

Skuteczne leczenie niedokrwienia kończyny dolnej poprzez stymulację angiogenezy plazmidem kodującym naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

Effective treatment of a patient with critical lower limb ischemia using plasmid encoding vascular endothelial growth factor (pVEGF) – case report

Robert M. Proczka¹, Maciej Małecki^{2,3}, Katarzyna Gromek³, Małgorzata Serafin-Król⁴, Przemysław Janik²,
Joanna Chorostowska-Wynimko⁵, Jerzy A. Polański¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii, Akademia Medyczna, Warszawa (Department of Surgery, Medical University, Warsaw, Poland)

²Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa (Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Warsaw, Poland)

³Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Akademia Medyczna, Warszawa (Department of Biochemistry and Clinical Chemistry, Medical University, Warsaw, Poland)

⁴Zakład Radiologii Akademii Medycznej, Warszawa (Department of Radiology Medical University, Warsaw, Poland)

⁵Laboratorium Diagnostyki Molekularnej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa (Laboratory of Molecular Diagnostics, National Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Warsaw, Poland)

Streszczenie

W artykule przedstawiono skuteczne leczenie pacjenta z krytycznym niedokrwieniem kończyny dolnej drogą stymulacji angiogenezy. Pacjentowi podano plazmid kodujący naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Przed zabiegiem występował ból w nocy, ból spoczynkowy i martwica palucha. W wyniku zastosowanego leczenia obserwowano stopniową poprawę stanu pacjenta. Kilka miesięcy po wszczęciu plazmidu rana po amputacji palucha zagoiła się, a dystans chromania zwiększył się do około 1000 m. Jedynymi działaniami niepożądanymi były wystąpienie pajęczaków naczyniowych i obrzęku kończyny, który ustąpił samoistnie.

Słowa kluczowe: terapia genowa, niedokrwienie obwodowe, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

Abstract

This study describes a really successful trial of angiogenic gene therapy in human beings. We treated a patient with critical limb ischemia using plasmid encoding vascular-endothelial growth factor. The patient before the procedure had rest-pain, nocturnal-pain and necrosis of the left toe. After our therapy the state of the patient systematically got better. A few months post gene transfer, the wound after amputation was healthy, the distance of claudication intermittent elongated and after treatment is about one thousand meters. The only adverse events were spider angiomas and mild edema.

Key words: gene therapy, ischemic diseases, VEGF

Wstęp

Angiogeneza jest wielostopniowym procesem odgrywającym podstawową rolę w rozwoju naczyń zarówno w zdrowych tkankach, jak i w przypadku niedokrwienia mięśnia sercowego, niedokrwienia obwodowego, wzrostu nowotworów i przerzutów nowotworowych [1–8].

Introduction

Angiogenesis is a multistep process that plays a crucial role in the development of vascular supply in normal tissue and is also involved in many ischemic diseases such as heart disease, peripheral vascular disease, and tumor growth and metastasis [1–8]. So far, manipulation

W ostatnich latach obiecującą metodą leczenia niedokrwienia stała się stymulacja angiogenezy drogą terapii genetycznej [3, 7, 9–13]. Obok wielu poznanych czynników wzrostowych, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular-endothelial growth factor*) prawdopodobnie jest najsilniejszą cytokiną proangiogenną [14, 15]. W licznych doniesieniach i publikacjach potwierdzono jego główną rolę w procesach tworzenia naczyń [6]. Znana jest rola VEGF jako silnego stymulatora proliferacji i migracji komórek śródbłonka naczyniowego i tworzenia nowych naczyń [1, 2, 5–7]. Silna ekspresja genu dla VEGF w niedokrwionych tkankach jest odpowiedzią mającą na celu poprawę perfuzji tkankowej [10]. Pierwsze próby leczenia drogą stymulacji angiogenezy dokładnie opisano w czasopismach medycznych [11]. Leczenie drogą stymulacji angiogenezy jest obecnie metodą dającą szansę pacjentom z zaawansowanym niedokrwieniem [9–13]. Zgodnie z doniesieniami Isnera — prekursora terapii genowej w niedokrwieniu — wszczęcie plazmidu kodującego VEGF bezpośrednio w niedokrwione tkanki stymuluje tworzenie nowych naczyń, poprawia ukrwienie tkankowe i stan kliniczny pacjenta.

W badaniu autorów niniejszej pracy wykorzystano ekspresję wektora kodującego izoformę 165 VEGF. Skonstruowany wektor sprawdzono *in vitro* na modelu zwierzęcym zgodnie z wcześniejszymi opisami [16, 17]. Wcześniejsze badania dowiodły zarówno bezpieczeństwa użycia plazmidu, jak również wysokiej potencjalnej skuteczności w procesie tworzenia naczyń [16, 17]. Parametry biochemiczne, takie jak stabilność przygotowania plazmidu, czystość mikrobiologiczna, zanieczyszczenie endotoksynami, skrupulatnie kontrolowane [16].

Plazmid podano pacjentom z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych. Spektakularne wyniki zastosowanej terapii zachęciły autorów do przedstawienia metody jako obiecującej w leczeniu pacjentów, którym obecnie proponuje się amputację chorej kończyny.

Material i metody

Leczeniu drogą stymulacji angiogenezy poddano 48-letniego pacjenta, palącego papierosy przez kilkadziesiąt lat, bez cukrzycy. Powodem przyjęcia do kliniki było występowanie silnego bólu spoczynkowego łydki oraz martwica palucha. Pierwszym objawem był ból wysiłkowy łydki, który pojawił się w 1991 roku. Początkowo pacjenta leczono pentoksyfiliną (2 × 600 mg). W tym czasie wypalał on około 30 papierosów dziennie. Po 2 latach pacjent dostrzegł skracający się dystans chromania przestankowego. Początkowo wynosił on około 1000 m, ale szybko się zmniejszał. W wykonanej 2-krotnie arteriografii ukazano brak możliwości wykonania zabiegu rekonstrukcyjnego. W 1998 roku u pacjenta po raz pierwszy pojawił się ból w nocy; początkowo okresowy, a później stały. Na początku 1999 roku wykonano sympatektomię lędźwiową. Trzy miesiące później pacjenta poddano terapii prostaglandynami (prostawazyna) w postaci dożylnych wlewów (60 mg/d.). Niestety, zastosowane leczenie nie poprawiło stanu klinicznego. W październiku 1999 roku pojawił się ból spoczynkowy. W tym czasie pacjen-

of angiogenesis *in vivo* by gene therapy methods is an example of successful treatment in the clinic [3, 7, 9–13]. Out of many angiogenic factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) seems to be the most powerful proangiogenic cytokine [14, 15]. Its central role in angiogenesis has been proven in numerous studies. It is well documented that VEGF strongly stimulates proliferation and migration of endothelial cells and induces new vessels formation [1, 2, 5–7]. VEGF is regarded as the main angiogenic gene useful in gene therapy applications [6]. The over-expression of VEGF in ischemic tissues is caused by the improvement of blood supply and the clinical state of patients [10]. The first angiogenic gene therapy clinical trials with VEGF have been well documented [11]. It was reported in these studies that stimulation of angiogenesis by a gene preparation encoding VEGF is a very efficient method of treating a vascular patient [9–13]. As revealed in Isner's studies the injection of naked DNA plasmid encoding VEGF directly into ischemic legs stimulates new vessel formation, improves blood supply, as well as the clinical state of patients. In this study we have constructed an expression vector encoding vascular endothelial growth factor, isoform VEGF165 (VEGF165). The VEGF is driven by a *cmv* promoter and the vector additionally has a strong murine Igk signal sequence which permits efficient secretion of the protein of interest. The constructed pVEGF vector was successfully tested *in vitro* and on animals, as reported previously [16, 17]. Previous studies have demonstrated its safety and the unique ability to induce new vessel formation [16, 17]. The biochemical parameters such as chemical stability of the plasmid preparation, its microbiological purity and contamination with endotoxins were also tested [16]. Finally the pharmaceutical preparation of the pVEGF plasmid was used in the clinic. The plasmid was injected into a patient suffering from critical lower limb ischemic disease. The promising clinical outcomes allowed us to report the treated patient as an excellent example of effective angiogenic gene therapy applications.

Material and methods

A 48-year old male, who was a heavy smoker and non-diabetic, was referred to the hospital for cramping of the left foot, pain, and gangrene of the left great toe. The first symptom, pain after effort in the calf, appeared in 1991. At the beginning, the patient was treated with Pentoxiphilin (2 × 600 mg). At that time, he smoked about 30 cigarettes per day. After two years the patient noticed symptoms of intermittent claudication. Initially, the distance was about 1000 m, but it decreased quickly. The patient had an arteriography performed twice. This examination showed that surgical intervention was not possible at that time, and the patient was disqualified from a surgical procedure. In 1998 the patient noticed nocturnal pain for the first time which initially was periodical, but than fixed. In the beginning of 1999 a chemical sympathectomy was performed. After three months our patient



Rycina 1. Arteriografia pokazująca słabo rozwiniętą siatkę naczyniową na udzie. Tętnica podkolanowa wypełnia się z krążenia obocznego

Figure 1. Arteriography showing poor vascularization of the thigh. We can notice the trunk of the popliteal artery which is being filled from collateral vessels



Rycina 2. Arteriografia okolicy podkolanowej. Niewidoczne główne pnie naczyniowe. Słabo rozwinięte krążenie obocznego

Figure 2. Arteriography of the region below the knee. We cannot see the main trunks of the arteries of the calf. Collateral circulation is poorly developed

ta ponownie przyjęto do szpitala; wykonano arteriotomię i arteriografię (ryc. 1, 2). Niestety, w badaniu angiograficznym ponownie wykazano brak możliwości wykonania rekonstrukcji naczyniowej. W tym czasie pacjent przyjmował już morfinę i miał założony cewnik zewnątrzoponowy. Nie wyczuwało się tętna w lewej kończynie. Wskaźnik kostka–ramię wynosił 0,3. Jediną alternatywą była amputacja kończyny. Postanowiono wszczepić plazmid kodujący VEGF. Pacjent spełniał wymogi protokołu zatwierdzonego przez Komisję Bioetyczną. W przeddzień planowanego zabiegu u pacjenta wykonano badanie dopplerowskie znakowane kolorem z podaniem środka kontrastowego (Levovist Schering, Berlin, Niemcy). W badaniu tym w wybranych obszarach stwierdzono pojedyncze (1–2), trudne do uwidocznienia, około jednomilimetrowe naczynia (ryc. 3). Po podaniu środka kontrastowego dostrzeżono dodatkowe 2–3 małe naczynia. Pobrano również krew z kończyny górnej do oznaczenia stężenia VEGF w surowicy. Po założeniu cewnika do tętnicy udowej wykonano kolejną arteriografię. Poprzez cewnik podano 1 ml plazmidu kodującego VEGF 165 i przepłukano solą fizjologiczną. Dodatkowo w 2 domięśniowych iniekcjach podano plazmid 10 cm poniżej szpary kolana. Jednocześnie wykonano amputację martwego palucha; w ranie po amputacji nie stwierdzono krwawienia.

Przygotowanie plazmidu

Szczegółowy opis przygotowania plazmidu przedstawiono wcześniej [17]; w skrócie: fragment kodujący VEGF



Rycina 3. Rana 5 miesięcy po amputacji palucha. Rana wygoiła się całkowicie 9 miesięcy po amputacji

Figure 3. This photo shows the wound after toe amputation five months after the procedure. The wound healed completely nine months after gene transfer and amputation

was treated with Prostavasin (PGE1). He received Prostavasin as intravenous drip infusion 60 mg in 0.9% NaCl per day. Unfortunately this treatment did not result in any improvement. In October 1999 the pain appeared

165 przygotowano na bazie cDNA z ludzkich komórek urotelialnych (HCV-29/RAF) metodą polimerazy łańcuchowej (PCR, *polymerase chain reaction*). Przygotowany fragment wklejono do wektora ekspresyjnego pSEC (Invitrogen, Holandia) w miejsca Bam HI i EcoRI. Następnie uzyskany konstrukt genowy przeniesiono na *Escherichia coli* DH5 α . Plazmid izolowano z EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Niemcy). Obecność genu VEGF w pSEC, jak również jego czystość potwierdzono w sposób tradycyjny.

Badanie VEGF w surowicy

Oznaczenie stężenia VEGF w surowicy pacjenta przed wszczepieniem plazmidu i po nim wykonano metodą ELISA (Amersham) zgodnie z zaleceniami producenta.

Wyniki

W ciągu pierwszych 3 dni obserwowano wzrost temperatury ciała do 39,2°C, tachykardię do 110 uderzeń/min oraz biegunkę. Tachykardię leczono poprzez podanie digoksyny, werapamilu, a biegunkę — nifuroksazydu. Po 5 dniach wykonano reamputację palucha u jego podstawy. Po 2 tygodniach zaobserwowano zmniejszenie natężenia bólu. Stopniowo zmniejszano dawki leków przeciwbólowych. Spostrzeżono powstawanie pajęczków naczyniowych w obwodowej części kończyny (ryc. 4). Przez około tydzień obserwowano niewielki obrzęk kończyny, obwód w okolicy kostki wzrósł z 23 do 24 cm — obrzęk nie wymagał leczenia. W dalszej kolejności obserwowano gojenie rany. Dystans chromania wzrósł do 400 m, zaś 3 miesiące od rozpoczęcia terapii nadal się wydłużał. Cztery miesiące po amputacji palucha rana miała średnicę 3 mm, a całkowicie się wygoiła po około 7 miesiącach (ryc. 5). Pacjent nie otrzymywał leków przeciwbólowych. Kontrolę stężenia VEGF w surowicy wykonano



Rycina 4. Pajęczki naczyniowe 5 miesięcy od rozpoczęcia terapii
Figure 4. The picture shows spider angiomas that were seen five months after gene transfer

at rest. At that time the patient was referred to the hospital, and subjected to an operation: an arteriotomy with arteriography, which showed a total occlusion of the crural arteries (Fig. 1, 2). At this time he was treated with Morphine and he had extradural catheter placed. He had no palpable pulses in the left limb. An ankle brachial index of the ischaemic limb was 0.3. The only procedure that could be carried at this time was leg amputation at the level of the thigh. At this time we decided to perform an experimental procedure — gene therapy. The patient was deemed suitable for arterial gene therapy according to a protocol approved by the Ethical Committee. One day before the plasmid injection, we performed a Doppler ultrasonography. The value of this non-invasive technique increased due to contrast agents used (in our case, Levovist Schering, Berlin, Germany). Before therapy, an examination without contrast of the chosen area of the calf showed single (1–2), difficult to visualize and small (1 mm) vessels (Fig. 3). After the infusion of Levovist, two to three additional smaller vessels and a larger vessel of about 2 mm within the intramuscular septum were visualized. We also took a blood sample to examine the level of vascular endothelial growth factor. After catheterization of the femoral artery, we repeated the arteriography in the operating room and we confirmed the lack of arteries. We gave 1 ml of the plasmid encoding VEGF165 through the catheter and we flushed the catheter with 0.9% NaCl. Afterwards we gave intramuscular injections of plasmid doses in the left calf 10 cm below knee. Simultaneously we performed distal phalangectomy of left great toe. After the amputation there was no wound bleeding.

Construction and preparation of pVEGF165 vector

Cloning of the pVEGF165 expression vector has been described previously [17]. Briefly, the fragment encoding VEGF165 was amplified using a total cDNA from human urothelial cell line (HCV-29/RAF) and a standard PCR method. The amplified fragment was inserted into a pSEC expression vector (Invitrogen, Holland) and into BamHI and EcoRI sites. The obtained construct was then trans-

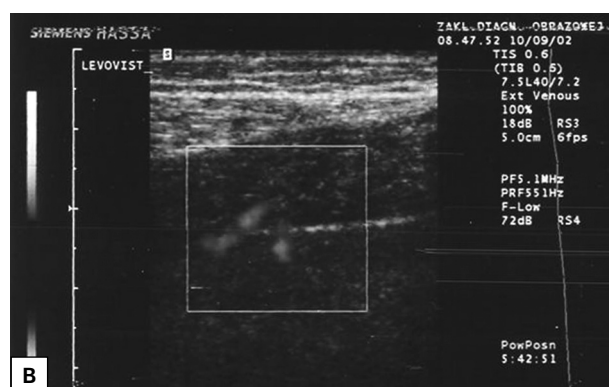
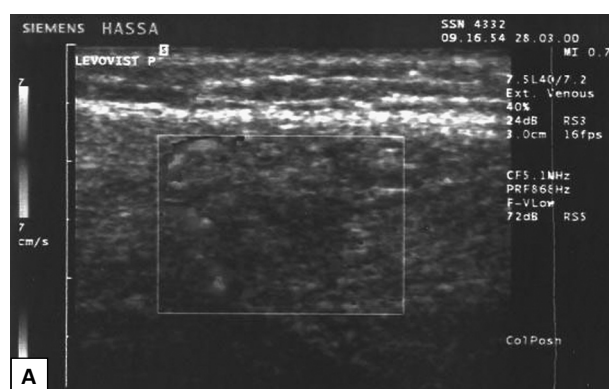


Rycina 5. Badanie dopplerowskie znakowane kolorem przed przeniesieniem genu
Figure 5. Doppler ultrasonography before gene transfer

Tabela I. Stężenie VEGF w surowicy chorych poddanych terapii genowej

Table I. VEGF level in the patient's serum during gene therapy procedure

Dzień badania Day of examination	Stężenie VEGF [j./l] Level of VEGF [u/l]
0	112
7	769
14	118
30	97



Rycina 6. Badanie dopplerowskie znakowane kolorem po przeniesieniu genu. A. dwa miesiące po zabiegu; B. dwa lata po zabiegu

Figure 6. Doppler ultrasonography after gene transfer. A. two months after procedure; B. two years after procedure

w 7., 14. i 30. dobie po wszczepieniu plazmidu. Wyniki zawarto w tabeli I. Po 2 miesiącach powtórzono badanie dopplerowskie znakowane kolorem (ryc. 6). W badanym obszarze przed podaniem środka kontrastowego stwierdzono 5 naczyń, których obraz uległ wzmocnieniu po jego podaniu. Wskaźnik kostka-ramię wzrósł do 0,6. Niestety, pacjent odmówił wykonania kontrolnej arteriografii. Obserwacja pacjenta trwała przez 3 lata. Pacjent nie zgłasza objawów chromania przestankowego, a rana jest całkowicie wygojona. Nie obserwowano żadnych istotnych powikłań.

formed into *Escherichia coli* DH5a strain growing on an LB medium (Sigma, USA) containing ampicillin (100 µg/ml). The plasmid was isolated using the EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Germany). The presence of the VEGF gene in the pSEC plasmid as well as the endotoxin purity of the preparation were confirmed by conventional procedures like restriction digestion mapping, sequencing or an LAL test, respectively.

VEGF quantification

Measurements of the levels of the VEGF protein in the patient's blood samples taken before and after the gene therapy were performed using an ELISA kit for human patients VEGF (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

Results

During the first three days we observed an increase in the temperature of up to 39.2°C, tachycardia up to 110 per minute and diarrhoea. Tachycardia was treated with Digoxin and Verapamile and diarrhoea with Nifuroxazide. After five days we reamputated the great toe (a proximal phalangectomy). After two weeks we noticed a decrease in leg pain. Gradually, we were able to reduce the analgesic doses. Angiogenesis was apparent on inspection of the distal portion of the ischaemic limb. Spider angiomas developed over the ankle and fore foot (Fig. 4). Transient peripheral edema was also observed in the ischaemic limb about one week after the procedure. The ankle circumference increased from 23 to 24 cm. The edema was untreated. The wound after amputation began to heal. The distance of intermittent claudication increased up to 400 meters after three months and was still increasing. After four months the patient stopped taking the analgesic. Also after four months the amputation wound was 3 mm in diameter, and it healed entirely after about seven months (Fig. 5). To control the level of Vascular Endothelial Growth Factor we took a blood sample seven days after the procedure, fourteen days, and 30 days after plasmid implantation. The results are shown in Table I. In two months we repeated the Doppler ultrasonography (Fig. 6). The examined area without the Levovist contrast showed more (ca 5) vessels, which were enhanced well. During the infusion of several additional vessels (ca 10) were visualized. The ankle-brachial index repeated at six months after the plasmid injection was 0.6. Unfortunately the patient refused to consent to check-up arteriography. We observed the patient for a total of three years. Until now we have not noticed any other adverse events. At this time the patient has not reported intermittent claudication and the wound after amputation has completely healed. The patient has noticed no adverse vision symptoms.

Discussion

After gene transfer in several animal models, in 1996 a clinical trial for therapeutic angiogenesis with peripheral

Dyskusja

Po próbach na zwierzętach, pierwsze próby leczenia drogą stymulacji angiogenezy osób z krytycznym niedokrwieniem przeprowadził prof. Isner w 1996 roku [12]. Opisany przypadek dotyczył 70-letniej kobiety bez cukrzycy z bólem nocnym i martwicą palucha. Wskaźnik kostka–ramię wynosił 0,26 [12]. Jako wynik leczenia autorzy podali wzrost przepływu o 82%. Następne badania tych autorów dotyczyły 9 pacjentów. Średnia wartość wskaźnika kostka–ramię wynosiła 0,33, a po leczeniu — 0,48. Jedynymi obserwowanymi powikłaniami były pajęczki naczyniowe i przejściowy obrzęk chorej kończyny. Taka sama sytuacja miała miejsce u leczonego pacjenta prezentowanego w niniejszej pracy. Wskaźnik kostka–ramię powiększył się 2-krotnie. W badaniu dopplerowskim znakowanym kolorem potwierdzono powstawanie naczyń krążenia obocznego. Obecnie pacjent porusza się normalnie, bez objawów chromania przestankowego. Początkowo wydłużanie dystansu chromania było szybkie — po 3 miesiącach wynosił on około 400 m — później uległo spowolnieniu. Po roku pacjent chodził bez bólu na dystansie około 1 km. Obecnie prowadzi normalne życie rodzinne i zawodowe. Naczyniowo–śródbłonkowy czynnik wzrostu znany jest także jako czynnik przepuszczalności naczyń [4, 6, 18, 19]. Po implantacji genu obserwowano obrzęk niedokrwionej kończyny. Nie podawano leków odwadniających, a obrzęk ustąpił po około 2 tygodniach.

Pajęczki naczyniowe, które pojawiły się w okolicy kostki i na stopie, znajdowały się poniżej podania plazmidu. Wydaje się pewne, że pajęczki naczyniowe były wynikiem terapii, gdyż wystąpiły bezpośrednio po jej rozpoczęciu. Powstawanie tych zmian zatrzymało się po pierwszym miesiącu.

Zgodnie z protokołem pacjent otrzymał plazmid kodujący VEGF 165 głównie domięśniowo i w niewielkiej dawce dotętniczo. Wkrótce po podaniu obserwowano wzrost temperatury ciała i tachykardię. Autorzy niniejszej pracy uważają, że powyższa reakcja była wczesną odpowiedzią alergiczną związaną ze wzrostem przepuszczalności naczyń (*permeability factor*).

Ogólnie zmiany w stanie pacjenta przebiegały stopniowo. Początkowo zmniejszył się ból spoczynkowy i pacjent zaczął chodzić. Ból w nocy utrzymywał się dłużej. Pacjent przestał przyjmować leki przeciwbólowe po około 4–5 miesiącach. Poprawę ukrwienia obserwowano jeszcze 15 miesięcy po wszczęciu plazmidu. Badacze spodziewają się, że było to spowodowane dalszą fizjologiczną odpowiedzią angiogenną.

Reasumując, autorzy niniejszej pracy uważają, że terapia drogą stymulacji angiogenezy może stać się skuteczną metodą u pacjentów cierpiących z powodu niedokrwienia obwodowego. Wydaje się, że opisana terapia jest dla nich skuteczna i bezpieczna.

artery disease was first performed by Prof. Isner *et al.* [12]. The case reported was a 70-year old woman, a non diabetic, with no palpable peripheral pulse, presenting rest and nocturnal pain, and gangrene of great toe. ABI was 0.26 [12]. As a result of gene therapy the authors reported an increase in rest flow of up to 82% and an increase in maximum flow of up to 72%. Next, a clinical trial consisting of nine patients was carried out. The average ABI before treatment was 0.33 and after plasmid implantation 0.48. The only adverse events confirmed after the therapy were moderate edema and spider angiomas [12]. In our patient the situation was analogous. After the therapy the value of ABI increased two fold. The changes in the Doppler USG showed the progress in the development of collateral circulation. Unfortunately we could not repeat the angiography. We observed the patient for four years. Now he walks normally without any distance of intermittent claudication. After therapy the walking distance increased rapidly and after three months it was about 400 m. Later the increase was slower. After one year the patient could walk without a break for about one kilometer. Now in normal every day life he does not feel any pain at all. Vascular endothelial growth factor is known also as permeability factor [4, 6, 18, 19]. After the gene transfer we noticed a trace of edema in the treated leg, the difference in circumference of the legs was 1 cm. *We did not give* to the patient any diuretic and after two weeks the edema disappeared. The spider angiomas that developed in ankle region and in the foot were below the level of where the gene was administered. It is very difficult to compare objectively the level of angioma expression. It is certain that they were the consequence of plasmid expression, because they appeared soon after plasmid implantation. It seems that we could observe new angiomas only for the first month. Since that time until now we have not noticed any new spider angiomas. According to our protocol the patient received the plasmid encoding VEGF-165 mainly through intramuscular injections and a small dose through intra-arterial injections. Soon after the gene transfer, we noticed an increase in temperature and tachycardia. We think that the intra-arterial implantation was responsible for the quick allergic response connected to the permeability response. Generally, the changes in patient's condition were gradual. At first rest pain disappeared and patient began to walk. Nocturnal pain lasted for a longer time. The patient stopped taking analgesic medication at night about 4–5 months after the gene transfer. There was some more improvement in the vascularization of the leg even at 15 months after the gene transfer. We realized that later after the plasmid transfer, the normal endogenic effect could appear which prolonged angiogenesis. In summary, we would like to postulate that angiogenic gene therapy may be a very efficient method for treating patients suffering from ischemic limb disorder. The procedure of injecting the plasmid which encodes VEGF165 described in this study seems to be safe and beneficial for patients.

Piśmiennictwo (References)

1. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. *et al.* Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114–1123.
2. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6: 389–395.
3. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A. Endothelial cell in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527–3561.
4. Connolly D.T. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J. Cell Biochem.* 1991; 47: 219–223.
5. Donnelly R., Yeung J. Therapeutic angiogenesis: a step forward in intermittent claudication. *Lancet* 2002; 359: 2048–2050.
6. Dvorak H.F., Brown F.L., Detmar M. *et al.* Vascular permeability factor/VEGF, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029–1039.
7. Engler R.L., Martin J. Symposium: Biorevascularization. 72-nd Scientific Sessions of the American Heart Association. Day 4 — November 10, 1999.
8. Esser S., Wolburg K., Wolburg H. *et al.* VEGF induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell Biol.* 1998; 140: 947–959.
9. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Cell Physiol.* 2001; 280: 1358–1366.
10. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; 97: 1108–1110.
11. Isner J.M., Walsh K., Symes J. *et al.* Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther.* 1996; 7: 959–988.
12. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R. *et al.* Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370–374.
13. Isner J.M., Baumgartner I., Rauh G. *et al.* Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of VEGF: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998; 28: 964–975.
14. Isner J.M. Myocardial gene therapy. *Nature* 2002; 415: 234–239.
15. Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J. *et al.* VEGF is secreted angiogenic mitogen. *Science* 1998; 246: 1306–1309.
16. Jastrzebski Z., Malecki M., Janik P. Badanie stopnia oczyszczenia z endotoksyn bakteryjnych preparatów plazmidowych przygotowanych dla potrzeb angiogennej terapii genowej. *Farmacja Pol.* 2003; 59: 171–175.
17. Malecki M., Przybyszewska M., Janik P. Construction of a bicistronic proangiogenic expression vector and its application in the experimental angiogenesis in vivo. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50: 875–882.
18. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674.
19. Yla-Herttuala S., Martin J.F. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000; 355: 213–222.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr med. Robert M. Proczka
II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Onkologicznej
Akademii Medycznej
Szpital Czerniakowski
ul. Stępińskiego 19/25, 00-739 Warszawa
tel./faks: (022) 841-15-92
tel. kom.: 604-525-713
e-mail: ramjup@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 28.12.2006 r.