

Preparaty genowe kodujące czynniki angiogenne efektywnie stymulują neowaskularyzację w skórze oraz wzrost włosów

Gene preparations encoding angiogenic factors effectively stimulate skin neovascularization and hair growth

Maciej Matecki¹, Karolina Podolska²

¹Zakład Biologii Komórki Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, p.o. kierownika Zakładu: doc. dr hab. Maciej Matecki
Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Jan Pachecka

²studentka Wydziału Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Post Dermatol Alergol 2008; XXV, 5: 199–205

Streszczenie

Wprowadzenie: Terapia genowa jest nową metodą leczenia chorób, wykorzystującą geny kodujące białka terapeutyczne. Powstawanie naczyń krwionośnych odgrywa kluczową rolę w warunkach fizjologicznych, a także determinuje przebieg chorób. Obecnie dzięki metodom inżynierii genetycznej możliwe jest konstruowanie preparatów genowych, które efektywnie stymulują procesy neowaskularyzacji, również w skórze. Ich obecność w badaniach może przyczynić się do rozwiązania wielu problemów ograniczających rozwój transplantologii, medycyny regeneracyjnej, chirurgii plastycznej czy kosmetologii.

Cel: Celem pracy była ocena, czy przygotowane proangiogenne preparaty genowe będą stymulować proces neowaskularyzacji w skórze i wzrost włosów.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na myszach laboratoryjnych *Balb/c*. Zwierzętom śródskórnym podawano DNA plazmidowe czyste lub skompleksowane z nośnikiem polikationowym PEI 25 kDa, efektywnie zwiększającym wydajność transfekcji genów *in vivo*. Do badań wykorzystano wektory kodujące białka proangiogenne, takie jak VEGF, FGF oraz SDF.

Wyniki: Preparaty genowe (pDNA:PEI) śródskórnym podane myszom efektywnie stymulują proces neowaskularyzacji oraz pobudzają wzrost włosów. Do najsilniejszych induktorów angiogenezy zaliczono preparaty pVIF:PEI oraz pSDF:PEI, natomiast efektywny wzrost włosów obserwowano po podaniu zwierzętom preparatu pVIF:PEI.

Wnioski: Proangiogenne preparaty genowe kodujące czynniki proangiogenne podane śródskórnym w formie kompleksów pDNA:PEI stymulują proces angiogenezy w skórze oraz pobudzają wzrost włosów.

Słowa kluczowe: terapia genowa, plazmidowe preparaty genowe, angiogeneza, skóra, wzrost włosów.

Abstract

Introduction: Gene therapy has become a novel method for the treatment of many diseases. Angiogenesis is a crucial process for the physiology as well as progression of various diseases. Currently, the construction of gene preparations that stimulate skin neovascularization is possible. It may be helpful for contemporary medicine.

Aim: The main aim of the study was to assess in mouse skin the proangiogenic activity of cloned plasmid expression vectors encoding angiogenic factors – VEGF, FGF and SDF.

Material and methods: The experiments were performed on *Balb/c* mice. The animals were intradermally injected with the studied vectors. The gene preparations were formulated as pDNA:PEI complexes.

Results: Proangiogenic gene preparations (pDNA:PEI) effectively stimulate skin neovascularization and hair growth. The pVIF:PEI and pSDF:PEI preparations were selected as the most powerful stimulators of skin neovascularization. Hair growth was observed mainly after intradermal injection of pVIF:PEI complexes.

Adres do korespondencji: doc. dr hab. Maciej Matecki, Zakład Biologii Komórki Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa, tel. +48 22 546 26 21, e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Conclusions: Gene preparations encoding proangiogenic factors injected into mouse as pDNA:PEI complexes effectively induce skin angiogenesis and stimulate hair growth. The results may have promising implications for further development of skin gene therapy.

Key words: gene therapy, plasmid gene preparations, angiogenesis, skin, hair growth.

Wprowadzenie

W zapoczątkowanych pod koniec lat 80. ubiegłego wieku próbach leczenia chorych metodami terapii genowej wykorzystuje się wirusowe lub niewirusowe preparaty genowe. Są to najczęściej wektory DNA niosące wybrane geny – kodujące, odpowiedzialne za efekt biologiczny, terapeutyczne białka. W obecnie przeprowadzanych badaniach klinicznych terapii genowej na świecie (ok. 40%) stosuje się wektory konstruowane na podstawie cząsteczki plazmidowego DNA [1]. Najczęściej wykorzystuje się plazmidy kodujące czynniki wzrostowe i ich receptory, regulatory cyklu komórkowego i apoptozy, czynniki decydujące o przebiegu angiogenezy [1, 2]. Geny – preparaty genowe – wprowadzane są najczęściej do tkanek, narządów dobrze dostępnych dla badacza, czyli mięśni, skóry i powierzchniowo umiejscowionych guzów nowotworowych [2, 3]. Bardzo często z uwagi na niską wydajność transfekcji genów *in vivo* plazmidowe DNA kompleksuje się z polimerami kationowymi, które – jak wykazują prace – ułatwiają wnikanie DNA do komórek [4]. Do nośników skutecznie zwiększających wydajność wprowadzania genów *in vivo*, także do skóry, zalicza się np. rozgałęzione lub liniowe polimery polietylenoiminowe (PEI) [4, 5]. Powstawanie naczyń krwionośnych oparte na strukturach już istniejących – angiogeneza – jest procesem złożonym, wieloetapowym, o którego przebiegu decyduje wypadkowa oddziaływania czynników angiogennych i antyangiogennych oraz środowiska tkankowego (komórki śródbłonkowe, fibroblasty, adipocyty, miocyty, makrofagi, monocyty) [6]. Doniesienia kliniczne i eksperymentalne wskazują, że naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF), fibroblastyczny czynnik wzrostu (ang. *fibroblast growth factor* – FGF) czy stromalny czynnik wzrostu (ang. *stromal derived factor* – SDF) mają silne właściwości proangiogenne – stymulują proliferację, migrację komórek śródbłonkowych, inicjują proces neowaskularyzacji tkankowej [6–8]. Wprowadzanie do wybranych tkanek (skóry, mięśni) genów kodujących czynniki proangiogenne powoduje w następstwie wydajnej transfekcji i ekspresji transgenów powstanie lokalnych gradientów stężeń rekombinowanych białek proangiogennych, które bezpośrednio decydują o przebiegu procesu neowaskularyzacji *in vivo* [9]. Jak pokazują wstępne badania, poprawa stanu klinicznego pacjentów leczonych preparatami genowymi (angiogeneza terapeutyczna) wynika bezpośrednio z neowaskularyzacji indukowanej przez wprowadzane do niedokrwnionych tkanek preparaty genowe ko-

dujące czynniki angiogenezy [9, 10]. Próby kliniczne angiogennej terapii genowej wykonuje się również w ośrodkach kardiologicznych w Polsce [11, 12].

Skóra jest rozległym narządem budującym ludzkie ciało. Spełnia wiele podstawowych zadań warunkujących prawidłowe funkcjonowanie organizmu człowieka. Jest aktywną biologicznie powłoką ciała, odgrywa rolę termoregulacyjną, wydzielniczą, a także wydalniczą. Fizjologiczny stan skóry jest wypadkową aktywności wielu narządów, a jej sprawność biologiczna łączy się również z funkcjonalnym ukrwieniem, warunkującym chociażby prawidłowy wzrost włosów. Unaczynienie (ukrwienie) skóry wpływa w decydujący sposób zarówno na jej sprawność biologiczną, jak i przebieg procesów starzenia. Rozwój technologii genowych umożliwił prowadzenie badań poświęconych poszukiwaniu różnorodnych środków leczniczych i skutecznych sposobów terapii. Obecnie możliwe wydaje się np. konstruowanie metodami inżynierii genetycznej ekspresyjnych wektorów plazmidowych poprawiających ukrwienie tkanek, tym samym polepszających czynność biologiczną narządów [10, 13]. Wydaje się prawdopodobne, że obecność plazmidów proangiogennych w badaniach może przyczynić się do rozwiązania wielu problemów ograniczających rozwój transplantologii, medycyny regeneracyjnej, chirurgii plastycznej czy kosmetologii.

Cel

W niniejszej pracy wykorzystano uzyskane drogą klonowania molekularnego wektory ekspresyjne kodujące wybrane, silne białka proangiogenne, takie jak VEGF, FGF oraz SDF. Celem badań była ocena, czy przygotowane proangiogenne preparaty genowe będą stymulować proces neowaskularyzacji w skórze i wzrost włosów. Badania przeprowadzono na myszach laboratoryjnych *Balb/c*. Zwierzętom śródskórnie podawano DNA plazmidowe czyste lub skompleksowane z nośnikiem polikationowym PEI 25 kDa, efektywnie zwiększającym wydajność transfekcji genów *in vivo*.

Materiał i metody

Proangiogenne plazmidy

W badaniach wykorzystano uzyskane wcześniej metodą klonowania molekularnego plazmidowe wektory ekspresyjne kodujące czynniki proangiogenne, takie jak pVEGF165, pFGF-2, pSDF-1 oraz wektor pVIF kodujący jednocześnie

VEGF165 oraz FGF-2 (wektor bicystronowy) [11]. Wklonowane geny znajdują się pod transkrypcyjną kontrolą promotora *cmv*. Wektory namnażano w systemie transformowanych bakterii *Escherichia coli*. Plazmidy izolowano metodą lizy alkalicznej, stosując zestawy do izolacji GigaEndofree (Qiagen). Uzyskane wektory poddawano analizie PCR (ang. *polymerase chain reaction*) oraz elektroforetycznej. Zastosowano startery o następujących sekwencjach: *amp*: 5'-ATAGTTGCCTGACTCC-3', 5'-GTTACATCGAACTGGA-3'; *Vegf165*: 5'-GCAGAATCATCACGAAGT-3', 5'-GCCTCGGCTTGTCACA-3'; *Fgf-2*: 5'-ATGAATTCGCCAGCATTGCCCGAGGAT-3', 5'-TTCTCGAGATTCAGCTCTTAGCAGACAT-3'; *Sdf-1*: 5'-AAGAAT-TCATGAACGCCAAGGTCGTG-3', 5'-AAACTCGAGTGCTTACTT-GTTAAAGCTTT-3'.

Kompleksy pDNA:PEI 25 kDa

Plazmidowe DNA kompleksowano z PEI 25 kDa (Sigma) w temperaturze pokojowej przez 20 min. Do badań indukcji angiogenezy przygotowano kompleksy zawierające 5 µg pDNA o współczynniku kompleksowania R=0,5, R=5 i R=10, natomiast do badania stymulacji wzrostu włosów wybrano preparaty zawierające 5 µg pDNA i R=5. Współczynnik R oznacza stosunek liczby naładowanych dodatnio grup iminowych polietylenoiminy (N) do ujemnie naładowanych grup fosforanowych plazmidowego DNA (P), N/P=R. Skuteczność kompleksowania, obecność kompleksów pDNA:PEI w uzyskanych preparatach potwierdzono za pomocą analizy elektroforetycznej. Kompleksy przygotowano bezpośrednio przed podaniem zwierzętom laboratoryjnym.

Test skórnej angiogenezy *in vivo*, ocena wzrostu włosów

Do badań wykorzystano 6–8-tygodniowe myszy *Balb/c* (samce). Zwierzęta usypiano 3,6-procentowym roztworem wodzianu chloralu i usuwano włosy za pomocą preparatu Nair. Następnie wykonano śródskórne iniekcje wektorów proangiogennych pVEGF165, pFGF-2, pVIF, pSDF-1 (w dawce 5 i 10 µg/0,125 ml 0,9% NaCl) oraz kompleksów wymienionych wektorów z polietylenoiminą 25 kDa (w dawce 5 µg/0,125 ml 0,9% NaCl/PEI, R=0,5, R=5 i R=10). Do iniekcji kontrolnych wykorzystano pusty wektor pEMPTY oraz 0,9-procentowy roztwór NaCl. W celu ułatwienia wizualizacji miejsca wstrzyknięcia preparaty barwiono 0,1-procentowym roztworem błękitu trypanu. Po 72 godz. zwierzęta uśpiono preparatem Morbital, a miejsca wstrzyknięcia analizowano pod lupą (32×), licząc nowe naczynia zgodnie z kryteriami opisanymi przez Sidky'ego i Auerbacha [14]. Części myszy podano śródskórnie preparaty wektorów proangiogennych skompleksowanych z PEI 25 kDa (5 µg/0,125 ml 0,9% NaCl/PEI R=5). Obserwowano wzrost włosów w miejscach iniekcji. W tym celu usunięto włosy preparatem Nair, podano śródskórnie plazmidy, zaznaczając miejsca podania. Pozostawiono następnie myszy na 14 dni, po czym znów usunięto włosy

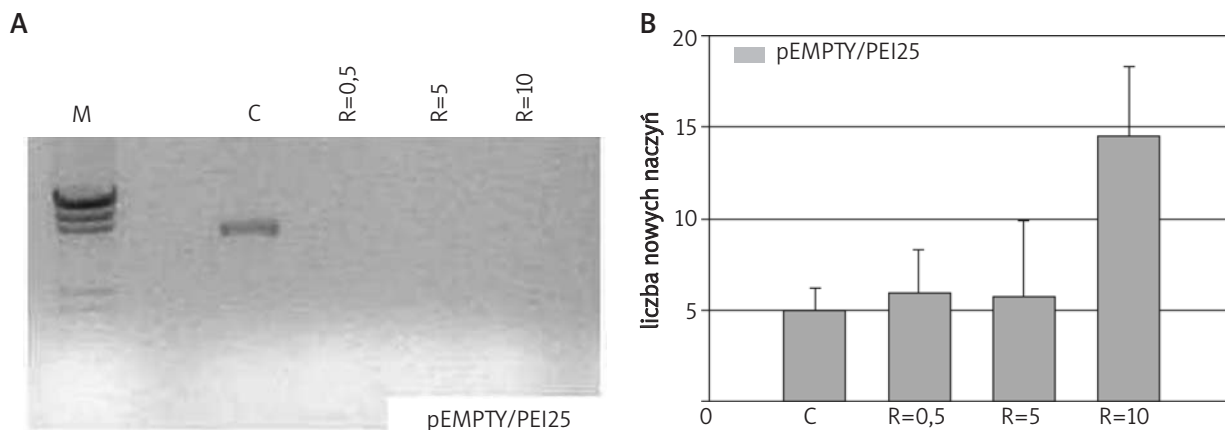
i obserwowano ich pojawianie się w miejscach wstrzyknięcia plazmidów. Wykonano fotografie, usunięto powtórnie włosy z miejsc podania. Pobrano zaznaczone fragmenty skóry, w obszarze którym obserwowano silną angiogenezę i wzrost włosów. Z pobranej tkanki wyizolowano DNA metodą Qiagen (zestaw Midiprep). Analizowano obecność sekwencji plazmidowych metodą PCR.

Wyniki i omówienie wyników

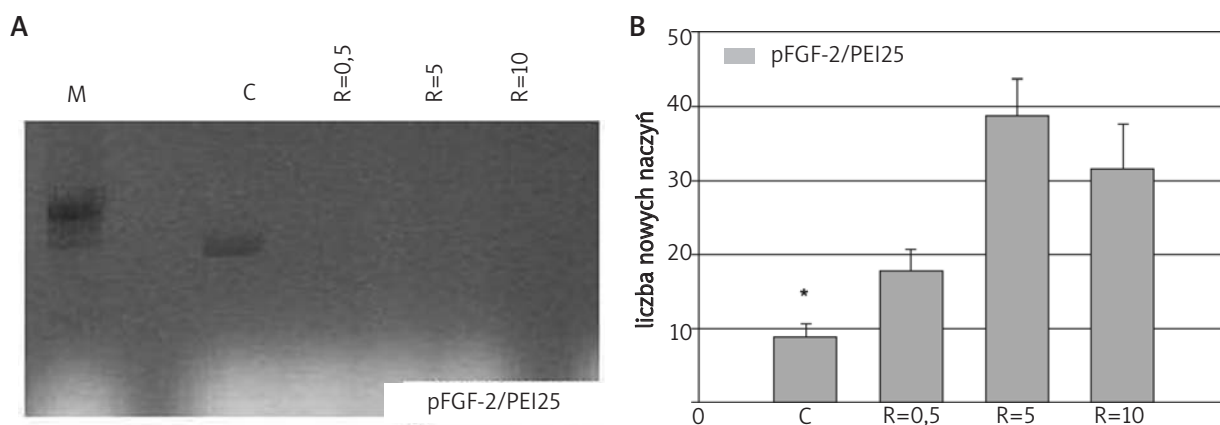
Dynamiczny rozwój nowych technologii farmaceutycznych sprawia, że jest możliwe projektowanie, wytwarzanie i stosowanie w warunkach klinicznych nowych środków leczniczych, również dermatologicznych. Znana w klinice od końca lat 80. ubiegłego wieku terapia genowa wykorzystuje preparaty genowe kodujące białka, spełniające funkcje terapeutyczne. Proangiogenne preparaty genowe zawierają geny czynników silnie stymulujących proces neowaskularyzacji *in vivo* [9, 10]. Pierwsze próby kliniczne wskazują, że np. proangiogenne wektory plazmidowe silnie pobudzają angiogenezę w mięśniach szkieletowych oraz w sercu pacjentów cierpiących na choroby niedokrwienne [1, 10–12].

Jak przedstawiono na ryc. 1–5., w wyniku połączenia plazmidowego DNA z polietylenoiminą 25 kDa powstają trwałe kompleksy pDNA:PEI. Analizy elektroforetyczne (test opóźnienia w żelu), widoczne na ryc. 1–5., panel A, ukazują, że przy stosunku grup iminowych (PEI) do fosforanowych (pDNA) 0,5–10 (R=0,5–10) polimer kationowy PEI całkowicie kompleksuje plazmidowe DNA. Powstałe kompleksy migrują w żelu agarozowym w formie niewidocznych plam.

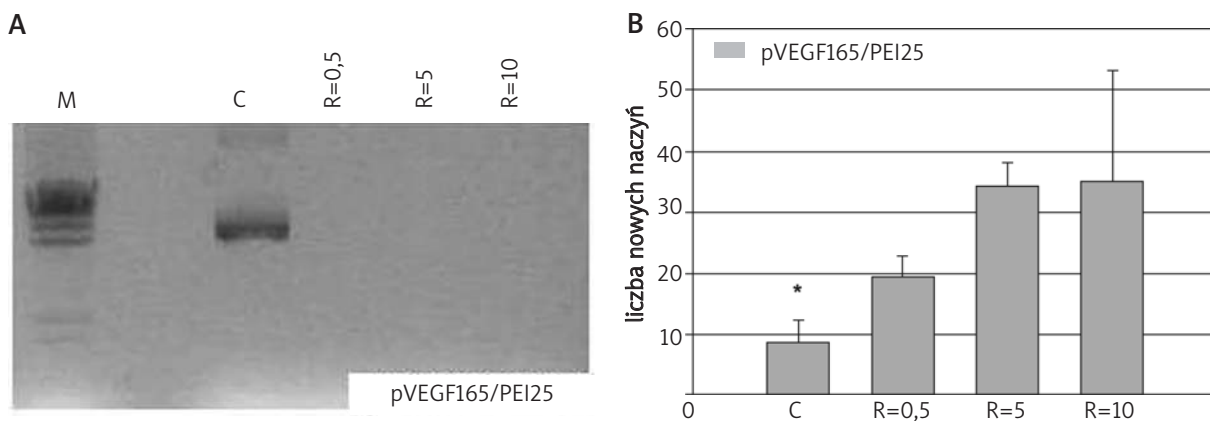
Celem doświadczeń *in vivo* na zwierzętach była ocena, czy sklonowane plazmidy proangiogenne opaszczone nośnikiem polietylenoiminowym, czyli struktury o wypadkowym ładunku dodatnim, efektywnie transfekują komórki skóry i pobudzą neowaskularyzację. Mysiom laboratoryjnym śródskórnie podawano kompleksy pDNA:PEI o R=0,5, R=5 oraz R=10. Wykazano (ryc. 1–5.), że PEI ułatwia wnikanie plazmidów proangiogennych do komórek. Wyniki testu angiogenezy skórnej zebrane w tab. 1. wskazują, że stymulacja angiogenezy przez kompleksy pDNA:PEI jest kilkakrotnie wyższa niż czystego plazmidowego DNA – np. wprowadzenie do skóry 5 µg czystego preparatu pVEGF165 powoduje powstanie ok. 8 nowych naczyń krwionośnych, natomiast podanie kompleksu pVEGF165:PEI indukuje powstanie blisko 30 naczyń. Z tab. 1. wynika, że wszystkie sklonowane wektory stymulują proces neoangiogenezy w skórze. Do najsilniej aktywujących powstanie nowych naczyń krwionośnych zaliczyć jednak można wektor pVIF oraz pSDF-1 (ryc. 4., 5.). Wektor pVIF koduje dwa czynniki proangiogenne – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF165) oraz fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF-2), natomiast wektor pSDF-1 – białko SDF-1. Wektory pVIF i pSDF-1 podane śródskórnie myszom w formie kompleksów z nośnikiem PEI stymulują angiogenezę najprawdopodobniej na zasadzie



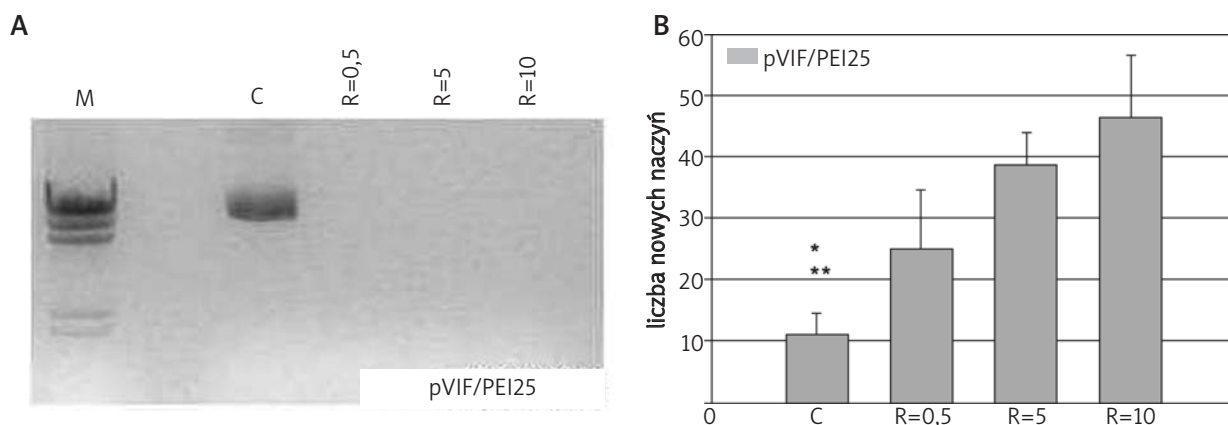
Ryc. 1. A – rozdział elektroforetyczny kompleksów pEMPTY: PEI25. **B** – liczba nowych naczyń krwionośnych w skórze transfekowanej wektorem pEMPTY (plazmid niekodujący czynników angiogennyh; kontrola) skompleksowanym z PEI25 (R=0,5, R=5, R=10)
C – plazmid pEMPTY nieskompleksowany z PEI25



Ryc. 2. A – rozdział elektroforetyczny kompleksów pFGF-2:PEI25. **B** – liczba nowych naczyń krwionośnych w skórze transfekowanej wektorem pFGF-2 skompleksowanym z PEI25 (R=0,5, R=5, R=10)
C – plazmid pFGF-2 nieskompleksowany z PEI25
*między grupą C a pozostałymi występuje różnica znamienna statystycznie, $p < 0,01$ (Student's t-test)



Ryc. 3. A – rozdział elektroforetyczny kompleksów pVEGF165:PEI25. **B** – liczba nowych naczyń krwionośnych w skórze transfekowanej wektorem pVEGF165 skompleksowanym z PEI25 (R=0,5, R=5, R=10)
C – plazmid pVEGF165 nieskompleksowany z PEI25
*między grupą C i pozostałymi występuje różnica znamienna statystycznie, $p < 0,01$ (Student's t-test)

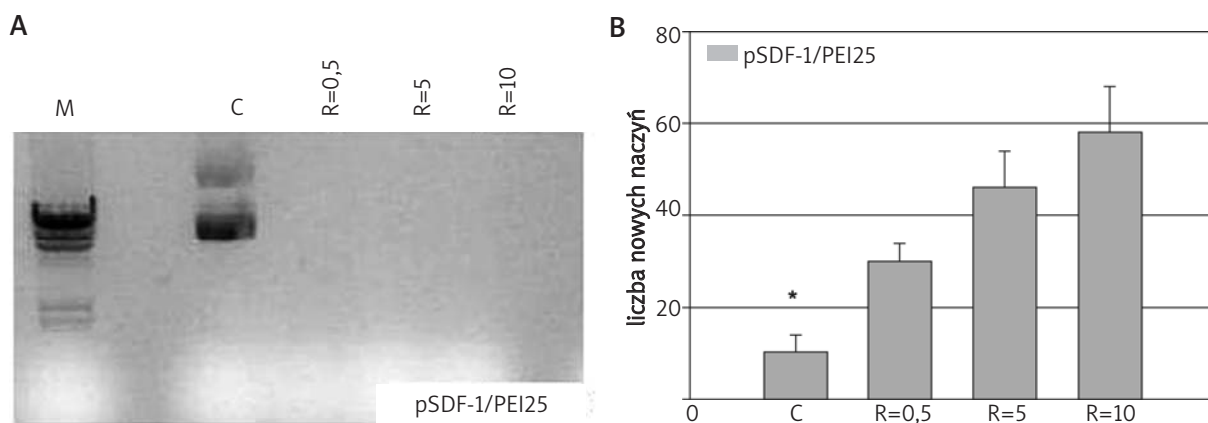


Ryc. 4. A – rozdział elektroforetyczny kompleksów pVIF:PEI25. **B** – liczba nowych naczyń krwionośnych w skórze transfekowanej wektorem pVIF skompleksowanym z PEI25 (R=0,5, R=5, R=10)

C – plazmid pVIF nieskompleksowany z PEI25

*między grupą C a grupą R=0,5 występuje różnica znamienna statystycznie, $0,05 > p > 0,01$

**między grupą C a grupami R=5, R=10 występuje różnica znamienna statystycznie, $p < 0,01$ (Student's t-test)



Ryc. 5. A – rozdział elektroforetyczny kompleksów pSDF-1:PEI25. **B** – liczba nowych naczyń krwionośnych w skórze transfekowanej wektorem pSDF-1 skompleksowanym z PEI25 (R=0,5, R=5, R=10)

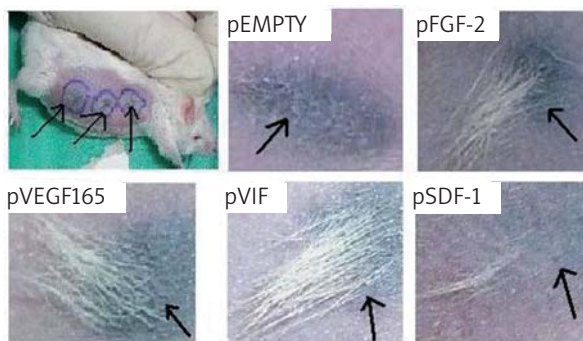
C – plazmid pSDF-1 nieskompleksowany z PEI25

*między grupą C a pozostałymi występuje różnica znamienna statystycznie, $p < 0,01$ (Student's t-test)

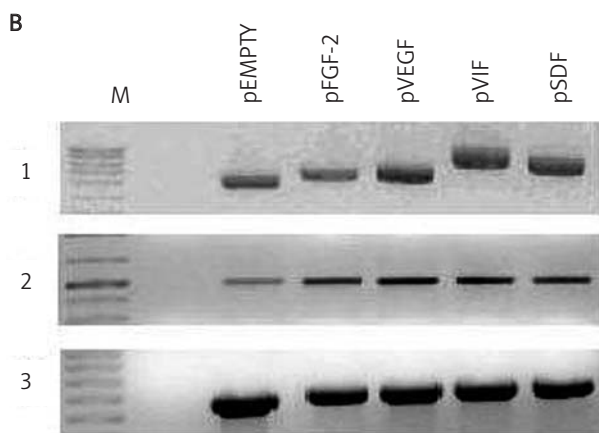
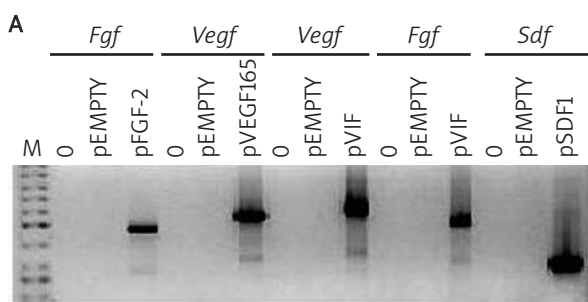
Tab. 1. Liczba nowych naczyń krwionośnych w skórze transfekowanej plazmidami kodującymi czynniki proangiogenne

Plazmid	Liczba nowych naczyń krwionośnych		
	10 μ g pDNA	5 μ g pDNA	5 μ g pDNA/PEI*
pEMPTY	5,0 \pm 1,1 n=7	5,0 \pm 1,2 n=7	8,8 n=14
pVEGF165	14,3 \pm 2,1 n=11	8,6 \pm 3,8 n=12	29,4 n=29
pFGF-2	11,9 \pm 1,8 n=9	9,0 \pm 1,7 n=8	29,4 n=20
pVIF	21,3 \pm 1,8 n=12	11,2 \pm 3,3 n=6	36,7 n=20
pSDF-1	25,0 \pm 2,1 n=12	10,5 \pm 3,3 n=8	44,8 n=19

Wektory (pVEGF165, pFGF-2, pVIF, pSDF-1 i pEMPTY) były wprowadzane śródskórnym jako czyste pDNA oraz w postaci kompleksów z PEI 25 kDa (pDNA:PEI).
*średnia liczba nowych naczyń krwionośnych po indukcji za pomocą kompleksów o R=0,5, R=5 i R=10



Ryc. 6. Stymulacja wzrostu włosów przez proangiogenne preparaty genowe (pFGF-2, pVEGF165, pVIF oraz pSDF-1) podane śródskórnie myszom w formie kompleksów pDNA:PEI. Obraz po 18 dniach od iniekcji



Ryc. 7. A – rozdziel elektroforetyczny amplifikowanych metodą PCR genów proangiogennych (cDNA) obecnych w sklonowanych wektorach (kontrola preparatów przed podaniem); *Fgf* – 440 bp, *Vegf* – 560 bp, *Sdf* – 240 bp. **B** – rozdziel elektroforetyczny amplifikowanych metodą PCR sekwencji pDNA obecnych w DNA wyizolowanym z transfekowanych skór (kontrola obecności preparatu w skórze po podaniu): 1 – rozdziel plazmidów (pEMPTY: 5200 bp; pFGF-2: 5621 bp; pVEGF165: 5723 bp; pVIF: 6960 bp; pSDF-1: 6370); 2 – kontrola *GAPDH* (500 bp); 3 – amplifikacja fragmentu pDNA – genu *amp* (760 bp)

odmiennych procesów. Główny mechanizm proangiogennej aktywności VEGF sprowadza się do stymulacji swoistych receptorów (głównie VEGFR1 i VEGFR2) na komórkach śródbłonkowych, natomiast SDF-1 jest chemokiną przede wszystkim oddziałującą na śródbłonkowe komórki progenitorowe [7, 8, 15].

W niniejszej pracy preparaty proangiogenne wektorów – plazmidowego DNA i nośnika polietylenoiminy – próbowano wykorzystać do indukcji neowaskularyzacji w skórze, jak również do stymulacji wzrostu włosów. Dane eksperymentalne wykazują, że właściwe ukrwienie skóry może być decydujące dla prawidłowego wzrostu włosów [16–18]. W pracy wzrost włosów stymulowano przez indukcję angiogenezy za pomocą preparatów genowych. Stosowano preparaty o jakości farmakopelnej. Niektóre z zastosowanych, np. wektory pVEGF165 i pVIF, są dopuszczone do prób klinicznych terapii genowej chorób naczyniowo-sercowych w Polsce [11, 12]. Z obserwacji wzrostu włosów u myszy, którym podano śródskórnie plazmidy proangiogenne (kompleksy pDNA:PEI, R=5) wynika, że preparaty genowe silnie stymulujące skórną angiogenezę pobudzają również wzrost włosów. Efekt obserwowano po ok. 14–18 dniach od iniekcji. Jak przedstawiono na ryc. 6. najsilniej wzrost włosów pobudza bicystronowy wektor pVIF. Wyniki wskazują, że silna, lokalna ekspresja cytokin VEGF i FGF wzmacnia angiogenezę i wzrost włosów. Metodą PCR (ryc. 7.) potwierdzono obecność sekwencji plazmidowych w miejscach silnej angiogenezy i intensywnego wzrostu włosów.

Wnioski

W pracy analizowano trzy geny proangiogenne – *Vegf*, *Fgf* oraz *Sdf*, które w formie wektorów plazmidowych kompleksowano z polietylenoiminą 25 kDa i wprowadzono śródskórnie do zwierząt laboratoryjnych. Poszukiwano kompleksów najefektywniej wprowadzających geny proangiogenne do komórek skóry i stymulujących tym samym skórną angiogenezę. W wyniku badań stwierdzono, że do najsilniejszych induktorów neowaskularyzacji zalicza się wektory pVIF i pSDF w postaci kompleksów pDNA:PEI o współczynniku kompleksowania R=5. Jak pokazują wyniki badań (tab. 1, ryc. 1–5., 7.) wykorzystane preparaty efektywnie stymulują neoangiogenezę w skórze zwierząt laboratoryjnych. Stwierdzono, że po śródskórnej iniekcji preparatów dochodzi do tworzenia kapilar oraz obserwuje się również silny wzrost włosów (ryc. 6.). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że z wykorzystanych preparatów genowych proangiogenne wzrost włosów najsilniej pobudza preparat bicystronowego wektora pVIF (kompleks pDNA:PEI, R=5).

Piśmiennictwo

1. www.wiley.com.
2. Rosa DD, Ismael G, Lago LD, Awada A. Molecular-targeted therapies: lessons from years of clinical development. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 61-80.
3. Kawakami S, Higuchi Y, Hashida M. Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide. *J Pharm Sci* 2008; 97: 726-45.
4. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60: 247-66.
5. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 2: 7297-301.
6. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-4.
7. Ferrara N, Garber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 6: 669-76.
8. Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med* 2004; 8: 509-18.
9. Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003; 9: 694-9.
10. Malecki M, Kolsut P, Proczka R. Angiogenic and antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther* 2005; 12 (Suppl 1): S159-69.
11. Kolsut P, Malecki M, Zelazny P, et al. Gene therapy of coronary artery disease with pvegf165 – early outcome. *Kardiol Pol* 2003; 59: 373-84.
12. Kukuła K, Dąbrowski M, Chojnowska L i wsp. Podstawy teoretyczne i plan badania VIFCAD – terapii genowej choroby wieńcowej u pacjentów bez możliwości zabiegowej rewaskularyzacji z zastosowaniem podawanego trans-endokardialnie plazmidu bicystronowego VEGF/FGF. *Post Kardiol Interw* 2006; 2: 116-23.
13. Paller AS. Genetic disorders of skin: a decade of progress. *Arch Dermatol* 2003; 139: 74-7.
14. Sidky YA, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-vs-host reaction. *J Exp Med* 1975; 141: 1084-100.
15. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007; 28: 299-307.
16. Detmar M. The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci* 2000; 24 (Suppl 1): S78-84.
17. Chang E, Yang J, Nagavarapu U, Herron GS. Aging and survival of cutaneous microvasculature. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 752-8.
18. Fujihara Y, Koyama H, Ohba M, et al. Controlled delivery of bFGF to recipient bed enhances the vascularization and viability of an ischemic skin flap. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 125-31.