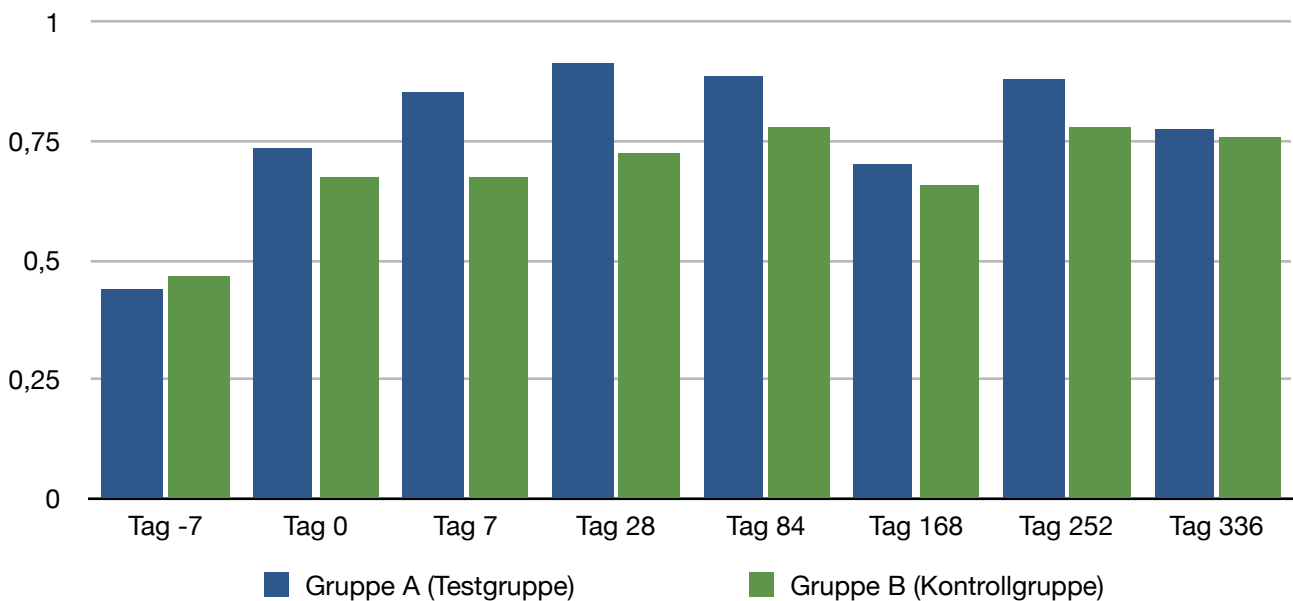
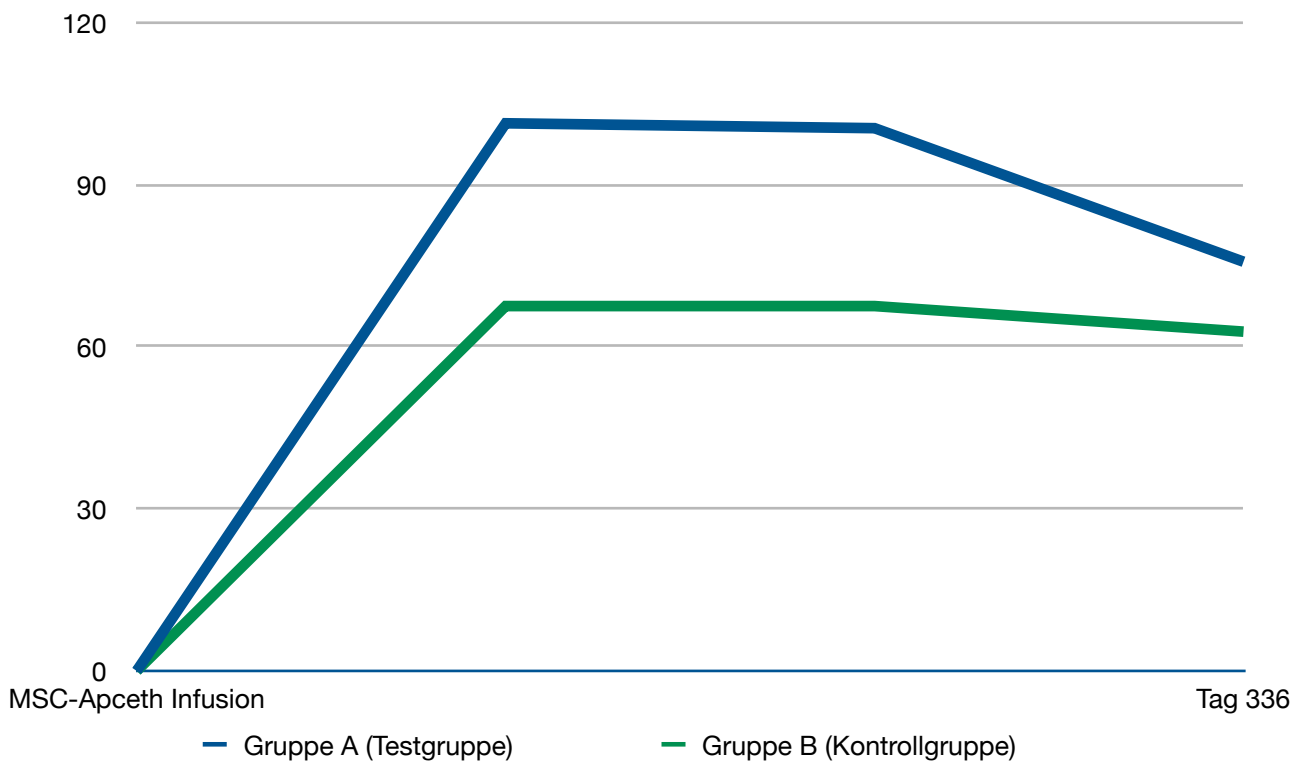


Tabelle 16: Prozentualer Anstieg der ABI-Werte nach Stammzellgabe

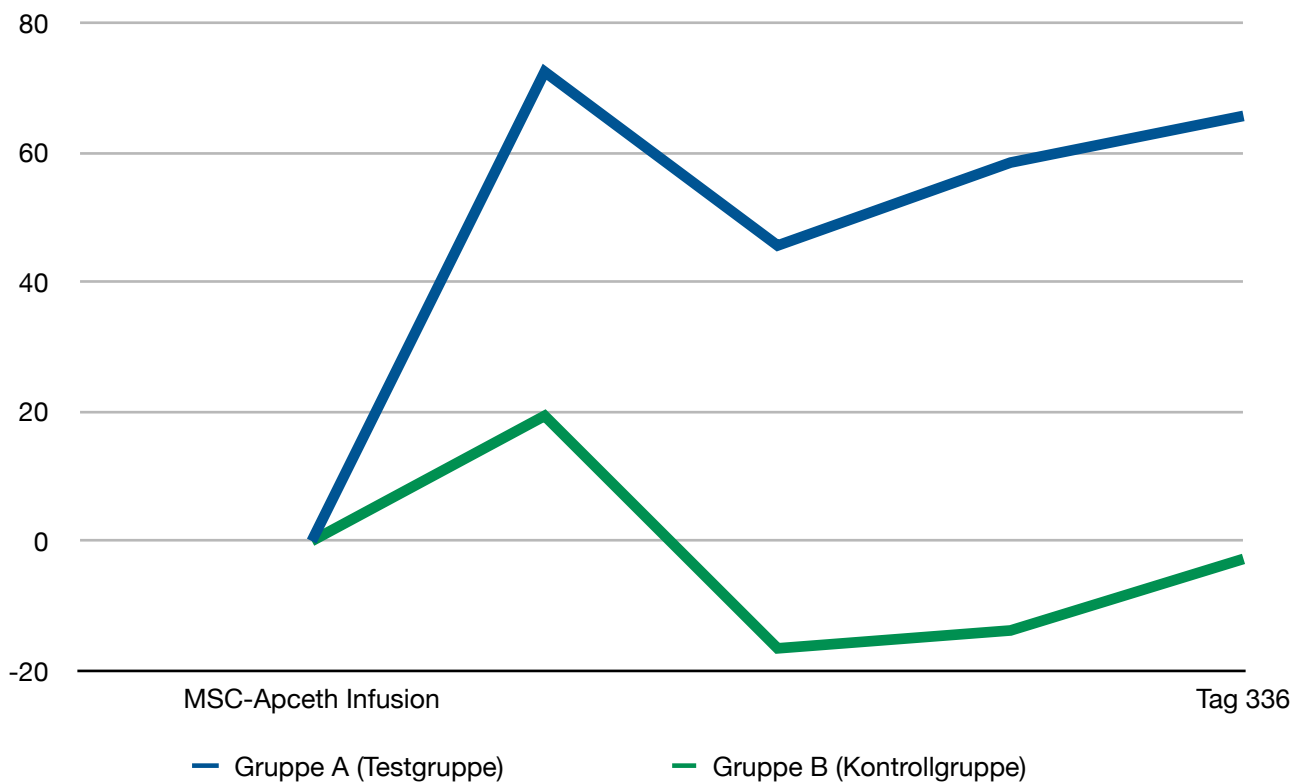


### 3.4.2. tcPO<sub>2</sub>

Die Basis-tcPO<sub>2</sub>-Werte zeigten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Mikrozirkulation, die anhand der tcPO<sub>2</sub>-Werte gemessen wurde, war in beiden Gruppen nach der Intervention weiterhin beeinträchtigt. In der Testgruppe A zeigte sich am Ende des 12-monatigen Beobachtungszeitraums eine deutliche Verbesserung der tcPO<sub>2</sub>-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ausgangswerte: Gruppe A 25,0 mmHg ± 13,7 mmHg versus Gruppe B 47,1 mmHg ± 27,5 mmHg; letzter Besuch: Gruppe A 41,4 mmHg ± 7,7 mmHg versus Gruppe B 45,8 mmHg ± 9,1 mmHg).



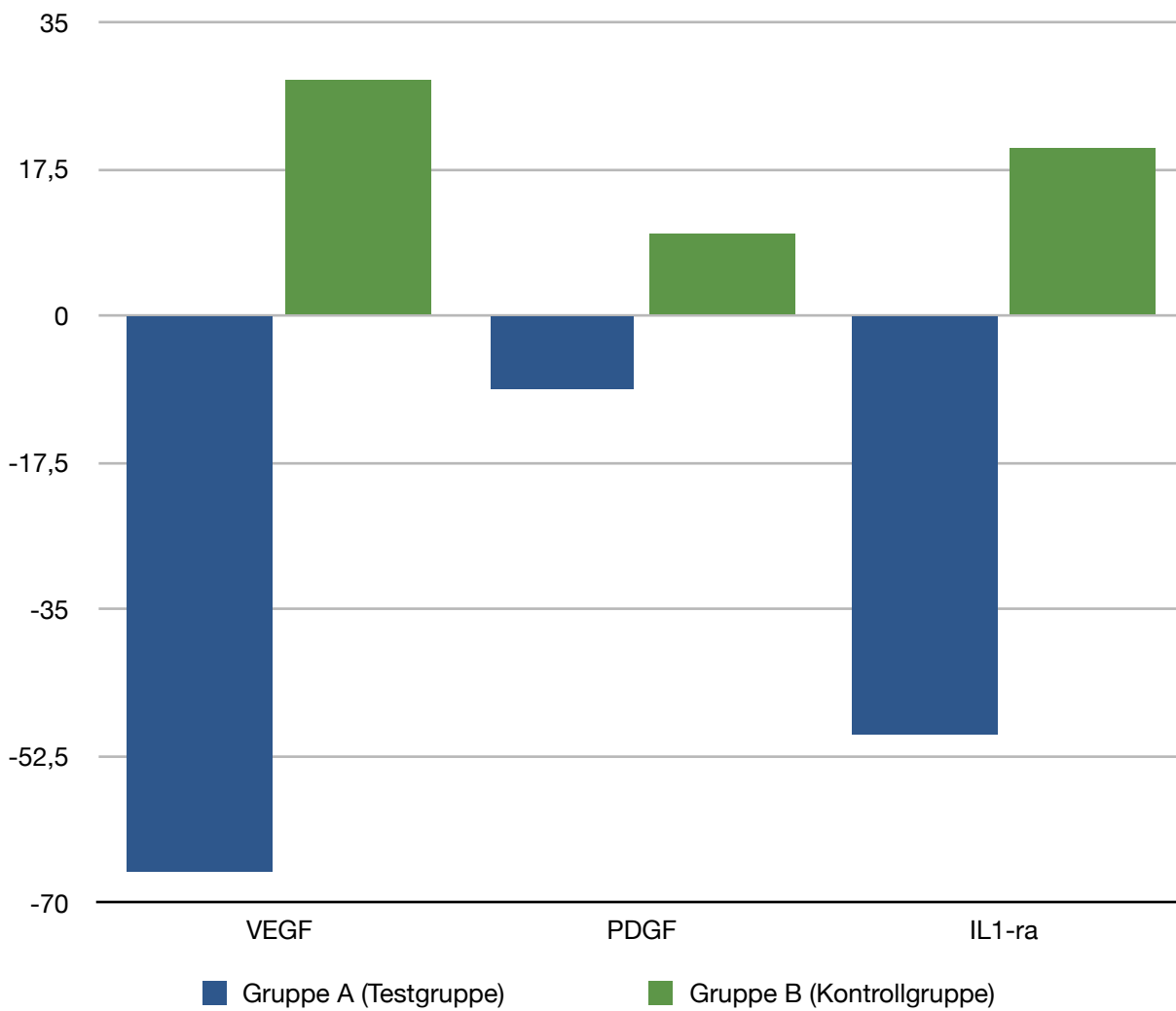
Tabelle 17: Entwicklung der tcPO2-Werte im Verlauf



### 3.5. Entwicklung von VEGF, PDGF und IL1-ra

Die Blutplasmaspiegel von VEGF, IL1-ra und PDGF zeigten bei der Basisdatenerhebung am Anfang der Studie keine relevanten Unterschiede unter den Patienten beider Gruppen. Nach der Stammzellgabe zeigte sich während der nachfolgenden Beobachtungsphase in der Testgruppe A ein deutlicher Abfall dieser Werte, während in der Kontrollgruppe B eine Zunahme der Plasmaspiegel aller drei Werte stattgefunden hat. Obwohl wir keine statistische Signifikanz nachweisen konnten, zeigte sich eine eindeutige Tendenz der Werte.

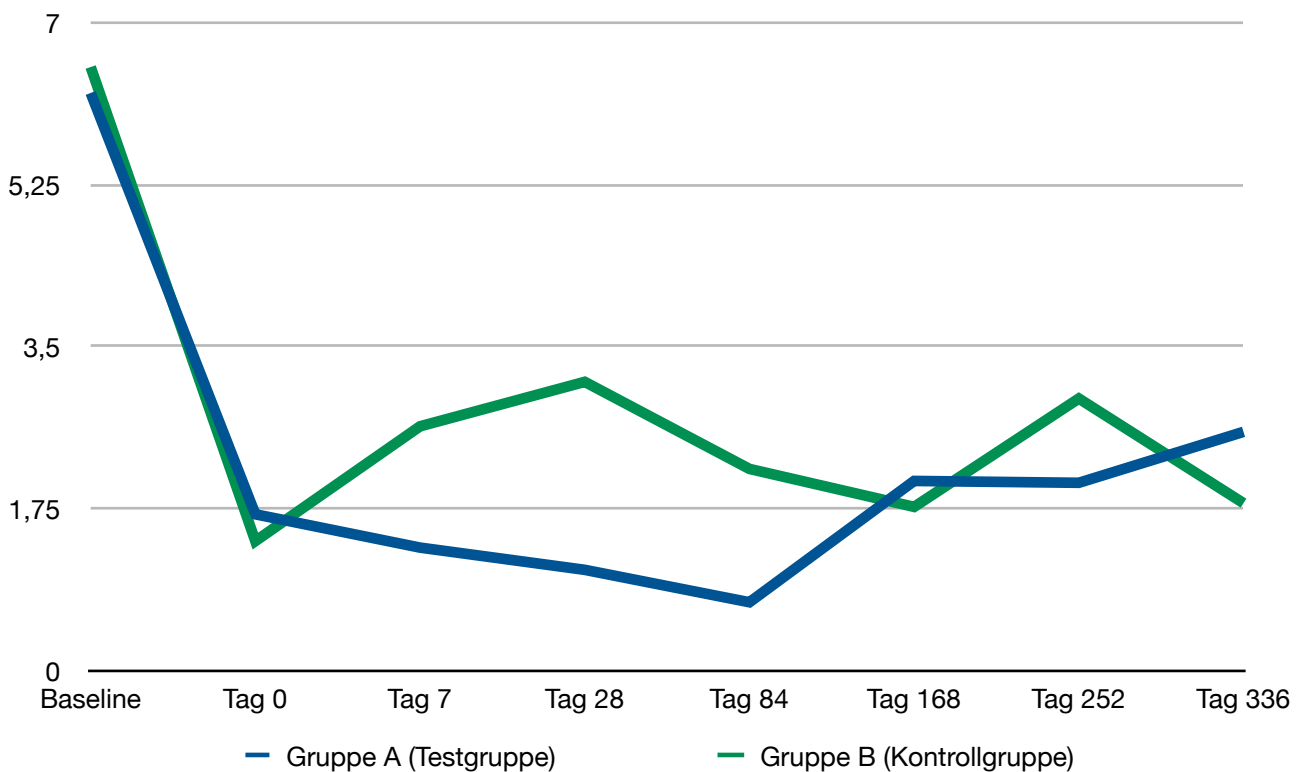
Tabelle 18: Prozentuale Entwicklung der Serumspiegel von VEGF, PDGF & IL1-ra



### 3.6. Schmerzerfassung

Die Schmerzerfassung erfolgte mittels der visuellen analogen Schmerzskala. Hierbei zeigte sich im Verlauf der Evaluierung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 19: Painassessment; Mittelwerte der VAS



### 3.7. Unerwünschte Ereignisse

In der Testgruppe zeigten sich 7 vaskuläre Komplikationen bei 6 Patienten. Bei einem Patienten verlief die Intervention frustan mit Verschluss des zu behandelnden Gefäßes und anschließender Anlage eines femoropoplitealen Bypasses. Bei einem Patienten zeigte sich in der Kontrolle 2 Tage nach der durchgeführten Intervention eine erneute Stenosierung der A. femoralis superficialis. Diese wurde ebenfalls interventionell behandelt. Bei drei Patienten zeigte sich eine Re-Stenose nach 174, 167 und 243 Tagen. Bei einem Patienten trat eine neue Stenose der kontralateralen A. femoralis superficialis und bei einem Patienten zeigte sich der Verschluss eines bereits vorhandenen femoropoplitealen Bypasses, beide Ereignisse waren nicht behandlungsassoziiert.

Tabelle 20: Vaskuläre unerwünschte Ereignisse Gruppe A

Patient Nr.	behandeltes Gefäß	unerwünschtes Ereignis	behandlungsassoziiert J/N
12	AIE und AFS links	Verschluss AIE und AFS links	ja
		Stenose AFS rechts	nein
15	A. poplitea rechts	Stenose A. poplitea rechts	ja
22	AFS rechts	Stenose AFS rechts	ja
23	AFS rechts	Verschluss AFS rechts	ja
31	AIE links	Verschluss des vorhandenen fem-pop Bypässen links	nein
34	AFS rechts	Stenose AFS rechts	ja

In der Kontrollgruppe traten 8 vaskuläre unerwünschte Ereignisse bei 7 Patienten auf. Bei einem Patienten musste aufgrund eines Verschlusses der A. poplitea nach Intervention der A. femoralis superficialis eine Bypassanlage erfolgen. Bei drei Patienten zeigte sich eine Re-Stenose am Tag 21, 140, 264 und 307. Bei vier Patienten zeigten sich neu aufgetretene Stenosen, die nicht behandlungsassoziiert waren.

Tabelle 21: Vaskuläre unerwünschte Ereignisse Gruppe B

Patient Nr.	behandeltes Gefäß	unerwünschtes Ereignis	behandlungsassoziiert J/N
5	AFS rechts	Stenose AFS links	nein
8	AFS links	Verschluss AFS und A. poplitea links	ja
10	AIC links	Verschluss AFS rechts	nein
11	AFS links	Stenose AFS links	ja
17	AFS rechts	Verschluss A. poplitea rechts	ja
18	AIE und AFS links	Stenose AFS links de novo	nein
32	AIE rechts	Stenose AIE rechts	ja
		Stenose AIE links	nein

Insgesamt traten 26 behandlungsassoziierte unerwünschte Ereignisse auf. An Majorkomplikationen zeigten sich die oben beschriebenen vaskulären Ereignisse. Davon waren 5 in Gruppe A und 4 in Gruppe B betreffend die Intervention.

In 9 Fällen kam es im Rahmen der Intervention zu Blutungskomplikationen, bei allen handelte es sich um kutane bzw. subkutane Blutungen im Punktionsareal. 2 Patienten entwickelten eine Lymphfistel.

In 5 Fällen haben die Patienten der Gruppe A nach der Stammzellgabe einen knoblauchigen Mundgeruch als störend empfunden. Dies ist eine bekannte Nebenwirkung nach Applikation von DMSO. DMSO wurde als Lösungsmittel in den Cryobags mit beinhaltenen Stammzellen verwendet. Ansonsten verliefen alle Stammzellgaben komplikationsfrei.

*Tabelle 22: Behandlungsassoziierte unerwünschte Ereignisse beider Gruppen*

<b>MAJOR</b>	<b>Gruppe A (n=9)</b>	<b>Gruppe B (n=14)</b>
vaskuläre unerwünschte Ereignisse (siehe Tabelle 20 & 21)	5	4
<b>Summe</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>MINOR</b>		
Blutungen	7	2
Lymphfistel	2	0
Dysästhesie der punktierten Leiste	1	0
Mundgeruch nach Stammzellgabe	5	0
<b>Summe</b>	<b>15</b>	<b>2</b>

Von den insgesamt 36 nicht behandlungsassoziierten unerwünschten Ereignissen gab es insgesamt 8 Majorereignisse. 6 vaskuläre Ereignisse, 2 in Gruppe A und 4 in Gruppe B, die oben beschrieben sind. Außerdem entwickelte ein Patient der Kontrollgruppe ein Basalzellkarzinom und ein Patient der Kontrollgruppe erkrankte an Windpocken.

Bei den beschriebenen 7 Infektionen handelt es sich 6mal um einen viralen Infekt der oberen Atemwege und 1mal um eine Panophtalmitis. Diese trat bei einem Patienten der Gruppe B mit vorbekannter okulärer Problematik auf. Die bei einem Patienten beschriebene Stenose der A. subclavia wurde während der Studie neu diagnostiziert und hatte keinen Zusammenhang zur Intervention oder Stammzellgabe.

Tabelle 23: Nicht behandlungsassoziierte unerwünschte Ereignisse beider Gruppen

<b>MAJOR</b>	<b>Gruppe A (n=9)</b>	<b>Gruppe B (n=14)</b>
vaskuläre unerwünschte Ereignisse	2	4
Varizella	0	1
Basalzellkarzinom	0	1
<b>Summe</b>	<b>2</b>	<b>6</b>
<b>MINOR</b>		
Infektion	2	5
Dysästhesie	2	1
muskuloskeletale Schmerzen	7	3
Schwellung im Bereich der unteren Extremität	3	1
Diarrhö	0	1
Tierbiss	1	0
Pollakisurie	1	0
Stenose A. subclavia	1	0
<b>Summe</b>	<b>17</b>	<b>11</b>

## 4. Diskussion

Die Therapie der peripheren AVK umfasst bislang sowohl eine konservative Therapie einschließlich der medikamentösen Sekundärprophylaxe wie auch eine chirurgische und interventionelle Revaskularisation. Aufgrund von Re-Stenose-Raten nach Interventionen aber auch nach revaskularisierenden Operationen ist die 5-Jahres-Prognose aller Maßnahmen infolge von Intimahyperplasie eher schlecht, vor allem bei Patienten in höheren AVK Stadien. In der BASIL-Studie zeigte sich nach 5 Jahren Follow-Up ein amputationsfreies Überleben bei 38% der Patienten nach Bypassoperation und bei 37% der Patienten nach Angioplastie [83]. In der Arbeit von Dorros et. al. zeigte sich ein ereignisfreies 5-Jahres-Überleben (Freiheit von Tod und wiederholten vaskulären Eingriffen) bei 31% der Patienten mit kritischer Extremitätenischämie nach Angioplastie [84].

Der Einsatz von Stammzellen bringt heutzutage Hoffnung bei verschiedenen chronischen Erkrankungen. In einem Hundemodell mit ischämischer Herzkrankheit zeigte sich eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Endothelzellen und in glatte Muskelzellen mit folglich dichteren myokardialen Gefäßversorgung und verbesserter kardialer Funktion [85]. In einer weiteren Arbeit konnte durch eine parakrine Interaktion zwischen endothelialen und mesenchymalen Zellen die Angiogenese in vitro potenziert werden. Die Wirkung war zytokinspezifisch an VEGF-A gebunden [86]. In Studien, die die Funktion von mesenchymalen Stammzellen des Amnions der Plazenta während der Schwangerschaft untersuchten, konnte eine parakrine Wirkung im Sinne von Angiogenese sowie der maternalen Immunmodulation gezeigt werden [87, 88].

Hinsichtlich des Einsatzes von Stammzellen bei der peripheren AVK erfolgten bereits mehrere Studien. In der TACT-, BONMOT-, RESTORE-CLI-Studie sowie in den Arbeiten von lafrati et. al. und Gupta et. al. wurden die Stammzellen intramuskulär in die betroffene Extremität injiziert. In der PROVASA-Studie erfolgte eine intraarterielle katheterbasierte Gabe der Stammzellen [73, 75-78, 89].

In die TACT-Studie wurden Patienten mit peripherer AVK und Patienten mit Thrombangiitis obliterans mit bilateraler Beinischämie als eigene Kontrollgruppe eingeschlossen. Die

autologen mononukleären Stammzellen des Knochenmarks wurden intramuskulär in den M. gastrocnemius der Extremität mit ausgeprägter Ischämie verabreicht. In das kontralaterale Bein wurde entweder Kochsalzlösung oder mononukleäre Zellen des peripheren Blutes injiziert. Nach 24 Wochen zeigte sich eine Verbesserung des Verschlussdruckindex, des  $tcPO_2$ , der Ruheschmerzen sowie der Gehstrecke [73]. Nach 3 Jahren zeigte sich eine Gesamtüberlebensrate von 80% bei Patienten mit atherosklerotischer peripherer arterieller Verschlusskrankheit und 100% bei Patienten mit Thrombangiitis obliterans. Die amputationsfreie Rate betrug 60% bei peripherer AVK und 91% bei Patienten mit Thrombangiitis obliterans. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Beinschmerzskala, der Ulkusgröße und der schmerzfreien Gehstrecke während 2 Jahren nach der Therapie, obwohl sich der Verschlussdruckindex und der transkutane Sauerstoffdruckwert nicht signifikant änderten [74]. Da in dieser Arbeit die Testgruppe zugleich die Kontrollgruppe war, ist ein Vergleichseffekt der Stammzellgabe schlecht beurteilbar, da die parakrine Wirkung an der kontralateralen ischämischen Extremität (Kontroll Extremität) nicht auszuschließen ist. Im Gegensatz zu unserer Arbeit wurden die mononukleären Knochenmarkszellen nicht weiter isoliert, also ist eine Schlussfolgerung bezüglich der Wirksamkeit von Stromazellen oder hämatopoetischen Stammzellen nicht durchführbar. Nichts desto trotz zeigte sich durch die Therapie eine subjektive Verbesserung auf der Schmerzskala sowie bezüglich der Gehstrecke, wie auch in unserer Arbeit.

In der BONMOT-Studie wurde die Wirksamkeit von autologen Knochenmarkstammzellen bei 51 Patienten mit austherapierten peripherer AVK im Stadium der kritischen Extremitätenischämie untersucht. Das Patientenalter lag zwischen 39 und 93 Jahren und die meisten Probanden waren männlich (67%). 240 ml Knochenmark wurde gewonnen, die mononukleäre Zellfraktion aufgereinigt und ein Konzentrat mit im Mittel  $1,3 \times 10^9$  Zellen hergestellt. Das Zellkonzentrat wurde intramuskulär an mehreren Stellen des ischämischen Beins sowie bei Vorhandensein eines Ulkus an diesen, injiziert. Nach 6 Monaten Mindestbeobachtungszeit zeigte sich in 59% ein Extremitätenerhalt und in 53% innerhalb der weiteren Nachbeobachtungszeit, im Mittel  $411 \pm 261$  Tage [75]. In dieser Arbeit erfolgte, wie auch in der TACT-Studie, keine Differenzierung der Knochenmarkstammzellen. Die neusten Studien zeigen ein amputationsfreies Überleben nach revaskularisierenden Maßnahmen von 76% - 83% nach offener Chirurgie und 59% -



83% nach interventionellen Eingriffen [90-92]. Dagegen ist die 53%-ige Beinerhaltungsrate in 1-2 Jahren Follow-Up bei austherapierten Patienten mit kritischer Extremitätenischämie in der BONMOT-Studie als ein sehr gutes Ergebnis zu werten. In den neuesten retrospektiven Langzeitstudien zeigte sich ein amputationsfreies Überleben von 70% 10 Jahre nach Therapie mit mononukleären Knochenmarkszellen bei Patienten mit austherapierten peripherer AVK [93, 94].

In die RESTORE-CLI-Studie wurden insgesamt 72 Patienten mit kritischer Extremitätenischämie ohne Revaskularisationsmöglichkeit eingeschlossen, 48 in der Verumgruppe (davon 71% Männer) und 24 in der Placebogruppe (davon 58% Männer). Das Patientenalter lag zwischen 18 und 90 Jahren. Es wurde die Wirksamkeit von Ixmylocel-T untersucht. Ixmylocel-T ist eine patientenspezifische, multizelluläre Therapie, die aus einer kleinen Menge des autologen Knochenmarks hergestellt wird. Im Herstellungsprozess von Ixmylocel-T wurden Zellen mit dem Oberflächenmarker CD90 (mesenchymale Zellen) und dem Oberflächenmarker CD14 (Monozyten/Makrophagen) vermehrt. Das Produkt enthielt  $35 - 295 \times 10^6$  Zellen und wurde in mehreren Einzeldosen in die betroffene Extremität bei 18% der Patienten in den Oberschenkel und in die Wade und in 82% der Patienten in den Oberschenkel, in die Wade und in den Fuß injiziert. Am Ende des 12-monatigen Follow-Up's erlitten insgesamt 39,6% der mit Ixmylocel-T behandelte Patienten und 66,7% der Kontrollpatienten eines oder mehrere Behandlungsversagen. Der Unterschied in der Zeit bis zum ersten Auftreten des Therapieversagens war signifikant - bei Patienten, die mit Ixmylocel-T behandelt wurden, deutlich länger als bei Kontrollpatienten. Bei dem amputationsfreien Überleben zeigte sich kein signifikanter Unterschied [76]. Die Kohorten in dieser Arbeit zeigen mit bis zu 70 Jahren Altersunterschied zwischen den Probanden eine deutliche Inhomogenität. Trotzdem zeigt sich kein Unterschied im amputationsfreien Überleben in den einzelnen Gruppen. Ein Therapieversagen (erneute Rekonstruktion oder Amputation) konnte mithilfe der Stammzelltherapie verzögert werden, eine eindeutige Besserung konnte leider nicht erzielt werden. Allerdings zeigte sich vergleichbar mit unserer Arbeit und mit den anderen genannten Studien ebenfalls ein positiver kurzfristiger Effekt der mesenchymalen Stammzellen. Es wurde, wie in unserer Arbeit auch, differenziert die Wirksamkeit der isolierten mesenchymalen Stammzellen ohne der Fraktion der Stammzellen des hämatopoetischen Systems untersucht.

In der Arbeit von lafrati et. al. wurden 48 Patienten mit chronisch kritischer Extremitätenischämie Rutherford-Stadium 4 und 5 ohne die Möglichkeit einer chirurgischen oder interventionellen Revaskularisation eingeschlossen. 34 Patienten waren in der Testgruppe und 14 in der Kontrollgruppe. 67% der Patienten waren männlich. Das Patientenalter reichte von 42 bis 93 Jahre. Den Patienten der Testgruppe wurde 240 ml Knochenmark entnommen, im Operationssaal zentrifugiert und insgesamt 40 ml in 1 ml Dosen an 40 Stellen entlang der Beinarterien intramuskulär verabreicht. Bei den Patienten der Kontrollgruppe wurde peripheres Blut entnommen, dieses verdünnt und ebenfalls intramuskulär in die betroffene Extremität injiziert. Am Ende des 12-wöchigen Beobachtungszeitraums zeigte sich eine niedrigere Rate der Majoramputationen (17.6% vs 28.6%), verbesserte Schmerzsituation (44% vs 25%), Verbesserung des Verschlussdruckindexes (32.4% vs 7.1%) sowie eine Verbesserung des Rutherford-Stadiums (35.3% vs 14.3%) bei den Patienten mit Stammzellbehandlung [77]. Wie auch in der BONMOT-Studie zeigte sich hier ein positiver kurzfristiger Effekt der lokalen Stammzelltherapie bei austerapierten Patienten mit chronisch kritischer Extremitätenischämie. In dem nur 3-monatigen Follow-Up zeigte sich eine deutliche Verbesserung in der Testgruppe, allerdings ist durch fehlende Langzeitdaten die Beurteilbarkeit eingeschränkt. Eine deutliche Verbesserung des Verschlussdruckindexes innerhalb eines 3-monatigen Zeitraumes konnten wir in unserer Arbeit ebenfalls feststellen. Durch die einzeitige Knochenmarkentnahme und Stammzellapplikation, wie in der Arbeit von lafrati et. al. [77], ist eine Isolierung bestimmter Stammzellen nicht möglich. Allerdings wird so ein erneuter Eingriff den Patienten erspart. In unserer Arbeit haben wir durch ein zweizeitiges Vorgehen die aus dem Knochenmark entnommenen mesenchymale Stammzellen im Labor deutlich angereichert und somit die Wirksamkeit dieser Stammzellen erhöht.

An der PROVASA-Studie haben insgesamt 40 Patienten teilgenommen, 19 (84% männlich) in der Verumgruppe und 21 (64% männlich) in der Placebogruppe. Das Alter lag zwischen 18 und 80 Jahren. Es wurden Patienten mit kritischer Extremitätenischämie und Thrombangiitis obliterans, Rutherford-Stadium 4 und höher ausgesucht, bei denen eine interventionelle oder chirurgische Therapie keine Option darstellte. Es wurden CD34+, CD45+ und CD133+ Knochenmarkstammzellen isoliert, mit patienteneigenem Serum und einem X-VIVO 10 medium vermischt und intraarteriell katheterbasiert in die

betroffene Extremität verabreicht. Patienten der Placebogruppe erhielten das körpereigene Serum vermischt mit dem X-VIVO 10 medium. Nach 3 Monaten Follow-Up Zeit nach der primären Behandlung erfolgte eine erneute Stammzellgabe, dieses Mal bei allen Studienpatienten, d.h. auch die Patienten der Placebogruppe erhielten autologe Stammzellen. 3 Monate nach der Stammzellgabe zeigte sich eine verbesserte Wundheilung sowie Reduktion der Ruheschmerzen in der Testgruppe gegenüber der Placebogruppe. Hinsichtlich amputationsfreien Überleben gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientenkollektiven [78]. Dies ist die einzige Arbeit, die Stammzellen intraarteriell appliziert hat und somit den Stammzelleffekt am nächsten an die zu behandelnden Organe, nämlich die Arterien, gebracht hat. Leider wurde kein Langzeit-Follow-Up durchgeführt um eine bessere Vergleichbarkeit mit den anderen Arbeiten, in denen Stammzellen intramuskulär verabreicht wurden, zu erzielen. Trotzdem zeigt sich auch hier eine verbesserte Wundheilung und Schmerzreduktion, auch wenn es keinen Unterschied zum Beinerhalt in den Gruppen gibt. Das Design der Studie lässt leider keine Schlussfolgerung zu, ob es sich um einen lokalen zellulären Effekt oder einen parakrinen Stammzelleffekt handelt. Unsere Daten, insbesondere hinsichtlich der Expression von VEGF, legen den Verdacht nahe, dass der Stammzelleffekt vorwiegend parakrin assoziiert ist.

In der Studie von Gupta et. al. wurden insgesamt 20 Patienten mit chronisch kritischer Extremitätenischämie Rutherford-Stadium 4 und höher eingeschlossen und 1:1 in die Verumgruppe und in die Placebogruppe randomisiert. Das Alter lag zwischen 32 und 60 Jahren. In der Testgruppe wurden 200 Millionen allogene Stammzellen pro Patient intramuskulär in den M. gastrocnemius des betroffenen Beins injiziert. In der Placebogruppe wurde PlasmaLyte A injiziert. In der Verumgruppe zeigte sich nach 6 Monaten eine Verbesserung der Verschlussdruckindices und der Schmerzsituation. Hinsichtlich Amputationsrate und Ulkusheilung zeigte sich nach 2 Jahren kein signifikanter Unterschied [89]. Eine Studie mit etwa der gleichen Probandenanzahl wie in unserer Arbeit. Es wurden CD 34 negative MSC's, wie auch in unserer Studie, verwendet. Die Ergebnisse sind den größeren Studien sehr ähnlich. Nämlich verbesserte Schmerzsituation ohne langfristigen Effekt hinsichtlich Beinerhalt. Die intramuskuläre Applikation der Stammzellen zeigt im Gegensatz zur intravenösen Gabe eine erschwerte Anwendbarkeit hinsichtlich Setup.

In einer Arbeit von Yang et.al. aus dem Jahr 2013 wurde die intramuskuläre Einmalgabe von allogenen Stammzellen aus Nabelschnurblut in die betroffene Extremität bei acht Patienten mit austherapierter kritischer Extremitätenischämie bei peripherer AVK und Thrombangiitis obliterans untersucht. Eine Vergleichsgruppe gab es in dieser Studie nicht. Bei 3 von 4 Patienten zeigte sich eine vollständige Ausheilung von Ulzerationen und bei 3 von 8 Patienten wurde ein verbesserter angiographischer Score beschrieben [95]. Anlehnend an das Wissen aus den großen randomisierten Studien ist davon auszugehen, dass diese Ergebnisse durch die Stammzellgabe induziert worden sind. Allerdings ist bei fehlender Kontrollgruppe und einer sehr kleiner Patientenzahl eine Schlussfolgerung hinsichtlich Wirksamkeit der einmaligen intramuskulären Stammzellgabe sehr kritisch zu betrachten.

In einer systematischen Analyse der vorliegenden Literaturdaten aus dem Jahr 2015 wurde auch ein positiver Effekt einer Zelltherapie beschrieben. Insgesamt 17 Studien zur Stammzelltherapie bei Patienten mit kritischer Extremitätenischämie ohne einer Option zur Revaskularisation wurden ausgewertet. Bei den Studien wurden mesenchymale Stammzellen, endotheliale Vorläuferzellen, fetale Stammzellen, Stammzellen aus Nabelschnurblut sowie Stammzellen aus dem Fettgewebe untersucht. All diese Arbeiten haben die positive Rolle der Stammzelltherapie bei der Verringerung der Rate größerer Amputationen, der Verbesserung der distalen Perfusion, der Verlängerung der Gehstrecke, der Verringerung der Schmerzen, der Verbesserung des Verschlussdruckindex und des transkutanen Sauerstoffpartialdrucks sowie der Verbesserung der allgemeinen ischämischen Symptome und der Lebensqualität bei Patienten mit kritischer Extremitätenischämie bestätigt [96].

Bei den beschriebenen Arbeiten zeigt sich ein relativ inhomogenes Patientengut bezüglich Geschlecht und Alter. Die meisten Probanden sind männlich. Das Alter der Patienten zeigt eine große Spanne (der jüngste eingeschlossene Patient war 18 Jahre alt), da neben Patienten mit peripherer AVK auch Patienten mit Thrombangiitis obliterans eingeschlossen wurden. In der vorliegenden Studie haben wir zwei Patientenkollektive mit homogener Verteilung hinsichtlich Geschlecht und Alter. Es wurden nur Patienten mit peripherer AVK eingeschlossen. Somit konnten wir die Wirkung der Stammzellgabe gezielt bei dem chronischen Prozess der Atherosklerose untersuchen und eine sehr gute

Interpretierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der klinischen Ergebnisse erzielen. Allerdings wurde die Anzahl der Patienten durch teilweise doch zu eng gestellten Einschlusskriterien stark limitiert. Ebenfalls zeigten sich in den Follow-up Untersuchungen zum Teil fehlende Messwerte, vor allem bei Laufbanduntersuchungen durch eine deutlich eingeschränkte Compliance der Studienpatienten beider Gruppen.

Sowohl bei uns als auch in den anderen Arbeiten wurden Patienten mit chronischer Extremitätenischämie Rutherford-Stadium 4 und höher eingeschlossen. Allerdings drohte, im Gegensatz zu den anderen Studien, bei keinem von unseren Patienten eine Majoramputation. Eine Subgruppenanalyse hinsichtlich Patienten mit Diabetes mellitus wurde bei uns nicht durchgeführt. In der Arbeit von Amann et. al. wurden durch Stammzellgabe keine besseren Ergebnisse hinsichtlich Ausbildung von Kollateralen und Amputationsrate bei Patienten mit Diabetes mellitus erzielt [75]. Im Review der BONMOT-Studie zeigte sich sogar ein schlechterer outcome für Diabetiker hinsichtlich klinischer Symptomatik, tcPO<sub>2</sub> und Amputationsrate [94]. In der Arbeit von Prochazka et. al. wurden insgesamt 96 Patienten mit austherapierten chronischer Extremitätenischämie bei peripherer AVK eingeschlossen. Die meisten Patienten litten an Diabetes mellitus Typ II, wobei der Anteil der Diabetiker in der Testgruppe niedriger war als in der Kontrollgruppe (88% vs. 98%). Nach Gabe von nicht weiter spezifizierten Stammzellen aus dem Knochenmark, analog zur BONMOT-Studie, entlang der Unterschenkelarterien zeigte sich in der Testgruppe eine bessere Wundheilung und niedrigere Rate von Majoramputationen [97]. Allerdings lässt sich aufgrund der Patientenverteilung in beiden Gruppen kein expliziter Vorteil für Patienten mit diabetischem Fußsyndrom ableiten.

Im Gegensatz zu den anderen Studien verabreichten wir die autologen Stammzellen intravenös. Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass im peripheren Blut zirkulierende, aus dem adulten Knochenmark stammende und auch intravenös applizierte, multipotente mesenchymale Stammzellen zu geschädigten Organen und Geweben migrieren können [66, 98-100]. Dieses organspezifische Homing ist durch den Zytokinrezeptor CCR2 und das intrazelluläre Adaptormolekül FROUNT möglich [101, 102]. Es ist nachgewiesen worden, dass die meisten mesenchymalen Stammzellen nach intravenöser Gabe in der Lunge eingeschlossen werden. Am ehesten beruht dieser „Trapping“-Effekt an der Größe der Zellen sowie an der Ausbildung bestimmter

Adhäsionsmoleküle, die die Passage durch die Lungenkapillaren erschweren [99, 103]. Allerdings zeigte sich in einer Studie bei Patienten mit Leberzirrhose zwar eine primäre Anreicherung der mesenchymalen Stammzellen in der Lunge, diese war allerdings gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg der Aktivität in der Leber und in der Milz. Nach Transplantation der mesenchymalen Stammzellen nahm die Aktivität in der Lunge von 35% zu Beginn auf 2% am Tag 10 ab, während in der Leber und der Milz die Aktivität deutlich zugenommen hat [104]. Andererseits ist bereits in mehreren Studien gezeigt worden, dass mesenchymale Stammzellen in vivo mRNA's für verschiedene Zytokine wie VEGF, MCP-1, IL-1, IL-6 und viele mehr exprimieren und so durch parakrine und trophische Effekte eine immunmodulatorische, angiogenetische und zellregeneratorische Wirkung auf geschädigtes Gewebe haben [105-107]. In einer tierexperimentellen Studie an Schweinen konnte bereits eine verbesserte kardiale Funktion nach intravenöser Stammzellgabe nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden [68]. Durch diese Erkenntnisse zeigt sich, dass die intravenöse Applikation mesenchymaler Stammzellen ein vielversprechender Therapieansatz bei verschiedenen Krankheitsbildern darstellt. Durch die einfache Gabe als intravenöse Infusion wäre diese in einem kurzen stationären Aufenthalt, bzw. bei weiterer Etablierung sogar unter ambulanten Bedingungen, unproblematisch und patientenorientiert durchführbar. Dabei würden intramuskuläre lokale Injektionen, die vergleichbar mit einem höheren Risiko v.a. infolge Blutungskomplikationen verbunden sind, vermeidbar. Die Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen durch Punktion des Beckenkamms und Aspiration aus dem Knochenmark ist bereits weltweit etabliert und gilt heutzutage als eine gängige Methode der Stammzellentnahme in der Medizin. Da intravenöse Stammzellgaben nicht unter sterilen Operationsbedingungen durchgeführt werden müssen, wie z.B. intramuskuläre oder intraarterielle Applikationsformen, wird dem Patienten bei einem zweizeitigen Vorgehen, wo in einem ersten Schritt die Revaskularisation durchgeführt wird und in einem zweiten Schritt mit einem zeitlichen Abstand die Stammzellgabe erfolgt, ein zweiter Eingriff mit anästhesiologischer Begleitung erspart.

Da wir die parakrine Wirkung der Stammzellen hinsichtlich Ausbildung einer Re-Stenose untersuchen wollten, haben wir nach der entsprechend den Leitlinien [11] indizierten Intervention die Rückgabe der autologen Stammzellen durchgeführt. Stützend an das Wissen, dass die Ausbildung von Re-Stenosen im Zusammenhang mit dem Serumspiegel

von VEGF steht [20, 29-31]. Durch alternatives Splicing des VEGF-Gens entstehen unterschiedliche Isoformen des VEGF. Neben den pro-angiogenetischen Isoformen gibt es anti-angiogenetische Isoformen, die die Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vitro* hemmen [108]. In der kardiologischen Studie von Katsaros et. al. zeigte sich nach Implantation eines medikamentenfreisetzungsfähigen Stents in die Koronararterien eine erhöhte Re-Stenose-Rate bei Patienten mit Anstieg des VEGF-Levels postinterventionell. Bei Patienten ohne VEGF-Erhöhung war die Re-Stenose-Rate deutlich niedriger [29]. In einer weiteren kardiologischen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von VEGF-C/VEGFR-3 und Transplantatversagen nach koronarer Bypassimplantation festgestellt werden [109]. Hutter et. al. zeigte in einem Mausmodell, dass die Überexpression von VEGF die Reendothelialisierung nach einer Gefäßverletzung beschleunigte und die Ausbildung einer Neointima unterdrückte. Umgekehrt verzögerte die Sequestrierung von VEGF durch eine VEGF-Falle die Reendothelialisierung und führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Neointima-Größe [20]. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Anwendung des Angiogenese-Stimulators VEGF-A165 oder eines Prolin/Arginin-reichen Peptids PR39 auf die Adventitia einer verletzten Arterie zu einem deutlichen Anstieg der neointimalen Verdickung führte. Ohne Anwendung von Angiogenese-Stimulatoren war die Intimahyperplasie der verletzten Arterie weniger ausgeprägt [30]. Durch Hemmung des VEGF konnte die neointimale Hyperplasie reduziert, allerdings nicht ganz unterdrückt werden [30, 31]. Bei unseren Patienten der Testgruppe zeigte sich nach der Stammzellgabe eine deutliche Reduktion der Serumplasmaspiegel von VEGF, PDGF und IL1-ra im Gegensatz zu Patienten der Kontrollgruppe, bei denen ein leichter Anstieg zu beobachten war. Wir gehen davon aus, dass dieser Effekt auf die parakrine Wirkung der mesenchymalen Stammzellen zurückzuführen ist.

Fünf Monate nach der Stammzellgabe zeigten sich in unserer Arbeit bessere Werte des  $tcPO_2$  und des Verschlussdruckindex in der Testgruppe als in der Kontrollgruppe. Die primäre Stentoffenheit betrug 6 Monate nach der Intervention 90% in der Testgruppe und 55% in der Kontrollgruppe. Allerdings zeigt sich am Ende der einjährigen Beobachtungsphase kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich Re-Stenose-Rate zwischen den beiden Gruppen. Nach 12 Monaten Follow-Up-Zeit betrug die Re-Stenose-Rate in der Testgruppe A 33,3% und in der Kontrollgruppe B 28,6%.

In dieser Arbeit konnte bezogen auf die primäre Offenheitsrate nach Interventionen ein kurzfristiger positiver Effekt durch intravenöse Gabe von mesenchymalen Stammzellen gezeigt werden. Mit einem Unterschied von 85 Tagen zeigte sich eine bessere primäre Offenheitsrate in der Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gabe von mesenchymalen Stammzellen. Außerdem wurde in der Testgruppe eine Senkung der Plasmaspiegel von VEGF, PDGF und IL1-ra beobachtet. Unter dem bereits bekannten Aspekt, dass diese Moleküle die Intimahyperplasie fördern können [14, 16, 29, 36, 37], ist es naheliegend, dass durch eine Suppression dieser Stoffe die Restenoseausbildung infolge von Intimahyperplasie unterdrückt werden kann.

Wir verwendeten aus dem Knochenmark entnommene mesenchymale Stammzellen. Diese Stromazellen sind für den Oberflächenmarker CD34 negativ und können sich in verschiedene Zellarten des nicht-hämatopoetischen Systems differenzieren [55, 58]. Die multipotenten adulten Progenitorzellen sind eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen. Diese Progenitorzellen können sich nicht nur in mesenchymale Zellarten differenzieren, sondern auch in Endothelzellen und Hepatozyten [56, 57]. Der Vorteil dieser Stammzellen ist, dass man sie relativ einfach dank ihrer plastikadhärenten Eigenschaften in vitro isolieren kann [59].

Bislang wurden in den verschiedenen Studien unterschiedliche Stammzellen eingesetzt. In manchen Arbeiten verwendete man alle Stammzellen aus dem Knochenmark [73, 75-77]. In der PROVASA Studie wurden CD34 positive Stammzellen, also Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems isoliert und intraarteriell verabreicht. In der Arbeit von Gupta et. al. verwendete man CD34 negative mesenchymale Stammzellen in einer intramuskulären Applikation [89]. In manchen Arbeitsgruppen wurden MSC's nicht nur anhand der Oberflächenmoleküle, sondern auch hinsichtlich ihres genetischen Profils und der Differenzierungskapazität definiert [110, 111].

In den Studien, bei denen alle Stammzellen des Knochenmarks ohne vorherige Differenzierung in hämatopoetische Zellen und Stromazellen verabreicht wurden, sieht man zwar eine Verbesserung der einzelnen Parameter, allerdings kann man keine genaue Aussage treffen, welche Zellen diesen Effekt hervorgerufen haben könnten. Deshalb ist es sicherlich sinnvoll eine weitere Isolierung durchzuführen. Wir haben uns für die



mesenchymalen Stammzellen entschieden. Die Differenzierung diesbezüglich ist auch eher grob, da die mesenchymalen Stammzellen wahrscheinlich mehrere Subpopulationen enthalten, wie z.B. die multipotenten adulten Progenitorzellen [56]. Die genaue Unterscheidung dieser Subpopulationen ist heutzutage allerdings mit den gängigen Methoden noch nicht etabliert.

Um eine konkretere Aussage zu treffen, ob eine systemische Gabe von mesenchymalen Stammzellen die Re-Stenose-Rate senken kann und somit die Offenheitsrate der gefäßchirurgischen und interventionellen Revaskularisationen verbessern kann, müsste man aus unserer Sicht die Stammzellgabe nicht singular sondern wiederholt durchführen. Da sowohl die Induktion der Neoendothelialisierung als auch der Intimahyperplasie rasch nach dem Gefäßtrauma beginnt [14], wäre es sinnvoll die erste Stammzellgabe in einem kurzen zeitlichen Intervall nach der Intervention durchzuführen. Eine feinere Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen hinsichtlich der Isolierung von multipotenten adulten Progenitorzellen könnte einen Aufschluss über die Wirksamkeit der einzelnen Subpopulationen der MSC's bringen. All diese Ansätze stellen eine Basis zukünftiger Untersuchungen dar.

Zusammenfassend zeigt unsere Arbeit, dass die systemische intravenöse Stammzellgabe sicher ist. Es konnte ein kurzfristiger positiver Effekt nach Stammzellbehandlung hinsichtlich der Entwicklung der Verschlussdruckindices und des transkutanen Sauerstoffpartialdrucks erzielt werden. Ebenfalls zeigte sich eine bessere mittlere primäre Offenheit in der Testgruppe mit 230 Tagen im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit 188 Tagen. Durch eine eindeutige Senkung der Plasmaspiegel von VEGF, PDGF und IL1-ra in der Testgruppe scheint durch den parakrinen Effekt der mesenchymalen Stammzellen die Regulation der Reendothelialisierung sowie eine Immunmodulation stattzufinden. Diese Prozesse tragen vermutlich zur Senkung der Re-Stenose-Rate bei.

## 5. Limitationen der Studie

Die größte Einschränkung in unserer Studie ist die geringe Anzahl der Studienpatienten. Zukünftig sollte man mehr Testpatienten einschließen. Da bereits eine große Anzahl an Outcome-Daten nach offen chirurgischen und interventionellen Eingriffen vorhanden ist, könnte man das Design der Studie ändern, in dem man eine einzelne Testgruppe untersucht, ähnlich zu PROVASA Studie, in der die Patienten der Kontrollgruppe nach drei Monaten auch einer Stammzellbehandlung unterzogen worden sind [78].

Die Einbeziehung von iliakalen, femoro-poplitealen und cruralen Stenosen in unserer Arbeit lässt keine genauere Aussage hinsichtlich der Re-Stenose-Rate in Bezug auf den Gefäßdurchmesser zu. Die Homogenität der zu behandelnden Läsionen auf den femoro-poplitealen Bereich würde die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen sowie bei Subgruppenanalysen verbessern. Außerdem wäre es sinnvoll die Morphologie der Re-Stenosen durch bildgebende Verfahren (IVUS, Sonographie, OCT, MRA) zu untersuchen.

Stützend an das Wissen, dass Stammzellen durch parakrine Mechanismen über die Wirkung von Wachstumsfaktoren die Reendothelialisierung, die Ausbildung einer Intimahyperplasie sowie die Angiogenese regulieren können, sollte eine differenziertere Bestimmung der Plasmaspiegel von Wachstumsfaktoren und evtl. Immunmodulatoren sowie eine genauere Verlaufsbeobachtung hinsichtlich des VEGF-Spiegels erfolgen.

Ein weiterer möglicher limitierender Faktor ist die Gabe von Prednisolon als Prämedikation zur Senkung des Allergierisikos vor der Stammzellgabe. Da bekannt ist, dass Glukocortikoide eine immunsupprimierende Wirkung durch Immunmodulation der Leukozyten haben [112-115], ist eine Beeinflussung der immunmodulatorischen Wirkung der mesechymalen Stammzellen durch Prednisolon nicht auszuschliessen. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll auch Patienten mit jeglichen immunsupprimierenden Therapien in der Eigenmedikation, wie z.B. Methotrexat bei rheumatischen Erkrankungen, nicht in die Studie aufzunehmen.

## 6. Zusammenfassung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit gehört zu den häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen. In höheren Stadien mit drohendem Beinverlust ist die interventionelle und chirurgische Therapie die einzige Möglichkeit zum Extremitätenerhalt und somit auch zum Erhalt der Lebensqualität der häufig multimorbiden Patienten. Diese Behandlungsformen sind bereits weit gereift, insbesondere brachten die minimalinvasiven interventionellen Eingriffe einen Umbruch in die Therapie der peripheren AVK. Allerdings zeigen sich die Offenheitsraten der meisten Rekonstruktionen, ob Bypässe, Angioplastien oder Stentangioplastien, sehr häufig auf nur wenige Monate bis Jahre beschränkt. Deshalb ist man weiterhin bemüht neue Therapiestrategien zu erarbeiten. 2002 erfolgte die erste randomisierte Studie, die die Wirksamkeit der mononukleären Stammzellen des Knochenmarks bei Patienten mit Extremitätenischämie untersuchte. Daraufhin folgten weitere Studien. Die Stammzellen wurden entweder intramuskulär in die betroffene Extremität, lokal entlang der Beinarterien oder intraarteriell in die betroffene Extremität verabreicht. Die Selektion der Stammzellen, ob CD34+ Zellen des hämatopoetischen Systems oder CD34- Stromazellen des Knochenmarks bis hin zu unselektierten Stammzellfraktionen, war ebenfalls zwischen den einzelnen Arbeiten sehr unterschiedlich. Nichts desto trotz zeigte sich insgesamt bei allen Studien ein deutlicher Trend mit einer verbesserten Wundheilung und niedrigerer Amputationsrate bei Patienten, die mit Stammzellen behandelt wurden.

In dieser Studie wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit bei intravenöser Verabreichung von CD34- mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks untersucht. Durch eine Homogenität von Geschlecht und Alter in der Testgruppe und in der Kontrollgruppe, ist eine genauere Aussage hinsichtlich der Behandlung von Patienten mit peripherer AVK in ihrer Gesamtheit möglich. Bewusst wurden Patienten mit Thrombangiitis obliterans ausgeschlossen, da die Wirksamkeit der Stammzellen ausschließlich auf die Ausbildung der Intimahyperplasie nach interventioneller Rekanalisation bei Arteriosklerose untersucht worden ist. Mit einer primären Offenheitsrate von 99% nach 6 Monaten in der Testgruppe versus 55% in der Kontrollgruppe zeigt sich ein deutlicher positiver Effekt der Stammzellbehandlung. Allerdings verliert sich der Vorteil nach 10 Monaten Beobachtungszeitraum, so dass am Ende der 12-monatigen Beobachtungsphase sich

nur noch ein Unterschied von 5% zwischen der Testgruppe und der Kontrollgruppe zeigt (primäre Offenheitsrate in der Testgruppe 10% vs. Kontrollgruppe 5%).

Obwohl unseren Wissens nach dies die erste Studie zur Wirksamkeit der Stammzellen nach interventioneller Rekanalisation ist, sind die Ergebnisse mit den Studien in denen eine verbesserte Wundheilung und das amputationsfreie Überleben bei Patienten in höheren AVK-Stadien untersuchten, sehr gut vergleichbar. Insgesamt zeigt sich ein deutlicher positiver Effekt durch die Stammzellbehandlung. Dieser scheint allerdings auf wenige Wochen beschränkt zu sein. Somit stellt sich die Frage, inwiefern eine wiederholte Stammzellgabe einen eventuell längerfristigen Effekt erzielen kann. Außerdem wäre es ein sinnvoller Ansatz die mesenchymalen Stromazellen in die bereits zum Teil bekannte Subpopulationen weiter zu differenzieren um die Wirksamkeit dieser Zellen gezielter untersuchen zu können. Somit ist für die Zukunft eine Reihe neuer Therapieansätze denkbar.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Rudofsky, G., [Modification of collateral arteries by intra-arterial prostaglandin E<sub>1</sub> infusion]. *Vasa Suppl*, 1987. **20**: p. 215-7.
2. Duvall, W.L. and D.A. Vorchheimer, Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem. *J Thromb Thrombolysis*, 2004. **17**(1): p. 51-61.
3. Haimovici, H., Patterns of arteriosclerotic lesions of the lower extremity. *Arch Surg*, 1967. **95**(6): p. 918-33.
4. Diehm, C., et al., High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis*, 2004. **172**(1): p. 95-105.
5. Kroger, K., et al., Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study. *Eur J Epidemiol*, 2006. **21**(4): p. 279-85.
6. Golledge, J., Lower-limb arterial disease. *Lancet*, 1997. **350**(9089): p. 1459-65.
7. Fowkes, F.G., Epidemiology of atherosclerotic arterial disease in the lower limbs. *Eur J Vasc Surg*, 1988. **2**(5): p. 283-91.
8. Fath, R., Periphere arterielle Verschlusskrankheit: Es besteht Handlungsbedarf. *Deutsches Ärzteblatt*, 2012.
9. Fontaine, R., M. Kim, and R. Kieny, [Surgical treatment of peripheral circulation disorders]. *Helv Chir Acta*, 1954. **21**(5-6): p. 499-533.
10. Rutherford, R.B., et al., Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg*, 1997. **26**(3): p. 517-38.
11. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.
12. Healy, D.A., et al., Contrast-enhanced magnetic resonance angiography in diabetic patients with infra-genicular peripheral arterial disease: systematic review. *Int J Surg*, 2013. **11**(3): p. 228-32.
13. Mason, R.A., et al., The effects of endothelial injury on smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg*, 1987. **5**(2): p. 389-92.
14. Clowes, A.W. and M.A. Reidy, Prevention of stenosis after vascular reconstruction: pharmacologic control of intimal hyperplasia--a review. *J Vasc Surg*, 1991. **13**(6): p. 885-91.
15. Allaire, E. and A.W. Clowes, Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg*, 1997. **63**(2): p. 582-91.
16. Newby, A.C. and A.B. Zaltsman, Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol*, 2000. **190**(3): p. 300-9.
17. Zacharias, R.K., T.R. Kirkman, and A.W. Clowes, *Mechanisms of healing in synthetic grafts*. *J Vasc Surg*, 1987. **6**(5): p. 429-36.
18. Stemerman, M.B., et al., Intimal healing. The pattern of reendothelialization and intimal thickening. *Am J Pathol*, 1977. **87**(1): p. 125-42.
19. Larena-Avellaneda, A.F.S., Die Intimahyperplasie—Bedeutung für den Gefäßchirurgen und therapeutische Möglichkeiten. *Gefäßchirurgie*, 2004. **2/2004**.
20. Hutter, R., et al., Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation*, 2004. **110**(16): p. 2430-5.
21. Li, Y., et al., In mice with type 2 diabetes, a vascular endothelial growth factor (VEGF)-activating transcription factor modulates VEGF signaling and induces therapeutic angiogenesis after hindlimb ischemia. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 656-65.
22. Ferrara, N., Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **280**(6): p. C1358-66.
23. Simons, M., E. Gordon, and L. Claesson-Welsh, Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016. **17**(10): p. 611-25.
24. Kim, K.J., et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
25. Aiello, L.P., et al., Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 1994. **331**(22): p. 1480-7.

26. Aiello, L.P., et al., Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(23): p. 10457-61.
27. Hunigen, H., et al., Vascular dynamics in relation to immunolocalisation of VEGF-A, VEGFR-2 and Ang-2 in the bovine corpus luteum. *Acta Histochem*, 2008. **110**(6): p. 462-72.
28. Qiu, Y., et al., Ovarian VEGF(165)b expression regulates follicular development, corpus luteum function and fertility. *Reproduction*, 2012. **143**(4): p. 501-11.
29. Katsaros, K.M., et al., An increase of VEGF plasma levels is associated with restenosis of drug-eluting stents. *EuroIntervention*, 2014. **10**(2): p. 224-30.
30. Khurana, R., et al., Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation*, 2004. **110**(16): p. 2436-43.
31. Ohtani, K., et al., Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cells. *Circulation*, 2004. **110**(16): p. 2444-52.
32. Sterpetti, A.V., et al., Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery*, 1993. **114**(5): p. 911-4.
33. Jain, M., et al., Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation after rat carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(6): p. 1445-55.
34. Shirakawa, F., et al., Expression of interleukin 1 receptors on human peripheral T cells. *J Immunol*, 1987. **138**(12): p. 4243-8.
35. Santarlasci, V., et al., IL-1 and T Helper Immune Responses. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 182.
36. Norioka, K., et al., Pretreatment of human vascular smooth muscle cells with interleukin-1 enhances interleukin-6 production and cell proliferation (action of IL-1 on vascular smooth muscle cells). *Autoimmunity*, 1990. **7**(1): p. 41-50.
37. Loppnow, H. and P. Libby, Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived interleukin 1 in paracrine and autocrine regulation pathways. *Exp Cell Res*, 1992. **198**(2): p. 283-90.
38. Li, S., et al., Interleukin-6 (IL-6) Receptor Antagonist Protects Against Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit*, 2016. **22**: p. 2113-8.
39. Gupta, A.K., et al., Dupixent(R) (Dupilumab): A Newly Approved Interleukin-4 Receptor Antagonist for the Treatment of Atopic Dermatitis in Pediatric Patients. *Skinmed*, 2019. **17**(2): p. 107-109.
40. Meier, R.P.H., et al., Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(6).
41. Ter Haar, N.M., et al., Treatment to Target Using Recombinant Interleukin-1 Receptor Antagonist as First-Line Monotherapy in New-Onset Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: Results From a Five-Year Follow-Up Study. *Arthritis Rheumatol*, 2019. **71**(7): p. 1163-1173.
42. Qian, W., et al., Mechanism of interleukin-1 receptor antagonist protection against myocardial ischaemia/reperfusion-induced injury. *Arch Cardiovasc Dis*, 2018. **111**(10): p. 545-554.
43. Bosiers, M., et al., Nitinol stent implantation in long superficial femoral artery lesions: 12-month results of the DURABILITY I study. *J Endovasc Ther*, 2009. **16**(3): p. 261-9.
44. Laird, J.R., et al., Nitinol stent implantation versus balloon angioplasty for lesions in the superficial femoral artery and proximal popliteal artery: twelve-month results from the RESILIENT randomized trial. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010. **3**(3): p. 267-76.
45. Laird, J.R., et al., Nitinol stent implantation vs. balloon angioplasty for lesions in the superficial femoral and proximal popliteal arteries of patients with claudication: three-year follow-up from the RESILIENT randomized trial. *J Endovasc Ther*, 2012. **19**(1): p. 1-9.
46. Deacon, T., et al., Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol*, 1998. **149**(1): p. 28-41.
47. Thomson, J.A., et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
48. Reubinoff, B.E., et al., Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(4): p. 399-404.

49. Reubinoff, B.E., et al., Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(12): p. 1134-40.
50. Blau, H.M., T.R. Brazelton, and J.M. Weimann, The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001. **105**(7): p. 829-41.
51. Korbling, M., Z. Estrov, and R. Champlin, *Adult stem cells and tissue repair*. Bone Marrow Transplant, 2003. **32 Suppl 1**: p. S23-4.
52. Martin, G.R., Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*, 1980. **209**(4458): p. 768-76.
53. Monk, M. and C. Holding, Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene*, 2001. **20**(56): p. 8085-91.
54. Siena, S., et al., Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(6): p. 1360-77.
55. Wolfe, M., et al., Isolation and culture of bone marrow-derived human multipotent stromal cells (hMSCs). *Methods Mol Biol*, 2008. **449**: p. 3-25.
56. Reyes, M. and C.M. Verfaillie, Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **938**: p. 231-3; discussion 233-5.
57. Schwartz, R.E., et al., Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002. **109**(10): p. 1291-302.
58. Javazon, E.H., K.J. Beggs, and A.W. Flake, *Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging*. *Exp Hematol*, 2004. **32**(5): p. 414-25.
59. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
60. Schofield, R., The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
61. Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991. **9**(5): p. 641-50.
62. Dazzi, F., et al., The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*, 2006. **20**(3): p. 161-71.
63. Yin, T. and L. Li, The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
64. Dexter, T.M., Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*, 1982. **1**: p. 87-94.
65. Wang, L., et al., MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology*, 2002. **7**(2): p. 113-7.
66. Devine, S.M., et al., Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2999-3001.
67. Sasaki, M., et al., Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2581-7.
68. Price, M.J., et al., Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol*, 2006. **111**(2): p. 231-9.
69. Yuan, F., et al., Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor augmenting collateral circulation in a rat hindlimb replantation model. *J Reconstr Microsurg*, 2006. **22**(2): p. 129-36.
70. Clayton, J.A., D. Chalothorn, and J.E. Faber, Vascular endothelial growth factor-A specifies formation of native collaterals and regulates collateral growth in ischemia. *Circ Res*, 2008. **103**(9): p. 1027-36.
71. Yin, L., et al., Induction of vascular progenitor cells from endothelial cells stimulates coronary collateral growth. *Circ Res*, 2012. **110**(2): p. 241-52.
72. Dai, Y., et al., The preservation effect of coronary collateral circulation on left ventricular function in chronic total occlusion and its association with the expression of vascular endothelial growth factor A. *Adv Clin Exp Med*, 2020.
73. Tateishi-Yuyama, E., et al., Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002. **360**(9331): p. 427-35.

74. Matoba, S., et al., Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*, 2008. **156**(5): p. 1010-8.
75. Amann, B., et al., Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant*, 2009. **18**(3): p. 371-80.
76. Powell, R.J., et al., Cellular therapy with Ixmyelocel-T to treat critical limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled RESTORE-CLI trial. *Mol Ther*, 2012. **20**(6): p. 1280-6.
77. Iafrafi, M.D., et al., Early results and lessons learned from a multicenter, randomized, double-blind trial of bone marrow aspirate concentrate in critical limb ischemia. *J Vasc Surg*, 2011. **54**(6): p. 1650-8.
78. 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 (PROVASA). *Circ Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(1): p. 26-37.
79. Gorabi, A.M.B., M.; Reiner, Z.; Pirro, M.; Hajighasemi, S.; Johnston, T.P.; Sahebkar, A., The Role of Mesenchymal Stem Cells in Atherosclerosis: Prospects for Therapy via the Modulation of Inflammatory Milieu. *Journal of Clinical Medicine*, 2019. **8**.
80. Management of peripheral arterial disease (PAD). TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *Int Angiol*, 2000. **19**(1 Suppl 1): p. I-XXIV, 1-304.
81. Wagner, F.W., Jr., The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment. *Foot Ankle*, 1981. **2**(2): p. 64-122.
82. Armstrong, D.G., L.A. Lavery, and L.B. Harkless, Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. *Diabetes Care*, 1998. **21**(5): p. 855-9.
83. Bradbury, A.W., et al., Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial: An intention-to-treat analysis of amputation-free and overall survival in patients randomized to a bypass surgery-first or a balloon angioplasty-first revascularization strategy. *J Vasc Surg*, 2010. **51**(5 Suppl): p. 5S-17S.
84. Dorros, G., et al., Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up. *Circulation*, 2001. **104**(17): p. 2057-62.
85. Silva, G.V., et al., Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 2005. **111**(2): p. 150-6.
86. Tille, J.C. and M.S. Pepper, Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 2002. **280**(2): p. 179-91.
87. Paradowska, E., Z. Blach-Olszewska, and E. Gejdel, Constitutive and induced cytokine production by human placenta and amniotic membrane at term. *Placenta*, 1997. **18**(5-6): p. 441-6.
88. Denison, F.C., et al., Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum Reprod*, 1998. **13**(12): p. 3560-5.
89. Gupta, P.K., et al., A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med*, 2013. **11**: p. 143.
90. Altreuther, M. and E. Mattsson, Long-Term Limb Salvage and Amputation-Free Survival After Femoropopliteal Bypass and Femoropopliteal PTA for Critical Ischemia in a Clinical Cohort. *Vasc Endovascular Surg*, 2019. **53**(2): p. 112-117.
91. Butt, T., et al., Amputation-free survival in patients with diabetic foot ulcer and peripheral arterial disease: Endovascular versus open surgery in a propensity score adjusted analysis. *J Diabetes Complications*, 2020. **34**(5): p. 107551.
92. Perlander, A., et al., Amputation-free survival, limb symptom alleviation and re-intervention rates after open and endovascular revascularization of femoropopliteal lesions in patients with chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg*, 2020.
93. Kondo, K., et al., Long-Term Clinical Outcomes Survey of Bone Marrow-Derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia in Japan. *Circ J*, 2018. **82**(4): p. 1168-1178.



94. Yusoff, F.M., et al., Review of the Long-term Effects of Autologous Bone-Marrow Mononuclear Cell Implantation on Clinical Outcomes in Patients with Critical Limb Ischemia. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 7711.
95. Yang, S.S., et al., A phase I study of human cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Int J Stem Cells*, 2013. **6**(1): p. 37-44.
96. Compagna, R., et al., Cell Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia. *Stem Cells Int*, 2015. **2015**: p. 931420.
97. Prochazka, V., et al., Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. *Cell Transplant*, 2010. **19**(11): p. 1413-24.
98. Devine, S.M., et al., Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*, 2001. **29**(2): p. 244-55.
99. Gao, J., et al., The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 2001. **169**(1): p. 12-20.
100. Wangler, S., et al., Mesenchymal Stem Cell Homing Into Intervertebral Discs Enhances the Tie2-positive Progenitor Cell Population, Prevents Cell Death, and Induces a Proliferative Response. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2019. **44**(23): p. 1613-1622.
101. Terashima, Y., et al., Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis. *Nat Immunol*, 2005. **6**(8): p. 827-35.
102. Belema-Bedada, F., et al., Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(6): p. 566-75.
103. Barbash, I.M., et al., Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 2003. **108**(7): p. 863-8.
104. Gholamrezanezhad, A., et al., In vivo tracking of <sup>111</sup>In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl Med Biol*, 2011. **38**(7): p. 961-7.
105. Kinnaird, T., et al., Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res*, 2004. **95**(4): p. 354-63.
106. Burchfield, J.S. and S. Dimmeler, Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2008. **1**(1): p. 4.
107. van Poll, D., et al., Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*, 2008. **47**(5): p. 1634-43.
108. Takahashi, H. and M. Shibuya, The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **109**(3): p. 227-41.
109. Podemska-Jedrzejczak, Z., et al., Vascular restenosis in coronary artery bypass grafting might be associated with VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway. *Heart Vessels*, 2018. **33**(9): p. 1106-1120.
110. Gronthos, S., et al., Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 9): p. 1827-35.
111. Le Blanc, K. and M. Pittenger, Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*, 2005. **7**(1): p. 36-45.
112. Laue, L., et al., Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhancement of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. *J Steroid Biochem*, 1988. **29**(6): p. 591-8.
113. Tanizaki, Y., et al., Effects of glucocorticoids on humoral and cellular immunity and on airway inflammation in patients with steroid-dependent intractable asthma. *J Asthma*, 1993. **30**(6): p. 485-92.
114. Meduri, G.U., et al., Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(7): p. 983-91.
115. Van Looveren, K., et al., Glucocorticoids limit lipopolysaccharide-induced lethal inflammation by a double control system. *EMBO Rep*, 2020. **21**(7): p. e49762.

## **8. Anhang**

### **8.1. Einschluss und Ausschlusskriterien für die Studie**

#### **8.1.1. Einschlusskriterien für die Studie**

- Erwachsene weibliche und männliche Patienten in einem Alter zwischen 40 und 80 Jahren zum Screeningzeitpunkt
- Patienten mit symptomatischer peripherer AVK: mit kritischer Extremitätenischämie, definiert als persistierender ischämischer Ruheschmerz für mindestens 2 Wochen und/oder Ulzerationen bis Gangrän (Stadium nach Fontaine III und IV; Rutherford Grad II und III),  $ABI \leq 5$
- Patienten, die sich für eine interventionelle Revaskularisation geeignet haben
- Patienten ohne Majoramputation der betroffenen Extremität
- Patienten mit unbeeinträchtigter Organ- und Knochenmarkfunktion definiert durch spezifische Laborparameter (siehe Anhang 7.2.)
- Patienten mit negativen Infektionsparametern bezüglich Hepatitis, HIV, Treponema pallidum und CMV
- Patienten ohne Nachweis von irregulären Antikörpern bei der Blutgruppendiagnostik
- Patienten mit unauffälliger Karyotypisierung bezüglich MSC's
- weibliche, sexuell aktive Patienten im gebärfähigem Alter mit Nachweis eines negativen Schwangerschaftstests, nicht stillend und mit effektiver Kontrazeption während der Studie
- Patienten, die fähig waren die Anforderungen der klinischen Studie zu verstehen und der Teilnahme an der klinischen Studie einzuwilligen

#### **8.1.2. Ausschlusskriterien für die Studie**

- Patienten mit systemischer oder lokaler Behandlung mit antiangiogenetischen Substanzen
- Patienten mit begleitenden Wundversorgungen, die Wachstumsfaktoren oder gewebegestützte Produkte umfassten
- Patienten mit stattgehabter Majoramputation der betroffenen Extremität
- Patienten mit Wunden Grad 2 und höher auf der Wagner-Armstrong-Wundskala

- Patienten mit Infektion
- Patienten mit lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmie
- Patienten mit instabiler Angina pectoris
- Patienten mit einem STEMI und/oder TIA innerhalb der letzten 6 Monate vor Studieneinschluss
- Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz NYHA Stadium IV
- Patienten mit schlecht oder nicht eingestellter arterieller Hypertonie, definiert durch einen systolischen Blutdruckwert von >180 mmHg oder einen diastolischen Wert von >110 mmHg
- Patienten mit einer antikoagulatorischer Therapie, die nicht für 24 Stunden periprozedural unterbrochen werden darf
- Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit
- Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus, definiert durch einen HbA<sub>1c</sub> > 9%
- Patienten mit schweren pulmonalen Erkrankungen oder Infektionen
- Patienten mit aktiver Hepatitis B oder C oder einem positiven Infektstatus bezüglich HIV und/oder Treponema pallidum
- Patienten mit einer positiven Anamnese bezüglich jeglichem Tumorleiden in der Vorgeschichte
- Patienten mit Autoimmunerkrankungen mit einer systemischen immunsuppressiven Therapie innerhalb der letzten 4 Wochen vor Studieneinschluss
- Patienten mit bekannten Allergien auf Eiweissprodukte und/oder Kontrastmittel
- Patienten mit schwerem Alkohol- oder Drogenabusus innerhalb der letzten 3 Monate vor Studieneinschluss
- weibliche schwangere oder stillende Patienten oder weibliche Patienten im gebärfähigem Alter ohne ausreichender Kontrazeption
- Patienten, die sich nach Ansicht des Prüfarztes nicht für eine Stammzelltherapie geeignet haben
- Patienten, die zum Studieneinschluss bereits an einer anderen Arzneimittelstudie eingeschrieben waren oder deren Beendigung weniger als 30 Tage zurücklag
- Patienten, die in einer öffentlichen Einrichtung betreut waren

- Patienten, die der klinischen Studie nicht eingewilligt haben bzw. unfähig waren, die Anforderungen der klinischen Studie zu verstehen und der Teilnahme an der klinischen Studie einzuwilligen

## 8.2. Laboruntersuchungen

<b>Blutbild</b>	Erythrozytenzahl, MCV, MCH, Hämatokrit, Hämoglobin, Retikulozytenzahl, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten
<b>Lymphozyten Differenzierung</b>	CD3, CD4, CD8, B-Zellen, Killerzellen, aktivierte T-Zellen, T4/T8-Ratio
<b>Blutchemie</b>	Glukose, Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium, Chlorid, Gesamteiweiss, Albumin, Calcium, Phosphor, Harnsäure, gesamt Bilirubin, alkalische Phosphatase, GGT, GOT, GPT, LDH, Prokollagen-III-Peptid, Cholesterol, Triglyzeride, HbA1c, TSH, T3, T4, Beta-HCG
<b>Infektionsparameter</b>	CRP, Interleukin 10, Interleukin 6, Interferon Gamma, TNF-Alpha
<b>Gerinnungsparameter</b>	Thromboplastinzeit (Quick-Wert), PTT, Fibrinogen
<b>Blutgruppenserologie</b>	Rhesusformel, Rhesusfaktor, Kell Faktor, irreguläre Blutgruppenantikörper
<b>Tumormarker</b>	PSA bei Männern, CEA, CA 15-3, CA 19-9
<b>Infektstatus</b>	HBs-Antigen, Anti-HBs-Antikörper, HBc-Antigen, HBV DNA, HCV-Antikörper, HCV RNA, HIV-Antikörper, HIV DNA, TPHA, CMV-IgG, CMV-IgM
<b>Urinanalyse</b>	pH-Wert, Glukose, Ketten, Erythrozyten, Leukozyten, Eiweiss, Hämoglobin, Nitrit, mikroskopische Sedimentuntersuchung

# 8.3. PAVK 86 - Fragebogen

PAVK-86 Fragebogen

**I. SCHMERZEN**  
In den folgenden Fragen geht es um Ihre Schmerzen, die durch die arterielle Durchblutungsstörung bedingt sind.

**I.1.** Wie sehr in der letzten Woche einschließlich heute

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
a) haben Sie Schmerzen in den Beinen beim Gehen verspürt?	1	2	3	4
b) haben Sie auch in Ruhe bzw. in der Nacht unter Schmerzen in den Beinen/Füßen gelitten?	1	2	3	4
c) müssen Sie wegen der Schmerzen Ihre Gehstrecke einschränken?	1	2	3	4
d) fühlen Sie sich wegen dieser Schmerzen ans Haus gefesselt?	1	2	3	4

**II. BESCHWERDEN**  
Diese Fragen beziehen sich auf körperliche Beschwerden, unter denen Sie außerdem noch leiden.

**Wie sehr haben Sie letzte Woche einschließlich heute gelitten an**

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
a) Kopfschmerzen	1	2	3	4
b) Schwindelgefühle	1	2	3	4
c) Müdigkeit	1	2	3	4
d) Erbrechen, Übelkeit	1	2	3	4
e) Durchfall	1	2	3	4
f) Allgemeines Krankheitsgefühl	1	2	3	4
g) Herzbeschwerden	1	2	3	4
h) Atemnot	1	2	3	4
i) Rückenschmerzen	1	2	3	4
j) geschwollenen Beinen/Füße	1	2	3	4
k) Sehstörungen	1	2	3	4
l) Potenzstörungen	1	2	3	4
m) Übermäßigem Hamdrang	1	2	3	4
n) Gelenkbeschwerden	1	2	3	4
o) Schlafstörungen	1	2	3	4

PAVK-86 Fragebogen

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
p) allergische Reaktionen	1	2	3	4
q) Temperaturerhöhung	1	2	3	4
r) Schweißausbrüche	1	2	3	4
s) Kreislaufstörungen	1	2	3	4
t) Verwirrtheit	1	2	3	4
u) Konzentrationsstörungen	1	2	3	4
v) Depressionen	1	2	3	4
w) Hörstörungen	1	2	3	4
x) Flush (Gesichtsrötung)	1	2	3	4
y) Empfindungsstörungen (z.B. Kribbeln)	1	2	3	4
Sonstiges _____				

**III. FUNKTIONALER STATUS**

**III.1.** Wie beeinträchtigt fühlen Sie sich in der letzten Woche einschließlich heute durch Ihre Gefäßerkrankung in den Beinen?

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
a) beim Treppensteigen	1	2	3	4
b) bei leichter Hausarbeit	1	2	3	4
c) bei schwerer Hausarbeit	1	2	3	4
d) beim Einkaufen	1	2	3	4
e) bei Besorgungen gängen	1	2	3	4
f) bei der Gartenarbeit	1	2	3	4
g) bei leichteren Sportarten	1	2	3	4
h) bei Ihrer Arbeit im Beruf	1	2	3	4
i) beim Spazierengehen	1	2	3	4
j) beim Sitzen	1	2	3	4
k) beim Schlafen	1	2	3	4
Sonstiges _____				

PAVK-86 Fragebogen

**IV. KRANKHEITSSPEZIFISCHE ÄNGSTE**

**IV.1.** Wie sehr in der letzten Woche einschließlich heute hatten Sie Angst,

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
a) operiert werden zu müssen	1	2	3	4
b) das Bein wegen der Durchblutungsstörung zu verlieren	1	2	3	4
c) daß die Schmerzen immer schlimmer werden	1	2	3	4
d) daß Sie abhängig von Schmerzmitteln werden	1	2	3	4
e) daß Ihnen nicht geholfen werden kann	1	2	3	4
f) daß Sie Ihren Arbeitsplatz verlieren (sofern Sie noch berufstätig sind)	1	2	3	4
g) daß Sie zu nichts mehr nütze sind	1	2	3	4
h) daß Sie anderen zur Last fallen	1	2	3	4
i) daß Ihnen die Medikamente nicht mehr helfen	1	2	3	4
j) daß die Geschwüre/Nekrosen immer größer werden	1	2	3	4
k) daß Ihr Partner sich von Ihnen abwendet	1	2	3	4

**V. STIMMUNG**

**V.1.** Nun folgen Fragen zu Ihrer Stimmung. Wären Sie in der letzten Woche

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
niedergeschlagen	1	2	3	4
fröhlich	1	2	3	4
tätig	1	2	3	4
unruhig	1	2	3	4
betört	1	2	3	4
schlapp	1	2	3	4
ängstlich	1	2	3	4
schlecht gelaunt	1	2	3	4
ausgeglichen	1	2	3	4
besorgt	1	2	3	4
reizbar	1	2	3	4
entmutigt	1	2	3	4
guter Dinge	1	2	3	4
mürrisch	1	2	3	4
lustlos	1	2	3	4
voller Energie	1	2	3	4
Sonstiges _____				

PAVK-86 Fragebogen

**VI. SOZIALE BEZIEHUNGEN**  
Im nächsten Fragenbereich geht es um Ihre Beziehungen zu anderen Menschen

**VI.1.** Wie sehr in der letzten Woche einschließlich heute haben Sie wegen Ihrer Erkrankung (Durchblutungsstörungen und Schmerzen)

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
a) sich vom Kontakt mit anderen Menschen zurückgezogen	1	2	3	4
b) Probleme mit Ihrem (Ehe)Partner oder in der Familie gehabt	1	2	3	4
c) sich abhängig und auf die Hilfe anderer Menschen angewiesen gefühlt	1	2	3	4
d) auf Unternehmungen mit anderen Menschen verzichtet	1	2	3	4
e) sich in Ihrem Sexualleben beeinträchtigt gefühlt	1	2	3	4
Sonstiges _____				

**VII. BEHANDLUNGSERWARTUNG**

**VII.1.** Wie sehr in der letzten Woche einschließlich heute

	gar nicht	etwas	ziemlich	sehr
a) glauben Sie, daß Ihnen die Behandlung hilft oder helfen wird?	1	2	3	4
b) fühlen Sie sich von Ihrem Arzt verstanden?	1	2	3	4
c) fühlen Sie sich gut betreut	1	2	3	4
d) würden Sie für eine Linderung Ihrer Beschwerden auch einen chirurgischen Eingriff in Kauf nehmen?	1	2	3	4
e) haben Sie selbst versucht, etwas zu Ihrer Genesung beizutragen?	1	2	3	4

Wenn ja, was? \_\_\_\_\_

PAVK-86 Fragebogen

**VIII. EIGENBEURTEILUNG VON GESUNDHEIT UND LEBENSQUALITÄT\***

**VIII.1.** Wie würden Sie Ihren Gesundheitszustand letzte Woche einschließlich heute beurteilen?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
sehr gut sehr schlecht

**VIII.2.** Wie würden Sie Ihre Lebensqualität\* in der letzten Woche einschätzen?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
sehr gut sehr schlecht

**\*Lebensqualität:** Mit diesem Begriff sollen sowohl Ihre körperliche Verfassung, Ihr seelisches Befinden, Ihre sozialen Beziehungen zur Umwelt (Partner, Freunde) als auch Ihre Einsatzfähigkeit im täglichen Leben (Haushalt, Beruf) beschrieben werden.

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit

## 8.4. SOP's für die Aufbereitung und Rückgabe der Stammzellen

### 8.4.1. Zusammensetzung der Stammzellbeutel

	15 ml		25 ml	
Zusammensetzung der Waschlösung vor der Anwendung	20 ml	0.5 g HSA 1 g HAES 20000 0.09 g NaCl 18.41 g H <sub>2</sub> O	20 ml	0.5 g HSA 1 g HAES 20000 0.09 g NaCl 18.41 g H <sub>2</sub> O
Zusammensetzung Form der Präsentation	15 ml	75x10 <sup>6</sup> MSC 1.5 g DMSO 0.3375 g HSA 0.675 g HAES 20000 0.05475 g NaCl 12.432 g H <sub>2</sub> O	25 ml	125x10 <sup>6</sup> MSC 2.5 g DMSO 0.5625 g HSA 1.125 g HAES 20000 0.09125 g NaCl 20.72 g H <sub>2</sub> O
Zusammensetzung der Waschlösung nach der Anwendung	20 ml	0.5 g HSA 1 g HAES 20000 0.09 g NaCl 18.41 g H <sub>2</sub> O	20 ml	0.5 g HSA 1 g HAES 20000 0.09 g NaCl 18.41 g H <sub>2</sub> O
Zusammensetzung der Lösung für die Anwendung	55 ml	75x10 <sup>6</sup> MSC 1.5 g DMSO 1.3375 g HSA 2.675 g HAES 20000 0,23475 g NaCl 49.252 g H <sub>2</sub> O	65 ml	125x10 <sup>6</sup> MSC 2.5 g DMSO 1.5625 g HSA 3.125 g HAES 20000 0,27125 g NaCl 49.252 g H <sub>2</sub> O

### 8.4.2. Allgemeine Maßnahmen

- Vor der Transfusion muss die Identität des Patienten mit dem MSC-Apceth-Präparat überprüft und dokumentiert werden.
- Um eine Histaminfreisetzung zu vermeiden, muss eine Prämedikation bestehend aus Antihistamin und evtl. Kortison in Analogie zu hämatopoetischen Stammzellpräparaten verabreicht werden.

- Es wird kein Waschverfahren für das Produkt empfohlen, da der DMSO-Gehalt bereits sehr niedrig ist.
- Die Transfusion muss über ein adäquates Transfusionsset ohne Leukozytenfilter (Transfusionsset vorgefüllt) erfolgen.
- Die Transfusion muss kontinuierlich (< 15 min/Beutel), angepasst an den klinischen Status des Patienten, verabreicht werden.
- Bei Volumenüberlastung muss die Applikation beendet werden.
- Die maximale Zeit zwischen dem Auftauen des Produkts und der vollständigen Verabreichung an den Patienten einschließlich des Spülens des Cryobags sollte insgesamt 45 Minuten nicht überschreiten.
- Der mögliche Verlust lebensfähiger Zellen durch das Auftauen muss berücksichtigt werden.

#### **8.4.3. Handhabung des Cryobags**

- MSC-Apceth wird in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von  $\leq -145^{\circ}\text{C}$  gelagert und geliefert und muss für die klinische Anwendung gemäß Herstelleranweisung in der Regel innerhalb von 24 h nach Übergabe an den Dry-Shipper aufgetaut werden.
- Der Beutel wird sehr vorsichtig aus der Metallbox entnommen (Beutel ist aufgrund der niedrigen Temperatur zerbrechlich).
- Der Cryobag muss vor Beginn des Auftauvorgangs und vor der Infusion der Suspension auf seine Unversehrtheit überprüft werden.
- Die Identität des Beutels muss aufgezeichnet werden.
- Der Beutel darf nach dem Auftauen des Produkts nicht wieder eingefroren werden.
- Das Zellprodukt darf nicht bestrahlt werden.

#### **8.4.4. Auftauen des Zellprodukts**

- Das Produkt muss vor der Verabreichung vollständig aufgetaut werden.
- MSC-Apceth wird unter geeigneten Bedingungen aufgetaut, wie die Verwendung einer laminaren Luftströmung.

- MCS-Apceth muss unmittelbar vor der Transfusion bei einer Temperatur von nicht mehr als 37°C aufgetaut werden.
- Der Cryobag wird in den Schutzbeutel gelegt und in die Auftauvorrichtung (37°C Wasserbad oder andere geeignete Vorrichtung) plaziert. Nach 1-2 Minuten muss die Unversehrtheit des Cryobags überprüft werden.
- Nach Abschluss des Auftauvorgangs (< 10 min) wird der Cryobag nach Desinfektion des Ports mit einem Transfusionsset verbunden.
- Der zweite Port des Cryobags wird an einen Dreiwegehahn angeschlossen.
- MSC-Apceth wird unmittelbar nach dem Auftauen transfundiert, um den negativen Einfluss von DMSO auf lebensfähige Zellen bei Raumtemperatur zu minimieren. Die Zeit zwischen dem Auftauen von MSC-Apceth und der Applikation am Patienten sollte 30 Minuten nicht überschreiten.

#### **8.4.5. Wiederherstellung**

- Die Rekonstitutionslösung, bestehend aus Human-Albumin 5% und HAES 10% in gleichen Volumina (1:1), wird unter aseptischen Bedingungen hergestellt (2 - 3 Spritzen a 20 ml/Cryobag).
- Das Transfusionsset wird mit 19,5 ml dieser Lösung vorgefüllt und an die Venenverweilkanüle angeschlossen.
- Die zweite Spritze wird dem Arzt zum Ausspülen des Cryobags nach der Transfusion zur Verfügung gestellt, um den gesamten Zellinhalt zu transfundieren.

#### **8.4.6. Infusion**

- Der Cryobag wird an die Venenverweilkanüle angeschlossen.
- Die Leitung zum Patienten wird geöffnet und MSC-Apceth über einen Zeitraum von < 15 min pro Beutel infundiert.
- Der Beutel wird durch Zugabe von 20 ml Human-Albumin/HAES-Gemisch über den Dreiwegehahn gespült und dem Patienten infundiert.
- Eine Koinfusion ist nicht zulässig.



### 8.4.7. Mehrfache Infusion

- Das Verfahren kann sequentiell wiederholt werden.
- Jeder Cryobag wird separat aufgetaut und infundiert.
- Das maximale Volumen sollte 250 ml nicht überschreiten.

### 8.5. Übersicht der Follow-Up Termine

#### Follow-Up Termine Gruppe A (Testgruppe)

Studienabschnitt	Visite Nr.	Procedur	zeitlicher Abstand zur PTA		
			Tage	Wochen	Monate
I	1	Patienten Screening	-7 bis -1	-1	-
II	2	PTA/KM-Entnahme	0	0	0
	2a	stationärer Aufenthalt 24h	1	-	-
IIIa	3	PTA Follow-Up	7 ± 1	1	-
	4		28 ± 2	4	1
	4a		77 ± 14	11 ± 2	3
IIIb	5	Stammzellrückgabe	84 ± 14	12 ± 2	3
	5a	stationärer Aufenthalt 24h	85 ± 14	12 ± 2	3
IIIc	5b	MSC-Infusion Follow-Up	92 ± 14	13 ± 2	3
	5c		98 ± 14	14 ± 2	4
	6		168 ± 14	24 ± 2	6
	7		252 ± 28	36 ± 4	9 ± 1
	8		336 ± 28	48 ± 4	12 ± 1

### Follow-Up Termine Gruppe B (Kontrollgruppe)

Studienabschnitt	Visite Nr.	Procedur	zeitlicher Abstand zur PTA		
			Tage	Wochen	Monate
I	1	Patienten Screening	-7 bis -1	-1	-
II	2	PTA	0	0	0
	2a	stationärer Aufenthalt 24h	1	-	-
III	3	PTA Follow-up	7 ± 1	1	-
	4		28 ± 2	4	1
	5		70 ± 14	10 ± 2	3
	6		154 ± 14	22 ± 2	6
	7		252 ± 28	36 ± 4	9 ± 1
	8		336 ± 28	48 ± 4	12 ± 1

### 8.6 Aufgaben der Doktorandin

Neben der Datensammlung und Auswertung wurden alle Schritte der Studie von der Patientenrekrutierung und Patientenvorbereitung, Durchführung der technischen nicht-invasiven Untersuchungen im Rahmen der Studienvorbereitung sowie während der Follow-Up Termine, Auswertung der Befunde, die Assistenz bei den durch den Facharzt durchgeführten Gefäßinterventionen bis hin zur Verabreichung der Stammzellen als intravenöse Infusion von mir als Doktorandin selbstständig durchgeführt und mitbetreut.

Zu den nicht-invasiven technischen Untersuchungen gehören im einzelnen:

- Messung der Verschlussdruckindices
- Messung des transkutanen Sauerstoffpartialdruckes an den Füßen (tcPO<sub>2</sub>)
- Sonographie und Duplexsonographie
- Laufbanduntersuchungen

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der peripheren AVK	7
Tabelle 2: Wagner-Armstrong Wundskala	19
Tabelle 3: Studienabschnitte	22
Tabelle 4: Demographische Daten der Patienten	25
Tabelle 5: Patientenüberblick	26
Tabelle 6: Atherogene Risikofaktoren	26
Tabelle 7: Begleitmedikation	26
Tabelle 8: Basisdaten zu Studienbeginn	27
Tabelle 9: Verteilung der Patienten zwischen den Gruppen hinsichtlich TASC-II-Klassifikation	27
Tabelle 9a: Aufteilung der Interventionen in den Gruppen	28
Tabelle 10: Stentoffenheit Gruppe A	28
Tabelle 11: Offenheit nach Angioplastie Gruppe A	29
Tabelle 12: Stentoffenheit Gruppe B	29
Tabelle 13: Offenheit nach Angioplastie Gruppe B	30
Tabelle 14: Kaplan-Meier-Kurve zur primären Offenheitsrate beider Gruppen	30
Tabelle 15: Entwicklung der ABI-Werte im Verlauf	31
Tabelle 16: Prozentualer Anstieg der ABI-Werte nach Stammzellgabe	32
Tabelle 17: Entwicklung der tcPO <sub>2</sub> -Werte im Verlauf	33
Tabelle 18: Prozentuale Entwicklung der Serumspiegel von VEGF, PDGF und IL1-ra	34
Tabelle 19: Painassessment	35
Tabelle 20: Vasculäre unerwünschte Ereignisse Gruppe A	36
Tabelle 21: Vasculäre unerwünschte Ereignisse Gruppe B	36
Tabelle 22: Behandlungsassoziierte unerwünschte Ereignisse beider Gruppen	37
Tabelle 23: Nicht behandlungsassoziierte unerwünschte Ereignisse beider Gruppen	38

## 10. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ABI	ankle brachial index
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AFS	Arteria femoralis superficialis
AIE	Arteria iliaca externa
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATA	Arteria tibialis anterior
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
Beta-HCG	humanes Choriogonadotropin
CA	cancer antigen
CEA	carcinoembryonales Antigen
CMV	cytomegalie virus
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CVA	cerebrovascular accident
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DSA	digitale Substraktionsangiographie
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HAES	Hydroxyaethylstärke
HbA1c	glykosiliertes Hämoglobin
HBc-Antigen	Hepatitis B core Antigen
HBs-Antigen	Hepatitis B surface Antigen

HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	humanes immundefizienz Virus
HSA	Humanes Serumalbumin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IL1-ra	Interleukin 1 - Rezeptor Antagonist
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
KM-Entnahme	Knochenmark
km/h	kilometer per hour
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
m	Meter
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCV	mean corpuscular volume (mittleres Erythrozytenvolumen)
mg	Milligramm
MHz	Mega Hertz
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MR	Magnetresonanz
MRA	MR-Angiographie
MSC	mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer

NYHA	New York Heart Association
OCT	Optische Kohärenztomographie
P1GF	placenta growth factor
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	platelet-derived growth factor
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTT	partial thromboplastin time
RNA	ribonucleic acid
SOP	standard operating Procedure
STEMI	ST-Streckenhebungs Myokardinfarkt
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TAH	Thrombozytenaggregationshemmung
tcPO2	transkutaner Sauerstoffpartialdruck
TIA	transitorische ischämische Attacke
TNF-Alpha	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TPHA	Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-Assay
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
VAS	visuelle Analogskala
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs	versus

## **11. Danksagung**

Am Ziel eines langen Weges ist es mir ein besonderes Anliegen, all denen meinen Dank auszusprechen, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden. An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Heider für die Überlassung des Themas, sowie für die ständige Unterstützung und Förderung meiner Person, welche weit über die normale Betreuung eines Doktoranden hinaus ging, bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolf und Herrn Dr. Traeger für Ihre Unterstützung, konstruktive Kritik und Aufmunterung nicht nur bei der Durchführung dieser Arbeit. Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Firma Apceth für die Bereitstellung des Labors und Verarbeitung der Stammzellen und bei Fr. Weiss für die freundliche Unterstützung während dem klinischen Abschnitt der Studie. Ich danke allen Mitarbeitern der Praxis für Gefäßchirurgie am Isarklinikum München für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit. Mein abschließender Dank gilt meiner Familie, die einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

## 12. Lebenslauf



### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Wirksamkeit und Sicherheit von autologen CD34-negativen mesenchymalen Stammzellen zur begleitenden Behandlung von Patienten mit fortgeschrittener peripherer arterieller Verschlusskrankheit nach Intervention**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Katarina Gröbl

München, den 24.10.2021