

Sposoby usprawniania angiogenezy terapeutycznej w chorobach serca

Rationalization of therapeutic angiogenesis in heart diseases

Jadwiga Joško i Marcin Kostkiewicz

Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej w Zabrze
 Śląska Akademia Medyczna w Katowicach

Abstract

Modern experimental strategy of treatment of myocardial ischaemia is based on the induction of neovascularisation using mediators inducing angiogenesis. Most frequently used angiogenic cytokines are VEGF, FGF, IGF, PDGF and HGF. These are administered either intravenously or locally to the heart muscle, pericardium, coronary vessels, intraadventitally and perivascularly. Angiogenic cytokines are also applied as genes transfer by adenoviruses and administration of naked DNA or mioblasts producing growth factors. Much attention has been paid lately to the issue of cardioprotection and therapeutic angiogenesis without the use of cytokines but grafting of endothelial progenitor cells as well as hypoxic and ischaemic preconditioning. (Folia Cardiol. 2005; 12: 713–725)

angiogenesis, cardioprotection, preconditioning, gene therapy, VEGF, FGF, IGF, PDGF, HGF, endothelial progenitor cells

Terapeutyczna angiogeneza

Nowoczesna eksperymentalna strategia leczenia niedokrwienia mięśnia sercowego polega na wywołaniu neowaskularyzacji przy użyciu mediatorów indukujących angiogenezę.

Taka strategia leczenia to terapeutyczna angiogeneza, która pojawiła się jako uzupełniająca metoda terapii niewydolności naczyń. Jej skuteczność początkowo wykazano u pacjentów z ciężkimi objawami krytycznego niedokrwienia kończyn [1]. Wkrótce prace kliniczne poszerzono o informacje dotyczące osób z ciężkimi objawami choroby wieńcowej, którzy nie kwalifikowali się do rewaskularyzacji. Oszacowano, że stanowią oni do 12% pacjentów kierowanych do ośrodków referencyjnych [2].

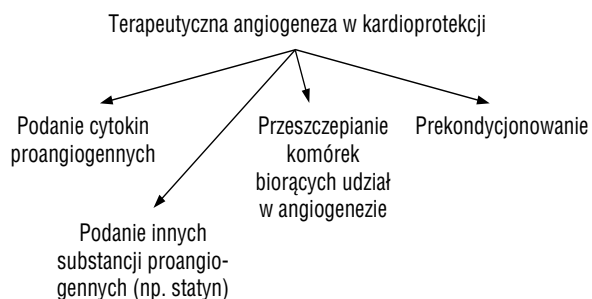
Adres do korespondencji: Dr hab. med. Jadwiga Joško
 Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej Śl. AM
 ul. H. Jordana 19, 41–808 Zabrze
 tel./faks (0 32) 272 28 47; e-mail: jjosko@slam.katowice.pl
 Nadesłano: 10.05.2005 r. Przyjęto do druku: 27.07.2005 r.

Obecnie sprawdza się skuteczność terapeutycznej angiogenezy w schorzeniach, takich jak zawał serca, choroba niedokrwienna serca, niewydolność serca, kardiomiopatie. Metody przyjmowane w celu osiągnięcia kardioprotekcji poprzez terapeutyczną angiogenezę w tych i innych schorzeniach przedstawiono na rycinie 1, a metody usprawniania angiogenezy na rycinie 2.

Kardioprotekcja poprzez podawanie cytokin

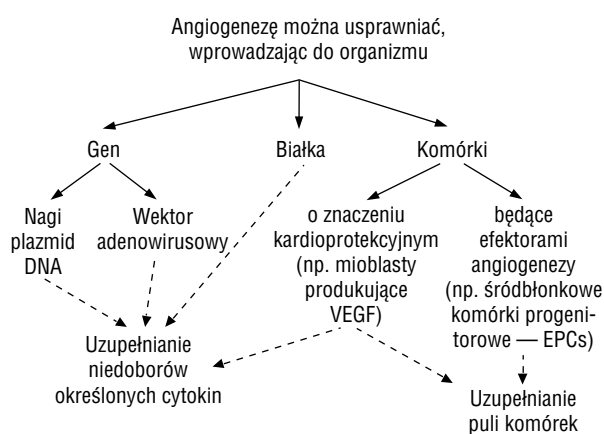
Sposób i miejsce podania czynników angiogennych. Czynniki wzrostu podaje się w postaci iniekcji dożylnych, do mięśnia sercowego, wlewów do tętnicy wieńcowej; selektywnej, regulowanej ciśnieniem infuzji wstecznej żył wieńcowych; iniekcji okołoprzydankowych (w pobliżu naczyń wieńcowych), śródprzydankowych; iniekcji do osierdzia [3–14] (ryc. 3).

W przypadku podawania cytokin dożylnie obserwuje się ich niepożądane działanie ogólnoustrojowe



Rycina 1. Strategie przyjmowane w celu osiągnięcia kardioprotekcji poprzez terapeutyczną angiogenezę

Figure 1. Strategies adopted in order to achieve cardioprotective effect through the therapeutic angiogenesis



Rycina 2. Metody usprawniania angiogenezy

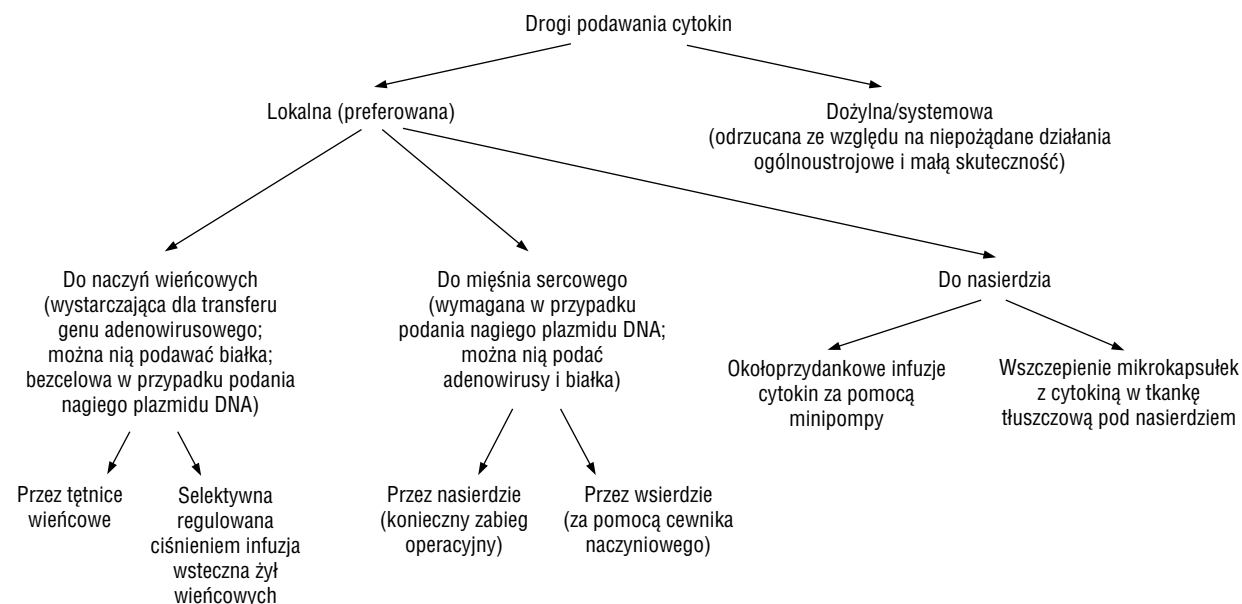
Figure 2. Angiogenesis improving methods

oraz zmniejszone oddziaływanie na serce w wyniku rozcięcia podanej dawki w łożysku naczyniowym i zatrzymania dużej części dawki w łożysku płucnym (sekwestracja płucna). Dlatego też lokalne dostarczenie rekombinowanych białek lub genów uważa się za optymalne. W badaniach klinicznych preferuje się drogę podania do naczyń wieńcowych (białek lub adenowirusów) lub do mięśnia sercowego (nagiego DNA lub adenowirusów) [3, 15, 16].

Bezpośrednie iniekcje angiogennych czynników wzrostu do mięśnia sercowego (w postaci genów lub białek) mają, przynajmniej teoretycznie, przewagę nad podawaniem ich do naczyń wieńcowych.

Podanie do mięśnia sercowego może odbywać się przez nasierdzie i wiąże się wtedy z ryzykiem zabiegu operacyjnego (choć ryzyko to nie jest istotne w przypadku konieczności implantacji bypassów). Metoda ta może więc zostać wyparta przez iniekcję do mięśnia sercowego poprzez wsierdzie, dzięki zastosowaniu cewnika. Skuteczność tej mniej inwazyjnej metody potwierdzono już w badaniach na modelu zwierzęcym i przeprowadzonych u ludzi [17–19].

Na modelu zwierzęcym (świnie z przewlekłym niedokrwieniem mięśnia sercowego) wykazano, że dzięki selektywnej regulowanej ciśnieniem infuzji wstecznej żył wieńcowych zwiększa się (w porównaniu z infuzją do tętnicy wieńcowej) wiązanie tkankowe fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF-2, inaczej bFGF, *fibroblast growth factor*). Potwierdzeniem skuteczności tej metody było wykazanie lepszej perfuzji i kurczliwości oraz większej liczby



Rycina 3. Sposoby podawania cytokin w celu pobudzenia angiogenezy

Figure 3. Cytokines administering methods aiming angiogenesis stimulation

kolaterali w pośmiertnej angiografii i większej gęstości kapilar w niedokrwionej części mięśnia sercowego w grupie z infuzją wsteczną FGF-2 w porównaniu z grupą z infuzją dotętniczą [10].

Randomizowane i kontrolowane chirurgicznie doświadczenia z okołonaczyniowym podaniem bFGF (10 lub 100 μ g) przy użyciu mikrokapsulek implantowanych w podnasierdziową tkankę tłuszczową udowodniły bezpieczeństwo i użyteczność tej metody u pacjentów poddawanych zabiegowi pomostowania aortalno-wieńcowego [11].

Udowodniono również skuteczność śródprzydankowych infuzji za pomocą minipompy u zwierząt [20, 21].

Próbowano także dostarczać adenowirusy kodujące cytokiny proangiogenne (naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka — VEGF165) do osierdzia u psa, jednak nie uzyskano spodziewanego efektu [14].

Ciągle jeszcze nie ma pewności dotyczącej nie tylko optymalnego sposobu, ale i miejsca podania leku w terapeutycznej angiogenezie. Nie wiadomo, czy należy go dostarczyć w samo centrum obszaru niedokrwionego, na jego obrzeża, czy w rejon niedotknięty niedokrwieniem, aby tam rozpoczęły wzrost nowe naczynia. A może w jedno i w drugie miejsce? W takim przypadku nie trzeba byłoby już martwić się o to, w jaki sposób dostarczyć lek precyzyjnie w określone miejsce. Jeśli jednak istnieje potrzeba precyzyjnego deponowania leku, to wydaje się, że optymalnym sposobem na to będzie dotarcie do mięśnia sercowego przez wsierdzie (za pomocą cewnika).

Istnieją doniesienia sugerujące, że potencjalnie użytecznym trybem leczenia może być zastosowanie pojedynczej dawki, prowadzące do 2–3-tygodniowego wzrostu stężenia angiogennych białek w ognisku niedokrwienia mięśnia sercowego, bez zwiększenia ich poziomu w krążeniu systemowym w celu redukcji ewentualnych odległych skutków ubocznych [15]. Dzięki terapii genowej można osiągnąć taki właśnie tryb leczenia, ponieważ nagie plazmidy DNA i wektory wirusowe zapewniają jedynie przemijającą transfekcję w czasie odpowiednim do osiągnięcia angiogenezy. Wiadomo jednak, że podanie do naczyń wieńcowych może być wystarczające dla transferu genu adenowirusowego [14], a nagi plazmid DNA wymaga bezpośredniej iniekcji domięśniowej z powodu degradacji przez krążące nukleazy [22, 23].

Rodzaje cytokin angiogennych stosowanych w kardioprotekcji. Wiele dowodów wskazuje, że podanie angiogennych czynników wzrostu jako rekombinowanych białek bądź poprzez transfer genów skutkuje polepszeniem perfuzji poprzez neowaskularyzację. Najlepiej poznane i najbardziej obiecujące cytokiny proangiogenne to: naczyniowy

czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF, *fibroblast growth factor*), insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF-I i IGF-II, *insulin-like growth factor*), płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDF, *platelet-derived growth factor*) oraz hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF, *hepatocyte growth factor*).

Do najlepiej zbadanych związków posiadających aktywność angiogenną należą: naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF) i fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF).

Badania na zwierzęcych modelach niedokrwienia serca

Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka.

Efekt wywołany przez białko VEGF165 został zbadany u psów i świń. Pojedyncze dawki podawane do naczyń wieńcowych okazały się efektywne u świń, podobnie jak serie dwóch lokalnych iniekcji za pomocą cewnika, 3- lub 4-tygodniowe śródprzydankowe infuzje za pomocą minipompy, iniekcje do mięśnia sercowego i 28-dniowe iniekcje do naczyń wieńcowych u psa. Podanie dożylnie było nieefektywne [6, 20, 21, 24, 25].

Iniekcje plazmidu DNA kodującego VEGF165 do mięśnia sercowego, VEGF-2 bądź adenowirusa kodującego VEGF121 drogą torakotomii u świń (model „ameroid”) poprawiają funkcję i perfuzję kolaterali [17, 26–29].

Dostarczanie adenowirusa kodującego VEGF165 do osierdzia psa nie zwiększyło przepływu przez kolaterale [14].

Fibroblastyczny czynnik wzrostu. Badania przeprowadzone na psach i świniami wykazały skuteczność działania białka FGF-2 w przypadku podawania go do naczyń wieńcowych, do nasierdzia w pobliżu naczyń wieńcowych bądź do mięśnia sercowego. W tych przypadkach wykazano większą gęstość tętniczek i włosniczek, zwiększony przepływ przez kolaterale i polepszenie czynności komór serca (wzrost frakcji wyrzutowej) [3, 5, 12, 30, 31].

Równocześnie stwierdzono brak skuteczności iniekcji do żył centralnych, spowodowane wiązaniem FGF-2 przez receptory płucne (sekwestracja płucna) [3, 16].

Przeprowadzono mniej doświadczeń z użyciem transferu genu FGF. Wykazano, że pojedyncza domięśniowa iniekcja nagiego DNA kodującego FGF-1 oraz adenowirusowy transfer genu FGF-5 do naczyń wieńcowych poprawiają przepływ odpowiednio w kończynie tylnej królika oraz mięśniu sercowym świni [22, 32].

Badania kliniczne

Badania kliniczne z użyciem rekombinowanych białek VEGF i FGF

Początkowe badania kliniczne, w których podawano rekombinowane białko FGF-1 (aFGF) lub FGF-2 (bFGF) do mięśnia sercowego bądź okołoprzydanekowo w czasie zabiegu pomostowania, przyniosły pewne dowody na poprawę w porównaniu ze stanem wyjściowym bądź po zastosowaniu placebo [33–37].

W dalszych badaniach fazy pierwszej zastosowano podanie do naczyń wieńcowych lub dożylnie VEGF165 lub FGF-2. W większości przypadków obserwowano znamienne poprawę w zakresie czasu ćwiczeń fizycznych oraz perfuzji, a także mniejsze bóle wieńcowe w porównaniu ze stanem przed interwencją. Stało się to podstawą do przeprowadzenia dwóch większych badań fazy II — VIVA i FIRST [15, 38–43].

W badaniu VIVA (*The Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*) porównano dwie dawki białka FGF-1 z placebo u 178 pacjentów, którym podano pojedynczą infuzję do naczyń wieńcowych, a następnie trzy infuzje dożylnie. Zasadnicze kryterium oceny, tj. czas trwania ćwiczenia w ciągu 60 dni, był podobny we wszystkich trzech grupach. Stopień duszności, jakość życia i perfuzja w ciągu 60 dni nie różniły się znamienne między grupami [39, 44, 47].

W badaniu FIRST (*FGF-2 Initiating Revascularization Support Trial*) porównano pojedynczą dawkę FGF-2 podaną do naczyń wieńcowych z placebo u 337 pacjentów. W ciągu 90 dni grupa otrzymująca FGF nie różniła się znamienne od grupy otrzymującej placebo pod względem zasadniczego kryterium oceny — czasu ćwiczenia bądź w wynikach spoczynkowej i wysiłkowej perfuzji. Bóle wieńcowe pojawiały się nieznamienne rzadziej w grupie przyjmującej FGF. Znamienne poprawę w czasie ćwiczenia po leczeniu FGF wykazano u pacjentów po 65 roku życia [46].

Niepomyślne wyniki badań VIVA i FIRST w zakresie czasu ćwiczenia podkreślają problem farmakokinetyki rekombinowanych białek podawanych do przestrzeni naczyniowej, która może prowadzić do nieadekwatnego lokalnego dostarczenia angiogennych czynników wzrostu do niedokrwionego mięśnia sercowego, co sugerowały badania z użyciem znakowanych ligandów [16, 47]. Dlatego też rozpoczęto badania nad transferem genów cytokin angiogennych.

Badania kliniczne z użyciem transferu genów VEGF i FGF

Transfekcja za pośrednictwem adenowirusów.

W badaniu transferu genu VEGF121 do mięśnia sercowego wektor adenowirusowy pierwszej generacji został podany pacjentom poddawanym zabiegowi wszczepiania bypassów lub jako jedyny element terapii drogą minitorakotomii. W obu grupach pacjentów stwierdzono poprawę w zakresie objawów, chociaż perfuzja wywołana stresem nie zmieniła się. W badaniu AGENT (*Angiogenic GENE Therapy*) podkreślono jedynie bezpieczeństwo podawania do naczyń wieńcowych wektorów adenowirusowych z genem FGF-4 u chorych z dławicą piersiową. Nie obserwowano jednak znamiennej poprawy [48, 49].

Transfekcja nagim DNA. W największym badaniu o najdłuższym okresie obserwacji oceniano 30 pacjentów z oporną dławicą piersiową niekwalifikujących się do konwencjonalnej rewaskularyzacji, którym podawano do mięśnia sercowego (na drodze minitorakotomii) nagie DNA kodujące gen VEGF165. W ciągu 90 dni tygodniową podaż nitrogliceryny zredukowano z 60 do 3,5 tabletki, a czas ćwiczenia znamienne się zwiększył. Poprawa dotycząca objawów utrzymała się przez 1 rok. Zaobserwowano również polepszenie czynności elektromechanicznej lewej komory (*left ventricular electromechanical mapping*) oraz lepszą spoczynkową i stresową perfuzję w tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu (SPECT, *single-photon emission computed tomography*) [15, 50, 51].

Doświadczenia związane z transferem genu do mięśnia sercowego przez nasierdzie w postaci nagiego DNA wykorzystano także w innych wielośrodkowych badaniach z użyciem genu VEGF-2 [15]. Częstość dławicy i podaż nitrogliceryny zmniejszyły się, a czas ćwiczeń wzrósł o ponad 2 min [15]. Udokumentowano także poprawę perfuzji, podobnie jak w badaniach z transferem genu VEGF165 [52, 53].

Pozytywne wyniki pierwszego badania klinicznego z przezskórnym transferem genu do mięśnia sercowego za pomocą cewnika naczyniowego stały się podstawą do przeprowadzenia wielośrodkowego, randomizowanego przeprowadzonego metodą podwójnie ślepej próby i kontrolowanego placebo badania transferu genu VEGF-2 z wykorzystaniem cewnika. Analiza dotycząca 19 pacjentów ujawniła znamienne poprawę w zakresie klasy dławicy w porównaniu z placebo. W ponad rocznej obserwacji u 25 osób nie stwierdzono powikłań ani zgonów po 150 iniekcjach VEGF [18, 54, 55].

Również w badaniu *Euroinject* wykazano bezpieczeństwo stosowania plazmidu genu *phVEGF-A(165)* i wykazano w grupie 40 osób badanych pozytywne efekty tej terapii pod postacią polepszenia mechaniki ścian serca w zakresie obserwowanych segmentów (mimo że nie uzyskano poprawy dotyczącej wysiłkowej perfuzji miokardium).

Skuteczność terapeutycznej angiogenezy można zwiększyć poprzez podniesienie efektywności transfekcji nagim plazmidem DNA. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że można to osiągnąć, zwiększając objętość bądź ciśnienie osmotyczne substancji podawanych podczas iniekcji domięśniowej lub prowadząc kotransfekcję genem syntazy prostacykliny. Badania te prowadzono na modelu niedokrwionej kończyny leczonej transferem genu *VEGF* lub *HGF* [56].

Wykazano również, że fale ultradźwiękowe zastosowane bezpośrednio po iniekcji domięśniowej wpływają na poprawę wychwytu plazmidu DNA i mogą zwiększyć ekspresję genu ponad 20 razy [57].

Podanie mioblastów produkujących VEGF

Przydatność szkieletowych mioblastów wytwarzających *VEGF* w leczeniu ostrego zawału u szczurów badali Suzuki i wsp. [58]. Szkieletowe mioblasty szczurów zostały transfekowane ludzkim genem *VEGF165*. Badanej grupie szczurów wstrzyknięto 4 miliony takich mioblastów do serca 1 godzinę po okluzji lewej tętnicy wieńcowej. Ekspresja *VEGF* w mięśniu sercowym wzrosła, co skutkowało zwiększoną angiogenezą bez tworzenia guzów nowotworowych. Przeszczepione mioblasty różnicowały się w sercu gospodarza w wielojądrowe miotuby, rozmiar zawału znamienne zmalał, a czynność serca w badanej grupie poprawiła się. W analizie *western-blott* wykazano, że stężenie *VEGF* w mięśniu sercowym w badanej grupie wzrosło znamienne pomiędzy 2 a 14 dniem po transplantacji mioblastów, z pikiem w dniu 4. Suzuki i wsp. [58] wnioskuje, że we wczesnej fazie zawału efekt kardioprotekcyjny wywołała wazodylatacja odbywająca się dzięki indukowanej przez *VEGF* zwiększonej produkcji tlenu azotu, niezależnie od angiogenezy. Angiogeneza zaś odegrała rolę w późniejszym okresie [59].

Istnieją również doniesienia wskazujące, że transfer genów za pośrednictwem szkieletowych mioblastów stale wytwarzających *VEGF* dzięki transfekcji retrowirusowej skutkuje powstawaniem naczyńnowych guzów u myszy z defektem immunologicznym. Prawdopodobnie dzieje się tak za sprawą stałego wytwarzania *VEGF* i utrzymywania się jego wysokich stężeń [60].

Inni autorzy sugerują natomiast, że okres 1–2 tygodni wzmożonej ekspresji *VEGF* (uzyskanej za pośrednictwem bezpośredniego transferu genów do mięśnia sercowego) jest zbyt krótki, aby powstały guzy nowotworowe, ale wystarczający do utworzenia naczyń obocznych w niedokrwionym mięśniu sercowym [50, 61].

Strategia zaprezentowana przez Suzuki i wsp. [58] może zapewnić odpowiednią wielkość i czas trwania ekspresji *VEGF* (ok. 2 tygodnie), potrzebne do rozwoju funkcjonalnych kolaterali, bez tworzenia naczynek. Odpowiedni poziom ekspresji *VEGF* uzyskuje się dzięki przemijającej transfekcji genowej mioblastów, przy użyciu *HVJ-liposomów (hemagglutinating virus of Japan-liposome)*.

Taka kombinowana strategia przeszczepiania komórek i terapii genowej może być istotna w leczeniu ostrego zawału serca.

Kardioprotekcja niezależna od angiogenezy z podaniem czynników proangiogennych (FGF-1)

W doświadczeniu z użyciem transgenicznych myszy, u których obserwowano wzrost ekspresji *FGF-1* w mięśniu sercowym, wykazano działanie kardioprotekcyjne [62]. Po okluzji naczyń wieńcowego zawał serca rozwijał się znacznie wolniej u myszy transgenicznych niż w grupie kontrolnej. Autorzy badań wykazali, że było to niezależne od angiogenezy, a co najmniej częściowo wywołane na drodze aktywacji konstytutywnej kinazy białkowej (*MAP, mitogen activated protein kinase*) — dokładnie gałęzi *ERK-1* i *ERK-2*. Wzrost ekspresji *FGF-1* w mięśniu sercowym może znamienne opóźnić rozwój zawału. Odkrycie zaś, że maksymalny rozmiar zawału nie był zmniejszony u myszy transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną oraz że żywotność komórek jest zwiększona także w izolowanych kardiomiocytach myszy transgenicznych poddanych niedokrwieniu, wskazuje, że antyniedokrwienne efekty *FGF-1* najprawdopodobniej nie wynika z utrzymanej perfuzji gęstszej sieci tętniczek u myszy transgenicznych [62].

Insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF-I i IGF-II). Wykazano, że *IGF-I* i *IGF-II* są silnymi i bezpośrednimi czynnikami chemotaktycznymi dla ludzkich komórek śródbłonna. Udowodniono również, że laminina, będąca białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, pełni funkcję permissywną wobec aktywności chemotaktycznej *IGF*. Sugeruje się, że laminina, bądź jej fragmenty, jest obecna w niedokrwionym sercu i może współdziałać z egzogennym *IGF* w stymulacji angiogenezy [63].

W doświadczeniach przeprowadzonych na świniach po zawale wykazano, że IGF-I jest najefektywniejszą molekułą poprawiającą czynność mięśnia sercowego, a także zwiększającą neowaskularyzację w niedokrwionym sercu [64].

Stwierdzono także, że IGF poprawia czynność mięśnia sercowego zarówno u ludzi zdrowych, jak i u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca [65, 66]. Osoby z wyższym stężeniem IGF w surowicy bezpośrednio po ostrym zawale serca charakteryzują się lepszą czynnością komórek i przebudową mięśnia sercowego od pacjentów z niższym stężeniem IGF-I.

Su i wsp. [63] scharakteryzowali wpływ oddziaływania rekombinowanych białek IGF oraz trzeciej generacji wektorów adenowirusowych kodujących geny IGF-I lub IGF-II na apoptozę kardiomiocytów i angiogenezę. Wykazano, że komórki śródbłonka hodowane w obecności zewnątrzkomórkowego białka lamininy zareagowały na białko IGF-I i IGF-II zwiększoną migracją komórek i pączkowaniem komórek śródbłonka.

Wydaje się, że transfer genu IGF-I i IGF-II to dobry sposób lokalnego dostarczania IGF w celu leczenia choroby niedokrwiennej serca i niewydolności serca poprzez stymulację angiogenezy i ochronę kardiomiocytów przed apoptozą.

Płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF). Wykazano, że istnieje komunikacja za pośrednictwem PDGF-AB między komórkami śródbłonka drobnych naczyń serca (CMECs, *cardiac microvascular endothelial cells*) a sąsiadującymi kardiomiocytami. Kardiomiocyty pobudzają CMECs do produkcji izoformy PDGF-B, która łączy się z produkowaną konstytutywnie izoformą PDGF-A w heterodimer PDGF-AB. Skutkuje to kaskadą molekularnych przemian, które utrzymują integralność naczyń, m.in. śródbłonkową ekspresję VEGF i receptora dla VEGF (VEGFR-2, Flk-1) [67].

W doświadczeniach przeprowadzonych *in vivo* dowiedziono, że podanie do mięśnia sercowego PDGF-AB minimalizuje rozmiar późniejszego zawału i promuje angiogenezę w starszych sercach szczurzych (starsze serca mają bowiem osłabioną możliwość angiogenezy, m.in. jako skutek zmniejszonej produkcji PDGF-B). Przywrócenie rozregulowanego śródbłonkowego szlaku angiogenezy z PDGF jako mediatorem przywraca w starszych sercach osłabioną kardioprotekcyjną funkcję angiogenezy i staje się podstawą rozwoju nowatorskich metod terapii w schorzeniach sercowo-naczyniowych u starszych osobników [68].

Hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF). Wykazano, że HGF jest unikalnym czynnikiem wzrostowym: daje efekt antyzwłóknieniowy i angiogeny, dlatego potencjalnie może być wykorzystana

w leczeniu kardiomiopatii. Hepatocytarny czynnik wzrostu stymuluje degradację kolagenu przez jedną z metaloproteinaz (MMP-1, *matrix metalloproteinase 1*), urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA, *urokinase plasminogen activator*) i kolagenazę, a także hamuje ekspresję transformującego czynnika wzrostu (TGF, *transforming growth factor*), co skutkuje zahamowaniem syntezy kolagenu i procesu włóknienia. Hepatocytarny czynnik wzrostu stymuluje ponadto ekspresję mRNA ets-1 w fibroblastach. Ets to rodzina istotnych czynników transkrypcyjnych dla angiogenezy i waskulogenezy. Przedstawiciele rodziny ets odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na różne sygnały rozwojowe i mitogenne [69, 70].

Wydaje się, że angiogenna aktywność HGF w dużej mierze zależy od szlaku ets, ponieważ rodzina ets aktywuje transkrypcję genów dla proteaz degradujących macierz zewnątrzkomórkową (kolagenaza 1, stromelizyna, uPA), a sam HGF pobudza aktywność ets i białka ets-1 w zawale serca. Prawdopodobnie aktywacja ets może regulować zarówno angiogenną, jak i antyzwłóknieniową aktywność HGF [69, 71].

Eksperymenty *in vivo* dowodzą, że transfekcja genu HGF do mięśnia sercowego chomików z wrodzoną kardiomiopatią stymuluje przepływ krwi poprzez wywoływanie angiogenezy i redukcję zwłóknienia. Wykazano, że lokalne stężenie endogennego HGF w mięśniu sercowym u chorych chomików jest zmniejszone w porównaniu ze stężeniem u osobników zdrowych. Może to być spowodowane działaniem supresyjnym na produkcję HGF, które wykazuje angiotensyna II i TGFb [69, 72].

W opisywanym doświadczeniu nie udało się dowieść wpływu transferu genu HGF na dysfunkcję serca, ponieważ w tym stadium choroby (20-miesięczne chomiki z kardiomiopatią) nie można jej jeszcze obserwować, być może uda się to w przyszłości w badaniach przeprowadzonych wśród starszych zwierząt [69].

Kardioprotekcja i angiogeneza terapeutyczna bez użycia cytokin

Przeszczepianie śródbłonkowych komórek progenitorowych (EPCs)

Ilość komórek śródbłonka zdolnych do odpowiedzi na podane cytokiny angiogenne może ograniczać efektywność terapeutycznej angiogenezy. Dlatego też zwiększanie reaktywności komórek śródbłonka i zwiększanie produkcji bądź dostępności śródbłonkowych komórek progenitorowych (EPCs, *endothelial progenitor cells*) stanowią racjo-

nalne sposoby terapeutycznej angiogenezy [73–76]. Strategia podawania powiększonej populacji komórek progenitorowych śródbłonna wyizolowanych z krwi pacjenta wydaje się obiecująca. Śródbłonkowe komórki progenitorowe w niedokrwionym mięśniu sercowym różnicują się w dojrzałe komórki śródbłonna. Po użyciu tej metody w niedokrwionym mięśniu sercowym szcztura następuje poprawa neowaskularyzacji, zachowanie czynności lewej komory oraz zahamowanie włóknienia mięśnia sercowego [77–79].

Opracowano metodę, dzięki której zostały pokonane podstawowe przeszkody w przeszczepianiu EPCs pacjentom. Zredukowano liczbę EPCs dzięki dostarczaniu ich bezpośrednio do niedokrwionego mięśnia sercowego, jednocześnie po raz pierwszy udowodniono skuteczność autologicznego przeszczepu EPCs [79]. Wcześniej podawano ludzkie EPCs zwierzętom z deficytem immunologicznym, aby zapobiec odrzucaniu przeszczepu [78, 80]. U świń, u których wykonano przezskórną transplantację EPCs do mięśnia sercowego za pomocą cewnika, uzyskano histopatologiczne, angiograficzne i funkcjonalne dowody zwiększonej angiogenezy w niedokrwionym mięśniu sercowym [79].

Istnieją także sposoby zwiększenia efektywności działania EPCs. Wykazano, że transfer *ex vivo* mysiego VEGF164 zwiększa aktywność proliferacyjną Epos, a także adhezję i wbudowywanie się tych komórek w spoczynkową bądź aktywowaną pojedynczą warstwę komórek śródbłonkowych [81, 82]. Stwierdzono ponadto, że VEGF zwiększa liczbę krążących EPCs. Efekt ten udokumentowano u myszy i ludzi [83–85].

Prekondycjonowanie

Hipoksyczne prekondycjonowanie. Pojawiły się doniesienia, że hipoksyczne prekondycjonowanie stymuluje angiogenezę w mięśniu sercowym na drodze zależnej od aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [86].

W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że hipoksyczne prekondycjonowanie stymuluje angiogenezę w mięśniu sercowym w stopniu wystarczającym do zapewnienia znamiennej kardioprotekcji w modelu zawału serca przechodzącym w niewydolność serca poprzez znamienne większą gęstość włócnickową, perfuzję i rezerwę skurczową mięśnia sercowego [87].

Niedokrwienne prekondycjonowanie. Na zwierzęcym modelu zawału serca wykazano, że kinaza fosfokreatynowa (PKCepsilon) ulega translokacji do jądra komórkowego po 10 min niedokrwienia, wzrasta ekspresja mRNA VEGF, a rozmiar zawału zmniejsza się wraz ze wzrostem angiogenezy [88].

Udowodniono także skuteczność niedokrwionego prekondycjonowania u ludzi: Wykazano, że 24 godziny po indukowanym ćwiczeniami niedokrwieniu mięśnia sercowego występuje u człowieka zwiększona tolerancja późniejszego niedokrwienia. Czas wystąpienia i stopień tej protekcji oraz jej niezależność od rekrutacji kolaterali odpowiada zjawisku późnego prekondycjonowania [89].

Statyny

Wykazano, że statyny promują aktywację serynowo/treoninowej kinazy proteinowej (Akt) w komórkach śródbłonna, co prowadzi do fosforylacji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) i wzrostu produkcji tlenu azotu. Wpływ statyn na angiogenezę jest dwufazowy: małe stężenia promują, duże — hamują angiogenezę. Małe stężenia statyn chronią komórki śródbłonna przed apoptozą, promują formowanie włócnickopodobnych struktur w żelu *matrix* (matrigel) na drodze zależnej od Akt. Duże dawki statyn są toksyczne [90, 91]. Statyny zwiększają mobilizację śródbłonkowych komórek progenitorowych (EPCs) ze szpiku do nowo wytworzonych naczyń krwionośnych na drodze zależnej od kinazy fosfatydyloinozytolowej i serynowo/treoninowej (PI3K/Akt), co sugeruje kolejny, zależny od Akt proangiogeny mechanizm działania statyn. Podobną mobilizację EPCs zaobserwowano także u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową [92–94].

Zwiększoną angiogenezę wykazano też u królików leczonych simwastatyną, również tutaj efekt ten uzyskano poprzez aktywację naczyniowej Akt [90].

Mimo działania proangiogenne nie ma dowodów klinicznych, że statyny zwiększają ryzyko wystąpienia nowotworów [95].

Potencjalne powikłania terapeutycznej angiogenezy

Podanie cytokin proangiogennych wiąże się z pojawieniem się wielu działań niepożądanych. Mechanizm wystąpienia i sposoby uniknięcia części z nich już poznano, ale czas obserwacji organizmów poddawanych terapeutycznej angiogenezie jest zbyt krótki, aby z całą pewnością stwierdzić, z jakimi jeszcze objawami ubocznymi terapii można się spotkać, a jakich udało się uniknąć.

Najlepiej znane są działania niepożądane wywołane przez białka proangiogenne związane z ich działaniem ogólnoustrojowym:

— użycie białka FGF może wywoływać proteinurię, anemię i trombocytopenię [96, 97];

- parenteralne podanie białka VEGF lub FGF-2 może wywołać spadek ciśnienia tętniczego z powodu wzmoczonej produkcji syntazy tlenu azotu; powikłanie to nie zostało opisane w przedklinicznych ani klinicznych badaniach nad transferem genu [15, 97, 98];
- tworzenie naczynek stwierdzone po podawanych zbyt długo lub lokalnie nadmiernych dawkach VEGF u myszy i szczurów; zjawiska tego nie obserwowano u ludzi [15, 60, 99];
- istnieje też grupa takich działań niepożądanych, których wystąpienie jest potencjalnie możliwe i dyskutowane ze względu na niejednoznaczne wyniki badań lub zbyt krótki czas obserwacji. Przykładem może być przyspieszenie procesu miażdżycowego lub aktywacja procesu nowotworowego.

W naczyniu z uszkodzonym funkcjonalnie śródbłonkiem z komórek obecnych w błonie wewnętrznej naczynia (intymie) tworzy się nowa błona wewnętrzna (neointima). Większość badaczy uważa, że są to uaktywnione komórki mięśni gładkich naczyń, migrujące z błony środkowej i proliferujące w błonie wewnętrznej. Uważa się, że proces ten jest aktywowany wieloma czynnikami i że przypomina w przebiegu spaczony (w wyniku upośledzenia funkcji lub braku śródbłonka) proces angiogenezy [100, 101].

Pojawiło się więc podejrzenie, że innym potencjalnym powikłaniem jest postępujące zagęszczanie uszkodzonej błony wewnętrznej z powodu wpływu podawanych czynników angiogennych na naczynia naczyń, a mitogenne działanie czynników wzrostu może przyspieszyć ekspansję lub destabilizację blaszki miażdżycowej [102, 103]. Nie jest to jednak jedyny pogląd na ten temat. Inni badacze donoszą o skutkach wprost przeciwnych, a więc o redukcji zagęszczenia błony wewnętrznej poprzez przyspieszenie nadpełzania komórek śródbłonka [104, 105].

Wobec wymienionych powyżej działań niepożądanych pojawiających się w przypadku podania białek proangiogennych na uwagę zasługują najnowsze badania kliniczne, takie jak *Euroinject* czy kolejne badania serii AGENT (*Angiogenic GENE Therapy*), wykazujące bezpieczeństwo proangiogennej terapii genowej w stabilnej chorobie wieńcowej [106–108].

Streszczenie

Nowoczesna eksperymentalna strategia leczenia niedokrwienia mięśnia sercowego polega na wywoływaniu neowaskularyzacji przy użyciu mediatorów indukujących angiogenezę. Najczęściej stosowanymi czynnikami angiogennymi są: naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF),

Bezpieczeństwa tego nie należy jednak traktować jako ostatecznie udowodnionego — niezbędna jest dalsza obserwacja odległych efektów terapii, zwłaszcza w przypadku pojawienia się ewidentnych dowodów na usprawnienie angiogenezy w badanej grupie.

Szczególną ostrożność należy zachować ze względu na potencjalne ryzyko aktywacji procesu nowotworowego, w którym angiogeneza odgrywa kluczową rolę (nie jest bowiem możliwy rozwój guza bez aktywacji angiogenezy). Co prawda, dotychczas nie posiadamy danych z badań *in vitro* bądź *in vivo* wskazujących, że metody terapeutycznej angiogenezy zwiększają ryzyko wzrostu nowotworowego bądź przerzutów, ale do wyjaśnienia tego problemu konieczne jest przeprowadzenie badań klinicznych o dłuższym okresie obserwacji [15].

Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy, nie można jednoznacznie powiedzieć, że terapia angiogennymi czynnikami wzrostowymi nie będzie wywoływała efektów niepożądanych pod postacią przyspieszenia procesów miażdżycowych lub destabilizacji blaszki miażdżycowej, aktywacji procesów nowotworowych bądź przyspieszenia retinopatii. Pomimo tych wątpliwości wyniki takich badań, jak *Euroinject* i AGENT stwarzają podstawę do dalszych badań klinicznych, a pozytywne tendencje obserwowane w badanych grupach dają nadzieję na zastosowanie terapii angiogennej w praktyce klinicznej, jako uzupełniającej metody leczenia pacjentów z chorobą niedokrwinną serca.

Wydaje się, że stwierdzenie jedynie tendencji do poprawy w tych i innych badaniach z zastosowaniem tylko jednego czynnika proangiogenego potwierdza przypuszczenie, że zastosowanie kliniczne powinny znaleźć raczej nie pojedyncze cytokiny, ale połączenia różnych czynników proangiogennych z dodatkowym zastosowaniem bodźców zwiększających ich regionalną ekspresję i biodostępność oraz stymulacja angiogenezy bez użycia cytokin.

Taki rodzaj terapii może w przyszłości zapewnić stymulację angiogenezy i ochronę kardiomiocytów przed apoptozą na poziomie pozwalającym skutecznie zwalczać chorobę niedokrwinną serca.

Niezbędne są więc dalsze badania w celu ustalenia optymalnych dawek, dróg podania i kombinacji czynników wzrostowych, służących terapeutycznej angiogenezie oraz obserwacji jej odległych skutków.

fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF), insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF), płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF) i hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF). Podaje się je dożylnie bądź miejscowo do mięśnia sercowego, do osierdza, do naczyń wieńcowych, śródprydatkowo oraz okołonaczyńniowo. Cytokiny angiogenne stosuje się także w postaci transferu genów za pośrednictwem adenowirusów, podawania nagiego DNA bądź mioblastów produkujących czynniki wzrostowe. Ostatnio dużo miejsca poświęca się zagadnieniom kardioprotekcji i angiogenezy terapeutycznej bez użycia cytokin, za pośrednictwem przeszczepiania śródbłonkowych komórek progenitorowych oraz wykorzystania hipoksyicznego oraz niedokrwiennego prekondycjonowania. (Folia Cardiol. 2005; 12: 713–725)

angiogeneza, kardioprotekcja, prekondycjonowanie, terapia genowa, VEGF, FGF, IGF, PDGF, HGF, śródbłonkowe komórki progenitorowe

Piśmiennictwo

1. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R. i wsp. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370–374.
2. Mukherjee D., Bhatt D.L., Roe M.T., Patel V., Ellis S.G. Direct myocardial revascularization and angiogenesis — how many patients might be eligible? *Am. J. Cardiol.* 1999; 84: 598–600.
3. Rajanayagam M.A., Shou M., Thirumurti V. i wsp. Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 519–526.
4. Schumacher B., Pecher P., von Specht B.U., Stegmann Th. Induction of Neoangiogenesis in Ischemic Myocardium by Human Growth Factors First Clinical Results of a New Treatment of Coronary Heart Disease. *Circulation* 1998; 97: 645–650.
5. Kawasuji M., Nagamine H., Ikeda M. i wsp. Therapeutic angiogenesis with intramyocardial administration of basic fibroblast growth factor. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 1155–1161.
6. Hughes C.G., Biswas S.S., Yin B. i wsp. Intramyocardial but not intravenous vascular endothelial growth factor improves regional perfusion in hibernating porcine myocardium. *Circulation* 1999; 100: I–476.
7. Rajanayagam M.A., Shou M., Thirumuri V. i wsp. Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 512–526.
8. Sato K., Wu T., Lacham R.J. i wsp. Efficacy of intracoronary versus intravenous FGF-2 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 70: 2113–2118.
9. Lopcz J.J., Laham R.J., Stamler A. i wsp. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc. Res.* 1998; 40: 272–281.
10. von Degenfeld G., Raake P., Kupatt Ch. i wsp. Selective pressure — regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 1120–1128.
11. Laham R.J., Sellke F.W., Ware J.A., Pearlman J.D., Edelman E.R., Simons M. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of local perivascular basic fibroblasts growth factor (bFGF) treatment in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 33 (supl. A): 383A (streszczenie).
12. Lazarous D.F., Scheinowitz M., Shou M. i wsp. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 1995; 91: 145–153.
13. Lazarous D.F., Shou M., Scheinowitz M. i wsp. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 1996; 94: 1074–1082.
14. Freedman S.B., Isner J.M. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann. Intern. Med.* 2002; 136: 54–71.
15. Lazarous D.F., Shou M., Stiber J.A. i wsp. Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 1999; 44: 294–302.
16. Lazarous D.F., Shou M., Stiber J.A. i wsp. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc. Res.* 1997; 36: 78–85.
17. Vale P.R., Milliken C.E., Tkebuchava T. i wsp. Catheter-based gene transfer of VEGF utilizing electro-mechanical LV mapping accomplishes therapeutic angiogenesis: pre-clinical studies in swine. *Circulation* 1999; 100: I–512.
18. Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E. i wsp. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheterbased myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 2138–2143.

19. Kornowski R., Fuchs S., Vodovotz Y. i wsp. Catheter-based transendocardial injection of adenoviral VEGF121 offers equivalent gene delivery and protein expression compared to a surgical-based transepical injection approach. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 73A.
20. Lopez J.J., Laham R.J., Stamler A. i wsp. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc. Res.* 1998; 40: 272–281.
21. Harada K., Friedman M., Lopez J.J. i wsp. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: H1791–H1802.
22. Wolff J.A., Ludtke J.J., Acsadi G., Williams P., Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1: 363–369.
23. Tsurumi Y., Takeshita S., Chen D. i wsp. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281–3290.
24. Hariawala Horowitz J.R., Esakof D., Sheriff D.D. i wsp. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J. Surg. Res.* 1996; 63: 77–82.
25. Banai S., Jaklitsch M.T., Shou M. i wsp. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183–2189.
26. Tio R.A., Tkebuchava T., Scheuermann T.H. i wsp. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10: 2953–2960.
27. Vale P.R., Tkebuchava T., Milliken C.E., Chen D., Symes J.F., Isner J.M. Percutaneous electromechanical mapping demonstrates efficacy of pVGL1 (VEGF2) in an animal model of chronic myocardial ischemia. *Circulation* 1999; 100: I-22.
28. Mack C.A., Patel S.R., Schwarz E.A. i wsp. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998; 115: 168–176.
29. Lee L.Y., Patel S.R., Hackett N.R. i wsp. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 14–23.
30. Harada K., Grossman W., Friedman M. i wsp. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 623–630.
31. Laham R.J., Rezaee M., Post M. i wsp. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 292: 795–802.
32. Tabata H., Silver M., Isner J.M. Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis in vivo: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc. Res.* 1997; 35: 470–479.
33. Schumacher B., Pecher P., von Specht B.U., Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; 97: 645–650.
34. Schumacher B., Stegmann T., Pecher P. The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor FGF: first clinical results. *J. Cardiovasc. Surg.* 1998; 39: 783–789.
35. Stegmann T.J., Hoppert T., Schlurmann W., Gemeinhardt S. First angiogenic treatment of coronary heart disease by FGF-1: long-term results after 3 years. *Cardiac and Vascular Regeneration* 2000; 1: 5–10.
36. Sellke F.W., Laham R.J., Edelman E.R., Pearlman J.D., Simons M. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 65: 1540–1544.
37. Laham R.J., Sellke F.W., Edelman E.R. i wsp. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 1865–1871.
38. Hendel R.C., Henry T.D., Rocha-Singh K. i wsp. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 2000; 101: 118–121.
39. Henry T.D., Abraham J.A. Review of preclinical and clinical results with vascular endothelial growth factors for therapeutic angiogenesis. *Curr. Interv. Cardiol. Rep.* 2000; 2: 228–241.
40. Henry T.D., Rocha-Singh K., Isner J.M. i wsp. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) to patients with coronary artery disease. *Am. Heart J.* 2001; 142: 872–880.
41. Udelson J.E., Dilsizian V., Laham R.J. i wsp. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1605–1610.
42. Laham R.J., Chronos N.A., Leimbach M. i wsp. Results of a phase 1 open label dose escalation study of intracoronary and intravenous basic fibroblast growth factor (rFGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: 6 months follow-up. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 73A.
43. Laham R.J., Chronos N.A., Pike M. i wsp. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of

- a phase I open-label dose escalation study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 2132–2139.
44. Ferguson J.J. Meeting highlights. Highlights of the 48th scientific sessions of the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 570–575.
 45. Henry T.D., McKendall G.R., Azrin M.A. i wsp. VIVA trial: one year follow up. *Circulation* 2000; 102: II–309.
 46. Kleiman N.S., Califf R.M. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *American College of Cardiology. J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 310–325.
 47. Laham R.J., Rezaee M., Garcia L. i wsp. Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intrapericardial and intramyocardial ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor (bFGF) favor intramyocardial delivery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 10A.
 48. Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R. i wsp. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100: 468–474.
 49. Grines C.L. Adenovirus FGF angiogenic gene therapy (AGENT) trial for stable angina. Late-Breaking Clinical Trial, American College of Cardiology, 50th Annual Scientific Sessions, 18–21.03. 2001.
 50. Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E. i wsp. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000; 102: 965–974.
 51. Symes J.F., Losordo D.W., Vale P.R. i wsp. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann. Thorac. Surg.* 1999; 68: 830–836.
 52. Vale P.R., Milliken C.E., Fortuin F.D. i wsp. Effective gene transfer of phVEGF-2 for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia as assessed by NOGA left ventricular electromechanical mapping. *Circulation* 2000; 102: II-689.
 53. Hendel R.C., Vale P.R., Losordo D.W. i wsp. The effects of VEGF-2 gene therapy on rest and stress myocardial perfusion: results of serial SPECT imaging. *Circulation* 2000; 102: II–769.
 54. Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E. i wsp. Randomized, placebo-controlled clinical study of percutaneous catheterbased left ventricular endocardial gene transfer of VEGF-2 for myocardial angiogenesis in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000; 102: II-563.
 55. Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E. i wsp. Phase I placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor-2 (VEGF-2) gene transfer utilizing catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 104: II-253.
 56. Hiraoka K., Koike H., Yamamoto S. i wsp. Enhanced therapeutic angiogenesis by cotransfection of prostacyclin synthase gene or optimization of intramuscular injection of naked plasmid DNA. *Circulation* 2003; 108: 2689–2696.
 57. Schratzberger P. i wsp. Ultrasound enhances therapeutic gene expression in ischemic pig myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37: 266A.
 58. Suzuki K., Murtuza B., Smolenski R.T. i wsp. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation* 2001; 104 (12 Supl. 1): I207–I212.
 59. Ziche M., Morbidelli L., Choudhuri R. i wsp. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 2625–2634.
 60. Lee R.J., Springer M.L., Blanco-Bose W.E. i wsp. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898–901.
 61. Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R. i wsp. Angiogenesis gene therapy: phase I assesment of direct intramyocardial administration of adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100: 468–474.
 62. Buehler A., Martire A., Strohm C. i wsp. Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice *Cardiovasc. Res.* 2002; 55: 768–777.
 63. Su E.J., Cioffi C.L., Stefansson S. i wsp. Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis enhances neovascularization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284: H1429–H1440.
 64. Kotlyar A.A., Vered Z., Goldberg I. i wsp. Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine. *Heart* 2001; 86: 693–700.
 65. Donath M.Y., Jenni R., Brunner H.P. i wsp. Cardiovascular and metabolic effects of insulin-like growth factor I at rest and during exercise in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81: 4089–4094.
 66. Donath M.Y., Sutsch G., Yan X.W. i wsp. Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 3177–3183.
 67. Edelberg J.M., Aird W.C., Wu W. i wsp. PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 837–843.
 68. Edelberg J.M., Lee S.H., Kaur M. i wsp. Platelet-derived growth factor-AB limits the extent of myocardial infarction in a rat model: feasibility of restoring impaired angiogenic capacity in the aging heart. *Circulation* 2002; 105: 608–613.
 69. Taniyama Y., Morishita R., Aoki M. i wsp. Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy. *Hypertension* 2002; 40: 47–53.
 70. Sato Y. Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell. Struct. Funct.* 2001; 26: 19–24.

71. Alpert N.R., Mulieri L.A., Hasenfuss G., Holubarsch C. Myocyte reorganization in hypertrophied and failing hearts. *Eur. Heart J.* 1995; 16: C2–C7.
72. Nakano N., Morishita R., Moriguchi A. i wsp. Negative regulation of local hepatocyte growth factor (HGF) expression by angiotensin II and transforming growth factor- β in blood vessels: potential role of HGF in cardiovascular disease. *Hypertension* 1998; 32: 444–451.
73. Isner J.M. Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 615–619.
74. Rivard A., Fabre J.E., Silver M. i wsp. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999; 99: 111–120.
75. Isner J.M., Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 1231–1236.
76. Asahara T., Kalka C., Isner J.M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* 2000; 7: 451–457.
77. Kalka C., Masuda H., Takahashi T. i wsp. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 3422–3427.
78. Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H. i wsp. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634–637.
79. Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J.I. i wsp. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461–468.
80. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J. i wsp. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 2001; 7: 430–436.
81. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. i wsp. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967.
82. Asahara T. i wsp. Gene therapy of endothelial progenitor cell for vascular development in severe ischemic disease. *Circulation* 1999; 100: I–481
83. Kalka C., Masuda H., Takahashi T. i wsp. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ. Res.* 2000; 86: 1198–1202.
84. Asahara T., Takahashi T., Masuda H. i wsp. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18: 3964–3972.
85. Kalka C., Tehrani H., Lundenberg B. i wsp. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 70: 829–834.
86. Sasaki H., Ray P.S., Zhu L. i wsp. Hypoxia/reoxygenation promotes myocardial angiogenesis via an NF kappa B-dependent mechanism in a rat model of chronic myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001; 33: 283–294.
87. Sasaki H., Fukuda S., Otani H. i wsp. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2002; 34 (3): 335–348.
88. Kawata H., Yoshida K., Kawamoto A. i wsp. Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium. *Circ. Res.* 2001; 88 (7): 696–704.
89. Lambiase P.D., Edwards R.J., Cusack M.R., Bucknall C.A., Redwood S.R., Marber M.S. Exercise-induced ischemia initiates the second window of protection in humans independent of collateral recruitment. *J. Am. Coll Cardiol.* 2003; 41: 1174–1182.
90. Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I. i wsp. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 2000; 6: 1004–1010.
91. Weis M., Heeschen C., Glassford A.J., Cooke J.P. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002; 105: 739–745.
92. Dimmeler S., Aicher A., Vasa M. i wsp. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 2001; 108: 391–397.
93. Llevadot J., Murasawa S., Kureishi Y. i wsp. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 2001; 108: 399–405.
94. Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., Aicher A., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885–2890.
95. Davidson M.H. Safety profiles for the HMG-CoA reductase inhibitors: treatment and trust. *Drugs* 2001; 61: 197–206.
96. Cooper L.T., Hirsch A.T., Regensteines J.G., Casscells S.W. A double-blind, placebo-controlled, phase II study of basic fibroblast growth factor in the treatment of intermittent claudication. *Circulation* 2000; 102: II-373.
97. Unger E.F., Goncalves L., Epstein S.E. i wsp. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 2000; 85: 1414–1419.
98. Murohara T., Asahara T., Silver M. i wsp. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2567–2578.
99. Schwarz E.R., Speakman M.T., Patterson M. i wsp. Evaluation of the effects of intramyocardial injection

- of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat—angiogenesis and angioma formation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 1323–1330.
100. Schwartz S.M. Perspective series: Cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 2814.
 101. deRuiter M.C., Pocimann R.E., van Munsteren J.C. i wsp. Embryonic endothelial cell transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ. Res.* 1997; 80: 444.
 102. Moulton K.S., Heller E., Konerding M.A., Flynn E., Palinski W., Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99: 1726–1732.
 103. Inoue M., Itoh H., Ueda M. i wsp. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98: 2108–2116.
 104. Van Belle E., Tio F.O., Chen D. i wsp. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of ph-VEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29: 1371–1379.
 105. Hiltunen M.O., Laitinen M., Turunen M.P. i wsp. Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation* 2000; 102: 2262–2268.
 106. Kastrup J., Jorgensen E., Ruck A. i wsp. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris. A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 45 (7): 982–988.
 107. Grines C.L., Watkins M.W., Helmer G. i wsp. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) Trial in Patients with Stable Angina Pectoris. *Circulation* 2002; 105: 1291–1297.
 108. Grines C.L., Watkins M.W., Mahmarian J.J. i wsp. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 1339–1347.

