



## Terapia genowa chorób układu krążenia

Józef Dulak<sup>1</sup>, Alicja Józkowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Molekularnej, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### Gene therapy of cardiovascular diseases

#### Summary

Despite progress in pharmacotherapy, there is still a lack of efficient treatment of advanced stages of cardiovascular diseases. Therefore, great expectations are connected with gene therapy. First clinical experiments of gene transfer of vascular endothelial growth factor (VEGF) were carried out in 1994-1998 on patients with critical leg ischemia. They resulted in the improvement of vascularisation and prevented the amputation of the limbs. Promising results have been also obtained with DNA decoys binding the EF2 transcription factor. In this way, the expression of genes enhancing the proliferation of vascular smooth muscle cells have been inhibited and in consequence the narrowing of the lumen of arterio-venous bypasses have been inhibited. Moreover, the experimental data from animal models of cardiovascular diseases suggest that the improvement in patients' conditions can be obtained by the transfer of genes modulating the inflammatory processes which are the main underlying cause of atherosclerosis. Thus, the enhanced expression of heme oxygenase-1, nitric oxide synthases or superoxide dismutases may beneficially influence the functions of the vessels. This protective activity may involve moderate enhancement of the synthesis of VEGF. Owing to this, the improvement of angiogenesis can be obtained without the risk of side effects associated with very high, unregulated expression of this growth factor. Further progress in gene therapy of cardiovascular diseases will depend on the results of clinical trials, investigations of the mechanisms of disturbance in gene expression associated with cardiovascular diseases, as well as on the development of efficient methods of targeted delivery and regulation of the expression of therapeutic genes.

#### Key words:

gene therapy, angiogenesis, VEGF, heme oxygenase-1, nitric oxide, superoxide dismutase, DNA decoys, atherosclerosis.

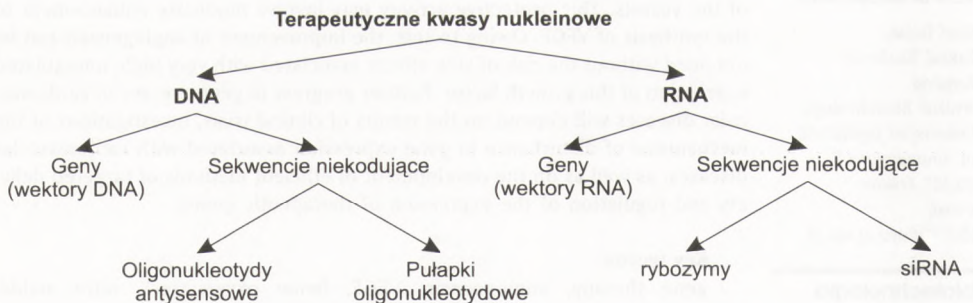
#### Adres do korespondencji

Józef Dulak,  
Zakład Biochemii  
Komórki,  
Wydział Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Gronostajowa 7,  
30-387 Kraków;  
e-mail:  
jdulak@mol.uj.edu.pl

## 1. Cele, strategie i narzędzia terapii genowej

Terapia genowa ma na celu leczenie chorób za pomocą kwasów nukleinowych (1,2). Ta szeroka definicja obejmuje zarówno lecznicze wykorzystanie genów jak i krótszych, niekodujących białek sekwencji DNA lub RNA (rys. 1). W terapii genowej, w zależności od rodzaju choroby zmierza się bądź do naprawy wady dziedzicznej, wprowadzając do komórek prawidłową postać brakującego genu, bądź też modyfikuje się funkcje genów działających w komórkach. W tym drugim przypadku terapia genowa może polegać na wzmacnianiu efektów genów, poprzez wprowadzanie dodatkowych kopii tych genów, które nie funkcjonują wystarczająco wydajnie w chorym organizmie. Może również zmierzać do zahamowania aktywności genów, których nadmierna ekspresja jest przyczyną chorób. To właśnie w hamującej terapii genowej wykorzystuje się obok genów także niekodujące białek sekwencje DNA lub RNA. Należą do nich oligonukleotydy antysensowe, pułapki oligonukleotydowe oraz rybozymy. Ostatnio duże nadzieje wiąże się z możliwością zastosowania dwunucio-owych fragmentów RNA (siRNA) do hamowania ekspresji genów poprzez tzw. interferencję RNA (rys. 1) (3).

Najważniejszym narzędziem w terapii genowej są wektory, czyli nośniki, za pomocą których kwasy nukleinowe są wprowadzane do komórek (1,2,4). Są to zmodyfikowane wirusy bądź plazmidy. Wektory wirusowe wykorzystują naturalne mechanizmy wnikania do komórek poprzez receptory powierzchniowe, jak np. białka CAR dla adenowirusów. Plazmidy, a także krótkie sekwencje kwasów nukleinowych mogą być wprowadzane do komórek dzięki wspomaganiamu chemicznemu. Wykorzystuje się w tym celu zazwyczaj liposomy kationowe, zobojętniające ujemny ładunek cząsteczki kwasu nukleinowego i umożliwiające jego wniknięcie do cytoplazmy oraz jądra komórkowego. W pewnych szczególnych przypadkach wektory plazmidowe wstrzykuje się do tkanek, np. mięśni nóg lub mięśnia sercowego, w postaci tzw. „nagiego DNA” (5).

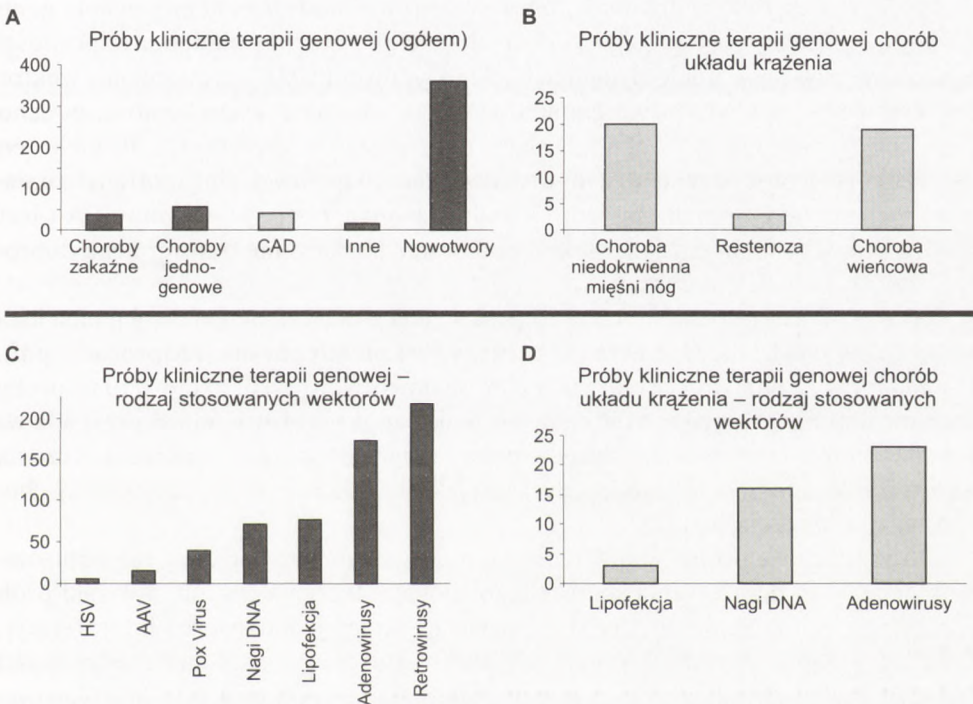


Rys. 1. Rodzaje terapeutycznych kwasów nukleinowych.



W prowadzonych obecnie próbach klinicznych najczęściej stosowane są wektory retrowirusowe (2). Są one zdolne do trwałej transfekcji komórek, możliwej dzięki wbudowywaniu materiału genetycznego wirusa do genomu zakażonej komórki. Retrowirusy (z wyjątkiem lentiwirusów) nie zakażają jednak komórek nie dzielących się, są ponadto mniej wydajne niż inne wektory wirusowe, co sprawia, że najczęściej wykorzystuje się je w strategii *ex vivo*. Polega ona na pobraniu od pacjenta komórek, hodowaniu ich w laboratorium, infekcji wektorem retrowirusowym, a następnie selekcji i namnożeniu komórek zmodyfikowanych, które podaje się z powrotem do organizmu chorego.

Wektory adenowirusowe są znacznie efektywniejsze niż retrowirusy, zakażają również komórki nie dzielące się (2). Wadą najczęściej używanych wektorów adenowirusowych, zawierających nadal sporą liczbę genów wirusowych, jest ich immunogenność. Stosowanie tych wektorów może wywołać silną reakcję zapalną, w skrajnych przypadkach prowadzącą do śmierci. To właśnie użycie wektora adenowiruso-



Rys. 2. Próby kliniczne terapii genowej ogółem (A) oraz terapii genowej chorób układu krążenia (B). W terapii genowej najczęściej stosowane są wektory retrowirusowe – (C) jednak w chorobach układu krążenia przeważa wykorzystanie plazmidowego DNA oraz adenowirusów (D). Zestawienie oparto na danych zamieszczonych na stronach internetowych National Institute of Health (USA), ([www4.od.nih.gov/oba/rac/protocol.pdf](http://www4.od.nih.gov/oba/rac/protocol.pdf)) oraz „Journal of Gene Medicine” ([www.wiley.co.uk/wileychi/genemed.clinical](http://www.wiley.co.uk/wileychi/genemed.clinical)), czasopisma Europejskiego Towarzystwa Terapii Genowej.



wego było przyczyną śmierci pacjenta poddanego terapii genowej w związku z zaburzeniami cyklu mocznikowego, spowodowanymi brakiem prawidłowego genu transkarbamylazy ornitynowej (OCT) (6). Niemniej jednak wektory adenowirusowe są drugie co do częstości wykorzystywania w próbach klinicznych terapii genowej (rys. 2) i uważa się, że przy właściwym dozowaniu ryzyko wystąpienia reakcji zapalnych jest stosunkowo niewielkie.

W próbach klinicznych terapii genowej chorób układu krążenia wykorzystywane są przede wszystkim plazmidy i adenowirusy (7,8). Pozostałe wektory nie były dotychczas stosowane. W badaniach przeprowadzanych na zwierzętach wskazuje się jednak, że przydatnym narzędziem mogą być wektory AAV (9-11). Więcej informacji na temat wektorów wirusowych znajduje się we wcześniejszej pracy (1) oraz w innych opracowaniach (2,12).

## 2. Próby kliniczne terapii genowej

We wrześniu 1990 r. dokonano pierwszej próby kontrolowanego podania genu pacjentowi. Do limfocytów T dzieci chorych na ciężki złożony niedobór odporności wywołany mutacją w genie deaminazy adenozykowej (ADA) wprowadzono wektor retrowirusowy z prawidłowym genem ADA i tak zmodyfikowane komórki podano następnie pacjentom. Żyją oni do dzisiaj w dobrym stanie zdrowia (13), ale efekt ten nie może być jednoznacznie uznany za sukces terapii genowej. Oprócz transferu genów pacjenci otrzymywali bowiem i nadal otrzymują zastrzyki enzymu ADA i jest bardzo prawdopodobne, że to właśnie podawanie białka, a nie transfer genu doprowadziło do poprawy stanu zdrowia.

Do 2003 r. zarejestrowano 636 projektów klinicznych terapii genowej (pełna lista znajduje się na stronie internetowej <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/protocol.pdf>). Ponad połowa z nich dotyczy leczenia chorób nowotworowych, około 1/10 to próby leczenia chorób jednogennych, a nieco mniejszy procentowy udział przypada na terapię chorób infekcyjnych, które – poza jednym wyjątkiem – dotyczą leczenia zakażeń HIV. Spośród 10% pozostałych projektów znaczna większość dotyczy chorób układu krążenia (rys. 2).

Dotychczasowe próby terapii genowej, poza jednym przypadkiem, nie doprowadziły jednak do opracowania skutecznego sposobu leczenia chorób, a wyniki prób klinicznych, mimo że obiecujące, nie pozwalają na ich jednoznaczną interpretację. Chlubny wyjątek dotyczy leczenia ciężkiego złożonego niedoboru odporności (X-SCID), spowodowanego mutacją genu łańcucha  $\gamma$ c receptora cytokin. Wprowadzanie prawidłowej postaci tego genu do hematopoetycznych komórek macierzystych chłopców chorych na X-SCID zdecydowanie poprawiło stan zdrowia dzieci, pozwalając im na normalne życie (14,15). W tej odmianie SCID nie ma możliwości korekty niedoboru genu poprzez podanie preparatu białkowego, zatem tak znaczna poprawa funkcji układu odpornościowego jest dowodem na skuteczność terapii ge-



nowej (14,15). Niestety, u dwóch spośród kilkunastu leczonych pacjentów doszło w ciągu dwóch lat od terapii do rozwoju białaczki (16). Na podstawie przeprowadzonych analiz wskazuje się, że została ona spowodowana wbudowaniem się wektora retrowirusowego w obręb protoonkogenu LMO2, co doprowadziło do klonalnej proliferacji limfocytów  $T\gamma\delta$  lub  $T\alpha\beta$ . Próby terapii genowej X-SCID są jednak nadal kontynuowane, gdyż jest ona jedyną szansą na wyleczenie i normalne życie dla pacjentów, u których nie można przeprowadzić przeszczepu szpiku kostnego.

### 3. Przyczyny stosowania terapii genowej w chorobach układu krążenia

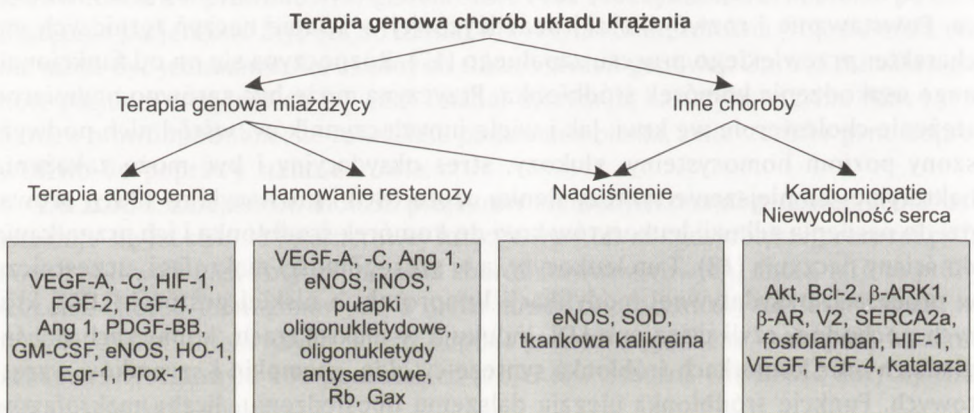
Po niepowodzeniach w terapii genowej nowotworów, chorób jednogenowych, czy zakażeń HIV nadzieje naukowców i lekarzy w znacznym stopniu zwróciły się w kierunku chorób układu krążenia. Przypuszczano, że ze względu na charakter procesów patofizjologicznych, które zamierzano skorygować, łatwiej i szybciej można będzie uzyskać przekonujące wyniki, dowodzące skuteczności terapii. Przypuszczano bowiem, że w przypadku tych schorzeń, w odróżnieniu od nowotworów i chorób jednogenowych korzystny efekt przynieść może nawet krótkotrwałe podwyższona ekspresja genu terapeutycznego (1).

Pierwotną przyczyną choroby niedokrwiennej serca i mięśni nóg jest miażdżyca. Powstawanie i rozwój blaszki miażdżycowej w ścianie naczyń tętniczych ma charakter przewlekłego procesu zapalnego (17). Rozpoczyna się on od funkcjonalnego uszkodzenia komórek śródbłonna. Przyczyną może być zarówno nadmierne stężenie cholesterolu we krwi, jak i wiele innych czynników, wśród nich podwyższony poziom homocysteiny, glukozy, stres oksydacyjny i być może zakażenia bakteryjne. Zmniejszenie syntezy tlenku azotu (NO) i prostacykliny ( $PGI_2$ ) prowadzi do nasilenia adhezji leukocytów krwi do komórek śródbłonna i ich przenikania do ściany naczynia (18). Tam leukocyty, a w szczególności makrofagi, uczestniczą w procesach oksydatywnej modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), których pochodne, czyli utlenione LDL indukują w makrofagach, komórkach mięśni gładkich oraz komórkach śródbłonna syntezę cytokin, chemokin i czynników wzrostowych. Funkcje śródbłonna ulegają dalszemu upośledzeniu, liczba makrofagów w ścianie naczynia zwiększa się, a dzielące się komórki mięśni gładkich uczestniczą zarówno w procesach modyfikacji LDL, jak i w nasileniu procesów zapalnych. Powiększanie rozmiarów blaszki miażdżycowej utrudniające przepływ krwi w tętnicach wieńcowych jest przyczyną rozwoju niedotlenienia mięśnia sercowego. Jeśli zaś miażdżyca rozwija się w tętnicach obwodowych, wywołuje niedotlenienie mięśni nóg, objawiające się tzw. chromaniem przestankowym. Pacjent odczuwa bóle podczas chodzenia nasilające się w miarę przebytego dystansu. W najbardziej krańcowym przypadku występują bóle spoczynkowe. Niedotlenienie prowadzi do martwicy tkanek, nieogających się owrzodzeń, a w konsekwencji może zaistnieć konieczność amputacji.



Oderwanie się blaszki miażdżycowej może doprowadzić do zaczerwienia światła tętnicy i zamknięcia przepływu krwi, będąc bezpośrednią przyczyną zawału serca czy udaru mózgu. Środki farmakologiczne mogą ograniczać postęp miażdżycy, ale metodą z wyboru usuwania bardzo zaawansowanych zwężeń światła naczyń jest zabieg angioplastyki. W jego wyniku dochodzi do zgniecenia blaszki miażdżycowej i poszerzenia światła tętnicy, co prowadzi do natychmiastowego zwiększenia przepływu krwi. Skuteczność tego zabiegu, a także stosowanego w bardziej skomplikowanych przypadkach pomostowania tętniczo-żylnego (*bypassów*) jest bardzo wysoka. Dość często jednak w naczyniach poddawanych angioplastyce lub w *bypassach* dochodzi do ponownego zwężenia światła tętnicy, czyli do restenozy. Dotychczas brak było skutecznych środków farmakologicznych zapobiegających restenozy, stąd zainteresowanie terapią genową.

W chorobach układu krążenia najwięcej badań dotyczy możliwości zastosowania terapii genowej dla stymulacji angiogenezy w niedotlenionym mięśniu sercowym lub mięśniach szkieletowych (rys. 2, 3) (7,8,19-23). W ten sposób, poprzez pobudzenie powstawania nowych naczyń krwionośnych próbuje się ograniczyć niekorzystne konsekwencje miażdżycy w chorobie niedokrwiennej serca i chromaniu przestankowym. Ponadto sporą uwagę przyciągała możliwość terapii genowej dla zapobiegania



Rys. 3. Zastosowanie terapii genowej w chorobach układu krążenia.

W ramach wymieniono geny najczęściej wykorzystywane w klinicznych lub eksperymentalnych próbach terapii genowej chorób układu krążenia. **Akt** – kinaza białkowa Akt (kinaza białkowa B); **Ang 1** – angiopoetyna 1; **β-AR** – receptor β-adrenergiczny; **β-ARK1** – kinaza receptora β-adrenergicznego; **Bcl-2** – czynnik antyapoptotyczny; **Egr-1** – czynnik transkrypcyjny; **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; **FGF-2,-4** – czynniki wzrostu fibroblastów; **fosfolamban** – inhibitor transportu  $Ca^{2+}$  w siateczce śródplazmatycznej; **Gax** – czynnik transkrypcyjny; **HIF-1** – hypoxia inducible factor – czynnik transkrypcyjny indukowany przez niedotlenienie (zwiększa ekspresję VEGF-A); **HO-1** – oksygenaza hemowa; **VEGF-A** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń-A; **VEGF-C** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń-C; **PDGF-BB** – czynnik pochodzenia płytkowego BB; **Prox -1** – czynnik transkrypcyjny; **Rb** – gen retinoblastomy; **SERCA** –  $Ca^{2+}$  – zależna ATPaza siateczki śródplazmatycznej; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **V2** – receptor V2 wazopresyny.



nia restenozie. To właśnie w tych trzech grupach schorzeń przeprowadzane są już próby kliniczne (19). W przypadku innych chorób układu krążenia, jak np. nadciśnienie, udar mózgu czy kardiomiopatia badania nad możliwością zastosowania terapii genowej ograniczone są jeszcze do prób na zwierzętach (21).

#### 4. VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

Poprawa funkcji śródbłonna naczyń oraz stymulacja powstawania nowych naczyń krwionośnych może być osiągnięta poprzez zastosowanie czynników wzrostowych. Wśród najważniejszych czynników angiogennych wyróżnić możemy dwie grupy (24-26). Do rodziny czynników VEGF należą białka określane symbolami A, B, C, D i E oraz czynnik wzrostu pochodzenia łożyskowego (PlGF). Drugą grupę stanowią angiopoetyny.

Najwięcej badań eksperymentalnych i niemal wszystkie próby kliniczne dotyczą możliwości wykorzystania VEGF oraz czynników wzrostowych fibroblastów (FGF) (7,8,19,22,27-30). W odróżnieniu od FGF, które wykazują szerokie spektrum działania ze względu na występowanie receptorów FGF na licznych komórkach, efekt VEGF jest ograniczony przede wszystkim do komórek śródbłonna.

VEGF-A (określany także jako VEGF) jest wytwarzany w postaci kilku izoform, będących produktem alternatywnego składowania mRNA (31). Izoforma VEGF<sub>121</sub> (złożona ze 121 aminokwasów) nie ma zdolności wiązania się do siarczanu heparanu, natomiast pozostałe izoformy, wśród których najważniejsza to VEGF<sub>165</sub>, po wydzieleniu z komórki mogą się do niego wiązać. Specyficzne receptory dla VEGF-A występują przede wszystkim na komórkach śródbłonna. Są to: receptor VEGFR1 (określany także jako flt-1) oraz VEGFR2 (flk1). Uważa się, że receptorem odpowiedzialnym za proces aktywacji komórek śródbłonna jest VEGFR2 (31,32).

Związanie VEGF z receptorem VEGFR2 prowadzi do zwiększenia syntezy NO i PGI<sub>2</sub> (33,34). Wykazano, że zgrubienie ściany tętnicy królika po założeniu pierścienia silikonowego wywołującego zwiększoną proliferację mięśni gładkich może być zahamowane, gdy do komórek ściany tętnicy zostanie wprowadzony gen VEGF (35). Ochronne działanie VEGF było jednak znoszone, gdy zwierzęta poddane zabiegowi otrzymywały równocześnie inhibitor syntazy tlenu azotu (35). Doświadczenie to dowodziło, że protekcyjny efekt VEGF wymaga syntezy NO przez komórki śródbłonna.

W doświadczeniu tym gen VEGF był wprowadzany do komórek za pomocą wektora plazmidowego. Użycie tak stosunkowo słabo wydajnego układu ekspresji było możliwe, bowiem VEGF jest uwalniany z komórek go produkujących i w związku z tym synteza przez nawet nieliczne komórki może prowadzić do uzyskania wystarczającego efektu. Przypuszczenie to zostało potwierdzone w licznych badaniach.

Zastosowanie u zwierząt plazmidowych wektorów zawierających cDNA różnych izoform VEGF udowodniło, że możliwa jest stymulacja angiogenezy poprzez terapię



genową. Wstrzyknięcie nagiego plazmidowego DNA do mięśni szkieletowych prowadzi do krótkotrwałej ekspresji transgenu i uwalniania VEGF do krwiobiegu (36). W modelu niedotlenienia mięśni kończyn królika wywołanym usunięciem fragmentu tętnicy biodrowej obserwowaliśmy wzrost liczby naczyń krwionośnych po podaniu plazmidu z genem VEGF<sub>165</sub> (37,38). Efekt ten nie występował w przypadku zastosowania genów kontrolnych. W konsekwencji dochodziło do zmniejszenia niedotlenienia, co znalazło potwierdzenie w analizie przepływów krwi (37,38).

W roku 1996 Isner i wsp. poinformowali o pierwszej próbie podania plazmidu z genem VEGF pacjentce z krytycznym niedotlenieniem kończyny dolnej (39). Plazmid z cDNA VEGF<sub>165</sub> dodano do żelu pokrywającego cewnik wprowadzany do tętnicy. Autorzy donieśli o pojawieniu się nowych naczyń krwionośnych w mięśniu podudzia, co świadczyło o udanej transfekcji. Na syntezę VEGF wskazywało także przejściowe pojawianie się naczynek na stopie i podudziu. Efekt transferu genu nie był jednak wystarczający i po kilku miesiącach konieczna była amputacja stopy (39).

W kolejnej próbie Isner i wsp. podawali plazmid pVEGF<sub>165</sub> wstrzykując go do mięśni nóg dziewięciu pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn, zagrożonych amputacją (40). Plazmid w ilości 2000 µg wstrzykiwano dwukrotnie, w odstępach czterotygodniowych. U pacjentów wykonano angiografię w celu stwierdzenia zmian w unaczynieniu mięśni kończyn, mierzono stężenie VEGF we krwi oraz określano przepływ krwi poprzez ustalenie indeksu ABI (*ankle-brachial index*). Parametr ten pozwala ocenić zmianę przepustowości naczynia poprzez porównanie ciśnienia krwi w początkowej i końcowej części tętnicy piszczelowej. Badacze donieśli, że w wyniku zastosowanej terapii u pacjentów doszło do zwiększenia stężenia VEGF we krwi, przy czym efekt ten był wyraźny dopiero po drugim podaniu plazmidu. Stwierdzono zwiększenie liczby naczyń krwionośnych oraz istotną statystycznie poprawę ABI. Co najważniejsze, na czterech z siedmiu nóg zagoiły się owrzodzenia, a u trzech najbardziej zagrożonych pacjentów uniknięto zalecanej wcześniej amputacji. U chorych nie zaobserwowano zagrażających życiu efektów ubocznych, jednak u 6 pacjentów stwierdzono wystąpienie silnych obrzęków, które wyeliminowano poprzez podanie diuretyków. Obrzęki były dodatkowym dowodem na syntezę i działanie VEGF, który wykazuje silne właściwości zwiększania przepuszczalności naczyń krwionośnych.

W tych wstępnych badaniach przeprowadzonych bez grupy kontrolnej wskazywano na bezpieczeństwo i skuteczność działania VEGF. Podobne, obiecujące efekty przyniosło użycie plazmidu VEGF w innej, także niekontrolowanej próbie (41). Poprawę stanu zdrowia odnotowano także u kilku pacjentów z chorobą Buergera traktowanych plazmidowym DNA z genem VEGF (42). Również w badaniach z zastosowaniem wektorów adenowirusowych, używanych do transferu izoformy VEGF<sub>121</sub> wykazano bezpieczeństwo tej formy transferu genów, chociaż nie zaobserwowano poprawy stanu klinicznego pacjentów (43-45).

Tak spektakularnych zmian jakie osiągnięto w pierwszych doświadczeniach nie udało się jednak powtórzyć w badaniach klinicznych II fazy (tab.). W próbach tych



do stymulacji angiogenezy używano zarówno wektorów plazmidowych (46-50) jak i adenowirusowych (46,47,51,52), jednak efekty ich działania często nie różniły się znacząco od efektów *placebo*.

Tabela

## Dotychczasowe najważniejsze próby kliniczne proangiogennej terapii genowej

Nazwa i faza kliniczna projektu	Czynnik terapeutyczny i stosowany wektor	Rodzaj choroby	Liczba pacjentów poddanych terapii	Czas trwania obserwacji i wynik	Literatura
1	2	3	4	5	6
I faza	plazmid VEGF <sub>165</sub>	zwężenie tętnic obwodowych (przewlekłe niedotlenienie nóg)	9 (10 nóg)	poprawa ABI, powstanie nowych naczyń krwionośnych, zagojenie owrzodzeń, uniknięcie amputacji	(40)
I faza	plazmid VEGF <sub>165</sub>	choroba Buergera	6 (7 nóg)	zagojenie owrzodzeń na 3 z 5 nóg, poprawa ABI, nowe naczynia krwionośne	(42)
I faza	plazmid VEGF <sub>165</sub>	zwężenie tętnic obwodowych (przewlekłe niedotlenienie nóg)	21	poprawa przepływu krwi, zagojenie lub znacząca poprawa stanu owrzodzeń u 75% pacjentów, eliminacja lub znaczne zmniejszenie bólu spoczynkowego	(41)
I faza	adenowirus VEGF <sub>121</sub>	zwężenie tętnic obwodowych (przewlekłe niedotlenienie nóg)	18 (w tym 3 <i>placebo</i> )	1 rok – negatywny	(51,52)
II faza	adenowirus – VEGF <sub>165</sub> plazmid/liposome VEGF <sub>165</sub> grupa kontrolna: płyn Ringera	zwężenie tętnic obwodowych (przewlekłe niedotlenienie nóg)	54	zwiększone unaczynienie w mięśniach nóg w 3 miesiące po zabiegu	(46)
II faza – KAT (Kuopio Angiogenesis Trial)	adenowirus – VEGF <sub>165</sub> plazmid/liposomy VEGF <sub>165</sub> grupa kontrolna: płyn Ringera	choroba niedokrwienna serca	103	poprawa przepływu w mięśniu serca w 6 miesięcy po zabiegu	(47)
II faza – REVASC	adenowirus VEGF <sub>121</sub>	choroba niedokrwienna serca	67	poprawa w teście tolerancji wysiłkowej w 26 tygodni po zabiegu	(113)
II faza – RAVE	adenowirus VEGF <sub>121</sub>	zwężenie tętnic obwodowych (przewlekłe niedotlenienie nóg)	105	12 tygodni po podaniu brak poprawy w długości dystansu pokonywanego bez bólu – negatywny	(114)



1	2	3	4	5	6
II faza – Euroinject One Trial	plasmid VEGF <sub>165</sub>	choroba niedokrwienna serca	74	3 miesiące po zabiegu nie zaobserwowano poprawy – negatywny	(115)
II faza – AGENT	adenowirus – FGF 4 grupa kontrolna: / płyn fizjologiczny	choroba niedokrwienna serca	79	poprawa w teście tolerancji wysiłkowej w 4 tygodnie po zabiegu	(116)

Badania I fazy mają na celu sprawdzenie bezpieczeństwa stosowanej terapii oraz ustalenie tolerowanych dawek leku i obejmują niewielką grupę pacjentów. Często nie stosuje się grupy kontrolnej. Badania II, a zwłaszcza III fazy wykonywane są na większej liczbie pacjentów. Konieczne jest stosowanie tzw. podwójnej ślepej próby, polegającej na podawaniu *placebo*, a zarazem pacjent jak i osoby bezpośrednio podające lek lub *placebo* muszą być nieświadomi rzeczywistej zawartości podawanej substancji. W IV fazie badania wykonuje się na bardzo dużej, liczącej kilkaset lub kilka tysięcy osób grupie pacjentów.

Największy europejski projekt kliniczny terapii genowej (KAT – Kuopio Angiogenesis Trial) realizowany jest w Finlandii (46,47). Dotychczas opublikowane zostały wyniki dwóch prób. W pierwszej leczeniu poddano pacjentów z krytycznym niedotlenieniem mięśni nóg (46). Podczas zabiegu angioplastyki tętnicy udowej 18 osób otrzymało  $2 \times 10^{10}$  jednostek adenowirusa-VEGF<sub>165</sub>, 17 pacjentów 2000 µg plazmidu VEGF zmieszanego z 2000 µl liposomu DOTMA:DOPE, zaś 19 osób z grupy kontrolnej wlew płynu Ringera. Po trzech miesiącach u pacjentów traktowanych wektorami z genem VEGF zaobserwowano nowe naczynia krwionośne w najbardziej niedotlenionym obszarze mięśni podudzia (46). Poprawę zaobserwowano również w wartościach ABI, ale efekt ten wystąpił zarówno u pacjentów otrzymujących gen VEGF jak i zastrzyki z płynu fizjologicznego. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości restenozy, która wynosiła 29,4% u pacjentów z grupy kontrolnej, 18,8% u pacjentów otrzymujących plazmid oraz 40% u pacjentów traktowanych wektorem adenowirusowym (46).

W drugim eksperymencie klinicznym, realizowanym w ramach projektu KAT, leczeniu poddano pacjentów z chorobą wieńcową (47). Podczas zabiegu angioplastyki 37 osób otrzymało wektor adenowirusowy z genem VEGF<sub>165</sub>, 28 plazmid zmieszany z liposomami zaś 38 wlew płynu Ringera (47). W tym doświadczeniu we wszystkich grupach pacjentów restenoza wystąpiła tylko w 6% przypadków. W 6 miesięcy po zabiegu nie uległ wydłużeniu czas wysiłku, do jakiego byli zdolni pacjenci, ani nie zmieniły się parametry angiograficzne, takie jak najmniejsza średnica tętnicy wieńcowej i stopień zwężenia światła naczynia. Istotną statystycznie poprawę perfuzji mięśnia sercowego zaobserwowano u pacjentów, którzy otrzymali VEGF w wektorze adenowirusowym, natomiast w grupie kontrolnej oraz traktowanej plazmidem zaobserwowano podobny trend, jednak nieistotny statystycznie. Ciekawym faktem jest widoczny, chociaż nieistotny statystycznie spadek stężenia VEGF we krwi zaobserwowany we wszystkich grupach pacjentów, także u tych, którzy otrzymali wektory z genem VEGF (47).



Przyczyn tak niejednoznacznych wyników może być kilka. Po pierwsze, pacjenci biorący udział w różnych badaniach wykazywali odmienny stan zaawansowania choroby. Po drugie, wydajność transfekcji stosowanych wektorów mogła się różnić. Ta druga możliwość jest jednak mało przekonująca bowiem Isner i wsp. (40-42) oraz Shyu i wsp. (41), stosujący mało wydajne wektory plazmidowe, zaobserwowali zwiększenie stężenia VEGF we krwi, chociaż efekt ten wykazywał tylko słabą zależność od dawki plazmidu. Tymczasem ani Rosegnart i wsp. (43-45) ani Yla-Herttualla i wsp. (46,47), stosujący bardzo wydajne wektory adenowirusowe nie stwierdzili wzrostu stężenia VEGF we krwi pacjentów po transferze genu. Po trzecie, jak widać na przykładzie próby KAT w chorobie niedokrwiennej serca (ale nie w niedotlenieniu mięśni nóg), częstość restenozy była stosunkowo niska niezależnie od podjętej terapii genowej, zatem wpływ transferu genu mógł być niezauważalny.

Co najciekawsze, w badaniach nad wykorzystaniem czynników proangiogennych poprawę obserwowano również często w grupie kontrolnej. W badaniach VIVA, w których pacjenci z chorobą niedokrwinną serca otrzymywali czterokrotne dowińcowe wlewy białka VEGF<sub>165</sub> poprawę parametrów fizjologicznych zaobserwowano po 60 dniach, ale efekt ten był równie silny u pacjentów otrzymujących *placebo* (53)! W dalszej analizie stanu zdrowia pacjentów biorących udział w projekcie VIVA wykazano poprawę niektórych parametrów po 120 dniach od podania VEGF i brak takich zmian u osób otrzymujących *placebo* (54). Nie wiadomo jednak, dlaczego ten efekt był tak opóźniony w czasie i czy ma długotrwałe znaczenie fizjologiczne.

W świetle dotychczasowych wyników można stwierdzić, że w przeprowadzonych badaniach klinicznych wykazano bezpieczeństwo i możliwość stosowania angiogennej terapii genowej. Konieczne są jednak dalsze prace nad znalezieniem najbardziej optymalnych i bezpiecznych sposobów podawania genów, a także nad wyodrębnieniem takich grup pacjentów, u których terapia będzie skuteczna.

## 5. Terapia genowa w zapobieganiu restenozie

W przeprowadzonych badaniach na zwierzętach wskazywano na niezwykle dużą skuteczność transferu VEGF w stymulacji regeneracji śródbłonna uszkodzonego podczas zabiegów angioplastyki. W roku 1996 Isner i wsp. jako pierwsi wykazali, że lokalne podanie plazmidu z genem VEGF do uszkodzonej tętnicy biodrowej królików istotnie hamowało rozwój zwężenia światła naczynia (55,56). Dotychczas jednak, jak omówiono wcześniej, nie udało się wykazać, by lokalne podanie VEGF do miejsca angioplastyki istotnie wpływało na przebieg rozwoju restenozy u pacjentów (46,47). Być może niepowodzenia te staną się jednak nieistotne, bowiem w ostatnio przeprowadzonych badaniach klinicznych wykazano bardzo wysoką skuteczność niektórych środków farmakologicznych. Zastosowanie stentów uwalniających rapamacynę niemal całkowicie ograniczyło częstość występowania restenozy u chorych poddanych takiemu leczeniu (57,58).



Skuteczne może się również okazać stosowanie pułapek oligonukleotydomy. W badaniu PREVENT stwierdzono, że wprowadzenie do fragmentów żył (służących jako pomosty omijające zwężenie tętnic udowych) sekwencji DNA wiążących czynnik transkrypcyjny E2F prowadziło do zahamowania proliferacji mięśni gładkich i ograniczało postęp zwężenia przeszczepu (59). W dalszych badaniach winno się wykazać, czy ten pozytywny efekt uda się potwierdzić u liczniejszej grupy pacjentów.

## 6. Ryzyko stosowania VEGF w terapii

Entuzjazm związany z bardzo obiecującymi wynikami wstępnych badań przesłonił obawy co do możliwości wystąpienia niebezpiecznych objawów ubocznych. Tymczasem zarówno w niektórych badaniach klinicznych jak i coraz liczniejszych pracach eksperymentalnych zwraca się uwagę na zasadność pytań dotyczących celowości i bezpieczeństwa stosowania VEGF w leczeniu miażdżycy.

W zastosowaniu VEGF jako leku zakłada się, że jego synteza lub aktywność jest znacząco obniżona w miażdżycy. Tym samym przyjmuje się, że w miażdżycy dochodzi do upośledzenia angiogenezy. Istotnie, u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca lub cukrzycą zaobserwowano słabszą indukcję ekspresji VEGF w monocytach krwi hodowanych w atmosferze z obniżonym stężeniem tlenu (60,61). Upośledzony rozwój krążenia obocznego w mięśniu sercowym i unaczynienia w mięśniach kończyn dowodzi, jak się zdaje, że przyczyną może być mniejsza dostępność czynników angiogenychnych. Tymczasem w badaniach wskazuje się, że możliwy jest także scenariusz odwrotny. U cukrzyków z krytycznym niedokrwieniem kończyn obserwowano znacznie większe stężenie VEGF we krwi aniżeli u osób zdrowych (62). W innych badaniach pacjenci z podwyższonym stężeniem cholesterolu we krwi charakteryzowali się wyższym poziomem VEGF aniżeli osoby o niższym stężeniu cholesterolu (63,64). Co ciekawe, w przeprowadzanych przez nas badaniach wykazano, że leczenie statynami, inhibitorami reduktazy 3-hydroksymetylo-glutarylo koenzymu A lekami skutecznie obniżającymi syntezę cholesterolu, a ponadto wykazującymi działanie przeciwzapalne, prowadziło do zmniejszenia zawartości VEGF we krwi (64). Brak jest dokładnych badań nad związkiem hipercholesterolemii z unaczynieniem mięśnia sercowego u pacjentów, ale w przeprowadzonej analizie serc świni z hipercholesterolemią wskazuje się na występowanie w nich znacznie obfitszej siatki naczyń aniżeli u osobników z normalnym poziomem cholesterolu (65). Również niedotlenienie mięśnia sercowego zazwyczaj skorelowane jest z wyraźnym podwyższeniem produkcji VEGF oraz innych czynników wzrostowych (66). Dlatego nie jest jasne, w jaki sposób nieznaczne zwiększenie lokalnej syntezy lub dostępności VEGF poprzez zastosowanie terapii genowej miałyby doprowadzić do osiągnięcia istotnych fizjologicznych efektów.

Zwiększona ilość VEGF może jednak paradoksalnie przyczyniać się do nasilenia rozwoju blaszki miażdżycowej. Stopień zaawansowania miażdżycy koreluje bowiem z liczbą odżywiających blaszkę naczyń krwionośnych (tzw. *vasa vasorum*). W rozwi-



niętych blaszkach miażdżycowych obserwuje się dużą liczbę komórek produkujących VEGF (67,68), czego przyczyną może być indukcja ekspresji VEGF przez utlenione LDL, na co wskazujemy m.in. w przeprowadzanych przez nas badaniach (68-70). Podważa to zasadność stosowania VEGF w celu zapobiegania restenozie. Ponadto możliwe jest uzyskanie efektów odwrotnych od oczekiwanych. Niedawno Celletti i wsp. wykazali, że jednorazowe podanie VEGF w ilości 2 mg/kg masy ciała myszom pozbawionym aktywnego genu apolipoproteiny E (apoE) i apolipoproteiny B100 (apoB100) nasilało u nich rozwój miażdżycy (71). Rozmiary blaszek miażdżycowych były kilka do kilkunastu razy większe niż u zwierząt traktowanych białkiem obojętnym, albuminą. Działanie VEGF związane było z jego właściwościami angiogennymi, gdyż zarówno we krwi jak i w blaszkach miażdżycowych zaobserwowano zwiększoną liczbę komórek macierzystych CD34+/flk-1+, które uwalniane są ze szpiku kostnego i mogą dawać początek nowym naczyniom krwionośnym. Podobnie, VEGF nasilał rozwój miażdżycy u królików karmionych pokarmem wzbogaconym w cholesterol (71,72).

Obserwacje takie poddają w wątpliwość optymistyczną interpretację wyników badań nad hamowaniem restenozy poprzez wykorzystanie transferu genu VEGF. Badania te były bowiem wykonywane u skądinąd zdrowych królików lub szczurów. Tymczasem efekt VEGF może być inny w naczyniach już zmienionych przez miażdżycę. Niedawno Hilitunen i wsp. nie stwierdzili poprawy po transferze genu VEGF do uszkodzonych tętnic królików karmionych dietą zawierającą 0,1% cholesterolu, chociaż zastosowanie genu innego czynnika VEGF-C, do pewnego stopnia hamowało rozwój restenozy (73). Również w badaniach przez nas prowadzonych wykazaliśmy, że lokalne podanie VEGF do ściany uszkodzonej tętnicy królików odżywianych dietą wysokotłuszczową, zawierającą 1% cholesterolu, może nasilać, a nie hamować rozwój restenozy (74). Należy zwrócić uwagę, że również niektóre wyniki doświadczeń wykonanych na królikach normocholesterolemicznych wskazywały na to, że nadekspresja genu VEGF może prowadzić do zgrubienia ściany tętnicy na skutek nadmiernej proliferacji komórek mięśni gładkich (75). Prawdopodobnie VEGF nie działa bezpośrednio jako czynnik mitogenny komórek mięśniowych, ale stymulując komórki śródbłonna, a także monocyty krwi może pobudzać je do produkcji czynników wzrostowych, aktywujących mięśnie gładkie. Ponadto zwiększenie przepuszczalności ściany naczyń prowadzi do napływu z krwi czynników mogących pobudzać proliferację komórek mięśniowych. Istnieją jednak również dane wskazujące na występowanie na komórkach mięśni gładkich receptora VEGFR1 (76), a nawet VEGFR2 (77), co mogłoby prowadzić do ich bezpośredniej aktywacji przez VEGF.

O znaczeniu i potencjalnie patologicznej roli angiogenezy w miażdżycy świadczą także doświadczenia Moultona i wsp., w których wykazano, że czynniki antyangiogenne, a zatem hamujące powstawanie naczyń krwionośnych mogą ograniczać rozwój choroby (78-80). W badaniach tych stwierdzono, że zastosowanie TNP-470 oraz endostatyny, inhibitorów angiogenezy, hamuje rozwój spontanicznej miażdżycy u myszy ApoE<sup>-/-</sup>. Ponadto w najnowszych badaniach wskazuje się, że angiostatyna



inny czynnik antyangiogeny, również spowalnia rozwój blaszek miażdżycowych (80,81), a jej działanie związane jest ze spadkiem produkcji VEGF w komórkach ściany naczynia (80).

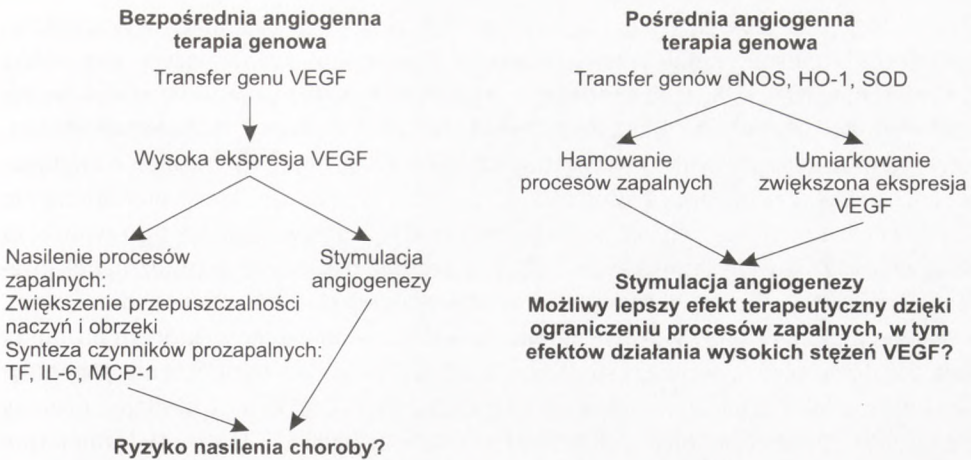
Właściwości VEGF jako silnego czynnika angiogennego, ponadto dramatycznie zwiększającego przepuszczalność naczyń krwionośnych, wskazują na konieczność właściwej regulacji ekspresji VEGF w przypadku stosowania silnych wektorów. W przeprowadzonych badaniach dowodzi się, że nadmierna, niekontrolowana synteza VEGF może inicjować powstawanie naczynek. Springer i wsp. wykazali, że transfer do mięśni kończyn myszy mioblastów stabilnie transfekowanych wektorem retrowirusowym zawierającym gen VEGF prowadził do powstawania dużych, nieodróżnionych naczyń krwionośnych o charakterze nowotworowym (82). W kolejnych doświadczeniach wykazano, że nadekspresja VEGF w mięśniu sercowym powodowała nie tylko powstawanie naczynek, ale przyczyniała się do śmierci myszy, którym do serca wszczepiono zmodyfikowane mioblasty, stale produkujące VEGF (83). Wreszcie, bardzo silna nadekspresja VEGF, będąca efektem zastosowania wektora adenowirusowego paradoksalnie prowadziła do nekrozy kończyn, do których w celu eliminacji niedotlenienia wprowadzano wektor zawierający gen VEGF (84).

Ponadto wydaje się, że VEGF może być czynnikiem niewystarczającym do uzyskania pełnego efektu terapeutycznego. Proces angiogenezy nie jest bowiem w stanie zapewnić prawidłowego ukrwienia niedotlenionych tkanek. Powstające w wyniku działania VEGF naczynia krwionośne są nieodróżniane, bardzo przepuszczalne i szybko ulegają regresji po zaprzestaniu działania czynnika (85). Uważa się, że rzeczywista poprawa krążenia może mieć miejsce, tylko wtedy gdy dojdzie do powstania dojrzałych naczyń krwionośnych, w których komórki śródbłonna otoczone będą warstwą komórek wspomagających (25). Proces ten nazywany jest arteriogenezą. Do jego prawidłowego przebiegu obok VEGF niezbędne są dodatkowe czynniki wzrostowe, takie jak PDGF czy angiopoetyna (Ang-1) (25,26,86). Rzeczywiście, kombinowana terapia polegająca na zastosowaniu w odpowiednich odstępach czasu VEGF i PDGF prowadziła do powstania tętnic (87). O ochronnej roli Ang-1 świadczą także wyniki badań nad rozwojem miażdżycy w alloprzeszczepach serca u szczurów. Okazuje się, że podanie do alloprzeszczepu wektora adenowirusowego zawierającego gen VEGF nasila procesy miażdżycowe inicjowane reakcją immunologiczną organizmu biorcy. Tymczasem transfer genu Ang-1 nie tylko hamował procesy zapalne w alloprzeszczepach, ale w konsekwencji prowadził do ograniczenia zwężenia światła tętnic (89).

## **7. Kombinowana terapia genowa – hamowanie procesów zapalnych i wspomaganie funkcji śródbłonna naczyń**

Fakt, że miażdżycy jest przewlekłym procesem zapalnym skłania do przypuszczeń, że pozytywne efekty może przynieść transfer genów, których produkty hamują zapalenie (rys. 4). Istotnie, nadekspresja genu śródbłonkowej syntazy tlenu





Rys. 4. Drogi bezpośredniej i pośredniej stymulacji angiogenezy i spodziewane efekty.

TF – czynnik tkankowy; IL-6 – interleukina 6; MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów.

azotu (eNOS) powodowała zmniejszenie restenozy w modelach doświadczalnych angioplastyki (90,91). Podobnie korzystne efekty może przynieść zastosowanie genów dysmutaz ponadtlenkowych, których efektem działania jest eliminacja szkodliwego anionorodnika ponadtlenkowego (92).

Innym, ostatnio intensywnie badanym enzymem o właściwościach przeciwzapalnych jest oksygenaza hemowa 1 (HO-1) (93). Ekspresja HO-1 wzrasta w warunkach stresu oksydacyjnego, a efektem jej działania jest rozkład hemu do jonów żelaza tlenku węgla i biliwerdyny, która następnie jest przekształcana do bilirubiny przez reduktazę biliwerdyny. Stres oksydacyjny, który prowadzi do uwolnienia hemu, może być jedną z przyczyn nasilających procesy oksydatywnej modyfikacji LDL (94). Działanie HO-1 prowadzi do eliminacji hemu, a zarazem zwiększa stężenie związków o działaniu antyoksydacyjnym, bowiem zarówno tlenek węgla, biliwerdyna jak i bilirubina wykazują właściwości przeciwzapalne (93).

W badaniach wykazano, że nadekspresja genu HO-1 hamuje rozwój miażdżycy w tętnicach zwierząt (95-97), a aktywność HO-1 zapobiega rozwojowi restenozy (96-101). Warte podkreślenia jest, że doświadczenia te wykonywane były najczęściej u zwierząt z miażdżycą, a zatem w warunkach bardziej przypominających proces chorobowy u człowieka aniżeli te badania, w których wskazywano na skuteczność VEGF. W tym aspekcie niezwykle ciekawe stają się również ostatnio opublikowane wyniki, na podstawie których przypuszcza się, że działanie lecznicze wspomnianej rapamacyny może być związane z indukcją ekspresji HO-1 w komórkach śródbłonna i mięśni gładkich (102).

W świetle badań wskazujących na korzystną rolę aktywności śródbłonkowej syntazy NO, dysmutazy ponadtlenkowej oraz oksygenazy hemowej ciekawe jest, jak się wydaje, że nadekspresja genów tych enzymów może prowadzić do nasilenia proce-



sów angiogenezy (rys. 4). W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazaliśmy, że komórki mięśni gładkich transfekowane plazmidem zawierającym gen eNOS (103,104) lub HO-1 (105,107) produkują więcej VEGF aniżeli komórki transfekowane wektorem kontrolnym. W badaniach prowadzonych na zwierzętach potwierdzono, że efektem transferu genów eNOS (108) lub HO-1 (109) może być nasilenie angiogenezy, co prowadzi do poprawy przebiegu gojenia się ran czy znosi niedotlenienie w mięśniach szkieletowych. W naszych najnowszych doświadczeniach przypuszcza się również, że zwiększenie syntezy VEGF może być osiągnięte poprzez nadekspresję miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (Grzenkowicz-Wydra i wsp., praca wysłana do druku). Możliwe zatem, że wykorzystanie genów, których produkty mają działanie plejotropowe, prowadząc z jednej strony do ograniczenia procesów zapalnych, a z drugiej umiarkowanie zwiększając syntezę VEGF i nasilając procesy angiogenezy przyniesie lepsze efekty aniżeli transfer genu VEGF (rys. 4). Nadmierne wysoka ekspresja tego czynnika stymuluje wprawdzie powstawanie naczyń krwionośnych, ale efekt ten może być niweczony przez niekorzystne efekty uboczne aktywności VEGF, prowadzące do nasilenia procesów zapalnych i w konsekwencji do postępu chorób układu krążenia, a nie ich zahamowania. Można również postawić hipotezę, że ograniczenie procesów zapalnych pozwoli na wykorzystanie efektów angiogennych i ochronnych nawet niskich stężeń VEGF. VEGF jest bowiem niewątpliwie czynnikiem protekcyjnym dla komórek śródbłonna (34,110,111). Stymulacja przez VEGF prowadzi do zwiększenia syntezy NO i PGI<sub>2</sub>, co może chronić śródbłonek przed niekorzystnym działaniem zmodyfikowanych lipoprotein (110). Korzystne właściwości VEGF mogą się jednak nie ujawniać, gdy nasilone procesy zapalne skierują działanie czynnika na stymulację leukocytów i komórek mięśni gładkich.

## 8. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych prób klinicznych proangiogennej terapii genowej wskazuje się, że może ona przynosić pozytywne efekty. Konieczne jest jednak wykonanie dalszych badań, które pozwolą na ustalenie warunków stosowania tej obiecującej strategii. Niewykluczone, że osiągnięcie pozytywnego efektu będzie możliwe tylko w przypadku niektórych pacjentów. Dlatego niezbędne jest poznanie molekularnych mechanizmów osobniczego zróżnicowania procesów zapalnych i angiogenezy w chorobach układu krążenia. Uzyskane wyniki eksperymentów prowadzonych na zwierzętach przestrzegają również przed możliwością wystąpienia poważnych efektów ubocznych terapii VEGF. Na szczęście dotychczas nie stwierdzono takich objawów u pacjentów poddawanych terapii genowej, jednak jak najbardziej uzasadnione są badania zmierzające do opracowania wektorów, w których ekspresja terapeutycznego genu będzie mogła być ściśle regulowana.

Entuzjazm konieczny dla osiągnięcia celu jakim jest skuteczna terapia genowa nie może przesłaniać faktu, że wyniki większości dotychczasowych badań są dalekie



od oczekiwanych. Ciekawym zjawiskiem jest ponadto silny efekt *placebo*, który skłania niektórych krytyków do powątpiewania w efekty bardzo nagłaśnianych prób klinicznych (112). O terapii genowej w leczeniu chorób układu krążenia będzie można mówić dopiero, wtedy gdy okaże się ona skuteczna we właściwie kontrolowanych badaniach klinicznych obejmujących znacznie większą liczbę pacjentów i dłuższy czas obserwacji niż to miało miejsce dotychczas.

Praca przygotowana w ramach działalności statutowej Zakładu Biochemii Komórki, finansowanej przez Uniwersytet Jagielloński. Badania autorów omawiane w pracy były częściowo finansowane z grantów KBN nr 3 P04A 049 22 oraz 6 P04B 013 21.

## Literatura

1. Dulak J., (2000), *Biotechnologia*, 1(48), 135-146.
2. Kootstra N. A., Verma I. M., (2003), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 413-439.
3. Silva J. M., Hammond S. M., Hannon G. J., (2002), *Trends Mol. Med.*, 8, 505-508.
4. Jozkowicz A., Dulak J., Nanobashvili J., Polterauer P., Prager M., Huk I., (2002), *Eur. Surg.*, 34, 95-100.
5. Herweijer H., Wolff J. A., (2003), *Gene Ther.*, 10, 453-458.
6. Raper S. E., Yudkoff M., Chirmule N., Gao G. P., Nunes F., Haska Z. J., Furth E. E., Propert K. J., Robinson M. B., Magosin S., Simoes H., Speicher L., Hughes J., Tazelaar J., Wivel N. A., Wilson J. M., Batshaw M. L., (2002), *Hum. Gene Ther.*, 13, 163-175.
7. Rutanen J., Markkanen J., Yla-Herttuala S., (2002), *Drugs*, 62, 1575-1585.
8. Yla-Herttuala S., Martin J. F., (2000), *Lancet*, 355, 213-222.
9. Maeda Y., Ikeda U., Shimpo M., Shibuya M., Monahan J., Urabe M., Ozawa K., Shimada K., (2000), *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 36, 438-443.
10. Shimpo M., Ikeda U., Maeda Y., Takahashi M., Miyashita H., Mizukami H., Urabe M., Kume A., Takizawa T., Shibuya M., Ozawa K., Shimada K., (2002), *Cardiovasc. Res.*, 53, 993-1001.
11. Su H., Lu R., Kan Y. W., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 13801-13806.
12. Thomas C. E., Ehrhardt A., Kay M. A., (2003), *Nat. Rev. Genet.*, 4, 346-358.
13. Muul L. M., Tuschong L. M., Soenen S. L., Jagadeesh G. J., Ramsey W. J., Long Z., Carter C. S., Garabedian E. K., Alleyne M., Brown M., Bernstein W., Schurman S. H., Fleisher T. A., Leitman S. F., Dunbar C. E., Blaese R. M., Candotti F., (2003), *Blood*, 101, 2563-2569.
14. Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J. L., Bousso P., Deist F. L., Fischer A., (2000), *Science*, 288, 669-672.
15. Hacein-Bey-Abina S., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., (2002), *Int. J. Hematol.*, 76, 295-298.
16. Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., Le Deist F., Wulffraat N., McIntyre E., Radford I., Villeval J. L., Fraser C. C., Cavazzana-Calvo M., Fischer A., (2003), *N. Engl. J. Med.*, 348, 255-256.
17. Ross R., (1999), *N. Engl. J. Med.*, 340, 115-126.
18. Cooke J. P., Dzau V. J., (1997), *Annu. Rev. Med.*, 48, 489-509.
19. Yla-Herttuala S., Alitalo K., (2003), *Nature Med.*, 9, 694-701.
20. Khan T. A., Sellke F. W., Laham R. J., (2003), *Gene Ther.*, 10, 285-291.
21. Khurana R., Martin J. F., Zachary I., (2001), *Hypertension*, 38, 1210-1216.
22. Khurana R., Simons M., (2003), *Trends Cardiovasc. Med.*, 13, 116-122.
23. Dulak J., Jozkowicz A., (2002), *Eur. Surg.*, 34, 101-104.
24. Alitalo K., Carmeliet P., (2002), *Cancer Cell*, 1, 219-227.
25. Carmeliet P., (2000), *Nat. Med.*, 6, 389-395.
26. Davis S., Yancopoulos G. D., (1999), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237, 173-185.
27. Post M. J., Laham R., Sellke F. W., Simons M., (2001), *Cardiovasc. Res.*, 49, 522-531.
28. Simons M., Bonow R. O., Chronos N. A., Cohen D. J., Giordano F. J., Hammond H. K., Laham R. J., Li W., Pike M., Sellke F. W., Stegmann T. J., Udelson J. E., Rosengart T. K., (2000), *Circulation*, 102, E73-86.
29. Koransky M. L., Robbins R. C., Blau H. M., (2002), *Trends Cardiovasc. Med.*, 12, 108-114.



30. Springer M. L., (2002), *Drug Discov. Today*, 7, 209-211.
31. Dulak J., Jozkowicz A., (2003), *Antioxid. Redox. Signal*, 5, 123-132.
32. Dulak J., Jozkowicz A., (2002), *Cardiovasc. Res.*, 56, 487-488 (author reply 489-491).
33. Servos S., Zachary I., Martin J. F., (1999), *Cardiovasc. Res.*, 41, 509-510.
34. Zachary I., Mathur A., Yla-Herttuala S., Martin J., (2000), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1512-1520.
35. Laitinen M., Zachary I., Breier G., Pakkanen T., Hakkinen T., Luoma J., Abedi H., Risau W., Soma M., Laakso M., Martin J. F., Yla-Herttuala S., (1997), *Hum. Gene Ther.*, 8, 1737-1744.
36. Takeshita S., Tsurumi Y., Couffinahl T., Asahara T., Bauters C., Symes J., Ferrara N., Isner J. M., (1996), *Lab. Invest.*, 75, 487-501.
37. Dulak J., Partyka L., Jozkowicz A., Heba G., Prager M., Neumayer C., Sobhjan B., Thurnher M., Nanobashvili J., Fuegl A., Ratajska A., Polterauer P., Pachinger O., Weidinger F., Dembinska-Kiec A., Redl H., Huk I., (2002), *Eur. Surg.*, 34, 105-110.
38. Jozkowicz A., Fuegl A., Nanobashvili J., Neumayer C., Dulak J., Valentini D., Funovics P., Polterauer P., Redl H., Huk I., (2003), *Int. J. Artif. Organs.*, 26, 161-169.
39. Isner J. M., Pieczek A., Schainfeld R., Blair R., Haley L., Asahara T., Rosenfield K., Razvi S., Walsh K., Symes J. F., (1996), *Lancet*, 348, 370-374.
40. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Kearney M., Walsh K., Isner J. M., (1998), *Circulation*, 97, 1114-1123.
41. Shyu K. G., Chang H., Wang B. W., Kuan P., (2003), *Am. J. Med.*, 114, 85-92.
42. Isner J. M., Baumgartner I., Rauh G., Schainfeld R., Blair R., Manor O., Razvi S., Symes J. F., (1998), *J. Vasc. Surg.*, 28, 964-73, discussion 73-75.
43. Rosengart T. K., Lee L. Y., Patel S. R., Kligfield P. D., Okin P. M., Hackett N. R., Isom O. W., Crystal R. G., (1999), *Ann. Surg.*, 230, 466-470 (discussion 470-472).
44. Rosengart T. K., Lee L. Y., Patel S. R., Sanborn T. A., Parikh M., Bergman G. W., Hachamovitch R., Szulc M., Kligfield P. D., Okin P. M., Hahn R. T., Devereux R. B., Post M. R., Hackett N. R., Foster T., Grasso T. M., Lesser M. L., Isom O. W., Crystal R. G., (1999), *Circulation*, 100, 468-474.
45. Patel S. R., Lee L. Y., Mack C. A., Polce D. R., El-Sawy T., Hackett N. R., Ilercil A., Jones E. C., Hahn R. T., Isom O. W., Rosengart T. K., Crystal R. G., (1999), *Hum. Gene Ther.*, 10, 1331-1348.
46. Makinen K., Manninen H., Hedman M., Matsi P., Mussalo H., Alhava E., Yla-Herttuala S., (2002), *Mol. Ther.*, 6, 127-133.
47. Hedman M., Hartikainen J., Syvanne M., Stjernvall J., Hedman A., Kivela A., Vanninen E., Mussalo H., Kauppila E., Simula S., Narvanen O., Rantala A., Peuhkurinen K., Nieminen M.S., Laakso M., Yla-Herttuala S., (2003), *Circulation*, 107, 2677-2683.
48. Losordo D. W., Vale P. R., Hendel R. C., Milliken C. E., Fortuin F. D., Cummings N., Schatz R. A., Asahara T., Isner J. M., Kuntz R. E., (2002), *Circulation*, 105, 2012-2018.
49. Symes J. F., Losordo D. W., Vale P. R., Lathi K. G., Esakof D. D., Mayskiy M., Isner J. M., (1999), *Ann. Thorac. Surg.*, 68, 830-836 (discussion 836-837).
50. Vale P. R., Losordo D. W., Milliken C. E., McDonald M. C., Gravelin L. M., Curry C. M., Esakof D. D., Mayskiy M., Symes J. F., Isner J. M., (2001), *Circulation*, 103, 2138-2143.
51. Rajagopalan S., Shah M., Luciano A., Crystal R., Nabel E. G., (2001), *Circulation*, 104, 753-755.
52. Rajagopalan S., Trachtenberg J., Mohler E., Olin J., McBride S., Pak R., Rasmussen H., Crystal R., (2002), *Am. J. Cardiol.*, 90, 512-516.
53. Henry T. D., Rocha-Singh K., Isner J. M., Kereiakes D. J., Giordano F. J., Simons M., Losordo D. W., Hendel R. C., Bonow R. O., Eppler S. M., Zioncheck T. F., Holmgren E. B., McCluskey E. R., (2001), *Am. Heart J.*, 142, 872-880.
54. Henry T. D., Annex B. H., McKendall G. R., Azrin M. A., Lopez J. J., Giordano F. J., Shah P. K., Willerson J. T., Benza R. L., Berman D. S., Gibson C. M., Bajamonde A., Rundle A. C., Fine J., McCluskey E. R., (2003), *Circulation*, 107, 1359-1365.
55. Asahara T., Chen D., Tsurumi Y., Kearney M., Rossow S., Passeri J., Symes J. F., Isner J. M., (1996), *Circulation*, 94, 3291-3302.
56. van Belle E., Tio F. O., Chen D., Maillard L., Chen D., Kearney M., Isner J. M., (1997), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29, 1371-1379.



57. Regar E., Serruys P. W., Bode C., Holubarsch C., Guermonprez J. L., Wijns W., Bartorelli A., Constantini C., Degertekin M., Tanabe K., Disco C., Wuelfert E., Morice M. C., (2002), *Circulation*, 106, 1949-1956.
58. Sousa J. E., Costa M. A., Abizaid A., Sousa A. G., Feres F., Mattos L. A., Centemero M., Maldonado G., Abizaid A. S., Pinto I., Falotico R., Jaeger J., Popma J. J., Serruys P. W., (2003), *Circulation*, 107, 24-27.
59. Mann M. J., Whittemore A. D., Donaldson M. C., Belkin M., Conte M. S., Polak J. F., Orav E. J., Ehsan A., Dell'Acqua G., Dzau V. J., (1999), *Lancet*, 354, 1493-1498.
60. Marsh S., Nakhoul F. M., Skorecki K., Rubin A., Miller B. P., Leib R., Levy N. S., Levy A. P., (2000), *Diabetes Care*, 23, 1375-1380.
61. Schultz A., Lavie L., Hochberg I., Beyar R., Stone T., Skorecki K., Lavie P., Roguin A., Levy A. P., (1999), *Circulation*, 100, 547-552.
62. Hochberg I., Hoffman A., Levy A. P., (2001), *Ann. Vasc. Surg.*, 15, 388-392.
63. Belgore F. M., Lip G. Y., Blann A. D., (2000), *Atherosclerosis*, 151, 599.
64. Alber H. F., Dulak J., Frick M., Dichtl W., Schwarzacher S. P., Pachinger O., Weidinger F., (2002), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 39, 1951-1955.
65. Kwon H. M., Sangiorgi G., Ritman E. L., McKenna C., Holmes D. R. Jr., Schwartz R. S., Lerman A., (1998), *J. Clin. Invest.*, 101, 1551-1556.
66. Banai S., Shweiki D., Pinson A., Chandra M., Lazarovici G., Keshet E., (1994), *Cardiovasc. Res.*, 28, 1176-1179.
67. Inoue M., Itoh H., Ueda M., Naruko T., Kojima A., Komatsu R., Doi K., Ogawa Y., Tamura N., Takaya K., Igaki T., Yamashita J., Chun T. H., Masatsugu K., Becker A. E., Nakao K., (1998), *Circulation*, 98, 2108-2116.
68. Ramos M. A., Kuzuya M., Esaki T., Miura S., Satake S., Asai T., Kanda S., Hayashi T., Iguchi A., (1998), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 1188-1196.
69. Dulak J., Jozkowicz A., Dichtl W., Alber H., Schwarzacher S. P., Pachinger O., Weidinger F., (2001), *Atherosclerosis*, 159, 325-332.
70. Inoue M., Itoh H., Tanaka T., Chun T. H., Doi K., Fukunaga Y., Sawada N., Yamashita J., Masatsugu K., Saito T., Sakaguchi S., Sone M., Yamahara K. I., Yurugi T., Nakao K., (2001), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21, 560-566.
71. Celletti F. L., Waugh J. M., Amabile P. G., Brendolan A., Hilfiker P. R., Dake M. D., (2001), *Nat. Med.*, 7, 425-429.
72. Celletti F. L., Hilfiker P. R., Ghafouri P., Dake M. D., (2001), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37, 2126-2130.
73. Hiltunen M. O., Laitinen M., Turunen M. P., Jeltsch M., Hartikainen J., Rissanen T. T., Laukkanen J., Niemi M., Kossila M., Hakkinen T. P., Kivela A., Enholm B., Mansukoski H., Turunen A. M., Alitalo K., Yla-Herttuala S., (2000), *Circulation*, 102, 2262-2268.
74. Dulak J., Schwarzacher S. P., Zwick R. H., Alber H., Milonig G., Smolira A., Huegel H., Weiss C., Jozkowicz A., Pachinger O., Weidinger F., (2001), *Circulation*, 104, 1667 (doniesienie konferencyjne).
75. Yonemitsu Y., Kaneda Y., Morishita R., Nakagawa K., Nakashima Y., Sueishi K., (1996), *Lab. Invest.*, 75, 313-323.
76. Wang H., Keiser J. A., (1998), *Circ. Res.*, 83, 832-840.
77. Ishida A., Murray J., Saito Y., Kanthou C., Benzakour O., Shibuya M., Wijelath E. S., (2001), *J. Cell. Physiol.*, 188, 359-368.
78. Moulton K. S., (2001), *Curr. Atheroscler. Rep.*, 3, 225-233.
79. Moulton K. S., Heller E., Konerding M. A., Flynn E., Palinski W., Folkman J., (1999), *Circulation*, 99, 1726-1732.
80. Moulton K. S., Vakili K., Zurakowski D., Soliman M., Butterfield C., Sylvain E., Lo K. M., Gillies S., Javaherian K., Folkman J., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4736-4741.
81. Celletti F. L., Waugh J. M., Amabile P. G., Kao E. Y., Boroumand S., Dake M. D., (2002), *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 13, 703-707.
82. Springer M. L., Chen A. S., Kraft P. E., Bednarski M., Blau H. M., (1998), *Mol. Cell.*, 2, 549-558.
83. Lee R. J., Springer M. L., Blanco-Bose W. E., Shaw R., Ursell P. C., Blau H. M., (2000), *Circulation*, 102, 898-901.
84. Masaki I., Yonemitsu Y., Yamashita A., Sata S., Tani M., Komori K., Nakagawa K., Hou X., Nagai Y., Hasegawa M., Sugimachi K., Sueishi K., (2002), *Circ. Res.*, 90, 966-973.
85. Dor Y., Djonov V., Abramovitch R., Itin A., Fishman G. I., Carmeliet P., Goelman G., Keshet E., (2002), *EMBO J.*, 21, 1939-1947.



86. Thurston G., Rudge J. S., Ioffe E., Zhou H., Ross L., Croll S. D., Glazer N., Holash J., McDonald D. M., Yancopoulos G. D., (2000), *Nat. Med.*, 6, 460-463.
87. Richardson T. P., Peters M. C., Ennett A. B., Mooney D. J., (2001), *Nat. Biotechnol.*, 19, 1029-1034.
88. Lemstrom K. B., Krebs R., Nykanen A. I., Tikkanen J. M., Sihvola R. K., Aaltola E. M., Hayry P. J., Wood J., Alitalo K., Yla-Herttuala S., Koskinen P. K., (2002), *Circulation*, 105, 2524-2530.
89. Nykanen A. I., Krebs R., Saaristo A., Turunen P., Alitalo K., Yla-Herttuala S., Koskinen P. K., Lemstrom K. B., (2003), *Circulation*, 11, 1308-1314.
90. von der Leyen H. E., Gibbons G. H., Morishita R., Lewis N. P., Zhang L., Nakajima M., Kaneda Y., Cooke J. P., Dzau V. J., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1137-1141.
91. Janssens S., Flaherty D., Nong Z., Varenne O., van Pelt N., Haustermans C., Zoldhelyi P., Gerard R., Collen D., (1998), *Circulation*, 97, 1274-1281.
92. Laukkanen M. O., Kivela A., Rissanen T., Rutanen J., Karkkainen M. K., Leppanen O., Brasen J. H., Yla-Herttuala S., (2002), *Circulation*, 106, 1999-2003.
93. Dulak J., Jozkowicz A., (2003), *Acta Biochim. Pol.*, 50, 31-47.
94. Jeney V., Balla J., Yachie A., Varga Z., Vercellotti G. M., Eaton J. W., Balla G., (2002), *Blood*, 100, 879-887.
95. Zhang M., Zhang B. H., Chen L., An W., (2002), *Cell Res.*, 12, 123-132.
96. Juan S. H., Lee T. S., Tseng K. W., Liou J. Y., Shyue S. K., Wu K. K., Chau L. Y., (2001), *Circulation*, 104, 1519-1525.
97. Duckers H. J., Boehm M., True A. L., Yet S. F., San H., Park J. L., Clinton Webb R., Lee M. E., Nabel G. J., Nabel E. G., (2001), *Nat. Med.*, 7, 693-698.
98. Tulis D. A., Durante W., Liu X., Evans A. J., Peyton K. J., Schafer A. I., (2001), *Circulation*, 104, 2710-2715.
99. Tulis D. A., Durante W., Peyton K. J., Chapman G. B., Evans A. J., Schafer A. I., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279, 646-652.
100. Aizawa T., Ishizaka N., Taguchi J., Kimura S., Kurokawa K., Ohno M., (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 302-307.
101. Otterbein L. E., Zuckerbraun B. S., Haga M., Liu F., Song R., Usheva A., Stachulak C., Bodyak N., Smith R. N., Csizmadia E., Tyagi S., Akamatsu Y., Flavell R. J., Billiar T. R., Tzeng E., Bach F. H., Choi A. M., Soares M. P., (2003), *Nat. Med.*, 9, 183-190.
102. Visner G. A., Lu F., Zhou H., Liu J., Kazemfar K., Agarwal A., (2003), *Circulation*, 107, 911-916.
103. Dulak J., Jozkowicz A., Dembinska-Kiec, A., Guevara I., Zdzienicka A., Zmudzinska-Grochot D., Florek I., Wojtowicz A., Szuba A., Cooke J. P., (2000), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 659-666.
104. Jozkowicz A., Cooke J. P., Guevara I., Huk I., Funovics P., Pachinger O., Weidinger F., Dulak J., (2001), *Cardiovasc. Res.*, 51, 773-783.
105. Dulak J., Jozkowicz A., Foresti R., Kasza A., Frick M., Huk I., Green C. J., Pachinger O., Weidinger F., Motterlini R., (2002), *Antioxid. Redox. Signal.*, 4, 229-240.
106. Jozkowicz A., Huk I., Nigisch A., Weigel G., Dietrich W., Motterlini R., Dulak J., (2003), *Antioxid. Redox. Signal.*, 5, 155-162.
107. Jozkowicz A., Huk I., Nigisch A., Weigel G., Weidinger F., Dulak J., (2002), *Antioxid. Redox. Signal.*, 4, 577-585.
108. Smith R. S. Jr., Lin K. F., Agata J., Chao L., Chao J., (2002), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 1279-1285.
109. Suzuki M., Iso-o N., Takeshita S., Tsukamoto K., Mori I., Sato T., Ohno M., Nagai R., Ishizaka N., (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 302, 138-143.
110. Kuzuya M., Ramos M. A., Kanda S., Koike T., Asai T., Maeda K., Shitara K., Shibuya M., Iguchi A., (2001), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21, 765-770.
111. Kupatt C., Hinkel R., Vachenaer R., Horstkotte J., Raake P., Sandner T., Kreuzpointner R., Muller F., Dimmeler S., Feron O., Boekstegers P., (2003), *FASEB J.*, 17, 705-707.
112. Kaptchuk T. J., (1999), *Circulation*, 100, e108.
113. Stewart D. J. et al., (2002), *Circulation*, 106, 23-26.
114. Rajagopalan S. et al., (2003), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41, 1604.
115. Kastrup J. et al., (2003), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41, 1603.
116. Grines C. L., Watkins M. W., Helmer G., Penny W., Brinker J., Marmur J. D., West A., Rade J. J., Marrott P., Hammond H. K., Engler R. L., (2002), *Circulation*, 105, 1291-1297.