

# Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia

## Lecznicze możliwości angiogenezy w krytycznym niedokrwieniu kończyn dolnych

Mirosław Dziekiewicz<sup>1</sup>, Emil Lisiak<sup>2</sup>, Marek Maruszyński<sup>1</sup>, Marek Janiak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of General, Oncological and Vascular Surgery, Military Institute of Health Service in Warsaw, Poland (Klinika Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej i Naczyniowej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie)

<sup>2</sup>Department of Radiobiology, Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland (Zakład Radiobiologii i Ochrony Radiologicznej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie)

---

### Abstract

*The use of angiogenic factors to effect therapeutic angiogenesis may be an attractive treatment modality for a substantial number of patients who have diffuse peripheral artery disease and who are not candidates for traditional revascularization procedures. Delivery of angiogenic factors as a protein or gene encoding for the respective protein product has been shown to induce angiogenesis in numerous animal models, and the expression of a functioning product has been demonstrated. Various early clinical trials of therapeutic angiogenesis have shown reduction in critical limb ischaemia (CLI) symptoms and increases in exercise time, as well as objective evidence of improved perfusion, and angiographic appearance following such angiogenic treatments. Initial phase I and II clinical trial results are encouraging and reflect the potential success of therapeutic angiogenesis as a clinical modality for the treatment of CLI. This review discusses the role of the most well-known growth factors under examination in therapeutic angiogenesis, along with the problems and considerations of this approach as a treatment strategy.*

**Key words:** angiogenesis, critical limb ischaemia, growth factor

### Streszczenie

*Zastosowanie czynników proangiogennych w celu wywołania efektu leczniczego u chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych (CLI) może stać się obiecującym sposobem leczenia, zwłaszcza osób niekwalifikujących się do leczenia chirurgicznego czy wewnątrznaczyniowego. W bezpośrednim zastosowaniu substancji stymulujących angiogenezę lub genów kodujących te substancje na modelach zwierzęcych wykazano skuteczność takiego postępowania. W licznych doniesieniach z pierwszych prób klinicznego zastosowania substancji stymulujących angiogenezę wskazuje się na zmniejszenie dolegliwości wiążących się z CLI, w tym wydłużenie dystansu chowania. Wyniki te zobiektywizowano poprzez badania przepływowe i obrazowe. Wstępna ocena wyników badań klinicznych I i II fazy daje podstawy do pozytywnej oceny proponowanego leczenia u osób wyłączonej z innych sposobów terapii CLI. W niniejszej pracy przedstawiono najczęściej stosowane w badaniach doświadczalnych i klinicznych czynniki wzrostu stymulujące angiogenezę pod kątem ich praktycznego wykorzystania klinicznego.*

**Słowa kluczowe:** angiogeneza, krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych, czynniki wzrostu

---

### Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Mirosław Dziekiewicz, Klinika Chirurgii Ogólnej Onkologicznej i Naczyniowej WIM  
ul. Szaserów 128, 00–909 Warszawa  
tel: (+48 22) 681 64 14, fax: (+48 22) 810 27 38  
e-mail: dziekiewicz@wp.pl

## Introduction

Atherosclerosis is a systemic or focal, chronic inflammatory, fibroproliferative, angiogenic, prothrombotic multifactorial disease of the arterial intima caused by the retention of modified low-density lipoproteins and haemodynamic stress. There is no question that atherosclerosis is a systemic dysfunctional endothelial disease. This process takes decades to develop and is symptomatically silent for much of this time [1]. As the intima thickens, there is a relative ischaemia of the vessel wall. This ischaemia of the vessel wall is a potent inducer of angiogenesis. The chronic inflammation that runs concurrently only serves to magnify this angiogenesis to the point that it appears to be uncontrolled as if it were a malignancy. The retention of modified low-density lipoproteins in collagen-rich extracellular matrix (ECM) milieu is felt to be a key pathogenic event, and possibly an absolute requirement for lesion development and progression. As the endothelial cells migrate to the site of injury they face a gradient of ECM degradation products due to metalloproteinase (MMP) activity—these products are angiogenic [2]. The migratory cells produce active MMPs [2] that promotes endothelial cell sprouting. The balance between MMP and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) is critical in vessel growth or its inhibition (apoptosis). For example, the role of different TIMPs e.g. TIMP-3 in vascular cell apoptosis has been demonstrated [3]. Studies of ischaemia have shown that endothelial cell proliferative activity is virtually absent in normal arteries; even a relatively low level of proliferation in response to arterial occlusion or administration of growth factors may therefore represent a considerable enhancement of such activity [4]. In addition, studies have shown that smooth muscle cells are needed to form a media of developing blood vessels, and that proliferative activity for endothelial as well as smooth muscle cells is highest in the smallest collateral vessels, the so-called midzone collateral segments. After extensive investigation in preclinical studies and recent clinical trials, gene therapy has been established as a potential method to induce therapeutic angiogenesis in ischaemic limb disease. Advancements in viral and non-viral vector technology including cell-based gene transfer will continue to improve transgene transmission and expression efficiency. Gene therapy to stimulate the growth of new blood vessels is proving to be an effective way of bypassing occluded arteries and re-establishing blood flow to ischaemic tissues. It could eventually replace surgical revascularization and angioplasty, which are not only more invasive but also plagued with restenosis - problems limiting long-term management of peripheral vascular disease [5]. In either case, re-esta-

## Wstęp

Miażdżycę, która jest miejscową lub uogólnioną chorobą błony wewnętrznej naczyń, postrzega się jako przewlekłą chorobę zapalną, wytwórczą, naczyniopochodną, predysponującą do powstania zakrzepów, o złożonym podłożu, prowadzącą do zwiększonego odkładania się lipoprotein (frakcji LDL) w ścianie naczynia, a w rezultacie do zaburzeń hemodynamicznych. Obecnie wiadomo, że miażdżycę jest swoistą ogólnoustrojową niewydolnością endotelium. Powstawanie zmian miażdżycowych jest procesem przewlekłym i przez większość choroby niemyym klinicznie [1]. Nastęstwem pogrubienia wewnętrznej błony naczynia jest niedokrwienie ściany tętnicy rozumiane jako czynnik stymulujący angiogenezę. Przewlekły stan zapalny towarzyszący CLI potęguje nasilenie zmian angiogennych w ścianie naczynia. W pewnym momencie proces ten jest już niekontrolowany, analogicznie do nowotworzenia. Odkładanie się zmodyfikowanych LDL w bogatej w kolagen macierzy pozakomórkowej (ECM) uznaje się za kluczowy moment i warunek konieczny zapoczątkowujący powstawanie i nasilenie się zmian o charakterze miażdżycowym. Komórki endotelium przemieszczające się ze światła naczynia do ECM natrafiają na gradient substancji modyfikujących architekturę środowiska zewnątrzkomórkowego [2], tzn. metaloproteinaz (MMP). Komórki migrujące wytwarzają czynne MMP [2], które umożliwiają pączkowanie naczyń. Równowaga między aktywnością metaloproteinaz i ich antagonistami (TIMP) jest najistotniejszą w procesie powstawania nowych naczyń lub apoptozy (programowana śmierć komórki) komórek endotelium. Działanie różnych typów TIMP, np. TIMP-3 w apoptozie wędrujących komórek endotelium, wykazali Baker i wsp. [3]. W badaniach nad miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dowiedziono, że aktywność proliferacyjna komórek naczyń jest praktycznie zerowa. Należy jednak zaznaczyć, że ten poziom aktywności komórek wystarczy, aby doprowadzić do zamknięcia światła naczynia lub wytworzenia nowej sieci naczyniowej [4]. Do powstania prawidłowych naczyń konieczny jest także rozplęgnięcie komórek mięśni gładkich naczyń i oba te procesy muszą przebiegać równolegle. Zaobserwowano, że taką aktywność najlepiej uzyskać w kolateralach najmniejszych naczyń nazywanych segmentem pośrednim. W licznych badaniach doświadczalnych na zwierzętach oraz w ostatnio przeprowadzanych próbach klinicznych dowiedziono skuteczności terapii genowej w leczeniu chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych. Postępy w technologii wytwarzania wirusowych i niewirusowych wektorów umożliwiających transmisję genów skutkują obecnie wystarczającą wydajnością terapii genowej, również

blishing blood flow to ischaemic tissues is intended to provide a biologic bypass around occluded arteries. This strategy, known as therapeutic angiogenesis, promises new options for patients who may not be optimal candidates for surgical revascularization or angioplasty [6–8].

The 10-point process of angiogenesis is distinguished by: 1 — endothelial cell activation and proliferation; 2 — local vasodilation; 3 — increased vascular permeability; 4 — accumulation of extravascular fibrin; 5 — proteolytic degradation of the basement membrane; 6 — thin cytoplasmic processes are extended from the endothelial cells; 7 — endothelial cells elongate and align with one another to form a capillary sprout; 8 — Interaction with the extracellular matrix (ECM); 9 — endothelial cell division proximal to the migrating tip; 10 — reconstruction of the basement membrane. Each of these steps can be a potential target for proangiogenic treatment [5].

A series of investigations established the feasibility of using recombinant growth factors to induce neovascularization in animal models of peripheral ischaemia [9, 10]. The growth factors first used for this purpose were members of the FGF and VEGF family. Others factors under examination have been HGF and quite new PR-39 or HIF 1 $\alpha$ . From the other hand the ability of bone marrow cells has been tested too.

### The role of cytokines

At least three mechanisms could explain the endothelium-dependent responses—a VEGF-induced increase in perfusion pressure helped to repair dysfunctional endothelium, VEGF directly repaired damaged endothelial cells, or newly formed blood vessels induced by VEGF accounted for some of the improved endothelial function [11]. Since VEGF increases vascular permeability, for example, extravasation of other angiogenic growth factors from circulating blood might have activated smooth muscle cell proliferation. Alternatively, endothelial cells stimulated by VEGF might have secreted factors that promote smooth muscle cell proliferation, such as tissue-type plasminogen activators. Experiments in Isner group's laboratory have shown that VEGF induces up-regulation of platelet-derived growth factor (PDGF), which is also a mitogen for vascular smooth muscle cells [1, 5, 11]. Furthermore, a high-affinity VEGF receptor on endothelial cells is expressed by smooth muscle cells, which could be a mechanism by which VEGF recruits smooth muscle cells to form media in developing blood vessels. Although single-bolus administration of VEGF stimulates formation of new collateral vessels in several days, the circulating half-life of VEGF is less than three minutes [12]. One possible explanation for the appa-

w w odniesieniu do wspomnianego schorzenia. W ten sposób udowodniono skuteczność terapii genowej w przywracaniu krążenia w uprzednio niedokrwionych tkankach, stwarzając możliwość rozwoju sieci naczyniowej. Być może w przyszłości taki sposób leczenia zastąpi całkowicie metody leczenia chirurgicznego lub wewnątrznaczyniowego, których wady, takie jak np. restenozy, są powszechnie znane [5]. Wykorzystanie transferu genów dla czynników wzrostu pozwoli na wytworzenie biologicznych pomostów naczyniowych (*bioby-pass*) omijających niedrożne odcinki naczyń. Taki sposób postępowania obecnie zaleca się w ograniczonej grupie pacjentów, u których ryzyko postępowania klasycznego jest zbyt duże lub spodziewany efekt leczenia chirurgicznego bądź wewnątrznaczyniowego jest bardzo niepewny [6–8].

Wyróżniono 10 etapów angiogenezy: 1 — pobudzenie komórek endotelium i proliferacja; 2 — miejscowe poszerzenie światła naczynia; 3 — zwiększona przepuszczalność naczynia; 4 — zgromadzenie zewnątrznaczyniowe fibryny; 5 — proteolityczny rozkład błony podstawnej; 6 — zapoczątkowanie procesów wewnątrzplazmatycznych komórek endotelium; 7 — rozciąganie i układanie się komórek w formie „pączków” naczyniowych; 8 — oddziaływanie z macierzą pozakomórkową; 9 — dzielenie się komórek endotelialnych w odcinku odnaczyniowym; 10 — odtworzenie błony podstawnej [5]. Każdy z wymienionych wymienionych etapów angiogenezy może być punktem uchwytu dla terapii proangiogennej.

W licznych badaniach na zwierzęcym modelu niedokrwienia obwodowego potwierdzono możliwości zastosowania rekombinowanych czynników wzrostu do wywołania neowaskularyzacji [9, 10]. Pierwszymi zastosowanymi substancjami były należące do rodziny FGF i VEGF, a pozostałymi, których zastosowanie w takim układzie doświadczenia spowodowało zamierzone efekty — HGF i niedawno odkryte PR-39 (białko-39) czy czynniki wywołane niedotlenieniem (HIF). Na oddzielną uwagę zasługują badania nad proangiogennymi możliwościami komórek szpiku.

### Rola cytokin w angiogenezie

W naczyniowym czynniku wzrostu (VEGF) stwierdzono przynajmniej 3 mechanizmy działania; podnosi on ciśnienie perfuzji tkanek niedokrwionych, korzystnie wpływając na naprawę uszkodzonego endotelium, bezpośrednio działa na komórki endotelialne, stymulując je do szybszej naprawy lub bezpośrednio stymulację komórki endotelium do proliferacji, a tym samym — do rozwoju sieci nowych naczyń [11]. Ponadto należy zaznaczyć stymulujący wpływ VEGF na proliferację ko-

rent disparity is that, as a heparin-binding protein, VEGF is rapidly cleared from the circulation, binding avidly to endothelial heparin sulphate proteoglycans. An autocrine loop activated by hypoxia might also serve to amplify and thereby protract the response of endothelial cells stimulated by administration of VEGF [13]. Moreover, VEGF also inhibits endothelial cell apoptosis (programmed cell death). This effect of VEGF, in conjunction with its mitogenic effect, might be expected to increase the total number of endothelial cells that survive. Therapeutic angiogenesis appears to promote recovery of endothelium-dependent flow. In a rabbit model of limb ischaemia, endothelium-dependent and -independent flows were essentially restored 30 days after administration of VEGF. The group of Isner showed that doses of 500 to 1000 µg of VEGF produced a statistically significant augmentation of angiographically visible collateral vessels and histologically identifiable capillaries, and that the haemodynamics of the ischaemic limb improved (measured as calf blood-pressure ratio) in VEGF-treated as compared with control animals [1, 5, 11].

Comparable results were obtained in another series of experiments in the same model. Recombinant VEGF was administered by intramuscular injection once daily for 10 days. Thereafter, blood flow at rest, as well as maximum flow velocity and maximum flow provoked by papaverine, were all significantly elevated [13–15].

Studies in animal models using fibroblast growth factor (FGF) have shown that administration of angiogenic cytokines produces neovascularisation in the region of ischaemia [5–8]. This cytokine belongs to a family of nine factors. The most important one in ischaemic tissues is basic fibroblast growth factor (bFGF). It has mitogenic (increase mitosis) and angiogenic properties [9]. Research in animals has shown that FGF increases myocardial perfusion and function in acute and chronic ischaemia. This was demonstrated by an increase in capillary networks [18]. Several studies have been done with bFGF. When patients with peripheral vascular disease were treated with recombinant FGF, circulating FGF levels were evident, yet angiogenesis was limited to the ischaemic extremities [5, 18]. It has been suggested that increased vascular permeability is a prerequisite for angiogenesis, yet other angiogenic growth factors such as FGF are not associated with such permeability. This study demonstrates for the first time that FGF-4 induces vascular permeability, therapeutic angiogenesis, and arteriogenesis comparable to that of VEGF and could be useful for the treatment of peripheral vascular disease. Fibroblast growth factors (FGFs) are now being tested

mórek mięśni gładkich naczyń w odpowiedzi na obecność tej substancji w środowisku zewnątrznaczyniowym. Czynniki VEGF może się tam znaleźć w wyniku przenikania przez ścianę kapilar lub jako substancja wydzielona *in situ* przez pączkujące komórki endotelium. W doświadczeniach przeprowadzonych w laboratorium kierowanym przez Isnera wykazano dodatnio stymulujący wpływ VEGF na płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), który jest uznanym mitogenem dla komórek mięśni gładkich naczyń [1, 5, 11]. Ponadto obecność licznych receptorów dla VEGF na komórkach mięśni gładkich może tłumaczyć sposób ich komunikowania się z komórkami endotelium i ich rekrutacji do budowania pełnowartościowej ściany nowego naczynia. Interesujący jest fakt, że nawet jednorazowe podanie VEGF w bolusie stymuluje tworzenie nowych naczyń, nawet przez wiele dni. Tym bardziej, że połowiczny czas aktywności biologicznej VEGF wynosi mniej niż 3 min [12]. Jedynym nasuwającym się wytłumaczeniem takiego stanu rzeczy jest szybkie wychwytywanie VEGF z krążenia przez komórki endotelium i wiązania go przez siarczan heparanu [13]. Aktywowana w warunkach niedotlenienia endokrynną pętlą służy jako wzmocnienie sygnału otrzymywanego ze strony VEGF. Poza tym VEGF hamuje proces apoptozy komórek endotelialnych [13]. Ten mechanizm działania w połączeniu z mitogennym wpływem na komórki śródbłonna naczyń skutkuje zwiększeniem ogólnej liczby komórek endotelium. W doświadczeniu na modelu niedokrwienia kończyny u królika bezpośredni i wtórny efekt działania VEGF po 30 dniach od podania spowodował istotną poprawę w ukrwieniu niedokrwionej kończyny. W badaniach przeprowadzonych przez Isnera i wsp. wykazano, że dawki VEGF 500–1000 µg powodowały wzrost przepływu istotnie statystyczny w porównaniu z grupą kontrolną, który potwierdzono w badaniach przepływowych, obrazowych i histologicznych [1, 5, 11]. Porównywalne wyniki otrzymano w innych obserwacjach, których podstawą był ten sam model zwierzęcy. Rekombinowany VEGF podawano w iniekcji domięśniowej raz dziennie przez 10 dni. Następnie mierzono przepływ krwi w spoczynku oraz po stymulacji papaweryną. W obu przypadkach zaobserwowano istotny statystycznie wzrost przepływu [13–15].

W doświadczeniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych z wykorzystaniem czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) dowiedziono skuteczności tej cytokiny w leczeniu proangiogennym w obszarach niedokrwienia [5, 16–18]. Czynniki FGF należy do rodziny 9 czynników wzrostu, wśród których najważniejszy jest zasadowy FGF (bFGF). Posiada on właściwości mitogenne (tzn. zwiększa liczbę mitoz) i angiogenne. W ba-

in patients with PAD. Because of their very short half-life, the use of recombinant angiogenic growth factor is difficult. High dosage or repeated protein administration may lead to hypotension, proteinuria or even atherosclerotic plaque instability. Gene transfer holds promise for the angiogenic treatment of ischaemic diseases by providing a sustained but low synthesis of the growth factor restricted at the site of administration [9, 18, 19].

Gene transfer of a hepatocyte growth factor (HGF) plasmid in a rabbit model of hind limb ischaemia produced increased angiographic score and capillary density in animals transfected using ultrasound with microbubble echocontrast. HGF also has emerged as a potential agent in therapeutic angiogenesis [7, 9, 11, 20]. In a rabbit ischaemic hind limb model, intramuscular injection of human HGF plasmid resulted in enhanced collateral development by angiography and increased blood flow and blood pressure in the ischaemic limb [9, 21]. Intramuscular injection of angiogenic plasmid has been shown to stimulate collateral formation in patients with PAD. Morishita and colleagues used HGF in pre-clinical studies as a potent angiogenic growth factor [10]. In their work, collateral vessel formation was stimulated by HGF gene therapy in various animal models, including diabetes, atherosclerosis, and hyperlipidaemia. All of their preclinical studies demonstrated that HGF was a potent angiogenic factor. Based on their pre-clinical findings, Morishita and colleagues conducted a TREAT-HGF trial to stimulate collateral formation in 22 patients [10]. The objective of the HGF-STAT clinical trial is to determine whether perfusion can be improved by gene transfer with a plasmid DNA containing HGF in the affected limb of patients with unreconstructable critical limb ischaemia (CLI). HGF is a viable option in the treatment of patients with CLI.

Another potential factor that regulates angiogenesis is the peptide PR-39. This peptide increases the cellular levels of hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) by inhibiting its degradation [22]. PR39 has been shown to increase the expression of VEGF, the VEGF receptors KDR and FLT-1, and the FGF receptor. HIF-1 $\alpha$  is a major transcription factor which promotes ischaemia-driven angiogenesis. However, little is known about the endogenous angiogenic response and the role of HIF-1 $\alpha$  in human CLI [23, 24].

### Bone marrow cells therapy

The stimulation of angiogenesis by gene or cell therapy is a promising approach in critical leg ischaemia [5, 11, 21]. The phase I and II trials published to date demonstrate that pro-angiogenic growth-factors or cell therapy by bone-marrow mononuclear cells can deve-

daniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że substancja ta zwiększa przepływ oraz poprawia czynność mięśnia sercowego w ostrym i przewlekłym niedokrwieniu. Zaobserwowano wzrost liczby kapilar, tym samym rozrost sieci naczyniowej [18]. U pacjentów, u których zastosowano rekombinowany bFGF, odnotowano zdecydowany wzrost stężenia krążącego bFGF, natomiast proangiogeny skutek działania tej substancji był ograniczony do strefy niedokrwienia w kończynach dolnych [5, 18]. Choć uważano, że FGF nie zwiększa przepuszczalności naczyń, a jego aktywność nie wiąże się ze wzrostem przepuszczalności ściany naczynia, wykazano, iż FGF-4 jednak powoduje jej zwiększenie. Efekt działania FGF pod kątem jego zdolności stymulowania angio- i arteriogenezy jest porównywalny do obserwowanego u chorych otrzymujących VEGF. Stąd sugestia, że być może należy go powszechniej stosować klinicznie. W ostatnich badaniach obszernie analizuje się właściwości proangiogenne całej rodziny FGF u pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych. Ze względu na krótki połowiczny czas aktywności tej substancji pojawił się problem z zastosowaniem rekombinowanego proangiogenego czynnika wzrostu fibroblastów. Stosowanie dużych dawek lub ich powtarzanie powodowało u chorych hipotensję, proteinurię oraz w pewnych przypadkach niestabilność blaszki miażdżycowej. Dlatego terapia genowa — jako kolejny najbardziej zaawansowany technologicznie sposób ingerencji w to środowisko — wydaje się spełniać wymogi ciągłego i kontrolowanego dawkowania wspomnianej cytokiny w miejscu, w którym efekt działania tej substancji jest najbardziej pożądany [9, 18, 19].

W doświadczeniach przeprowadzonych na królikach transfer genu dla hepatocytarnego czynnika wzrostu w postaci plazmidu (HGF) spowodował zamierzony wzrost gęstości sieci naczyniowej w rejonach niedokrwienia kończyny. Wyniki te opracowano na podstawie analizy badań obrazowych, pomiaru przepływu oraz oceny histologicznej. Tym samym kolejna substancja może stać się lekiem proangiogenym [7, 9, 11, 20]. Podobnie zachęcające wyniki obserwowano u pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych. Chorzy ci otrzymywali plasmid HGF w iniekcjach domięśniowych [9, 21]. Analogiczne obserwacje prowadziły Morishita i wsp. w badaniach przedklinicznych [10]. W swojej pracy analizowali potencjalne właściwości proangiogenne nie tylko u chorych z miażdżycą, ale również obciążonych cukrzycą i hiperlipidemią. W każdej z badanych grup odnotowano zadowalające wyniki. Zachęcony wynikami swych badań Morishita wraz z zespołem stanęli na czele programu badawczego TREAT-HGF, przyjmując za cel zbadanie w grupie 22 chorych

lop new collateral vessels and increase blood flow [25]. Several questions are pending: can a single growth-factor allow persistent angiogenesis or are synergism of factors required? Bone marrow contains stem cells that have pro-angiogenic properties. Among the mononuclear cells used in clinical trials it remains to be demonstrated which type(s) of cell(s) are responsible for revascularization, and which mechanisms are involved: is it a paracrine mechanism that stimulates angiogenesis or a vasculogenic process with incorporation of vascular stem cells within the arterial wall [26]? Previous studies have identified that normal adults have a small amount of circulating endothelial progenitor cells (EPC) in peripheral blood. In response to cytokine stimulation, these cells are mobilized from bone marrow and home to the ischaemic tissue and contribute to new vessel formation. According to these characteristics, EPC have been investigated as an agent for therapeutic angiogenesis. These studies have shown that administration of EPC to animals with limb ischaemia can enhance neovascularisation, salvage tissue, and improve limb function [5, 26]. Human clinical trials using autologous progenitor cells also showed improved myocardial viability and blood flow. However, there are several limitations in the therapeutic application of EPC. First, the amount of available EPC required for therapeutic angiogenesis is limited, so large amounts of peripheral blood are required. Furthermore, the isolated circulating cell population that contributes to postnatal neovascularisation is heterogeneous and displays variable morphological growth characteristics. Therefore, the genetic modification of EPC might overcome some of these limitations by altering the cell phenotype to promote the efficiency of cell-based therapeutic angiogenesis [5, 7, 8, 26].

### Combination therapy and adverse effects of angiogenic factors.

Vascular endothelium growth factor is specific for the endothelial cells. Basic FGF acts on other cells including smooth muscle cells [12]. The association of these effects may synergistically improve angiogenesis [6, 7, 8]. The therapeutic implications of this combination will be determined by ongoing research. The main concern with these factors is tumour growth. However there is no evidence that this can happen. In the VIVA trial the incidence of tumours was higher in the placebo arm [27]. Other side effects include interstitial oedema. This is seen with VEGF because of the increase in permeability. However, this is easily treated with diuretics. Hypotension can be seen when high systemic doses of the peptide are administered [3, 15, 27]. The mechanism is likely to cause the release of nitric oxide and vasodila-

z CLI skuteczność i specyficzność leczenia plasmidem DNA kodującym HGF [10]. Otrzymane wyniki zdecydowanie pozwalają włączyć HGF do substancji proangiogennych, postulując wykorzystanie jej w leczeniu chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na proces angiogenezy jest peptyd PR-39. Molekuła ta działa, podnosząc poziom wewnątrzkomórkowy komórkowego czynnika aktywowanego niedotlenieniem (HIF-1 $\alpha$ ), spowalniając jego rozkład [22]. Wykazano również, że PR-39 odpowiada za zwiększoną ekspresję VEGF oraz receptorów dla VEGF, tzn. KDR i FLT-1. Dodatkowo stwierdzono zwiększoną ekspresję receptorów dla FGF. Uważa się, że czynnik transkrypcyjny HIF-1 $\alpha$  istotnie stymuluje angiogenezę wywołaną niedokrwieniem kończyn dolnych. Jednak dotąd niewiele wiadomo na temat jego endogennych proangiogennych właściwości i jego roli u człowieka [23, 24].

### Leczenie komórkami szpiku

Terapia genowa czy leczenie komórkami szpiku, mające na celu stymulację angiogenezy u chorych w CLI, są powszechnie uznawane [5, 11, 21]. Podobnie jak w przypadku czynników wzrostu w badaniach klinicznych I i II fazy dowiedziono skuteczności podawania komórek jednojądrzastych pochodzenia szpikowego. Również i w tym przypadku obserwowano rozwój nowych naczyń oraz wzrost przepływu w strefie niedokrwienia [25]. Należy odpowiedzieć na wiele pytań, które stale towarzyszą badaniom na tym etapie, tzn.: czy zastosowanie pojedynczego czynnika wzrostu jest wystarczające, czy może jednak lepszy efekt można osiągnąć, używając większej liczby cytokin? Szpik zawiera komórki pnia charakteryzujące się właściwościami proangiogennymi. W badaniach klinicznych wykorzystywano wiele rodzajów komórek jednojądrzastych, starając się wykazać ich potencjalne możliwości stymulowania angiogenezy. Jednak wymaga się precyzyjniejszej oceny w zakresie typu lub typów komórek odpowiedzialnych za rewaskularyzację oraz dokładne określenie mechanizmów stymulacji angiogenezy. Czy można powiedzieć, że mechanizm kierujący angiogenezą ma charakter parakryny, czy też polega on na zasiedlaniu się komórek szpikowych w ścianie tętnicy [26]? Wiadomo, że u dorosłych osób występuje mała liczba krążących prekursorowych komórek śródbłonna (EPC). W odpowiedzi na stymulację cytokinami można zwiększyć ich liczbę, pobrać ze szpiku, umiejscowić w niedokrwionych tkankach i zmusić do tworzenia nowych naczyń. Przyjmując takie założenia, EPC uznano i badano jako oddzielne czynniki proangiogenne. Wykazano, że podawanie EPC zwierzętom z CLI powodowało nasilenie neowaskula-

tion. This is not seen with the naked DNA injection [11]. Other side effects are less common and include anaemia, neointimal proliferation and renal toxicity (only seen in monkeys treated with bFGF) [8].

### Summary

The current therapeutic strategies, including bypass surgery and percutaneous interventions, are only successful in treating a subset of patients [8]. Therapeutic angiogenesis is an investigational method that seeks to favourably impact tissue perfusion in CLI [5, 7, 10]. Angiogenesis provides a new treatment for patients with no other revascularization options. Peripheral and myocardial ischaemia have been the target of this novel medical management. Present studies have documented an increase in collaterals with minimal side effects. However, many issues need to be resolved including the extent of improvement of symptoms. Future clinical trials will help to answer these questions. The potent physiological endogenous angiogenic response to ischaemic stimuli is often suboptimal and therefore, a better understanding of the basic mechanisms is essential for their use in therapeutic angiogenesis.

### References

1. Isner J, Baumgartner I, Rauh G et al (1998) Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg*, 28: 964–973.
2. Tummalapalli C, Tyagi S (1999) Responses of vascular smooth muscle cell to extracellular matrix degradation. *J Cell Biochem*, 1: 515–527.
3. Baker A, Zaltsman A, George S, Newby A (1998) Effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 over-expression in rat vascular smooth muscle cell invasion. *J Clin Invest*, 15: 1478–1487.
4. Kunecki M, Miłosz A, Nawrocka A (2002) Inflammatory reaction and angiogenesis intensity in aortic wall according to clinical manifestation of abdominal aortic aneurysm. *Acta Angiol*, 8: 89–98.
5. Isner J, Asahara T (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularisation. *J Clin Invest*, 103: 1231–1236.
6. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1185–1186.
7. Harjai K, Chowdhury P, Grines C (2002) Therapeutic angiogenesis: a fantastic new adventure. *J Interv Cardiol*, 15: 223–229.
8. Collinson D, Donnelly R (2004) Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation? *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28: 9–23.
9. Khan T, Sellke F, Laham R (2003) Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Therapy*, 10: 285–291.

ryzacji, ocalenie niedokrwionych tkanek oraz przywrócenie prawidłowej funkcji kończyny [5, 26]. W badaniach u chorych z niedokrwieniem mięśnia sercowego ujawniono zwiększenie przepływu i poprawę funkcji mięśnia sercowego. Niestety, kliniczne możliwości zastosowania EPC są ograniczone. Po pierwsze liczba EPC wymagana do leczenia jest ograniczona, stąd wymaga się dużych ilości krwi obwodowej. Wyizolowana populacja komórek krążących, wytypowana do neowaskularyzacji, jest niejednorodna i charakteryzuje się zmienną zdolnością do wzrostu. Dlatego wydaje się, że niezbędna będzie genetyczna modyfikacja EPC, która pozwoli na pełne wykorzystanie potencjału proangiogennej tych komórek [5, 7, 8, 26].

### Terapia skojarzona i działania niepożądane leczenia czynnikami proangiogennymi

Czynnik VEGF jest czynnikiem wzrostu specyficznym dla komórek endotelium. Zasadowy FGF oddziałuje dodatkowo na inne komórki, w tym na komórki mięśni gładkich [12]. Dzięki skojarzeniu efektów działań obu tych substancji można uzyskać interesujące wyniki [6–8]. Obecnie bada się leczniczy efekt takiego synergizmu. Główna obawa przed takim kojarzeniem czynników wzrostu wiąże się z problemem wzrostu guzów. Jednak brakuje dowodów wskazujących na faktyczne zagrożenie wiążące się z takim potraktowaniem problemu. W badaniu VIVA wykazano, że częstość występowania nowotworów była większa w grupie otrzymującej placebo [27]. Innym powikłaniem wiążącym się z równoczesnym podawaniem substancji był obrzęk śródmiąższowy tkanek, wynikający najprawdopodobniej z zastosowania VEGF i jego zdolności do zwiększania przepuszczalności ściany naczyń [3, 15]. Dzięki podawaniu diuretyków to działanie niepożądane zniwelowano. Niedociśnienie obserwowano tylko przy podawaniu dużych dawek preparatów. Prawdopodobny mechanizm ich działania polegał na zwiększeniu wydzielania tlenu azotu i reakcji mięśniówki gładkiej naczyń w postaci poszerzenia ich światła. Objawów tych nie obserwowano podczas podawania samego DNA tych substancji [11]. Pozostałe działania niepożądane były rzadsze i obejmowały niedokrwistość, proliferację neointymy i nefrotoksyczność (tylko u małej liczby leczonych bFGF) [8].

### Podsumowanie

Współczesna chirurgia naczyniowa, stosując metody tradycyjnego leczenia chirurgicznego czy zabiegi wewnątrznaczyniowe, może pomóc pewnej określo-

10. Morishita R, Sakaki M, Yamamoto K et al (2002) Impairment of collateral formation in lipoprotein transgenic mice. *Circulation*, 105: 1491–1496.
11. Isner J (1998) Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv Drug Deliv Rev*, 30: 185–197.
12. Rajagopalan S, Mohler E, Lederman R et al (2003) Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, control study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*, 108: 1933–1938.
13. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6: 389–395.
14. Makin A, Chung N, Silverman S, Lip G (2003) Vascular endothelial growth factor and tissue factor in patients with established peripheral artery disease: a link between angiogenesis and thrombogenesis? *Clin Sci*, 104: 397–404.
15. Takeshita S, Zheng L, Brogi E et al (1994) Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 93: 662–670.
16. Syed I, Sandborn T, Rosengart T (2004) Therapeutic angiogenesis: a biologic bypass. *Cardiology*, 101: 131–143.
17. Palmer-Kazen V, Warriaro D, Luo F, Wahlberg E (2004) Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*, 39: 621–628.
18. Makinen K (2003) Angiogenesis — a new goal in peripheral artery occlusive disease therapy. *Acta Chir Belg*, 103: 470–474.
19. Porcu P, Emanuelli C, Kapatsoris M, Chao J, Chao L, Madeddu P (2002) Reversal of angiogenic growth factor upregulation by revascularisation of lower limb ischemia. *Circulation*, 105: 67–72.
20. Taniyama Y, Morishita R, Hiraoka K et al (2001) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model. *Circulation*, 104: 2344–2350.
21. Powell R, Dormandy J, Simons M, Morishita R, Annex B (2004) Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: design of the hepatocyte growth factor therapeutic angiogenesis clinical trial. *Vasc Med*, 9: 193–198.
22. Paul S, Simons J, Majeesh N (2000) HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis. *J Cell Physiol*, 1: 20–30.
23. Tuomisto T, Rissanen T, Vajanto I, Korkeala A, Rutanen J, Yla-Herttuala S (2004) HIF-VEGF-VEGFR-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human muscle ischemia as studied with DNA array. *Arteriosclerosis*, 1: 111–120.
24. Patel T, Kimura H, Weiss C, Semenza G, Hofmann L (2005) Constitutively active HIF-1alpha improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia. *Cardiovasc Res*, 1: 144–154.
25. Partyka Ł, Siwiec K, Niżankowski R et al (2003) Endothelial progenitor cells (EPCs) in therapy. *Acta Angiol*, 9: 53–62.
26. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360: 2083–2084.
27. Timothy D, Henry M, Brian H et al. (2003) The VIVA Trial. Vascular endothelial Growth Factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation*, 107: 1359–1365.

nej grupie chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych. Jednak zawsze pozostaje grupa pacjentów, którym nie można zaproponować żadnej z inwazyjnych metod leczenia [8]. Leczenie z wykorzystaniem stymulacji angiogenezy będzie mogło przywrócić przepływ przez niedokrwione tkanki kończyn dolnych u chorych z CLI [5, 7, 10]. Angiogeneza stwarza nowe możliwości dla pacjentów, u których nie można zastosować innych metod rewaskularyzacji. Chorzy z niedokrwieniem mięśnia sercowego czy kończyn dolnych oczekują na ostateczne wyniki prowadzonych w wielu ośrodkach badań. Otrzymane na obecnym etapie badań dane wskazują na znamienny statystycznie wzrost liczby naczyń po zastosowanym leczeniu proangiogennym z towarzyszącymi mu niewielkimi działaniami niepożądanymi. Jednak nadal wiele kwestii pozostaje nierozwiązanych, w tym większa skuteczność i swoistość leczenia. Mimo teoretycznych założeń wyniki leczenia pozostają niezadowolające. Dlatego lepsze poznanie mechanizmów kierujących angiogenezą u chorych z CLI, na podstawie dalszych badań, powinno dać rozwiązanie tego problemu z korzyścią dla chorych.