

Kompleksowa terapia komórkowo-genowa w leczeniu krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych

JAN SKÓRA, ARTUR PUPKA, PIOTR BARĆ, PRZEMYSŁAW SZYBER, WOJCIECH POLAK, PIOTR SZYBER

Akademia Medyczna we Wrocławiu: Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej, kierownik: prof. dr hab. med. P. Szyber

Kompleksowa terapia komórkowo-genowa w leczeniu krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych

Skóra J., Pupka A., Barć P., Szyber P., Polak W., Szyber P.

Akademia Medyczna we Wrocławiu: Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej

Cel. Praca przedstawia wyniki naszego badania, w którym została zastosowana terapia hybrydowa komórkowo-genowa w krytycznym niedokrwieniu kończyn dolnych. Osiemnastu pacjentów zostało zakwalifikowanych do badania. Od każdego z nich został pobrany szpik kostny. Otrzymane komórki szpikowe były inkubowane przez 2 godziny z plazmidem genu VEGF, a następnie podane domięśniowo w niedokrwione kończyny.

Metody. W naszej pracy ocenialiśmy: bezpieczeństwo, wpływ terapii na stan kliniczny pacjentów, stężenie białka VEGF w surowicy przed i po (w 7., 14., 28. oraz 90 dniu) podaniu plazmidu. Od pacjentów, u których wykonaliśmy amputację kończyny zostały pobrane wycinki tkanek, które następnie były badane histologicznie oraz techniką PCR (Polymerase Chain Reaction) w celu wykrycia aktywności genów plazmidu.

Wyniki. Wyniki naszej terapii są bardzo zachęcające. U dziesięciu z osiemnastu pacjentów (~55 %) doszło do poprawy stanu klinicznego- pacjenci ci zachowali kończynę. Stężenie VEGF we krwi żyłnej u pacjentów było statystycznie wyższe niż w grupie osób zdrowych. Obserwowaliśmy wzrost stężenia tej cytokiny w 14. dniu oraz jej spadek w 90. dniu badania. Wykazaliśmy ekspresję plazmidowego VEGF w transfekowanych komórkach macierzystych, i w tkankach pochodzących z amputowanych kończyn. Analizy histologiczne nie ujawniły jednak żadnych oznak tworzenia nowych naczyń (angiogenezy) w obrębie próbek pobranych z amputowanych mięśni.

Wnioski. Zastosowana terapia jest bezpieczna i skuteczna. Zaobserwowaliśmy znaczącą poprawę stanu klinicznego pacjentów. Przedstawiona terapia wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: terapia hybrydowa, gen, plazmid, VEGF, komórki macierzyste

Pol. Merk. Lek., 2007, XXII, 128, 121

Complex gene-cell therapy in treatment of critical lower limbs ischemia

Skóra J., Pupka A., Barć P., Szyber P., Polak W., Szyber P.

Medical University of Wrocław, Poland: Chair and Department of Vascular, General and Transplantation Surgery

The aim. The paper presents the results of our hybrid gene-cell therapy in case of critical lower limb ischemia. Eighteen patients with critical limb ischemia were enrolled to the study. The bone marrow from each patient was harvested. It had been incubated with VEGF₁₆₅ gene plasmid for two hours before it was administrated intramuscularly into patient's lower limb.

Methods. In the study we evaluated: safety, clinical outcomes of the therapy, venous blood VEGF protein concentration before and after (at: 7th, 14th, 28th and 90th day) administration of the stem cells. We obtained samples of muscles from the patients who underwent the limb amputation, which were examined histological and by PCR (Polymerase Chain Reaction) for detection of plasmid genes.

Results. We observed very good clinical outcomes of the therapy. In ten of eighteen patients (~55%) critical lower limb ischemia symptoms subsided – they saved their limbs. The serum VEGF concentration was higher than in healthy controls ($p < 0.05$). We observed the increase of the concentration of the cytokine at the 14th day and decrease at the 90th day after administration of cells with plasmid. We found expression of plasmid VEGF in transfected stem cells and in tissues taken from amputated limbs. However histological examination did not reveal any signs of new blood vessels formation in the samples taken from ischemic limbs.

Conclusions. The therapy is safe and effective. We observed significant improvement in patient's clinical state. The therapy needs further investigations.

Key words: hybrid therapy, gene, plasmid, VEGF, stem cells

Pol. Merk. Lek., 2007, XXII, 128, 121

Występowanie zmian miażdżycowych w tętnicach kończyn dolnych jest stosunkowo częste, ale w odróżnieniu od innych obszarów tętniczych w 80% ma przebieg bezobjawowy [9, 13, 21]. Umieralność chorych z bezobjawową miażdżycą tętnic kończyn dolnych jest 3-krotnie wyższa, natomiast z objawową miażdżycą 7-krotnie wyższa, niż w porównywalnej pod względem wieku populacji bez miażdżycy [4, 5, 13, 21]. Ze względu na dużą umieralność leczenie miażdżycy tętnic kończyn dolnych jest ważnym problemem medycznym, ekonomicznym i społecznym [9, 13, 21].

Z badań epidemiologicznych wynika, że 15-20% chorych z objawową miażdżycą zapadnie na krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych [4, 5, 21]. Określenia „krytyczne niedokrwienie kończyn” używa się w odniesieniu do chorych z przewlekłym spoczynkowym bólem niedokrwinnym, owrzodzeniem lub martwicą kończyny, które są skutkiem stwierdzonych miażdżycowych zmian tętnic [4, 17]. Krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych to jednostka chorobowa o bardzo niekorzystnym przebiegu i rokowaniu [4, 17]. Tylko u 30%

chorych można wykonać zabieg operacyjny na układzie tętniczym, ratujący chorych przed utratą kończyny [4, 17, 21].

Konwencjonalne leczenie farmakologiczne z reguły jest nieskuteczne i nie zatrzymuje procesu chorobowego. Z tego powodu u około 70% chorych wskazana jest ratująca życie amputacja kończyn [4, 17, 21]. Śmiertelność w krytycznym niedokrwieniu jest bardzo wysoka i wynosi 40%, a w grupie chorych nie zakwalifikowanych do zabiegu na układzie tętniczym sięga 70% w ciągu 1 roku [5, 21].

Z tego powodu istotnym i podstawowym problemem w chirurgii naczyniowej jest poszukiwanie nowych metod leczenia krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych.

Według danych z piśmiennictwa uzyskano pozytywne wczesne wyniki leczenia po podaniu komórek macierzystych CD 34 [8,18].

Jednocześnie od kilku lat prowadzone są próby z zastosowaniem terapii genowej plazmidem genu naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF₁₆₅ (ang. Vascular Endothelial Growth Factor) [1, 7]. Wydaje się, że obie meto-

dy mogą się uzupełniać w procesie stymulacji angiogenezy i arteriogenezy w niedokrwionych tkankach [2, 20].

Równoczesne zastosowanie terapii genowej i wykorzystanie komórek macierzystych może w istotny sposób przyspieszyć powstawanie krążenia obocznego w niedokrwionej krytycznie kończynie [2, 20].

Transfekcja plazmidem genu VEGF₁₆₅ może przyspieszyć oraz znacznie zwiększyć liczbę komórek macierzystych przekształcających się w komórki śródbłonna [2, 20]. Należy mieć nadzieję, że pozwoli to na zwiększenie liczby uratowanych przed amputacją kończyn w przebiegu krytycznego niedokrwienia. Dlatego uzasadnione są próby jednoczesnego zastosowania terapii genowej plazmidem genu VEGF₁₆₅ i terapii komórkami macierzystymi CD34.

Celem pracy była:

- ocena wpływu podania komórek macierzystych CD34 transfekowanych plazmidem genu VEGF₁₆₅ na angiogenezę i arteriogenezę w obrębie krytycznie niedokrwionych kończyn dolnych,
- ocena bezpieczeństwa skojarzonej terapii komórkami macierzystymi CD34 z plazmidem genu VEGF₁₆₅,
- ocena poziomu VEGF₁₆₅ w surowicy chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych po podaniu komórek macierzystych transfekowanych plazmidem genu VEGF₁₆₅,
- ocena klinicznego efektu leczenia w przypadkach krytycznego niedokrwienia kończyny dolnej.

MATERIAŁ I METODY

Próby kliniczne przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu. W badaniu użyto plazmidu kodującego ludzki gen VEGF₁₆₅. Konstrukcję genową sporządzono w Zakładzie Technik Molekularnych Akademii Medycznej Katedry Medycyny Sądowej we Wrocławiu, zaś wkłoniowanie konstruktu do plazmidu i jego namnożenie przeprowadzono w Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk (PAN). Apyrogenność plazmidu została potwierdzona metodą LAL; wykorzystano Pyrochrome Chromogenic Test Kit (Charles River) w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych IITD PAN we Wrocławiu. Jałowość plazmidu potwierdzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Śpik kostny pobierano metodą wielokrotnych nakłuć talerzy kości biodrowych stosując znieczulenie ogólne oraz komercyjny zestaw do pobierania szpiku kostnego (Bone Marrow Collection Kit, Baxter USA). Po pobraniu 1000ml szpiku przeprowadzono krew szpikową przez filtry 500 i 200 mikronów. Następnie izolowano komórki jednojądrzaste w separatorach. W końcowym etapie dokonywano finalnej filtracji wykorzystując filtry PALL 50 microm. Uzyskiwano 100ml koncentratu komórek jednojądrzastych, które poddawano ocenie jakościowej.

Do uzyskanego koncentratu komórek macierzystych dodawano 2mg plazmidu genu VEGF₁₆₅ i inkubowano przez 2 godziny przed podaniem.

Do badania zakwalifikowano 18 chorych (6 kobiet, 12 mężczyzn, wiek 52-78 lat), z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, spełniającym kryteria konsensusu Dormandy'ego oraz TransAtlantic Inter-Society [6, 14]. Średnie ciśnienie parcjalne tlenu u pacjentów wynosiło 28mmHg. Współczynnik kostka/ramię w dwóch niezależnych badaniach, wykonanych w odstępie 7 dni przed włączeniem do badania <0,5. Żaden z chorych nie chorował na cukrzycę. U wszystkich pacjentów wykonano angiografię naczyń kończyn dolnych. Charakter zmian miażdżycowych, uwidoczny w tym badaniu, wykluczał zastosowanie leczenia operacyjnego.

Wszyscy pacjenci, przed przystąpieniem do badania, zostali zakwalifikowani, ze względu na zaawansowany stan kli-

niczny (martwica stopy, bóle spoczynkowe, nocne), do zabiegu amputacji kończyny dolnej na wysokości uda i wyrazili zgodę na jego wykonanie.

Po przeprowadzeniu szczegółowego wywiadu chorobowego, wykonaniu badań dodatkowych, oraz po dokładnym poinformowaniu pacjentów o charakterze badania i możliwych skutkach ubocznych terapii, podejmowano decyzję o zastosowaniu (lub nie) u chorego terapii komórkowo-genowej. Kryteria wykluczające z terapii obejmowały m.in.: choroby nowotworowe, autoimmunologiczne, gruźlicę i inne choroby układowe.

Od każdego pacjenta zakwalifikowanego do badania uzyskaliśmy pisemne potwierdzenie świadomej zgody na udział w nim, zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej.

Próbki pobrane od pacjentów szpiku kostnego (2ml), jeszcze przed inkubacją z plazmidem VEGF, były badane metodą RT-PCR (ang. RT-Polymerase Chain Reaction) w celu określenia ekspresji natywnego VEGF w komórkach macierzystych. Analogiczne badanie wykonano z próbkami pobranymi tuż przed podaniem komórek osobom chorym.

Koncentrat, zawierający komórki progenitorowe, inkubowane z 2mg plazmidu genu VEGF₁₆₅, podawaliśmy w iniekcjach domięśniowych – około 20-25 iniekcji wzdłuż przebiegu mięśnia trójgłowego łydki.

Przed podaniem komórek macierzystych i genu pobierano od chorych krew żylną z kończyny górnej w celu badania stężenia VEGF. Materiał ten pobierano następnie w 7, 14, 28 i 90 dobie po wstrzyknięciu komórek z plazmidem. Pobraną surowicę odwirowywano i zamrażano, następnie stężenie VEGF₁₆₅ w surowicy oznaczano metodą ELISA zestawem firmy R&D Systems, postępując zgodnie z instrukcją producenta.

W przypadkach, w których pomimo eksperymentalnej terapii doszło do amputacji kończyny, pobierano po niej fragmenty mięśni poprzecznie prażkowanych z miejsc, w które wcześniej podano komórki macierzyste. Następnie tkankę utwardzano i przesyłano do Zakładu Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu, gdzie z dostarczonego materiału wykonywano preparaty. Oceny biopłatów dokonywał doświadczony patomorfolog. Biopłaty poddawaliśmy badaniu histologicznemu (barwienie – hematoksylina-eozyna), oraz immunohistochemicznemu, aby uwidocznili czynnik VEGF. We wszystkich przypadkach fragmenty mięśni amputowanych kończyn (z miejsca wcześniejszych podań komórek macierzystych z VEGF₁₆₅) zostały przebadane techniką RT-PCR w celu ustalenia ekspresji plazmidu VEGF₁₆₅.

U pacjentów oceniano: stan kliniczny niedokrwionej kończyny, nasilenie bólu, współczynnik kostka-ramię (ABI), stężenie cytokiny VEGF₁₆₅ we krwi; a dodatkowo u chorych, którym amputowano kończynę przeprowadzano także badanie histopatologiczne z oceną sieci naczyniowej w obrębie amputowanych mięśni.

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Etyczną przy Akademii Medycznej we Wrocławiu nr zgody: KB-926/2003.

Wyniki poddane zostały obróbce statystycznej z wykorzystaniem testu Friedmana oraz test kolejności par Wilcozona.

WYNIKI

U większości poddanych leczeniu pacjentów obserwowaliśmy poprawę subiektywnie odczuwanego stanu klinicznego. U części z nich poprawa była jednak krótkotrwała i w naszej opinii związana głównie z efektem placebo; u pozostałych osób efekt terapii widoczny był także w obserwacji długoterminowej.

Większość poddanych leczeniu pacjentów dobrze zniosła serię iniekcji domięśniowych, zawierających roztwór komórek macierzystych, inkubowanych z plazmidem VEGF. Tylko trzech pacjentów podawało, że iniekcje są bardzo bolesne, lecz nie zażądali oni zaprzestania procedury. Poza nakłuciem naczyń żylnych, wymagającym utrzymania ucisku

na nie przez około 30 min., powikłań nie obserwowaliśmy. Dwóch pacjentów skarżyło się na bolesność kończyny dolnej – w miejscach podania komórek – do 24 godzin po ich aplikacji. W naszym badaniu nie obserwowaliśmy natomiast u żadnego pacjenta: gorączki ani stanów podgorączkowych, wzrostu leukocytozy, innych odczynów czy skutków ubocznych terapii.

U 10 z 18 (55,6%) pacjentów terapia spowodowała ustąpienie dolegliwości bólowych w spoczynku. Doszło u nich także do całkowitego wygojenia przewlekłych owrzodzeń w obrębie stopy. U tych chorych amputacja kończyny nie była konieczna.

U pozostałych 8 (44,4%) pacjentów wyniki nie były tak zadowalające. W tej podgrupie wszyscy chorzy wymagali interwencji chirurgicznej. U 6 pacjentów wykonano amputację na wysokości podudzia (przed podjęciem terapii eksperymentalnej planowano amputację na wysokości uda z powodu niedrożności tętnic w odcinku udowopodkolanowym oraz zaawansowanych zmian martwiczych w obrębie stopy). Amputacje wykonywane były między 6 a 12 tygodniem od podania plazmidu. W tej podgrupie żaden chory nie „zachował” kończyny dłużej niż 3 miesiące. U żadnego pacjenta z tej podgrupy nie doszło do gojenia owrzodzenia kończyny dolnej; u wszystkich utrzymywały się zmiany martwicze w obrębie stopy. U pozostałych dwóch chorych wykonane zabiegi amputacji zostały ograniczone do poziomu śródstopia – amputacja Choparta (fot. 1, 2, 3).

U tych pacjentów obserwowaliśmy zmniejszenie nasilenia bólu spoczynkowego w stosunku do stanu sprzed zastosowania terapii oraz stopniowe gojenie owrzodzeń.

Podczas 90-dniowej obserwacji żaden pacjent nie zmarł i nie był hospitalizowany z jakiegokolwiek przyczyny; chorzy zgłaszali się jedynie na kontrolne wizyty w naszym ośrodku.

Zauważyliśmy nieznaczny wzrost wskaźnika kostka-ramię (ABI) w badanej grupie. Przed przystąpieniem do badania średnia wartość ABI wynosiła $ABI_0 = 0,10$, natomiast w 28 i 90 dniu odpowiednio: $ABI_{28} = 0,16$, $ABI_{90} = 0,14$. Różnice te nie osiągnęły jednak istotności statystycznej ($p > 0,05$) (ryc. 1).



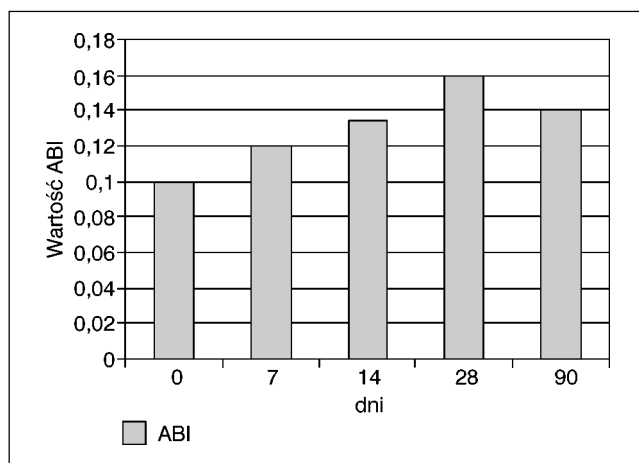
Fot. 1. Stopa przed rozpoczęciem leczenia
Ph. 1. Foot before administration of hybrid therapy



Fot. 2. Ta sama stopa 6 tygodni później
Ph. 2. The same foot 6 week later



Fot. 3. Ta sama stopa 12 tygodni później
Ph. 3. The same foot 12 week later

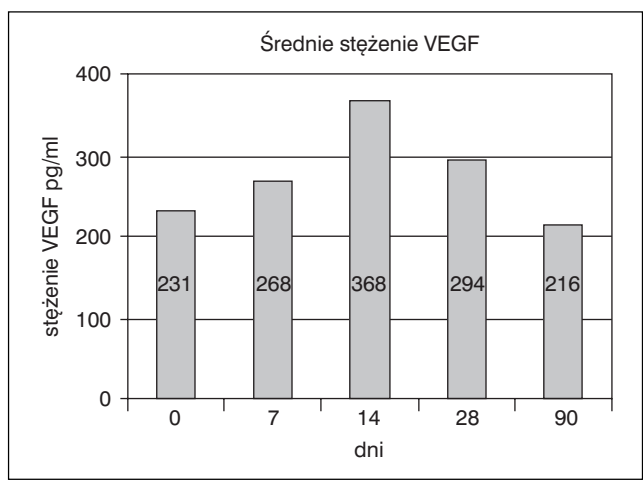


Ryc. 1. Wartości ABI podczas obserwacji
Fig. 1. ABI index fluctuation during the study

W badaniu RT-PCR komórek macierzystych, przed ich inkubacją z plazmidem, wykazaliśmy obecność mRNA VEGF w komórkach. Także po inkubacji stwierdzano obecność natywnego, „komórkowego” VEGF, jednak stwierdziliśmy również występowanie mRNA plazmidowej formy VEGF, co stanowi dowód skutecznej transfekcji komórek macierzystych plazmidem VEGF.

Badanie histopatologiczne biopsji, pochodzących z amputowanych tkanek, nie ujawniło rozplemu komórkowego, wzmocnienia sieci kapilarnej, cech proliferacji komórek śródbłonna, ani innych cech angiogenezy. W badaniu immunohistochemicznym nie stwierdziliśmy obecności cytokiny VEGF, ani w cytoplazmie komórek śródbłonna, ani w cytoplazmie mięśni poprzecznie prążkowanych. Nie uwidoczniliśmy także obecności tego białka w przestrzeniach międzykomórkowych. Jednak w przebadanych techniką RT-PCR tkankach stwierdziliśmy ekspresję plazmidowej formy genu $VEGF_{165}$.

W przeprowadzonych badaniach stężenia VEGF w surowicy obserwowaliśmy wysokie wyjściowe stężenie tej cytokiny w surowicy zakwalifikowanych do badania pacjentów. Poziom ten był znacząco wyższy w stosunku do stężeń obserwowanych u osób zdrowych. Podczas 90-dniowej obserwacji wystąpiły pewne wahania ilości cytokiny u pacjentów poddanych terapii. Najwyższy średni poziom VEGF w surowicy zanotowaliśmy w 14 dobie po aplikacji komórek z plazmidem VEGF. Wzrost ten był istotny statystycznie w stosunku do poziomu wyjściowego ($p < 0,05$). W ostatnim dniu obserwacji (dzień 90-ty) średnie stężenie VEGF nieistotnie statystycznie obniżyło się w stosunku do punktu początkowego ($p > 0,05$). W grupie pacjentów, u których operacja nie była konieczna średnie stężenie VEGF (w 28 dniu) było wyższe w porównaniu do stężenia stwierdzonego u osób z grupy operowanej. Różnica ta nie jest jednak istotna statystycznie ($p > 0,05$) (ryc. 2).



Ryc. 2. Stężenie VEGF₁₆₅ (pg/ml) w surowicy.
Fig. 2. Concentration of VEGF (pg/ml) in serum

OMÓWIENIE

Jest to pierwsza praca opisująca zastosowanie terapii hybrydowej, komórkowo-genowej u pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych. Wcześniejsze próby zastosowania takiej metody opisywane były w leczeniu choroby niedokrwiennej na modelach zwierzęcych lub w terapii innych schorzeń [8, 12, 16, 18].

Wyniki naszego badania są bardzo obiecujące. Osiągnęliśmy znaczną, długotrwale utrzymującą się (powyżej 90 dni) poprawę stanu klinicznego pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyny, zakwalifikowanych do zabiegu operacyjnego – amputacji kończyny na poziomie uda. W wyniku zastosowania terapii u ponad połowy badanych leczenie operacyjne nie było konieczne. Obserwowaliśmy gojenie się owrzodzeń niedokrwionych kończyn oraz ustępowanie bólów spoczynkowych. Niestety, nie u wszystkich zakwalifikowanych do badania hybrydowa terapia komórkowo-genowa dała tak widoczne efekty. U części pacjentów – 6 (33,3%) amputacja była konieczna, jednak wykonano ją nie jak zakładano przed kwalifikacją do badania na poziomie uda lub kolana lecz na poziomie podudzia, co także uważamy za pozytywny wpływ zastosowanego leczenia.

W naszym badaniu wykazaliśmy nieznaczny wzrost współczynnika kostka-ramię (ABI) w 28 i 90 dniu obserwacji w stosunku do dnia badania poprzedzającego iniekcję komórek macierzystych. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie, co nie jest zaskakujące, ponieważ znając teoretyczny mechanizm działania VEGF i komórek macierzystych wiemy, iż zastosowane leczenie nie powinno wpłynąć na przepływ w dużych naczyniach. Powinno natomiast pobudzić tworzenie sieci małych naczyń krwionośnych w obrębie kończyny, a takich zmian współczynnik ABI nie mierzy.

W pobranych od chorych komórkach macierzystych wykryliśmy – metodami biologii molekularnej – obecność natywnego VEGF. Wiadomo, że gen ten ulega ekspresji w różnych komórkach, w tym w komórkach guza, śródbłonna, makrofagach, limfocytach T, komórkach mięśni gładkich, komórkach nerki, keratocytach, astrocytach oraz osteoblastach [11, 19]. Nie były nam wcześniej znane żadne doniesienia dotyczące analizy ekspresji tego genu w „świeżo pobranych” komórkach macierzystych. Wiedzieliśmy tylko o pośrednich dowodach aktywności tego genu w komórkach macierzystych poddanych hodowli [10]. Po inkubacji komórek z plazmidem genu VEGF₁₆₅ wykazaliśmy ekspresję genu zarówno natywnego jak i plazmidowego. Obserwacja ta jest o tyle ważna, że potwierdza nie tylko przeniknięcie plazmidu do wnętrza komórek macierzystych, ale także ich ekspresję (wykorzystanie) przez transferowane komórki. Dzięki tej efektywnej transfekcji możemy mieć nadzieję na to, że komórki w więk-

szym stopniu będą brały aktywny udział w angiogenezie zarówno jako źródło angiogennej cytokiny jak i bezpośrednie źródło prekursorów niezbędnych w tym procesie. Zastosowane przez nas metody nie pozwalają jednak ocenić stopnia transfekcji, to znaczy procentu komórek, do których plazmid został wprowadzony. Z piśmiennictwa wynika, iż procent ten powinien być niewielki, co może stanowić ograniczenie naszego eksperymentu [22].

Przeprowadzone badania PCR biopłatów mięśni po przecięnie prażkowanych amputowanych kończyn wykazały obecność plazmidowego RNA VEGF₁₆₅. Stanowi to dowód na skuteczną transfekcję oraz przeżycie wszczepionych komórek macierzystych w mięśniach niedokrwionej kończyny dolnej. Wynik ten pozostaje w sprzeczności z brakiem jakiegokolwiek cech angiogenezy w obrazie histologicznym, nie obserwowaliśmy bowiem żadnych proliferacji komórkowych ani lokalnego zwiększenia stężenia VEGF₁₆₅. Trzeba jednak pamiętać, że nie pobieraliśmy do badania próbek od pacjentów, którzy nie byli poddani amputacji i po zastosowanej terapii zachowali kończyny.

Należy zaznaczyć, że poza wynikami klinicznymi, które oceniamy jako bardzo obiecujące (w szczególności w porównaniu efektów zastosowania samego plazmidu VEGF₁₆₅) nie mamy jednoznacznych dowodów potwierdzających indukcję angiogenezy przez komórki macierzyste, transfekowane genem VEG₁₆₅. Możemy jedynie pośrednio wnioskować, że u pacjentów z krytycznym niedokrwieniem, u których nastąpiła poprawa stanu klinicznego, doszło do polepszenia perfuzji tkanek kończyny poprzez rozbudowę sieci małych naczyń krwionośnych.

Z naszych obserwacji wynika, że zastosowana metoda jest bardzo obiecującą formą indukcji angiogenezy. Niezmierznie trudno ocenić dlaczego tylko około 50% chorych odniosło korzyści z zastosowanej terapii. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest zbyt mały stopień transfekcji komórek macierzystych plazmidem genu naczyniowo-śródbłonkowo czynnika wzrostu. Znamy bardziej efektywne formy transfekcji jednak są one obciążone pewnymi wadami gdyż są bardziej kosztowne, a bezpieczeństwo niektórych z nich (użycie wirusów) wciąż budzi kontrowersje [2, 20].

Podobnie jak inni autorzy obserwowaliśmy podwyższenie „wyjściowego” stężenia VEGF w surowicy chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyny dolnej [3, 15]. W 14 dobie wystąpił wzrost stężenia tej cytokiny w surowicy co może być związane z syntezą czynnika wzrostu przez wszczepione komórki macierzyste. Dowodów na tę tezę jednak nie posiadamy. Obserwowany następnie spadek stężenia tego czynnika wzrostu interpretujemy jako dowód zmniejszenia obszaru objętego niedokrwieniem. Wiadomo bowiem, iż najsilniejszym stimulatorem syntezy VEGF jest ischemia. Zwiększenie perfuzji, dzięki rozbudowie sieci naczyniowej, zmniejsza objętość tkanki niedokrwionej, z drugiej strony u części chorych wykonany został zabieg amputacji co także doprowadziło do redukcji obszaru niedokrwienia.

WNIOSKI

1. Nie posiadamy bezpośrednich dowodów potwierdzających wzbudzenie angiogenezy przez zastosowaną przez nas terapię hybrydową – komórkowo-genową, dysponujemy jedynie dowodami pośrednimi czyli poprawą stanu klinicznego pacjentów.
2. Zastosowana terapia jest bezpieczna; nie obserwowaliśmy żadnych efektów ubocznych poza nakłuciem powierzchownych naczyń żylnych kończyny oraz bolesnością podczas iniekcji.
3. Wykazaliśmy proces transfekcji komórek macierzystych plazmidem VEGF₁₆₅.
4. Stwierdziliśmy obecność plazmidu VEGF₁₆₅ w obrębie tkanek amputowanych kończyn.

5. Obserwowaliśmy wzrost poziomu VEGF w surowicy chorych szczególnie zaznaczony w 14. dniu od aplikacji komórek.
6. Podczas prowadzonego badania doszło do znacznej poprawy stanu klinicznego u ponad połowy poddanych terapii chorych.

PIŚMIENNICTWO

1. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. i wsp.: *Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia*. *Circulation*, 1998, 97, 1114-1123.
2. Chen H.K., Hung H.F., Shyu K.G., i wsp.: *Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction*. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005, 35, 677-86.
3. Choksy S., Pockley A.G., Wajeh Y.E. i wsp.: *VEGF and VEGF receptor expression in human chronic critical limb ischaemia*. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2004, 28, 660-669.
4. Dormandy J., Mahir M., Ascady G., i wsp.: *Fate of the patient with chronic leg ischaemia: a review article*. *J. Cardiovasc. Surg.*, 1989, 30, 50-57.
5. Dormandy J.: *Peripheral vascular disease*. *Med. North. Am.*, 1994, 353-360.
6. Dormandy J.A.: *Therapeutic advances in critical limb ischemia*. *International Congress and Symposium Series No 195*. Dublin, 2 May, 1992.
7. Dulak J., Partyka P., Jozkowicz A., i wsp.: *Gene transfer of naked VEGF plasmid induces the formation of microvessels but not mature collaterals in ischaemic limb muscles*. *Eur. Surg.*, 2002, 34, 105.
8. Dzau V.J., Gnecci M., Pachori A.S. i wsp.: *Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases*. *Hypertension*, 2005, 46, 7-18.
9. Fowkes F.G.R., Housley E., Cawood E.H. i wsp.: *Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population*. *Int. J. Epidemiol.*, 1991, 20, 384-392.
10. Fuchs S., Baffour R., Zhou Y., i wsp.: *Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia*. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2001, 37, 1726-1732.
11. Iijima K., Yoshikawa N., Connolly D.T., Nakamura H.: *Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor*. *Kidney Int.* 1993, 44, 959-996.
12. Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka Ch., i wsp.: *Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration*. *Circulation*, 2002, 105, 732-738.
13. Leng G.C., Fowkes F.G.E.: *The Edinburgh Claudication Questionnaire: an improved version of the WHO/Rose Questionnaire for use in epidemiological surveys*. *J. Clin. Epidemiol.*, 1992, 45, 1101-1109.
14. *Management of peripheral arterial disease (PAD) TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC)*. Section C. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2000, 19, 47-243.
15. McLaren M., Newton D.J., Khan F. i wsp.: *Vascular endothelial growth factor in patients with critical limb ischemia before and after amputation*. *Int. Angiol.*, 2002, 21, 165-8.
16. Nagaya N., Kangawa K., Kanda M. i wsp.: *Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2003, 108, 889-895.
17. *Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia*. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1992, 6, suppl A, 1-32.
18. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. i wsp.: *Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: pilot study and a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2002, 360, 427-35.
19. Tischer E., Gospodarowicz D., Mitchell R. i wsp.: *Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 165, 1198-1206.
20. Wang Y., Haider H.K., Ahmad N., i wsp.: *Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair*. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2006, 40, 736-745.
21. Weitz J., Byrne J., Clagett P.G. i wsp.: *Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: A critical review*. *Circulation*, 1996, 94, 3026-3049.
22. Ylä-Herttuala S., Martin J.F.: *Cardiovascular gene therapy*. *Lancet*, 2000, 355, 213-22.

Adres: Jan Skóra, Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej, Akademia Medyczna, 50-326 Wrocław, ul. Poniatowskiego 2, tel./fax (071) 733 22 99, e-mail: janskora@wp.pl