

Terapeutický potenciál bioaktívnych molekúl secernovaných kmeňovými bunkami zubnej drene

Dana IVANIŠOVÁ¹, Dušan Hollý², Martin BOHÁČ¹

¹Regenmed spol. s r. o., Medená 29, 811 02 Bratislava; ²Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Heydukova 10, 812 50 Bratislava

Súhrn

Relatívne nedávno bol objavený alternatívny zdroj mezenchymálnych kmeňových buniek (MSCs) - kmeňové bunky zubnej drene (DPSCs), získaný z mliečnych a dospelých zubov, ktoré môžu predstavovať potenciálne nástroje pre regeneratívnu medicínu. DPSCs pochádzajú z neurálnej lišty a normálne sa podieľajú na homeostáze dentínu. Klinická aplikácia MSCs zahŕňajúca aj DPSCs je ovplyvnená rôznymi obmedzeniami, ako sú vysoké náklady, nízka bezpečnosť a problémy s manipuláciou s bunkami, ako aj invazívne postupy odberu vzoriek. Hoci implantácia MSCs ponúka priaznivé výsledky pri špecifických ochoreniach, implantované MSCs nemôžu prežiť dlhú dobu. Predpokladá sa teda, že ich sprostredkovaný mechanizmus účinku zahŕňa parakrinné účinky. V tomto prehľade sa zameriavame na opis charakteristík kondicionovaných médií pripravených z DPSCs (DPSC-CM) a ich terapeutického potenciálu v regeneratívnej medicíne.

Kľúčové slová: kmeňové bunky zubnej drene, secernované faktory, regenerácia, imunomodulácia

Important neuropeptides in the context of anxiety and depressive disorders

Summary

Relatively recently, an alternative source of mesenchymal stem cells (MSCs) - dental pulp stem cells (DPSCs), obtained from deciduous and adult teeth has been discovered, which may represent potential tools for regenerative medicine. DPSCs originate from the neural crest and are normally involved in dentin homeostasis. The clinical application of MSCs, including DPSCs, is affected by various limitations, such as high cost, low safety and cell handling problems, as well as invasive sampling procedures. Although the implantation of MSCs offers favorable results in specific diseases, the implanted MSCs cannot survive for a long time. Thus, their mediated mechanism of action is thought to involve paracrine effects. In this review, we focus on describing the characteristics of conditioned media prepared from DPSCs (DPSC-CM) and their therapeutic potential in regenerative medicine.

Keywords: dental pulp stem cells, secreted factors, regeneration. immunomodulation

Úvod

Mikroprostredie ústnej dutiny, ktoré tvoria zuby, ďasná a jazyk, je jedným z najšpecializovanejších útvarov kraniofaciálneho skeletu a tvorí výborný vývojový model tvorby orgánov. Okrem toho táto komplexná a sofistikovaná štruktúra ponúka veľký potenciál pre regeneratívnu medicínu vďaka bohatým zdrojom rôznych typov MSCs. Zdá sa, že

najnovšie objavené kmeňové bunky v repertoári mezenchymálnych kmeňových buniek, DPSCs, majú obrovský potenciál pre vývojové, diferenciačné, regeneračné a imunomodulačné vlastnosti [1].

DPSC pochádzajúce z detskej alebo dospeljej ľudskej zubnej drene boli pôvodne objavené Gronthosom a kolegami v roku 2000 [2]. DPSCs boli izolované na základe vysokej proliferácie a frekvencie kolonizácie, pričom produkovali sporadické, ale husto kalcifikované zhluky. Okrem toho sa DPSCs významne nelíšia od MSCs odvodených z tukového tkaniva, kostnej drene a tkaniva pupočníka, pokiaľ ide o ich povrchové markery – sú pozitívne na CD29, CD90, CD105, CD73 a CD44 a negatívne na markery hematopoetických a endotelových buniek (CD14, CD34 a CD45). Vykazujú aj podobnú dferenciačnú kapacitu [1].

Je známe, že MSCs sa podieľajú na raste, hojení rán a náhrade buniek za normálnych aj patologických stavov. Tieto bunky preukázali účinnosť pri regenerácii periodontálneho tkaniva, ischemického tkaniva končatín, poškodenia kostí vyvolaného osteonekrózou, kožných lézií po popáleninách, atď. K dnešnému dňu sa uskutočnilo veľa predklinických experimentov aj s použitím DPSCs a existujú informácie, že DPSC sa diferencujú na rôzne bunky, napr. nervové bunky, dopaminergné neuróny, myotuby, bunky podobné hepatocytom a keratocyty [3]. Neexistujú však žiadne správy o rozsiahlych klinických štúdiách. Problémom pri používaní kmeňových buniek je riziko rozvoja rakoviny a potreba špeciálnych zariadení na spracovanie buniek [4].

Rôzne predchádzajúce štúdie ukázali, že transplantované bunky môžu mať viaceré a významné úlohy, môžu nielen migrovať v tkanivách hostiteľa a priamo sa podieľať na regenerácii tkaniva, ale môžu mať aj parakrinné účinky (obr. 1). DPSC produkujú cytokíny, ktoré môžu znížiť zápal, zvýšiť proliferáciu progenitorových buniek, zlepšiť opravu tkaniva a znížiť infekciu účinnejšie v porovnaní s MSC derivovanými z kostnej drene [5]. Cieľom tohto prehľadu je teda poukázať na terapeutický účinok secernovaných faktorov z DPSC na rôzne ochorenia, ako aj na mechanizmus ich účinku.

Bioaktívne molekuly secernované DPSCs

Predchádzajúce výskumy ukázali, že DPSC-kondicionované médiá (DPSC-CM) obsahujú rôzne bioaktívne molekuly. Ukázalo sa že sú signifikatne lepším zdrojom protizápalových cytokínov ako BMMSC-kondicionované médiá. Produkujú napr. interleukín 10 (IL-10), IL-13, follistatín, transformujúci rastový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Okrem toho produkujú aj rastový faktor hepatocytov (HGF), adhéznú molekulu nervových buniek 1 (NCAM-1), adiponektín, matrixovú metaloproteinázu 13 (MMP-13), neurotrofin 3 (NT-3), neurotrofický faktor odvodený z mozgu (BDNF) a MMP-9 [6].

Vzťah medzi DPSC-CM a exozómami

DPSC-CM obsahuje predovšetkým cytokíny a nepatrný počet exozómov sekretovaných DPSCs. Preto sa predpokladá, že DPSC-CM je neimunogénny, čo podporuje ich použitie u rovnakého alebo iného živočíšneho druhu. Mechanizmus pôsobenia secernovaných faktorov reguluje najmä rovnováhu medzi týmito protizápalovými a prozápalovými cytokínmi v konkrétnom tkanive.

Za exozómy sa označujú špecifické extracelulárne vezikuly s priemerom 40–150 nm. Následne môžu byť exozómy internalizované inými bunkami, najmä fagocytózou a fúziou s bunkovou membránou a interakciou receptor-ligand, čo im umožňuje uvoľniť ich obsah do cytoplazmy. Regeneračný potenciál exozómov môže byť modulovaný rôznymi mechanizmami, vrátane predchádzajúcej expozície pôvodnej bunkovej populácie vonkajším stimulom [7]. Primárne funkčné molekuly exozómov však zostávajú nejasné a v súčasnosti

neexistuje jednotné dávkovanie, spôsob podávania alebo skladovacia schéma pre bezbunkovú terapiu, preto je na vyriešenie týchto problémov potrebný ďalší systematický a rozsiahly výskum.

Terapeutický význam kondicionovaných médií

Ischemické choroby srdca, ako napríklad infarkt myokardu (IM), patria medzi hlavné príčiny úmrtí na celom svete. IM zvyčajne vedie k ireverzibilnému poškodeniu tkanív srdca a súvisiaca mortalita a morbidita zostávajú vysoké aj napriek pokrokom v medicíne. Vývoj účinných doplnkových terapií pre pacientov s IM je preto stále nevyhnutný. Bolo preukázané, že podávanie DPSC-CM znížilo rizika IM a zvýšilo srdcovú funkciu u myši po ischemickej reperfúzii. To korelovalo s ischemickou apoptózou srdca a zníženým zápalom [8,9]. Yamaguchi a kol. ukázali, že DPSC-CM indukuje prežitie kardiomyocytov ako odpoveď na hypoxiu a sérovú depriváciu a že DPSC-CM znižuje expresiu prozápalových mediátorov podporovaných lipopolysacharidom [8]. Podávanie DPSC-CM tak môže chrániť srdce pred ischemickým poškodením aspoň dvoma mechanizmami sprostredkujúcimi zníženie apoptózy kardiomyocytov a potlačenie zápalových reakcií v bunkách myokardu.

Existuje niekoľko štúdií týkajúcich sa terapie CNS kondicionovanými médiami [10,11]. Aplikácia DPSCs podporuje funkčné zotavenie z rôznych akútnych a chronických inzultov CNS prostredníctvom parakrinných mechanizmov, ktoré indukujú endogénne aktivity na opravu tkaniva [12]. Mŕtvica je celosvetovo treťou najčastejšou príčinou smrti a najčastejšou príčinou dlhodobej invalidity u ľudí. Nedávno sa ukázalo, že transplantácia mononukleárných buniek kostnej drene dosahuje klinickú účinnosť podporou angiogenézy u pacientov s cerebrálnou ischémiou [13]. Na zvieracom modeli fokálnej cerebrálnej ischémie, DPSC-CM a BMMSC-CM rovnako inhibovali expresiu prozápalových cytokínov a markerov oxidatívno-nitrozatívneho stresu. Naopak, DPSC-CM selektívne aktivoval mikrogliu typu M2, čo viedlo k expresii mRNA kódujúceho BDNF, neurotrofinu, ktorý má kľúčovú úlohu v synaptickej remodelácii korelovanej s rozvojom pamäte v dospelom hipokampe [14]. Na modeli potkanov aneuryzmálneho subarachnoidálneho krvácania (aSAH) sa pozoroval potenciálny synergický účinok DPSC-CM. Pozorovali sa najmä vysoké hladiny tkanivového inhibítora metaloproteináz (TIMP-2) v DPSC-CM, ktoré sú kľúčové pre udržanie tkanivovej homeostázy [10].

Akútne zlyhanie pečene (AZP), ktoré môže byť spôsobené rôznymi vplyvmi, ako sú lieky, vírusy a ischemiotoxíny, môže viesť k masívnej deštrukcii hepatocytov a neobmedzenej zápalovej odpovedi. Hoci pečeň má vysokú regeneračnú kapacitu, pri chronickom poškodení sa mnohokrát nedá dosiahnuť jej regenerácia a mnohokrát môže viesť ku smrti. Na potkaních modeloch AZP sa zistilo, že BMMSC-CM má terapeutický účinok [15]. Matsushita a kol. navrhol využitie DPSC-CM pre potreby liečby AZP [16]. Ďalej bolo zistené, že HGF ako multifunkčný proteín, zabraňuje apoptóze hepatocytov, indukuje proliferáciu progenitorových buniek pečene a podporuje neovaskularizáciu [17]. Faktory kmeňových buniek (SCF) inhibujú hepatickú apoptózu pri AZP [18]. Proteín viažuci rastový faktor podobný inzulínu (IGFBP-1) a TIMP-1 inhibujú apoptózu hepatocytov pri AZP [19]. Angiogenín, vaskulárny endotelový rastový faktor A (VEGF-A) a vaskulárny endoteliálny rastový faktor odvodený od endokrinného systému (EGVEGF) sú zavedené angiogénne promótoary, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri neovaskularizácii po poškodení pečene [20]. Faktory zahrnuté v DPSC-CM a faktory na opravu endogénneho tkaniva indukované terapeutickou funkciou DPSC-CM v kombinácii zmierňujú AZP.

MSCs sú výnimočné aj ako kandidáti na vhodné imunosupresívum počas transplantácie solídnych tkanív a orgánov ako aj na liečbu reakcie štetu vs. hostiteľ,

zápalových ochorení, ako aj iných autoimunitných ochorení. Prvé štúdie ukázali, že DPSCs významne blokujú proliferáciu stimulovaných T buniek v porovnaní s BMMSCs [21]. DPSCs inhibovali proliferáciu mononukleárných buniek periférnej krvi, ktorá bola stimulovaná mitogénom alebo bola v alogénnej zmiešanej lymfocytovej reakcii, čo naznačuje význam rozpustných faktorov. V predchádzajúcich štúdiách sa preukázalo, že toll-like receptory sú vo všeobecnosti distribuované v bunkách imunitného systému a môžu aktivovať imunosupresiu DPSCs zvýšením expresie TGF- β a IL-6 [22,23]. Najnovšie, Matsumura-Kawashima a kol. podávali DPSC-CM neobéznyim diabetickým myšiam (primárny Sjögrenov syndróm, čo je chronické, systémové autoimunitné ochorenie charakterizované zápalom exokrinných žliaz a funkčným poškodením slinných a slzných žliaz). DPSC-CM vyvinul ochranný účinok na sekrečnú funkciu slinných žliaz. Okrem toho DPSC-CM zlepšila hyposaliváciu znížením expresie zápalových cytokínov, podporou regulačných T buniek v slezine prostredníctvom dráhy TGF- β /Smad, kontrolou lokálneho zápalového mikroprostredia a znížením apoptózy v iných žľazách [24].

Diabetes mellitus je metabolický stav charakterizovaný prevažne chronickou hyperglykémiou, ktorá je spôsobená inzulínovou rezistenciou alebo poruchou sekrécie inzulínu. Celkovo sa u 75 % obéznych pacientov nevyvinie cukrovka v dôsledku účinku kompenzačnej sekrécie inzulínu, ale udržanie funkčných pankreatických β -buniek sa považuje za konečný výsledok liečby cukrovky. Bolo ukázané, že DPSC-CM ovplyvnilo regeneráciu pankreatických β -buniek u streptozotocínom stimulovaných diabetických myší. Izumoto-Akita a kol. poukázali, že za tento proces by mohli byť zodpovedné faktory vylučované z kmeňových buniek [25]. Predchádzajúce štúdie ukázali, že VEGF hrá kľúčovú úlohu v proliferácii a vývoji pankreatických β -buniek a stimulácia fosfoinozítid 3-kinázy potláča bunkovú smrť, proliferáciu a funkciu pankreatických β -buniek [26]. Okrem toho skúmanie frakcionovaného DPSC-CM na základe molekulovej hmotnosti odhalilo, že v porovnaní s DMEM frakcia viac ako 100 kDa zvýšila životaschopnosť buniek MIN6 (myšia pankreatická β -bunková línia) [25]. Taktiež bolo opísané, že DPSCs sa diferencujú na pankreatické β -like bunky, čo naznačuje, že DPSC-CM bežne obsahujú sekretované faktory ovplyvňujúce diferenciačné dráhy, funkciu a sekréciu medzi nervovými bunkami a pankreatickými β -bunkami [27].

Záver

DPSC-CM môže byť relevantný pre bezbunkovú liečbu ochorení súvisiacich s imunitou a zápalom. Napriek tomu sú štúdie hodnotiace imunomodulačné a protizápalové účinky DPSC-CM stále nedostatočné v porovnaní s BMMSC-CM. Ďalšie štúdie by sa mali zamerať na úplné objasnenie kritickej úlohy a súvisiacich mechanizmov imunomodulačných vlastností DPSC-CM. Keďže kondicionované médiá môžu obsahovať aj niekoľko odpadových produktov (výsledok bunkového metabolizmu), existujú limity jeho terapeutického použitia. Okrem toho existuje rozdiel v účinku získaného médiav závislosti od stavu bunkovej kultúry. Pre aplikáciu kondicionovaných médií do klinickej praxe je potrebné zabezpečiť čo najvyššiu uniformitu týchto médií.

Pod'akovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby z operačného programu Integrovaná infraštruktúra, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (ITMS2014+: 313011V358).

Zoznam použitej literatúry

1. Varga, I.; Hollý, D.; Vojtaššák, J.; Böhmer, D.; Polák, Š.; Danišovič, L. Morphological Characterization of in Vitro Expanded Human Dental Pulp-Derived Stem Cells. *Biologia* **2011**, *66*, 706–711.
2. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) *in Vitro* and *in Vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 13625–13630.
3. Honda, M.; Ohshima, H. Biological Characteristics of Dental Pulp Stem Cells and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Journal of Oral Biosciences* **2022**, *64*, 26–36.
4. Ledesma-Martínez, E.; Mendoza-Núñez, V.M.; Santiago-Osorio, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells International* **2016**, *2016*, 1–12.
5. Yamada, Y.; Nakamura-Yamada, S.; Umemura-Kubota, E.; Baba, S. Diagnostic Cytokines and Comparative Analysis Secreted from Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells for Functional Cell-Based Therapy. *IJMS* **2019**, *20*, 5900.
6. Bousnaki, M.; Bakopoulou, A.; Pich, A.; Papachristou, E.; Kritis, A.; Koidis, P. Mapping the Secretome of Dental Pulp Stem Cells Under Variable Microenvironmental Conditions. *Stem Cell Rev and Rep* **2022**, *18*, 1372–1407.
7. Ogata, K.; Moriyama, M.; Matsumura-Kawashima, M.; Kawado, T.; Yano, A.; Nakamura, S. The Therapeutic Potential of Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells for Various Diseases. *Biomedicine* **2022**, *10*, 1049.
8. Yamaguchi, S.; Shibata, R.; Yamamoto, N.; Nishikawa, M.; Hibi, H.; Tanigawa, T.; Ueda, M.; Murohara, T.; Yamamoto, A. Dental Pulp-Derived Stem Cell Conditioned Medium Reduces Cardiac Injury Following Ischemia-Reperfusion. *Sci Rep* **2015**, *5*, 16295.
9. Sowa, K.; Nito, C.; Nakajima, M.; Suda, S.; Nishiyama, Y.; Sakamoto, Y.; Nitahara-Kasahara, Y.; Nakamura-Takahashi, A.; Ueda, M.; Kimura, K.; et al. Impact of Dental Pulp Stem Cells Overexpressing Hepatocyte Growth Factor after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **2018**, *10*, 281–290.
10. Chen, T.-F.; Chen, K.-W.; Chien, Y.; Lai, Y.-H.; Hsieh, S.-T.; Ma, H.-Y.; Wang, K.-C.; Shiau, C.-Y. Dental Pulp Stem Cell-Derived Factors Alleviate Subarachnoid Hemorrhage-Induced Neuroinflammation and Ischemic Neurological Deficits. *IJMS* **2019**, *20*, 3747.
11. Yamamoto, A.; Sakai, K.; Matsubara, K.; Kano, F.; Ueda, M. Multifaceted Neuro-Regenerative Activities of Human Dental Pulp Stem Cells for Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Neuroscience Research* **2014**, *78*, 16–20.
12. Luzuriaga, J.; Polo, Y.; Pastor-Alonso, O.; Pardo-Rodríguez, B.; Larrañaga, A.; Unda, F.; Sarasua, J.-R.; Pineda, J.R.; Ibarretxe, G. Advances and Perspectives in Dental Pulp Stem Cell Based Neuroregeneration Therapies. *IJMS* **2021**, *22*, 3546.
13. Kawabori, M.; Shichinohe, H.; Kuroda, S.; Houkin, K. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. *IJMS* **2020**, *21*, 7380.
14. Inoue, T.; Sugiyama, M.; Hattori, H.; Wakita, H.; Wakabayashi, T.; Ueda, M. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Tissue Engineering Part A* **2013**, *19*, 24–29.
15. Chinnici, C.M.; Russelli, G.; Bulati, M.; Miceli, V.; Gallo, A.; Busà, R.; Tinnirello, R.; Conaldi, P.G.; Iannolo, G. Mesenchymal Stromal Cell Secretome in Liver Failure: Perspectives on COVID-19 Infection Treatment. *WJG* **2021**, *27*, 1905–1919.
16. Matsushita, Y.; Ishigami, M.; Matsubara, K.; Kondo, M.; Wakayama, H.; Goto, H.; Ueda, M.; Yamamoto, A. Multifaceted Therapeutic Benefits of Factors Derived from Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Acute Liver Failure in Rats: Therapeutic Benefits of Dental Pulp Stem Cells for Acute Liver Failure. *J Tissue Eng Regen Med* **2017**, *11*, 1888–1896.
17. Moumen, A.; Ieraci, A.; Patané, S.; Solé, C.; Comella, J.X.; Dono, R.; Maina, F. Met Signals Hepatocyte Survival by Preventing Fas-Triggered FLIP Degradation in a PI3k-Akt-Dependent Manner. *Hepatology* **2007**, *45*, 1210–1217.

18. Hu, C.; Zhao, L.; Zhang, L.; Bao, Q.; Li, L. Mesenchymal Stem Cell-Based Cell-Free Strategies: Safe and Effective Treatments for Liver Injury. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 377.
19. Duarte, S.; Hamada, T.; Kuriyama, N.; Busuttil, R.W.; Coito, A.J. TIMP-1 Deficiency Leads to Lethal Partial Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury. *Hepatology* **2012**, *56*, 1074–1085.
20. Lin, Y.; Dong, M.; Liu, Z.; Xu, M.; Huang, Z.; Liu, H.; Gao, Y.; Zhou, W. A Strategy of Vascular-targeted Therapy for Liver Fibrosis. *Hepatology* **2022**, *76*, 660–675.
21. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Tuan, R.S.; Wang, S.; Shi, S.; Huang, G.T.-J. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics* **2008**, *34*, 166–171.
22. Iwasaki, A.; Medzhitov, R. Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses. *Nat Immunol* **2004**, *5*, 987–995.
23. Ji, L.; Bao, L.; Gu, Z.; Zhou, Q.; Liang, Y.; Zheng, Y.; Xu, Y.; Zhang, X.; Feng, X. Comparison of Immunomodulatory Properties of Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Dental Pulp Stem Cells. *Immunol Res* **2019**, *67*, 432–442.
24. Matsumura-Kawashima, M.; Ogata, K.; Moriyama, M.; Murakami, Y.; Kawado, T.; Nakamura, S. Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Improve Sjögren's Syndrome via Regulatory T Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 182.
25. Izumoto-Akita, T.; Tsunekawa, S.; Yamamoto, A.; Uenishi, E.; Ishikawa, K.; Ogata, H.; Iida, A.; Ikeniwa, M.; Hosokawa, K.; Niwa, Y.; et al. Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Improve Glucose Intolerance in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Increasing Pancreatic β -Cell Function. *BMJ Open Diab Res Care* **2015**, *3*, e000128.
26. Elghazi, L.; Rachdi, L.; Weiss, A.J.; Cras-Méneur, C.; Bernal-Mizrachi, E. Regulation of β -Cell Mass and Function by the Akt/Protein Kinase B Signalling Pathway. *Diabetes Obes Metab* **2007**, *9*, 147–157.
27. Mäkinen, K.; Manninen, H.; Hedman, M.; Matsi, P.; Mussalo, H.; Alhava, E.; Ylä-Herttuala, S. Increased Vascularity Detected by Digital Subtraction Angiography after VEGF Gene Transfer to Human Lower Limb Artery: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Phase II Study. *Molecular Therapy* **2002**, *6*, 127–133.