

Terapia genowa niedokrwienia obwodowego

Gene therapy of peripheral ischemic disease

Maciej Małecki¹, Robert M. Proczka², Małgorzata Polańska², Jerzy A. Polański²

¹Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa (Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Warsaw, Poland)

²II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Onkologicznej Akademii Medycznej, Warszawa (Second Department of General, Vascular and Oncological Surgery, University of Medicine, Warsaw, Poland)

Streszczenie

Terapia genowa, mimo że budzi wiele wątpliwości, szczególnie natury moralnej, jest szansą w leczeniu pacjentów, którym do tej pory nie można było pomóc. Próby kliniczne genetycznego leczenia nowotworów i chorób naczyniowych są coraz bardziej zaawansowane.

Słowa kluczowe: angiogeneza, terapia genowa, niedokrwienie kończyn dolnych

Abstract

Gene therapy is overshadowed with doubt, especially due to the ethical nature of such experiments. On the other hand it gives a chance to patients what we could not help until now. Clinical trials of treating neoplasms and vascular diseases using gene therapy are most advanced at this moment.

Key words: angiogenesis, gene therapy, peripheral ischemic

Terapia genowa — wprowadzenie

Terapia genowa obejmuje szereg zabiegów związanych z wprowadzaniem materiału genetycznego do organizmu w celu leczenia rozlicznych chorób. Większość eksperymentów terapii genowej dotyczy transferu genu do komórek somatycznych. Badania z wykorzystaniem zarodków — choć o potencjalnie olbrzymich aplikacjach terapeutycznych — budzą jednak wiele wątpliwości, przede wszystkim natury etycznej [1]. Terapia genowa ukierunkowana na komórki linii płciowej powoduje trwałą zmianę materiału genetycznego, która będzie przekazywana nowym pokoleniom. Stwarza to możliwość wyeliminowania wady genetycznej na zawsze w danej linii [1]. Transfer genów do komórki modyfikuje jej funkcje lub nierzadko, głównie w przypadku komórek nowotworowych, może prowadzić do ich śmierci. Geny wprowadzane są do komórek w systemie *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* za pomocą nośników wirusowych i niewirusowych. Obecnie wykorzystuje się głównie wektory wirusowe

Gene therapy — introduction

Gene therapy encompasses a series of treatments dealing with introduction of genetic material into an organism as a method of treating various diseases. Most experiments using gene therapy deal with gene transfer into somatic cells. Research conducted with the use of embryonic stem cells for this purpose, though with potentially great therapeutic applications, is overshadowed with doubt especially due to the ethical nature of these experiments [1]. Gene therapy aimed at germ line cells, causes permanent change of the genetic material, which will be transferred into all new generations. This creates the possibility of forever removing a genetic defect in a given line [1]. The transfer of genes into a cell modifies its function and often, mainly in the case of a tumor cell, may cause its death. Genes can be introduced into cells using the *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* systems with the aid of viral and non-viral vectors. Today, generally viral vectors, both retroviral or adenoviral, are most often used

— retrowirusowe i adenowirusowe, choć nagi lub kapsułkowany w lipidach plazmidowy DNA również znajduje zastosowanie. Najczęściej terapeutyczne geny wprowadza się do wątroby, mięśni szkieletowych, serca, centralnego układu nerwowego, płuc, skóry, trzustki i komórek krwi, na przykład limfocytów. Transfer genów obejmuje bezpośrednie iniekcje do badanej tkanki lub podania dożylnie, dotętnicze, domięśniowe, donosowe, dojamowe czy doskórne. Większość prób klinicznych terapii genowej dotyczy chorób nowotworowych (ryc. 1). Stanowią one ponad 65% wszystkich protokołów klinicznych. W dalszej kolejności próby kliniczne obejmują choroby monogenowe, choroby naczyniowe i infekcyjne.

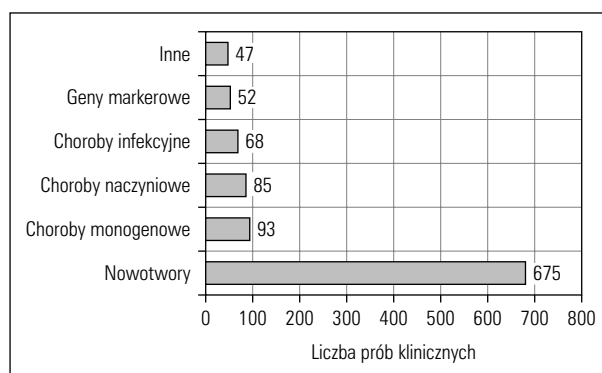
Większość prób klinicznych terapii genowej (z ponad 1000 zatwierdzonych na całym świecie) — około 65% — przeprowadzana jest na kontynencie amerykańskim (ryc. 2). W Europie terapia genowa to około 30% wszystkich prób, w Azji około 21%, w Australii około 2%, natomiast na kontynencie afrykańskim wykonano jak dotychczas (dane z 01.2005 r.) jedną próbę kliniczną terapii genowej, co stanowi 0,1% wszystkich prób na świecie [2].

W Europie najwięcej prób przeprowadzono w Wielkiej Brytanii, Niemczech i Szwajcarii. Łącznie w tych państwach wykonano ponad 200 badań, co stanowi około 20% wszystkich prób klinicznych przeprowadzonych na świecie. W Polsce próby kliniczne terapii genowej obejmują głównie nowotwory i choroby sercowo-naczyniowe. W światowych bazach danych, jak dotychczas, figurują trzy polskie próby kliniczne. Dotyczą one prób terapii genowej nowotworów skóry, centralnego układu nerwowego oraz terapii genowej nowotworów [2]. Oprócz tego prowadzone są również próby kliniczne angiogennej terapii genowej chorób sercowo-naczyniowych i terapii antyangiogennej nowotworów kobiecych narządów płciowych [3].

Angiogenna terapia genowa niedokrwienia obwodowego — doświadczenia kliniczne

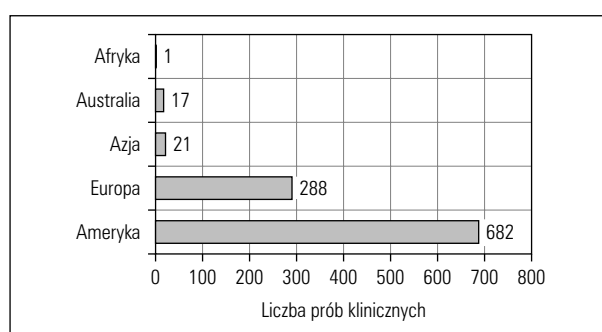
Interesującą strategią terapii genowej jest angiogenna terapia genowa, czyli badania indukcji powstawania naczyń krwionośnych przez wektory ekspresyjne kodujące czynniki proangiogenne. Mechanizm powstawania nowych naczyń jest zagadnieniem złożonym, w którym jedną z kluczowych ról pełni naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu — VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [4]. Większość prób klinicznych terapii angiogennej w Stanach Zjednoczonych opiera się na wykorzystaniu VEGF, choć również dość liczne badania prowadzone są z wykorzystaniem indukowanego hipoksją czynnika 1a (HIF 1a, *hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit*), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF, *fibroblast growth factor*) oraz płytkowopochodnego czynnika wzrostu (PDGF, *platelet-derived growth factor*) (ryc. 3) [5]. W Polsce angiogenna terapia genowa to, jak dotychczas, badania oparte na VEGF i VEGF/FGF [3, 6].

Wydaje się, że angiogenna terapia genowa może być rozpatrywana jako alternatywna metoda leczenia stanów niedokrwienia obwodowego. W praktyce klinicznej wykorzystywane są konstrukty genowe kodujące czynniki



Rycina 1. Terapia genowa na świecie — badania kliniczne, geny, choroby [2]

Figure 1. Gene therapy — clinical trials in the world



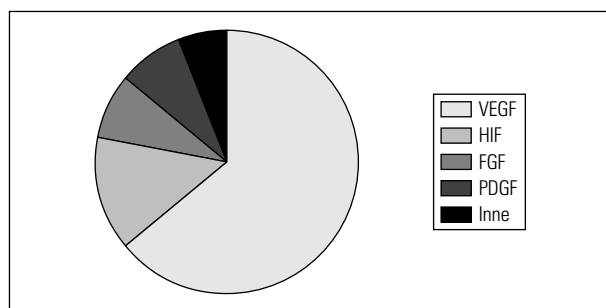
Rycina 2. Terapia genowa na świecie — dystrybucja na kontynentach [2]

Figure 2. Gene therapy — continental distribution

for this purpose, although naked or lipid encapsulated plasmid DNA has also been utilized. Most commonly, genes are introduced into the liver, skeletal or cardiac muscles, central nervous system, lung, skin, pancreas, and blood cells; for example, lymphocytes. Gene transfer includes direct injections into the tissue or intravenous, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracavitary, or intracutaneous application. As shown in Figure 1, gene therapy is used in the clinic mostly to treat neoplastic disease. These make up over 65% of the clinical protocols. The remaining clinical trials are made up of attempts to treat monogenic, vascular, or infectious diseases.

Most of the clinical trials employing gene therapy (about 65% of over 1000 approved around the world), have been done in the United States (Fig. 2). About 30% of the trials have been done in Europe, and 2.1% and 2% have been done respectively in Asia and Australia. So far only one clinical trial using gene therapy has been attempted in Africa which makes up 0.1% of all the trials (data from 1/2005) [2].

Most clinical trials in Europe have been done in Great Britain, Germany, and Switzerland with a total of over 200 trials, which makes up about 20%. In Poland, most trials with gene therapy have been used in the treatment of tumors or cardio-vascular disease. In world-wide data base three trials in Poland have been mentioned which deal with gene therapy of tumors [2]. In addition, gene



Rycina 3. Próby kliniczne angiogennej terapii genowej (Stany Zjednoczone). Najwięcej prób — ponad 60% — przeprowadza się z wykorzystaniem genu VEGF [5]

Figure 3. Clinical trials concerning angiogenic gene therapy (USA). In most of trials VEGF is used (over 60%)

proangiogenne. Wyniki badań klinicznych z wykorzystaniem pVEGF dowodzą, że jest to metoda dająca szanse pacjentom, u których obecnie jedyną alternatywą jest amputacja kończyny.

Należy pamiętać, że terapia angiogenna przeznaczona jest dla pacjentów z krytycznym niedokrwieniem obwodowym. Według konsensusu Dormandy'ego z 1992 roku krytyczne niedokrwienie kończyny, zarówno u pacjentów z cukrzycą, jak i bez współistniejącej cukrzycy musi spełniać dwa kryteria [7]:

- uporczywie nawracający niedokrwienno-bólowy zespół, wymagający analgezji przez okres dłuższy niż dwa tygodnie, z ciśnieniem skurczowym w kostce mniejszym niż 50 mm Hg i/albo ciśnieniem skurczowym na paluchu mniejszym od 30 mm Hg;

- owrzodzenie albo martwica palców i stopy, ze skurczowym ciśnieniem w kostce mniejszym od 50 mm Hg albo ciśnieniem skurczowym mierzonym na paluchu mniejszym od 30 mm Hg.

Terapia angiogenna nie może być uważana obecnie za terapię alternatywną albo konkurencyjną w stosunku do przyjętych metod leczenia zachowawczego, endowaskularnego lub chirurgicznego. W przypadku zmian miażdżycowych sposób postępowania systematyzuje przyjęty w 2000 roku konsensus transatlantyki (TASC, *TransAtlantic Inter-Society Consensus*) [8]. Terapię angiogenną wykorzystuje się w leczeniu pacjentów, którzy w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat nie mogli liczyć na skuteczną pomoc, a po amputacji stają się obciążeniem zarówno dla swoich rodzin, jak i dla systemu zdrowotnego.

Teoretycznie zamysł leczenia angiogennej jest prosty. Wszczepiając gen kodujący, jeden z wcześniej wymienionych proangiogennych czynników wzrostowych dąży się do wytworzenia naczyń krążenia obocznego w krytycznie niedokrwionych tkankach. Wiadomo przy tym, że narastanie nowych naczyń dotyczy jedynie niedokrwionych tkanek, hipoksja bowiem jest niezbędnym kofaktorem tego procesu. Wytworzone krążenie oboczne to gęsta sieć naczyń o stosunkowo niewielkich średnicach. Z jednej strony naczynia te niewątpliwie narażone są na łatwe zamknięcie w przypadku występowania czynników ryzyka miażdżycy, z drugiej zaś mogą one zapewnić krążenie wystarczające dla potrzeb metabolicznych.

therapy has been used in attempts to treat cardio-vascular diseases and female reproductive tract cancer [3].

Angiogenic gene therapy of peripheral ischemic disease — clinical experiments

Angiogenic gene therapy, in other words, the induction of vessel formation through the use of vectors encoding proangiogenic factors, is an interesting treatment strategy. The formation of new vessels is a very complex process, where one of the key roles is played by vascular endothelial growth factor, VEGF [4]. Most trials of angiogenic therapy in the US have been done with the use of VEGF. In other attempted therapy trials HIF 1a, FGF, and PDGF (Fig. 3) have been used [5]. In all of angiogenic therapy experiments done in Poland up to this time, VEGF and VEGF/FGF have been utilized [3, 6].

It seems that angiogenic gene therapy can be used as an alternative method of treatment of peripheral ischemia. Gene constructs, encoding proangiogenic factors, have already been utilized in the clinic. Experiments with the use of pVEGF show that this method may offer a possibility for improvement in those patients, in whom amputation is the only feasible option for treatment.

We must remember that gene therapy is reserved only for patients with critical peripheral ischemia. According to a consensus made by Dormandy in 1992, critical peripheral ischemia of the lower limb, in both diabetic and non-diabetic patients, must fulfill two criteria [7]:

- persistent ischemic rest pain requiring analgesia for two weeks or longer with systolic blood pressure in the limb lower than 50 mm Hg and/or systolic blood pressure lower than 30 mm Hg measured on the large toe;

- ulceration or necrosis of the toes and the foot with a systolic blood pressure measurement on the ankle lower than 50 mm Hg or lower than 30 mm Hg on the large toe.

Currently, gene therapy cannot be an alternative or competitive treatment to presently accepted non-invasive, endovascular, or surgical methods. In cases of atherosclerotic disease, treatment options are directed by the transatlantic consensus TASC [8]. Angiogenic therapy should be implemented only in patients who, for the past several decades, could not be successfully treated with traditional methods, and the only available option, amputation of the limb, causes them to become a burden to their families, as well as the entire healthcare system.

Theoretically, the ideas behind angiogenic therapy seem fairly simple. By implantation of a gene encoding one of the previously mentioned proangiogenic growth factors, we are causing the development of collateral circulation in the ischemic tissues. It is well known, though, that new vessel formation occurs only in ischemic tissues, since hypoxia is a necessary cofactor for this process. A newly formed vascular network consists of a net of relatively narrow vessels, which are likely to be in danger of being blocked in patients with a high risk of atherosclerosis. On the other hand, these vessels may

Czynnik wzrostu kodowany przez podany gen może mieć działanie ogólnoustrojowe. Jest to przyczyną obaw o wystąpienie działań niepożądanych. Należy tu wymienić rozwój nowotworu niewykrytego przed rozpoczęciem terapii oraz nieprawidłowy rozwój naczyń na dnie oka — jest to powodem, dla którego pacjenci z cukrzycą są wyłączeni z postępowania terapeutycznego. Zarówno w piśmiennictwie, jak i w obserwacjach własnych autorów niniejszej pracy obawy te nie znajdują potwierdzenia. Pacjent, któremu przeszło 5 lat temu wszczepiono plazmid kodujący naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF pozostaje do tej pory pod kontrolą autorów. Jak dotąd nie obserwowano naczyniowych zmian na dnie oka ani żadnych innych późnych powikłań po wszczepieniu plazmidu. O'Reilly i wsp. przeprowadzili serię podań VEGF (białka) myszom z licznymi, niewielkimi ogniskami przerzutowymi nowotworu do płuc [9]. W wyniku tych podań nie obserwowano jednak rozwoju sieci naczyń w guzkach nowotworowych ani wzmożonej szybkości rozwoju samych zmian nowotworowych. Wydaje się, że niezbędnym sygnałem do uruchomienia procesów angiogenezy jest, nawet w przypadku tkanki nowotworowej, niedotlenienie.

Obecnie trudno jest podać ostateczne wnioski dotyczące terapii angiogennej. Niewątpliwie publikowane wyniki leczenia są obiecujące. Nadal jednak nie poznano do końca czynników, które mogą spowalniać lub uniemożliwiać tę terapię.

Wśród pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, których poddawano amputacji, stężenie VEGF było bardzo wysokie. Zakładając, że VEGF jest kluczową cytokiną proangiogeną, a jej stymulacja terapeutyczna ma doprowadzić do powstania krążenia, można się dopatrywać pewnej nieścisłości. Organizm w naturalnych procesach fizjologicznych produkuje czynniki wzrostowe chociażby w procesach gojenia ran. W momencie pojawienia się niedokrwienia fizjologiczna reakcja powinna doprowadzić do natychmiastowej „naprawy” polegającej na wytworzeniu dodatkowego naczynia lub sieci naczyń. Być może brak odpowiedzi podyktowany jest zaburzeniem funkcjonowania receptorów, na przykład dla VEGF. Być może produkowane białko ma zmienioną, nieprawidłową budowę (polimorfizm) i dlatego nie jest w stanie uruchomić procesów angiogennych.

Jest też możliwe, że zaburzenia metaboliczne hamują procesy endogenego powstawania naczyń. Opisana terapia za pomocą plazmidu kodującego naczyniowy czynnik wzrostu może być utrudniona u pacjentów z hipercholesterolemią ze względu na podwyższone stężenie cholesterolu frakcji LDL. Chavakis i wsp. przypuszczają, że podwyższona koncentracja VEGF w surowicy, która przy prawidłowym stężeniu lipidów doprowadza do szybkiej migracji i proliferacji komórek śródbłonka, w warunkach hipercholesterolemii może nie objawiać się wzmożoną angiogenezą [10]. Wydaje się, że nawet bardzo wysokie stężenie VEGF nie jest w stanie skompensować hamującego działania lipidów [13–16].

Związkiem pośredniczącym w odpowiedzi komórkowej na aktywację receptorów dla VEGF jest tlenek azotu

be sufficient to allow appropriate circulation to maintain all metabolic processes.

There is also some concern that growth factors encoded by the injected gene may have general effects in some of the patients. The main worries are the possibility of the development of a malignant tumor, which has not been detected prior to gene therapy, or the formation of pathologic vessels in the retina (this is the reason why diabetic patients are currently excluded from these trials). However, current medical literature as well as our own experience contradict these claims. A patient who received an injection of the VEGF encoding plasmid over five years ago is still in our care and we have not observed any pathology in the retina or other side effects of the treatment. O'Reilly et al. [9] have administered a series of injections of VEGF (protein) into mice with multiple small metastatic tumors in the lungs. They did not observe any new vessel formation in the tumors nor an acceleration in the development of the actual cancerous process. It seems, that even in cases of neoplastic tissue, hypoxia is a necessary factor for induction of angiogenesis. At the present time, it is still difficult to summarize angiogenic therapy. Unquestionably, published therapy results are promising. Still, factors which may decelerate or fully inhibit this therapy have not been fully understood.

Serum levels of vascular endothelial growth factors were very high among patients with critical lower limb ischemia who required amputation. There are certain inconsistencies considering the fact that VEGF is the key proangiogenic cytokine and that it plays a role in the development of circulation. The human body physiologically produces growth factors as in during the wound healing process. Therefore, there should be an immediate reaction to ischemia where the problem would be easily “fixed” by the development of a single vessel or a net of vessels. Perhaps the lack of response is caused by the pathologic functioning of receptors, for example for VEGF. Another theory states that the produced protein has a changed pathologic structure (polymorphism) and thus is unable to initiate the angiogenic processes.

It is possible that metabolic imbalance inhibits endogenous production of vessels. Therapy with the vascular endothelial growth factor described in this study may actually be more difficult in patients with hypercholesterolemia because of their increased LDL levels. Chevakis *et al.* [10] speculate that increased concentration of VEGF in the serum, which at physiological serum lipid levels leads to quick migration and proliferation of endothelial cells, may actually not cause increased angiogenesis in patients with hypercholesterolemia. It seems that even very high levels of VEGF are not able to compensate for the inhibiting effects of lipids [13–16].

Nitric oxide is a compound which mediates the cellular response to activation of the VEGF receptors. It must be mentioned that that L-arginin is the substrate necessary for the production of NO. L-arginin is changed into cytrulin then to NO through the activity of NO₂ synthase. Schwarzscher *et al.* [11] supplemented L-arginin after iliac artery angioplasty in rabbits. They noticed a positive effect in the hea-

(NO, *nitric oxide*). Trzeba wspomnieć, że substratem dla produkcji NO jest L-arginina. To z niej pod wpływem syntazy NO₂ powstaje cytrulina, a następnie tlenek azotu. Schwarzscher i wsp. suplementowali L-argininę po angioplastyce tętnicy biodrowej u królików [11]. Zaobserwowali korzystny wpływ na gojenie się uszkodzonego podczas zabiegu śródbłonna, co można wytłumaczyć zwiększoną produkcją VEGF spowodowaną zwiększoną syntezą NO. Po wyższy wynik może mieć istotne znaczenie kliniczne. Nieodpowiednie stężenie L-argininy w organizmie człowieka może zaburzać prawidłową odpowiedź komórek śródbłonna na VEGF. Próbowano doświadczalnie suplementować L-argininę do diety królików w celu osiągnięcia efektu angiogenego, ale wyniki tych prac nie są jednoznaczne [12].

Mimo złożoności problemu, wydaje się, że terapia angiogenna jest bardzo obiecującą metodą dającą szansę w leczeniu choroby niedokrwiennej serca, a także naczyń obwodowych.

Piśmiennictwo (References)

1. Verma IM, Somia N. Gene therapy — promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239–242.
2. www.wiley.co.uk
3. Kołsut P, Małecki M, Żelazny P *et al.* Gene therapy of coronary artery disease with phevfgf165 — early outcome. *Polish Heart J.* 2003; 59: 373–384.
4. Farrara N, Garber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 6: 669–676.
5. Isner JM, Vale PR, Symes JF *et al.* Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res.* 2001; 89: 389–400.
6. Małecki 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.
7. Dormandy JA. Therapeutic advances in critical limb ischaemia. *International Congress and Symposium Series.* Dublin, 1992.
8. Management of peripheral arterial disease (PAD). *TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Section C.* *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19: 47–243.
9. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277–285.
10. Chavakis E, Dernbach E, Hermann C *et al.* Oxidized LDL inhibits VEGF-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation* 2001; 103: 2102–2107.

ling of the damaged endothelium which could be explained by increased production of VEGF caused by greater synthesis of NO. These results may have important applications in the clinic. In humans, lower levels of L-arginin may negatively affect cellular response to VEGF. There have been trials of L-arginin supplementation in the diet of rabbits where an angiogenic effect was expected. Unfortunately results of these studies are unclear [12].

Moving past the complexity of the issue, it seems that angiogenic therapy is a highly promising strategy to battle ischemic disease, both in the heart and peripheral vessels.

11. Schwarzscher SP, Lim TT, Wang B *et al.* Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. *Circulation* 1997; 95: 1863–1869.
12. Asahara T, Masuda H, Takahashi T *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularisation. *Circ Res.* 1999; 85: 221–228.
13. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 2000; 477: 258–262.
14. Engler RL, Martin J. Joint AHA/ESC Symposium: Biorevascularization. 72-nd scientific sessions of the American Heart Association. November 10, 1999.
15. Levis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP *et al.* Exercise training increases basal NO production from the forearm in hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2782–2787.
16. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA *et al.* Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of VEGF in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1997; 100: 3131–3139.

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: 09.08.2005 r.