

# Rassegne

## Angiogenesi terapeutica nell'ischemia critica degli arti inferiori.

### Revisione della letteratura e prospettive della ricerca sulle cellule staminali

Rossella Di Stefano, Ugo Limbruno\*, Daniele Barone\*, Alberto Balbarini

Sezione di Angiologia, \*Cardiologia Interventistica, Dipartimento Cardio Toracico, Università degli Studi, Pisa

**Key words:**  
Angiogenesis;  
Cells; Ischemia.

Chronic peripheral arterial disease affects up to 15% of adults over the age of 55 years; critical limb ischemia represents the most dramatic clinical outcome. Patients with chronic critical limb ischemia who are not candidate for surgical or percutaneous revascularization have impending limb loss; those who benefit from successful revascularization suffer from high rate of recurrent symptoms or revision surgery or progressive amputations. In these patients no medical treatment is considered effective for rest pain or ulcer healing. Therapeutic angiogenesis, which has the goal to achieve the process of new blood vessel formation via the administration of growth factors, has become a new promising hope. The discovery of the possibility of inducing sprouting of new vessels from preexisting vasa (angiogenesis) or the *in situ* differentiation of endothelial cells from stem cell precursors (vasculogenesis) have open new lease on life.

However, a careful analysis of experimental results achieved in animal models is required before proposing for clinical setting.

Although a major concern is that most of the experimental work has been done on animal models that do not represent the clinical process, benefit from growth factor administration or stem cell therapy has been proven in clinical trials, suggesting the importance of this new research frontier. This literature review is aimed to examine potential applications of therapeutic angiogenesis to treat critical limb ischemia with particular attention to angiogenesis obtained with stem cells.

(Ital Heart J Suppl 2004; 5 (1): 1-13)

© 2004 CEPI Srl

Ricevuto il 20 giugno 2003; nuova stesura il 17 ottobre 2003; accettato il 20 ottobre 2003.

*Per la corrispondenza:*  
Dr.ssa Rossella Di Stefano  
Sezione di Angiologia  
Dipartimento  
Cardio Toracico  
Ospedale Cisanello  
Via Paradisa, 2  
56124 Pisa  
E-mail: r.distefano@  
ao-pisa.toscana.it

## Introduzione

Il termine "angiogenesi terapeutica" è stato proposto per la prima volta nel 1993 da Hockel et al.<sup>1</sup> per descrivere interventi diretti ad indurre la crescita di vasi sanguigni in aree di ipovascolarizzazione. Da allora l'angiogenesi è stata identificata nell'utilizzo di fattori di crescita o nell'induzione di proteine angiogeniche per incrementare il flusso ematico di tessuti ischemici. Questo concetto ha trovato ovvie indicazioni nella patologia vascolare periferica occlusiva degli arti inferiori caratterizzata da ischemia dovuta ad insufficienza del flusso ematico arterioso.

Questa revisione della letteratura è volta ad esaminare le potenziali applicazioni della terapia angiogenetica come possibile trattamento dell'ischemia degli arti inferiori con particolare attenzione alla lettura dei modelli sperimentali utilizzati ed ai risultati della terapia angiogenetica mediante cellule staminali.

## Ischemia critica e angiogenesi

L'arteriopatia obliterante degli arti inferiori è una patologia molto diffusa che si manifesta con quadri clinici molto diversi. L'ischemia critica degli arti inferiori (CLI) ne rappresenta il quadro più drammatico caratterizzato dalla perdita imminente di un arto che si verifica quando il flusso ematico dell'arto a riposo è inferiore a quello necessario per mantenere la vitalità dei tessuti. Il TASC (TransAtlantic Inter-Society Consensus) Working Group ha definito i pazienti con ischemia critica come pazienti aventi dolore a riposo, o ulcere trofiche non tendenti alla guarigione o entrambi, attribuibili ad una patologia occlusiva arteriosa oggettivabile<sup>2</sup>. La reale incidenza e prevalenza di questa patologia non è nota; dati ottenuti mediante approcci diversi sembrano peraltro convergere su un'incidenza di circa 400-450 casi per milione/anno o, in altri termini, di un nuovo caso per anno ogni 100 pazienti sofferenti di claudicatio intermittens<sup>3</sup>.

Nonostante le moderne tecniche di rivascularizzazione chirurgica e di angioplastica ed alcune terapie mediche con prostanoidi abbiano aumentato la percentuale di salvataggio degli arti affetti da CLI, l'amputazione resta sempre l'evento più probabile per numerose ragioni. L'impossibilità di avere disponibile un segmento venoso autologo o la mancanza di un letto arterioso distale adeguato per il bypass, la presenza di un danno del microcircolo e di condizioni di comorbilità sono i fattori alla base delle oltre 50 000 amputazioni per CLI che si attuano ogni anno solo negli Stati Uniti.

L'ischemia critica implica cronicità e deve essere distinta dall'ischemia acuta, quadro ben diverso che determina un decremento nella perfusione dell'arto in maniera veloce se non improvvisa, con immediata compromissione della vitalità dell'arto stesso. La progressione dell'arteriopatia periferica dalla claudicatio al dolore a riposo fino alle ulcere o alla gangrena è comunque il risultato di uno o più eventi acuti che peggiorano l'ischemia esistente.

È noto da tempo che lo sviluppo di un circolo collaterale rappresenta un fattore prognosticamente favorevole nell'ambito delle arteriopatie obliteranti. La possibilità di interferire con l'angiogenesi, ovvero stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni a scopo terapeutico, è un'acquisizione molto più recente legata alla scoperta delle proprietà biologiche del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)<sup>4</sup>. Il passo successivo è stato quello di ipotizzare che stimolando, mediante la somministrazione di VEGF, la formazione di un circolo collaterale, si potesse migliorare la perfusione del tessuto ischemico (neoangiogenesi terapeutica)<sup>1,5,6</sup>.

Il processo di angiogenesi comprende in realtà tre fenomeni distinti: la vasculogenesi, l'arteriogenesi e l'angiogenesi propriamente detta. Il termine "vasculogenesi" si riferisce al processo di formazione e maturazione di nuovi vasi sanguigni a partenza da cellule staminali mesenchimali indifferenziate e si verifica principalmente durante l'embriogenesi<sup>7</sup>. La distinzione comunque tra vasculogenesi come fenomeno limitato allo sviluppo embrionale non è più considerata assoluta perché si stanno accumulando evidenze sperimentali di meccanismi di vasculogenesi anche post-natale<sup>8</sup>.

Per "arteriogenesi" si intende la trasformazione delle arteriole in arterie più grosse con un diametro circa 20 volte superiore a quello di origine. L'arteriogenesi si associa ad un intenso rimodellamento del tessuto circostante ottenuto mediante l'attivazione di varie proteasi<sup>9</sup>.

Per "angiogenesi" si intende infine lo sviluppo di nuovo circolo capillare, quindi la gemmazione di nuovi vasi, a partenza da capillari preesistenti per proliferazione/migrazione di cellule endoteliali mature. Una differenza importante fra arteriogenesi e angiogenesi è che l'angiogenesi si sviluppa nel tessuto ischemico (distalmente cioè all'occlusione arteriosa) mentre l'arteriogenesi avviene più a monte, in prossimità dell'ostruzione arteriosa o anche a monte di essa e quindi in un territorio che non è né ischemico né ipossico<sup>10</sup>.

**Fattori e stimoli angiogenici.** Il tessuto ischemico esprime fattori angiogenici simili a quelli prodotti dai tumori<sup>11</sup>. Negli ultimi anni sono stati isolati e caratterizzati numerosi fattori angiogenetici e relativi recettori. Tra questi i più studiati e di cui meglio si conoscono le caratteristiche molecolari e gli effetti biologici sono certamente il VEGF ed il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) che sono peraltro gli unici, al momento, di utilizzo clinico.

Il VEGF è una glicoproteina omodimerica del peso molecolare di 45 kD che si lega all'eparina: ne esistono varie isoforme ma la più studiata è quella costituita da 165 aminoacidi (VEGF-A)<sup>4</sup>. Recentemente sono stati isolati altri fattori VEGF-simili come il VEGF-B<sup>12</sup>, prodotto in particolare dal tessuto miocardico, ed il VEGF-C che sembra essere coinvolto nella formazione dei vasi linfatici<sup>13</sup>. Il VEGF è prodotto da varie linee cellulari, in particolare dalle cellule muscolari lisce e da quelle endoteliali mentre il principale bersaglio del VEGF sono le cellule endoteliali. Ciò configura un sistema al tempo stesso paracrino e autocrino. Infatti le cellule muscolari lisce produttrici di VEGF sono site accanto alle cellule endoteliali nella parete vascolare e le cellule endoteliali, anch'esse produttrici di VEGF, ne sono a loro volta il bersaglio. Sono stati anche identificati vari tipi di recettori per il VEGF: i più importanti e conosciuti sono l'Flt-1 e l'Flk-1<sup>14,15</sup>. Il meccanismo di trasduzione del segnale all'interno della cellula non è ben noto ma sembra comunque coinvolgere il sistema dell'inositolo-3-fosfato. Questi recettori sono quasi esclusivamente presenti sulla superficie delle cellule endoteliali anche se dati recenti indicano che anche altri tipi cellulari possono presentare questo tipo di recettori<sup>16</sup>. Un terzo recettore, l'Flt-4, è stato isolato ed è in grado di legare specificamente il VEGF-C<sup>17</sup>. I principali effetti del VEGF consistono nell'induzione della proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali, nell'aumento della permeabilità capillare, nell'induzione del rilascio di nitrossido e nell'induzione dell'espressione di enzimi come le serinproteasi e le collagenasi interstiziali che hanno un ruolo importante nel mediare i fenomeni di rimodellamento dell'interstizio che sempre accompagnano processi di neoformazione vascolare<sup>18,19</sup>. Il sistema VEGF-recettore non è sempre attivo nell'adulto. Nell'organismo adulto sano il VEGF ed il suo recettore sono praticamente inespressi; la massima espressione di questo sistema si ha nell'embriogenesi quando c'è necessità di formare nuovi vasi; nella fase post-natale questo sistema è silente e si attiva in situazioni particolari come la formazione del corpo luteo o in situazioni particolari in risposta a stimoli angiogenici, tra i quali l'ischemia-ipossia che è probabilmente ad oggi il più potente<sup>20,21</sup>.

Dell'FGF sono ad oggi noti due tipi: l'FGF-1 o FGF-acido e l'FGF-2 o FGF-basico. L'FGF-2 è una proteina monomerica con peso molecolare di 18 kD che si lega all'eparina ed è uno dei più potenti peptidi angiogenetici oggi noti. Sono stati identificati quattro

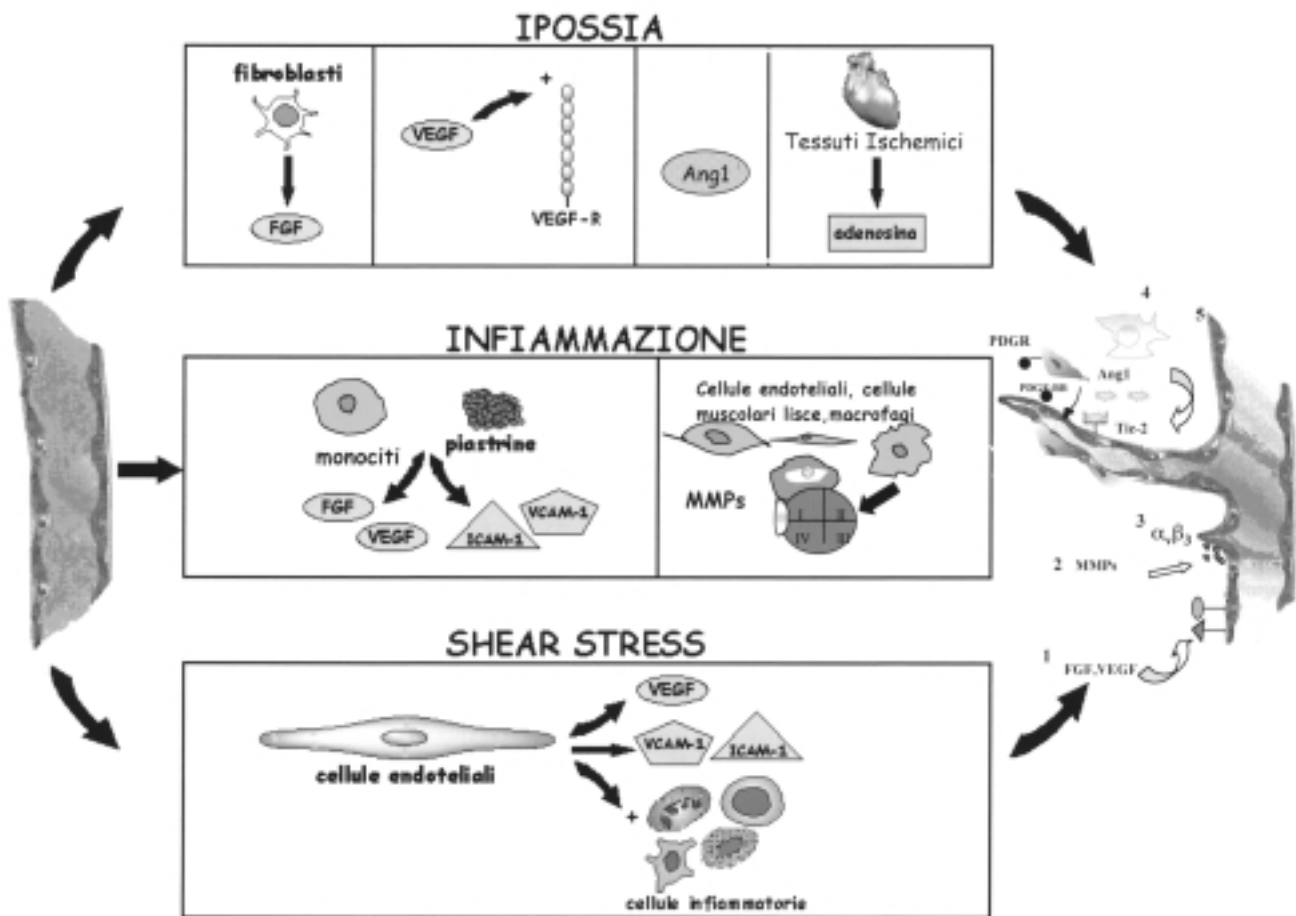
diversi tipi di recettori per l'FGF-2 tutti appartenenti alla famiglia delle tirosinchinasi<sup>22,23</sup>. L'effetto biologico dell'FGF-2 comprende un'intensa attività mitogenica nei confronti delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce vascolari<sup>24</sup>. È probabile che l'effetto mitogenico sulle cellule muscolari lisce, di cui il VEGF è privo, possa assicurare all'FGF-2 un'azione neoangiogenetica più completa con formazione non solo di neocapillari ma anche di arteriole. Recenti dati sperimentali indicano comunque un possibile effetto sinergico di VEGF e FGF-2 sia *in vivo* che *in vitro*<sup>25,26</sup>. L'FGF-2 ed i suoi recettori specifici sono, come il sistema del VEGF, stimolati dall'ipossia<sup>27</sup>. Infine è stato osservato un aumento dei livelli di FGF-2 nel liquido pericardico di pazienti con angina instabile ad indicare che questo fattore di crescita può svolgere un ruolo nella formazione del circolo collaterale anche nell'uomo<sup>28</sup>. L'FGF-1 è inoltre un potente agente chemiotattico/mitogeno nei confronti di vari tipi cellulari vascolari (cellule endoteliali, fibroblasti, cellule muscolari lisce) ed è stimolato durante la formazione di circolo collaterale<sup>29</sup> o in presenza di ipossia.

In anni recenti sono stati identificati altri fattori in grado di esplicitare azioni pro-angiogeniche: tra questi la famiglia delle angiopoietine (Ang)<sup>30</sup>, tra le quali le più caratterizzate sono l'Ang1 e l'Ang2, che svolgono un ruolo importante anche nei fenomeni di rimodellamento vascolare, ed altri che hanno al momento solo applicazioni sperimentali come il fattore di crescita piastrinico (PDGF)<sup>31</sup>, il fattore di crescita degli epatociti<sup>32</sup>, la proteina chemotattica per i monociti-1<sup>33</sup>, il *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*<sup>34</sup>, l'*hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* <sup>35</sup> e la callicreina tissutale umana<sup>36,37</sup> ed altri come gli estrogeni<sup>38</sup>.

I principali stimoli fisiopatologici che portano all'attivazione e rilascio dei fattori angiogenici sono schematizzati nella figura 1.

Tra questi l'ipossia, derivata dallo squilibrio tra la domanda metabolica e l'offerta di ossigeno dei tessuti, è il principale fattore di induzione di angiogenesi nell'adulto.

L'ipossia induce il rilascio di FGF-1 e 2 dai fibroblasti ed una up-regulation del VEGF e dei suoi recettori, attraverso l'induzione dei fattori trascrizionali *hypoxia inducible factor-1* e *hypoxia inducible factor-*



**Figura 1.** Schema dei fattori e principali stimoli angiogenici. 1 = fattori angiogenici (fattore di crescita dei fibroblasti-FGF, fattore di crescita dell'endotelio vascolare-VEGF) si legano ai rispettivi recettori endoteliali; 2 = le metalloproteasi (MMPs) sono attivate e degradano la matrice favorendo la migrazione delle cellule endoteliali; 3 = le molecole di adesione cellulare (ICAM-1, VCAM-1) facilitano l'adesione e migrazione delle cellule endoteliali; 4 = le cellule mesenchimali rilasciano l'angiopoietina 1 (Ang1) che si lega al recettore Tie-2 favorendo la gemmazione e il richiamo dei periciti; 5 = le cellule endoteliali rilasciano il fattore di crescita piastrinico (PDGF)-BB che richiama i precursori dei periciti.

<sup>220,21,39</sup>. È descritta peraltro un'eterogeneità interindividuale nella capacità dell'ipossia di attivare il sistema del VEGF<sup>40</sup> che potrebbe spiegare la variabilità alla risposta a tale stimolo. È possibile inoltre che, almeno in parte, l'effetto angiogenetico dell'ipossia sia mediato dall'aumentato rilascio da parte delle cellule muscolari ischemiche di prodotti del catabolismo delle purine ed in particolare dall'adenosina<sup>41</sup>.

Numerose evidenze sperimentali indicano che anche l'infiammazione svolge un ruolo fondamentale nella neoformazione vascolare. Infatti in presenza di tessuto necrotico, ad esempio in corso di infarto miocardico acuto, si verifica la migrazione/attivazione di macrofagi, monociti e piastrine con conseguente rilascio di citochine ed espressione di molecole di adesione cellulare (selectine, ICAM-1, VCAM-1)<sup>42-44</sup>. Queste a loro volta inducono l'espressione del VEGF e dell'FGF nonché di altri fattori di crescita vascolare. Al tempo stesso le cellule infiammatorie partecipano intensamente ai fenomeni degradativi della matrice extracellulare contribuendo in tal modo al rimodellamento dell'interstizio necessario per lo sviluppo dei nuovi vasi.

Infine l'aumento dello stress meccanico prodotto dall'aumento del flusso ematico all'interno di vasi collaterali preesistenti ad un'occlusione arteriosa può portare ad un'attivazione endoteliale con conseguente esposizione delle molecole di adesione, attrazione delle cellule infiammatorie che partecipano ai processi di neoformazione vascolare, nonché ad una up-regulation del sistema del VEGF<sup>45</sup>. In alcuni organi, come il cuore, l'attivazione del sistema del VEGF può essere infine conseguente ad un aumento dello "stiramento" meccanico subito dalle cellule miocardiche nelle zone dissinergiche del ventricolo sinistro<sup>46</sup>.

**Cellule staminali progenitrici endoteliali.** È di recentissima acquisizione la scoperta della vasculogenesi anche nell'organismo adulto consistente nella migrazione di cellule progenitrici delle cellule endoteliali (EPC) provenienti dal midollo osseo nei siti di rivascolarizzazione di territori ischemici<sup>8,47</sup>.

Questo meccanismo di formazione vascolare è stato dimostrato ad esempio nell'infarto miocardico acuto dove si verifica la mobilitazione nel torrente circolatorio di EPC staminali in grado di migrare nei foci di neovascolarizzazione e di partecipare alla formazione di nuovi vasi sanguigni nel tessuto ischemico<sup>48</sup>.

Diversi studi sperimentali, che analizzeremo di seguito, hanno documentato che tali cellule sono presenti nel midollo come elementi immaturi cellulari, identificabili per la presenza di alcuni marcatori di superficie, come CD34, e che sono in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature, assumendo marcatori di superficie tipici di queste cellule come il fattore di von Willebrand, CD31 o VE-caderina e di secernere fattori di crescita, quando a contatto con i siti ischemici.

Da questi dati sperimentali è nato il presupposto razionale della terapia angiogenica cellulare mediante autotrapianto diretto nel tessuto ischemico delle cellule staminali prelevate dal midollo osseo o delle EPC isolate dal sangue periferico.

### Angiogenesi terapeutica nell'ischemia periferica

**Evidenze sperimentali.** La maggior parte delle acquisizioni sulla possibilità di indurre neoangiogenesi nell'ischemia periferica sono state ottenute in modelli animali di ischemia dell'arto posteriore di ratto, del coniglio e del topo (Tab. I)<sup>26,49-69</sup>.

Il modello prevede sempre un'incisione longitudinale nell'arto, dal ligamento inguinale fino in prossimità del ginocchio; l'arteria femorale superficiale viene sezionata, legata e rimossa dalla sua origine dall'arteria iliaca esterna fino al punto in cui si biforca nelle arterie safena e poplitea, insieme a tutti i suoi rami collaterali (Figg. 2 e 3). In questo modello è fondamentale l'accurata dissezione e cauterizzazione di ogni collaterale.

I parametri comunemente utilizzati per studiare gli effetti positivi della terapia angiogenetica includono la misurazione della pressione arteriosa a livello del polpaccio, del flusso sanguigno mediante microsfera, l'angiografia dei vasi collaterali sviluppati, la densità capillare, il laser Doppler e la spettroscopia con risonanza magnetica per lo studio del metabolismo energetico muscolare. Per valutare il miglioramento "clinico" indotto dalla neoangiogenesi, la modalità più utilizzata è la misurazione del tempo di corsa degli animali.

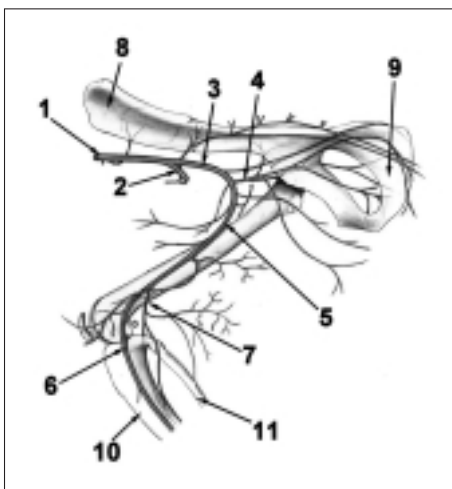
*Angiogenesi indotta con fattori di crescita.* I primi ad essere sperimentati sono stati i fattori di crescita angiogenetici. Questi sono stati somministrati direttamente nella zona ischemica o nel circolo sistemico sia come proteine ricombinanti o sotto forma di geni codificanti la proteina angiogenetica. Il gene di interesse è stato introdotto come plasmide nudo, oppure veicolato da un carrier virale (più frequentemente un adenovirus) o ancora tramite complessi DNA-liposomi.

La maggior parte degli studi sperimentali di neoangiogenesi terapeutica nell'ischemia periferica mediante fattori di crescita ha utilizzato la proteina ricombinante di VEGF<sub>165</sub><sup>57,58,70-73</sup>; raramente è stata utilizzata la proteina del VEGF<sub>121</sub>. Risultati positivi sono stati ottenuti iniettando VEGF sia per via endovenosa sistemica sia mediante iniezione intramuscolare locale. Interessante notare come anche un singolo bolo di VEGF è risultato in grado di migliorare il flusso. Numerosi sono gli studi di terapia genica in cui è stato utilizzato DNA complementare di VEGF<sup>61,74-79</sup>. Risultati positivi sono stati ottenuti anche mediante plasmide codificante per il VEGF<sub>165</sub><sup>60</sup>. In tutti gli studi l'indice radiografico di perfusione dell'arto era notevolmente superiore negli animali trattati con plasmide rispetto ai controlli;

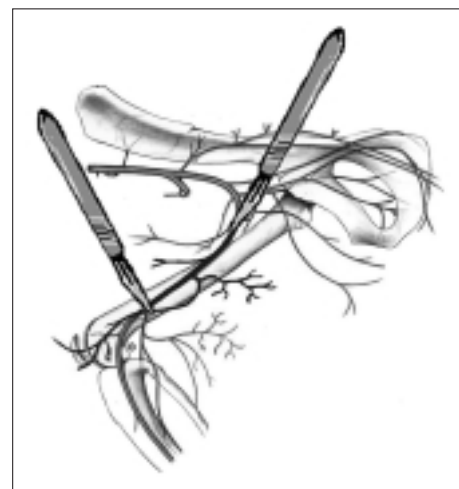
**Tabella I.** Angiogenesi sperimentale: sintesi delle principali ricerche in modelli animali di ischemia periferica.

Fattore usato e forma	Somministrazione	Animale	Autore
Cellule di midollo osseo autologo (non frazionato)	i.m. locale	Ratto	Ikenaga et al. <sup>49</sup> , 2001
Frazione MNC di midollo osseo autologo	i.m. locale	Ratto	Hamano et al. <sup>50</sup> , 2001
CD34 <sup>+</sup> selezionate dalle hPBMC	i.m. locale	Coniglio	Shintani et al. <sup>51</sup> , 2001
Sottopopolazione EPC delle CD34 <sup>+</sup> derivate da hPBMC	e.v.	Topo	Asahara et al. <sup>52</sup> , 1997
Sottopopolazione EPC delle CD34 <sup>+</sup> derivate da cordone ombelicale umano	i.a.	Topo	Kalka et al. <sup>53</sup> , 2000
Leucociti e piastrine circolanti autologhe	i.m. locale	Ratto	Murohara et al. <sup>54</sup> , 2000
MNC, leucociti e piastrine circolanti umane	i.m. locale	Ratto	Kobayashi et al. <sup>55</sup> , 2002
VEGF-A proteica	i.m. locale	Ratto	Iba et al. <sup>56</sup> , 2002
VEGF-A proteica	i.a. (arteria iliaca interna)	Coniglio	Bauters et al. <sup>57</sup> , 1995
VEGF-A <sub>165</sub> gene (plasmide)	e.v.	Coniglio	Bauters et al. <sup>58</sup> , 1995
VEGF-A <sub>165</sub> gene (plasmide)	i.a. (arteria iliaca interna)	Coniglio	Takeshita et al. <sup>59</sup> , 1996
VEGF-A <sub>165</sub> gene (plasmide)	i.a. (arteria iliaca interna)	Coniglio	Takeshita et al. <sup>60</sup> , 1996
VEGF-A <sub>165</sub> gene (plasmide)	i.m. locale	Coniglio	Tsurumi et al. <sup>61</sup> , 1997
VEGF-A <sub>165</sub> gene (plasmide)	i.m. locale	Ratto	Takeshita et al. <sup>62</sup> , 1998
VEGF-A gene (adenovirus)	i.m. locale	Ratto	Mack et al. <sup>63</sup> , 1998
VEGF-A gene (adenovirus)	i.m. locale	Coniglio	Vajanto et al. <sup>64</sup> , 2000
aFGF (FGF-1) proteica	i.m. iniezioni giornaliere	Coniglio	Pu et al. <sup>65</sup> , 1995
bFGF (FGF-2) proteica	i.m. rilascio lento	Ratto	Chleboun et al. <sup>66</sup> , 1992
bFGF (FGF-2) gene (adenovirus)	i.m. locale	Topo	Garcia-Martinez et al. <sup>67</sup> , 1999
VEGF-A + FGF-2 proteica	i.a. (arteria iliaca interna)	Coniglio	Asahara et al. <sup>26</sup> , 1995
Ang1 gene (plasmide)	i.m. locale	Coniglio	Shyu et al. <sup>68</sup> , 1998
Ang1 + VEGF gene (cytomegalovirus)	i.m. locale	Coniglio	Chae et al. <sup>69</sup> , 2000

aFGF = fattore di crescita dei fibroblasti acido; Ang1 = angiopoietina 1; bFGF = fattore di crescita dei fibroblasti basico; EPC = cellula progenitrice della cellula endoteliale; hPBMC = cellula mononucleata del sangue periferico umano; MNC = cellula mononucleata; VEGF = fattore di crescita dell'endotelio vascolare.



**Figura 2.** Arterie della pelvi e dell'arto inferiore del ratto. 1 = arteria aorta; 2 = arteria iliaca esterna sinistra; 3 = arteria iliaca esterna destra; 4 = arteria iliaca interna; 5 = arteria femorale; 6 = arteria safena; 7 = arteria poplitea; 8 = ileo; 9 = ischio; 10 = tibia; 11 = fibula.



**Figura 3.** Dissezione dell'arteria femorale e dei relativi rami. L'arteria femorale ed i suoi rami principali (arteria circonflessa femorale laterale, arteria femorale caudale laterale e arteria epigastrica caudale superficiale) sono state dissecate, legate ed asportate nel loro intero tragitto.

l'esame istologico documentava negli animali trattati con plasmide-VEGF<sub>165</sub> un rapporto fra capillari e miociti notevolmente più elevato rispetto agli animali di controllo. Anche i plasmidi contenenti DNA complementare per VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> e VEGF<sub>189</sub> hanno mostrato una simile attività biologica nell'indurre angiogenesi<sup>59</sup>. Risultati analoghi sono stati ottenuti mediante somministrazione intramuscolare diretta, anziché in-

trararteriosa, del plasmide<sup>80</sup>. È stato dimostrato inoltre un recupero della funzione endoteliale del circolo collaterale dopo trasferimento genico codificante per il VEGF<sub>165</sub><sup>62</sup>. Alcuni studi hanno utilizzato per il trasferimento del gene per il VEGF dei vettori virali, in genere adenovirus modificati incapaci di replicarsi e la transfezione del gene per il VEGF si è dimostrata efficace nel proteggere l'arto anche dagli effetti dell'occlusione va-

scolare acuta<sup>63,64</sup>. La terapia con vettori virali non è tuttavia scevra da rischi: nello studio di Messina et al.<sup>81</sup> la somministrazione di VEGF tramite carrier adenovirale ha provocato la gangrena dell'arto causata dalla reazione infiammatoria al capsido virale (Fig. 4); la somministrazione con ciclosporina, inibendo la reazione infiammatoria, ne preveniva l'insorgenza (Fig. 5)<sup>81</sup>.

Altri studi sperimentali hanno utilizzato la forma acida dell'FGF<sup>65,82-85</sup>, documentando una migliore perfusione negli animali trattati, con neovascolarizzazione e ricostituzione dell'albero arterioso distale.

La forma basica dell'FGF è stata sperimentata da vari autori<sup>86-93</sup> mediante varie modalità di somministrazione, incluse forme di rilascio lento controllato<sup>66</sup>. È però da segnalare che l'incremento di flusso ottenuto negli animali trattati rispetto ai gruppi di controllo mostrava un limite temporale, essendo il fattore evidenziabile per non più di 3 settimane. Altri hanno utilizzato il gene codificante per FGF o bFGF trasportato da un



**Figura 4.** Gangrena di arto inferiore di ratto 5-7 giorni dopo la somministrazione intrarteriosa di gene con carrier adenovirale in arto ischemico. Da Messina et al.<sup>81</sup>, con il permesso dell'Editore.



**Figura 5.** Prevenzione della gangrena mediante somministrazione di ciclosporina. Da Messina et al.<sup>81</sup>, con il permesso dell'Editore.

adenovirus (Ad-bFGF) dimostrando la formazione di una nuova rete vascolare locale<sup>67,94,95</sup>.

L'associazione tra i due fattori VEGF e FGF ha dimostrato avere effetti sinergici<sup>26</sup>.

Anche il plasmide contenente l'Ang1, ma non l'Ang2, si è dimostrato efficace nello sviluppare una rete vascolare collaterale<sup>68</sup> e risultati positivi sono stati ottenuti anche mediante la co-somministrazione di Ang1 e VEGF<sup>69</sup>.

Come già ricordato, neoangiogenesi è stata ottenuta anche con numerosi altri fattori di crescita<sup>30-38</sup>.

*Angiogenesi indotta con cellule staminali o progenitrici endoteliali.* Analizziamo adesso gli studi che hanno dimostrato l'efficacia della terapia angiogenetica indotta mediante terapia cellulare con cellule staminali.

Nei primi lavori neoangiogenesi è stata ottenuta utilizzando l'intera popolazione delle cellule midollari<sup>49,50</sup>. Le cellule midollari sono state iniettate direttamente nei muscoli resi ischemici, secondo la procedura sperimentale già descritta. Dopo 2 settimane dall'autotrapianto è stato documentato un aumento del circolo collaterale nell'arto ischemico tramite esame istologico: il rapporto fra capillari e fibre muscolari è risultato infatti significativamente superiore nei ratti trapiantati rispetto al gruppo di controllo, in cui alla legatura dell'arteria femorale seguiva l'inoculazione di solo placebo. La valutazione microangiografica ha confermato che gli arti dei ratti che avevano ricevuto le cellule midollari erano dotati di una rete di vasi collaterali più sviluppata rispetto ai controlli. Il flusso sanguigno all'arto, misurato tramite laser Doppler, è risultato ridotto nei ratti che avevano ricevuto solo placebo rispetto a quelli trapiantati con cellule midollari. Infine, l'impianto di cellule midollari ha determinato un miglioramento dell'autonomia di marcia negli animali trattati. Nelle sezioni istologiche ottenute dopo l'impianto, le cellule inoculate sono risultate positive all'immunostochimica per antigeni endoteliali (CD31 e VE-caderina), dimostrando la loro differenziazione in cellule endoteliali mature.

Questi studi hanno peraltro dimostrato che le cellule di origine midollare, individuabili tramite marcatura con colorante fluorescente, sono presenti nel muscolo ischemico dopo 3 giorni dal loro inoculo ma la loro quantità si riduce notevolmente già dopo 1 settimana, fino a divenire trascurabile dopo 2 settimane.

Altri autori hanno utilizzato la sola frazione mononucleata delle cellule di midollo osseo (BMNC)<sup>51</sup>, ottenuta dopo centrifugazione in gradiente di densità. Questa popolazione è composta da eritroblasti ( $37 \pm 6\%$ ), cellule monocitoidi ( $12 \pm 2\%$ ), cellule linfocitoidi ( $37 \pm 10\%$ ) e granulociti ( $14 \pm 2\%$ ). Le frazioni monocitoidi e linfocitoidi sembrano contenere, fra le cellule stromali midollari, le EPC<sup>96,97</sup>. Anche le BMNC sono state trapiantate in punti diversi dei muscoli resi ischemici della coscia, dopo legatura dell'arteria femorale. I risultati ottenuti con l'utilizzo delle BMNC sono analo-

ghi a quelli ottenuti nei lavori precedenti utilizzando l'intera popolazione midollare: all'esame istologico del muscolo ischemico, le cellule impiantate sono state incorporate nella rete capillare e sono risultate positive alla fosfatasi alcalina, enzima di norma espresso nelle cellule endoteliali del muscolo scheletrico; la densità capillare è apparsa significativamente maggiore negli animali che avevano ricevuto le BMNC; sia lo score angiografico, che il flusso tramite laser Doppler, aumentavano significativamente dopo il trapianto delle BMNC rispetto ai gruppi di controllo, indicando che le BMNC avevano indotto la formazione di un neocircolo collaterale.

Il passo successivo è stato quello di sperimentare una popolazione ancora più selezionata, ovvero la sola frazione contenente le EPC.

Asahara et al.<sup>52</sup> hanno selezionato le EPC mediante due antigeni: il CD34 ed il Flk-1 (recettore del VEGF), espressi dalle cellule staminali ematopoietiche fino a prima della loro maturazione e dalle cellule endoteliali immature. Tali cellule CD34<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> sono state iniettate in topi immunodeficienti in cui era stata indotta ischemia di un arto. Queste cellule sono state trovate incorporate nel 13% dei capillari neoformati; nei controlli in cui sono state trapiantate cellule CD34 negative, queste si ritrovavano soltanto nell'1% dei neovasi dell'arto ischemico.

Kalka et al.<sup>53</sup> hanno utilizzato una frazione cellulare ancora più specifica, cioè le EPC espanse in coltura per 4 giorni in un terreno arricchito di fattori di crescita specifici per le cellule endoteliali. Le EPC ottenute tramite amplificazione *in vitro* sono risultate identificabili, dopo 7 giorni, nel 56 ± 4.7% dei nuovi vasi dell'arto ischemico. Questo studio ha inoltre dimostrato una maggiore densità capillare ed un maggior flusso al laser color Doppler nei topi trapiantati con le EPC rispetto ai controlli; inoltre nel gruppo di topi di controllo (in cui nell'arto reso ischemico si somministrava solo soluzione salina) solo il 7% dei topi rimaneva con l'arto illeso contro il 59% dei topi riceventi le EPC.

Esperimenti analoghi sono stati effettuati utilizzando EPC isolate e coltivate da sangue di cordone ombelicale<sup>54</sup>. Anche in questi esperimenti le EPC trapiantate sono sopravvissute ed hanno contribuito alla formazione dei neovasi.

Riteniamo interessante segnalare infine un'altra linea sperimentale che ha utilizzato per indurre angiogenesi leucociti e piastrine del sangue periferico al posto dei precursori midollari. Il rationale all'utilizzo dell'impianto di cellule mononucleate del sangue periferico nel muscolo ischemico si basa sul presupposto che tali cellule, localizzandosi intorno ai vasi, ne possano aumentare il numero tramite il rilascio in loco di fattori angiogenetici (VEGF, bFGF, PDGF e *transforming growth factor-β*) e proteasi della matrice extracellulare.

In uno studio che ha sperimentato tale ipotesi<sup>55</sup> i risultati sono stati positivi: 4 settimane dopo l'impianto i ratti trapiantati, rispetto ai controlli, avevano un rap-

porto capillari/fibre muscolari significativamente maggiore ed un miglior score angiografico. I livelli circolanti e nelle sezioni istologiche muscolari di alcuni fattori di crescita e citochine angiogenetiche sono risultati simili a quelli degli animali dove venivano impiantate cellule staminali midollari<sup>50</sup>.

In uno studio analogo<sup>56</sup> sono state utilizzate separatamente cellule mononucleate del sangue periferico, polimorfonucleati e piastrine. Immagini angiografiche confermavano lo sviluppo di vasi collaterali neoformati solo negli animali sottoposti ad impianto locale di cellule mononucleate del sangue periferico o di piastrine mentre la presenza di polimorfonucleati attenuava di un 32% la presenza di questi capillari neoformati. Un dato sicuramente importante è che marcando le cellule con colorante fluorescente, si notava che queste non venivano incorporate nei nuovi capillari a conferma che sono solo le cellule staminali (CD34<sup>+</sup>) quelle capaci di incorporarsi nella parete dei vasi in formazione.

Le BMNC contengono circa il 2.4% di cellule CD34<sup>+</sup>, mentre le mononucleate del sangue periferico ne contengono circa lo 0.02%. Per verificare se questa differenza influisce sul potenziale neoangiogenetico, lo stesso numero di cellule mononucleate di origine midollare e di cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico venivano iniettate in due gruppi distinti di ratti. Dopo 21 giorni il flusso sanguigno negli arti in cui erano state impiantate cellule mononucleate di origine midollare era > 28% circa a quello in cui erano state impiantate cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico evidenziando pertanto che, sebbene le cellule mononucleate del sangue periferico siano capaci di sviluppare una buona quota di angiogenesi, la presenza di un numero maggiore di EPC favorisce ulteriormente la formazione di capillari.

Le considerazioni conclusive che possiamo trarre dai numerosi dati sperimentali nei modelli animali sono che questi studi sono stati sicuramente fondamentali per dimostrare gli effetti *in vivo* dei fattori di crescita e delle citochine coinvolte nel processo di neoangiogenesi nell'ischemia periferica; hanno inoltre chiaramente dimostrato la presenza del fenomeno di vasculogenesi nella fase non embrionale dello sviluppo del sistema vascolare ed il ruolo svolto dalle cellule progenitrici midollari nell'organismo adulto.

Gli studi sull'animale sono inoltre ad oggi gli unici che hanno permesso di documentare il processo di homing ovvero di migrazione ed inserimento di queste cellule nei foci di ischemia, nonché il loro differenziamento in senso endoteliale. Hanno dimostrato come solo le progenitrici sono incorporate nei neovasi, a differenza delle altre cellule mononucleate del periferico che pure migrano e partecipano indirettamente alla neoangiogenesi nei territori ischemici.

Da una prospettiva clinica tuttavia i dati nell'animale non hanno al momento dimostrato quanto le cellule staminali siano determinanti nell'arteriogenesi e quanto a lungo persista l'effetto proangiogenetico.

Inoltre riteniamo opportuno ricordare che nell'ambito clinico il quadro di ischemia critica implica cronicità. Gli studi eseguiti ad oggi hanno valutato di fatto gli effetti della terapia angiogenetica in modelli animali di ischemia acuta. Alla legatura della femorale e dei collaterali consegue infatti un'ischemia acuta severa nell'arto posteriore, con mionecrosi nei muscoli della gamba e della coscia, così come risulta dalle sezioni istologiche e dalle immagini di risonanza magnetica. Alla morte del tessuto muscolare si associano spesso necrosi superficiali e perdita di peluria dell'arto. Si deve peraltro tenere presente che questi modelli nei piccoli animali hanno di base un fattore confondente importante, in quanto in questi animali esiste una neoangiogenesi spontanea: la stessa ischemia conseguente alla legatura arteriosa è uno stimolo per sviluppare una certa quota di angiogenesi compensatoria spontanea e, dopo un certo periodo di tempo, per reclutare vasi collaterali<sup>81</sup>. Nella pratica clinica si presenta una situazione opposta: una condizione ischemica perdurante da molto tempo, con fallimento della risposta angiogenica spontanea. Inoltre questi modelli sono di solito, ad eccezione di pochi casi, eseguiti in animali normocolesterolemici, non diabetici e non anziani e pertanto con una migliore capacità di formare vasi collaterali rispetto ai soggetti umani con ischemia critica.

**Trial clinici.** I primi tentativi clinici di terapia angiogenetica in pazienti con CLI hanno utilizzato fattori di crescita endoteliali.

Nel primo trial di fase I non randomizzato, 9 pazienti con CLI sono stati trattati con due iniezioni intramuscolari (a distanza di 4 settimane) di plasmide di DNA esprimente VEGF<sub>165</sub> umano sotto il controllo di un promotore cytomegalovirus<sup>98</sup>. I risultati di tale sperimentazione hanno dimostrato la formazione di nuovi vasi collaterali del diametro medio di 200 µm in 7 dei 10 arti trattati, il miglioramento clinico (guarigione delle ulcere o diminuzione del dolore a riposo) in 9 arti e strumentale (aumento > 0.1 dell'indice di Winsor-ABI) in 5 pazienti. Lo stesso protocollo è stato praticato in 6 pazienti con tromboangiite obliterante (morbo di Buerger) ottenendo la completa guarigione delle ulcere in 5 arti; anche in questo trial tuttavia non era presente un gruppo di controllo<sup>99</sup>.

Questi studi hanno anche segnalato alcuni effetti collaterali indesiderati della terapia angiogenica come la formazione di neoangiogenesi patologica in altri organi e la comparsa di edema importante dell'arto che tuttavia risponde alla terapia con diuretici o può essere prevenuto dall'uso concomitante di AngI.

Dopo queste prime esperienze sono iniziati numerosi altri trial (alcuni tuttora in corso) in cui la neoangiogenesi periferica è indotta mediante l'iniezione diretta dei fattori di crescita VEGF-C e FGF-1 veicolati da plasmidi o vettori virali<sup>100</sup>.

Tra questi lo studio TRAFFIC di fase II, randomizzato a doppio cieco con placebo, si è recentemente con-

cluso<sup>101</sup>. Lo studio ha arruolato 190 pazienti con claudicatio intermittens dovuta ad aterosclerosi localizzata a valle dell'arteria iliaca, suddivisi in tre gruppi a ricevere l'infusione intrarteriosa di placebo (ai giorni 1 e 30), oppure una dose di placebo al giorno 1 e una dose di rFGF-2 al giorno 30 oppure l'infusione di rFGF-2 in due dosi (ai giorni 1 e 30).

I risultati sono stati valutati mediante incremento del tempo di marcia con Gardner treadmill test eseguito 90 giorni dopo la fine del trattamento: il gruppo trattato con una dose di rFGF-2 ha incrementato il tempo di marcia rispetto al gruppo trattato con placebo; la doppia infusione di fattori di crescita non ha prodotto risultati migliori rispetto alla singola dose. Come endpoint secondari lo studio esaminava il tempo di marcia a 180 giorni, la misurazione dell'ABI a 90 e 180 giorni dall'inizio del trattamento e la qualità di vita valutata mediante due questionari. Anche per gli obiettivi secondari non si sono ottenute differenze significative su questi parametri rispetto al placebo. Da segnalare la comparsa di proteinuria severa (> 1 g/die) dose-dipendente in alcuni pazienti.

Un altro recente studio<sup>102</sup>, eseguito nella popolazione cinese, terapia genica con VEGF<sub>165</sub> veicolato da plasmide è stata praticata in 21 pazienti affetti da CLI cronica, di cui 16 con ulcere ischemiche, a dosi variabili fra 400 e 2000 µg di plasmide, mediante iniezione diretta intramuscolare nell'arto ischemico; la stessa dose veniva ripetuta dopo 4 settimane. I risultati di questo studio, se pur non randomizzato con placebo, hanno dimostrato chiaramente l'efficacia della terapia in termini di miglioramento dell'ABI, guarigione o miglioramento di 12 ulcere (75%) e del dolore a riposo in 20 arti e di formazione di nuovi circoli evidenziati con risonanza magnetica. Il dato più significativo di questo studio è la presenza di un effetto angiogenetico dose-dipendente e l'assenza di effetti collaterali importanti eccetto edema transitorio dell'arto trattato.

A conforto dei numerosi studi sperimentali, un trial clinico randomizzato a doppio cieco (studio TACT- Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation) ha recentemente confermato la possibilità di indurre neoangiogenesi mediante innesto di cellule di midollo osseo autologhe in pazienti con CLI<sup>103</sup>. I risultati dello studio TACT hanno infatti dimostrato chiaramente l'effetto angiogenetico ottenibile con l'utilizzo di BMNC al placebo. Nei pazienti inclusi nel braccio di studio che prevedeva l'impianto di BMNC, monitorizzati mediante ABI, pressione parziale di ossigeno transcutanea e tempo libero di marcia ed angiografia digitale, si è ottenuto un netto miglioramento dei parametri strumentali, completa remissione del dolore a riposo in 22 pazienti, regressione nella scala del dolore in 15, salvataggio da amputazioni digitali in 15 su 20 pazienti e miglioramento delle ulcere in 6 su 10.

In un ulteriore studio di tipo osservazionale, Minamino et al.<sup>104</sup> hanno utilizzato cellule mononucleate del sangue periferico, previa mobilizzazione di progenitri-

ci midollari con la somministrazione di *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* per 4 giorni. Nei pazienti in cui veniva riscontrato un aumento almeno dello 0.1% della popolazione CD34<sup>+</sup> veniva seguita aferesi delle cellule mononucleate che venivano poi concentrate ed iniettate in 50 punti del muscolo dell'arto ischemico. Il miglioramento del quadro clinico, a distanza di 1 anno, valutato con il prolungamento del tempo di marcia, tuttavia non era oggettivamente con i test clinici e radiologici. Secondo gli stessi autori il metodo, pur essendo efficace, è tuttavia molto costoso per la metodica di selezione e raccolta delle CD34<sup>+</sup> ed è pertanto proponibile solo quando non è possibile eseguire il prelievo di midollo.

Una segnalazione dell'efficacia anche dell'impianto dei soli leucociti del sangue periferico è stata ottenuta in 3 pazienti con CLI con gangrena ed ulcere dove l'impianto ha determinato, oltre al miglioramento dell'ABI, la parziale guarigione delle ulcere e la scomparsa del dolore a riposo<sup>105</sup>. Interessante l'osservazione in questi pazienti di una normalizzazione dei valori della proteina C reattiva, dopo 1 mese dall'impianto.

A commento di questi studi clinici, riteniamo che, nonostante i risultati incoraggianti, esistono al momento alcuni punti critici sulla terapia angiogenica, sollevati peraltro dagli stessi pionieri di questa terapia<sup>106</sup>. Infatti non è ancora ad oggi stabilito con certezza se i pazienti con CLI cronica che non sono candidabili per procedure di rivascolarizzazione chirurgica o percutanea, siano effettivamente candidabili alla terapia cellulare o con fattori di crescita. Questi pazienti potrebbero avere danni muscolari e neurologici ormai irreversibili, oltre a infezioni locali, che possono di per sé costituire un rischio di amputazione non necessariamente legato a modifiche dello stato di perfusione.

Infine resta il problema molto importante, non ancora risolto, della scelta degli endpoint nei trial perché al momento non esistono *gold standard* che documentino con certezza il processo di angiogenesi nell'uomo.

## Considerazioni conclusive

I dati della letteratura mostrano l'impressionante potenzialità della terapia angiogenetica per il trattamento della patologia ischemica degli arti inferiori. Tuttavia numerosi sono ancora i quesiti ai quali la ricerca deve trovare risposta.

L'emivita dei fattori di crescita ricombinanti in circolo, ad esempio, è solo di pochi minuti. Ciò premesso, sembra difficile ipotizzare un sostanziale effetto angiogenetico con una singola o doppia dose di VEGF o FGF. Gli effetti positivi comunque riportati potrebbero essere dovuti all'effetto autocrino amplificante di tali fattori o al legame di tali fattori con l'eparansolfato che ne potrebbe prolungare gli effetti sistemici.

Un altro quesito chiave è quello di capire quanto un fattore di crescita specifico per un determinato tipo cel-

lulare possa da solo portare allo sviluppo di arterie muscolari. Sebbene sia stato dimostrato che il VEGF può avere effetti anche sulle cellule muscolari lisce<sup>107</sup>, è più probabile che possa generare arteriogenesi tramite meccanismi indiretti legati a modifiche emodinamiche. In questo senso abbiamo visto che l'angiogenesi prodotta dai fattori di crescita riduce le resistenze vascolari dell'intera regione dipendente dal vaso collaterale mediante l'aumento della densità capillare e pertanto contribuisce ad aumentare il flusso locale, favorendo tramite lo *shear stress*, la crescita delle anastomosi arteriose preesistenti. In aggiunta, il VEGF produce una up-regulation della nitrossido-sintetasi costitutiva e della nitrossido-sintetasi inducibile, potenti vasodilatatori delle arterie muscolari tramite produzione di ossido nitrico<sup>108,109</sup>.

Allo stato attuale tuttavia non è possibile concludere che un singolo fattore sia più o meno efficace di un cocktail. L'utilizzo delle cellule staminali ha tutti i presupposti per essere una strategia migliore rispetto a quella che sfrutta i fattori di crescita singoli o in associazione. Tramite queste cellule infatti viene eliminato il problema del fattore o dei fattori di crescita più efficaci e della dose degli stessi da somministrare. Si presume infatti che le cellule stesse siano capaci di creare il microambiente ottimale per l'angiogenesi, liberando nella giusta sequenza e nella combinazione ottimale i fattori di crescita e le citochine necessarie per la formazione di nuovi vasi. Inoltre le EPC sono esse stesse capaci di differenziarsi negli elementi cellulari costituenti i vasi sanguigni oltre a rappresentare una sorgente locale di fattori angiogenetici e quindi contribuire anche indirettamente alla formazione di nuovi vasi. Inoltre le cellule inoculate inducono il reclutamento dei monociti, i quali partecipano attivamente ai processi infiammatori che accompagnano la neoangiogenesi liberando citochine, molecole di adesione, fattori di crescita vascolare e proteasi della matrice extracellulare.

Negli studi clinici, le EPC si sono rivelate prive di effetti collaterali: nei pazienti trattati con cellule staminali non si sono riscontrate modificazioni istologiche come crescita o sviluppo di angiomi; rispetto alle proteine ricombinanti ed alla terapia genica, l'utilizzo delle cellule staminali autologhe potrebbe essere pertanto più sicuro dal punto di vista della tossicità degli effetti collaterali. Infatti non si può ad oggi escludere con certezza che l'uso di fattori di crescita veicolati da plasmidi o vettori virali possa portare all'accelerazione della retinopatia diabetica, all'instabilità delle placche aterosclerotiche o allo sviluppo di tumori.

Allo stato attuale delle conoscenze tuttavia non è ancora possibile rispondere al quesito: la strategia migliore per produrre neoangiogenesi è quella di somministrare le BMNC *in toto* o soltanto la frazione di queste indirizzata verso la differenziazione endoteliale (EPC) reperibile nel sangue periferico? A favore della prima ipotesi, c'è la considerazione che una popola-

zione non selezionata può sfruttare appieno i segnali intercellulari fra i diversi tipi di cellule, necessari per la differenziazione e maturazione *in loco* in cellule endoteliali; al contrario, probabilmente, la frazione EPC se inoculata da sola nel tessuto ischemico potrebbe avere maggiori difficoltà a differenziarsi in cellule endoteliali mature e a formare neovasi in quanto verrebbe a mancare il ruolo che svolgono le altre cellule nel processo di differenziazione. Le cellule CD34 negative (cellule mesenchimali) infatti, non sintetizzano soltanto fattori di crescita angiogenetici (VEGF e bFGF), ma anche l'Ang1, che abbiamo visto avere un'importante funzione nella maturazione e nel mantenimento del sistema vascolare.

A favore dell'utilizzo di EPC espanse in coltura c'è sicuramente la possibilità di ottenerle mediante un prelievo non invasivo; l'esiguità del numero nel sangue periferico può essere risolta mediante opportune metodiche di amplificazione *in vitro*<sup>110</sup>. Si calcola che, da 1 milione di cellule mononucleate del sangue periferico si possano selezionare circa  $3 \times 10^2$  EPC, cioè circa lo 0.05%. Tramite espansione *ex vivo*, invece, dallo stesso numero di cellule, si possono ottenere circa  $4-5 \times 10^4$  EPC, con un guadagno dell'ordine di 80-90 volte.

Uno studio recente in pazienti con infarto miocardico acuto ha peraltro dimostrato che l'infusione intracoronarica di EPC autologhe isolate da sangue periferico dello stesso paziente ed espanse in coltura determina rispetto all'impiego di cellule staminali del midollo osseo *in toto* i medesimi risultati clinici, in termini di frazione di eiezione, miglioramento del quadro clinico e prevenzione del rimodellamento postinfartuale<sup>111</sup>.

L'espansione *ex vivo* presenta inoltre il notevole vantaggio di poter assicurare un pool di EPC autologhe numericamente significativo anche in quei soggetti che, a causa di disfunzioni midollari legate ad altre patologie o all'età, non hanno un numero sufficiente di precursori midollari. Nella prospettiva di associare la terapia genica a quella cellulare, sappiamo inoltre che il trasferimento di geni è più facile in cellule *committed* (come le EPC) rispetto a cellule meno differenziate.

Abbiamo visto infine come alcuni studi abbiano proposto come altra fonte di terapia cellulare angiogenica i semplici leucociti e le piastrine presenti del sangue periferico. I leucociti (granulociti, monociti, macrofagi) e le piastrine sono infatti capaci di per sé di rilasciare un gran numero di citochine angiogeniche. È stato dimostrato che la loro iniezione diretta nel tessuto ischemico è in grado di indurre angiogenesi. Questa metodica che non presenterebbe effetti collaterali, è sicuramente meno invasiva e meno costosa (non richiedendo particolari tecnologie) rispetto a quella che si basa sull'uso delle cellule staminali midollari o delle EPC. I risultati dello studio TACT tuttavia, a differenza dei dati ottenuti nell'animale, non sembrano confermarne la stessa efficacia nell'uomo, se confrontate con le cellule staminali.

In conclusione, resta pertanto a nostro avviso importante cercare di indirizzare la ricerca preclinica nella messa a punto di modelli sperimentali di angiogenesi che siano più vicini alla fisiopatologia del quadro clinico dell'ischemia critica; di sviluppare e migliorare le tecniche di coltura e differenziamento cellulare *in vitro* per poter sperare di applicare la terapia cellulare angiogenica con le migliori possibilità di successo.

## Riassunto

È stimato che l'arteriopatia obliterante, di cui l'ischemia critica rappresenta il quadro evolutivo più drammatico, interessi il 15% degli adulti > 55 anni. I pazienti con ischemia critica degli arti inferiori che non sono candidabili ad interventi di rivascolarizzazione chirurgica o percutanea sono destinati alla perdita di un arto. Coloro che possono beneficiare di una rivascolarizzazione spesso vanno incontro a ricomparsa dei sintomi o ad ulteriori interventi di revisione chirurgica o ad amputazioni progressive. Nessuna terapia medica è ad oggi ritenuta valida per il trattamento del dolore a riposo o la guarigione delle lesioni trofiche che spesso affliggono questi pazienti.

La neoangiogenesi terapeutica, che ha lo scopo di migliorare il flusso ematico dei tessuti ischemici inducendo la formazione di nuovi vasi sanguigni, potrebbe rappresentare un'opzione terapeutica. La scoperta della possibilità di indurre la "gemmazione" di nuovi vasi da vasi preesistenti (angiogenesi) o di formare nuovi vasi tramite la differenziazione *in situ* di cellule endoteliali da precursori staminali (vasculogenesi) ha aperto nuovi orizzonti per questa patologia estremamente invalidante.

Sebbene di fatto ad oggi la maggior parte della sperimentazione è stata ottenuta in modelli animali che non rappresentano appieno la reale situazione clinica, i risultati di alcuni trial clinici incoraggiano a proseguire su questa nuova frontiera della ricerca. Questa revisione della letteratura è volta ad esaminare le potenziali applicazioni della terapia angiogenetica come possibile trattamento dell'ischemia degli arti inferiori. L'attenzione è stata posta in particolare alla lettura dei lavori sperimentali sulla terapia angiogenetica mediante cellule staminali.

*Parole chiave:* Angiogenesi; Cellule; Ischemia.

## Bibliografia

1. Hockel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. Arch Surg 1993; 128: 423-9.
2. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). J Vasc Surg 2000; 31 (Part 2): S1-S296.
3. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. Circulation 1991; 84 (Suppl): IV1-IV26.

4. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
5. Engler DA. Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis. *Circulation* 1996; 94: 1496-8.
6. Schaper W. Control of coronary angiogenesis. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl C): 66-8.
7. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
8. Ribatti D, Vacca A, Vico B, Roncalli L, Dammacco F. Post-natal vasculogenesis. *Mech Dev* 2001; 100: 157-63.
9. Beck L Jr, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11: 365-73.
10. Tabibiazar R, Rockson SG. Angiogenesis and the ischaemic heart. *Eur Heart J* 2001; 22: 903-18.
11. Kumar S, West D, Shahabuddin S, et al. Angiogenesis factor from human myocardial infarcts. *Lancet* 1983; 2: 364-8.
12. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2576-81.
13. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276: 1423-5.
14. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-43.
15. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835-46.
16. Liu B, Earl HM, Baban D, et al. Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 721-7.
17. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290-8.
18. Van Der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997; 95: 1030-7.
19. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153: 557-62.
20. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189-95.
21. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 768-72.
22. Ledoux D, Gannoun-Zaki L, Barritault D. Interactions of FGFs with target cells. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4: 107-20.
23. Xu X, Weinstein M, Li C, Deng C. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and their roles in limb development. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 33-43.
24. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996; 27: 1153-5.
25. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69: 508-17.
26. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; 92 (Suppl): II365-II371.
27. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4606-10.
28. Fujita M, Ikemoto M, Kishishita M, et al. Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 610-3.
29. Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res* 1993; 72: 7-19.
30. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-80.
31. Martins RN, Chleboun JO, Sellers P, Sleight M, Muir J. The role of PDGF-BB on the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Growth Factors* 1994; 10: 299-306.
32. Van Belle E, Witztenbichler B, Chen D, et al. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 1998; 97: 381-90.
33. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997; 80: 829-37.
34. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
35. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 2000; 102: 2255-61.
36. Emanuelli C, Zacheo A, Minasi A, et al. Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery induces angiogenesis in normoperfused skeletal muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2379-85.
37. Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, et al. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2001; 103: 125-32.
38. Kyriakides ZS, Petinakis P, Kaklamanis L, et al. Intramuscular administration of estrogen may promote angiogenesis and perfusion in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 626-33.
39. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 95: 1798-807.
40. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999; 100: 547-52.
41. Morris PB, Ellis MN, Swain JL. Angiogenic potency of nucleotide metabolites: potential role in ischemia-induced vascular growth. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 351-8.
42. Sunderkotter C, Beil W, Roth J, Sorg C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. *Am J Pathol* 1991; 138: 931-9.
43. Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991; 51: 195-216.

44. Polverini PJ. Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis. *Am J Pathol* 1996; 148: 1023-9.
45. Ando J, Nomura H, Kamiya A. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 1987; 33: 62-70.
46. Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest* 1997; 100: 18-24.
47. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-8.
48. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-9.
49. Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 2001; 96: 277-83.
50. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery* 2001; 130: 44-54.
51. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; 103: 897-903.
52. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
53. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3422-7.
54. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105: 1527-36.
55. Kobayashi T, Hamano K, Li TS, et al. Angiogenesis induced by the injection of peripheral leukocytes and platelets. *J Surg Res* 2002; 103: 279-86.
56. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002; 106: 2019-25.
57. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 1995; 91: 2802-9.
58. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; 21: 314-24.
59. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, et al. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 1996; 75: 487-501.
60. Takeshita S, Weir L, Chen D, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 628-35.
61. Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, et al. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation* 1997; 96 (Suppl): II382-II388.
62. Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, et al. Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 1998; 98: 1261-3.
63. Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT, et al. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg* 1998; 27: 699-709.
64. Vajanto I, Rissanen TT, Rutanen J, et al. Effects of intramuscular adenovirus mediated vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer to rabbit ischemic hindlimb. (abstr) *J Gen Med* 2000; 2 (Suppl): 76.
65. Pu LQ, Gadowski GR, Graham AM, et al. Enhanced revascularisation after angiogenic stimulation in a rabbit model of bilateral limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9: 189-96.
66. Chleboun JO, Martins RN, Mitchell CA, Chirila TV. bFGF enhances the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 510-6.
67. Garcia-Martinez C, Opolon P, Trochon V, et al. Angiogenesis induced in muscle by a recombinant adenovirus expressing functional isoforms of basic fibroblast growth factor. *Gene Ther* 1999; 6: 1210-21.
68. Shyu KG, Manor O, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb. *Circulation* 1998; 98: 2081-7.
69. Chae JK, Kim I, Lim ST, et al. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2573-8.
70. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol* 1994; 267 (Part 2): H1263-H1271.
71. Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 1995; 147: 1649-60.
72. Walder CE, Errett CJ, Bunting S, et al. Vascular endothelial growth factor augments muscle blood flow and function in a rabbit model of chronic hindlimb ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 91-8.
73. Hopkins SP, Bulgrin JP, Sims RL, Bowman B, Donovan DL, Schmidt SP. Controlled delivery of vascular endothelial growth factor promotes neovascularization and maintains limb function in a rabbit model of ischemia. *J Vasc Surg* 1998; 27: 886-94.
74. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994; 90 (Part 2): II228-II234.
75. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998; 2: 549-58.
76. Rivard A, Fabre JE, Silver M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999; 99: 111-20.
77. Gowdak LH, Poliakova L, Wang X, et al. Adenovirus-mediated VEGF<sub>121</sub> gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation* 2000; 102: 565-71.
78. Gowdak LH, Poliakova L, Li Z, Grove R, Lakatta EG, Talian M. Induction of angiogenesis by cationic lipid-mediated VEGF<sub>165</sub> gene transfer in the rabbit ischemic hindlimb model. *J Vasc Surg* 2000; 32: 343-52.
79. Witzschichler B, Asahara T, Murohara T, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153: 381-94.

80. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281-90.
81. Messina LM, Brevetti LS, Chang DS, Paek R, Sarkar R. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: invited commentary. *J Control Release* 2002; 78: 285-94.
82. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, et al. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362: 844-6.
83. Muhlhauser J, Pili R, Merrill MJ, et al. In vivo angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1457-65.
84. Rosengart TK, Budenbender KT, Duenas M, Mack CA, Zhang QX, Isom OW. Therapeutic angiogenesis: a comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. *J Vasc Surg* 1997; 26: 302-12.
85. Pu LQ, Snidermann AD, Brassard R, et al. Enhanced revascularization of the ischemic limb by angiogenic therapy. *Circulation* 1993; 88: 208-15.
86. Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedman P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181-91.
87. Yang HT, Deschenes MR, Ogilvie RW, Terjung RL. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. *Circ Res* 1996; 79: 62-9.
88. Jejurikar SS, Welling TH, Zelenock JA, et al. Induction of angiogenesis by lidocaine and basic fibroblast growth factor: a model for in vivo retroviral-mediated gene therapy. *J Surg Res* 1997; 67: 137-46.
89. Stark J, Baffour R, Garb JL, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates angiogenesis in the hindlimb of hyperglycemic rats. *J Surg Res* 1998; 79: 8-12.
90. Bush RL, Pevec WC, Ndoye A, Cheung AT, Sasse J, Pearson DN. Regulation of new blood vessel growth into ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1998; 28: 919-28.
91. Baffour R, Garb JL, Kaufman J, et al. Angiogenic therapy for the chronically ischemic lower limb in a rabbit model. *J Surg Res* 2000; 93: 219-29.
92. Yang HT, Feng Y, Allen LA, Protter A, Terjung RL. Efficacy and specificity of bFGF increased collateral flow in experimental peripheral arterial insufficiency. *Am J Physiol* 2000; 278: H1966-H1973.
93. Yang HT, Feng Y. bFGF increases collateral blood flow in aged rats with femoral artery ligation. *Am J Physiol* 2000; 278: H85-H93.
94. Tabata H, Silver M, Isner JM. 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: 470-9.
95. Ueno H, Li JJ, Masuda S, Qi Z, Yamamoto H, Takeshita A. Adenovirus-mediated expression of the secreted form of basic fibroblast growth factor (FGF-2) induces cellular proliferation and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2453-60.
96. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-4.
97. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-72.
98. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-23.
99. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998; 28: 964-73.
100. Rissanen TT, Vajanto I, Yla-Herttuala S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb - on the way to the clinic. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 651-66.
101. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, et al, for the TRAFFIC Investigators. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2053-8.
102. Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med* 2003; 114: 85-92.
103. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al, for the Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
104. Minamino T, Toko H, Tateno K, Nagai T, Komuro I. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? (letter) *Lancet* 2002; 360: 2083-4.
105. Inaba S, Egashira K, Komori K. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? (letter) *Lancet* 2002; 360: 2083.
106. Baumgartner I. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy: fact or fiction? *Am J Med* 2003; 114: 156-7.
107. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 1999; 58: 128-36.
108. Laitinen M, Zachary I, Breier G, et al. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1737-44.
109. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 743-6.
110. Di Stefano R, Santoni T, Barsotti MC, et al. Different growth conditions for peripheral blood endothelial progenitors. *Cardiovasc Radiat Med* 2002; 3: 172-5.
111. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.