



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0526**

Využitie mezenchymálnych kmeňových buniek v kombinácii s ďalšími podpornými biologickými postupmi v liečbe chronického diabetického vredu

Zodpovedný riešiteľ **MUDr. Pavol Janega, PhD.**

Príjemca **MEDIREX GROUP ACADEMY n.o.**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Medirex Group Academy, n.o.
Univerzita Komenského v Bratislave, Úniverzitný vedecký park
Nemocničná, a.s.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Riešenia sa priamo nezučastnili zahraničné pracoviská.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Počas riešenia projektu nebola podaná patentová prihláška, vynález alebo úžitkový vzor

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Výsledky štúdie boli publikované v odborných časopisoch, počas doby realizácie projektu vznikli 3 články publikované v časopisoch indexovaných v CC resp. WoS, z toho 1 karentovaná publikácia.

Pos, O., J. Budis, Z. Kubiritova, M. Kucharik, F. Duris, J. Radvanszky and T. Szemes (2019). "Identification of Structural Variation from NGS-Based Non-Invasive Prenatal Testing." *Int J Mol Sci* 20(18)., medzinárodný, CC Physical, Chemical & Earth Sciences, WoS, SCIE, 4,556, Q1; ide o metodickú prácu ktorá vznikla v súvislosti so zavedením molekulárno-genetických metodík ktoré boli následne využité pri stanovovaní zloženia mikrobiálneho spoločenstva ulcerácií, testované bolo amplikónové sekvenovanie krátkych úsekov, využívajúce špeciálny PCR protokol rovnako, ako v prípade stanovenia profilov sekvencií 16S rRNA v steroch.

Andrea Janegova, Zuzana Hlavata, Luboslav Mihok, Lucia Copakova, Pavel Babal, Pavol Janega: Immunohistochemical evaluation of potential molecular targets of desmoid-type fibromatosis. *Pol J Pathol* 2021;72(3):252-260., medzinárodný, WoS, SCIE, 1,072, Q4; práca hodnotiaca zmeny molekulárnych markerov pozorovaných imunohistochemicky pri agresívnej fibromatóze s možnými paralelami s diabetom.

Barczi, T., Brody, P., Klein, M., Varga, I., Bies Pivackova, L., Krenek, P., Janega, P. and Babal, P. (2022). "Proapoptotic and antiapoptotic stimuli alternation in myocardial infarction experimental model." *Bratisl Lek Listy* 123(1): 22-26., národný SR, WoS, SCIE, 1,278, Q4; práca z experimentálnej časti, zameraná na hodnotenie apoptotických zmien počas

ischemicko reparačných procesov v experimentálnom modeli.

Počas riešenia projektu vznikli 4 články publikované v odborných recenzovaných časopisoch v SR a 2 články publikované v odborných recenzovaných zborníkoch v SR

1. Lang J. (2019). Experimentálna terapia kmeňovými bunkami je perspektívna v liečbe chronického diabetického vredu – prípadová štúdia, Newslab, 10 (2), 77 – 79

2. Klimova, D., Altanerova, U., Jakubechová, J., Altaner, Č. and Repiská, V. (2021).

Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek. In (eds.). Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave. Bratislava, Univerzita Komenského: 55-59.

3. Michall Kajsík, Pavol Janega: Mikrobiálne spoločenstvá a ich vplyv na liečbu diabetickej nohy. Newslab, 2021; roč. 12 (2): 79 – 82)

4. Janegova, A., Janega, P. (2022). "Narušená reparácia tkanív je sprievodným znakom diabetu mellitu (patofyziologický pohľad a prípadová štúdia)" Newslab 13(1): 14-18

5. Bernatova, L., Janega, P. (2022). "Oxid dusnatý a jeho význam pri poškodení tkaniva a v reparácii." Newslab 13(2)

6. Nikola Nyáriová, Katarína Gaplovská, Vanda Repiská (2023) Detekcia funkcie proteínu Spc2 v meiotickom delení kvasinky Schizosaccharomyces pombe. Zborník vedeckých prác. 60. fakultná konferencia Študentskej vedeckej odbornej činnosti a XVII. vedecká konferencia doktorandov LF UK. Univerzita Komenského v Bratislave.

Počas riešenia projektu vzniklo 7 príspevkov zaradených medzi popularizačné aktivity a 1 popularizačný článok publikovaný v nerecenzovanom časopise distribuovanom medzi klinických lekárov, realizovaná bola 1 diplomová práca, ktorá je prijatá na obhajobu (03/2023). Počas sledovaného obdobia bola zorganizovaná online interaktívna konferencia „Nové trendy v liečbe komplikácií diabetes mellitus“. Vzhľadom na prebiehajúcu COVID-19 pandémiu, nebolo možné konferenciu realizovať prezenčne tak, ako bolo pôvodne plánované. Konferencia sa konala 9.11.2021 bola online prenášaná prostredníctvom platformy zoom. Odborný program pokryli 4 prednášky „Pokročilá liečba komplikácií diabetickej nohy“, „Chorobné zmeny reparácie tkanív spôsobené diabetes mellitus“, „ Mikrobiálne spoločenstvo rán pacientov s diabeticou nohou“ a „Možnosti aplikácie bakteriofágov ako novej antimikrobiálnej terapie“.

Uplatnenie výsledkov projektu

- otestovanie účinnosti a možnosti využitia liečby kmeňovými bunkami v našich podmienkach
- projekt preukázal pozitívny účinok aplikácie kmeňových buniek v liečbe diabetickej nohy, s vyšším podielom pacientov s úplným zhojením defektu a skrátením priemernej dĺžky hojenia v porovnaní s pacientami ktorí boli liečení výhradne bežnými metódami.
- významným nálezom je ale aj znížená potreba antibiotickej liečby u pacientov s aplikáciou kmeňových buniek
- dlhodobá observácia pacientov preukázala recidívy u časti pacientov, efektivita liečby závisí od viacerých faktorov, veľkosti defektu, stavu prekrvenia končatiny, ale aj dodržiavania následných režimových opatrení, životného štýlu a kompenzácie diabetu.
- optimalizácia protokolu na stanovenie mikrobiálneho spoločenstva z ulcerácií diabetickej nohy
- izolácia a identifikácia bakteriofágov vhodných na liečbu diabetickej nohy a charakterizácia použitých fágov, vytvorili sme predpoklady pre ďalší výskum bakteriofágov a ich priamej aplikovateľnosti in vivo
- výskum molekulárnych zmien v procesoch hojenia sa u pacientov s diabetes mellitus. Pozorované výsledky môžu otvoriť možnosti cielej terapie diabetickej ulcerácie v budúcnosti

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavný cieľ projektu, overiť možnosti použitia kmeňových buniek v liečbe chronického diabetického vredu v kombinácii s ďalšími liečebnými postupmi a navrhnúť protokol aplikácie bol v rámci aktuálnych možností naplnený. Do štúdie bolo zaradených 50 pacientov, preukázali sme pozitívny vplyv aplikácie mezenchymálnych kmeňových buniek v liečbe diabetickej nohy, ktorý charakterizoval významne vyšší podiel pacientov s úplným zhojením defektu a skrátenie priemernej dĺžky hojenia v porovnaní s pacientami ktorí boli

liečeni výhradne bežnými metódami (15,5 týždňa vs. 24 týždňov v prípade pacientov s diabetickou gangrénou a 13,7 týždňa vs. 45 týždňov v prípade pacientov s neuropatickými vredmi). Ani po aplikácii kmeňových buniek sa však nezhojili všetky defekty a u časti pacientov sme zaznamenali recidívu. Významným nálezom je ale aj znížená potreba antibiotickej liečby u pacientov s aplikáciou kmeňových buniek. Využitie larválnej terapie neskrátilo čas hojenia, dĺžka hojenia bola dokonca predĺžená. Prínosom lariev ale bol však skrátený čas medzi amputáciou, vyčistením defektov a aplikáciou kmeňových buniek, použitie lariev skrátilo čas navodenia granulačnej odpovede v rane. Otestovaný bol protokol na stanovenie mikrobiálneho spoločenstva z ulcerácií, optimalizovali sme metódu next-gen sekvenovania 16S rRNA génu s následnou bioinformatickou analýzou. Realizovaná bola aj izolácia a identifikácia bakteriofágov vhodných na liečbu diabetickej nohy a charakterizácia použitých fágov, vytvorili sme predpoklady pre ďalší výskum bakteriofágov a ich priamej aplikovateľnosti in vivo. Aj keď sa neukazuje že by sme v porovnaní s nediabetickými vredmi pozorovali zmenenú denzitu novovytvorených ciev vo vznikajúcom granulačnom tkanive, v prípade diabetes mellitus je zmenený charakter ciev a ovplyvnené zloženie podporných buniek v okolí samotných cievnych lúmenov. Úlohu zohrávať aj ovplyvnenie expresie NO syntáz v reparujúcom sa tkanive, po aplikácii kmeňových buniek pozorujeme pokles expresie NOS2 v reparujúcom sa granulačnom tkanive a v okolitom tkanive so súčasným vzostupom expresie NOS3. Tieto zmeny môžu zlepšovať biodostupnosť NO. Zdá sa, že podávanie terapie viac ako s samostatnou neovaskularizáciou súvisí s ovplyvnením regulácie vlastností mikroprostredia v hojacom sa tkanive.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main aim of the project, to verify the possibility of using stem cells in the treatment of chronic diabetic ulcer in combination with other therapeutic procedures and to propose an application protocol has been fulfilled within the current limits. 50 patients were enrolled in the study and we demonstrated a positive effect of mesenchymal stem cell application in the treatment of diabetic foot, characterized by a significantly higher proportion of patients with complete healing of the defect and a reduction in the mean healing time compared to patients who were treated exclusively with conventional methods (15.5 weeks vs. 24 weeks in the case of patients with diabetic gangrene and 13.7 weeks vs. 45 weeks in the case of patients with neuropathic ulcers). However, even after stem cell application, not all defects healed and we observed recurrence in some patients. Significant finding is the reduced need for antibiotic treatment in patients with stem cell application. The use of larval therapy did not shorten the healing time; the time of healing was even prolonged. However, the benefit of larvae was the reduced time between amputation, defect clearance and stem cell application, the use of larvae reduced the time to induce a granulation response in the wound. We tested a protocol to determine the microbial community from ulcerations, and optimized a method for next-gen sequencing of the 16S rRNA gene followed by bioinformatic analysis. Isolation and identification of bacteriophages suitable for the treatment of diabetic foot ulcers and characterization of the phages were also carried out, and we established the prerequisites for further research on bacteriophages and their direct applicability in vivo. Although we do not show changed density of newly formed vessels in the emerging granulation tissue compared to non-diabetic ulcers, the nature of the vessels is altered in diabetes mellitus and the composition of the supporting cells around the vascular lumens is affected. Influencing the expression of NO synthases in the repairing tissue also plays a role; after application of stem cells, we observe a decrease in NOS2 expression in the repairing granulation tissue and in the surrounding tissue with a concomitant increase in NOS3 expression. These changes may improve NO bioavailability. The administration of therapy seems to be more related to the regulation of microenvironmental features in the healing tissue than to neovascularization.