

The significance of vascular endothelial growth factor in the neoangiogenesis process. The role of hypoxia in the endothelial cells proliferation process and in the formation of collateral circulation

Naczyniowy czynnik wzrostu w procesie stymulacji neoangiogenezy. Rola hipoksji w procesie rozrostu komórek endotelialnych i powstawaniu krążenia obocznego

Robert M. Proczka¹, Jerzy A. Polański¹, Maciej Małecki², Krzysztof Wikieł¹

¹ Second Department of Surgery of the Second Faculty of Medicine, Medical University Warsaw, Poland (II Katedra i Klinika Chirurgii II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie)

² Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Warsaw, Poland (Zakład Biologii Komórki Centrum Onkologii w Warszawie)

Abstract

The formation of new vessels is a complex problem. In this process the key role is played by the vascular-endothelial growth factor (VEGF). It is secreted, among others, by macrophages and endothelial cells. Genes for VEGF are located on the sixth chromosome. Hypoxia is a mandatory signal for the start of the angiogenesis process. Activated through hypoxia, HIF proteins move to the cells nucleus and regulate expression of vascular-endothelial growth factor. VEGF through its receptors on endothelial cells leads to the proliferation of new vessels.

Key words: vascular endothelial growth factor, Ischaemia, VEGF-receptors

Streszczenie

Powstawanie nowych naczyń jest zagadnieniem złożonym, w którym kluczową rolę pełni naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Wydzielany między innymi przez makrofagi i komórki śródbłonka jest niezbędny do uruchomienia procesów angiogenezy. Informacja genetyczna dla tej cytokiny znajduje się w chromosomie szóstym. Sygnałem do rozpoczęcia rozrostu naczyń jest niedotlenienie tkanek. Uaktywnione w wyniku hipoksji białka pomocnicze HIF przemieszczają się do jądra komórkowego i regulują ekspresję genów dla VEGF. Wytworzony przez komórki naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu poprzez pobudzenie receptorów na komórkach śródbłonka doprowadza do ich proliferacji i powstawania nowych naczyń.

Słowa kluczowe: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, niedokrwienie, receptory dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu, VEGF

Coronary artery occlusive disease and lower extremity ischemia are now considered civilization diseases, a problem that is still growing in size. This is likely due to the eating habits, lack of proper physical activity,

Chorobę niedokrwinną serca oraz niedokrwienie kończyn dolnych obecnie uważa się za choroby cywilizacyjne przy czym problem ten stale narasta. Wiąże się to ze sposobem odżywiania, brakiem wystarczającej ilo-

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Robert M. Proczka

ul. Tęczowa 7, 05–075 Warszawa-Wesoła

high prevalence of arterial hypertension, and the addiction to cigarettes. Epidemic studies conducted in the United States have shown that the frequency of lower extremity ischemia due to atherosclerosis occurs in 16% of the population over the age 55 (the diagnostic criterium was ABI below 0.9) [1]. In Poland each year about 30 thousand patients visit their doctors with the symptoms of lower limb ischemia. Out of these patients about 10% needs an amputation of the affected limb [2].

The treatment of the lower extremity ischemia is a difficult task. In case of single artery stenosis surgical treatment brings the best results, either through bypasses or endarterectomy. In the recent years transcatheter angioplasty methods have also played a larger role in the treatment of this disease. When more than one artery is occluded, or even worse, when the smaller caliber vessels are involved surgical treatment is often impossible. Pharmaceutical treatment with vasodilating drugs or those that improve the plasticity of blood cells unfortunately does not bring the expected results in patients with more advanced disease. Even intrarterial, or as preferred by other authors intravenous injections of the prostaglandin PGE₁ (in Poland Prostavasin and Iloprost have been used) have not met the expectations too. Non-surgical treatment, however, does slow down the disease process allowing the possibility of collateral circulation development. In case of full patient's compliance and regular physical activity, through rehabilitation the claudication distance can be increased of 122% [1].

The mechanism of formation of new vessels is a complex problem. It seems that the key role in this process is played by the vascular endothelial growth factor (VEGF) [3, 4]. It is a part of a group of angiogenic growth factors, and it is a specific mitogen for endothelial cells. It is secreted by macrophages, endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, and neoplastic cells [5, 6]. Wartiovaara et al [7] have reported increase of production of VEGF during platelets activation, as well as the possibility of storage and release of VEGF by thrombocytes [8]. The increase vessels permeability induced by VEGF (about 50 000 times greater than that by histamine) was the reason why VEGF was called the vascular permeability factor at first. VEGF also induces the release of Von Willebrand's factor, type I plasminogen activating factor, and urokinase activation factor. Vascular endothelial growth factor has also a chemotactic function, especially for macrophages [10].

Genetic code for VEGF consists of 8 exons. It is located on the short arm of the sixth chromosome. The first exon for the VEGF gene codes the sequence responsible for secretion of the cytokin. Through the process of alternative splicing of mRNA four forms of

ści ruchu, nadciśnieniem tętniczym oraz z paleniem tytoniu. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych wykazano, że niedokrwienie kończyn dolnych na tle miażdżycy występuje u 16% populacji powyżej 55 roku życia (za kryterium przyjęto wskaźnik kostkowo-ramienny poniżej 0,9) [1]. W Polsce około 30 000 rocznie pacjentów zgłasza się po raz pierwszy do lekarza z objawami niedokrwienia kończyn dolnych, a spośród nich u około 10% konieczna jest amputacja kończyny [2].

Leczenie choroby niedokrwiennej kończyn dolnych jest bardzo trudne. W przypadku pojedynczych zwężeń naczyń dobre wyniki przynosi leczenie chirurgiczne (pomostowanie lub udrażnianie naczyń). Ostatnio istotną rolę zaczęły odgrywać metody przezskórnej plastyki naczyniowej. Gdy zmiany są rozsiane lub — co gorsze — dotyczą także małych naczyń, leczenie chirurgiczne często jest niemożliwe. Próby leczenia farmakologicznego preparatami naczyniorozszerzającymi lub/i poprawiającymi plastyczność ściany krwinek niestety nie przynoszą spodziewanych efektów u pacjentów z zaawansowaną chorobą niedokrwinną serca. Również dotętnicze lub preferowane przez innych autorów dożylnie wlewy prostaglandyn PGE₁ (preparaty stosowane w Polsce to Prostavasin i Iloprost) okazały się niewystraszające. Leczenie zachowawcze spowalnia jednak postęp choroby, umożliwiając wytworzenie krążenia obocznego. W przypadku pełnej współpracy z pacjentem, jeśli podejmuje on systematyczny wysiłek fizyczny, wykazano, że dzięki rehabilitacji dystans chromania wydłużył się o 122% [1].

Mechanizm powstawania nowych naczyń jest zagadnieniem złożonym, w którym prawdopodobnie kluczową rolę pełni naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) [3, 4]. Należy on do grupy angiogennych czynników wzrostowych i jest specyficznym mitogenem dla komórek śródbłonka. Jest wydzielany przez makrofagi, komórki śródbłonka naczyniowego, komórki mięśni gładkich naczyń, fibroblasty oraz komórki nowotworowe [5, 6]. Wartiovaara i wsp. [7] odnotowali wzmożoną produkcję VEGF w miejscu aktywacji płytek oraz możliwość magazynowania i uwalniania VEGF przez płytki krwi [8]. Zwiększenie przepuszczalności naczyń indukowane przez VEGF (ok. 50 000 razy większe w porównaniu z histaminą) sprawiło, że początkowo nazywano go czynnikiem przepuszczalności naczyń (VPF, *vascular permeability factor*) [9]. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu wywołuje również uwalnianie czynnika von Willebranda i aktywatora plazminogenu typu tkankowego oraz urokinazowego, a także działa chemotaktycznie na makrofagi [10].

Informacja genetyczna dla VEGF w postaci 8 eksonów zlokalizowana jest na ramieniu krótkim chromo-

this regulatory protein formed. They consist of 121, 165, 189, 206 amino acids. The biologic importance of expression most isoforms hasn't been discovered yet. It is assumed that VEGF 165 is the most common product of the VEGF gene and has the highest biologic activity [11]. VEGF 121 and VEGF 165 are mainly secreted outside the cells, where they are found in an unconjugated form. The isoforms 189 and 206 are combined with heparan sulfate inside the cell. They do not probably play any role in neoangiogenesis [5, 12]. The authors underline, though, that all forms are very active in the process of increasing vessel permeability. An additional form VEGF 145 has been identified in the human endometrium. The biologic function of this substance has not been identified yet. All these isoforms are the product of the VEGF-A gene. The additional types are: VEGF-B, C, D, E. Isoform C is also important in the angiogenesis. It is responsible for regulation of limfangiogenesis.

Hypoxia is a mandatory signal for the start of the angiogenesis process and the expression of the gene which codes VEGF. This brings about the transcription of special substances known as the hypoxia induced factors such as HIF-1 α , HIF-1 β , HIF 2 α [14, 15]. Activated through hypoxia HIF proteins move to the cell nucleus, where they take part in formation of regulatory complexes of the expression of VEGF. These complexes consist of the HIF and the HRE (hypoxia response element located on the 5' region of the VEGF coding gene). Through the HIF activation hypoxia also increases the stability of the VEGF mRNA through an increase in its halftime [16]. It is highly probable that hypoxia also leads to production of VEGF not only directly through activation of the VEGF gene, but also inducing the transcription of gene which codes COX-2 and increases the concentration of prostoglandins. This in effect increases the expression of VEGF in fibroblasts [17]. Kappel et al [18] has proven the positive effect of HIF-2 α on the transcription of VEGFR-2 (explanation of importance of this fact further in the text) Vincent et al [19] noticed the influence of this protein also on the IGF-2 and erythropoetin.

Hypoxia is also responsible for the synthesis of other growth factors such as basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet derived growth factor (PDGF), placenta growth factor (PIGF). It also indirectly causes the synthesis of Nitric oxide (NO) [20, 21]. The increase in expression of the VEGF caused by these cytokins underlines the key role of vascular endothelial growth factor in the process of vessel formation.

Endothelial cells are the main, but not the only effector cells for VEGF. They have three kinds of recep-

toru 6. Pierwszy ekson genu dla VEGF zawiera sekwencję sekrecyjną pozwalającą na naturalne wydzielanie tej cytokiny. Na drodze alternatywnego składowania (*alternative splicing*) mRNA powstają cztery formy tego białka regulatorowego. Zbudowane są one ze 121, 165, 189 lub z 206 aminokwasów. Dotychczas całkowicie nie poznano biologicznego znaczenia ekspresji różnych izoform VEGF. Uważa się, że produkt genu VEGF — VEGF 165 występuje najpowszechniej i posiada największą aktywność biologiczną [11]. Czynniki VEGF121 i VEGF165 w większości wydzielane są poza obręb komórki, gdzie pozostają w postaci niezwiązanej, natomiast izoformy 189 i 206 w przestrzeni komórkowej ulegają wiązaniu z siarczanem heparanu i najprawdopodobniej nie pełnią najważniejszej roli w neoangiogenezie [5, 12]. Jednocześnie autorzy podkreślają, że wszystkie cztery izoformy charakteryzują się wysoką aktywnością jako czynniki przepuszczalności naczyń. Dodatkową izoformę — VEGF 145 zidentyfikowano w endometrium ludzkim, jednak jeszcze dokładnie nie ustalono jej aktywności biologicznej. Wszystkie powyższe izoformy są kodowane przez gen VEGF-A. Należy wspomnieć także o dodatkowych rodzajach VEGF; B, C, D, E. Z punktu widzenia angiogenezy ważna jest izoforma C, która jest odpowiedzialna za regulację procesów limfangiogenezy.

Niezbędnym sygnałem do rozpoczęcia procesów angiogenezy, a tym samym do ekspresji genu kodującego VEGF jest niedotlenienie tkanek [13]. Pod jego wpływem dochodzi do wytworzenia transkrypcyjnych czynników indukowanych przez hipoksję, takich jak HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α (*hipoxia-inducible transcription factor*) [14, 15]. Uaktywnione w wyniku hipoksji białka HIF przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie uczestniczą w tworzeniu kompleksów regulujących ekspresję genów VEGF. Kompleksy te to połączony HIF z elementem odpowiedzi na hipoksję HRE (*hipoxia response element*) znajdującym się w regionie 5' genu kodującego VEGF. Ponadto hipoksja poprzez aktywację białek HIF wpływa na zwiększenie stabilności VEGFmRNA poprzez wydłużenie jego czasu półtrwania [16]. Prawdopodobnie hipoksja powoduje produkcję VEGF nie tylko bezpośrednio przez aktywację genu kodującego VEGF, ale również poprzez indukcję transkrypcji genu COX-2 i wzrostu stężenia prostaglandyn, które z kolei zwiększają ekspresję VEGF w fibroblastach [17]. Kappel i wsp. [18] udowodnili również dodatni wpływ HIF-2 α na transkrypcję VEGFR-2 (patrz dalej), a Vincent i wsp. [19] zaobserwowali wpływ tego białka na IGF-2 oraz erythropoetynę.

Pod wpływem niedotlenienia następuje synteza także innych czynników wzrostu, takich jak bFGF (*basic fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), PIGF (*placenta growth factor*) oraz wtórnie do tlenu

tors for vascular endothelial growth factor: VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/flk, KDR and VEGFR-3/flt-4. These are examples of proteins that are tyrosine kinases. The combination of the ligand and the receptor activates the process of autophosphorylation, which uncovers the places of junction for intracellular enzymes and activates phospholipase C- γ . The next step is formation of secondary transmitters such as inositol triphosphate, and diacylglycerol. Diacylglycerol is in turn the main activator of the C protein kinase, which is responsible for the migration of endothelial cells and vessel permeability [22, 23].

The receptors flt-1 and flk are located mainly on blood vessel endothelial cells. On the other hand flt-4 are located mostly on endothelial cells of lymphatic vessels [24]. They take part in lymphoangiogenesis. Miao et al [25] have reported the existence of coreceptors which were parts of different classes of collapsins: neurophilin 1 and 2. The authors assume that the combination VEGF and neurophilin-1 causes increased bonding VEGF with the second type receptors. Neurophilin-2 inhibits this process, so the activity of VEGF depends on competitive bonding in the active places of the neutrophilins.

The next step in the process of angiogenesis is the response of endothelial cells to the binding of VEGF to the receptors. It is known that the first to be activated are VEGFR-2 receptors. This starts the process of endothelial cell proliferation. Up to this time the exact role of the VEGFR-1 has not been explained yet. Some authors believe that these receptors are inert decoy [21]. The others believe these receptors play a signaling and regulatory role. Bussolati et al [21] conducted an interesting experiment. They created a model of aorta endothelium cells. They consecutively blocked each of the VEGF receptors. They established that the stimulation of VEGFR-2 is necessary for the start of the response from the endothelial cells. It is interesting that the blockage of VEGFR-1 does not inhibit endothelial proliferation, but it causes its disorganization. It has been found that when the first type of receptors are blocked the elongation process of the tubes made up from proliferating endothelial cells occurred in a disordered way. The tube length decreased as the width increased. In this model the process of building connections between the capillaries was inhibited as well.

Nitric oxide (NO) is the compound which takes part in the cellular response to activation of the receptors of the first type. Synthesis of nitric oxide synthase-2 (NOS-2), stimulated by VEGF, and the release of NO is inhibited by the blockage of VEGFR-1. In turn VEGFR-1,

azotu (NO) [20, 21]. Powyższe cytokiny doprowadzają do wzmożonej ekspresji VEGF, co wskazuje na kluczową rolę VEGF w procesach tworzenia naczyń.

Głównymi (choć nie jedynymi) komórkami efektorowymi dla VEGF są komórki śródbłonna naczyń. Znajdują się na nich trzy rodzaje receptorów dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu: VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/flk/KDR oraz VEGFR-3/flt-4. Są to białka o aktywności kinazy tyrozynowej. Związanie liganda z receptorem wymusza proces jego autofosforylacji, co powoduje odsłonięcie miejsc połączeń dla wewnątrzkomórkowych enzymów i aktywacji fosfolipazy C- γ , która katalizuje rozkład fosfatydyloinozitolobisfosforanu (PIP2) do inozytolotrifosforanu (IP3) i diacyloglicerolu (DAG). Wtórne przekaźniki IP3 i DAG przekazują dalej sygnał w komórce: DAG bierze udział w aktywacji białkowej kinazy C, natomiast IP3 ułatwia uwalnianie jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej. Kinaza białkowa C jest odpowiedzialna m.in. za migrację komórek śródbłonna i przepuszczalność naczyń [22, 23].

Receptory flt-1 i flk występują przede wszystkim na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, natomiast flt-4 głównie w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych i biorą udział w limfangiogenezie [24]. Miao i wsp. [25], którzy stwierdzili występowanie koreceptorów należących do różnych klas kolapsyn: neurofiliny 1 i 2, przypuszczają, że po połączeniu VEGF z neurofiliną-1 następuje wzmożone wiązanie VEGF z receptorami typu drugiego. Neurofiliny-2 wpływają hamująco na powyższe procesy, więc aktywność VEGF zależy od kompetycyjnego łączenia w aktywnych miejscach neurofilin.

Kolejnym etapem w procesie angiogenezy jest odpowiedź komórek śródbłonna naczyń po połączeniu się VEGF z receptorami. Wiadomo, że na początku aktywowane są receptory VEGFR-2, które uruchamiają procesy proliferacji komórek endotelialnych. Dotychczas jednoznacznie nie określono roli receptorów typu pierwszego. Są badacze, którzy twierdzą, że VEGFR-1 są nieczynnymi dla procesów angiogenezy „pułapkami” [21], inni zaś uważają, że pełnią one rolę sygnalizacyjną i regulacyjną. Ciekawe badanie przeprowadzili Bussolati i wsp. [21]. Stworzyli oni model komórek aorty, w których blokowali kolejno poszczególne receptory. Autorzy ci ustalili, że aktywacja VEGFR-2 jest niezbędna do rozpoczęcia odpowiedzi komórek śródbłonna naczyniowego na VEGF. Wynikiem zablokowania VEGFR-1 nie jest brak odpowiedzi w postaci zablokowania proliferacji, lecz jej dezorganizacja. W tym przypadku stwierdzono zaburzenia elongacji rur tworzących się z proliferujących komórek śródbłonna, zaburzenia wytwarzania połączeń między kapilarami, zmniejszenie długości kapilar oraz wzrost ich grubości.

through NO, down-regulates the proliferation of endothelial cells formed by the activation of VEGFR-2, and simultaneously is responsible for their arrangement. The role of NO has been also proved in the reendothelialization of damaged artery [26]. L-arginin is the substrate for the production of NO. NOS-2 causes the break down of this amino acid into ceruline and nitric oxide. Some scientists like Schwarzacher et al. [27] have seen a positive effect of L-arginin supplementation on healing damaged endothelium. This can be explained by an increase of VEGF production caused by an increase in NO synthesis. Aside from the level of L-arginin, the level of lipids, especially LDL, influences VEGF synthesis. Through the blockage of NO synthesis, oxygenized low density lipoproteins (LDL) inhibit the migration of endothelial cells [28].

As it has been noted earlier, VEGF receptors are located mainly on endothelial cells. However, there is another group of cells, important in the angiogenesis process — the endothelial progenitor cells (EPCs), which have VEGFR-2. These bone marrow derived cells enter the blood stream, and are transported through the circulatory system to sites of ischemia [29]. The discovery of EPCs allowed scientists to prove that the process of angiogenesis is a two way process: from healthy vessels to the area of ischemia and the other way — from the area of ischemia to properly perfused tissues. EPCs at the site of ischemia differentiate into endothelial cells, and later quickly proliferate. This function can be debilitated by hiperglicemia, hipercholesterolemia, hiperhomocysteinemia, and the ageing of the organism [31, 32]. It has also been proven that VEGF has a direct effect on proliferating activity of the EPCs [30].

More knowledge about vascular endothelial growth factor allows to use this cytokin in clinical trials. Some authors through blockage try to inhibit proliferation of neoplastic cells, others want to treat ischemic disease of the heart and the lower limbs. In 1994 the Isner group proposed the use of VEGF in therapy of peripheral ischemic disease. Unfortunately direct administration of the protein was complicated by necessity of multiple injections, as well as difficulty in synthesis and standardization. Gene therapy, which in this case is direct administration of plasmid DNA into the muscles, seems to be a better strategy. The pioneers of this method are the Isner group (Harvard, Boston, USA) and the scientists from Karolinska Institute (Sweden). Intramuscular injection of the naked plasmid causes striated muscle cells to express a foreign gene, in this case for VEGF. It can be noticed that despite intermediate increase in VEGF levels in the whole circulatory system, the development of vessels occurs only at the sites of ischemia.

Związkiem pośredniczącym w odpowiedzi komórkowej na aktywację receptorów typu pierwszego jest NO. Stymulowana przez VEGF syntaza NOS-2 (*nitric oxide synthase-2*) i uwalnianie NO są hamowane blokowaniem VEGFR-1. Z kolei VEGFR-1 poprzez NO negatywnie reguluje proliferację komórek śródbłonka wytwarzanych za pośrednictwem aktywacji VEGFR-2, ale jednocześnie odpowiadają za uporządkowane ustawienie. Rolę NO udowodniono również w reendothelializacji zniszczonej tętnicy [26]. Substratem dla produkcji NO jest L-arginina, z której pod wpływem syntazy NO₂ powstaje cytrulina i NO. Schwarzacher i wsp. [27] spostrzegli korzystny wpływ suplementacji L-argininy na gojenie się uszkodzonego śródbłonka, co można wytłumaczyć zwiększoną produkcją VEGF spowodowaną zwiększoną syntezą NO. Oprócz stężenia L-argininy synteza VEGF zależy także od stężenia lipidów, a dokładniej LDL. Utleńowany LDL poprzez blokowanie syntezy NO hamuje migrację komórek śródbłonka [28].

Jak wspomniano, receptory dla VEGF posiadają przede wszystkim komórki śródbłonka. Inną grupą komórek ważną ze względu na angiogenezę, posiadającą na swojej powierzchni VEGFR-2, są endotelialne komórki progenitorowe (EPCs, *endothelial progenitor cells*). Te wywodzące się ze szpiku kostnego komórki przedostają się do krążenia, a następnie poprzez układ krwionośny — do ognisk niedokrwienia [29]. Odkrycie EPCs pozwoliło udowodnić, że procesy angiogenezy są ukierunkowane nie tylko na ognisko niedokrwienne, ale również od strony niedokrwienia do zdrowego naczynia. Endotelialne komórki progenitorowe, przebywając w ognisku niedokrwinnym, różnicują się do komórek śródbłonka, a następnie ulegają szybkiej proliferacji. Ta funkcja może jednak ulec upośledzeniu w warunkach hiperglikemii, hipercholesterolemii, hiperhomocysteinemii oraz wraz ze starzeniem się organizmu [31, 32]. Iwaguro i wsp. [30] udowodnili, że VEGF ma bezpośredni wpływ na aktywność proliferacyjną EPCs.

Dzięki coraz większej wiedzy, możliwe stało się przeprowadzenie próby wykorzystania naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu do celów terapeutycznych. Niektórzy autorzy poprzez jego blokadę próbują doprowadzać do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych, inni chcą leczyć za pomocą VEGF choroby niedokrwienne serca oraz kończyn dolnych. W 1994 roku Isner [33] zaproponował wykorzystanie VEGF w leczeniu niedokrwienia obwodowego. Jednak bezpośrednie podawanie białka łączyło się z wielokrotnymi iniekcjami oraz z trudnościami w syntezie i standardyzacji. Lepszą strategią angiogennej terapii wydaje się terapia genowa, czyli podawanie plazmidowego DNA bezpośrednio do mięśni. Pionierem tej metody jest grupa

The published results of gene therapy are promising [33]. There is unfortunately little knowledge about the side effects of this therapy. Some questions arose from the possibility of quick growth of latent and undiagnosed tumor at the time of therapy. It is unknown what would be the effect of gene therapy on the blood vessels of the retina, especially in patients with diabetes mellitus. In the authors' opinion gene therapy with the plasmid which codes vascular endothelial growth factor may be an alternative way of treatment of ischemia in the future, but nowadays to little is known about this method.

References

- Gardner AW, Thompson PD (2002) Ćwiczenia ruchowe w przewlekłym miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych. *Medycyna po Dyplomie*, 11: 2.
- Noszczyk W, Andziak P (1998) Przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych. *Chirurgia tętnic i żył obwodowych*. Rozdział 27.1
- Engler RL, Martin J (1999) Joint AHA/ESC symposium: Biorevascularization.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13: 18–32.
- Dulak J; Józkwicz A, Ratajska A, Szuba A, Cooke JP, Dembińska-Kieć A (2000) VEGF is efficiently synthesized in spite of low transfection efficiency of pSG5VEGF plasmids in vascular smooth muscle cells. *Vascular Medicine*, 5: 33–40.
- Dulak J, Józkwicz A, Dembińska-Kieć A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzińska-Grochot D, Florek I, Wójtowicz A, Szuba A, Cook JP (2000) Nitric oxide induces the synthesis of VEGF by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 659–666.
- Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H et al. (1998) Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemostas*, 80: 171–175.
- Weltermann A, Wolzt M, Petersmann K, Czerni C, Grasseli U, Lechner K et al. (1999) Large amounts of VEGF at the site of hemostatic plug formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 1757–1760.
- Senger DR, Connolly D, Van de Water, Feder L, Dvorak HF (1990) Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, 50: 1774–1778.
- Claffey KP, Brown LF, Del Aguila L, Tognazzi K, Yeo K, Manseau EJ, Dvorak HF (1996) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth. A angiogenesis and experimental metastasis. *Cancer Res*, 56: 172–1781.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266: 11947–11954.
- Ferrara N, Davis-Smith T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18: 4–25.
- Schaper W (1993) Coronary collateral development: concepts and hypotheses. In: Schaper W, Schaper J, eds. *Collateral Circulation*, 46.
- Semenza GL (1999) Perspectives on oxygen sensing. *Cell*, 98: 281–284.
- Namiki A, Brogi E et al. (1995) Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem*, 270: 31189–31195.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W (1995) Hypoxia induced transcriptional activation and increased mRNA stability of VEGF in C6 glioma cells. *J Biol Chem*, 270: 19761–19766.
- Ji YS, Xu Q, Schmedtje JF (1998) Hypoxia induces high-mobility group protein I and transcription of the cyclooxygenase-gene 2 in human vascular endothelium. *Circ Res*, 83: 295–304.
- Kappel A, Ronicke V, Damert A, Flamme I, Risau W, Breier G (1999) Identification of VEGF receptor-2 (Flk-1) promoter enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood*, 93: 4284–4292.
- Vincent KA et al. (2000) Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 α VP16 hybrid transcription factor. *Circulation*, 102: 2255–2261.
- Matsumoto LC, Bogic L, Brace R, Cheung C (2002) Prolonged hypoxia upregulates VEGF messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 186: 303–310.
- Busolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos C, Mason J, Ahmed A (2001) VEGF-receptor-1 modulates VEGF-mediated angiogenesis via Nitric Oxide. *Am J Pathol*, 159: 3.

22. Takahashi T, Shibuya M (1997) The 230 kDa mature form of KDR/flk-1 (VEGF-receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 14: 2079–2089.
23. Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger HJ (1999) Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol*, 276: H535–H542.
24. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S et al. (1996) VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *J Biol Chem*, 271: 1270–1273.
25. Miao HQ, Soker S, Feiner L, Alonso JL, Raper JA, Klagsbrun M (1999) Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: Functional competition of collapsin-1 and VEGF-165. *J Cell Biol*, 59: 99–106.
26. Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, Silver M, Takeshita S, Yang J, Symes J, Isner J (1997) Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of VEGF gene. *Circulation*, 96: 9.
27. Schwarzacher S, Lim TT, Wang BY, Kernof RS, Niebauer J, Cooke JP, Yeung AC (1997) Local Interamural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after vascular injury. *Circulation*, 95: 1863–1869.
28. Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf U, Zeiher A, Dimmeler S (2001) Oxidized LDL inhibits VEGF-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the akt/endothelial NOS pathway. *Circulation*, 103: 2102–2107.
29. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Isner J (1999) Bone marrow origin of EPCs responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85: 221–228.
30. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner J, Asahara T (2002) EPC VEGF gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105: 732–738.
31. Cosentino F, Luscher TF (1998) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32: S54–S61.
32. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K et al. (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet*, 338: 1546–1550.
33. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF (1996) Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of ph VEGF165 in patients with ischaemic limb. *Lancet*, 348: 370–374.