

A k a d e m i a M e d y c z n a w G d a ń s k u

# ANNALES ACADEMIAE MEDICAE GEDANENSIS

**Wewnątrz naczyniowy transfer genów do ściany tętnicy  
szyjnej królika przy pomocy wirusów związanych  
z adenowirusami i wektorów adenowirusowych**

2397

MARCIN GRUCHAŁA

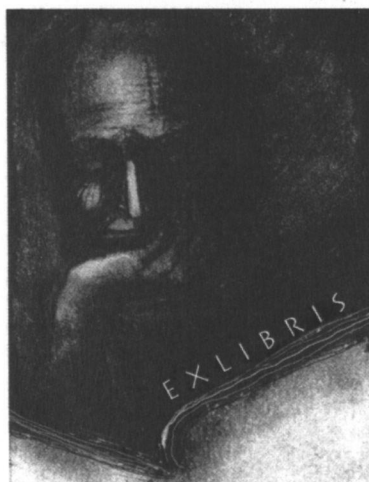
ROZPRAWA HABILITACYJNA

TOM XXXV

2 0 0 5

SUPPLEMENT 3





60 LAT BIBLIOTEKI GŁÓWNEJ  
AKADEMII MEDYCZNEJ  
W GDAŃSKU

**ANNALES  
ACADEMIAE MEDICAE  
GEDANENSIS  
TOM XXXVI  
2005  
SUPPLEMENT 3**





AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Marcin Gruchała

**Wewnątrznaczyniowy transfer genów do ściany tętnicy  
szyjnej królika przy pomocy wirusów związanych  
z adenowirusami i wektorów adenowirusowych**

*Intravascular gene transfer into rabbit carotid artery with  
adeno-associated virus and adenovirus vectors*

Rozprawa habilitacyjna

I Klinika Chorób Serca  
Akademia Medyczna w Gdańsku  
Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Rynkiewicz

GDAŃSK 2005

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY  
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD

prof. dr Roman Kaliszan

KOMITET REDAKCYJNY  
EDITORIAL BOARD

prof. dr Marek Grzybiak (sekretarz), prof. dr Andrzej Hellmann,  
dr hab. Józef Jordan, prof. nadzw. AMG, prof. dr Janusz Limon,  
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI  
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE  
Annales Academiae Medicae Gedanensis  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,  
80-210 Gdańsk, Poland  
e-mail: [annales@amg.gda.pl](mailto:annales@amg.gda.pl)

Artykuły opublikowane w Annales AMG  
są zamieszczane w bazie EMBASE  
Articles published In Annales AMG are covered  
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

---

Akademia Medyczna w Gdańsku

## PODZIĘKOWANIA

Panu Profesorowi Andrzejowi Rynkiewiczowi składam serdeczne podziękowania za nieustającą inspirację do pracy naukowej i do podjęcia badań nad możliwościami zastosowania terapii genowej w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Bardzo dziękuję za wszechstronną pomoc w realizacji podjętych badań oraz stworzenie mi idealnych warunków do ich prowadzenia.

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy zostały wykonane w Zakładzie Medycyny Molekularnej Instytutu A.I. Virtanena Uniwersytetu w Kuopio w Finlandii w latach 2001-2002. Chciałbym wyrazić swoją szczególną wdzięczność Panu Profesorowi Seppo Ylä-Herttuała za możliwość dwuletniej pracy w kierowanym przez Niego Zespole i umożliwienie mi prowadzenia pasjonujących badań w zakresie terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego. Przeprowadzenie prezentowanych badań było możliwe głównie dzięki Jego profesjonalnemu wsparciu, ogromnemu entuzjazmowi, nieustającej zachęce do pracy, zaufaniu i stworzeniu mi warunków niemal nieograniczonej wolności naukowej.

Niniejsze badania nie byłyby możliwe bez niezwykle cennej pomocy Dr Katri Pajusola i Profesora Hansruedi Bueler z Uniwersytetu w Zurychu, którzy skonstruowali i wyprodukowali wykorzystane w prezentowanych badaniach wektory oparte na wirusach związanych z adenowirusami. Bardzo dziękuję za okazaną w trakcie prowadzenia badań pomoc Panu Prof. Kari Alitalo z Instytutu Haartmana w Helsinkach.

Bardzo dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Medycyny Molekularnej Instytutu A.I. Virtanena za wszechstronną pomoc i nieustającą życzliwość w trakcie mojej pracy i pobytu w Kuopio. Jestem szczególnie wdzięczny Tuomasowi Rissanenowi i Juha Rutanenowi za wprowadzenie mnie w tajniki terapii genowej i pracy eksperymentalnej na modelach zwierzęcych. Chciałbym wyrazić serdeczne podziękowania dla Shalini Bhardwaj, Himadriego Roy, Tommiego Heikura, Johanny Markkanen, Ilze Kokina, Adama Sokala, Heleny Vita i Ivany Koholova z Instytutu A.I. Virtanena oraz Marji Hedman, Anttiego Kivela, Anttiego Hedman, Juhy Hartikainena, Maiji-Riitty Orden i Ismo Vajanto ze Szpitala Uniwersyteckiego w Kuopio za wszechstronną pomoc w trakcie prowadzenia eksperymentów.

Chciałbym podziękować za niezwykle cenną pomoc techniczną Marji Polkolainen, Helenie Pernu, Mervi Nieminen, Seiji Sahiro, Aili Erkinheimo, Janne Kokkonen i innym technikom z Instytutu A.I. Virtanena.

Bardzo dziękuję Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej oraz Uniwersytetowi w Kuopio za umożliwienie mi wyjazdu do Instytutu A.I. Virtanena.



## ACNOWLEDGMENTS

I am deeply grateful to Professor Andrzej Rynkiewicz for his great personal enthusiasm and continuous encouragement to scientific work and inspiration to initiate research in cardiovascular gene therapy.

This study was carried out at the Department of Molecular Medicine, A.I. Virtanen Institute, Kuopio University in Finland in years 2001-2002. I am very thankful to Professor Seppo Ylä-Herttua, the head of the Department of Molecular Medicine, A.I. Virtanen Institute, for giving me the opportunity to be involved in the exciting science performed in his group and for possibility to perform presented studies on gene transfer to arterial wall. His professional insight, enthusiasm and trust that I received made these studies possible.

I am deeply indebted to our collaborators Dr Katri Pajusola and Professor Hansruedi Bueler from University of Zurich and Professor Kari Alitalo from University of Helsinki. I feel privileged for having had the access to the novel adeno-associated virus vectors and growth factors provided by you for the realisation of this thesis.

I wish to express my warmest thanks to Everyone in the SYH-group for the acceptance, friendship and invaluable help during my work and two-years stay in Kuopio. I owe special thanks to Tuomas Rissanen and Juha Rutanen who introduced me to the field of gene therapy and animal experimental work. I am grateful to Shalini Bhardwaj, Himadri Roy, Tommi Heikura, Johanna Markkanen, Ilze Kokina, Adam Sokal, Helena Vita and Ivana Koholova from A.I. Virtanen Institute and Marja Hedman, Antti Kivela, Antti Hedman, Juha Hartikainen, Maija-Riitta Orden and Ismo Vajanto from Kuopio University Hospital for their unselfish help in my thesis studies and other ongoing experiments.

Without the technical assistance of Marja Polkolainen, Helena Pernu, Mervi Nieminen, Seija Sahiro, Aila Erkinheimo, Janne Kokkonen and other technicians this study would not have been possible.

I am very grateful to the Foundation for Polish Sciences and University of Kuopio for supporting my stay in A.I. Virtanen Institute.



# SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>13</b>
1.1. HISTORIA I DEFINICJA TERAPII GENOWEJ .....	13
1.2. PODSTAWOWE ZAŁOŻENIA TERAPII GENOWEJ.....	17
1.3. POTENCJALNE CELE TERAPII GENOWEJ W UKŁADZIE SERCOWO- NACZYNIOWYM.....	20
1.4. ŚRÓDBŁONKOWE CZYNNIKI WZROSTU NACZYŃ (VEGF) .....	27
1.5. WEKTORY STOSOWANE W TRANSFERZE GENÓW W UKŁADZIE SERCOWO- NACZYNIOWYM.....	31
1.6. ZNACZENIE AKTYWNOŚCI UKŁADU UBIKWITYNA-PROTEOSOM DLA TRANSFERU GENÓW PRZY POMOCY WEKTORÓW AAV .....	42
1.7. KOMÓRKOWO-SWOISTY TRANSFER GENÓW O REGULOWANEJ EKSPRESJI .....	43
1.8. METODY TRANSFERU WEKTORÓW W UKŁADZIE SERCOWO-NACZYNIOWYM .....	45
1.9. PRÓBY KLINICZNE.....	47
1.10. BEZPIECZEŃSTWO I ASPEKTY ETYCZNE TERAPII GENOWEJ.....	51
1.11. PODSUMOWANIE.....	53
<b>2. CELE PODJĘTYCH BADAŃ.....</b>	<b>54</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>55</b>
3.1. WEKTORY.....	55
3.2. TRANSFER GENÓW DO ŚCIANY TĘTNICY.....	56
3.3. HISTOLOGIA I OCENA MORFOMETRYCZNA .....	59
3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA .....	62
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>63</b>
4.1. TRANSFER GENÓW REPORTEROWYCH DO ŚCIANY TĘTNICY: PORÓWNANIE WIRUSÓW ZWIĄZANYCH Z ADENOWIRUSAMI Z WEKTORAMI ADENOWIRUSOWYMI .....	63
4.2. TRANSFER GENÓW DO ŚCIANY TĘTNICY PRZY POMOCY WEKTORA AAV ZAWIERAJĄCEGO GEN REPORTEROWY POD KONTROLĄ PROMOTORA Tie-1 NIE PROWADZI DO KOMÓRKOWO-SWOISTEJ EKSPRESJI W KOMÓRKACH ŚRÓDBŁONKA.....	74
4.3. ZASTOSOWANIE INHIBITORA PROTEOSOMALNEGO MG-132 NIE PROWADZI DO POPRAWY EFEKTYWNOŚCI TRANSFERU GENÓW DO ŚCIANY TĘTNICY SZYJNEJ KRÓLIKA PRZY UŻYCIU WEKTORA AAV.....	78
4.4. TRANSFER GENU ŚRÓDBŁONKOWEGO CZYNNIKA WZROSTOWEGO NACZYŃ TYPU D PRZY POMOCY WEKTORA ADENOWIRUSOWEGO DO ŚCIANY PRAWIDŁOWEJ I PODDANEJ URAZOWI TĘTNICY SZYJNEJ KRÓLIKA.....	81
<b>5. DYSKUSJA .....</b>	<b>91</b>
<b>6. PODSUMOWANIE.....</b>	<b>106</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>109</b>
<b>8. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>112</b>





## WYKAZ CZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

AAV	wirus związany z adenowirusami ( <i>adeno-associated virus</i> )
Adv	adenowirus ( <i>adenovirus</i> )
CAD	choroba wieńcowa serca ( <i>coronary artery disease</i> )
CAR	receptor dla wirusów coxackie i adenowirusów ( <i>coxackie-adenovirus receptor</i> )
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EC	komórka śródbłonna ( <i>endothelial cell</i> )
eGFP	wzmocnione zielone białko fluorescencyjne ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu ( <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
EPC	śródbłonkowa komórka progenitorowa ( <i>endothelial progenitor cell</i> )
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów ( <i>fibroblast growth factor</i> )
HGF	czynnik wzrostu hepatocytów ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HIF	czynnik indukowany przez niedotlenienie ( <i>hypoxia inducible factor</i> )
HSPG	proteoglikan heparanosiarczanowy ( <i>heparan sulphate proteoglycan</i> )
ICAM	cząsteczka adhezji międzykomórkowej ( <i>intracellular adhesion molecule</i> )
iNOS	indukowana syntaza tlenku azotu ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
<i>LacZ</i>	galaktozydaza- $\beta$ gen wskaźnikowy ( <i><math>\beta</math>-galactosidase marker gene</i> )
MMP	metaloproteinaza macierzy międzykomórkowej ( <i>matrix metalloproteinase</i> )
NO	tlenek azotu ( <i>nitric oxide</i> )
NRP	neuropilina ( <i>neuropilin</i> )
PAD	choroba tętnic obwodowych ( <i>peripheral artery disease</i> )
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
pfu	jednostka tworząca lysinkę ( <i>plaque forming unit</i> )
PTA	przezskórna angioplastyka śródnaczyniowa ( <i>percutaneous transluminal angioplasty</i> )
PTCA	przezskórna śródnaczyniowa angioplastyka wieńcowa ( <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> )
RNA	kwas rybonukleinowy ( <i>ribonucleic acid</i> )
mRNA	informacyjny kwas rybonukleinowy ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
Tie-1	kinaza tyrozynowa z domenami homologicznymi immunoglobulinową i nabłonkowego czynnika wzrostu-1 ( <i>tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-1</i> )
VCAM	cząsteczka adhezji komórkowej naczyń ( <i>vascular cell adhesion molecule</i> )
VEGF	śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR	receptor śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń ( <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> )
VSMC	komórka mięśni gładkich naczyń ( <i>vascular smooth muscle cell</i> )



## 1. WSTĘP

### 1.1. Historia i definicja terapii genowej

Opublikowanie w 1953 roku opisu struktury cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) przez J. Wastona, F. Cricka i M. Wilkinsa oraz wkrótce potem odkrycie zasad kodu genetycznego przez M. Nirenberg i H. Matthaei było przełomem w poznaniu podstawowych zasad przechowywania oraz powielania informacji genetycznej i stało się podwaliną rozwoju genetyki molekularnej [259,175]. Ta zupełnie nowa wówczas dziedzina biologii objęła swoim zainteresowaniem badania struktury i funkcji materiału genetycznego na poziomie cząsteczkowym. W ostatnich dziesięcioleciach, głównie dzięki zdobyczom genetyki molekularnej, dokonął się znaczny postęp w zrozumieniu roli czynników dziedzicznych w procesach patologii człowieka. Poznano mechanizmy chorób uwarunkowanych genetycznie oraz schorzeń o uwarunkowaniach wieloczynnikowych, w których ujawnieniu i przebiegu istotną rolę odgrywają nie tylko złożona wrodzona predyspozycja, ale i liczne elementy środowiska [57, 74]. Dzięki poznaniu molekularnych podstaw wielu chorób coraz częściej można zidentyfikować osoby zagrożone jeszcze przed ujawnieniem się patologii i, o ile jest to możliwe, zaproponować wczesne postępowanie lecznicze lub prewencję.

Obok genetyki medycznej, która jest gałęzią medycyny zajmującą się przede wszystkim dziedziczeniem, rozpoznawaniem, leczeniem chorób uwarunkowanych zmianami w materiale genetycznym człowieka oraz poradnictwem genetycznym dotyczącym problemów pacjentów z chorobami uwarunkowanymi genetycznie i ich rodzin, w ostatnich latach wyodrębniła się nowa gałąź medycyny określana mianem medycyny molekularnej [57,74,117]. Medycyna molekularna bada możliwości klinicznego zastosowania najnowszych osiągnięć genetyki i biologii molekularnej w diagnostyce i leczeniu chorób (tabela 1). Jedną z niezwykle dynamicznie rozwijających się dziedzin medycyny molekularnej jest terapia genowa, która zajmuje się możliwością wykorzystania kwasów nukleinowych w celach terapeutycznych [72,74,75,238].

Tab. 1. Główne pola działania i kierunki badań medycyny molekularnej.  
 Tab. 1. Main interest and research areas of molecular medicine.

<b>Diagnostyka molekularna</b> <i>Molecular diagnostics</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- identyfikacja genów odpowiedzialnych za wystąpienie choroby (choroby uwarunkowane jednogеноwo) <i>disease gene identification (single gene diseases)</i></li> <li>- identyfikacja alleli polimorficznych genów sprzyjających wystąpieniu choroby (choroby uwarunkowane wieloczynnikowo) <i>susceptibility genes identification (multifactorial traits)</i></li> </ul>
<b>Terapia molekularna</b> <i>Molecular therapy</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- terapia rekombinowanymi proteinami <i>recombinant proteins</i></li> <li>- terapia genowa <i>gene therapy</i></li> <li>- terapia komórkowa <i>cell-based therapy</i></li> <li>- terapia przy pomocy przeciwciał <i>monoclonal antibodies</i></li> <li>- substancje drobnocząsteczkowe <i>small molecule drugs</i></li> </ul>

**Terapię genową można zdefiniować jako działalność medyczną polegającą na wprowadzeniu do żywych komórek egzogenego materiału genetycznego (DNA lub RNA), co prowadzi do pożądanej zmiany ekspresji danego genu w celu osiągnięcia efektu terapeutycznego.**

Już w latach 60-tych ubiegłego wieku, znając budowę i podstawowe zasady funkcjonowania materiału genetycznego, naukowcy zaczęli dostrzegać możliwości ingerowania w strukturę kwasów nukleinowych w celu zmiany funkcji poszczególnych genów. W tym czasie formułowano już pierwsze koncepcje transferu genów i terapii genowej. Jednym z pionierów terapii genowej jest W. Szybalski, jeden z czołowych biologów molekularnych, absolwent Politechniki Lwowskiej i doktorant Politechniki Gdańskiej. Wykonał on w McArdle Laboratory for Cancer Research w Wisconsin USA pierwsze eksperymenty *in vitro* transferu prawidłowego genu *HPRT* (*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase*) do linii komórek ludzkich, które nie posiadały funkcjonalnego genu *HPRT* [239,240]. W ten sposób, dzięki metodzie transferu genów, komórki te uzyskały zdolność syntezy enzymu HPRT. Wyniki tych przełomowych doświadczeń zostały opublikowane przez W. Szybalskiego już w 1962 roku, niespełna 10 lat po opublikowaniu przez J. Wastona, F. Cricka i M. Wilkina opisu dwuniciowej spirali DNA. W 1966 roku J. Lederberg i E. Tatum, laureaci nagrody Nobla z 1958 roku za badania dotyczące właściwości kwasów nukleinowych, na sympozjum dotyczącym dalszych kierunków poszukiwań naukowych i przyszłości medycyny związanych z rozwojem biologii molekularnej sprecyzowali teoretyczne podstawy wykorzystania transferu genów jako działania o potencjale

terapeutycznym. Tego typu potencjalną działalność medyczną określili terminem „terapii genowej” [135,243].

Pierwsze badania dotyczące możliwości zastosowania terapii genowej dotyczyły chorób genetycznych uwarunkowanych jednogenowo. W chorobach tych najczęściej defekt pojedynczego genu związany z utratą jego prawidłowej funkcji prowadzi bądź do braku możliwości syntezy danego białka/enzymu lub do produkcji białka o nieprawidłowej strukturze i funkcji. Wprowadzenie do komórek organizmu dodatkowej kopii prawidłowego genu powinno prowadzić do syntezy białka o prawidłowej budowie i funkcji, kompensując defekt metabolizmu leżący u podstaw choroby. W 1970 roku S. Rogers podjął pierwszą, niestety nieudaną, próbę leczenia dwóch chorych z genetycznie uwarunkowanym niedoborem enzymu argininazy wykorzystując wirus *Shope papilloma virus*, który w swym naturalnym genomie zawiera gen argininazy [243]. Dziesięć lat później, w 1980 roku M. Cline z University of California w Los Angeles, mimo braku zgody University of California na próbę terapii genowej beta talasemii, przeprowadził dwie nieskuteczne próby leczenia u chorych w Izraelu i we Włoszech [5]. Mimo, iż zastosowana przez niego eksperymentalna terapia nie przyniosła również szkody pacjentom, naukowiec poniósł surowe konsekwencje ze strony swego macierzystego uniwersytetu oraz National Institute of Health (NIH) za nieautoryzowane i niezgodne z zasadami NIH prowadzenie badań klinicznych. Wydarzenie to było jednym z bezpośrednich czynników inspirujących na początku lat 80-tych publiczną debatę dotyczącą aspektów etycznych oraz potrzeby regulacji i kontroli prób klinicznych terapii genowej [4].

Przełom w rozwoju terapii genowej nastąpił dzięki zastosowaniu pierwszych wektorów wirusowych opartych na retrowirusach. W 1983 roku A. Bernstein [108], D. Miller z I. Verma [157] i T. Friedmann [263] opublikowali pierwsze doniesienia o skutecznym transferze funkcjonalnych genów *in vitro* do komórek ssaków i człowieka przy pomocy wektorów retrowirusowych. Pierwsze linie komórek pakujących bez udziału wirusa pomocniczego, które znacznie ułatwiły produkcję wektorów retrowirusowych, zostały wprowadzone do użycia przez H. Temina [260] i R. Mulligana [149]. Pierwszy udokumentowany efektywny transfer genu wskaźnikowego *NeoR in vivo* u myszy przy pomocy wektora retrowirusowego *N2* został opublikowany w 1985 roku przez E. Gilboa i W.F. Anderson [52]. W 1989 roku W.F. Anderson, M. Blaese i S. Rosenberg dokonali pierwszego skutecznego i zaaprobowanego przez NIH transferu genu wskaźnikowego *NeoR* przy pomocy wektora retrowirusowego w warunkach klinicznych u człowieka [210]. Celem tego transferu było genetyczne oznakowanie limfocytów naciekających nowotwór u pacjentów z czerniakiem złośliwym.

Pierwsza, zaaprobowana przez NIH, próba kliniczna terapii genowej miała miejsce 14 września 1990 roku. Czteroletnia dziewczynka Ashanthi DeSilva, cierpiąca na uwarunkowany defektem genu deaminazy adenozykowej ciężki złożony niedobór odporności (SCID/ADA), jako pierwsza z dwóch pacjentek

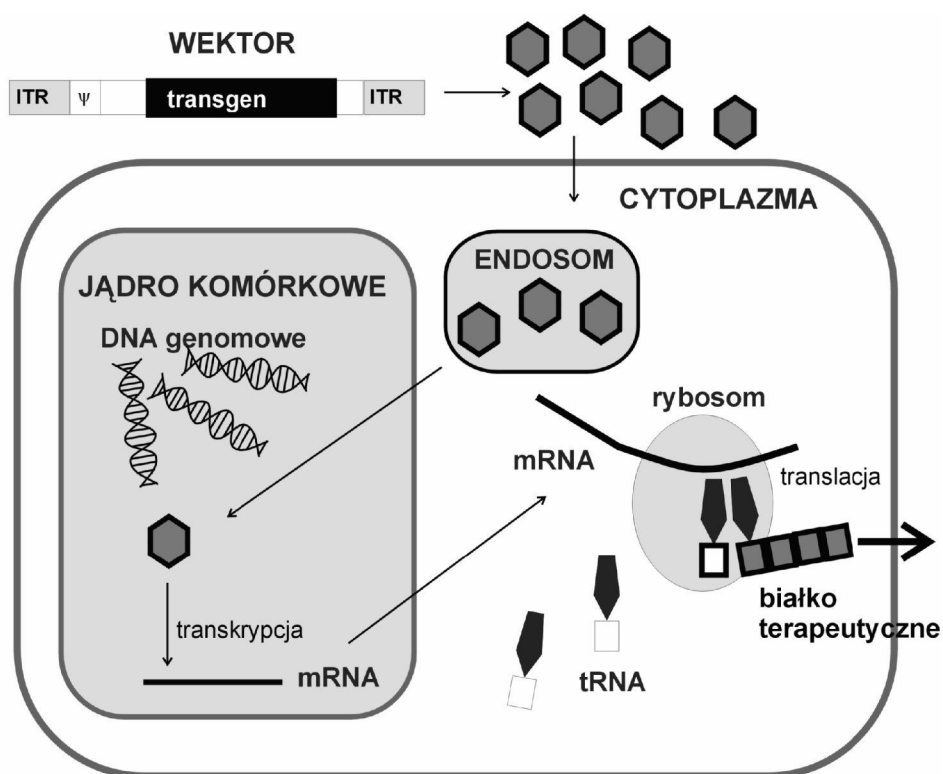
otrzymała infuzję zmodyfikowanych prawidłowym genem *ADA* własnych limfocytów T. W ciągu 23 miesięcy chora otrzymała dziesięć kolejnych infuzji podanych *ex vivo* korekcie genetycznej limfocytów T. U pacjentki tej osiągnięto pierwszy w historii sukces kliniczny terapii genowej, stwierdzając istotny wzrost poziomu aktywności enzymu deaminazy adenozynowej w pięć lat po ostatniej infuzji na poziomie 25% wartości prawidłowych, niestety nie gwarantujący całkowitego wyleczenia [23].

Największym do tej pory osiągnięciem terapii genowej jest bez wątpienia całkowite wyleczenie ciężkiego złożonego niedoboru odporności związanego z chromosomem X (SCID/X1), zwanego „chorobą chłopca w namiocie” [32]. To zagrażające życiu schorzenie spowodowane jest mutacją genu znajdującego się na chromosomie płciowym X, kodującego łańcuch  $\gamma_c$  receptora dla cytokin takich jak min.: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15. Czynniki te biorą istotny udział w różnicowaniu i dojrzewaniu limfocytów T i NK. Przyjęta strategia terapeutyczna była podobna jak w przypadku SCID/ADA. Pobrane komórki macierzyste szpiku kostnego poddawano korekcji genetycznej *ex vivo* przy pomocy transferu prawidłowego genu kodującego łańcuch  $\gamma_c$  receptora dla cytokin z użyciem wektora retrowirusowego, a następnie reimplantowano zmodyfikowane komórki choremu. Pierwszą tego typu próbę kliniczną przeprowadzili w 1999 roku M. Cavazzana-Calvo i A. Fischer w Instytucie Pasteura w Paryżu, włączając do badania 11 chłopców. U wszystkich pacjentów uzyskano całkowite wyleczenie z prawidłowymi parametrami odporności komórkowej i humoralnej.

W pierwszych eksperymentach dotyczących transferu genów w układzie sercowo-naczyniowym, opublikowanych w 1989 roku przez E. Nabel do transferu genu wskaźnikowego  $\beta$ -galaktozydazy do ściany tętnic również wykorzystano strategię *ex vivo* [166]. Przy pomocy wektora retrowirusowego transdukowano komórki śródbłonna pobrane z żyły szyjnej zwierząt laboratoryjnych, a następnie zmodyfikowane komórki podano do pozbawionej śródbłonna tętnicy udowodnionej tych zwierząt. Wykazano, iż komórki wykazujące ekspresję  $\beta$ -galaktozydazy, ulegają efektywnej implantacji w pozbawionej śródbłonna ścianie tętnicy. Badacze z tej samej grupy rok później wykazali możliwość bezpośredniego transferu genów do ściany tętnicy *in vivo* przy użyciu wektora retrowirusowego i plazmidowego DNA z użyciem liposomów [167]. Pierwszą próbę kliniczną transferu genu w układzie krążenia dokonał J. Isner ze Szpitala Św. Elżbiety w Bostonie w 1996 roku [101]. Plazmidowy DNA kodujący śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń typu  $A_{165}$  (VEGF- $A_{165}$ ) podano na pokrytym hydrożelem balonie do tętnicy krytycznie niedokrwionej kończyny dolnej. Autorzy opisali zwiększenie sieci naczyń krwionośnych w badaniu angiograficznym i pojawienie się zmian naczyńniakowatych na skórze kończyny dystalnie od miejsca aplikacji plazmidu świadczące o udanym transferze genu *VEGF- $A_{165}$* .

## 1.2. Podstawowe założenia terapii genowej

Podstawowym założeniem terapii genowej jest wpływ na funkcję czyli ekspresję genów w celach terapeutycznych [72,74,238]. Intencyjne zwiększenie lub zmniejszenie ekspresji genu prowadzi do pojawienia się w tkance większej albo zmniejszonej ilości białka kodowanego przez dany gen. W ten sposób, wpływając na kluczowe białka zaangażowane w patomechanizm chorób, możemy korygować defekty genetyczne lub aktywnie wpływać na toczące się procesy biologiczne, ryc. 1.



Ryc. 1. Transfer dodatkowej kopii genu przy pomocy wektora adenowirusowego prowadzi do ekspresji transgeny i produkcji białka o działaniu terapeutycznym. Dokładny opis w tekście.

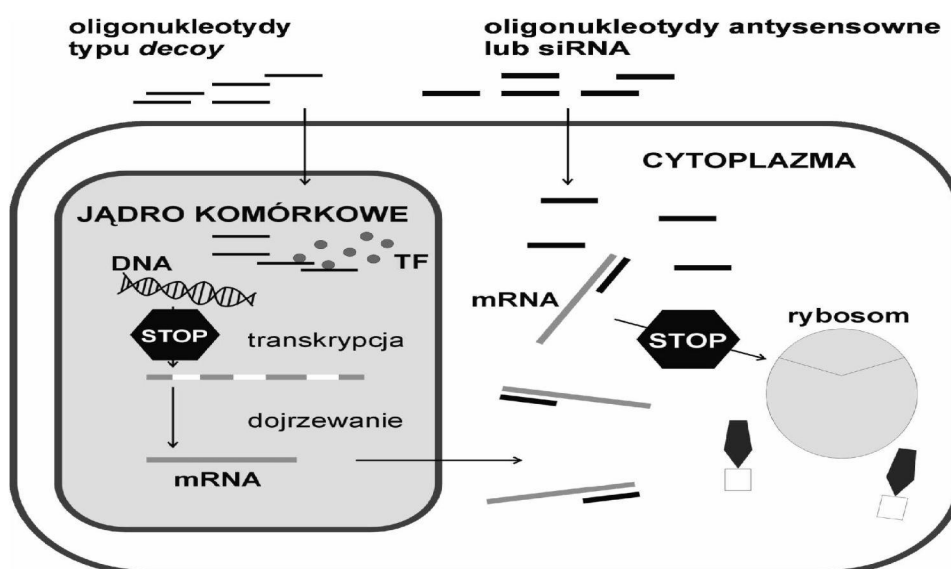
Fig. 1. Gene transfer with the use of adenoviral vector leads to the transgene expression and therapeutic protein production.

Przykładem terapii wzmacniającej funkcję genu, polegającej na transferze dodatkowych kopii prawidłowego genu, może być transfer prawidłowego genu receptora LDL do wątroby chorego z hipercholesterolemią rodzinną [264]. Choroba ta polega na braku prawidłowego genu receptora LDL w komórkach organizmu, co prowadzi do ciężkich zaburzeń lipidowych, przedwczesnej miażdżycy i zgonów w młodym wieku [74]. Innym przykładem może być terapeutyczna angiogeneza przy pomocy transferu dodatkowych kopii genu śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (VEGF) do obszaru niedokrwionego mięśnia sercowego w celu indukcji powstawania naczyń krążenia obocznego [172].

Hamowanie aktywności genów, których nadmierna ekspresja jest przyczyną chorób, może być wykonane między innymi przy użyciu pułapek oligonukleotydowych. Są to krótkie fragmenty DNA lub RNA, które na zasadzie komplementarności łączą się z fragmentami regulatorowymi genów lub z transkrybowanym informacyjnym mRNA danego genu, hamując przepływ informacji genetycznej, ryc. 2 [72,74,238]. Informacyjny mRNA może również być swoiście degradowany przy użyciu oligonukleotydów o nukleolitycznej aktywności enzymatycznej określanych rybozymami [238]. Jednym z najczęstszych eksperymentalnych zastosowań rybozymów jest terapia infekcji ludzkim wirusem nabytego niedoboru odporności HIV polegająca na swoistej degradacji RNA wirusa [238]. Alternatywną metodą wybiórczej degradacji swoistego mRNA jest wykorzystanie niskocząsteczkowego tzw. interferującego RNA (siRNA), który również posiada zdolność identyfikacji swoistych sekwencji mRNA [238]. W konsekwencji wszystkie te metody prowadzą do selektywnego ograniczenia lub zablokowania syntezy danego białka/enzymu, ryc. 2.

Transfer genów w układzie sercowo-naczyniowym dotyczy komórek somatycznych organizmu. Możliwa jest również modyfikacja komórek szlaku płciowego metodami terapii genowej, jednak tego typu działalność budzi wiele kontrowersji natury etycznej. Transfer egzogenego materiału genetycznego może odbyć się *ex vivo* to znaczy poza organizmem chorego i dotyczyć komórek lub tkanek pobranych, a następnie po modyfikacji genetycznej reimplantowanych do ciała pacjenta [72,74,238]. Z sytuacją taką mamy do czynienia w przypadku transferu genów do przeszła żylnego przed jego wszyciem jako pomost omijający zwężenie w tętnicy wieńcowej lub obwodowej. Transfer może zostać również dokonany *in vivo* to jest bezpośrednio do tkanki lub narządu żywego organizmu [72,74,238]. Przykładem może być tu transfer genów kodujących czynniki wzrostu naczyń do mięśnia sercowego czy niedokrwionych mięśni szkieletowych w celu indukcji terapeutycznej angiogenezy (tabela 2).





Ryc. 2. Hamowanie aktywności genów metodami terapii genowej. Dokładny opis w tekście. TF - czynnik transkrypcyjny.

Fig. 2. The inhibition of the genes activity with the use of gene transfer methods. TF- transcription factor.

Tab. 2. Klasyfikacja metod terapii genowej.

Tab. 2. Methods of gene transfer and gene therapy.

<b>1. Ze względu na mechanizm wywierania efektu terapeutycznego / Therapeutic activity</b>
- <b>wzmocnienie ekspresji genów / acceleration of the gene activity</b>
a) transfer kopii prawidłowych genów (np. transfer genu receptora LDL do wątroby w hipercholesterolemii rodzinnej);
b) transfer dodatkowych kopii genów (np. indukcja angiogenezy w obszarach niedokrwienia przy pomocy genów kodujących czynniki wzrostowe naczyń);
- <b>hamowanie ekspresji genów / inhibition of the gene activity</b>
a) oligonukleotydy antysensowne / antisense oligonucleotides, np. inhibicja aktywności elementów układu renina-angiotensyna w nadciśnieniu tętniczym;
b) rybozomy / ribozymes;
c) niskocząsteczkowy, interferujący RNA (siRNA) / small interfering RNA (siRNA);
d) pułapki oligonukleotydowe / decoy oligonucleotides; np. blokowanie czynników transkrypcyjnych w celu hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń w stencie;
<b>2. Ze względu na typ komórek docelowych / Target cells</b>
- somatyczna / somatic cells;
- komórek szlaku płciowego / germ line cells;
<b>3. Ze względu na miejsce transferu genów / Method of gene transfer</b>
- ex vivo, np. transfer genów do przeszczepów żylnych przed ich implantacją;
- in vivo.

Powodzenie terapii genowej w leczeniu danej jednostki chorobowej jest związane ze spełnieniem następujących podstawowych warunków:

1. wyborem odpowiedniego genu terapeutycznego, którego zmiana ekspresji (aktywacja lub hamowanie) będzie wywierała efekt leczniczy,
2. wyborem właściwego wektora czyli nośnika genu terapeutycznego, który przetransportuje kwas nukleinowy o działaniu terapeutycznym do wnętrza komórek docelowych, zapewniając efektywną ekspresję,
3. wyborem metod i narzędzi transferu zapewniających dostateczną kumulację aktywnego wektora w tkance bez jego inaktywacji i rozsiania do narządów innych niż docelowe.

### **1.3. Potencjalne cele terapii genowej w układzie sercowo-naczyniowym**

#### *Miażdżycy, zaburzenia metabolizmu lipidów i układu krzepnięcia*

Schorzenia uwarunkowane defektem pojedynczego genu wydają się być najlepszymi kandydatami dla leczenia metodami terapii genowej. Oczekuje się, iż transfer prawidłowej kopii genu dokona korekty deficytu metabolicznego związanego z obecnością nieprawidłowego genu w danej tkance lub narządzie. Istnieje wiele przykładów jednogenu uwarunkowanych zaburzeń lipidowych predisponujących do rozwoju miażdżycy, z powodzeniem korygowanych w badaniach eksperymentalnych transferem pojedynczych genów. Klasycznym przykładem choroby genetycznej uwarunkowanej mutacją pojedynczego genu kodującego receptor dla frakcji LDL cholesterolu, prowadzącej do przedwczesnej miażdżycy tętnic wieńcowych i objawów choroby niedokrwiennej serca, jest hipercholesterolemia rodzinna [74]. Niezwykle wysoki poziom aterogennych frakcji cholesterolu LDL obserwowany w tej chorobie, może zostać istotnie obniżony, a rozwój miażdżycy tętnic znacznie spowolniony przy zastosowaniu lokalnego transferu genu kodującego prawidłowy receptor dla cholesterolu LDL lub VLDL do wątroby zwierząt eksperymentalnych [127,186]. Podjęto również wstępne próby kliniczne korekcji genu receptora LDL w najcięższej przebiegającej postaci homozygotycznej hipercholesterolemii rodzinnej u ludzi [67,264]. Wykazano także, iż transfer do wątroby zwierząt eksperymentalnych genu acetylo-transferazy lecytyna-cholesterol (*LCAT*) i genu kodującego białko transferujące lipidy może być skuteczny w leczeniu niektórych jednogenu uwarunkowanych dyslipidemii [26,220]. Patologicznie wysoki poziom w surowicy apolipoproteiny apoB100, o promiażdżycowym działaniu, może zostać obniżony przy pomocy transferu genu *apobec-1*, będącego jednostką katalityczną enzymu

edytującego apoB [63,126]. Transfer genu *ApoA1*, odpowiedzialnego za odwrotny transport cholesterolu z surowicy do wątroby, może potencjalnie zostać wykorzystany w leczeniu chorych z genetycznie uwarunkowanym deficytem ApoA1 [19]. Hiperlipoproteinemia typu III może być korygowana przy pomocy transferu genu *apoE*, który prowadzi do obniżenia poziomu lipoprotein [113]. Transfer genu kodującego lipazę lipoproteinową (LPL), enzymu odpowiedzialnego za hydrolizę triglicerydów w chylomikronach i cząsteczkach VLDL, korzystnie wpływa na profil lipidowy u zwierząt z deficytem LPL, prowadząc do wzrostu poziomu cząstek HDL [247,274]. Podobnie transfer genów rozpuszczalnych receptorów zmiatających klasy A (*Class A soluble scavenger receptor*) i klasy B (*Class B soluble scavenger receptor*), obniża ilość lipidów skumulowanych w makrofagach oraz podwyższa poziom cholesterolu frakcji HDL o działaniu przeciwmiażdżycowym [134,274].

W praktyce klinicznej, najczęściej jednak mamy do czynienia z miażdżycą uwarunkowaną wieloczynnikowo, co oznacza, że ujawnia się ona w efekcie kumulacji i współdziałania wielu czynników genetycznych i środowiskowych [70,71,73]. Dlatego transfer pojedynczych genów dla efektywnego leczenia lub zapobiegania wieloczynnikowo uwarunkowanej miażdżycy tętnic może wydawać się kontrowersyjny. Istnieje jednak wiele istotnych przesłanek, pochodzących przede wszystkim z badań eksperymentalnych, iż genetyczna modyfikacja ściany naczyń metodami terapii genowej może skutecznie zapobiegać lub istotnie zwalniać proces także wieloczynnikowo uwarunkowanej miażdżycy. Zaburzenia prawidłowej funkcji śródbłonna, obserwowane w początkowych etapach rozwoju zmian miażdżycowych w tętnicach, mogą być spowodowane głównie obniżeniem produkcji tlenku azotu (NO) w ścianie naczynia. Wykazano, iż tego typu wczesne zaburzenia mogą z powodzeniem być korygowane za pomocą lokalnego transferu genów śródbłonkowej syntazy NO (*eNOS*) i śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (*VEGF*) do ściany tętnicy [86,133,201]. Zwiększenie lokalnej ekspresji enzymów antyoksydacyjnych, białek o działaniu przeciwzapalnym takich jak Interleukina-10 (IL-10) lub hydrolaza acetylowa czynnika aktywującego płytki krwi (PAF-AH), efektywnie redukuje rozwój lokalnych zmian miażdżycowych w miejscu transferu [199,253]. Ostatnio duże zainteresowanie wzbudza również oksygenaza hemowa-1 (HO-1), enzym o silnych właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych [48,50]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, iż nadekspresja genu *HO-1* hamuje rozwój miażdżycy u zwierząt oraz ogranicza restenozę [184, 278]. Przypuszcza się, iż jednym z mechanizmów ograniczających nawrót zwężenia po implantacji stentów uwalniających rapamycynę, jest indukcja ekspresji HO-1 [251].

Zakrzepica tętnicza w miejscu pękniętej, niestabilnej blaszki miażdżycowej, jest kluczowym mechanizmem w patogenezie ostrych zespołów wieńcowych, takich jak ostry zawał serca i niestabilna choroba wieńcowa. W badaniach eksperymentalnych wykazano, iż lokalny transfer genu tkankowego inhibitora

metaloproteinaz (*TIMP*), czyli inhibitora enzymów odpowiedzialnych za degradację substancji podstawowej tkanki łącznej, które ulegają aktywacji w niestabilnej blaszce miażdżycowej, prowadzi do stabilizacji blaszki i redukcji jej prokrzepeowego potencjału [162]. Również transfer genów kodujących cyklooksygenazę, hirudynę, trombomodulinę, tkankowy aktywator plazminogenu i inhibitor czynnika wewnątrzpochodnego okazał się skuteczny w redukcji incydentów ostrej zakrzepicy w warunkach eksperymentalnych [200,261,284].

### ***Choroba wieńcowa serca, miażdżycy tętnic obwodowych***

Objawy choroby wieńcowej serca (*CAD- coronary artery disease*) i choroby miażdżycowej tętnic obwodowych (*PAD- peripheral artery disease*) powstają w wyniku rozwoju zmian miażdżycowych istotnie zwężających lub zamykających światło tętnic. Deficyt w ukrwieniu serca lub mięśni szkieletowych ujawnia się zwykle w postaci bólu wieńcowego (*angina pectoris*) lub chromania przestankowego w warunkach zwiększonego zapotrzebowania metabolicznego lub w zaawansowanych przypadkach w stanie spoczynku. Dlatego wykorzystanie metod terapii genowej dla stymulacji tworzenia sieci naczyń krążenia obocznego może być atrakcyjną opcją terapeutyczną prowadzącą do poprawy ukrwienia w obszarach niedokrwionego miokardium lub mięśni szkieletowych [72,74,272]. Transfer genów kodujących czynniki wzrostowe z rodziny śródbłonkowych czynników wzrostowych naczyń (*VEGF*), czynników wzrostowych fibroblastów (*FGF*) i czynnika wzrostowego hepatocytów (*HGF*) stymuluje tworzenie siatki naczyń krążenia obocznego w niedokrwionych obszarach mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych w badaniach eksperymentalnych [205,206,269,272]. Ich działanie zostało również potwierdzone we wstępnych badaniach klinicznych [66,163,211,231,236,241,246,249,269,272]. Redukcję nasilenia objawów steno-kardialnych, poprawę tolerancji wysiłku oraz redukcję obszarów niedokrwienia w badaniu scyntygraficznym serca wykazano po transferze genu kodującego *VEGF* lub *FGF* do obszarów niedokrwienia u pacjentów z chorobą wieńcową we wstępnych próbach klinicznych I i II fazy [66,211,231,236,249,269]. Transfer genu *VEGF*, *FGF* lub *HGF* okazał się również skuteczny we wstępnych próbach klinicznych u chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, prowadząc do redukcji oczekiwanej liczby amputacji, poprawy gojenia owrzodzeń niedokrwiennych, redukcji zużycia środków analgetycznych, wydłużając dystans chromania przestankowego i zwiększając gęstość sieci naczyń krążenia obocznego w badaniu angiograficznym [163,241,246]. Peptydy z rodziny angiopoetyn posiadają właściwości stymulujące dojrzewanie i przebudowę pierwotnych naczyń powstających pod wpływem *VEGF* w kierunku pełnowartościowych tętnic o w pełni wykształconej ścianie naczyniowej [269,283]. Badania eksperymentalne wskazują również, iż niektóre cytokiny, takie jak: białko chemotaksji monocytów-1 (*MCP-1- monocyte chemotactic protein-1*) i płytkopochodny czynnik

wzrostowy (PDGF- *platelet derived growth factor*), mogą pośrednio stymulować angiogenezę [80,93,103].

Indukcja terapeutycznej angiogenezy może wiązać się z pewnym ryzykiem poważnych działań niepożądanych, takich jak: powstawanie naczynek, waskularyzacja nowotworów prowadząca do progresji ich wzrostu i przerzutowania, neowaskularyzacja blaszek miażdżycowych prowadząca do ich destabilizacji oraz powstawanie niedojrzałych funkcjonalnie naczyń prowadzące do obrzęków [72,74,238].

### ***Nawrót zwężenia po zabiegach wewnątrznacyniowych i degeneracja pomostów żylnych***

Nawrót zwężenia (restenoza) po zabiegach przezskórnej angioplastyki balonowej lub implantacji stentów oraz degeneracja przęseł żylnych w istotnym stopniu ograniczają długoterminowe efekty leczenia przewlekłej choroby wieńcowej serca i miażdżycy tętnic obwodowych [72,74]. Wiele czynników, takich jak: proliferacja mięśni gładkich ściany naczyń, przebudowa ściany naczynia, nagromadzenie substancji podstawowej tkanki łącznej, aktywacja czynników krzepnięcia, adhezja płytek krwi i leukocytów, odgrywa istotną rolę w procesie nawrotu zwężenia po zabiegach wewnątrznacyniowych i degeneracji przęseł żylnych [219]. W badaniach eksperymentalnych sprawdzono wiele różnorodnych strategii terapii genowej w celu ograniczenia proliferacji komórek ściany naczyń poddanych urazowi związanemu z angioplastyką, implantacją stentu, czy warunkom przepływu tętniczego w przypadku przęseł żylnych [42,72,213]. Jedną z najwcześniejszych strategii było hamowanie aktywności genów istotnych w cyklu komórkowym, odpowiedzialnych za proliferację komórek. W tym celu w warunkach eksperymentalnych z powodzeniem wykorzystano oligonukleotydy antysensowne i rybozomy skierowane przeciwko genom; *c-myb*, *c-myc*, *cdc-2*, *cdk-2*, *ras* i *bcl-x* [28,42,98,164,213,235]. Ponadto, z sukcesem zastosowano pułapki oligonukleotydowe, które łącząc się z czynnikami transkrypcyjnymi *E2F* i *NFkB* istotnie hamują proliferację komórek ściany naczyniowej i prowadzą do redukcji rozrostu warstwy wewnętrznej - neointimy [147,148].

Kolejną strategią wykorzystywaną przez terapię genową w celu ograniczenia proliferacji komórek w ścianie naczyń i tworzenia neointimy jest terapia cytotoksyczna, szeroko stosowana również w terapii genowej nowotworów [42,72,213]. Polega ona na transferze do ściany naczynia genu kinazy tymidynowej wirusa opryszczki zwykłej (HSV-tk – *herpes simplex virus thymidine kinase*), a następnie na podaniu gancykloviru, który pod wpływem HSV-tk ulega przekształceniu w toksyczny dla komórek metabolit [76]. Wykorzystując terapię HSV-tk, uzyskano redukcję przyrostu neointimy od 30% do niemal 90% w modelach zwierzęcych. Podobny efekt cytotoksyczny w ścianie naczynia można uzyskać,

wykorzystując gen deaminazy cytozyny, która przekształca egzogenną 5-fluorouracyl w cytotoksyczny produkt 5-fluorouracyl [81].

Wykorzystanie stentów uwalniających lokalnie w miejscu urazu tętnicy środki silnie hamujące proliferację komórek naczyniowych mięśni gładkich istotnie zredukowało ryzyko nawrotu zwężenia po zabiegach angioplastyki tętnic wieńcowych [99]. Jednak zastosowane substancje o działaniu silnie cytostatycznym hamują również proliferację komórek śródbłonka (EC), opóźniając proces gojenia tętnicy po implantacji stentu, co może sprzyjać zwiększeniu ryzyka miejscowych powikłań zakrzepowych [120]. Dlatego nadal korzystną opcją może być terapia, której celem jest szybkie odtworzenie integralności komórek warstwy śródbłonka po urazie tętnicy. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że istotnie redukuje to ryzyko nawrotu zwężenia związanego z proliferacją VSMC i zawału serca wynikającego z lokalnej zakrzepicy. Dlatego głównym obiektem zainteresowania terapii genowej stały się śródbłonkowe czynniki wzrostu naczyń o silnym mitogennym działaniu na EC oraz inne czynniki o protekcyjnym działaniu na ścianę naczyniową [72]. Transfer genu *VEGF-A* i *C* do ściany tętnic zwierząt poddanych eksperymentalnej angioplastyce lub urazowi istotnie redukuje proliferację komórek mięśni gładkich i tworzenie neointymy [48,90,91]. Podobny efekt uzyskano po transferze genu kodującego czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) do ściany uszkodzonej tętnicy [85]. Szybkie odtworzenie integralności warstwy śródbłonka hamuje proliferację komórek mięśni gładkich poprzez sekrecję substancji o działaniu protekcyjnym na ścianę naczyniową, takich jak: tlenek azotu, czynnik natriuretyczny typu-C i prostacyklina  $I_2$ . Ogranicza też adhezję w miejscu uszkodzenia płytek krwi i makrofagów uwalniających substancje mitogenne [72,74,133,176,213].

Obiecującą metodą ograniczenia aktywności proliferacyjnej w ścianie naczynia może być również transfer genu kodującego tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (TIMP-1) w celu ograniczenia aktywności metaloproteinaz tkankowych ulegających aktywacji w poddanej urazowi mechanicznemu ścianie naczynia [248].

Tlenek azotu (NO) produkowany w ścianie naczynia przede wszystkim przez śródbłonkową syntazę NO (eNOS) i indukowalną syntazę NO (iNOS) odgrywa kluczową rolę w zachowaniu prawidłowej funkcji śródbłonka i całego naczynia. Swoją protekcyjną rolę NO odgrywa głównie poprzez hamowanie adhezji płytek krwi i leukocytów, hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich, stymulację proliferacji komórek EC i zwiększenie odporności tych komórek na następstwa urazów [14]. W miejscach urazu naczynia warstwa śródbłonka ulega dezintegracji i w konsekwencji produkcja NO ulega upośledzeniu, co zwiększa ryzyko niekorzystnych następstw w postaci ostrej zakrzepicy lub rozwoju neointymy i zwężenia światła naczynia. Zwiększenie produkcji NO w miejscu urazu przy pomocy transferu genów kodujących syntazę NO istotnie redukuje tworzenie neointymy w badaniach eksperymentalnych [49]. Pośredniemu zwiększeniu

produkcji NO po transferze *VEGF-A* przypisuje się również protekcyjne działanie tego czynnika wzrostowego na ścianę naczyń [49,90,133].

### *Nadciśnienie tętnicze*

Złożona natura pierwotnego nadciśnienia tętniczego wraz z jego wieloczynnikowym uwarunkowaniem oraz stosunkowo efektywna farmakoterapia tego schorzenia sprawiają, iż metody terapii genowej prawdopodobnie nie odegrają na tym polu zasadniczej roli w najbliższych latach [192]. Jednak możliwość uzyskania długotrwałego efektu hipotensyjnego lub nawet trwałej normalizacji wartości ciśnienia tętniczego po jednorazowym zabiegu terapii genowej wydawać się może bardzo atrakcyjną perspektywą. Obecnie badania eksperymentalne prowadzone są w dwóch kierunkach. Celem pierwszego jest osiągnięcie efektu hipotensyjnego poprzez zwiększenie ekspresji czynników o działaniu wazodylatacyjnym. Wykazano, iż transfer genów kodujących kalikreinę tkankową, adrenomedullinę, przedsionkowy peptyd natriuretyczny i eNOS, efektywnie obniża wartość ciśnienia tętniczego u zwierząt eksperymentalnych [38,192,257]. Drugi kierunek badań opiera się na założeniu, iż redukcja wysokości ciśnienia tętniczego może zostać osiągnięta poprzez hamowanie ekspresji białek o potencjale wazokonstrykcyjnym. W warunkach eksperymentalnych z powodzeniem wykorzystano między innymi terapię genową hamującą aktywność genów kodujących receptor  $\beta$ -adrenergiczny, elementy układu renina-angiotensyna: enzym konwertujący angiotensynę I (ACE), receptor dla angiotensyny II typu 1 (AT1R) i element aktywujący gen angiotensynogenu, oraz hormon tyreotropowy [60,114,128,192,202,279]. Mimo obiecujących wyników badań przeprowadzonych na zwierzętach do tej pory nie zainicjowano prób klinicznych leczenia nadciśnienia tętniczego przy pomocy metod terapii genowej.

### *Nadciśnienie płucne*

Pierwotne nadciśnienie płucne jest chorobą o nieznanym etiologii, zdecydowanie złym rokowaniu i niepoddającą się dotychczas stosowanej farmakoterapii. W obrazie patomorfologicznym obserwuje się głównie patologiczną przebudowę drobnych i średniego kalibru naczyń płucnych, polegającą głównie na rozroście komórek warstwy wewnętrznej, co w konsekwencji prowadzi do postępującego wzrostu oporu i ciśnienia w krążeniu płucnym [94]. Podjęto próby zastosowania transferu genów kodujących czynniki o potencjale hamującym proliferację komórek i skurcz naczyń w łożysku płucnym celem leczenia nadciśnienia płucnego w warunkach eksperymentalnych. Wykorzystano z różnym powodzeniem geny kodujące następujące białka: MCP-1, peptyd związany z genem prepro-kalcytoniny, przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), eNOS, syntazę

prostacykliny i czynniki wzrostowe z rodziny śródbłonkowych czynników wzrostu naczyń [94,182,233].

Tab. 3. Potencjalne cele terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego i wybrane geny terapeutyczne.

Tab. 3. *Potential targets and therapeutic genes for gene therapy applications in cardiovascular diseases.*

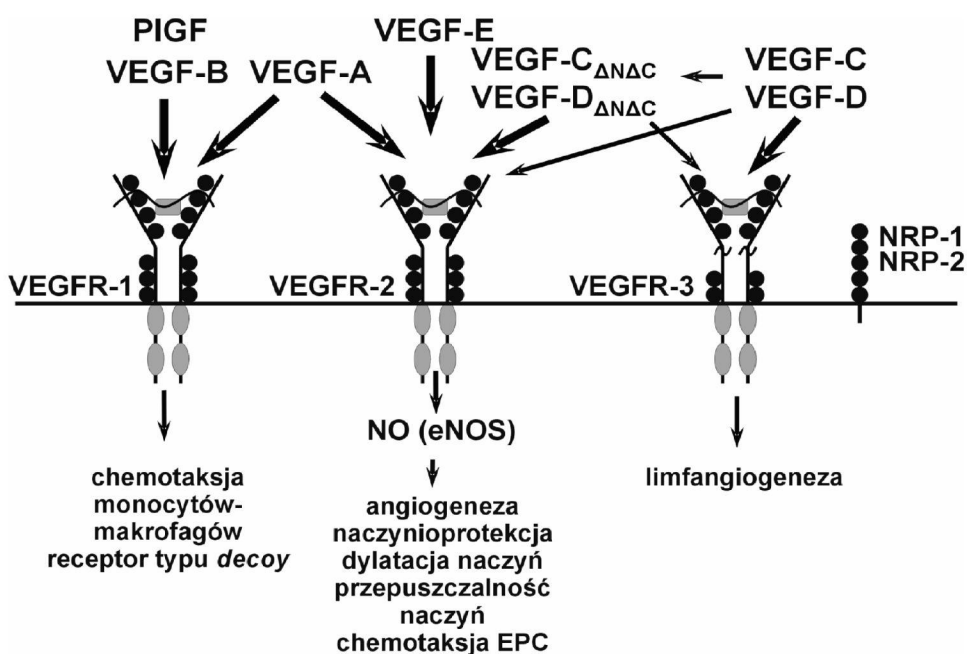
<b>Cel terapeutyczny</b> <i>Target</i>	<b>Gen</b> <i>Gene</i>
Miażdżycy i zaburzenia metabolizmu lipidów <i>Atherosclerosis and disorders of lipid metabolism</i>	<i>LDLR, VLDLR, apoE, apoA-1, lipaza lipoproteinowa, lipaza wątrobowa, LCAT, apoB, rozpuszczalne receptory oczyszczające klasy A i B, rozpuszczalne VCAM i ICAM, enzymy antyoksydacyjne, IL-10, PAF-AH</i>
Zakrzepica <i>Thrombosis</i>	<i>Hirudyna, tPA, thrombomodulina, COX, TFPI</i>
Choroba wieńcowa i miażdżycy tętnic obwodowych <i>Coronary artery disease and peripheral artery disease</i>	<i>Terapeutyczna angiogeneza: VEGF-A, -B, -C, -D, -E, FGF-1, -2, -4, -5, Angiopoetyna-1,-2, HGF, MCP-1, PDGF, eNOS, iNOS</i>
Restenoza po zabiegach na tętnicach i degeneracja prześleń żylnych <i>Postintervention restenosis and venous graft degeneration</i>	<i>VEGF-A, -C, eNOS, iNOS, TIMP, COX, TK, gax, CyA, p53, Rb, sdi-1, pułapki oligonukleotydowe przeciwko: fas ligand, p16, p21, p27, NFkB, E2F, cdk-2, cdc-2, c-myb, c-myc, ras, bcl, Gβγ, PCNA rybozomy, blokowanie ekspresji PDGF lub TGF-β</i>
Niestabilna blaszka miażdżycowa <i>Unstable plaque</i>	<i>TIMP, COX, rozpuszczalne VCAM</i>
Nadciśnienie tętnicze <i>Arterial hypertension</i>	<i>Działanie naczyniorozkurczowe: kalikreina tkankowa, ANP, adrenomedullina, eNOS, iNOS Hamowanie wazokonstrykcji: pułapki oligonukleotydowe przeciw: β-adrenoreceptorom, ACE, AT1R, TRH, receptorowi dla TRH, carboksypeptydazie γ, c-fos, CYP4A1</i>
Nadciśnienie płucne <i>Pulmonary hypertension</i>	<i>ANP, eNOS, syntaza prostacykliny, VEGF-A, peptyd związany z genem prepro-kalcytoniny</i>

Rozwinięcie skrótów w tekście.



#### 1.4. Śródbłonkowe czynniki wzrostu naczyń (VEGF)

Rodzina śródbłonkowych czynników wzrostu naczyń składa się z sześciu reprezentantów o zróżnicowanej masie molekularnej i właściwościach biologicznych. VEGF-A, -B, -C, -D, -E i łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF- *placenta growth factor*) posiadają w swej strukturze wspólną domenę homologiczną zawierającą osiem charakterystycznie ułożonych reszt cysteinowych [39]. Swoje biologiczne działania wywierają poprzez trzy rodzaje receptorów związanych z kinazą tyrozynową VEGFR-1, VEGFR-2 oraz VEGFR-3. Ich indywidualna zdolność do aktywacji poszczególnych receptorów VEGFR oraz koreceptorów neuropiliny-1 i neuropiliny-2 (NRP-1, -2) w znacznym stopniu determinuje zróżnicowanie ich biologicznych właściwości, ryc. 3 [39].



Ryc. 3. Receptory dla czynników VEGF i główne efekty ich aktywacji. NO- tlenek azotu, eNOS- śródbłonkowa syntaza tlenku azotu, EPC- śródbłonkowe komórki progenitorowe.

Fig. 3. VEGF receptors and their main actions. NO- nitric oxide, eNOS- endothelial nitric oxide synthase, EPC- endothelial precursor cell.

**VEGF-A** był pierwszym zidentyfikowanym reprezentantem rodziny VEGF, którego sekwencja genu została opublikowana niezależnie przez trzy grupy badawcze w 1989 roku (Leung i wsp [138], Keck i wsp. [116], Plouet i wsp.[194]). Jednak już w 1983 Senger i Dvorak opisali białko zwiększające przepuszczalność naczyń (VPF- *vascular permability factor*), produkowane głównie przez guzy nowotworowe prowadzące do gromadzenia się płynu puchlinowego w jamie otrzewnej [221]. W 1989 roku Keck i wsp. wykazali, iż VEGF-A i VPF są w rzeczywistości tym samym czynnikiem o identycznej budowie cząsteczki [116]. VEGF-A jest najlepiej poznany VEGF, któremu poświęcono ponad 11 000 indeksowanych publikacji do końca 2004 roku (*PubMed, National Library of Medicine*). VEGF-A odgrywa kluczową rolę w procesach angio- i vasculogenezy. Swoje efekty biologiczne wywiera poprzez aktywację receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2 [39,54]. W organizmie istnieje w postaci kilku form zawierających różną liczbę aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (121, 145, 165, 183, 189 i 206 aminokwasów). Powstają one głównie dzięki procesowi alternatywnego składania mRNA oraz procesów potranslacyjnych. Poszczególne formy VEGF-A różnią się nieco swoimi właściwościami, co wynika ze zróżnicowania ich wiązania do siarczanu heparanu w macierzy międzykomórkowej oraz wiązania z NRP-1 [54].

VEGF-A jest silnym mitogenem EC oraz czynnikiem protekcyjnym dla tych komórek *in vitro* i *in vivo*. Wykazano, iż indukuje on ekspresję białek o działaniu zapobiegającym apoptozie w EC i zwiększa możliwości przetrwania tych komórek [39,54,72]. Poza silnym działaniem angiogennym w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym, potwierdzonym w badaniach eksperymentalnych i klinicznych, VEGF-A zwiększa przepuszczalność naczyń [72, 206, 246, 249, 269, 272]. Powoduje to wydostawanie się osocza wraz z fibryną i innymi białkami poza łożysko naczyniowe do tkanek otaczających, co dodatkowo zwiększa migrację EC w macierzy międzykomórkowej i sprzyja angiogenezie. Ekspresja VEGF-A jest indukowana głównie przez niedotlenienie oraz przez hipoglikemię, zapalenie, procesy naprawy tkankowej i nowotwory [20, 54, 224]. VEGF-A w postaci rekombinowanego białka, jak i transfer genu *VEGF-A* metodą śródnaczyniową i do przydanki tętnic, hamował rozrost warstwy wewnętrznej w tętnicach poddanych urazowi w badaniach na modelach zwierzęcych [8,96,133,254]. Wykazano, iż efekt protekcyjny VEGF-A mediowany jest przede wszystkim przez aktywację receptora VEGFR-2 oraz indukcję syntezy NO i prostacykliny [54,133].

W ostatnim czasie zaczęto poddawać w wątpliwość naczynio-protekcyjne działanie VEGF-A. W ukończonych badaniach klinicznych nie potwierdzono obserwowanych we wcześniejszych pracach eksperymentalnych ograniczenia częstości i stopnia nawrotu zwężenia po zabiegach na naczyniach wieńcowych i obwodowych po lokalnym transferze genu *VEGF-A* [88,131,246]. Wykazano wzrost ekspresji VEGF-A oraz jego dwóch podstawowych receptorów VEGFR-

1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR w zmianach miażdżycowych i w miejscu restenozy po zabiegu angioplastyki balonowej [34,83,100,222,280]. Kolejne badania na modelach zwierzęcych wskazały na potencjalne właściwości stymulacji rozrostu warstwy wewnętrznej naczynia po lokalnym urazie balonowym oraz promiażdżycowe działanie VEGF-A [33,83,140,280]. Te niekorzystne działania są tłumaczone następującymi ujawnionymi ostatnio właściwościami: 1) VEGF-A indukuje migrację VSMC [188,258], 2) wzmaga w ścianie naczynia ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 [118], 3) indukuje migrację i aktywację monocytów [151], 4) zwiększa ekspresję metaloprotein macierzy międzykomórkowej MMP-1, MMP-3 i MMP-9 [256], 5) indukuje lokalną angiogenezę w blaszkach miażdżycowych, powodując ich progresję [130,187], 6) stymuluje rekrutację komórek progenitorowych szpiku biorących udział w rozroście neointymy po urazie naczynia [140,216].

**VEGF-B** ulega ekspresji głównie w mięśniu sercowym we wczesnym okresie życia osobniczego oraz w mięśniach szkieletowych, trzustce, nadnerczach, kościach i komórkach mięśni gładkich dużych naczyń [1,179-181]. VEGF-B występuje w dwóch formach wynikających z alternatywnego składowania mRNA, które zawierają w cząsteczce 167 lub 186 aminokwasów. Jest on ligandem VEGFR-1 i NRP-1 [179-181]. Po utworzeniu heterodimeru z VEGF-A może również oddziaływać na receptor VEGFR-2 [180]. Jednak w przeciwieństwie do VEGF-A jego ekspresja nie jest zależna od niedotlenienia i cytokin zapalnych, a jego działanie mitogenne *in vitro* na EC jest bardzo słabe [53,179,180]. W badaniach własnych wykazano brak właściwości angiogennych VEGF-B w mięśniu szkieletowym i tkance okołonaczyniowej królika [22,206]. Znaczenie biologiczne tego czynnika wzrostowego pozostaje niejasne. Badania na myszach transgenicznych sugerują jego udział głównie w rozwoju embrionalnym serca. Myszy VEGF-B<sup>-/-</sup> charakteryzują się mniejszym sercem i wadami rozwojowymi tętnic wieńcowych [17].

**VEGF-C** i **-D** tworzą podrodzinę VEGF ze względu na znaczne podobieństwo budowy oraz wspólne mechanizmy działania. Ludzki gen *VEGF-C* został sklonowany w 1996 a *VEGF-D* w 1997 [106,268]. W budowie aminokwasowej oba czynniki wykazują 48% homologii. Oba są syntetyzowane w postaci wielko-cząsteczkowych prekursorów, które składają się z centralnej domeny homologicznej VEGF oraz dwóch przedłużeń polipeptydowych na końcu C i N cząsteczek. Dojrzałe i w pełni aktywne formy VEGF-C i -D, określane jako  $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ , powstają poprzez wewnątrz i zewnątrzkomórkową proteolizę końców -C i -N [2, 106, 229, 268]. Prekursorowe, duże cząsteczki VEGF-C i -D oddziałują głównie poprzez receptor VEGFR-3 podczas, gdy formy aktywne  $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$  wykazują silne powinowactwo do VEGFR-2 [107, 229]. VEGF-D $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$  charakteryzuje się około 290- i odpowiednio 40-krotnie wyższym powinowactwem do VEGFR-2 i -3 w porównaniu do swego wielko-cząsteczkowego prekursora [229]. Prekursorowe, długie cząsteczki VEGF-C i -D wykazują głównie działanie

limfangiogenne podczas, gdy aktywne formy krótkie charakteryzują się działaniem angiogennym i zwiększają przepuszczalność ściany naczyniowej [22,30,104,107,206,250]. Oba czynniki mają duże znaczenie w angiogenezie i limfangiogenezie nowotworów oraz sprzyjają przerzutowaniu drogą limfatyczną. Wykazano, że znaczenie prognostyczne ich ekspresji w tkance guzów nowotworowych [87]. Wyniki badań embrionów oraz zwierząt transgenicznych wskazują na kluczową rolę VEGF-C oraz receptora VEGFR-3 w rozwoju embrionalnym układu limfatycznego. Homozygotyczne myszy VEGF-C<sup>-/-</sup> z całkowicie nieaktywnym genem VEGF-C giną z powodu braku rozwoju układu limfatycznego, a heterozygotyczne myszy VEGF-C<sup>+/-</sup> wykazują poważne wady w rozwoju tego układu [112]. W badaniach własnych transfer ludzkiego genu *VEGF-C* prowadził głównie do indukcji limfangiogenezy w tkankach zwierząt dojrzałych [22,206]. Wykazano również, iż transfer *VEGF-C* do ściany tętnicy, przy pomocy wektora adenowirusowego prowadził do protekcji naczyniowej, zmniejszając rozwój neointymy po urazie mechanicznym tętnicy [85].

Niewiele wiadomo na temat biologicznej roli i właściwości VEGF-D. Znaczne podobieństwo strukturalne z VEGF-C oraz powinowactwo do tych samych receptorów VEGFR-2 i VEGFR-3 pozwalają oczekiwać zbliżonych właściwości biologicznych tych dwóch czynników [2]. Jednak VEGF-D nie odgrywa tak istotnej roli w embrionalnym rozwoju układu limfatycznego jak VEGF-C [111]. Poza mitogennym działaniem na komórki EC stymuluje on podział fibroblastów [183]. W badaniach własnych wykazano silne właściwości limfangiogenne i angiogenne transferu ludzkiego genu VEGF-D<sub>ΔNAC</sub> w mięśniu szkieletowym i tkance okołonaczyniowej królika oraz mięśniu sercowym świni [22,206,214]. Jego ekspresję wykazano podczas rozwoju embrionalnego w powstających kończynach, sercu, nerkach, płucach, wątrobie oraz zębach [11]. W dojrzałych tkankach ludzkich ekspresję VEGF-D wykazuje się w takich narządach jak: serce, płuca, mięśnie szkieletowe, okrężnica oraz jelito cienkie [2]. Konstytutywną ekspresję VEGF-D opisano w komórkach mięśni gładkich (VSMC) prawidłowych tętnic człowieka, a jej zmniejszenie obserwowano w zaawansowanych zmianach miażdżycowych z obecnością włóknienia [212]. Można oczekiwać, iż VEGF-D, podobnie jak VEGF-A i VEGF-C, może posiadać właściwości naczynioprotekcyjne, które mogą znaleźć zastosowanie w terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego. Do tej pory nie badano potencjalnych właściwości naczynioprotekcyjnych VEGF-D w badaniach eksperymentalnych w warunkach *in vivo*.

Mianem **VEGF-E** określono grupę czynników kodowanych przez różne szczepy wirusa *Orf*. Charakteryzują się one wysoką homologią sekwencji aminokwasowej z VEGF-A i wykazują powinowactwo do VEGFR-2 i NRP-1 [178, 265]. Lokalną angiogenezę i wzrost przepuszczalności ściany naczyń obserwowano po infekcji skóry wirusem *Orf* oraz podaniu rekombinowanego VEGF-E [142].

**Łożyskowy czynnik wzrostowy PIGF**, którego cDNA zostało zidentyfikowane w tkance łożyska w 1991 roku, wykazuje wysoką homologię z sekwencją aminokwasową regionu podobnego do PDGF (*platelet derived growth factor*) w VEGF-A [144]. Różne izoformy PIGF (PIGF-1, -2 i -3) wykazują powinowactwo do receptora VEGFR-1 oraz NRP-1 i -2 [145,156,189]. Podobnie jak w przypadku VEGF-B, innego selektywnego agonisty VEGFR-1, biologiczna rola PIGF nie jest w pełni jasna. Myszy transgeniczne pozbawione aktywności obu genów PIGF nie wykazują patologii naczyniowych oraz pozostają płodne [31]. Wykazano, iż PIGF może odgrywać pewną rolę w procesach angiogenezy, chociaż według większości badaczy nie wykazuje on bezpośredniego mitogenego działania na EC oraz nie zwiększa bezpośrednio przepuszczalności ściany naczyniowej. Mimo to, transfer genu *PIGF-2* do skóry myszy indukuje formowanie stabilnych tworów naczyniowych wykazujących wzrost ekspresji VEGFR-1 i -2 [139,177]. Postuluje się pośrednie oddziaływanie PIGF na receptor VEGFR-2 lub indukcję ekspresji VEGF-A [10].

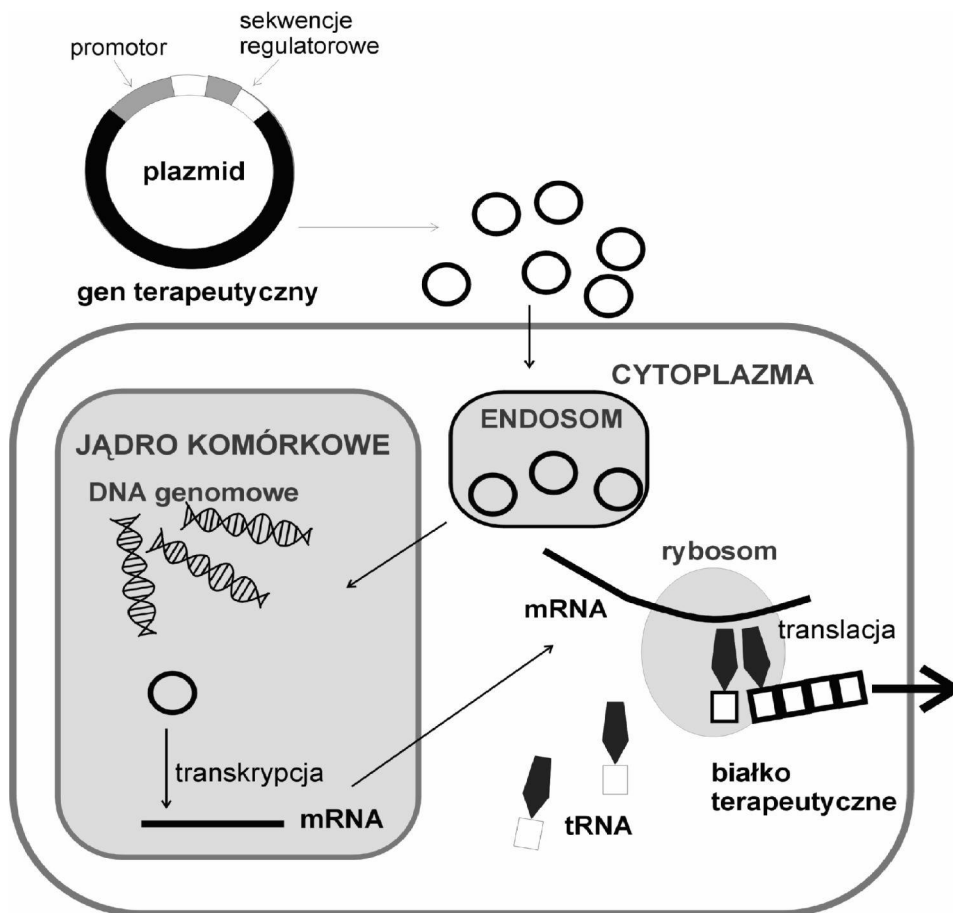
## 1.5. Wektory stosowane w transferze genów w układzie sercowo-naczyniowym

Jednym z najważniejszych elementów decydujących o powodzeniu terapii genowej jest efektywny system transferu genów terapeutycznych do komórek docelowych. Taki system określany jest mianem wektora [72,74,238]. Do tej pory rozwinięto wiele wektorów, których zasadniczym zadaniem jest wprowadzenie egzogenego materiału genetycznego (kwasów nukleinowych) do żywych komórek, prowadząc do jego efektywnej ekspresji [115, 146]. Wprowadzenie egzogenego materiału genetycznego do wnętrza bakterii jest określane mianem transfekcji, zaś do komórki niebakteryjnej (eukariotycznej) określane jest jako transdukcja [238]. Idealny system transferu genów powinny charakteryzować przede wszystkim: wysoka efektywność transferu, specyficzność komórkowa i/lub tkankowa, wysoki poziom ekspresji z możliwością regulacji oraz brak toksyczności i patogenności.

### *Wektory niewirusowe*

Najczęściej stosowanymi wektorami niewirusowymi są cząsteczki DNA w formie plazmidu lub kompleksów plazmidów z cząsteczkami nośnikowymi, których zadaniem jest zwiększenie efektywności transferu do komórek docelowych [72,74,238]. Plazmid jest kolistą cząsteczką DNA, która poza sekwencją genu terapeutycznego, nazywaną transgenem, zwykle zawiera odpowiedni promotor, sekwencje regulatorowe i wybrany gen antybiotykooporności [238].

Promotor odpowiedzialny jest za aktywację transkrypcji transgenu na informacyjny RNA (mRNA), który następnie ulega translacji, czyli przepisaniu na sekwencję peptydu w cytoplazmie komórki poddanej transferowi. Dodatkowo sekwencje regulatorowe najczęściej służą zwiększeniu ekspresji terapeutycznego genu w określonym typie komórek, tkance lub w specyficznych warunkach. Geny antybiotykooporności zawarte w plazmidzie służą jego selekcji i namnażaniu w hodowlach bakteryjnych [238]. Plazmidy należą do wektorów, które nie ulegają integracji z materiałem genetycznym komórki docelowej, nie są wbudowywane w strukturę chromosomu i pozostają w formie episomalnej, ryc.4. Tego typu wektory są określane jako nieintegrujące. Konsekwencją braku integracji jest krótkotrwała i przemijająca ekspresja po transferze mediowanym przez plazmidy.



Ryc. 4. Transfer genów przy pomocy wektora plazmidowego. Opis w tekście.

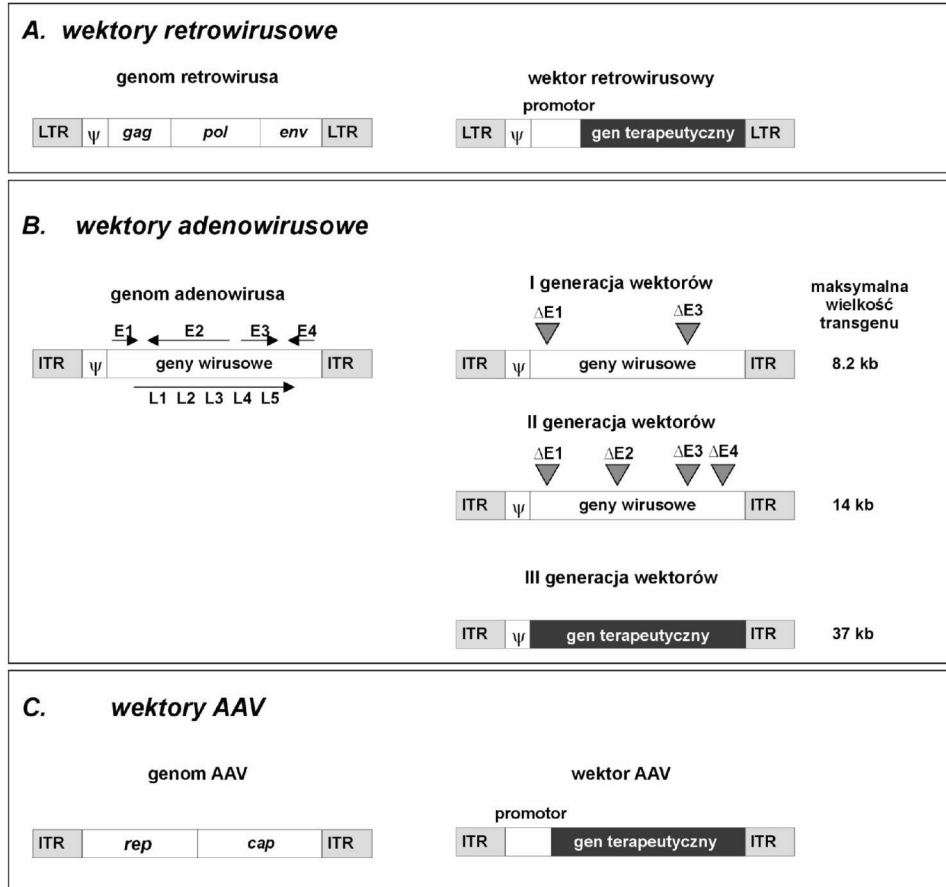
Fig. 4. Plasmid mediated gene transfer.

Plazmidy posiadają wiele korzystnych cech jako wektory dla terapii genowej [62,174,238]. Są stosunkowo proste do skonstruowania i łatwe w produkcji w dużych ilościach. Brak infekcyjności i niska toksyczność warunkują ich bardzo korzystny profil bezpieczeństwa. Wykazano, iż przy pomocy plazmidów można dokonać transferu genów między innymi do kardiomiocytów, komórek ściany naczyń oraz komórek mięśni szkieletowych [72]. Poważnym ograniczeniem wektorów plazmidowych jest ich bardzo niska efektywność transferu w warunkach *in vivo*, zwykle poniżej 1%. Zastosowanie cząsteczek nośnikowych (polimerów o dodatnim ładunku, lipidów lub peptydów chroniących DNA przed degradacją i ułatwiających integrację z komórką docelową) zwiększyło nieco efektywność transferu genów przy pomocy plazmidowego DNA [62,174]. Jednak nadal stosunkowo niski poziom ekspresji uzyskiwany przy pomocy plazmidów w warunkach *in vivo* budzi poważne wątpliwości co do użyteczności tych wektorów dla celów terapeutycznych [214].

W ostatnim czasie opublikowano obiecujące wyniki badań eksperymentalnych, demonstrujących znaczny wzrost skuteczności transferu genów do ściany naczyń i miokardium przy pomocy plazmidowego DNA inkorporowanego do mikrosfer kontrastu ultrasonograficznego i poddanego działaniu ultradźwięków [16,43,121,242]. Wykazano wysoką ekspresję genu reporterowego ograniczoną do pola działania ultradźwięków. Uważa się, iż energia uwalniana podczas działania ultradźwięków na mikrosfery kontrastu lokalnie oddziałuje na błony komórkowe, ułatwiając wniknięcie plazmidu do wnętrza komórki docelowej.

### ***Wektory wirusowe***

Wirusy przez miliony lat ewolucji wykształciły mechanizmy umożliwiające tym stosunkowo prostym organizmom, nie posiadającym własnego metabolizmu, wnikanie do komórek żywych organizmów i ekspresję własnych genów przy wykorzystaniu struktur i mechanizmów enzymatycznych gospodarza. Proces przekształcenia często patogennego wirusa w wektor polega na usunięciu metodami biologii molekularnej części genomu wirusowego kodującego białka strukturalne i odpowiedzialne za proces replikacji wirusa w komórce gospodarza [72,115,146,238]. Usunięte fragmenty genomu wirusa pozostawiają przestrzeń dla egzogenego materiału genetycznego o działaniu terapeutycznym, ryc. 5. Wektor wirusowy efektywnie przenosi gen terapeutyczny, i wykorzystując endogenne mechanizmy komórkowe, doprowadza do ekspresji białka terapeutycznego zamiast swoich własnych białek wirusowych. Ponieważ wektor pozbawiony jest możliwości replikacji wywiera znacznie mniejszy efekt patogenny niż wyjściowy wirus lub jest go całkowicie pozbawiony. Wirusy pochodzące z wielu rodzin zostały wykorzystane dla tworzenia wektorów o różnych właściwościach biologicznych i w konsekwencji o odmiennych możliwościach zastosowania w terapii genowej, tabela 4 [72,115,146,238].



Ryc.5. Tworzenie wektorów wirusowych. A. Wektory renowirusowe. B. Wektory adenowirusowe. C. Wektory AAV (AAV- *Adeno-associated virus*). Dokładny opis w tekście.

Fig. 5. Construction of viral vectors. A. Retroviral vectors B. Adenoviral vectors. C. Adeno-associated virus vectors (AAV- *Adeno-associated virus*).

### Retrowirusy

Retrowirusy są grupą wirusów szeroko wykorzystywanych jako wektory dla transferu genów, zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i klinicznych [72,115,146,238]. Ich popularność wynika z istotnych zalet, takich jak: genom łatwo poddający się manipulacjom umożliwiającym akomodację dużych fragmentów egzogenego materiału genetycznego, możliwość transdukcji różnorodnych typów komórek oraz długotrwała ekspresja, wynikająca z trwałej integracji transgenu z chromosomalnym DNA gospodarza [226].



Genom retrowirusów w postaci jednoniciowego RNA znajduje się w kapsydzie zawartym w otoczce. Większość wektorów pochodzenia retrowirusowego skonstruowana jest na bazie wirusa MLV (*murine leukemia retrovirus*) [155, 126, 238]. Genom MLV składa się z trzech podstawowych genów: *gag*- kodujący białka kapsydu, *pol*- kodujący odwrotną transkryptazę, integrzę i proteazę, oraz *env*- zawierający informację o glikoproteinach otoczki wirusowej. Ważnym elementem genomu jest sekwencja  $\psi$  (*packaging sequence*) zawierająca informację o pakowaniu wirusowego genomu w formujące się cząstki wirusa. Genom retrowirusów ograniczony jest na obu swych krańcach sekwencjami długich powtórzeń końcowych (LTR- *long terminal repeats*). Sekwencja LTR na końcu 5' genomu zawiera promotor odpowiedzialny za transkrypcję wszystkich genów wirusa, ryc. 4A. W trakcie tworzenia wektora z genomu retrowirusa zostają usunięte wszystkie jego geny. W ich miejsce wprowadzony zostaje transgen, zwykle z dodatkowym własnym promotorem, który będzie aktywował ekspresję w komórkach docelowych. Pozbawiony wirusowych genów oraz sekwencji  $\psi$  wektor traci właściwości replikacji genów wirusowych i odtwarzania cząsteczek wirusa w komórce docelowej. Po udanym transferze, czyli wprowadzeniu materiału genetycznego w formie jednoniciowego RNA do wnętrza komórki docelowej, podlega on odwrotnej transkrypcji na dwuniciowy DNA, który następnie zostaje trwale włączony do chromosomalnego DNA gospodarza, gdzie ulega transkrypcji pod kontrolą zastosowanego promotora egzogenego lub retrowirusowego.

Pomimo swoich istotnych zalet wektory retrowirusowe posiadają również poważne ograniczenie, albowiem są one zdolne do transdukcji wyłącznie komórek aktualnie dzielących się [72,226]. Niestety, w ścianie naczyń krwionośnych oraz w miokardium zwykle tylko niewielki odsetek komórek znajduje się w fazie podziału, co znacznie ogranicza przydatność tej grupy wektorów dla terapii genowej w układzie sercowo-naczyniowym *in vivo*. Wektory retrowirusowe efektywnie transdukują komórki aktywnie dzielące się zwłaszcza w warunkach *ex vivo*. Dlatego są przede wszystkim wykorzystywane do transdukcji *ex vivo* komórek szpiku kostnego, komórek macierzystych i mioblastów, które następnie mogą być reimplantowane do organizmu gospodarza [84]. Poważne ryzyko transformacji nowotworowej może wynikać z przypadkowej integracji transgenu do genomu gospodarza w regionie protoonkogenów i ich aktywacji. Wykazano, iż mutageneza insercyjna jest najprawdopodobniej przyczyną wystąpienia zespołów białaczkowych u dzieci trwale wyleczonych z ciężkiego złożonego zespołu niedoboru odporności (SCID- *combined severe immunodeficiency*) przy pomocy terapii genowej z użyciem wektorów retrowirusowych [77,84].

### ***Lentiwirusy***

Lentiwirusy są podgrupą retrowirusów zdolną do infekowania komórek nie-dzielących się [72,115,146,238]. Ta właściwość lentiwirusów wynika z faktu tworzenia w trakcie transdukcji tzw. kompleksu preintegracyjnego, składającego

się z genomu wirusa, białek strukturalnych i enzymów odpowiedzialnych za odwrotną transkrypcję i integrację. Kompleks preintegracyjny umożliwia lentiwirusom wykorzystanie mechanizmów transportu jądrowego dla transferu swojego genomu do wnętrza jądra komórki docelowej. Pierwsze wektory pochodzenia lentiwirusowego powstały w oparciu o ludzki wirus nabytego niedoboru odporności typu-1 (HIV-1 *human immunodeficiency virus type-1*) [58]. Usunięcie kluczowych genów wirusowych doprowadziło do powstania niezdolnego do replikacji wektora, a modyfikacja otoczki wirusa umożliwiła transdukcję nie tylko CD4+ pozytywnych limfocytów, ale i wielu innych niedzielących się typów komórek [44,58]. Do tworzenia wektorów wykorzystano również inne lentiwirusy: ludzki wirus nabytego niedoboru odporności typu-2 (HIV-2) oraz zwierzęce wirusy nabytego niedoboru odporności (FIV- *feline immunodeficiency virus* i SIV- *simian immunodeficiency virus*) [72,215].

Z wektorami lentiwirusowymi wiąże się bardzo duże nadzieje wynikające z ich istotnych zalet, takich jak: wspomniana powyżej zdolność do transdukcji zróżnicowanych komórek nie dzielących się, charakterystyczna dla retrowirusów długotrwała ekspresja związana z trwałą integracją transgeny z genomem komórki docelowej oraz niska immunogenność wynikająca z braku ekspresji białek wirusowych. Wektory lentiwirusowe zastosowane już zostały dla transferu genów do ściany tętnic i mięśnia sercowego zwierząt eksperymentalnych [24,110]. Przy użyciu potencjalnie śmiertelnych dla człowieka wirusów dla tworzenia wektorów niezwykle ważne są względy bezpieczeństwa terapii. Dlatego duży wysiłek badaczy skoncentrowany jest na ograniczeniu do minimum ryzyka generacji zdolnego do replikacji, kompetentnego wirusa HIV podczas stosowania wektorów lentiwirusowych dla transferu genów [44,58].

### **Adenowirusy**

Wektory adenowirusowe należą do najbardziej efektywnych narzędzi transferu genów zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i klinicznych [72, 238]. Adenowirusy są bezotczkowymi wirusami DNA. Mimo, że pierwotnym celem dla tej grupy wirusów jest nabłonek dróg oddechowych, są one również zdolne do infekowania wielu innych typów komórek [72, 238]. Transdukcja uwarunkowana jest obecnością specyficznych dla adenowirusów receptorów na błonie komórek docelowych takich jak: CAR (*coxackie-adenovirus receptor*) i integryny  $\alpha_v$ . Adenowirusy transdukują z wysoką efektywnością zarówno komórki dzielące się, jak i komórki już dojrzałe niezdolne do proliferacji [72, 238]. Poważnym ograniczeniem zastosowania tych wektorów jest krótkotrwałość mediowanej przez nie ekspresji, która wynika z braku integracji transgeny do genomu gospodarza oraz z dużego odczynu immunologicznego skierowanego przeciw transdukowanym komórkom. Odczyn immunologiczny, który może prowadzić nawet do poważnych reakcji toksycznych, wynika przede wszystkim z ekspresji części białek adenowirusowych przez te wektory [228,

252]. Pierwszy zgon chorego związany z zastosowaniem terapii genowej wywołany został reakcją toksyczną po podaniu dużej dawki wektora adenowirusowego do tętnicy wątrobowej pacjenta cierpiącego na łagodną postać genetycznie uwarunkowanego częściowego niedoboru transkarbamylazy ornitynowej (*OTC deficiency*) [150].

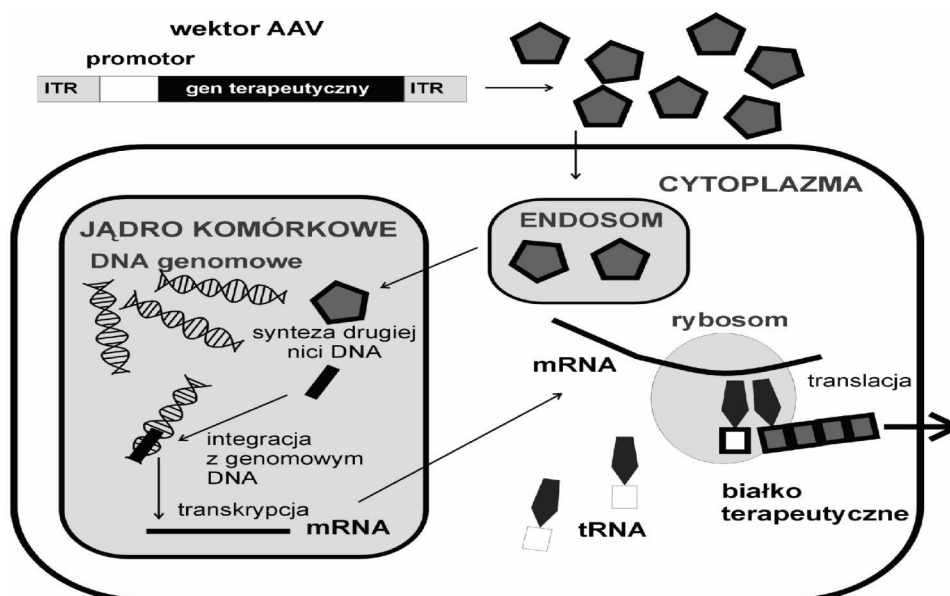
Materiał genetyczny adenowirusów tworzą: odwrócone terminalne sekwencje powtórzeniowe (ITR- *inverted terminal repeats*), sekwencje promotorowe oraz geny wirusowe, ryc. 5B. W zależności od czasu ich ekspresji przed lub po inicjacji syntezy wirusowego DNA wyróżnia się grupy genów wczesnych (*early*) E1-E4 i późnych (*late*) L1-L5 [72,228,238,252]. Pierwsza generacja wektorów adenowirusowych powstała dzięki delecji genów E1 i częściowej delecji grupy E3 w celu stworzenia przestrzeni dla transgenu i pozbawienia wirusa zdolności replikacji. W drugiej i trzeciej generacji wektorów wprowadzono dodatkowe delecje dotyczące genów grupy E2 i /lub E4, które umożliwiają transfer większych fragmentów egzogenego DNA oraz zmniejszają immunogenność i toksyczność, związaną z dalszym ograniczeniem ekspresji białek adenowirusowych, ryc. 5B [72,228,238,252].

Wykazano, iż wektory adenowirusowe są bardzo efektywnymi narzędziami transferu genów między innymi do ściany naczyń krwionośnych, miokardium oraz mięśni szkieletowych [22,85,133,205,206,214,248]. Ich potencjalna przydatność i bezpieczeństwo dla terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego została potwierdzona w wielu badaniach eksperymentalnych oraz kilkunastu badaniach klinicznych [66,88,131,211,231,246]. Dzięki wysokiej efektywności transferu genów kodujących czynniki wzrostowe naczyń do obszarów niedokrwionego mięśnia sercowego lub mięśni szkieletowych przy pomocy tych wektorów udało się uzyskać efektywną angiogenezę wspomagającą powstawanie sieci naczyń krążenia obocznego. Terapeutyczna angiogeneza w obszarach niedokrwienia uzyskana metodami transferu genów potwierdzona została metodami morfologicznymi i czynnościowymi w badaniach eksperymentalnych oraz poprawą kliniczną i wynikami badań czynnościowych w próbach klinicznych [72,272]. Wektory adenowirusowe efektywnie transdukują komórki ściany tętnicy zarówno, gdy są aplikowane od jej światła, jak też od strony przydanki [22,133,150]. Podczas transferu od strony światła nieuszkodzonego naczynia transdukcji ulegają tylko komórki śródbłonna [217]. Adenowirusy ze względu na swój stosunkowo duży rozmiar (około 100 nm) nie są w stanie przeniknąć przez bariery anatomiczne w ścianie tętnicy, które stanowią warstwa nieuszkodzonego śródbłonna oraz wewnętrzna błona elastyczna [209,218]. Dopiero, jak wykazano między innymi w badaniach eksperymentalnych będących przedmiotem niniejszej rozprawy, mechaniczne uszkodzenie ściany naczynia umożliwia wniknięcie wektora i efektywną transdukcję komórek mięśni gładkich w warstwie środkowej tętnicy.

### *Wirusy związane z adenowirusami*

Wirusy związane z adenowirusami (AAV- *adeno-associated viruses*) są niepatogennymi ludzkimi wirusami z grupy parwovirusów, które do przejścia swojego pełnego replikacyjnego cyklu życiowego wymagają obecności wirusa pomocniczego, najczęściej adenowirusa [55,72,160,238]. Zostały one odkryte jako nieistotne zanieczyszczenia w laboratoryjnych hodowlach adenowirusów, stąd pochodzi ich nazwa. Genom AAV zawarty jest w pojedynczej nici DNA i obejmuje tylko dwa geny znajdujące się między odwróconymi powtórzeniami końcowymi (ITR- *inverted terminal repeats*) [55,72,160,238]. Każdy z genów koduje kilka polipeptydów: gen *rep* koduje białka strukturalne, białka kontrolujące replikację wirusa i miejscowo specyficzną integrację genomu wirusa do 19 chromosomu człowieka, gen *cap* koduje białka strukturalne kapsydu. W trakcie konstruowania wektora oba geny zostają usunięte i zastąpione przez transgen wraz z promotorem. Niestety przestrzeń dla transgeny ograniczona jest tylko do pięciu kilobaz [55,160], ryc. 5C.

W ostatnich latach wektory AAV wzbudziły wiele zainteresowania głównie ze względu na możliwość transferu genów do komórek nie dzielących się, szeroki tropizm komórkowy i tkankowy, długotrwałą ekspresję *in vivo* oraz bardzo niską immunogenność i toksyczność [55,72,160,238] (ryc. 6). Ponieważ AAV nie są związane z żadną znaną chorobą u ludzi wydają się one szczególnie atrakcyjnym narzędziem dla klinicznego zastosowania. Zostały one już wykorzystane w próbach klinicznych takich chorób przewlekłych jak: mukowiscydoza, hemofilia i dystrofia mięśniowa, gdzie długotrwała, a nawet trwająca całe życie osobnicze, ekspresja genu terapeutycznego jest szczególnie wskazana [41,55,56]. Do najlepiej poznanych należą wektory skonstruowane na podstawie serotypu drugiego AAV. Znanych jest jednak jeszcze siedem innych serotypów, których zróżnicowany tropizm komórkowy jest obiektem licznych badań eksperymentalnych [64]. Do tej pory nie wykorzystano jeszcze wektorów AAV w klinicznych próbach terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego. Wyniki pierwszych badań eksperymentalnych transferu genów w układzie sercowo-naczyniowym i do mięśni szkieletowych są bardzo zachęcające. Wskazują one na wysoce efektywną i długotrwałą ekspresję przy znikomej immunogenności i toksyczności [7,36,37,223]. W odróżnieniu od adenowirusów doświadczenie z wykorzystaniem wektorów AAV dla transferu genów do ściany tętnic jest jednak nadal bardzo ograniczone. Kontrowersje dotyczą głównie możliwości transferu genów do komórek EC a także indukcji odczynu immunologicznego [5,204,245]. Ostatnio opisano przewlekłe utrzymywanie się nacieku limfocytów T po lokalnym transferze genów do ściany tętnicy przy użyciu wektora AAV [204]. Dlatego istotna część przedstawionej rozprawy dotyczy możliwości wewnątrz-naczyniowego transferu genów przy pomocy wektorów AAV do prawidłowej tętnicy szyjnej królika ze szczególnym uwzględnieniem typu transdukowanych komórek, czasu ekspresji oraz analizy lokalnego odczynu zapalnego.



Ryc. 6. Transfer genów przy pomocy wirusów związanych z adenowirusami (AAV).  
 Fig. 6. Gene transfer mediated by adeno-associated virus vectors (AAV).

Obawy związane z wykorzystaniem wektorów AAV wynikają głównie z utraty wraz z delecją genu *rep* specyficzności miejsca integracji na chromosomie 19 człowieka i ryzykiem transformacji nowotworowej wynikającym z mutagenyzy insercyjnej oraz z konsekwencji niekontrolowanej i długotrwałej ekspresji transgeny [55,72,160,238,244].

### **Bakulowirusy**

Bakulowirusy są grupą patogenów owadów. *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* jest wykorzystywany od wczesnych lat 80-tych do produkcji rekombinowanych protein w komórkach owadów. Bakulowirusy znalazły również szerokie zastosowanie jako biologiczne pestycydy, niszczące określone gatunki szkodliwych owadów. Wirusy te są niezdolne do replikacji w komórkach kręgowców i całkowicie niepatogenne dla ssaków, co zostało bardzo dokładnie wykazane dzięki wieloletniemu wykorzystywaniu bakulowirusów jako pestycydów. Ten korzystny profil bezpieczeństwa wraz z właściwościami transferu genów do wielu rodzajów, zarówno dzielących się jak i nieproliferujących komórek, czyni z wektorów bakulowirusowych atrakcyjne narzędzie terapii genowej

[72,95,193]. Ponadto, technologia ich produkcji i manipulacji genomu jest dobrze znana, umożliwiając akomodację dużych odcinków egzogenego DNA, nawet do 50 kilobaz, i produkcję wektora w dużych ilościach. Wykazano, że bakulowirusy są zdolne do transdukcji ściany tętnic przy użyciu silikonowego kołnierza okołonaczyniowego z efektywnością porównywalną z wektorem adenowirusowym [3]. Jednak podobnie jak w przypadku adenowirusów ekspresja transgeny *in vivo* jest krótkotrwała, ze względu na brak integracji transgeny z genomem gospodarza.

### ***Inne wektory wirusowe***

Ostatnio wykazano, iż wektory skonstruowane w oparciu o inne grupy wirusów mogą także służyć transferowi genów do układu sercowo-naczyniowego. Wirus opryszczki prostej (HSV-1) efektywnie transdukował komórki mięśni gładkich warstwy środkowej naczyń oraz komórki mięśnia sercowego *in vivo* [40], a wykorzystanie wektora opartego na wirusie *Semliki Forest Virus* prowadziło do efektywnego transferu genów do komórek mięśni gładkich warstwy środkowej aorty szczura po urazie balonowym [207].

Tab. 4. Zalety i ograniczenia wektorów stosowanych w terapii genowej.  
 Tab. 4. *Advantages and limitations of the vector systems for gene delivery.*

<b>Wektor</b> <i>Vector</i>	<b>Zalety</b> <i>Advantages</i>	<b>Wady i ograniczenia</b> <i>Limitations</i>
Wektory niewirusowe: Plazmidowe DNA Kompleksy DNA z lipidami, polimerami, białkami itp. <i>Non-viral vectors</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość transferu dużych fragmentów DNA.</li> <li>– Niska immunogenność.</li> <li>– Łatwość produkcji.</li> <li>– Wysoki poziom bezpieczeństwa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Niska efektywność transferu.</li> <li>– Krótkotrwała ekspresja.</li> </ul>
Adenowirusy <i>Adenoviruses</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość transdukcji komórek nieproliferujących.</li> <li>– Wysoka efektywność transferu.</li> <li>– Możliwość transferu dużych fragmentów DNA.</li> <li>– Łatwość produkcji w wysokich mianach.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Krótkotrwała ekspresja.</li> <li>– Duży odczyn immunologiczny.</li> </ul>
Retrowirusy <i>Retroviruses</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Długotrwała ekspresja.</li> <li>– Niska immunogenność.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość transdukcji tylko komórek dzielących się.</li> <li>– Niska efektywność transferu.</li> <li>– Możliwość transformacji nowotworowej.</li> <li>– Trudna produkcja w wysokich mianach.</li> </ul>
Lentiwirusy <i>Lentiviruses</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość transdukcji komórek nie dzielących się.</li> <li>– Długotrwała ekspresja.</li> <li>– Niska immunogenność.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Obawy związane z bezpieczeństwem.</li> </ul>
Wirusy związane z adenowirusami (AAV) <i>Adeno-associated viruses (AAV)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość transdukcji komórek nie dzielących się.</li> <li>– Długotrwała ekspresja.</li> <li>– Brak patogenności.</li> <li>– Niska immunogenność.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Ograniczona przestrzeń akomodacji transgenu (4.7 kb).</li> <li>– Potencjalna możliwość transformacji nowotworowej.</li> <li>– Trudna produkcja w wysokich mianach.</li> </ul>
Bakulowirusy <i>Baculoviruses</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość transdukcji komórek nie dzielących się.</li> <li>– Możliwość transferu dużych fragmentów DNA.</li> <li>– Brak patogenności.</li> <li>– Łatwość produkcji w wysokich mianach.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Krótkotrwała ekspresja.</li> <li>– Potencjalny odczyn immunologiczny związany z otoczką pochodzącą z błony komórkowej owada.</li> </ul>

## 1.6. Znaczenie aktywności układu ubikwityna-proteosom dla transferu genów przy pomocy wektorów AAV

Efektywność transferu genów często rozstrzyga o osiągnięciu pożądanego efektu biologicznego w badaniach eksperymentalnych lub efektu leczniczego w terapii genowej [72,74]. Wektory AAV, ze względu na długotrwałą ekspresję oraz brak indukcji istotnego odczynu zapalnego, są jednymi z najbardziej obiecujących systemów transferu genów. Dlatego dążenie do maksymalizacji efektywności tych wektorów ma bardzo duże znaczenie dla potencjalnego zastosowania AAV w terapii.

Układ ubikwityna-proteosom odgrywa ważną rolę w wewnątrzkomórkowych przemianach białkowych, degradując zbędne lub nieprawidłowe białka. Enzymy proteosomalne tworzą struktury cylindryczne z proteaz rozkładających białka oznakowane wcześniej poprzez związanie z ubikwityną [89,232]. Mechanizm ten bierze również udział w wewnątrzkomórkowych przemianach niektórych wirusów min. wirusa HIV (*human immunodeficiency virus*) [27,165]. Wykazano, iż zastosowanie inhibitorów enzymów proteosomalnych w istotnym stopniu zwiększa efektywność transferu genów przez wektory AAV-2 i AAV-5 do niektórych typów komórek. Opisano, związane z zahamowaniem aktywności proteosomalnej, zwiększenie efektywności transdukcji komórek nabłonka oddechowego, fibroblastów i hepatocytów *in vitro* oraz komórek nabłonka oddechowego *in vivo* [45-47,78,79,270]. Wyniki dotychczas opublikowanych badań wskazują, iż efektywność stosowania inhibitorów enzymów proteosomalnych dla modulacji transferu AAV w znacznym stopniu zależy od typu transdukowanych komórek. W przypadku transdukcji komórek mięśni szkieletowych i komórek mięśnia sercowego, w obecności inhibitora proteosomalnego, nie obserwowano wzrostu efektywności transferu AAV [47]. W badaniach Nicklina i wsp. oraz w badaniach własnych obserwowano, w zależności od rodzaju komórek śródbłonna nawet 12-krotny wzrost ekspresji transgenu po transferze AAV-CMV-eGFP w obecności inhibitora proteosomalnego MG-132 (*Z-LLL- carbo-benzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal*) w warunkach *in vitro* [171,185]. Dlatego jednym z podjętych problemów w niniejszej pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania inhibitora aktywności proteosomalnej dla zwiększenia efektywności transferu genów do ściany tętnic przez AAV *in vivo*. Dotychczasowe badania dotyczące komórek EC i VSMC były wykonywane wyłącznie w warunkach *in vitro*.



## 1.7. Komórkowo-swoisty transfer genów o regulowanej ekspresji

Nie ulega wątpliwości, iż leczenie metodami terapii genowej różnych stanów patologicznych układu sercowo-naczyniowego, może wymagać zróżnicowania: komórek docelowych, terapeutycznych genów oraz pożądanego czasu ekspresji. Zdolność specyficznego kierowania transferu genów do wybranej klasy komórek docelowych oraz efektywna kontrola poziomu ekspresji terapeutycznego genu jest bardzo ważnym warunkiem determinującym efektywność i bezpieczeństwo zastosowanego leczenia [72,74]. Jest to szczególnie ważne w przypadku długotrwałej ekspresji, którą już obecnie możemy osiągnąć przy użyciu wektorów AAV, wektorów retrowirusowych i lentiwirusowych [44,84,146,244].

Swoistość komórkową transferu genów można uzyskać poprzez konstruowanie wektorów o określonym tropizmie komórkowym uwarunkowanym specyficznymi receptorami odpowiedzialnymi za interakcję cząsteczek wirusa z błonami komórek docelowych [13,72,238]. Modyfikacja otoczek wektorów retrowirusowych i lentiwirusowych przy pomocy białka G otoczki wirusa VSV (*Vesicular stomatitis virus*) nie tylko zwiększa odporność wektora na czynniki fizyczne takie jak ultrawirowanie, ale i umożliwia transdukcję innych typów komórek [271]. Wektory adenowirusowe charakteryzują się wysoką efektywnością transferu genów do szerokiego spektrum typów komórek, co często prowadzi do niepożądanego ekspresji transgenów w organach i tkankach poza docelowymi [91]. By uniknąć tego istotnego ze względów bezpieczeństwa terapii problemu, w ostatnim czasie skonstruowano wektory adenowirusowe o zmodyfikowanych kapsydach, dodając elementy prowadzące do specyficznego tropizmu. Dzięki takiemu rozwiązaniu udało się uzyskać min. adenowirusy kodujące tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej typu-1 (TIMP-1) o tropizmie warunkowanym obecnością metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej (MMP-2 i -9) w ścianie tętnicy oraz wektory adenowirusowe i AAV o tropizmie ograniczonym do komórek śródbłonna naczyń [173,248,262].

Inną metodą uzyskania swoistości komórkowej lub tkankowej transferu genów, celem ograniczenia ryzyka związanego z ekspresją transgenów poza organem docelowym, jest zastosowanie komórkowo lub tkankowo swoistych promotorów i elementów regulatorowych [72,238]. Tkankowo lub komórkowo swoisty promotor aktywuje transkrypcję transgenów tylko w swoistej tkance lub typie komórki. Przykładem może być tutaj zastosowanie promotorów swoistych dla śródbłonna naczyń takich jak: promotor genu *FLT-1* (*fms-like tyrosine kinase-1*), genu cząsteczki adhezji komórkowej naczyń *VCAM-1* (*vascular cell adhesion molecule 1*), genu cząsteczki adhezji międzykomórkowej *ICAM-2* (*intercellular adhesion molecule 2*), genu śródbłonkowej syntazy tlenku azotu *eNOS* (*endothelial nitric oxide synthase*), genu *KDR* (*kinase-like domain receptor*) i genu czynnika *von Willebranta* [159, 172, 267]. Wykazano również, iż stosując wektor

adenowirusowy z promotorem SM22 $\alpha$ , można uzyskać selektywną ekspresję w komórkach naczyń mięśni gładkich (VSMC) [105].

Gen *Tie-1* koduje receptor kinazy tyrozynowej, którego ekspresję wykazano w komórkach EC naczyń krwionośnych, zwłaszcza w okresie rozwoju embrionalnego oraz w obszarach aktywacji angiogenezy u zwierząt dorosłych [97,197,122-125]. Aktywność tego genu jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju naczyń krwionośnych. Alitalo i wsp. scharakteryzowali mysz i ludzki gen *Tie-1* oraz wyizolowali jego promotor (*tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor domain gene promoter*) [97,123]. Wyniki analiz embrionalnego rozwoju układu sercowo-naczyniowego zwierząt transgeniczných oraz transferu genów do różnych linii komórkowych *in vitro* wykazały potencjalną możliwość wykorzystania promotora *Tie-1* dla komórkowo-swoistego transferu genów do EC [97,123]. Jednak do tej pory nie badano możliwości wykorzystania promotora *Tie-1* dla transferu genów do komórek EC tętnic *in vivo*. Dlatego jednym z celów podjętych badań było sprawdzenie możliwości zastosowania promotora genu *Tie-1* dla komórkowo-swoistego transferu genów do EC przy pomocy wektora AAV w modelu wewnątrznaczyniowego transferu genów do tętnicy szyjnej królika *in vivo*.

W większości przypadków transferu genów do układu sercowo-naczyniowego w badaniach eksperymentalnych i klinicznych stosowano dotychczas nieswoiste promotory wirusowe, takie jak np. CMV lub RSV, prowadzące do wysoce efektywnej ekspresji [72, 74]. Jednak niektóre zastosowania terapii genowej mogą wymagać regulacji poziomu ekspresji genu terapeutycznego w czasie w celu optymalizacji wyników leczenia i uniknięcia działań niepożądanych wynikających z nadmiernej ekspresji. Dlatego istotny jest rozwój wektorów zapewniających regulowaną ekspresję przy pomocy promotorów indukowalnych. Promotory indukowalne umożliwiają specyficzne hamowanie i aktywację transkrypcji i ekspresji genu w zależności od obecności w środowisku egzo- lub endogennego czynnika [72, 238]. Przykładem może być tetracyklino-zależny promotor *tet*, który aktywuje transkrypcję tylko w obecności tetracykliny [275] lub element transkrypcyjny HRE (*hypoxia response element*) wrażliwy na niedotlenienie, który aktywuje transkrypcję w warunkach lokalnego niedotlenienia [12].

## 1.8. Metody transferu wektorów w układzie sercowo-naczyniowym

Metoda transferu wektora do tkanki docelowej w znacznym stopniu determinuje poziom ekspresji genu terapeutycznego i w konsekwencji istotnie wpływa na ostateczną skuteczność zastosowanej terapii [72,238].

Transfer genów do naczyń krwionośnych może dotyczyć zmian zlokalizowanych (zwążeń miażdżycowe poddane angioplastyce lub stentowaniu, przeszło żyłne), regionalnych łożysk naczyniowych (nadciśnienie płucne, obszary niedokrwionego miokardium lub mięśni szkieletowych), lub systemowych (nadciśnienie tętnicze) [72]. Lokalny transfer do ściany naczynia może odbywać się w warunkach *in vivo* od strony światła naczynia, przy użyciu stale udoskonalanych różnego rodzaju cewników i stentów metodami kardiologii inwazyjnej, oraz metodami chirurgicznymi z przestrzeni okołonaczyniowej przy pomocy kołnierzy, pochewek i żeli okołonaczyniowych z materiałów ulegających biodegradacji, tab.5, [22, 72, 85, 154, 254]. Wysoce efektywny jest transfer wektora *ex vivo* w przypadku przeszł żylnych bezpośrednio przed ich implantacją. W trakcie chirurgicznej procedury mogą zostać one zanurzone w wysoko stężonym roztworze wektora na dłuższy okres czasu [147, 148]. Są to warunki znacznie korzystniejsze od tych, które można uzyskać *in vivo*, gdzie często dochodzi do kontaktu wektora z krwią, jego rozcieńczenia i dezaktywacji przez mechanizmy obronne organizmu [72]. Czas ekspozycji tkanki docelowej na wektor w warunkach *in vivo* jest zwykle ograniczony np. czasem niedokrwienia wywołanego ograniczeniem przepływu krwi przez cewnik aplikacyjny. Efektywność transferu w warunkach *in vivo* może zostać istotnie zwiększona dzięki dodatkowemu zastosowaniu takich czynników jak: ultradźwięki czy impulsy elektryczne [16, 43, 242].

Transfer wektorów do mięśnia sercowego może zostać osiągnięty poprzez aplikacje dowieńcowe, wsteczne wstrzyknięcia do zatoki wieńcowej, podania do worka osierdziowego lub bezpośrednie iniekcje domiokardialne poprzez torakotomię [72, 272]. W ostatnich latach coraz szerzej stosuje się domiokardialne iniekcje od strony światła lewej komory serca przy pomocy przezskórnego systemu NOGA [236, 249, 214]. System ten dodatkowo dzięki analizie lokalnego potencjału elektrycznego i kurczliwości serca umożliwia lokalizację obszarów niedokrwienia, do których terapia powinna być kierowana. Z dużym powodzeniem wykorzystywane są również systemy iniekcji domiokardialnych z dostępu od naczyń żylnych serca, których bezpieczeństwo potwierdzono w badaniach klinicznych przeprowadzonych w Polsce przez grupę prof. Siminiaka z Poznania [225].

W przypadku niedokrwienia mięśni szkieletowych wywołanych miażdżycą tętnic obwodowych najbardziej skuteczny wydaje się być transfer wektora przy pomocy bezpośrednich iniekcji domięśniowych [272]. Wykorzystuje się również wstrzyknięcia dotętnicze oraz aplikacje przy użyciu cewników balonowych.

Tab. 5. Systemy i cewniki wykorzystywane do transferu wektorów w układzie sercowo-naczyniowym.

Tab. 5. *Catheters and systems for vector delivery to vascular wall and myocardium.*

<b>Lokalny transfer do ściany naczynia</b> <i>Local transfer to vascular wall</i>		
<b>Cewnik</b> <i>Catheter</i>	<b>Zalety</b> <i>Advantages</i>	<b>Ograniczenia</b> <i>Limitations</i>
Cewnik dwubalonowy <i>Double balloon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Przedłużony kontakt wektora ze ścianą naczynia.</li> <li>– Niska urażność (transfer niskociśnieniowy).</li> <li>– Możliwość usunięcia wektora po zakończeniu transferu.</li> <li>– Minimalna utrata wektora do krążenia systemowego.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Całkowite zamknięcie naczynia, bez możliwości perfuzji tkanek obwodowych.</li> <li>– Możliwość utraty wektora przez gałęzie boczne naczynia.</li> <li>– Niska efektywność transdukcji głębszych warstw naczynia.</li> </ul>
Cewnik z porowatym balonem <i>Porous balloon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Umożliwia transdukcję głębszych warstw ściany naczynia dzięki transderowi wysokociśnieniowemu.</li> <li>– Relatywnie krótki czas zamknięcia naczynia.</li> <li>– Możliwość wykonania angioplastyki i transferu przy pomocy tego samego cewnika.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwy uraz naczynia związany z wysokim ciśnieniem.</li> </ul>
Balon powlekany żelam <i>Gel-coated balloon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Relatywnie krótki czas zamknięcia naczynia.</li> <li>– Możliwość wykonania angioplastyki i transferu przy pomocy tego samego cewnika.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Niska efektywność transferu ze względu na małą zawartość wirusa rozcieńzonego w żelu.</li> </ul>
Cewnik infuzyjno-perfuzyjny <i>Dispatch catheter</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Przedłużony kontakt wektora ze ścianą naczynia.</li> <li>– Umożliwia utrzymanie perfuzji tkanek obwodowych.</li> <li>– Efektywny transfer.</li> <li>– Minimalna utrata wektora do krążenia systemowego.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość utraty wektora przez gałęzie boczne naczynia.</li> </ul>
Cewnik infiltracyjny <i>Infiltrator angioplasty balloon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Efektywny transfer do głębszych warstw ściany naczynia.</li> <li>– Minimalna utrata wektora do krążenia systemowego.</li> <li>– Relatywnie krótki czas zamknięcia naczynia.</li> <li>– Możliwość wykonania angioplastyki i transferu przy pomocy tego samego cewnika.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Możliwość urazu związana z wieloma iniekcjami do ściany naczynia.</li> </ul>

<b>Transfer do mięśnia sercowego</b> <i>Gene transfer to myocardium</i>		
<b>System Device</b>	<b>Zalety Advantages</b>	<b>Ograniczenia Limitations</b>
System <i>NOGA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Umożliwia iniekcje do mięśnia sercowego z dostępu przezskórnego bez konieczności działania chirurgicznego.</li> <li>– Transfer ukierunkowany do niedokrwionego, żywego miokardium.</li> <li>– Wysoka efektywność transferu.</li> <li>– Minimalna utrata wektora do krążenia systemowego.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Wysoki koszt.</li> <li>– Procedura wymagająca dodatkowego przeszkolenia personelu pracowni hemodynamicznej.</li> </ul>
System <i>TransAccess</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Umożliwia iniekcje do mięśnia sercowego z dostępu przezskórnego bez konieczności działania chirurgicznego.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Procedura wymagająca dodatkowego przeszkolenia personelu pracowni hemodynamicznej.</li> <li>– Brak możliwości oceny, żywotności i ukrwienia mięśnia sercowego.</li> <li>– Brak danych na temat wykorzystania dla transferu genów.</li> </ul>

## 1.9. Próby kliniczne

Większość wiedzy na temat możliwości transferu genów w układzie sercowo-naczyniowym pochodzi z eksperymentalnych badań na zwierzętach. Stosunkowo niewiele prób klinicznych terapii genowej chorób układu krążenia zostało ukończonych lub jest w toku. Koncentrują się one głównie na możliwościach indukcji terapeutycznej angiogenezy w obszarach niedokrwienia mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych, prewencji restenozy po zabiegach implantacji stentów i angioplastyki wieńcowej (PTCA), po przezskórnych zabiegach na tętnicach obwodowych (PTA) oraz prewencji degeneracji przęseł żylnych. Większość z nich to badania I i II fazy, tylko nieliczne to randomizowane badania II lub III fazy, podwójnie zaślepione i kontrolowane placebo. Szczegółowe dane dotyczące zakończonych oraz obecnie prowadzonych prób klinicznych można znaleźć w internecie na stronach:

- <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/clinicaltrial.htm//>
- <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical//>.

Wybrane ważniejsze badania kliniczne terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego przedstawiono w tabeli 6. Próby kliniczne terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego stanowią 8% (n=80) z 987 protokołów zarejestrowanych w <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/> (dane z grudnia 2004). Czterdzieści trzy z nich to badania I fazy, 22 fazy II, a tylko

pięć fazy III. W trzydziestu sześciu badaniach wykorzystuje się wektor adenowirusowy, a 44 protokoły opisują użycie wektora niewirusowego.

Tab. 6. Wybrane próby kliniczne terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego.

Tab. 6. *Selected clinical trials of cardiovascular gene therapy.*

Choroba <i>Indication</i>	Gen tera- peutycz- ny <i>Trans- gene</i>	Faza <i>Faze</i>	Wektor <i>Vector</i>	Droga transferu <i>Route</i>	Liczba pacjen- tów <i>No. patients</i>	Wy- nik <i>Result</i>	Ośrodek <i>Centre</i>	Badacz <i>Reference</i>
<b>Restenoza po zabiegach wewnątrznaczyniowych i degeneracja przęseł żylnych</b> <i>Post-intervention restenosis and venous graft degeneration</i>								
Miażdżycza tętnic kończyn dolnych, restenoza	<i>VEGF-A</i>	II	Plazmid/liposom lub Adenowirus	Cewnik infuzyjno-perfuzyjny, po angioplastyce	54	-	Kuopio University Central Hospital, Kuopio, Finland	Mäkinen i wsp. Mol Ther 2002;6:127
Miażdżycza tętnic kończyn dolnych, degeneracja obwodowych przęseł żylnych	<i>E2F decoy</i>	II	Oligonukleotydy	Wysokociśnieniowy transfer <i>ex vivo</i>	41	+	PREVENT trial Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA	Mann i wsp. Lancet 1999;354:1493
Choroba wieńcowa, degeneracja wieńcowych przęseł żylnych	<i>E2F decoy</i>	II	Oligonukleotydy	Wysokociśnieniowy transfer <i>ex vivo</i>	200	+	Multicenter trial	Grube i wsp. Late Breaking Clinical Trials AHA Meeting 2001
Choroba wieńcowa, restenoza	<i>VEGF-A</i>	I	Plazmid/liposom	Cewnik infuzyjno-perfuzyjny, po angioplastyce	10	-	Kuopio University Central Hospital, Kuopio, Finland	Laitinen i wsp. Hum Gen Ther 2000;11:263
Choroba wieńcowa, restenoza w stencie	<i>VEGF-A</i>	II	Plazmid/liposom lub Adenowirus	Cewnik infuzyjno-perfuzyjny, po angioplastyce i stentowaniu	108	-	KAT trial Kuopio i Helsinki University Central Hospital, Finland	Hedman i wsp. Circulation 2003;107:2677
Choroba wieńcowa, restenoza w stencie	<i>c-myc antisense</i>	II	Oligonucleotydy	Cewnik infuzyjny po stentowaniu	85	-	ITALICS trial University Hospital Dijkzigt, Rotterdam, Netherlands	Kutryk i wsp. J. Am. Coll Cardiol. 2002;39:281
Choroba wieńcowa, restenoza w stencie	<i>iNOS</i>	II	Plazmid/lipoplex	Cewnik infiltracyjny po stentowaniu	a		Badanie wielośrodkowe	Cardion AG

Terapeutyczna angiogeneza <i>Therapeutic angiogenesis</i>								
Miażdżycy tętnic kończyn dolnych	<i>VEGF-A</i>	I	Plazmid	Iniekcje domięśniowe	9	+	St. Elizabeth's Medical Center, Boston, MA, USA	Baumgartner i wsp. Circulation 1998;97:1114
Miażdżycy tętnic kończyn dolnych	<i>VEGF-A</i>	I	Plazmid	Iniekcje domięśniowe	6	+	St. Elizabeth's Medical Center, Boston, MA, USA	Isner i wsp. J Vasc Surg. 1998;28: 964
Miażdżycy tętnic kończyn dolnych	<i>VEGF-A</i>	II	Ade-nowirus	Iniekcje domięśniowe	105	-	wieloośrodkowe USA	Rajagopalan i wsp. Circulation. 2003;108:1933
Miażdżycy tętnic kończyn dolnych	<i>FGF-4</i>	II	Ade-nowirus	Iniekcje domięśniowe	a		wieloośrodkowe, Europa	Therapeutics Inc/ Berlex Schering AG
Miażdżycy tętnic kończyn dolnych	<i>HGF</i>	I	Plazmid	Iniekcje domięśniowe	6	+	Department of Geriatric Medicine, Osaka, Japonia	Morishita i wsp. Hypertension. 2004;44:203
Choroba wieńcowa	<i>VEGF-A</i>	I	Plazmid	Iniekcje domiokardialne (torakotomia)	20	+	St. Elizabeth's Medical Center, Boston, MA, USA	Symes i wsp. Ann Thorac Surg 1999;68:830
Choroba wieńcowa	<i>VEGF-A</i>	I	Ade-nowirus	Iniekcje domiokardialne podczas CABG (torakotomia)	21	+	Cornell Medical Center, New York, USA	Rosengart i wsp. Circulation 1999;100: 468
Choroba wieńcowa	<i>VEGF-A</i>	II	Ade-nowirus	Iniekcje domiokardialne, minitorakotomia	71	+	REVASC trial wieloośrodkowe	Stewart i wsp. Circulation. 2002;106:2986-a. Abstract.
Choroba wieńcowa	<i>VEGF-A</i>	II	Plazmid	Iniekcje domiokardialne, system NOGA	74	-	EUROINJECT One trial, badanie wieloośrodkowe, Europa	Kastrup i wsp. J Am Coll Cardiol 2003;41:1603
Choroba wieńcowa	<i>FGF-4</i>	II	Ade-nowirus	Aplikacje dowieńcowe	79	+	AGENT trial, badanie wieloośrodkowe, USA	Grines i wsp. Circulation 2002;105:1291
Choroba wieńcowa	<i>FGF-4</i>	II	Ade-nowirus	Aplikacje dowieńcowe	52	+	AGENT-2 trial, badanie wieloośrodkowe, USA	Grines i wsp. J Am Coll Cardiol. 2003;42:1339

a - obecnie prowadzona rekrutacja lub brak ogłoszonych wyników

Do tej pory tylko dwie próby kliniczne poświęcone zapobieganiu degeneracji prześleń żylnych przyniosły pozytywne rezultaty [68,147,148]. Oba badania oparte były na metodzie hamowania proliferacji komórek przy pomocy pułapek oligonukleotydowych skierowanych przeciwko czynnikowi transkrypcyjnemu E2F. Zastosowanie transferu *ex vivo* pułapek oligonukleotydowych anty-E2F do prześleń żylnych przed ich implantacją istotnie zmniejszyło częstość ich okluzji u chorych z miażdżycą tętnic kończyn dolnych oraz u chorych poddanych przeszłowaniu aortalno-wieńcowemu. Zastosowanie podobnej strategii terapii hamującej ekspresję genów z użyciem oligonukleotydów antysensownych przeciw *c-myc* w celu prewencji nawrotu zwężenia po implantacji stentu do tętnicy wieńcowej okazało się nieskuteczne w opublikowanym ostatnio dużym randomizowanym badaniu podwójnie zaślepionym i kontrolowanym placebo [129]. To niepowodzenie można tłumaczyć znacznie niższą efektywnością metod wewnątrznaczyniowego transferu genów w porównaniu do transferu genów *ex vivo* do prześleń żylnych, związaną głównie z rozcieńczeniem wektora i jego dezaktywacją we krwi.

Pozytywne rezultaty w postaci regresji klinicznych objawów niedokrwienia takich jak ból wieńcowy, chromanie przestankowe i wzrost tolerancji wysiłku w trakcie testów obciążeniowych przyniosły niektóre próby kliniczne dotyczące indukcji terapeutycznej angiogenezy przy pomocy transferu genów czynników wzrostowych naczyń w chorobie wieńcowej serca i chorobie niedokrwiennej kończyn dolnych [15,66,101,163,211,231,237,246,249]. W większości były to badania fazy I i II, w których stosowano wektory niewirusowe lub adenowirusowe drogą bezpośrednich iniekcji domięśniowych lub domiokardialnych oraz aplikacji dotętnicznych. Tylko w nielicznych z tych badań wykazano istotny wzrost tworzenia sieci naczyń krążenia obocznego lub wzrost perfuzji obszarów niedokrwienia przy pomocy obiektywnych metod obrazowych [66,163,231,246,249]. Dlatego wyniki te wymagają potwierdzenia w kontrolowanych badaniach fazy III przeprowadzonych w większych grupach chorych z użyciem obiektywnych metod oceny poprawy perfuzji.



## 1.10. Bezpieczeństwo i aspekty etyczne terapii genowej

Troska o bezpieczeństwo jest podstawowym problemem terapii genowej zwłaszcza przy użyciu wektorów wirusowych, które często wywodzą się z wirusów o istotnym patogennym potencjale. Toksyczność i immunogenność wektora musi szczególnie być brana pod uwagę podczas planowania badań klinicznych [72,238]. Tragiczną lekcją była śmierć młodego pacjenta, cierpiącego na łagodną postać częściowego niedoboru transkarbamylazy ornitynowej, która była związana z toksycznym działaniem dużej dawki wektora adenowirusowego podanego do tętnicy wątrobowej [150]. Szczególny nacisk kładzie się na rozwój technologii i kontrolę jakości laboratoriów produkujących wektory celem wykluczenia możliwości zanieczyszczenia preparatów wektora wirusami kompetentnymi, zdolnymi do replikacji i działania patogennego. Ważnym problemem dotyczącym wektorów wirusowych mających zdolność do integracji z genomem gospodarza jest ryzyko indukcji mutacji inercyjnych prowadzących do transformacji nowotworowej. Zjawisko indukcji nowotworów obserwowano w badaniach eksperymentalnych transferu genów przy pomocy wektorów retrowirusowych. W ostatnim czasie doniesiono o wystąpieniu zespołów białaczkowych u dzieci trwale wyleczonych z ciężkiego złożonego zespołu niedoboru odporności SCID przy pomocy terapii genowej z użyciem wektorów retrowirusowych [77,84]. Ryzyko insercyjnej mutagenyzy należy brać pod uwagę nie tylko przy stosowaniu wektorów retrowirusowych, ale i w przypadku innych wektorów integrujących takich jak lentiwirusy i AAV [244].

W większości przypadków terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego intencją jest wybiórcza ekspresja genu terapeutycznego o ściśle określonej lokalizacji w tkance lub narządzie [72,74]. Transdukcja komórek poza obszarem docelowym może wiązać się z istotnym ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych. Przypadkowa transdukcja komórek linii płciowej może być źródłem utrwalenia w populacji sztucznie wywołanych zmian genetycznych. Szczególne obawy badaczy związane są z transferem genów kodujących naczyniowe czynniki wzrostowe. Indukcja angiogenezy w przypadkowych miejscach poza obszarem docelowym może potencjalnie sprzyjać wzrostowi nowotworów, cukrzycowej retinopatii proliferacyjnej, reumatoidalnemu zapaleniu stawów, waskularyzacji i destabilizacji blaszek miażdżycowych [72,74,102]. Dodatkowe niebezpieczeństwo może wynikać z nadmiernej i nieograniczonej w czasie ekspresji. Wykazano, iż długotrwała i niekontrolowana ekspresja VEGF przez transdukowane przy pomocy wektora retrowirusowego mioblasty, które implantowano następnie do miokardium myszy, może być powodem powstawania śmiertelnych dla zwierząt naczynek w ścianie serca [136]. Dlatego bardzo ważny jest dalszy rozwój systemów lokalnego transferu wektorów w układzie

sercowo-naczyniowym oraz poszukiwanie nowych wektorów o komórkowo- i tkankowo-swoistej ekspresji z możliwością regulacji jej poziomu w czasie.

Terapia genowa w układzie sercowo-naczyniowym dotyczy komórek somatycznych. Istnieją możliwości techniczne oraz pozytywne wyniki badań eksperymentalnych wskazujących na możliwość transferu genów również do komórek szlaku płciowego. Jednak ze względu na istotne wątpliwości natury etycznej prowadzenie tego typu badań klinicznych jest wysoce kontrowersyjne.

W próbach klinicznych terapii genowej, podobnie jak w innych badaniach z udziałem ludzi, najważniejsze jest dobro i korzyść biorącego udział w badaniu pacjenta. Zarówno Europejskie jak i Amerykańskie Towarzystwo Terapii Genowej zalecają: rygorystyczne przestrzeganie międzynarodowych, narodowych oraz instytucjonalnych wytycznych dotyczących standardów opieki nad pacjentem biorącym udział w badaniu klinicznym, ściśle przestrzeganie zaaprobowanych przez odpowiednie instytucje protokołów badań oraz natychmiastowe zgłaszanie działań niepożądanych do odpowiednich instytucji nadzorujących. Ze względu na znaczące zainteresowanie przemysłu możliwościami klinicznego zastosowania terapii genowej zaleca się szczególne zwracanie uwagi na możliwość wystąpienia finansowych konfliktów interesów badaczy. Narodowy Instytut Zdrowia Stanów Zjednoczonych (NIH) publikuje od 1994 roku wytyczne dotyczące prowadzenia badań z wykorzystaniem rekombinowanego DNA w tym problematyki prowadzenia prób klinicznych terapii genowej. Dokument ten wraz z kolejnymi aktualizacjami dostępny jest na stronach internetowych NIH: <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines/guidelines.html>.

### 1.11. Podsumowanie

Zebrane dotychczas doświadczenia z przeprowadzonych prób klinicznych wskazują, iż transfer genów w układzie sercowo-naczyniowym jest stosunkowo bezpieczny. Do tej pory raportowano o następujących łagodnych objawach niepożądanych: obrzęk kończyny dolnej po transferze *VEGF*, przemijający wzrost poziomu białka C-reaktywnego, krótkotrwałe odczyny gorączkowe oraz przemijająca proteinuria i trombocytopenia. Nie należy jednak lekceważyć potencjalnych zagrożeń, które mogą pojawić się wraz z zastosowaniem nowych wektorów oraz genów terapeutycznych. Niezwykle istotne jest przeprowadzenie szeregu wnikliwych badań eksperymentalnych na wielu różnych modelach zwierzęcych nowych wektorów, promotorów i genów terapeutycznych przed rozpoczęciem prób klinicznych. Dlatego głównym przedmiotem niniejszej rozprawy są badania wzbudzających obecnie duże zainteresowanie wektorów AAV, swoistego dla komórek śródbłonna promotora *Tie-1* oraz potencjalnych właściwości naczynio-protেকcyjnych mało poznanego VEGF-D.

## 2. CELE PODJĘTYCH BADAŃ

1. Zbadanie możliwości wykorzystania i porównanie skuteczności wewnątrznaczyniowego transferu genów do ściany tętnicy szyjnej królika *in vivo* przy użyciu wektorów AAV oraz wektorów adenowirusowych.
2. Zbadanie możliwości wykorzystania promotora Tie-1 dla komórkowo-swoistego transferu genów do komórek śródbłonka *in vivo* przy pomocy wektorów AAV.
3. Sprawdzenie możliwości zastosowania inhibitora enzymów proteosomalnych MG-132 (*Z-LLL - carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal*) dla zwiększenia efektywności wewnątrznaczyniowego transferu genów do prawidłowej tętnicy szyjnej królika przy pomocy wektora AAV z promotorem CMV lub Tie-1 w warunkach *in vivo*.
4. Zbadanie potencjalnego naczynioprotekcyjnego efektu wewnątrznaczyniowego transferu genu śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń typu  $D_{\Delta N\Delta C}$  (*VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>*) do ściany prawidłowej lub poddanej urazowi mechanicznemu tętnicy szyjnej królika *in vivo*.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Wektory

W wykonanych eksperymentach wykorzystano niereplikujące wektory adenowirusowe pierwszej generacji, pozbawione genów regionu E1 i częściowo E3, produkowane w sposób typowy przy wykorzystaniu komórek pakujących linii 293 w Zakładzie Medycyny Molekularnej Instytutu A.I. Virtanena, Uniwersytetu w Kuopio w Finlandii [69,132]. W celu uzyskania wektorów adenowirusowych pozbawionych wirusów pomocniczych stosowano trzy oddzielne cykle lizy łysinek (*plaque lysis*) oraz oczyszczanie i koncentrację przy pomocy ultrawierowania. Ostatecznej oceny miana uzyskanego wektora dokonywano określając liczbę jednostek tworzących łysinki na mililitr preparatu (pfu– *plaque forming unit*). Dodatkowo, wykonywano analizę Southern-blot, reakcję PCR specyficzną dla grupy genów E1/E2 oraz badano efekt cytotatyczny wektora na linii komórek A549 [2,69,132,198].

Wektory oparte na wirusach związanych z adenowirusami o serotypie drugim (AAV-2) były produkowane metodą transfekcji podwójnym plazmidem przy użyciu ko-precypitacji fosforanem wapnia w Instytucie Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Zurychu w Szwajcarii [65,69,185,190]. Do transfekcji komórek pakujących linii 293T stosowano plazmid pDG oraz plazmid Psub z kasetą ekspresyjną zawierającą transgen, promotor i element wzmacniający WPRE. Preparaty wektora oczyszczano i zagęszczano przy wykorzystaniu ultrawierowania w gradiencie Iodixanolu oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC- *high performance liquid chromatography*). Miano wektora charakteryzowano określając liczbę cząstek transformujących na mililitr (TU/ml- *transforming units/mililiter*) w teście transdukcji komórek linii HeLa i analizę przy pomocy immunofluorescencyjnej cytometrii przepływowej (FACS- *fluorescence activated cell sorting*) [65,69,185,190].

W prowadzonych badaniach wykorzystywano następujące rodzaje wektorów i kaset ekspresyjnych:

1. Adv-CMV-LacZ - wektor adenowirusowy kodujący gen reporterowy  $\beta$ -galaktozydazę (*LacZ*) pod kontrolą wczesnego promotora cytomegalowirusowego (CMV).
2. Adv-CMV-VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> - wektor adenowirusowy kodujący formę ΔNΔC (krótką, aktywną) śródbłonkowego czynnika wzrostowego naczyń typu D pod kontrolą promotora CMV.
3. AAV-CMV-eGFP - wektor AAV kodujący wzmocnione zielone białko fluorescencyjne (eGFP- *enhanced green fluorescent protein*) pod kontrolą

- promotora CMV i regulacyjnego elementu wzmacniającego WPRE (WPRE-*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*).
4. AAV-Tie-eGFP - wektor AAV kodujący eGFP pod kontrolą promotora *Tie-1* (*tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-1*) i elementu wzmacniającego WPRE.

### 3.2. Transfer genów do ściany tętnicy

Wszystkie przeprowadzone doświadczenia na zwierzętach zaaprobowane zostały przez Animal Care and Use Committee of University of Kuopio w Finlandii.

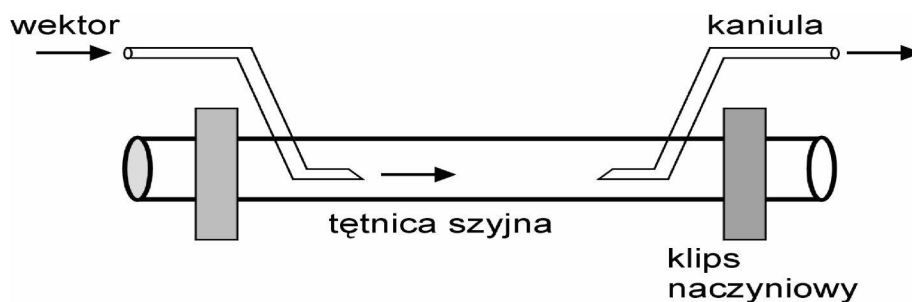
#### *Anestezja*

Samce królików rasy New Zeland White (n = 87, 2.2-3.0 kg) znieczulano przy użyciu: fentanylu-fluonisonu 0.2 ml/kg s.c. (Hypnorm, Janssen Pharmaceutica) i midazolamu 1.5 mg/kg s.c. (Dormicum, Roche), miejscowo stosowano 1% lidokainę s.c. (Lidocain, Orion). Ponadto, przed zabiegiem wszystkie zwierzęta otrzymywały środek antycholinergiczny- glycopyrronium 0.05 mg/kg s.c. (Robinul, John Wyeth and Brother Ltd.) i antybiotyk- cefuroxim 125 mg s.c. (Zinacef, GlaxoWellcome) [273].

#### *Transfer genów do prawidłowej ściany tętnicy*

Z cięcia pośrodkowego szyi odsłaniano i wypreparowywano tętnicę szyjną wspólną królika. Celem zniesienia skurczu tętnicy miejscowo stosowano 1% lidokainę. Następnie, jako środek przeciwkrzepliwy podawano enoxaparin 1mg/kg i.v. (Clexane, Rhone-Poulenc Rorer). Dla wewnątrznaczyniowego transferu genów między dwoma atraumatycznymi klipsami naczyniowymi A3 (S&T AG Microsurgical Instruments) izolowano segment tętnicy długości 1.5-2.5 cm. W odcinku proksymalnym i dystalnym wyizolowanego segmentu wykonywano arteriotomię i do światła naczynia wprowadzano dwie kaniule rozmiaru 24 (Becton Dickinson), rycina 7. Światło tętnicy przepłukiwano 0.9% roztworem soli fizjologicznej a następnie wprowadzano 100 µl roztworu wektora lub tę samą objętość roztworu placebo (0.9% roztwór soli fizjologicznej), tabela 7. Po okresie 20 minutowej inkubacji aspirowano roztwór wektora lub placebo ze światła naczynia i przepłukiwano 0.9% roztworem soli fizjologicznej. Usuwano kaniule, zaopatrywano arteriotomie przy pomocy szwów Ethilon 10/0 (Johnson

& Johnson) i przywracano przepływ krwi w tętnicy, usuwając klipsy naczyniowe. Ranę operacyjną zaopatrywano szwami podskórnymi i skórnymi. Zwierzęta bezpośrednio po zabiegu umieszczano do czasu pełnego wybudzenia w ciepłarnie. W okresie pooperacyjnym stosowano przeciwbólowo carprofen 0.1mg/kg s.c. (Rimadyl, Pfizer). W części eksperymentów procedurę transferu genów wykonywano kolejno na lewej i prawej tętnicy szyjnej wspólnej.



Ryc. 7. Schemat wyizolowanego segmentu tętnicy szyjnej dla wewnątrznaczyniowego transferu genów.

Fig. 7. Isolated segment of rabbit carotid artery for intravascular gene transfer.

#### ***Transfer genów do ściany tętnicy poddanej urazowi***

Mechanicznego uszkodzenia ściany tętnicy szyjnej królika dokonywano na cztery dni przed transferem genów, który przeprowadzano analogicznie do procedury transferu genów do tętnicy prawidłowej. W znieczuleniu ogólnym, prowadzonym według opisanego wyżej protokołu, kaniulowano docelową tętnicę szyjną i wprowadzano do światła naczynia balon do angioplastyki wieńcowej Quantum Monorail o wymiarach 2.5 x 9 mm (Boston Scientific). Wypełniony roztworem soli fizjologicznej balon pasażowano trzy razy w celu uszkodzenia warstwy komórek śródbłonna i elastycznej błony wewnętrznej naczynia. Po usunięciu balonu światło tętnicy przepłukiwano 0.9% roztworem soli fizjologicznej, arteriotomię zaopatrywano przy użyciu szwów Ethilon 10/0 i przywracano prawidłowy przepływ krwi.

Tab. 7. Wektory, dawki i model eksperymentalny (tętnica szyjna prawidłowa lub uszkodzona) użyte w badaniach.

Tab. 7. *Vectors, dosage ad experimental model of gene transfer used (normal or injured rabbit carotid artery).*

Wektor <i>Vector</i>	Dawka i miano wektora <i>Vector dose and titer</i>	Model (tętnica) <i>Model (artery)</i>	Liczba tętnic <i>No. of arteries</i>	Dzień analizy <i>Day of analysis</i>
AAV-CMV-eGFP	100 $\mu$ l 9x10e8 TU/ml	prawidłowa / <i>normal</i>	8	21, 42
AAV-CMV-eGFP	100 $\mu$ l 4x10e9 TU/ml	prawidłowa / <i>normal</i>	15	4, 21, 42, 100
AAV-Tie-eGFP	100 $\mu$ l 9x10e8 TU/ml	prawidłowa / <i>normal</i>	8	21, 42
AAV-CMV-eGFP + 40mM MG-132	100 $\mu$ l 9x10e8 TU/ml	prawidłowa / <i>normal</i>	6	21, 42
AAV-Tie-eGFP + 40mM MG-132	100 $\mu$ l 9x10e8 TU/ml	prawidłowa / <i>normal</i>	6	21, 42
Adv-CMV-LacZ	100 $\mu$ l 1x10e9 pfu/ml	prawidłowa / <i>normal</i> uszkodzona / <i>injured</i>	6 6	4, 14 4, 14
Adv-CMV-LacZ	100 $\mu$ l 1x10e10 pfu/ml 100 $\mu$ l 1x10e10 pfu/ml	prawidłowa / <i>normal</i> uszkodzona / <i>injured</i>	14 14	4, 7, 14 4, 7, 14
Adv-CMV-VEGF- D <sub>ANAC</sub>	100 $\mu$ l 1x10e10 pfu/ml 100 $\mu$ l 1x10e10 pfu/ml	prawidłowa / <i>normal</i> uszkodzona / <i>injured</i>	7 7	7 7
placebo	100 $\mu$ l 0.9% NaCl	prawidłowa / <i>normal</i>	6	4, 21

#### **Pobranie materiału do analiz**

Na zakończenie eksperymentu zwierzęta ponownie znieczulano według opisanego wyżej protokołu anestezji, podawano heparynę (600 IU i.v.) i wypreparowywano lewą i prawą tętnicę szyjną, tabela 7. Króliki uśmiercano przy pomocy dożylniej infuzji roztworu siarczanu magnezu, wycinano poddane wcześniej transferowi genów segmenty tętnic, które przepłukiwano 0.9% roztworem soli fizjologicznej. Nie pobierano do analiz odcinków naczyń z miejsc zaopatrzenia arteriotomii oraz fragmentów, na które zakładano klipsy naczyniowe.

W wyborze czasu pobrania materiału do analiz od momentu transferu kierowano się głównie czasem maksymalnej ekspresji i maksymalnym czasem trwania ekspresji mediowanej przez badane typy wektorów ustalonymi na podstawie danych dostępnych z literatury oraz wyników własnych eksperymentów wstępnych.



### 3.3. Histologia i ocena morfometryczna

#### *Histologia*

Pobrano segment tętnicy szyjnej królika dzielono na trzy równe fragmenty. Część proksymalną utrwalało w 4% roztworze paraformaldehydu w 0.15M buforze sodowo-fosforanowym przez 15 minut, a następnie po przepłukaniu w 0.15M buforze sodowo-fosforanowym o pH 7.2 zatapiało i zamrażano w substancji OCT (Sakura) i przechowywano w  $-70^{\circ}$  C. Fragment środkowy naczynia utrwalało w 4% roztworze paraformaldehydu w 0.15M buforze sodowo-fosforanowym przez 15 minut a następnie po przepłukaniu w 0.15M buforze sodowo-fosforanowym o pH 7.2 wykorzystywano do przygotowania preparatu *en face*, lub bezpośrednio po pobraniu zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w  $-70^{\circ}$  C. Część dystalną utrwalało w 4% roztworze paraformaldehydu w 15% roztworze cukrozy przez cztery godziny, a następnie po inkubacji przez noc w 15% roztworze cukrozy o pH 7.4 wykorzystywano do zatopienia w parafinie [69,92,273].

#### *Ocena ekspresji genów reporterowych eGFP i $\beta$ -galaktozydazy*

Ekspresję genów reporterowych oceniano na podstawie analizy 20 przekrojów poprzecznych tętnicy grubości 10 $\mu$ m, mrożonych w OCT. Oceniane przekroje cięto w odstępach przynajmniej 50 $\mu$ m, w celu uniknięcia oceny tych samych komórek.

Ekspresję genu *LacZ* uwidaczniano przy pomocy reakcji barwnej z 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-alactopyranozydem (*X-gal*; Sigma) [69,92]. Liczbę komórek  $\beta$ -gal-pozytywnych oceniano w mikroskopie świetlnym, a liczbę komórek eGFP-pozytywnych oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym, wykorzystując mikroskop AX70 (Olympus Optical), stosując powiększenie 200x. Średnią liczbę komórek  $\beta$ -gal-pozytywnych lub eGFP-pozytywnych określano oddzielnie w warstwie śródbłonna, warstwie wewnętrznej (intima) i środkowej (media) naczynia przypadających na cały przekrój poprzeczny tętnicy. W przypadku przydanki, oceniano liczbę komórek pozytywnych w czterech losowo wybranych, niepokrywających się polach mikroskopowych (powiększenie 400x) przypadających na przekrój poprzeczny. Dodatkowo w przypadku tętnic transdukowanych wektorem AAV ekspresję eGFP uwidaczniano i oceniano na preparatach *en face*. Obliczano średnią liczbę komórek eGFP-pozytywnych przypadających na mm<sup>2</sup> pola powierzchni preparatu *en face* tętnicy. Wszystkich analiz dokonywano w sposób ślepy, oceniając całą powierzchnię preparatu w powiększeniu mikroskopowym umożliwiającym identyfikację poszczególnych komórek, przy użyciu oprogramowania do morfometrii AnalySIS (*Soft Imaging System*, Munster, Germany).

### ***Ocena morfologii tętnicy i lokalnego odczynu zapalnego po transferze genów***

Morfologię tętnicy, obecność lokalnego zapalenia, ekspresję metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej i receptora VEGFR-2 po transferze genów lub zastosowaniu *placebo* oceniano na podstawie analizy przekrojów poprzecznych naczyń barwionych hematoksyliną i eozyną (H&E) oraz swoistych barwień immunohistochemicznych przy użyciu przeciwciał wykrywających: komórki śródbłonna-EC (mAb CD31, DAKO, rozcieńczenie 1:50), komórki mięśni gładkich- SMC (mAb HHF-35, Enzo Diagnostics, rozcieńczenie 1:50), makrofagi (mAb RAM11, DAKO, rozcieńczenie 1:100), leukocyty (mAb CD45, Serotec, rozcieńczenie 1:20), limfocyty-T (mAb MCA800, Serotec, rozcieńczenie 1:5), komórki VCAM-1-pozytywne (mAb Rb1/9 dzięki uprzejmości Dr Myron Cybulsky, University of Toronto, rozcieńczenie 1:20), MMP-2 (mAb MMP-2, Serotec, rozcieńczenie 1:100), MMP-9 (mAb MMP-9, Serotec, rozcieńczenie 1:100) i VEGFR-2 (mAb VEGFR-2 clone sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, rozcieńczenie 1:500). Wizualizacji barwienia dokonywano z wykorzystaniem systemu avidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa (Vector Laboratories). W celu określenia specyficzności reakcji wykonywano barwienia immunohistochemiczne z klasowo- i gatunkowo-dobranymi immunoglobulinami oraz barwienia, w których pominięto pierwotne przeciwciało [69,92,248].

### ***Identyfikacja komórek proliferujących***

Komórki ściany tętnicy będące w fazie podziału identyfikowano przy pomocy znakowania 5-bromo-2'-deoxyurydyną (BrdU, Sigma). Królikom dwukrotnie w infuzji dożylniej podawano BrdU (30mg/kg masy ciała) na 24 i trzy godziny przed pobraniem segmentów tętnic do analizy. Jądra komórkowe zawierające BrdU identyfikowano na przekrojach poprzecznych tętnic przy pomocy swoistego barwienia immunohistochemicznego (mAb BrdU, DAKO, rozcieńczenie 1:200).

### ***Ocena ilościowa komórek zapalnych oraz komórek VCAM-1 i BrdU-pozytywnych***

Średnią liczbę leukocytów, makrofagów, limfocytów-T, komórek VCAM-1-pozytywnych i BrdU-pozytywnych oceniano oddzielnie w warstwie komórek śródbłonna, warstwie wewnętrznej (intima), warstwie środkowej (media) i przydanie na czterech przekrojach poprzecznych transdukowanej lub traktowanej *placebo* tętnicy. W celu uniknięcia oceny tych samych komórek analizowano przekroje znajdujące się w odstępach przynajmniej 50µm. Liczbę komórek pozytywnych w warstwie śródbłonna, warstwie wewnętrznej i środkowej naczyń określano na całej powierzchni preparatu, stosując powiększenie 200x. W przypadku przydanki, oceniano liczbę komórek pozytywnych w 4 losowo wybranych, niepokrywających się polach mikroskopowych (powiększenie 400x)

przypadających na przekrój poprzeczny. Wszystkich analiz dokonywano w sposób ślepy, oceniając preparaty w dużym powiększeniu mikroskopowym, umożliwiającym identyfikację poszczególnych komórek, przy użyciu oprogramowania do morfometrii AnalySIS [69].

#### ***Półilościowa ocena ekspresji MMP-2, MMP-9 i VEGFR-2***

Poziom ekspresji MMP-2, MMP-9 i VEGFR-2 oceniano oddzielnie w warstwie komórek śródbłonna, warstwie wewnętrznej (intima), warstwie środkowej (media) i przydane na czterech przekrojach poprzecznych transdukowanej lub traktowanej *placebo* tętnicy. Analizowano przekroje znajdujące się w odstępach przynajmniej 50 $\mu$ m, w celu uniknięcia oceny tych samych komórek. Oceny dokonywano w sposób półilościowy przyznając punkty w skali od 0 do 3 w zależności od intensywności barwienia: 0 - brak komórek pozytywnych, brak barwienia; 1 - nieliczne komórki pozytywne (<50%), niska intensywność barwienia; 2 - około połowy komórek pozytywna (50-75%), średnia intensywność barwienia, 3 - ponad 75% komórek pozytywnych, wysoka intensywność barwienia. Wszystkich analiz dokonywano w sposób ślepy, oceniając preparaty w 200x powiększeniu mikroskopowym, umożliwiającym identyfikację poszczególnych komórek, przy użyciu oprogramowania do morfometrii AnalySIS [69].

#### ***Ocena morfometryczna uszkodzenia komórek śródbłonna i grubości warstwy wewnętrznej***

Stopień uszkodzenia warstwy komórek śródbłonna oceniano w czwartym dniu po transferze genów lub zastosowaniu *placebo*, obliczając średni procent obwodu wewnętrznego tętnicy pozbawiony EC. Analizowano cztery losowo wybrane przekroje poprzeczne naczyń barwione swoiście na EC przy użyciu przeciwciała mAb CD31. Grubość warstwy wewnętrznej naczyń oceniano w siódmym lub 14 dniu dla tętnic transdukowanych Adv i w 21 dniu dla tętnic transdukowanych AAV i traktowanych *placebo* obliczając średnie pole powierzchni intymy w czterech losowo wybranych przekrojach poprzecznych naczyń barwionych swoiście na VSMC przy użyciu przeciwciała mAb HHF-35. Do oceny wybierano przekroje znajdujące się w odstępach przynajmniej 200 $\mu$ m. Analizy dokonywano w sposób ślepy, oceniając całą powierzchnię preparatu w 200x powiększeniu mikroskopowym, umożliwiającym identyfikację poszczególnych komórek, przy użyciu oprogramowania do morfometrii AnalySIS [69].

### **3.4. Analiza statystyczna**

Dane przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SD (odchylenie standardowe). Różnice między grupami oceniano przy użyciu testu Manna-Whitneya U. Korelacje między poszczególnymi zmiennymi określano na podstawie współczynników korelacji Pearsona. Wartość  $P < 0.05$  przyjęto za istotną statystycznie. Do wszystkich obliczeń wykorzystano oprogramowanie Statistica for Windows (StatSoft).

## 4. WYNIKI

### 4.1. Transfer genów reporterowych do ściany tętnicy: porównanie wirusów związanych z adenowirusami z wektorami adenowirusowymi

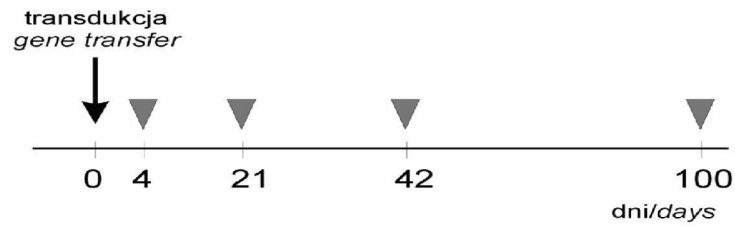
W niniejszym rozdziale częściowo wykorzystano materiały zawarte w publikacji: Gruchała M., Bhardwaj S., Pajusola K., Roy H., Rissanen T.T., Kokina I., Kholova I., Markkanen J.E., Rutanen J., Heikura T., Alitalo K., Bueler H., Yla-Herttuala S. Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. *J Gene Med.* 2004;6:545-54.

#### *Transfer genów przy pomocy wektora AAV do tętnicy prawidłowej prowadzi do długotrwałej ekspresji genu reporterowego głównie w komórkach mięśni gładkich warstwy środkowej*

Czas trwania ekspresji eGFP oraz typ skutecznie transdukowanych komórek oceniano cztery, 21, 42 i 100 dni po transferze wektorem AAV-CMV-eGFP w dawce 100  $\mu$ l 4x10<sup>9</sup> TU/ml do prawidłowej tętnicy szyjnej królika w preparatach przekrojów poprzecznych i na preparatach *en face*, ryc.8 A. Charakterystyczną fluorescencją białka eGFP w komórkach ściany tętnicy stwierdzano już cztery dni po transferze. W każdym z analizowanych punktów czasowych (4-100 dzień) głównym typem komórek, w których obserwowano ekspresję eGFP były komórki mięśni gładkich warstwy środkowej naczynia (VSMC), ryc. 9 A, B. Maksymalny poziom ekspresji eGFP w VSMC wykazano 21 dni po transferze. W tym czasie około 10-20% VSMC warstwy środkowej tętnicy było eGFP-pozytywnych (13.8  $\pm$  3.4 komórek eGFP-pozytywnych /przekrój poprzeczny i 96.6  $\pm$  24.5 komórek eGFP-pozytywnych /mm<sup>2</sup> preparatu *en face*). Obserwowano statystycznie istotny spadek liczby eGFP-pozytywnych komórek VSMC 42 dnia po transferze. Następnie liczba komórek VSMC wykazujących ekspresję eGFP pozostawała stała do 100 dnia obserwacji, ryc. 10 A, B .

Efektywność transferu AAV-CMV-eGFP w dawce 100  $\mu$ l 4x10<sup>9</sup> TU/ml do komórek śródbłonna (EC) warstwy wewnętrznej tętnicy była bardzo niska. Ekspresję eGFP stwierdzano w nielicznych komórkach EC głównie we wczesnym okresie obserwacji. Maksymalną liczbę komórek EC eGFP-pozytywnych wykazano czwartego dnia po transferze (1.2  $\pm$  1.2 komórek eGFP-pozytywnych /przekrój poprzeczny). Tendencję do spadku liczby komórek EC wykazujących ekspresję eGFP stwierdzono już 21 dnia po transferze (0.7  $\pm$  0.7 komórek eGFP-pozytywnych/ przekrój poprzeczny). W tętnicach pobranych 42 i 100 dni po transferze nie stwierdzano obecności komórek EC eGFP-pozytywnych, ryc.10 C.

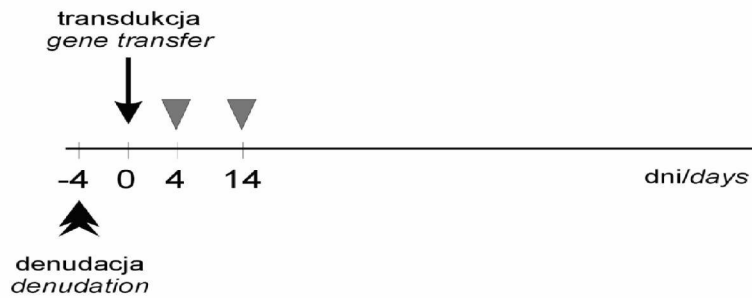
**A. Transfer genów przy pomocy wektorów AAV**  
**AAV gene transfer**



**B. Transfer genów przy pomocy wektorów Adv do tętnicy prawidłowej**  
**Adv gene transfer to normal artery**



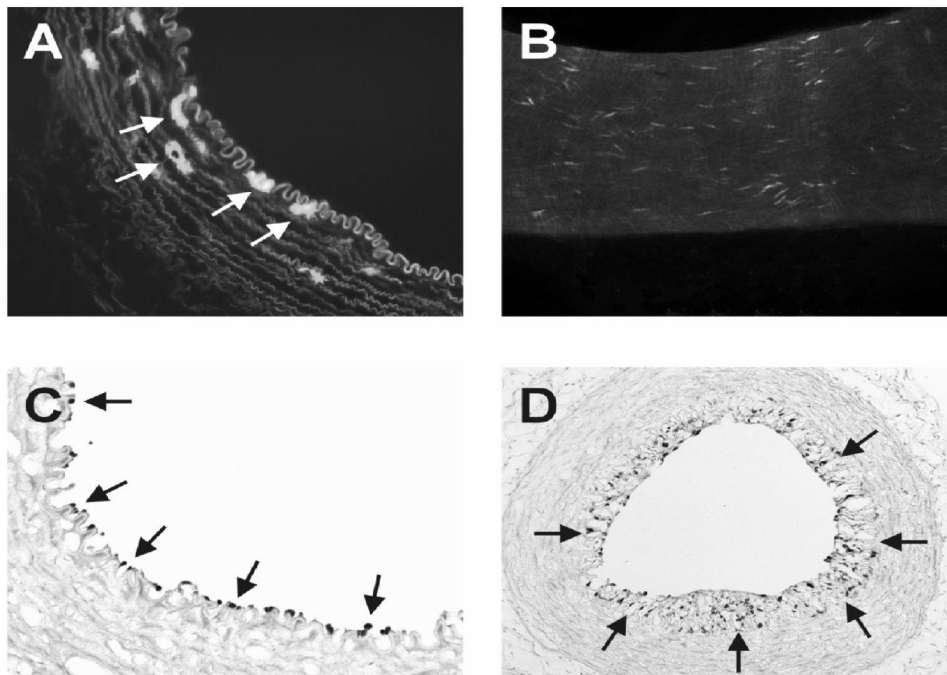
**C. Transfer genów przy pomocy wektorów Adv do tętnicy uszkodzonej**  
**Adv gene transfer to injured artery**



▼ pobranie materiału i analiza  
*sample collection and analysis*

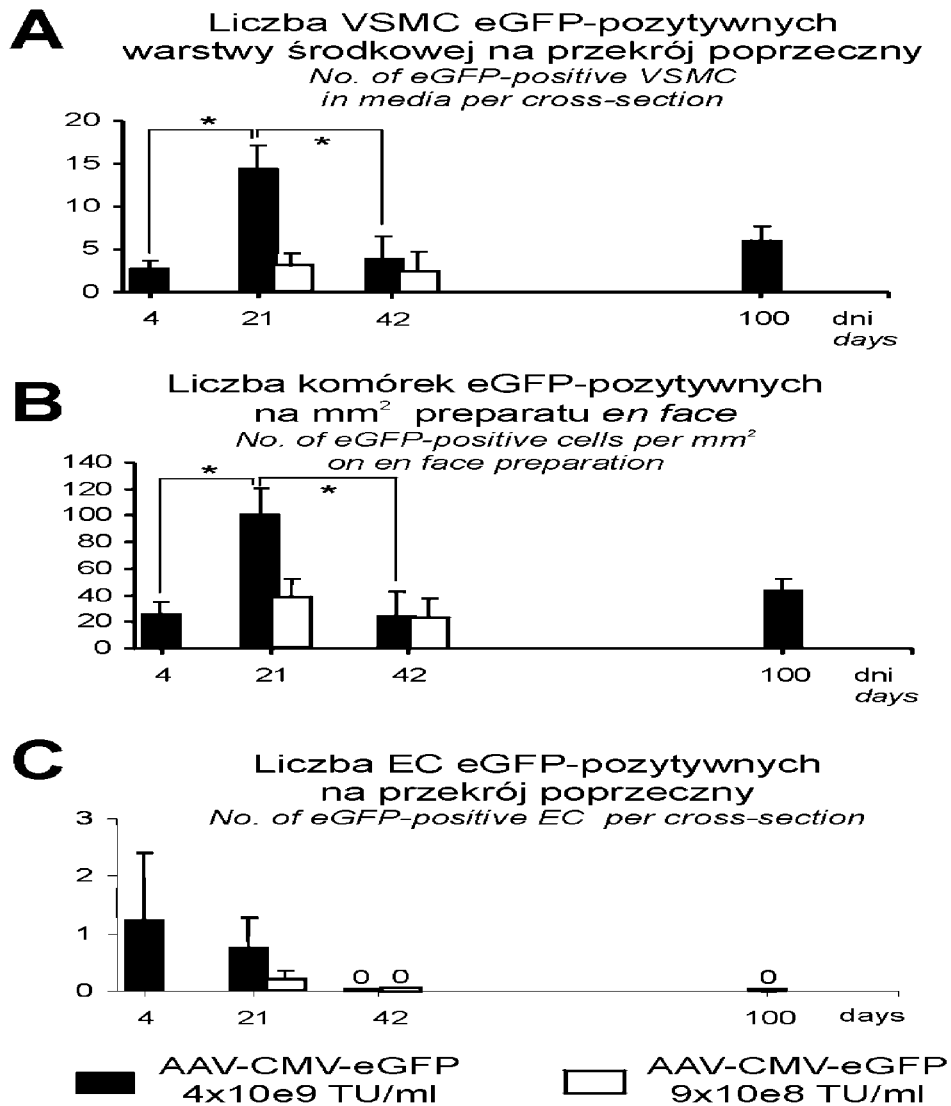
Ryc. 8. Schemat badania. A. Prawidłową tętnicę szyjną królika transdukowano przy pomocy wektora AAV kodującego eGFP pod kontrolą promotora CMV. Materiał do badań pobierano w 4, 21, 42 lub 100 dni po transferze. B. Prawidłową tętnicę szyjną królika transdukowano przy pomocy wektora Adv kodującego *LacZ* pod kontrolą promotora CMV. Materiał do badań pobierano w 4 lub 14 dni po transferze. C. Transferu genów do uszkodzonej tętnicy szyjnej królika przy pomocy wektora Adv kodującego *LacZ* pod kontrolą promotora CMV dokonywano w 4 dni po urazie naczynia. Materiał do badań pobierano w 4 lub 14 dniu po transferze.

Fig. 8. Study design. A. AAV-mediated gene transfer to normal rabbit carotid artery, B. Adv-mediated gene transfer to normal rabbit carotid artery, C. Adv-mediated gene transfer to injured rabbit carotid artery.



Ryc. 9. Reprezentatywne mikrofotografie histologicznej lokalizacji komórek wykazujących ekspresję genu reporterowego po transferze przy pomocy wektora AAV i Adv: A. przekrój poprzeczny tętnicy 21 dni po transferze AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml, obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x), strzałki wskazują eGFP-pozytywne VSMC warstwy środkowej tętnicy; B. preparat *en face* tętnicy 100 dni po transferze AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml, obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 50x), jasna fluorescencja wskazuje komórki eGFP-pozytywne; C. przekrój poprzeczny prawidłowej tętnicy 4 dni po transferze Adv-CMV-LacZ  $10 \times 10^{10}$  pfu/ml, strzałki wskazują komórki EC wykazujące ekspresję LacZ (powiększenie 100x); D. przekrój poprzeczny uszkodzonej tętnicy 4 dni po transferze Adv-CMV-LacZ  $10 \times 10^{10}$  pfu/ml, strzałki wskazują elastyczną błonę wewnętrzną, reakcja barwna z X-gal uwidoczniła transdukowane komórki w obrębie neointymy i warstwy środkowej tętnicy (powiększenie 100x).

Fig. 9. Representative micrographs of histological localization of reporter gene expression after AAV and Adv gene transfer: A. cross-section of the rabbit carotid artery 21 days after AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml gene transfer, fluorescence microscopy (magnification 100x), arrows indicate eGFP-positive VSMC in media; B. *en face* preparation of the artery 100 days after AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml gene transfer, fluorescence microscopy (magnification 50x), Bright fluorescence spots indicate eGFP-positive cells; C. cross-section of the normal rabbit carotid artery 4 days after Adv-CMV-LacZ  $10 \times 10^{10}$  pfu/ml gene transfer, arrows indicate EC cells expressing LacZ, X-gal staining (magnification 100x); D. cross-section of the injured rabbit carotid artery 4 days after Adv-CMV-LacZ  $10 \times 10^{10}$  pfu/ml gene transfer, arrows indicate internal elastic lamina, dark spots in neointima and media indicate cells expressing LacZ, X-gal staining (magnification 100x).



Ryc.10. Czas i poziom ekspresji eGFP w VSMC i EC po transferze przy pomocy wektora AAV. A. Liczba eGFP-pozytywnych VSMC warstwy środkowej tętnicy na przekrój poprzeczny naczyń; B. Liczba eGFP-pozytywnych komórek na mm<sup>2</sup> preparatu *en face*; C. Liczba eGFP-pozytywnych EC na przekrój poprzeczny naczyń. \* -  $P < 0.05$

Fig.10. Time course of eGFP expression in VSMC and EC after AAV gene transfer. A. Number of eGFP-positive VSMC in media per cross-section; B. Number of eGFP-positive cells per mm<sup>2</sup> of *en face* carotid artery preparation, C. Number of eGFP-positive EC per cross-section. \* -  $P < 0.05$



W żadnej z analizowanych tętnic, niezależnie od czasu pobrania po wykonaniu transferu, nie stwierdzono ekspresji eGFP w komórkach przydanki. Jak oczekiwano, nie obserwowano ekspresji eGFP w komórkach tętnic poddanych działaniu placebo. Nie wykazano również obecności komórek eGFP-pozytywnych w tętnicach szyjnych nie poddanych transferowi, przeciwnych do tętnicy transdukowanej AAV-CMV-eGFP.

***Wyższa dawka i miano wektora AAV prowadzi do bardziej efektywnego transferu genu reporterowego***

W celu określenia znaczenia dawki wektora AAV dla efektywności transferu genów do ściany tętnicy wykonano dodatkowe doświadczenia stosując 100  $\mu$ l wektora AAV-CMV-eGFP o mianie  $9 \times 10^8$  TU/ml. Liczbę i rodzaj komórek eGFP-pozytywnych oceniano 21 i 42 dni po transferze genów i porównano z danymi z eksperymentów przeprowadzonych z zastosowaniem 100  $\mu$ l wektora AAV-CMV-eGFP o mianie  $4 \times 10^9$  TU/ml, ryc.8 A.

Transfer AAV-CMV-eGFP przy użyciu preparatu wektora o niższym mianie prowadził do ekspresji genu reporterowego głównie w komórkach VSMC warstwy środkowej tętnicy. Najwyższą liczbę komórek VSMC eGFP-pozytywnych stwierdzono 21 dni po transferze ( $3.0 \pm 1.9$  komórek eGFP-pozytywnych / przekrój poprzeczny i  $36.9 \pm 25.5$  komórek eGFP-pozytywnych /  $\text{mm}^2$  preparatu *en face*). Wartości te były niższe w porównaniu do uzyskanych po transferze z wykorzystaniem preparatu wektora o wyższym mianie  $4 \times 10^9$  TU/ml, niemniej różnica ta nie osiągnęła znamienności statystycznej, ryc.10. W materiale pobranym 42 dni po transferze stwierdzono zbliżoną liczbę komórek VSMC wykazujących ekspresję eGFP w obu porównywanych grupach.

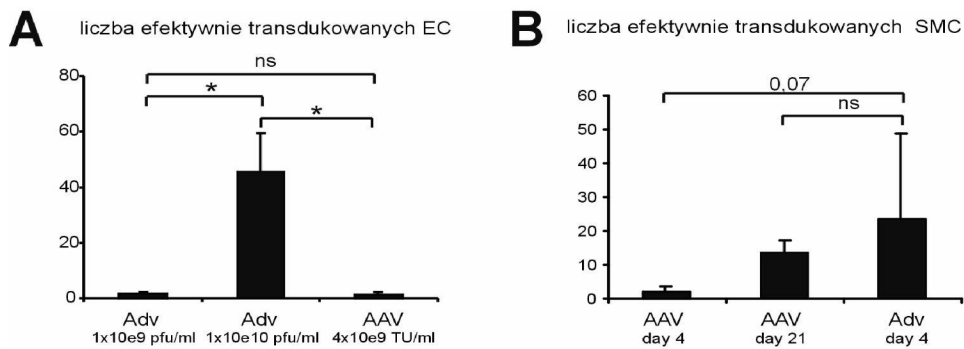
Po zastosowaniu preparatu wektora AAV o niższym mianie stwierdzono znikomą ekspresję eGFP w komórkach EC warstwy wewnętrznej tętnicy 21 dni po transferze ( $0.1 \pm 0.1$  komórek eGFP-pozytywnych / przekrój poprzeczny), ryc.10. W porównaniu do tętnic poddanych transferowi przy użyciu wektora o wyższym mianie uzyskane wartości były niezamiennie niższe. W tętnicach pobranych 42 dni po transferze nie stwierdzano obecności komórek EC eGFP-pozytywnych, niezależnie od zastosowanego miana wektora.

***Transfer genów do prawidłowej tętnicy przy pomocy wektora Adv prowadzi do ekspresji genu reporterowego wyłącznie w komórkach EC warstwy wewnętrznej***

Ekspresję genu reporterowego *LacZ* oceniano w czwartym i 14 dniu po transferze przy pomocy wektora Adv w mianie  $1 \times 10^9$  pfu/ml i  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml, ryc.8 B. Komórki EC warstwy wewnętrznej prawidłowej tętnicy były jedynymi komórkami wykazującymi ekspresję genu reporterowego w czwartym dniu po

transferze Adv metodą aplikacji od światła naczynia, ryc.9 C. Nie stwierdzono ekspresji transgenu w warstwie środkowej i przydanie transdukowanych tętnic niezależnie od zastosowanego stężenia wektora. W dniu 14 po transferze nie obserwowano ekspresji  $\beta$ -gal w żadnej z warstw ściany analizowanych tętnic. Jak oczekiwano, nie stwierdzono obecności komórek wykazujących ekspresję genu reporterowego ani w tętnicach traktowanych placebo, ani w tętnicach szyjnych przeciwnych do poddanych zabiegowi transferu Adv-CMV-LacZ.

Przy użyciu wektora Adv o stężeniu  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml uzyskano najwyższy odsetek komórek EC wykazujących ekspresję  $\beta$ -gal w cztery dni po transferze ( $45.7 \pm 13.6$  EC  $\beta$ -gal-pozytywnych /przekrój poprzeczny, ponad 70% EC), ryc. 11 A. Wartość ta była istotnie wyższa od uzyskanych przy pomocy wektora Adv o niższym mianie  $1 \times 10^9$  pfu/ml ( $1.6 \pm 0.6$  EC  $\beta$ -gal-pozytywnych /przekrój poprzeczny,  $P < 0.05$ ), ryc. 11 A. Była również istotnie wyższa od maksymalnej liczby komórek EC wykazujących ekspresję genu reporterowego po transferze przy pomocy wektora AAV w mianie  $4 \times 10^9$  TU/ml ( $0.7 \pm 0.7$  EC  $eGFP$ -pozytywnych /przekrój poprzeczny,  $P < 0.05$ ), ryc. 11 A.



Ryc. 11. A. Średnia liczba komórek EC wykazujących ekspresję genu reporterowego na przekrój poprzeczny naczynia w cztery dni po transferze Adv-CMV-LacZ  $1 \times 10^9$  pfu/ml, Adv-CMV-LacZ  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml lub AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml do ściany prawidłowej tętnicy szyjnej królika, B. Średnia liczba komórek VSMC wykazująca ekspresję genu reporterowego na przekrój poprzeczny naczynia w cztery lub 21 dni po transferze AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml do prawidłowej tętnicy szyjnej królika lub cztery dni po transferze Adv-CMV-LacZ  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml do ściany tętnicy szyjnej królika poddanej urazowi.  $*P < 0.05$

Fig. 11. A. Bar graphs represent the mean number of EC expressing reporter gene 4 days after Adv-CMV-LacZ  $1 \times 10^9$  pfu/ml, AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml or AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml gene transfers to normal rabbit carotid artery, B. Bar graphs represent the mean number of VSMC expressing reporter gene in media per cross-section 4 days after AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml transfer to normal rabbit carotid artery, 21 days after AAV-CMV-eGFP  $4 \times 10^9$  TU/ml transfer to normal rabbit carotid artery or 4 days after Adv-CMV-LacZ  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml transfer to injured rabbit carotid artery.  $*P < 0.05$

***Transfer genów do uszkodzonej tętnicy przy pomocy wektora Adv prowadzi do ekspresji genu reporterowego w komórkach warstwy wewnętrznej i środkowej tętnicy***

Ze względu na znaczenie barier anatomicznych, takich jak warstwa komórek EC i elastyczna błona wewnętrzna, dla efektywnego transferu genów do warstwy środkowej tętnicy przy pomocy wektorów Adv, wykonano doświadczenia z wykorzystaniem modelu tętnicy szyjnej królika podanej urazowi przy pomocy balonu do angioplastyki. Ekspresję genu reporterowego *LacZ* oceniano w czwartym i 14 dniu po transferze przy pomocy wektora Adv w mianach  $1 \times 10^9$  pfu/ml i  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml wykonanym cztery dni po urazie tętnicy, ryc. 8 C. Wyłącznie w czwartym dniu po transferze wykazano obecność komórek wykazujących ekspresję  $\beta$ -gal. Należały do nich komórki EC warstwy wewnętrznej i VSMC pogrubiałej warstwy wewnętrznej (neointimy) oraz VSMC warstwy środkowej tętnicy, ryc. 9 D. Ekspresji transgenu, podobnie jak w przypadku tętnic prawidłowych, nie stwierdzano już w 14 dniu po transferze. Liczba komórek  $\beta$ -gal-pozytywnych zarówno w warstwie wewnętrznej jak i środkowej była istotnie wyższa w przypadku zastosowania Adv w mianie  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml w porównaniu do preparatu wektora o mianie  $1 \times 10^9$  pfu/ml w 4 dniu po transferze ( $P < 0.05$ ).

***Liczba komórek VSMC warstwy środkowej wykazujących ekspresję transgenu jest zbliżona w przypadku transferu przy pomocy wektora AAV do ściany prawidłowej tętnicy i wektora Adv do tętnicy poddanej urazowi***

Liczba komórek VSMC warstwy środkowej wykazująca ekspresję genu reporterowego w czwartym dniu po transferze Adv ( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml) do tętnicy poddanej urazowi wielokrotnie przekraczała liczbę transdukowanych komórek VSMC warstwy środkowej tętnicy prawidłowej w czwartym dniu po transferze przy pomocy wektora AAV ( $4 \times 10^9$  TU/ml). Jednak liczba ta była zbliżona do liczby transdukowanych komórek VSMC warstwy środkowej tętnicy prawidłowej 21 dni po transferze przy pomocy wektora AAV ( $4 \times 10^9$  TU/ml), ryc. 11 B. Należy zwrócić uwagę, iż większość komórek VSMC warstwy środkowej wykazujących ekspresję genu reporterowego, w przypadku tętnic poddanych transferegowi Adv, była zlokalizowana bezpośrednio pod wewnętrzną błoną elastyczną. Natomiast w przypadku transferu AAV komórki VSMC eGFP-pozytywne były rozłożone bardziej równomiernie w całej grubości warstwy środkowej tętnicy, ryc. 9 A i D.

*Zmiany morfologiczne oraz ocena ostrej fazy nacieku zapalnego po transferze genów przy pomocy wektorów AAV i Adv do ściany prawidłowych tętnic*

Wszystkie zwierzęta poddane transferowi genów do tętnicy szyjnej przeżyły do końca eksperymentu. Nie obserwowano klinicznie jawnych działań niepożądanych. Wszystkie tętnice w momencie pobrania do analizy były drożne dla prawidłowego przepływu krwi.

Obecność morfologicznych uszkodzeń oraz komórkowego nacieku zapalnego fazy ostrej oceniano histologicznie w czwartym dniu po transferze genów oraz po zastosowaniu placebo. Dodatkowo oceniano ekspresję cząstek adhezji komórek naczyniowych VCAM-1 oraz proliferację komórkową. Wyniki przedstawiono na ryc. 12 i w tabeli 8.

Obfity leukocytny nacieki zapalny obserwowano w warstwie wewnętrznej i środkowej tętnic poddanych transferowi przy pomocy wektora Adv. Średnia liczba leukocytów stwierdzona w warstwie wewnętrznej i środkowej przekraczała około 10-krotnie liczbę leukocytów obserwowanych w analogicznych warstwach tętnic poddanych transferowi przy pomocy wektora AAV lub traktowanych placebo, ryc. 12 A, B. Liczby leukocytów obecnych w przydanie tętnic poddanych transferowi Adv, AAV oraz traktowanych placebo nie różniły się znacząco, ryc. 12 C. W tętnicach poddanych transferowi z wykorzystaniem wektora AAV leukocyty w warstwie wewnętrznej i środkowej stwierdzano sporadycznie, podobnie jak w przypadku tętnic poddanych działaniu placebo, ryc. 12 A.

Bardziej szczegółowa charakterystyka komórek nacieku zapalnego ujawniała istotnie wyższą liczbę limfocytów T obecnych w warstwie wewnętrznej i środkowej tętnic poddanych transferowi przy pomocy wektora Adv w porównaniu do naczyń poddanych transferowi genów z wykorzystaniem wektora AAV i poddanych działaniu placebo, ryc. 12 A, B. Nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie limfocytów T naciekających przydankę tętnic w żadnej z trzech porównywanych grup, ryc. 12 C.

Obserwowano istotne uszkodzenie warstwy wewnętrznej polegające na denudacji komórek EC około 15% obwodu światła naczynia związane z ostrym naciekiem zapalnym obecnym w tętnicach poddanych transferowi przy pomocy wektora Adv. Niewielkie uszkodzenia warstwy komórek EC stwierdzano również w tętnicach poddanych transferowi przy użyciu wektora AAV. Były one jednak istotnie mniejsze w porównaniu do stwierdzanych w tętnicach poddanych transdukcji wektorem Adv ( $P < 0.05$ ) i porównywalne do obserwowanych w tętnicach traktowanych placebo, tabela 8.

Tab. 8. Stopień denudacji komórek EC i pole powierzchni warstwy wewnętrznej tętnicy po transferze AAV, Adv lub działaniu placebo.

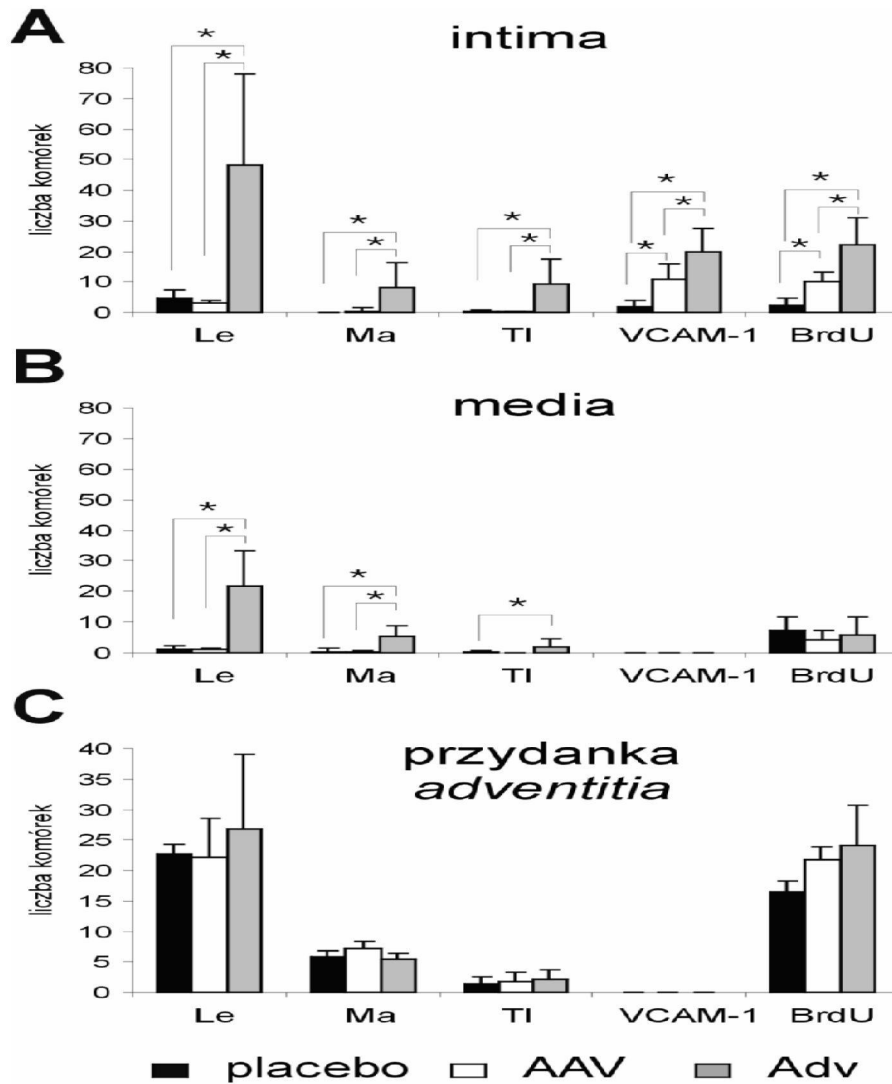
Tab. 8. *Acute endothelial denudation and neointima formation after Adv, AAV or mock gene transfers.*

	<b>Adv</b>	<b>AAV</b>	<b>Placebo</b>	<b>P</b> <b>Adv vs. AAV</b>
Odsetek obwodu światła tętnicy pozbawiony śródbłonna (dzień 4) <i>Absent endothelium at day 4</i> [% of luminal circumference]	15.0 ± 6.8*	1.7 ± 2.9 <sup>ns</sup>	0.9 ± 1.6	<i>P</i> <0.05
Pole powierzchni warstwy wewnętrznej tętnicy (dzień 14/21) <i>Area of neointima at day 14/21</i> [mm <sup>2</sup> /cross-section]	0.35 ± 0.17*	0.07 ± 0.08 <sup>ns</sup>	0.06 ± 0.07	<i>P</i> <0.01

\* *P*<0.05, ns - różnica nieistotna statystycznie w porównaniu do tętnic traktowanych placebo, ns- not significant compared with mock treatment

Ekspresję cząsteczek adhezyjnych VCAM-1 stwierdzano w komórkach EC warstwy wewnętrznej wszystkich tętnic poddanych transferowi genów oraz traktowanych placebo. Jednak tętnice poddane transdukcji Adv charakteryzowały się najwyższą liczbą komórek EC VCAM-1-pozytywnych, istotnie wyższą w porównaniu do tętnic poddanych transdukcji przy pomocy AAV (*P*< 0.05) i traktowanych placebo (*P*< 0.05). Liczba komórek EC wykazujących ekspresję VCAM-1 w tętnicach poddanych transferowi przy pomocy wektora AAV była również istotnie wyższa od stwierdzanej w tętnicach poddanych działaniu placebo (*P*< 0.05), ryc. 12 A.

Znakowanie przy pomocy BrdU wykazało istotnie wyższą liczbę proliferujących komórek EC warstwy wewnętrznej tętnic transdukowanych wektorem Adv w porównaniu do tętnic transdukowanych AAV (*P*< 0.05) i traktowanych placebo (*P*< 0.05). Niewielki, ale istotny statystycznie wzrost liczby komórek EC będących w stadium podziału stwierdzono w tętnicach transdukowanych AAV w porównaniu do naczyń poddanych działaniu placebo (*P*< 0.05), ryc. 12 A. Liczby komórek proliferujących w warstwie środkowej i przydince tętnic nie różniły się istotnie w porównywanych grupach, ryc. 12 B, C.



Ryc. 12. Naciek komórek zapalnych, ekspresja VCAM-1 i proliferacja komórkowa w; A. warstwie wewnętrznej (intima), B. środkowej (media) i C. przydanku tętnicy szyjnej królika w cztery dni po transferze genów przy pomocy wektora AAV, Adv lub działaniu placebo. \*-  $P < 0.05$ , Le - leukocyty, Ma - monocyty, TI - limfocyty T, VCAM-1- komórki wykazujące ekspresję VCAM-1, BrdU- komórki w fazie podziału.

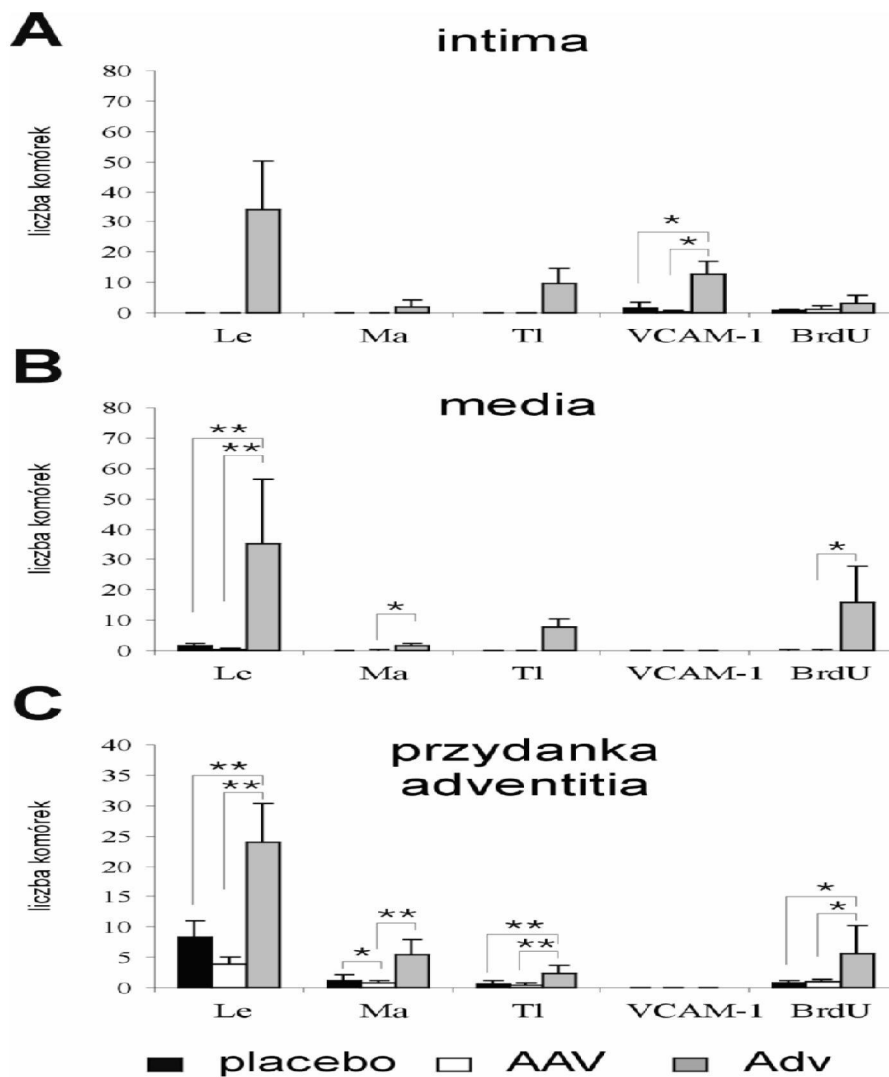
Fig. 12. Inflammatory cell infiltration, VCAM-1 expression and proliferation in; A. intima, B. media and C. adventitia in rabbit carotid arteries four days after AAV, Adv and mock treatments. \*-  $P < 0.05$ , Le- leukocytes, Ma- macrophages, TI- T-lymphocytes, VCAM-1- vascular cell adhesion molecule-1 expressing cells, BrdU- proliferating cells identified by the BrdU assay.

***Zmiany morfologiczne oraz ocena komórkowego nacieku zapalnego po transferze genów przy pomocy wektorów AAV i Adv do ściany prawidłowych tętnic w obserwacji odległej***

Obecność morfologicznych uszkodzeń oraz przewlekłego komórkowego nacieku zapalnego oceniano histologicznie w 14 dniu po transferze genów przy pomocy wektora Adv oraz w 21, 42 i 100 dniu po transdukcji AAV, a także w 21 dniu po zastosowaniu placebo. Dodatkowo oceniano ekspresję VCAM-1 oraz liczbę komórek proliferujących. Wyniki przedstawiono na ryc. 13 i w tabeli 8.

Intensywny, przewlekły naciek leukocytny, o liczbie komórek zapalnych zbliżonej do stwierdzanej w okresie ostrym, z przewagą limfocytów T nad makrofagami obserwowano w warstwie wewnętrznej, środkowej i przydince tętnic w 14 dniu po transdukcji Adv, ryc. 13 A, B, C. Ponadto, liczba komórek EC wykazujących ekspresję VCAM-1 oraz liczba komórek proliferujących w warstwie środkowej i przydince tętnic poddanych transferowi przy pomocy wektora Adv, były istotnie wyższe od wartości stwierdzanych w tętnicach transdukowanych AAV oraz poddanych działaniu placebo, ryc. 13 A, B, C. W warstwie wewnętrznej i środkowej tętnic poddanych transferowi mediowanemu przez AAV oraz traktowanych placebo naciek zapalny stwierdzany w fazie ostrej niemal zupełnie zanikł, tylko pojedyncze leukocyty były widoczne 21 dnia po zabiegu w przydince naczyń. Nieliczne komórki EC warstwy wewnętrznej tętnic transdukowanych AAV wykazywały ekspresję cząstek VCAM-1 w 21 dniu, w liczbie nie różniącej się istotnie od stwierdzanej w tętnicach traktowanych placebo. Nie obserwowano obecności komórek zapalnych, ekspresji VCAM-1 oraz komórek w fazie podziału w tętnicach pobranych w 42 i 100 dniu po transdukcji AAV.

Przyrost grubości warstwy wewnętrznej (neointima) na całym obwodzie światła tętnic obserwowano po transferze genów przy użyciu wektora Adv. W tętnicach poddanych transdukcji AAV obserwowano tylko niewielki rozrost warstwy wewnętrznej, ograniczony w grubości do jednej-dwóch warstw komórek i obejmujący poniżej 20% obwodu światła naczynia. Porównanie pola powierzchni warstwy wewnętrznej wykazało istotnie większy przyrost warstwy wewnętrznej w tętnicach transdukowanych Adv w porównaniu do tętnic poddanych działaniu AAV ( $P < 0.01$ ) i placebo ( $P < 0.05$ ). Przyrost neointimy w tętnicach transdukowanych AAV nie różnił się istotnie od przyrostu obserwowanego w tętnicach traktowanych placebo, tabela 8.



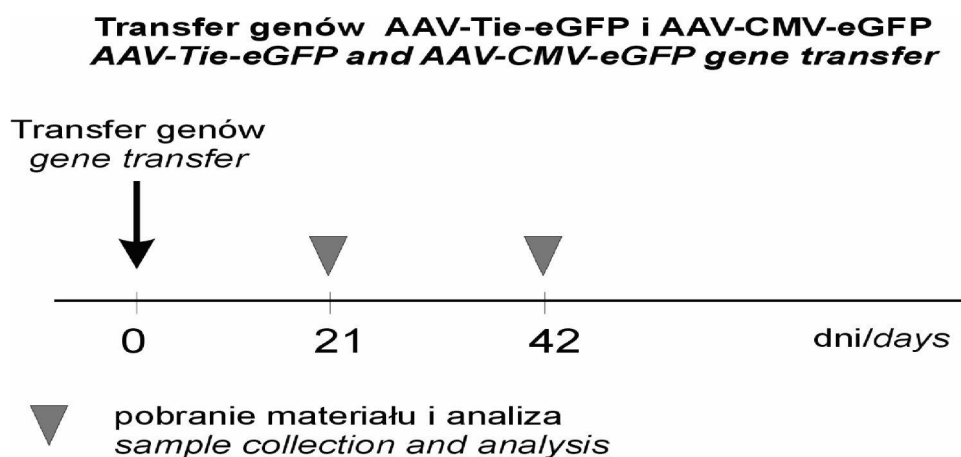
Ryc. 13. Naciek komórek zapalnych, ekspresja VCAM-1 i proliferacja komórek w; A. warstwie wewnętrznej (intima), B. środkowej (media) i C. przydanku tętnicy szyjnej królika we późnym okresie (14/21 doba) po transferze genów przy pomocy wektora AAV, Adv lub działaniu placebo. \*-  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , Le- leukocyty, Ma- monocyty, Tl- limfocyty T, VCAM-1- komórki wykazujące ekspresję VCAM-1, BrdU- komórki w fazie podziału.

Fig. 13. Inflammatory cell infiltration, VCAM-1 expression and proliferation in; A. intima, B. media and C. adventitia in rabbit carotid arteries in 14/21 days after AAV, Adv and mock treatments. \*-  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , Le- leukocytes, Ma- monocytes, Tl- T-lymphocytes, VCAM-1- vascular cell adhesion molecule-1 expressing cells, BrdU- proliferating cells identified by the BrdU assay.



#### 4.2. Transfer genów do ściany tętnicy przy pomocy wektora AAV zawierającego gen reporterowy pod kontrolą promotora Tie-1 nie prowadzi do komórkowo-swoistej ekspresji w komórkach śródbłonka

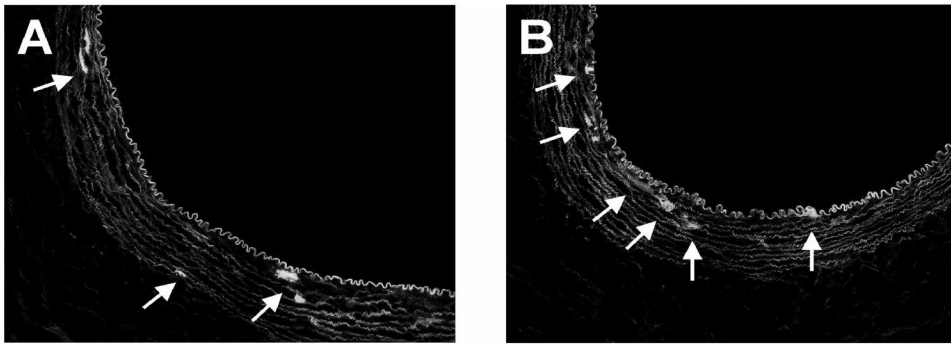
Ekspresję eGFP porównano w 21 i 42 dniu po wewnątrznaczyniowym transferze AAV-Tie-eGFP i AAV-CMV-eGFP do prawidłowej tętnicy szyjnej królika, ryc. 14.



Ryc. 14. Schemat badania. Prawidłową tętnicę szyjną królika transdukowano przy pomocy wektora AAV kodującego eGFP pod kontrolą promotora CMV lub Tie-1. Materiał do badań pobierano 21 lub 42 dni po transferze.

*Fig. 14. Study design. AAV-Tie-eGFP or AAV-CMV-eGFP gene transfer to normal rabbit carotid artery.*

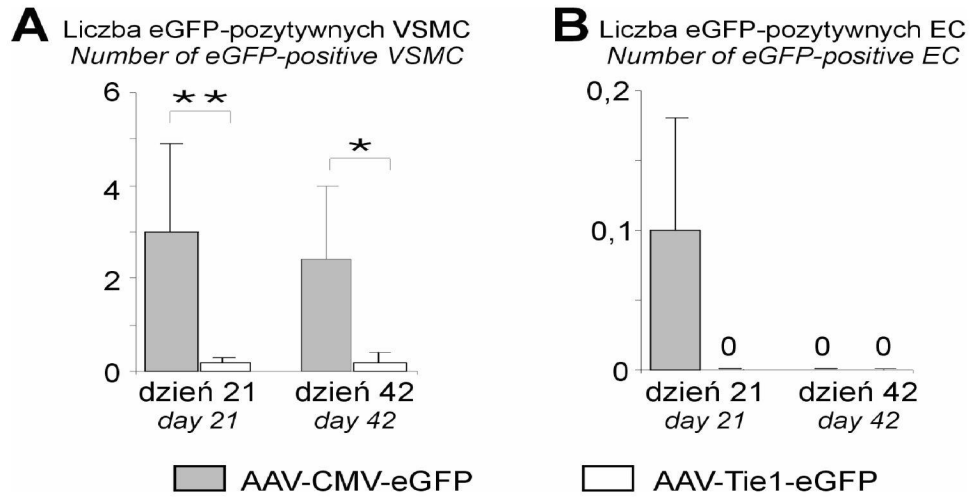
Po transferze przy użyciu wektora z promotorem Tie-1 stwierdzono ekspresję genu reporterowego ograniczoną do nielicznych komórek VSMC warstwy środkowej tętnicy, ryc. 15 A. Nie obserwowano ekspresji eGFP ani w komórkach EC ani w warstwie przydanki.



Ryc. 15. Reprezentatywne mikrofotografie histologicznej lokalizacji komórek wykazujących ekspresję eGFP po transferze przy pomocy wektora AAV do prawidłowej tętnicy szyjnej królika, obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x), strzałki wskazują eGFP-pozytywne VSMC warstwy środkowej tętnicy: A. przekrój poprzeczny tętnicy 21 dni po transferze AAV-Tie-eGFP  $9 \times 10^8$  TU/ml; B. przekrój poprzeczny tętnicy 21 dni po transferze AAV-CMV-eGFP  $9 \times 10^8$  TU/ml.

*Fig. 15. Representative micrographs of histological localization of eGFP gene expression after AAV gene transfer to normal rabbit carotid artery, fluorescence microscopy (magnification 100x), arrows indicate eGFP-positive VSMC in media: A. cross-section of the artery 21 days after AAV-Tie-eGFP  $9 \times 10^8$  TU/ml gene transfer; B. cross-section of the artery 21 days after AAV-CMV-eGFP  $9 \times 10^8$  TU/ml gene transfer.*

Liczba komórek VSMC wykazujących ekspresję eGFP po transferze AAV-Tie-eGFP była istotnie niższa w porównaniu z liczbą eGFP-pozytywnych komórek VSMC po transferze AAV-CMV-eGFP zarówno w 21 jak i 42 dniu po zabiegu, ryc. 16 A. W tętnicach transdukowanych AAV-CMV-eGFP stwierdzono nieliczne komórki EC wykazujące ekspresję genu reporterowego tylko w 21 dniu po transferze, ryc. 16 B.



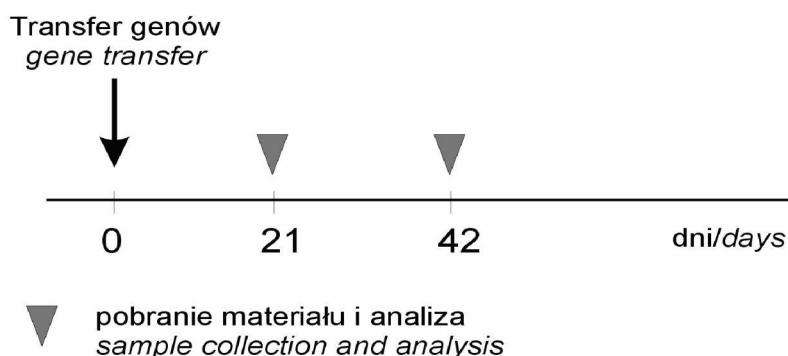
Ryc. 16. Średnia liczba VSMC i EC wykazujących ekspresję eGFP na przekrój poprzeczny naczyń 21 i 42 dni po transferze AAV-Tie-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) i AAV-CMV-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) do prawidłowych tętnic szyjnych królika. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Fig. 16. Bar graphs represent the mean number of eGFP-positive VSMC and EC per cross-section 21 and 42 days after the AAV-Tie-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) and the AAV-CMV-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) gene transfers to normal rabbit carotid arteries. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 4.3. Zastosowanie inhibitora proteosomalnego MG-132 nie prowadzi do poprawy efektywności transferu genów do ściany tętnicy szyjnej królika przy użyciu wektora AAV

W celu zbadania możliwości wykorzystania inhibitora proteosomalnego MG-132 dla zwiększenia efektywności transferu genów do prawidłowej tętnicy szyjnej królika przy pomocy wektorów AAV, porównano efekty transferu genu reporterowego przy pomocy AAV-Tie-eGFP lub AAV-CMV-eGFP w i bez obecności 40mM MG-132, ryc. 17.

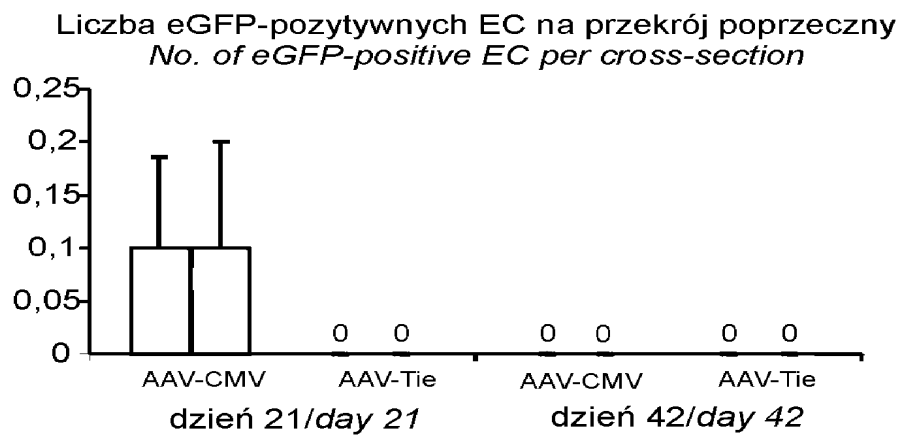
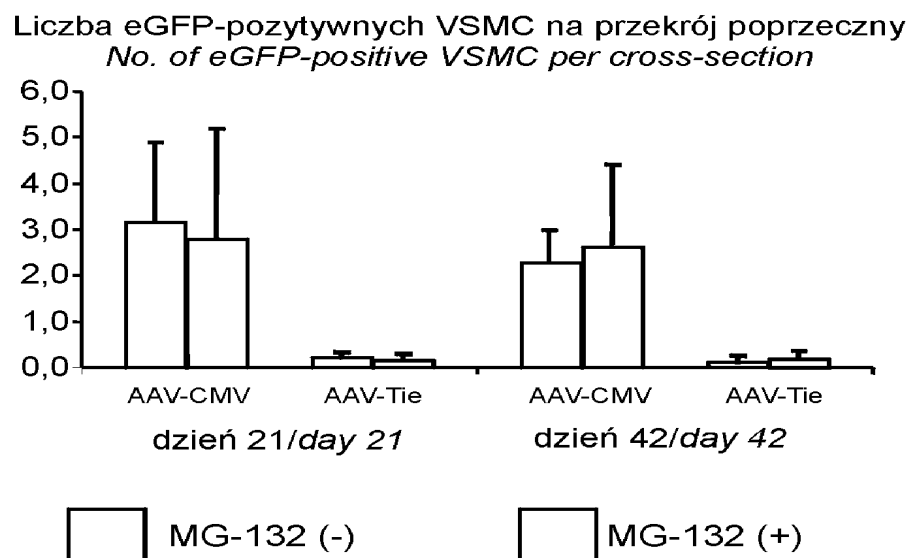
#### Transfer genów AAV-Tie-eGFP i AAV-CMV-eGFP z lub bez MG-132 *AAV-Tie-eGFP and AAV-CMV-eGFP gene transfer with or without MG-132*



Ryc. 17. Schemat badania. Prawidłową tętnicę szyjną królika transdukowano przy pomocy wektora AAV kodującego eGFP pod kontrolą promotora CMV lub Tie-1 z lub bez obecności 40mM MG-132. Materiał do badań pobierano 21 lub 42 dni po transferze.

*Fig. 17. Study design. The AAV-CMV-eGFP or AAV-Tie-eGFP gene transfers with or without 40mM MG-132 to normal rabbit carotid arteries.*

Porównując liczbę komórek ściany tętnicy wykazujących ekspresję transgenu po transferze AAV-CMV-eGFP lub AAV-Tie-eGFP z i bez obecności 40mM MG-132 nie wykazano wpływu inhibitora na poziom ekspresji ani w 21, ani w 42 dniu po zabiegu. Obserwacja ta dotyczy zarówno komórek EC warstwy wewnętrznej, jak i komórek mięśniówki gładkiej warstwy środkowej tętnicy, ryc. 18.

**A****B**

Ryc. 18. Średnia liczba EC (A) i VSMC (B) wykazujących ekspresję eGFP na przekrój poprzeczny naczyń 21 i 42 dni po transferze AAV-CMV-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) lub AAV-Tie-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) do prawidłowych tętnic szyjnych królika w lub bez obecności 40mM MG-132.

Fig. 18. Bar graphs represent the mean number of eGFP-positive EC (A) and VSMC (B) per cross-section 21 and 42 days after the AAV-CMV-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) or the AAV-Tie-eGFP ( $9 \times 10^8$  TU/ml) gene transfers to normal rabbit carotid arteries with or without 40mM MG-132.

W analizie histologicznej transdukowanych naczyń nie obserwowano istotnych lokalnych zmian toksycznych lub zapalnych związanych z zastosowaniem MG-132 w czasie transferu genów, tab. 9. Stwierdzono tylko nieznacznie wyższą liczbę leukocytów w warstwie wewnętrznej oraz makrofagów w przydanie tętnic poddanych transferowi AAV z użyciem MG-132 w porównaniu z tętnicami poddanymi działaniu placebo. Wartości te nie różniły się jednak w sposób statystycznie znamienne od obserwowanych w naczyniach poddanych transferowi AAV bez użycia MG-132.

Tab. 9. Liczba komórek lokalnego nacieku zapalnego, komórek proliferujących, komórek EC wykazujących ekspresję VCAM-1 oraz pole powierzchni neointymy w tętnicach poddanych transferowi AAV z i bez obecności MG-132 oraz w tętnicach poddanych działaniu placebo (0.9% NaCl).

Tab. 9. Number of local inflammatory cells, proliferating cells, VCAM-1 expressing EC, and neointima area in AAV transduced arteries with and without MG-132 and in placebo treated arteries.

	AAV (+MG-132)	AAV (-MG-132)	p*	placebo	p**
<b>leukocyty</b> <i>leukocytes</i>					
w. wewnętrzna/ intima [na ppn]	0.3 ± 0.4	0.4 ± 0.9	NS	0.1 ± 0.1	<0.05
w. środkowa/ media [na ppn]	1.7 ± 2.0	0.9 ± 0.9	NS	1.5 ± 0.9	NS
przydanka/ adventitia [na pw]	6.7 ± 3.1	5.7 ± 2.0	NS	8.4 ± 2.7	NS
<b>makrofagi</b> <i>macrophages</i>					
w. wewnętrzna/ intima [na ppn]	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NS	0.0 ± 0.0	NS
w. środkowa/ media [na ppn]	0.7 ± 0.9	0.4 ± 0.6	NS	0.2 ± 0.9	NS
przydanka/ adventitia [na pw]	4.8 ± 1.7	5.3 ± 3.5	NS	1.2 ± 1.0	<0.05
<b>limfocyty T</b> <i>T lymphocytes</i>					
w. wewnętrzna/ intima [na ppn]	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NS	0.0 ± 0.0	NS
w. środkowa/ media [na ppn]	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	NS	0.1 ± 0.1	NS
przydanka/ adventitia [na pw]	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.3	NS	1.5 ± 0.6	NS
<b>k. proliferujące</b> <i>proliferating cells</i>					
w. wewnętrzna/ intima [na ppn]	0.9 ± 1.3	0.9 ± 1.3	NS	0.7 ± 0.5	NS
w. środkowa/ media [na ppn]	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NS	0.1 ± 0.2	NS
przydanka/ adventitia [na pw]	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.6	NS	0.8 ± 0.3	NS
VCAM- 1 [na ppn]	1.5 ± 1.7	1.4 ± 1.2	NS	1.5 ± 2.0	NS
Neointima [mm <sup>2</sup> ]	0.071 ± 0.084	0.024 ± 0.051	NS	0.061 ± 0.070	NS

p\* - istotność statystyczna różnic między tętnicami transdukowanymi w obecności MG-132 a tętnicami transdukowanymi bez obecności inhibitora MG-132 (*MG-132+* vs. *MG-132-*),

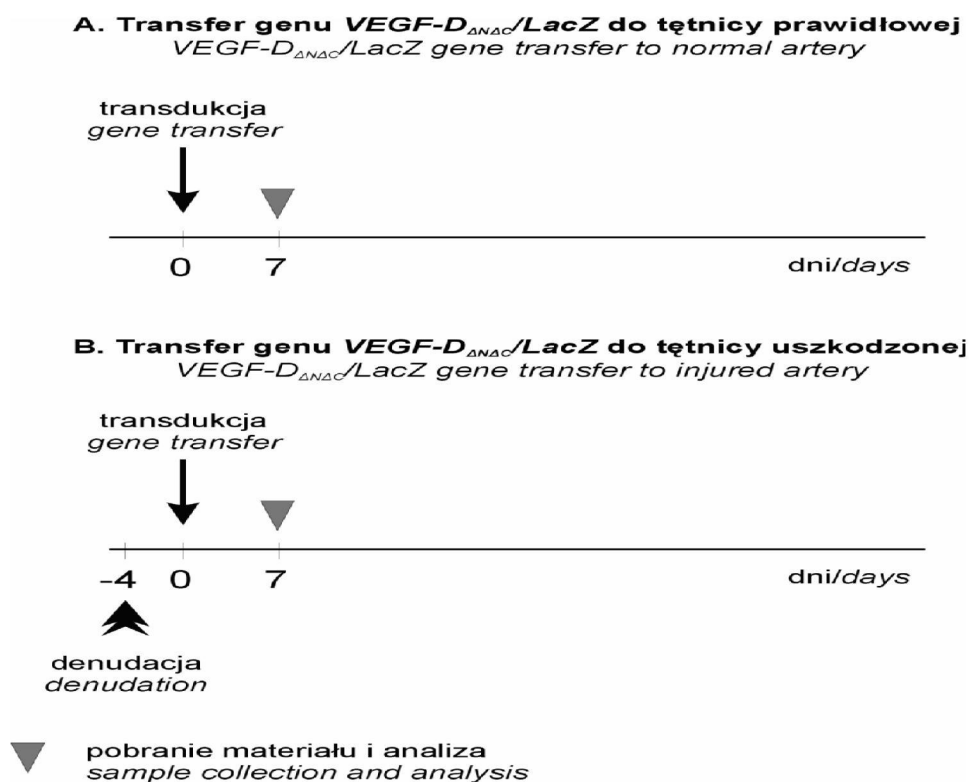
p\*\* - istotność statystyczna różnic między tętnicami transdukowanymi w obecności MG-132 a tętnicami traktowanymi placebo (*MG-132+* vs. *placebo*),

na ppn- na przekrój poprzeczny naczynia/ *per cross section*,

na pw- na pole widzenia mikroskopu/ *per high power field*

#### 4.4. Transfer genu śródbłonkowego czynnika wzrostowego naczyń typu D przy pomocy wektora adenowirusowego do ściany prawidłowej i poddanej urazowi tętnicy szyjnej królika

W celu zbadania potencjalnych naczynio-protেকcyjnych właściwości VEGF-D porównano efekty transferu przy pomocy wektorów adenowirusowych genu kodującego VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> i genu kontrolnego *LacZ* do prawidłowej i uszkodzonej tętnicy szyjnej królika *in vivo*, ryc. 19.



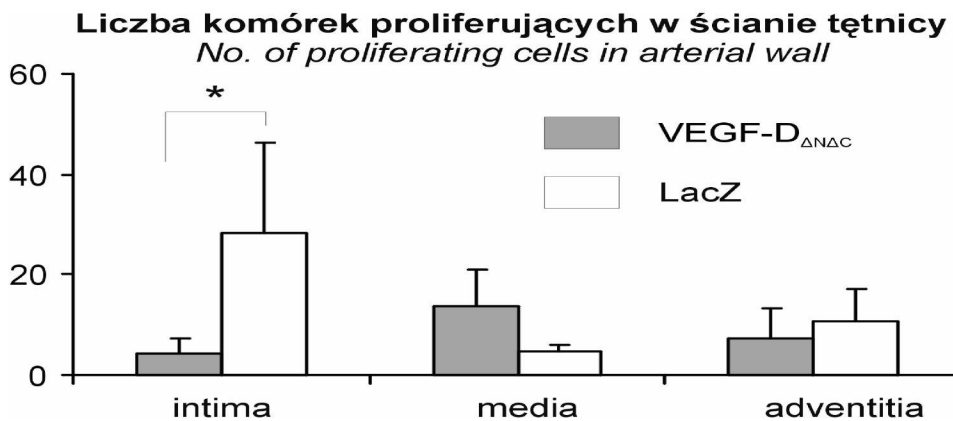
Ryc. 19. Schemat badania. Prawidłową lub poddaną cztery dni wcześniej urazowi przy pomocy balonu do angioplastyki tętnicę szyjną królika transdukowano przy pomocy wektora Adv kodującego VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> lub *LacZ* pod kontrolą promotora CMV. Materiał do badań pobierano siedem dni po transferze.

Fig. 19. Study design. A. The VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> or placebo gene transfer with Adv vector to normal rabbit carotid arteries, B. The VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> or placebo gene transfer with Adv vector to injured rabbit carotid arteries.

**Transfer genu *VEGF-D<sub>ΔANAC</sub>* do ściany nieuszkodzonej tętnicy prowadzi do redukcji komórkowego odczynu zapalnego i liczby komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej tętnicy**

W celu zbadania proliferacji komórek w naczyniach poddanych transferowi genów wykonano test inkorporacji BrdU. W warstwie wewnętrznej tętnic siedem dni po transferze genu *VEGF-D<sub>ΔANAC</sub>* stwierdzono istotnie mniejszą liczbę komórek w fazie podziału (BrdU-pozytywnych) w porównaniu z tętnicami po transferze genu kontrolnego *LacZ* (odpowiednio  $4.4 \pm 3.0$  i  $28.4 \pm 18.1$ ,  $p < 0.05$ ). Nie wykazano istotnych różnic w liczbie komórek proliferujących w warstwie środkowej i przydanie transdukowanych tętnic, ryc. 20. Nie obserwowano również istotnych statystycznie różnic w stopniu uszkodzenia integralności warstwy komórek śródbłonna między porównywanymi grupami *VEGF-D<sub>ΔANAC</sub>* i *LacZ*, chociaż stopień denudacji EC był nieco większy w tętnicach poddanych transferowi genu *LacZ*, tab. 10.

Na uwagę zasługuje istotna różnica w nasileniu miejscowego odczynu zapalnego między porównywanymi grupami. W tętnicach poddanych transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔANAC</sub>* wykazano istotnie mniejszą liczbę leukocytów oraz makrofagów we wszystkich warstwach naczynia w porównaniu z tętnicami transdukowanymi genem *LacZ*, tab.10. Wykazano, istotną korelację pozytywną między liczbą makrofagów, a liczbą komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej tętnic poddanych transferowi genu *LacZ* ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.05$ ), tab. 12.



Ryc. 20. Średnia liczba komórek w fazie podziału (BrdU-pozytywnych) w poszczególnych warstwach tętnic siedem dni po transferze *VEGF-D<sub>ΔANAC</sub>* lub *LacZ* do prawidłowych tętnic szyjnych królika. \*  $P < 0.05$

Fig. 20. Bar graphs represent the mean number of proliferating cells in intima, media and adventitia 7 days after *VEGF-D<sub>ΔANAC</sub>* or *LacZ* gene transfers to normal rabbit carotid arteries. \*  $P < 0.05$



Tab. 10. Uszkodzenie śródbłonki i liczba komórek zapalnych w poszczególnych warstwach tętnic siedem dni po transferze *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ* do prawidłowych tętnic szyjnych królika.

*Tab. 10. Endothelial denudation and number of inflammatory cells in intima, media and adventitia 7 days after VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> or Lac-Z gene transfers to normal rabbit carotid arteries.*

	Adv-CMV-VEGF-D	Adv-CMV-LacZ	p
ubytek EC [%] <i>EC denudation [%]</i>	4.5 ± 5.7	7.6 ± 5.0	NS
<b>liczba leukocytów na ppn</b> <i>no. leucocytes</i>			
warstwa wewnętrzna / <i>intima</i> [na ppn]	9.1 ± 12.1	47.5 ± 37.6	<0.05
warstwa środkowa / <i>media</i> [na ppn]	0.3 ± 0.8	4.7 ± 3.9	<0.05
przydanka / <i>adventitia</i> [na pw]	29.0 ± 4.9	69.5 ± 25.2	<0.05
<b>liczba makrofagów na ppn</b> <i>no. macrophage per cross-section</i>			
warstwa wewnętrzna / <i>intima</i> [na ppn]	0.1 + 0.1	4.9 + 4.7	<0.01
warstwa środkowa / <i>media</i> [na ppn]	0.6 + 1.3	2.2 + 2.1	<0.05
przydanka / <i>adventitia</i> [na pw]	7.5 + 3.6	15.1 + 6.9	<0.05

na ppn- na przekrój poprzeczny naczynia/ *per cross section*,  
na pw- na pole widzenia mikroskopu/ *per high power field*

***Transfer genu VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> do ściany nieuszkodzonej tętnicy prowadzi do obniżenia ekspresji receptora VEGFR-2/KDR oraz metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej***

W analizie immunohistologicznej przekrojów poprzecznych prawidłowych tętnic poddanych transferowi genów *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* i *LacZ* wykazano ekspresję receptora VEGFR-2 oraz metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej 2 i 9 we wszystkich trzech warstwach naczynia: wewnętrznej, środkowej i przydanie. W tętnicach poddanych transferowi *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* w ocenie półilościowej ekspresja VEGFR-2 oraz MMP-2 i MMP-9 była niższa w warstwach wewnętrznej i środkowej w porównaniu do tętnic poddanych transferowi *LacZ*, osiągając istotność statystyczną dla VEGFR-2 w warstwie wewnętrznej i środkowej, dla MMP-2 w warstwie wewnętrznej i dla MMP-9 w warstwie środkowej, tab. 11.

Tab. 11. Półilościowa ocena ekspresji MMP-2, MMP-9 i VEGFR-2/KDR w warstwie wewnętrznej, środkowej i przydanki tętnic siedem dni po transferze *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ* do prawidłowych tętnic szyjnych królika.

Tab. 11. *Semiquantitative evaluation of MMP-2, MMP-9 and VEGFR-2/KDR expression in intima, media and adventitia 7 days after VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> or Lac-Z gene transfers to normal rabbit carotid arteries.*

	Adv-CMV-VEGF-D	Adv-CMV-LacZ	p
<b>MMP-2</b>			
warstwa wewnętrzna / intima	1.4 + 0.8	2.4 + 0.8	<0.05
warstwa środkowa / media	1.4 + 0.8	2.0 + 0.6	NS
przydanka / adventitia	3.0 + 0.0	3.0 + 0.0	NS
<b>MMP-9</b>			
warstwa wewnętrzna / intima	1.4 + 0.8	2.3 + 1.0	NS
warstwa środkowa / media	1.1 + 0.4	2.0 + 0.6	<0.05
przydanka / adventitia	3.0 + 0.0	3.0 + 0.0	NS
<b>VEGFR-2/KDR</b>			
warstwa wewnętrzna / intima	1.9 + 0.4	2.7 + 0.5	<0.05
warstwa środkowa / media	1.3 + 0.5	2.4 + 0.5	<0.01
przydanka / adventitia	2.0 + 0.0	2.3 + 0.5	NS

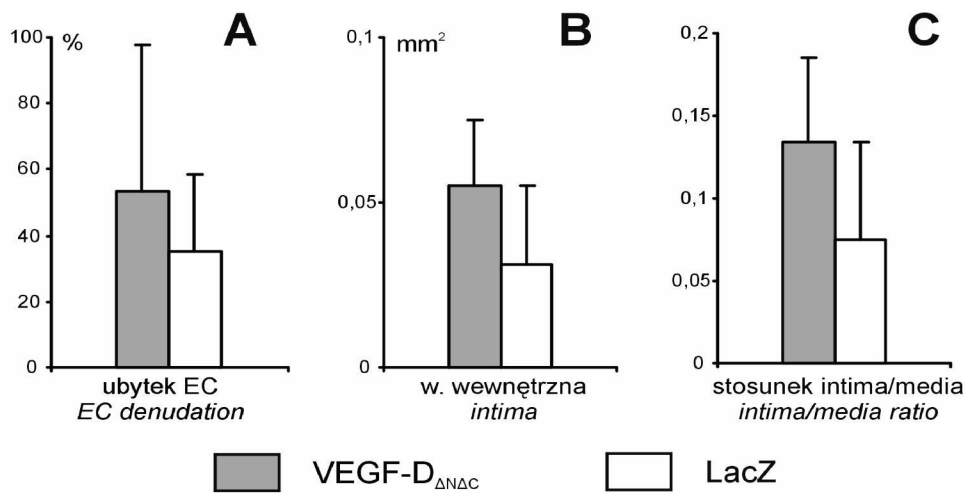
W większości tętnic poddanych transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* i *LacZ* poziomy ekspresji obu analizowanych metaloproteinaz w warstwie wewnętrznej i środkowej pozytywnie korelowały między sobą oraz z ekspresją VEGFR-2, tab. 12. Nie wykazano istnienia istotnych korelacji między ekspresją MMP-2, MMP-9 oraz VEGFR-2, a stopniem uszkodzenia warstwy śródbłonna, liczbą komórek proliferujących oraz liczbą komórek zapalnych w poszczególnych warstwach prawidłowych tętnic poddanych transferowi *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* i *LacZ*.

Tab. 12. Wybrane korelacje w grupie tętnic prawidłowych poddanych lokalnemu transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ*.Tab. 12. Selected correlations after *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* or *LacZ* gene transfers to normal rabbit carotid arteries.

	<b>VEGF-D</b>	<b>LacZ</b>
Liczba komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej vs. liczba makrofagów w warstwie wewnętrznej <i>No. proliferating cells in intima vs. No. macrophages in intima</i>	r = 0.55, NS	<b>r = 0.82, p&lt;0.05</b>
Ekspresja MMP-2 w warstwie wewnętrznej vs. ekspresja MMP-9 w warstwie wewnętrznej <i>MMP-2 expression in intima vs. MMP-9 expression in intima</i>	<b>r = 0.73, p&lt;0.05</b>	<b>r = 0.92, p&lt;0.01</b>
Ekspresja MMP-2 w warstwie wewnętrznej vs. ekspresja VEGFR-2 w warstwie wewnętrznej <i>MMP-2 expression in intima vs. VEGFR-2 expression in intima</i>	r = 0.06, NS	<b>r = 0.81, p&lt;0.05</b>
Ekspresja MMP-2 w warstwie środkowej vs. ekspresja MMP-9 w warstwie środkowej <i>MMP-2 expression in media vs. MMP-9 expression in media</i>	<b>r = 0.73, p&lt;0.05</b>	<b>r = 1.0, p&lt;0.00</b>
Ekspresja MMP-2 w warstwie środkowej vs. ekspresja VEGFR-2 w warstwie środkowej <i>MMP-2 expression in media vs. VEGFR-2 expression in media</i>	<b>r = 0.74, p&lt;0.05</b>	<b>r = 1.0, p&lt;0.00</b>
Ekspresja MMP-9 w warstwie wewnętrznej vs. ekspresja VEGFR-2 w warstwie wewnętrznej <i>MMP-9 expression in intima vs. VEGFR-2 expression in intima</i>	r = -0.37, NS	<b>r = 0.83, p&lt;0.05</b>
Ekspresja MMP-9 w warstwie środkowej vs. ekspresja VEGFR-2 w warstwie środkowej <i>MMP-9 expression in media vs. VEGFR-2 expression in media</i>	r = 0.73, NS	<b>r = 1.0, p&lt;0.00</b>

***Wewnątrznaczyniowy transfer genu VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> do ściany tętnicy po urazie balonowym nie przyspiesza odtworzenia integralności warstwy śródbłonka oraz nie prowadzi do redukcji przyrostu warstwy wewnętrznej***

W siedem dni po transferze genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* do ściany tętnicy poddanej wcześniej urazowi przy pomocy balonu do angioplastyki wieńcowej nie wykazano przyspieszenia procesu odtworzenia integralności warstwy śródbłonka oraz redukcji przyrostu grubości warstwy wewnętrznej (neointimy) w porównaniu do tętnic poddanych transferowi genu *LacZ*. W tętnicach poddanych transdukcji *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* stopień denudacji EC oraz pole powierzchni warstwy wewnętrznej i stosunek warstwy wewnętrznej do środkowej były większe w porównaniu do naczyń poddanych transferowi genu kontrolnego, różnice te jednak nie były istotne statystycznie, ryc. 21.



Ryc. 21. Uszkodzenie śródbłonna i przyrost warstwy wewnętrznej siedem dni po transfe-rze *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ* do poddanych urazowi tętnicy szyjnej królika. A. Procent obwodu światła naczynia pozbawiony komórek śródbłonna, B. pole powierzchni warstwy wewnętrznej, C. stosunek pola powierzchni warstwy wewnętrznej do pola powierzchni warstwy środkowej.

Fig. 21. *Endothelial denudation and neointima formation 7 days after VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> or LacZ gene transfers to injured rabbit carotid arteries. A. percentage of denuded EC, B. intima area, C. intima/media ratio.*

W tętnicach transdukowanych *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* obserwowano istotnie większą liczbę komórek VSMC proliferujących w warstwie środkowej oraz w sposób nieistotny statystycznie zwiększoną liczbę komórek w fazie podziału w warstwie wewnętrznej i przydatce w porównaniu do tętnic poddanych transferowi *LacZ*, tab. 13. Nie występowały istotne różnice w liczbie komórek lokalnego nacieku zapalnego w obu porównywanych grupach tętnic, tab.13.

Tab. 13. Liczba komórek dzielących się oraz leukocytów i makrofagów w poszczególnych warstwach tętnic siedem dni po transferze *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ* do ściany poddanych urazowi tętnic szyjnych królika.

Tab. 13. Number of proliferating cells, leukocytes and macrophages in intima, media and adventitia 7 days after *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* or *Lac-Z* gene transfers to injured rabbit carotid arteries.

	Adv-CMV-VEGF-D	Adv-CMV-LacZ	p
<b>liczba komórek proliferujących</b> <i>no. proliferating cells</i>			
warstwa wewnętrzna / intima [na ppn]	39.0 + 22.3	19.1 + 16.7	NS
warstwa wewnętrzna / intima [na mm <sup>2</sup> ]	924.2 + 878.5	779.5 + 561.0	NS
warstwa środkowa / media [na ppn]	14.2 + 8.0	4.3 + 3.1	<0.05
przydanka / adventitia [na pw]	2.5 + 1.9	0.8 + 0.3	NS
<b>liczba leukocytów</b> <i>no. leucocytes</i>			
warstwa wewnętrzna / intima [na ppn]	85.7 + 132.7	33.4 + 82.0	NS
warstwa wewnętrzna / intima [na mm <sup>2</sup> ]	12.7 + 17.1	11.5 + 15.5	NS
warstwa środkowa / media [na ppn]	1.3 + 1.7	1.5 + 1.4	NS
przydanka / adventitia [na pw]	34.3 + 12.8	32.2 + 22.0	NS
<b>liczba makrofagów na ppn</b> <i>no. macrophage per cross-section</i>			
warstwa wewnętrzna / intima [na ppn]	0.8 + 1.1	0.3 + 0.3	NS
warstwa wewnętrzna / intima [na mm <sup>2</sup> ]	6.5 + 8.1	5.0 + 8.7	NS
warstwa środkowa / media [na ppn]	0.4 + 0.7	0.2 + 0.3	NS
przydanka / adventitia [na pw]	5.7 + 0.9	5.3 + 1.5	NS

ppn- przekrój poprzeczny naczynia/ *cross section*,

pw- pole widzenia mikroskopu/ *high power field*

Pole powierzchni warstwy wewnętrznej (neointima) oraz stosunek intima/media tętnic poddanych transferowi genu *LacZ* dodatnio korelowały z liczbą naciekających tę warstwę leukocytów oraz liczbą komórek neointimy w fazie podziału, tab. 14. Natomiast liczba komórek proliferujących dodatnio korelowała z liczbą naciekających leukocytów oraz stopniem ekspresji MMP-9, tab. 14. W przypadku tętnic poddanych transferowi *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* stwierdzono występowanie dodatniej korelacji między liczbą komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej, a liczba komórek dzielących się w warstwie środkowej oraz występowanie dodatniej korelacji między liczbą komórek proliferujących w warstwie środkowej a ekspresją MMP-9, tab. 14.

Tab. 14. Wybrane korelacje w grupie tętnic poddanych urazowi a następnie lokalnemu transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNAC</sub>* lub *LacZ*.

*Tab. 14. Selected correlations after VEGF-D or LacZ gene transfers to injured rabbit carotid arteries.*

	<i>VEGF-D</i>	<i>LacZ</i>
Pole powierzchni warstwy wewnętrznej vs. liczba leukocytów w warstwie wewnętrznej <i>Intima area vs. No. leukocytes in intima</i>	r = 0.33, NS	<b>r = 0.88, p&lt;0.05</b>
Stosunek intima/media vs. liczba komórek proliferujących warstwy wewnętrznej <i>Intima/media ratio vs. No. proliferating cells in intima</i>	r = -0.48, NS	<b>r = 0.83, p&lt;0.05</b>
Stosunek intima/media vs. liczba leukocytów w warstwie wewnętrznej <i>Intima/media ratio vs. No. leukocytes in intima</i>	r = 0.33, NS	<b>r = 0.89, p&lt;0.05</b>
Liczba komórek proliferujących warstwy wewnętrznej vs. liczba leukocytów w warstwie wewnętrznej <i>No. proliferating cells in intima vs. No. leukocytes in intima</i>	r = 0.56, NS	<b>r = 0.88, p&lt;0.05</b>
Liczba komórek proliferujących warstwy wewnętrznej vs. ekspresja MMP-9 w warstwie wewnętrznej <i>No. proliferating cells in intima vs. MMP-9 expression in intima</i>	r = 0.62, NS	<b>r = 0.92, p&lt;0.01</b>
Liczba komórek proliferujących warstwy wewnętrznej vs. liczba komórek proliferujących warstwy środkowej <i>No. proliferating cells in intima vs. No. proliferating cells in media</i>	<b>r = 0.77, p&lt;0.05</b>	r = 0.07, NS
Liczba komórek proliferujących warstwy środkowej vs. ekspresja MMP-9 w warstwie środkowej <i>No. proliferating cells in media vs. MMP-9 expression in media</i>	r = 0.18, NS	<b>r = 0.81, p&lt;0.05</b>

***Transfer genu VEGF-D<sub>ΔNAC</sub> prowadzi do obniżenia ekspresji receptora VEGFR-2/KDR oraz metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej w warstwie środkowej tętnicy po urazie balonowym***

W analizie immunohistologicznej tętnic poddanych urazowi przy pomocy balonu do angioplastyki wieńcowej i następnie transferowi genów *VEGF-D<sub>ΔNAC</sub>* lub *LacZ* podobnie jak w tętnicach prawidłowych wykazano ekspresję receptora VEGFR-2 oraz metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej 2 i 9 we wszystkich trzech warstwach: wewnętrznej, środkowej i przydance. W ocenie półilościowej ekspresja VEGFR-2, MMP-2 i MMP-9 była nieco wyższa w tętnicach

poddanych urazowi w porównaniu do naczyń prawidłowych, lecz różnice te nie wykazywały istotności statystycznej. W tętnicach uszkodzonych poddanych transferowi *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* w ocenie półilościowej ekspresja VEGFR-2 oraz MMP-2 i MMP-9 była niższa w warstwie środkowej w porównaniu do tętnic poddanych transferowi *LacZ*, osiągając istotność statystyczną tylko w przypadku MMP-9, tab.15.

Tab. 15. Półilościowa ocena ekspresji MMP-2, MMP-9 i VEGFR-2/KDR w poszczególnych warstwach siedem dni po transferze *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ* do tętnic szyjnych królika poddanych urazowi.

Tab. 15. *Semiquantitative evaluation of MMP-2, MMP-9 and VEGFR-2/KDR expression in intima, media and adventitia 7 days after VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> or Lac-Z gene transfers to injured rabbit carotid arteries.*

	Adv-CMV-VEGF-D	Adv-CMV-LacZ	p
<b>MMP-2</b>			
warstwa wewnętrzna / <i>intima</i>	2.1 + 0.7	2.5 + 0.6	NS
warstwa środkowa / <i>media</i>	1.4 + 0.8	2.2 + 0.4	NS
przydanka / <i>adventitia</i>	3.0 + 0.0	3.0 + 0.0	NS
<b>MMP-9</b>			
warstwa wewnętrzna / <i>intima</i>	2.1 + 0.7	2.3 + 0.5	NS
warstwa środkowa / <i>media</i>	1.4 + 0.8	2.5 + 0.6	<0.05
przydanka / <i>adventitia</i>	3.0 + 0.0	3.0 + 0.0	NS
<b>VEGFR-2/KDR</b>			
warstwa wewnętrzna / <i>intima</i>	2.3 + 0.5	2.7 + 0.5	NS
warstwa środkowa / <i>media</i>	2.1 + 0.4	2.5 + 0.6	NS
przydanka / <i>adventitia</i>	1.9 + 0.4	2.0 + 0.0	NS

Poziom ekspresji metaloproteinaz MMP-2 i 9 korelował ze sobą zwłaszcza w przypadku tętnic poddanych transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>*, tab. 16. Ponadto, w przypadku tych tętnic, wykazano istnienie dodatniej korelacji ekspresji obu metaloproteinaz z liczbą naciekających leukocytów w warstwie wewnętrznej, tab. 16. W tętnicach poddanych transferowi genu *LacZ* wykazano istnienie dodatniej korelacji między ekspresją MMP-9 a ekspresją VEGFR-2 w warstwie środkowej naczynia, tab. 16.

Tab. 16. Wybrane korelacje między badanymi parametrami w grupie tętnic poddanych urazowi a następnie lokalnemu transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* lub *LacZ*.

Tab. 16. Selected correlations between studied parameters after *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* or *LacZ* gene transfers to injured rabbit carotid arteries.

	<i>VEGF-D</i>	<i>LacZ</i>
Ekspresja MMP-2 w warstwie wewnętrznej vs. liczba leukocytów warstwy wewnętrznej <i>MMP-2 expression in intima vs. No. leukocytes in intima</i>	<b>r = 0.85, p&lt;0.05</b>	r = 0.45, NS
Ekspresja MMP-2 w warstwie wewnętrznej vs. ekspresja VEGFR-2 w warstwie wewnętrznej <i>MMP-2 expression in intima vs. VEGFR-2 expression in intima</i>	r = 0.35, NS	<b>r = 1.0, p&lt;0.00</b>
Ekspresja MMP-2 w warstwie wewnętrznej vs. ekspresja MMP-9 w warstwie wewnętrznej <i>MMP-2 expression in intima vs. MMP-9 expression in intima</i>	<b>r = 1.0, p&lt;0.00</b>	r = 0.71, NS
Ekspresja MMP-2 w warstwie środkowej vs. ekspresja MMP-9 w warstwie środkowej <i>MMP-2 expression in media vs. MMP-9 expression in media</i>	<b>r = 1.0, p&lt;0.00</b>	r = 0.44, NS
Ekspresja MMP-9 w warstwie wewnętrznej vs. liczba leukocytów warstwy wewnętrznej <i>MMP-9 expression in intima vs. No. leukocytes in intima</i>	<b>r = 0.85, p&lt;0.05</b>	r = 0.63, NS



## 5. DYSKUSJA

Lokalny transfer genów do ściany tętnicy stanowi potencjalnie przydatną metodę zarówno w badaniach biologii i patologii naczyń jak i w terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego. Do tej pory opisano kilka systemów efektywnego transferu genów do ściany naczyń krwionośnych wykorzystujących różne rodzaje wektorów [72,74,272]. Obecnie znacznie częściej wykorzystuje się wektory wirusowe głównie ze względu na znacznie wyższą efektywność transferu genów w porównaniu z wektorami niewirusowymi. Wirusy pochodzące z wielu rodzin zostały wykorzystane do tworzenia wektorów o różnych właściwościach biologicznych i w konsekwencji o odmiennych zaletach i ograniczeniach ich zastosowania w badaniach eksperymentalnych i potencjalnej terapii genowej [72,74,272].

### *Transfer genów reporterowych do ściany tętnicy: porównanie wirusów związanych z adenowirusami z wektorami adenowirusowymi*

Niewiele wiadomo na temat możliwości transferu genów do ściany naczyń przy pomocy wirusów związanych z adenowirusami AAV [6,61,141,143,204,208,245]. Niniejsze badanie miało głównie na celu określenie efektywności oraz ewentualnych działań niepożądanych wewnątrznaczyniowego transferu genów do ściany tętnicy przy pomocy wektorów AAV. Jest to najprawdopodobniej pierwsze badanie dotyczące transferu genów do ściany naczyń porównujące bezpośrednio w tym samym modelu eksperymentalnym wektory AAV z wektorami adenowirusowymi Adv.

Dokonując transferu od wewnątrz światła tętnicy wykazano, iż pomimo zachowania integralności komórek EC warstwy wewnętrznej oraz elastycznej błony wewnętrznej, użycie wektora AAV z promotorem CMV prowadzi do wysoce efektywnej transdukcji komórek VSMC warstwy środkowej naczynia z długotrwałą ekspresją genu reporterowego, obecną do 100 dni po transdukcji. Jest to najprawdopodobniej najdłuższy udokumentowany do tej pory czas ekspresji transgenu w ścianie tętnicy uzyskany przy pomocy wektora AAV [6,61,141,143,204,208,245]. W tym samym modelu eksperymentalnym, użycie wektora Adv z tym samym promotorem CMV prowadziło do wysoce selektywnej i efektywnej transdukcji > 70% komórek EC warstwy wewnętrznej. Jak oczekiwano, ekspresja genu reporterowego po transdukcji Adv była krótkotrwała, poniżej dwóch tygodni. Natomiast nie uzyskano ekspresji transgenu w warstwie środkowej tętnicy. Najprawdopodobniej bariera anatomiczna w postaci: warstwy komórek EC oraz elastycznej błony wewnętrznej, oddzielającej warstwę wewnętrzną od środkowej naczynia, jest czynnikiem ograniczającym efektywny transfer genów do warstwy środkowej tętnicy przy pomocy wektorów Adv, charakteryzujących się

relatywnie dużym rozmiarem (średnica ok. 100 nm). Ten wniosek jest poparty obserwacjami z niniejszej pracy oraz innych badaczy, iż uraz mechaniczny, uszkodzający warstwę komórek EC i elastyczną błonę wewnętrzną tętnicy, umożliwia penetrację Adv oraz efektywną transdukcję VSMC warstwy środkowej [209,218]. Mały wymiar cząsteczki wektora AAV (około 20 nm) może przynajmniej częściowo tłumaczyć łatwość przenikania tego wektora przez bariery anatomiczne prawidłowego, nieuszkodzonego naczynia i efektywną transdukcję VSMC warstwy środkowej.

Zaskoczeniem może być obserwacja, iż mimo bezpośredniego kontaktu wektora AAV z komórkami śródbłonna warstwy wewnętrznej, efektywność transferu genów do tych komórek jest bardzo niska. Proteoglikan heparanosiarczanowy (HSPG – *heparan sulphate proteoglycan*) odgrywa kluczową rolę jako główny receptor odpowiedzialny za wnikanie AAV do komórek docelowych [234]. Wyniki wcześniejszych badań własnych wykazały, iż macierz pozakomórkowa związana z EC jest bardzo bogata w HSPG. W warunkach eksperymentalnych udowodniono, iż HSPG obecny w macierzy pozakomórkowej EC może efektywnie konkurować z HSPG na powierzchni komórek EC o wiązanie cząstek AAV i uniemożliwiać wnikanie wektora do wnętrza tych komórek [185]. Zjawisko to, przynajmniej w części, może odpowiadać za obserwowaną *in vivo* niską efektywność transferu genów do komórek EC przy pomocy wektora AAV. Niedawno opublikowane przez *Nicklin i wsp.* wyniki eksperymentów, polegających na inkorporacji do kapsydu wektora AAV cząstek specyficznych ligandów peptydowych, wyizolowanych metodą *phage display*, umożliwiły efektywną i wysoce selektywną transdukcję komórek EC [171]. Z doniesienia tego wyniku, iż przynajmniej częściowe uniezależnienie wnikania wirusa od receptora HSPG poprzez zastosowanie innych ligandów specyficznych dla EC, znacznie zwiększa efektywność transferu do tych komórek. Potwierdza to wysunięte przez naszą grupę wnioski dotyczące ważnej roli HSPG w macierzy pozakomórkowej natywnych komórek EC w limitowaniu efektywności transdukcji przy pomocy wektorów AAV [185].

W niniejszym badaniu wykazano obecność wysoce efektywnej ekspresji transgenu czwartego dnia po transferze genów do ściany tętnicy przy pomocy wektora Adv. Jednak 10 dni później nie obserwowano nawet pojedynczej komórki wykazującej ekspresję genu reporterowego. Tego typu krótki czas trwania ekspresji jest charakterystyczny dla Adv oraz innych wektorów nieposiadających właściwości integracji z genomem komórki docelowej [72,74,228,252].

Obserwowany we wczesnej fazie po transferze wektorem AAV maksymalny poziom ekspresji genu reporterowego w komórkach śródbłonna czwartego dnia, następnie jego redukcja 21 dnia oraz całkowity zanik 42 dnia mogą sugerować charakter episomalny ekspresji. Mechanizm ten może odpowiadać także za istotną redukcję poziomu ekspresji genu reporterowego w komórkach mięśni gładkich warstwy środkowej tętnicy obserwowaną 42 dnia po transdukcji AAV.

Uzyskane wyniki doświadczeń porównujących efektywność transferu przy użyciu różnych dawek wirusa sugerują, iż poziom tej krótkotrwałej ekspresji może zależeć od liczby kopii wektora wprowadzonej do komórek docelowych. Natomiast wykazany w niniejszym badaniu długotrwały do 100 dni, stabilny poziom ekspresji w komórkach VSMC związany jest najprawdopodobniej z integracją transgenów do genomu komórek docelowych. Porównywalna liczba komórek wykazujących ekspresję transgenów w obserwacji długotrwałej niezależna od dawki wektora, może sugerować, iż proces integracji może nie być bezpośrednio uwarunkowany pierwotną liczbą kopii wirusa wnikających do VSMC. Dokładny mechanizm integracji transgenów przez wektory AAV jest nadal nieznan [152, 158]. Poznanie natury tego procesu prowadzącego do długotrwałej ekspresji transgenów jest niezwykle ważne przede wszystkim ze względów bezpieczeństwa potencjalnej terapii.

Wyniki tego badania po raz pierwszy w bezpośrednim porównaniu wektorów AAV i Adv udokumentowały brak zarówno ostrej jak i przewlekłej istotnej odpowiedzi zapalnej w przypadku transferu genów do ściany tętnicy przy zastosowaniu wektora AAV. W sposób szczegółowy określono charakter komórkowego nacieku, ostrą toksyczość oraz przewlekający się lokalny odczyn zapalny, proliferację komórkową i patologiczny rozrost warstwy wewnętrznej indukowane przez wektory Adv. Oryginalnym wynikiem tego badania jest również wykazanie niewielkiego, ale istotnego statystycznie w porównaniu do tętnic traktowanych placebo wzrostu ekspresji VCAM-1 i wzrostu liczby proliferujących komórek EC we wczesnej fazie po transferze wektorem AAV. Należy jednak podkreślić, iż zarówno ekspresja VCAM-1, jak i wzrost liczby dzielących się EC, były zjawiskiem krótkotrwałym i były istotnie niższe w porównaniu do obserwowanych w tętnicach transdukowanych Adv. W porównaniu z tętnicami poddanymi transferowi przy pomocy Adv w ścianie tętnic transdukowanych AAV stwierdzano niewielki i szybko przemijający komórkowy odczyn zapalny porównywalny z obserwowanym w naczyniach traktowanych placebo. W szczególności nie wykazano obecności przewlekłego nacieku limfocytów T, opisanego przez *Richter i wsp.* [204]. Zaobserwowano natomiast, obecność niewielkiego przyrostu grubości błony wewnętrznej. Nie różnił się on jednak znamienne od wykazanego w tętnicach traktowanych placebo oraz był ograniczony do jednej-dwóch warstw komórek i dotyczył poniżej 20% obwodu światła naczynia. Zjawisko to można tłumaczyć niewielkim uszkodzeniem warstwy EC oraz nieznacznym nasileniem proliferacji komórkowej we wczesnym okresie po transferze przy pomocy AAV. Nie można również wykluczyć z całą pewnością uszkodzeń EC związanych z samą procedurą chirurgiczną wewnątrznaczyniowego transferu genów.

W badaniu tym wykazano istotne różnice między wektorami AAV i Adv, które z pewnością mają duże znaczenie, zarówno w badaniach eksperymentalnych transferu genów do ściany tętnic, jak i dla ich potencjalnych zastosowań w terapii genowej. Po pierwsze, różnice w tropizmie wektorów AAV do VSMC

i Adv do EC wyraźnie widoczne w przypadku transdukcji tętnic nieuszkodzonych, umożliwiając preferencyjny, wysoce specyficzny transfer genów do tych typów komórek. Uzyskane wyniki wskazują, iż użycie wektorów AAV pozwala na efektywny transfer genów do VSMC warstwy środkowej naczynia bez potrzeby mechanicznego uszkodzenia barier anatomicznych. Ta obserwacja wydaje się szczególnie ważne ze względu na kluczową rolę jaką odgrywają komórki VSMC w procesach: rozrostu błony wewnętrznej w miażdżycy tętnic, nawrocie zwężenia po zabiegach angioplastyki i implantacji stentów naczyniowych oraz w degeneracji przęseł żylnych po zabiegach przeszłowania aortalno-wieńcowego i zabiegach chirurgii naczyniowej [42,99,148,213,219]. Dlatego właśnie VSMC są bardzo atrakcyjnymi komórkami docelowymi dla terapii genowej schorzeń układu krążenia. Dodatkowo, transfer genów do nieuszkodzonej ściany tętnicy może być bardzo przydatny dla badania potencjalnych właściwości terapeutycznych wybranych genów w badaniach eksperymentalnych i przedklinicznych terapii genowej [72,74]. Po drugie, różnice w czasie trwania efektywnej ekspresji transgenu po transferze przez AAV i Adv mogą zostać wykorzystane w celu uzyskania różnych zarówno eksperymentalnych, jak i terapeutycznych efektów. Ekspresja genów po transferze przy pomocy Adv jest krótkotrwała (< 2 tygodnie). Jest to najprawdopodobniej zbyt krótki okres czasu, by uzyskać efekt terapeutyczny w przypadku schorzeń przewlekle uszkodzających naczynia. Jednakże przemijająca ekspresja może okazać się użyteczna, a nawet wskazana w pewnych sytuacjach związanych np. z badaniem właściwości terapeutycznych genów w modelach eksperymentalnych lub zastosowań terapeutycznych w schorzeniach ostrych o potencjalnie szybko odwracalnej przyczynie, jak prewencja ostrej zakrzepicy naczyniowej, czy zapobieganie nawrotowi zwężenia po zabiegach na tętnicach. Długotrwale utrzymująca się ekspresja po transdukcji AAV może znaleźć zastosowanie w leczeniu schorzeń o przebiegu przewlekłym, takich jak: miażdżycy tętnic, degeneracja przęseł żylnych i arteriopatia wieńcowa w przeszczepionym sercu. Po trzecie, należy uwzględnić istotne różnice w indukcji ostrej i przewlekłej lokalnej odpowiedzi zapalnej przy wyborze wektora dla aplikacji eksperymentalnej, a zwłaszcza dla zastosowania w terapii. Wektory Adv, jak wykazano w prezentowanym badaniu oraz jak wykazali wcześniej inni badacze, powodują istotne ostre uszkodzenie naczynia, przedłużającą się w czasie aktywację komórek naczyniowych, zapalenie i patologiczny rozrost warstwy wewnętrznej [170,217,218]. W przeciwieństwie do Adv wektory AAV wydają się być niepatogenne i nietoksyczne dla ściany tętnic, powodują subtelną i krótkotrwałą lokalną odpowiedź immunologiczną ustroju [276].

W przypadku wektorów AAV należy nadal brać pod uwagę niezwykle ważne aspekty związane z bezpieczeństwem ich stosowania. Do najistotniejszych należy nie do końca sprecyzowane jeszcze ryzyko mutagenezy związane z losową integracją materiału genetycznego wektora z genomem komórki docelowej [72,74,168,244]. Obawę wzbudza również ryzyko odpowiedzi humoralnej związanej z wysoką częstością występowania w populacji ludzkiej przeciwciał skier-

rowanych przeciwko dzikim wirusom AAV [21,191]. Niezwykle ważne jest również poznanie wszystkich potencjalnych konsekwencji długotrwałej ekspresji danego transgenu.

### **Wnioski:**

1. Zarówno wektory AAV jak i Adv są skutecznymi i efektywnymi narzędziami transferu genów do ściany tętnic.
2. Istnieją istotne różnice w typie transdukowanych komórek ściany tętnicy oraz w czasie trwania ekspresji transgenu między porównywanymi systemami wektorów. Transfer przy pomocy wektora AAV do ściany prawidłowej tętnicy prowadzi do długotrwałej (do 100 dni) ekspresji transgenu w komórkach mięśni gładkich warstwy środkowej. Natomiast transfer przy pomocy wektora adenowirusowego do prawidłowej tętnicy prowadzi do krótkotrwałej (poniżej 14 dni) ekspresji wyłącznie w komórkach śródbłonna.
3. Szczególnie korzystną przewagą wektorów AAV nad Adv jest brak indukcji istotnej odpowiedzi zapalnej.
4. Zróżnicowane właściwości obu typów wektorów mogą zostać efektywnie wykorzystane dla różnych celów eksperymentalnych i terapii genowej.

#### ***Transfer genów do ściany tętnicy przy pomocy wektora AAV zawierającego gen reporterowy pod kontrolą promotora Tie-1 nie prowadzi do komórkowo-swoistej ekspresji w komórkach śródbłonna***

Prowadzenie badań dotyczących biologii naczyń oraz potencjalne leczenie różnych stanów patologicznych układu sercowo-naczyniowego metodami terapii genowej zwykle wymaga osiągnięcia efektywnej ekspresji transgenu ograniczonej lokalnie do danego rodzaju tkanki lub typu komórek [72,74,272]. Osiągnięcie pożądanego efektu biologicznego w badaniach eksperymentalnych lub skutecznego efektu leczniczego w terapii genowej często uwarunkowane jest potrzebą zróżnicowania komórek docelowych. Ponadto, zdolność specyficznego kierowania transferu genów do wybranego typu komórek, może być istotnym mechanizmem ograniczającym ryzyko ekspresji transgenu poza tkanką lub narządem docelowym, zapewniając bezpieczeństwo stosowanego leczenia w przypadku systemowego rozsiania wektora [72,74,91,246,272]. Jest to szczególnie ważne w przypadku długotrwałej ekspresji transgenu, którą już obecnie można osiągnąć

przy użyciu wektorów retrowirusowych i lentiwirusowych oraz jak wykazano w niniejszej rozprawie wykorzystując wektory AAV [37,58,136,185,244].

Komórki śródbłonka naczyń krwionośnych stanowią bardzo atrakcyjny obiekt transferu genów zarówno dla celów eksperymentalnych, jak i dla celów leczniczych w terapii genowej [72,74,272]. Poszukiwanie promotorów kontrolujących wybiórczą dla komórek śródbłonka ekspresję genów stanowi ważny kierunek rozwoju wektorów zdolnych do selektywnego zastosowania w terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego oraz w hamowaniu nowotworzenia naczyń w chorobie nowotworowej [72,74,105,123,172,173,262,267,272].

Próba wykorzystania promotora Tie-1 dla komórkowo swoistego transferu genów do komórek EC prawidłowej tętnicy szyjnej królika *in vivo* przy pomocy wektora AAV w niniejszym badaniu nie powiodła się. Wykazano tylko niewielką ekspresję genu reporterowego w komórkach VSMC warstwy środkowej naczynia, istotnie niższą w porównaniu do tętnic transdukowanych wektorem AAV z konstytutywnym promotorem wirusowym CMV. Ten zaskakujący wynik uzyskano mimo bardzo obiecujących danych wskazujących na stosunkowo dużą swoistość promotora Tie-1 dla komórek EC w eksperymentach transferu genów w hodowlach śródbłonkowych linii komórkowych *in vitro* [97,123]. Ponadto, analiza ekspresji genów pod kontrolą promotora Tie-1 u myszy transgenicznych *in vivo* wskazywała na selektywną aktywność tego promotora w komórkach śródbłonka, zwłaszcza w okresie embriogenezy oraz angiogenezy związanej z gojeniem ran, nowotworami oraz formowaniem ciała żółtego podczas cyklu menstruacyjnego [82,109,122,124,125,197]. Opisano również efektywną ekspresję ludzkiego hormonu wzrostu pod kontrolą promotora Tie-1 w modelu myszy transgenicznej [97].

Jakie mogą być potencjalne przyczyny braku komórkowo-swoistej ekspresji pod kontrolą promotora Tie-1 w zaprezentowanych doświadczeniach? Po pierwsze, wykorzystane we wcześniejszych doświadczeniach *in vitro* komórki śródbłonkowe linii komórkowych, ze względu na właściwości proliferacyjne wykazują wysoką aktywność promotora Tie-1. Natomiast już wyizolowane natywne komórki EC wykazują w warunkach hodowli *in vitro* znacznie mniejszą aktywność Tie-1 [97]. Co pozwala wnioskować, iż natywne komórki EC o znacznie mniejszych właściwościach proliferacyjnych w porównaniu do komórek typowych linii komórkowych charakteryzuje supresja aktywności Tie-1. Po drugie, w warunkach *in vivo* najwyższą ekspresję Tie-1 we wszystkich naczyniach i sercu stwierdza się w okresie rozwoju układu sercowo-naczyniowego zwierząt [123,125]. Natomiast w organizmach dojrzałych wysoka ekspresja Tie-1 jest stwierdzana tylko w obszarach aktywnej angiogenezy, jak opisano powyżej. Aktywność promotora Tie-1 średniego stopnia wykazano w łożysku naczyniowym płuc i nerek, a bardzo niskiego stopnia w endokardium, naczyniach włosowatych i żylnych mózgu oraz zatokach wątrobowych myszy [123]. Dlatego należy wziąć pod uwagę możliwość braku aktywności promotora Tie-1 w komór-

kach EC tętnicy szyjnej królika. Po trzecie, jest możliwe, że brak jakiegokolwiek ekspresji transgenu w komórkach EC jest spowodowany naturalnym brakiem tropizmu wektora AAV do komórek EC, opisanym w niniejszej rozprawie. Ponadto, promotory komórkowo-swoiste zwykle charakteryzują się niższą aktywnością transkrypcyjną w porównaniu do konstytutywnych promotorów wirusowych, jak użyty dla porównania promotor CMV [72,74]. Dlatego zsumowanie się efektów niskiej aktywności promotora Tie-1 wraz z słabym tropizmem AAV do komórek EC może być powodem braku ekspresji genu reporterowego w komórkach śródbłonna warstwy wewnętrznej tętnic w niniejszym badaniu.

Ważną obserwacją jest wykazanie w niniejszym badaniu ekspresji transgenu w komórkach VSMC warstwy środkowej tętnicy po transferze AAV-Tie-eGFP. Świadczy to o niepełnej swoistości promotora Tie-1 dla komórek EC. Dotychczasowe doniesienia na temat specyficzności promotora Tie-1 dla komórek śródbłonna, oparte na doświadczeniach *in vitro*, były sprzeczne [97,123]. Biorąc pod uwagę poczynione w niniejszym badaniu obserwacje, zastosowanie promotora Tie-1 nie gwarantuje selektywnego transferu genów do EC bez użycia wektora o wysokim powinowactwie do komórek śródbłonna. Wektory AAV poddane odpowiedniej modyfikacji kapsydu mogą istotnie zmienić swój naturalny tropizm i umożliwić efektywną i wysoce selektywną transdukcję komórek EC, jak wykazał *Nicklin i wsp.* [171].

Ostatnio doniesiono o istnieniu związku ekspresji Tie-1 w komórkach EC z siłami przepływu krwi. Opisano indukcję aktywności Tie-1 w miejscach zaburzeń laminarnego przepływu krwi, takich jak: miejsca podziału i odejścia gałęzi naczyniowych, tętniakowate poszerzenia oraz blaszki miażdżycowe, co sugeruje istotną rolę aktywacji Tie-1 w procesach przebudowy naczyń i miażdżycy tętnic [35,196,230]. Dlatego, mimo braku swoistej dla EC ekspresji spod promotora Tie-1 w przedstawionych eksperymentach, wydaje się, iż warto kontynuować badania potencjalnego zastosowania promotora Tie-1 w innych wektorach w celu opracowania metod lokalnie ukierunkowanej terapii genowej w układzie naczyniowym.

#### **Wniosek:**

5. Transfer genu reporterowego przy pomocy wektora AAV z promotorem Tie-1 nie prowadzi do komórkowo swoistej ekspresji w komórkach śródbłonna, natomiast wykazuje aktywność transkrypcyjną w komórkach mięśni gładkich warstwy środkowej tętnicy szyjnej królika *in vivo*.

***Zastosowanie inhibitora proteosomalnego MG-132 nie prowadzi do poprawy efektywności transferu genów do ściany tętnicy szyjnej królika przy użyciu wektorów AAV***

Efektywność transferu genów często rozstrzyga o osiągnięciu pożądanego efektu biologicznego w badaniach eksperymentalnych lub leczniczego w terapii genowej [72,74]. Wektory AAV, ze względu na długotrwałą ekspresję oraz brak indukcji istotnego odczynu zapalnego, jak wykazano we wcześniejszych rozdziałach, są jednymi z najbardziej obiecujących systemów transferu genów do ściany tętnic. Dlatego dążenie do maksymalizacji efektywności tych wektorów ma bardzo duże znaczenie dla potencjalnego zastosowania AAV w terapii.

Mimo obiecujących wyników eksperymentów przeprowadzonych na komórkach śródbłonkowych w warunkach hodowli *in vitro* [171,185], nie udało się wykazać w niniejszej pracy skuteczności zastosowania inhibitora aktywności proteosomalnej MG-132 dla zwiększenia efektywności wewnątrznaczyniowego transferu genów do ściany prawidłowej tętnicy szyjnej królika przy pomocy wektora AAV z promotorem CMV lub Tie-1. W przypadku komórek EC wskazuje to na innego rodzaju niż inaktywacja wirusa przez system ubikwityna-proteosom mechanizm oporności na transdukcję AAV. Co dodatkowo potwierdza wysuniętą na podstawie wcześniejszych badań własnych teorię o zasadniczym znaczeniu obecności proteoglikanu heparanosiarczanowego (HSPG) w macierzy okołokomórkowej EC jako podstawowego mechanizmu ograniczającego efektywność transdukcji tego typu komórek *in vivo* [185]. Należy także zwrócić uwagę, iż MG-132 zwiększa efektywność transferu AAV w doświadczeniach *in vitro* w znacznie większym stopniu w komórkach śródbłonkowych linii komórkowych nieposiadających bogatej w HSPG macierzy okołokomórkowej niż w natywnych komórkach śródbłonka zawierających duże ilości HSPG związane z błoną komórkową [185]. Dlatego można się teoretycznie spodziewać, że dopiero po przełamaniu bariery związanej z utrudnionym wiązaniem się AAV z receptorem HSPG na błonie komórkowej EC *in vivo*, zastosowanie inhibicji układu proteosomalnego ma szansę na dodatkowe zwiększenie efektywności transferu genów przy pomocy wektorów AAV.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż efektywność transdukcji komórek VSMC warstwy środkowej tętnicy szyjnej królika przez AAV nie jest zależna od aktywności mechanizmów proteosomalnych. Potwierdza to obserwacja braku wpływu MG-132 na efektywność transferu genu reporterowego do komórek VSMC warstwy środkowej tętnicy, zarówno w przypadku stosunkowo wydajnej transdukcji przy pomocy AAV z promotorem CMV jak i znacznie mniej efektywnej przy zastosowaniu promotora Tie-1. Biorąc pod uwagę doniesienia braku znaczenia hamowania układu proteosomalnego dla efektywności transferu AAV do komórek mięśni szkieletowych oraz mięśnia sercowego [47], można wysunąć hipotezę, iż prawdopodobnie mechanizm



efektywnej transdukcji naczyńniowych komórek mięśni gładkich przez wektory AAV jest również niezależny od wewnątrzkomórkowego układu ubikwityna-proteosom. Hipoteza ta wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo*.

Należy zaznaczyć, iż mimo dużego postępu jaki się dokonał w ostatnich latach, w związku z narastającym zainteresowaniem AAV jako wektorem dla transferu genów, nadal istnieje wiele kontrowersji na temat wewnątrzkomórkowych losów AAV oraz mechanizmu udziału wewnątrzkomórkowego układu ubikwityna-proteosom w procesie transdukcji. Nie wiadomo, dlaczego inhibitory układu proteaz proteosomalnych są efektywne tylko w pewnych typach komórek lub jak w przypadku komórek nabłonka oddechowego tylko w przypadku transferu AAV od szczytowego bieguna komórki. Wysłunięto dwie hipotezy. Według pierwszej z nich, w komórkach podatnych na działanie inhibitorów układu proteaz proteosomalnych, wektor ulega degradacji w mechanizmie aktywacji enzymów proteosomalnych. Według drugiej koncepcji wewnątrzkomórkowa droga AAV na skutek ubikwitynacji ulega zaburzeniu i wirus zostaje przekierowany do kompartmentu komórkowego, gdzie nie może ulegać ekspresji [46,47,270]. Wydaje się, iż układ ubikwityna-proteosom może odgrywać rolę pierwotnego systemu obrony komórek przed infekcją wirusową.

Do ważnych wyników tego badania należy stwierdzenie braku istotnych lokalnych zmian toksycznych oraz zapalnych w ścianie tętnic poddanych transdukcji AAV w obecności MG-132. Obserwowano tylko nieznacznie wyższą liczbę leukocytów w warstwie wewnętrznej oraz makrofagów w przydanie tętnic poddanych transferowi AAV z użyciem MG-132 w porównaniu z tętnicami poddanymi działaniu placebo. Wartości te nie różniły się jednak istotnie od obserwowanych w naczyniach poddanych transferowi AAV bez użycia MG-132.

#### **Wnioski:**

6. Nie wykazano skuteczności inhibitora aktywności proteosomalnej MG-132 dla zwiększenia efektywności transferu genów do ściany prawidłowej tętnicy szyjnej królika przy pomocy wektora AAV z promotorem CMV lub Tie-1 *in vivo*.
7. Zastosowanie MG-132 w czasie transferu genów z użyciem AAV nie powoduje istotnych lokalnych zmian toksycznych lub zapalnych w ścianie tętnicy.
8. Można oczekiwać, że zastosowanie inhibicji układu proteosomalnego ma szansę na dodatkowe zwiększenie efektywności ekspresji w komórkach śródbłonka dopiero po przełamaniu bariery związanej z utrudnionym wiązaniem się AAV z receptorem HSPG w błonie tych komórek *in vivo*.

9. Najprawdopodobniej efektywność transdukcji komórek mięśniówki gładkiej warstwy środkowej tętnicy szyjnej królika przez AAV, podobnie jak innych komórek mięśniowych, nie jest zależna od aktywności mechanizmów proteosomalnych.

***Transfer genu śródbłonkowego czynnika wzrostowego naczyń typu D przy pomocy wektora adenowirusowego do ściany prawidłowej i poddanej urazowi tętnicy szyjnej królika***

Wykorzystanie stentów uwalniających lokalnie w miejscu urazu tętnicy środkowej silnie hamujące proliferację komórek naczyniowych mięśni gładkich istotnie zredukowało ryzyko nawrotu zwężenia po zabiegach angioplastyki tętnic wieńcowych w ostatnim czasie [161,203,227]. Jednak zastosowane substancje o działaniu silnie cytostatycznym hamują również proliferację komórek EC, opóźniając proces gojenia tętnicy po implantacji stentu, co może sprzyjać zwiększeniu ryzyka miejscowych powikłań zakrzepowych [99,120,153]. Dlatego nadal korzystną opcją może być terapia, której celem jest szybkie odtworzenie integralności komórek warstwy śródbłonka po urazie tętnicy, co jak wykazano w badaniach eksperymentalnych, istotnie redukuje ryzyko nawrotu zwężenia, związane z proliferacją VSMC i zawału serca wynikającego z lokalnej zakrzepicy [51,119]. Głównym obiektem zainteresowania stały się śródbłonkowe czynniki wzrostowe naczyń o silnym mitogennym działaniu na EC. Rekombinowany VEGF-A, jak i transfer genu *VEGF-A* metodą śródnaczyniową i do przydanki tętnic, hamowały rozrost warstwy wewnętrznej w tętnicach poddanych urazowi w badaniach na modelach zwierzęcych [8,9,29,133]. Wykazano, iż efekt protekcyjny VEGF-A wynika przede wszystkim z aktywacji receptora VEGFR-2 i indukcji ekspresji NO oraz prostacykliny [133]. W modelu eksperymentalnej restenozы u królika po zastosowaniu transferu genu *VEGF-C*, agonisty receptora VEGFR-2 i VEGFR-3, zaobserwowano istotną redukcję przyrostu grubości warstwy wewnętrznej tętnicy po urazie mechanicznym [90,137].

Konstytutywną ekspresję odkrytego w ostatnich latach VEGF-D opisano w komórkach mięśni gładkich prawidłowych tętnic człowieka, a jej zmniejszenie obserwowano w zaawansowanych zmianach miażdżycowych z obecnością włóknienia [212]. Wiedza na temat znaczenia VEGF-D w biologii naczyń jest jednak jeszcze bardzo ograniczona. Hipotezę naczynioprotekcyjnego działania VEGF-D wysunięto na podstawie silnego działania mitogennego na komórki EC obserwowanego między innymi w badaniach własnych dotyczących indukcji angiogenezy w mięśniu szkieletowym królika i mięśniu sercowym świni [22,206,214]. W badaniach tych potwierdzono aktywność użytego w niniejszym eksperymencie wektora i transgenu w tkankach królika oraz wykazano szczegól-

nie silną aktywność angiogenną formy  $\Delta N\Delta C$  VEGF-D. Forma ta charakteryzuje się 290-krotnie większym powinowactwem do receptora VEGFR-2 w porównaniu do swojego prekursora z zachowanym końcem N i C peptydu [229]. Wiadomo, iż właśnie aktywacja receptora VEGFR-2 odpowiada za większość potencjalnie korzystnych działań naczyniowych, takich jak: indukcja proliferacji EC, stymulowanie angiogenezy, ograniczanie patologicznego rozrostu warstwy wewnętrznej tętnic, zwiększenie przepuszczalności ściany naczyń oraz działanie na endotelialne komórki prekursorowe szpiku [54,133]. Dlatego potencjalne naczynioprotekcyjne działanie VEGF- $D_{\Delta N\Delta C}$ , planowano zbadać w modelu restenozy indukowanej uszkodzeniem tętnicy szyjnej królika. Jednak w 7 dni po transferze genu *VEGF-D $\Delta N\Delta C$*  przy pomocy wektora adenowirusowego do ściany tętnicy poddanej wcześniej urazowi przy pomocy balonu do angioplastyki wieńcowej nie wykazano przyspieszenia procesu odtworzenia integralności warstwy śródbłonna oraz redukcji przyrostu grubości warstwy wewnętrznej (neointymy) w porównaniu do tętnic poddanych transferowi genu *LacZ*. Obserwowano również nieco większą liczbę komórek w fazie podziału zwłaszcza w warstwie wewnętrznej i środkowej w uszkodzonych tętnicach poddanych transferowi *VEGF-D $\Delta N\Delta C$* , co może tłumaczyć nieistotną statystycznie tendencję do większego przyrostu warstwy wewnętrznej i do wyższego wskaźnika intima/media w tych naczyniach.

W ostatnim czasie zaczęto poddawać w wątpliwość naczynioprotekcyjne działanie najlepiej poznanego śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń, VEGF-A. W opublikowanych badaniach klinicznych nie potwierdzono obserwowanego we wcześniejszych pracach eksperymentalnych ograniczenia częstości i stopnia nawrotu zwężenia po zabiegach na naczyniach wieńcowych i obwodowych po lokalnym transferze genu *VEGF-A* [88,131,146]. Wykazano natomiast wzrost ekspresji VEGF-A oraz jego dwóch podstawowych receptorów VEGFR-1/Flt-1 i VEGFR-2/KDR w zmianach miażdżycowych i w miejscu restenozy po zabiegu angioplastyki balonowej [34,83,100,280]. Kolejne badania na modelach zwierzęcych wskazały na potencjalne właściwości stymulacji rozrostu warstwy wewnętrznej naczynia po lokalnym urazie balonowym oraz promiażdżycowe działanie VEGF-A [33,83,139,280]. Te niekorzystne działania tłumaczy się następującymi ujawnionymi ostatnio właściwościami VEGF-A: 1) indukcją migracji VSMC [188,258], 2) zwiększeniem ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 w ścianie naczynia [118], 3) indukcją migracji i aktywacją monocytów [151], 4) zwiększeniem ekspresji metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej MMP-1 i MMP-9 [256], 5) indukcją lokalnej angiogenezy w blaszkach miażdżycowych powodującą ich progresję [130, 187], 6) stymulacją rekrutacji komórek progenitorowych szpiku biorących udział w rozroście neointymy po urazie naczynia [139,216]. Warto podkreślić, że najprawdopodobniej wszystkie te niekorzystne działania VEGF-A są zależne od receptora VEGFR-1. Wykazano mianowicie, iż blokada działania tego receptora poprzez transfer genu kodującego rozpuszczalny VEGFR-1 (*sVEGFR-1 - soluble*

*VEGFR-1*) istotnie redukuje eksperymentalną restenozę po wewnątrznaczyniowym urazie tętnic [281]. Zaobserwowano lokalne zmniejszenie ekspresji VEGF-A, prozapalnych cytokin; MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, czynnika martwicy guzów- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* , *tumor necrosis factor*) i MMP-9 oraz istotnie mniejszą liczbę monocytów naciekających ścianę naczyń w miejscu urazu. Jednocześnie transfer *sVEGFR-1* nie upośledzał procesu pourazowej reendotelializacji, w związku z mitogennym działaniem VEGF-A na EC poprzez receptor VEGFR-2. Wiadomo, iż właśnie receptor VEGFR-2 mediuje większość pozytywnych działań naczyniowych, takich jak indukcja proliferacji EC, zwiększenie produkcji NO i prostacykliny, stymulowanie angiogenezy oraz działanie na endotelialne komórki prekursorowi szpiku [54,133]. Dlatego VEGF-D $_{\Delta N\Delta C}$ , działający na VEGFR-2 i VEGFR-3, a nieposiadający powinowactwa do receptora VEGFR-1 powinien być pozbawiony negatywnych cech VEGF-A. Ponadto, transfer genu *VEGF-C*, który jest najbardziej zbliżonym budową oraz właściwościami biologicznymi do VEGF-D członkiem grupy śródbłonkowych czynników wzrostowych naczyń, aktywującym wyłącznie receptory VEGFR-2 i VEGFR-3, wykazał działanie naczynioprotekcyjne w dwóch badaniach przeprowadzonych w modelu restenozy aorty królika [90,137]. Ponieważ obecność receptora VEGFR-3 w życiu pozapłodowym stwierdza się wyłącznie w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych oraz miejscach aktywnej angiogenezy związanej przede wszystkim z nowotworami, potencjalne działanie VEGF-C lub D w ścianie dużych tętnic mediowane przez ten receptor można praktycznie wykluczyć [2,54,111]. Stąd efekty naczyniowe działania VEGF-D $_{\Delta N\Delta C}$  w niniejszym badaniu, podobnie jak w przypadku VEGF-C, należy przypisywać aktywacji VEGFR-2, a nie VEGFR-1 i VEGFR-3.

Mimo, że w niniejszym badaniu nie wykazano oczekiwanego przyspieszenia procesu odtworzenia po urazie integralności warstwy komórek EC i hamowania rozwoju neointymy, niektóre uzyskane wyniki mogą jednak wskazywać na potencjalne działanie naczynioprotekcyjne transferu *VEGF-D $_{\Delta N\Delta C}$* . O działaniu naczynioprotekcyjnym świadczyć mogą: zmniejszenie liczby komórek zapalnych, leukocytów i makrofagów, naciekających warstwę wewnętrzną i środkową nieuszkodzonych tętnic poddanych transferowi *VEGF-D $_{\Delta N\Delta C}$* ; zmniejszenie liczby komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej oraz niższą aktywnością MMP-2, MMP-9 i VEGFR-2 w warstwie środkowej i wewnętrznej. Na podstawie wyników własnych prezentowanych we wcześniejszych rozdziałach niniejszej pracy wiadomo, iż sam transfer genów do prawidłowej tętnicy szyjnej królika przy użyciu wektora adenowirusowego jest swoistym urazem wynikającym głównie z intensywnej, lokalnej reakcji zapalnej prowadzącej do zmian morfologicznych typu uszkodzenia integralności warstwy śródbłonka oraz rozwoju neointymy w obserwacji odległej. Dlatego zaobserwowane przeciwzapalne działanie VEGF-D $_{\Delta N\Delta C}$  należy traktować jako potencjalnie bardzo korzystne z punktu widzenia protekcji ściany naczyniowej. Również we wcześniejszych badaniach własnych dotyczących transferu genów do przydanki tętnic szyjnych królika

przy pomocy wektorów adenowirusowych wykazano istotnie mniejszy naciek zapalny po transferze *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>*, *VEGF-D*, *VEGF-C<sub>ΔNΔC</sub>* i *VEGF-C* w porównaniu do *VEGF-A* i *VEGF-B* [22]. Przeciwwzpalne działanie VEGF-D i VEGF-C wykazano ostatnio także w raku piersi, gdzie guzy nowotworowe wykazujące przewagę ekspresji VEGF-D i VEGF-C nad VEGF-A charakteryzowały się niższą liczbą naciekających leukocytów i zmniejszoną ekspresją VCAM-1 [25].

W tętnicach poddanych urazowi, a następnie transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>*, nie wykazano zmniejszenia liczby komórek nacieku zapalnego oraz komórek w fazie podziału w porównaniu z tętnicami transdukowanymi genem kontrolnym *LacZ*. Natomiast podobnie jak w tętnicach prawidłowych, w tętnicach uszkodzonych poddanych transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* w warstwie wewnętrznej i środkowej wykazano tendencję do niższej ekspresji metaloproteinaz MMP-2, MMP-9 i receptora VEGFR-2 w porównaniu do tętnic kontrolnych. Lokalny odczyn zapalny w modelu restenozы uszkodzonej tętnicy szyjnej wynika nie tylko z transferu genów przy pomocy wektora adenowirusowego, jak w przypadku tętnic prawidłowych, ale w znacznym stopniu z urazu mechanicznego uszkadzającego warstwę komórek EC i wewnętrzną błonę elastyczną, co może maskować potencjalne przeciwwzpalne działanie *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>*. Następstwem urazu jest również najprawdopodobniej tendencja do wyższej aktywności MMP-2, MMP-9 i VEGFR-2 w warstwie wewnętrznej i środkowej tętnic uszkodzonych poddanych transferowi genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* i *LacZ* w porównaniu do tętnic prawidłowych [18]. Jednak i w tym przypadku w grupie naczyń transdukowanych *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* stwierdzono tendencję do niższej ekspresji metaloproteinaz i VEGFR-2 w porównaniu do tętnic transdukowanych *LacZ*. MMP-2 i MMP-9 są jednymi z głównych metaloproteinaz, które ulegają wzmożonej ekspresji w zmianach miażdżycowych oraz w miejscu nawrotu zwężenia tętnicy po zabiegu angioplastyki [59,255]. Wykazano ich szczególnie ważną rolę w procesie migracji VSMC z warstwy środkowej do wewnętrznej. Dlatego hamowanie ich ekspresji w ścianie naczynia, jak zostało to udokumentowane w doświadczeniach eksperymentalnych, prowadzi do ograniczenia rozwoju neointimy [248,277].

Zarówno uraz tętnicy, jak i niektóre prozapalne cytokiny, prowadzą do naturalnego wzrostu ekspresji VEGF-A oraz jego receptorów, VEGFR-1 i VEGFR-2 w ścianie tętnicy [34,83,100,222,280]. W prezentowanym doświadczeniu, zgodnie z oczekiwaniami wykazano wzrost ekspresji VEGFR-2 w tętnicach poddanych urazowi mechanicznemu. Transfer genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* do tętnic prawidłowych był związany z istotnie niższą ekspresją VEGFR-2 w porównaniu do ekspresji wykazanej w naczyniach transdukowanych *LacZ*. Również w tętnicach poddanych urazowi mechanicznemu transfer genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* był związany z tendencją do niższej ekspresji VEGFR-2. Ekspresja VEGFR-2 korelowała z ekspresją MMP-2 i MMP-9, zwłaszcza w przypadku tętnic prawidłowych. Można przypuszczać, że wykazane przeciwwzpalne działanie *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>*

prowadzi do obniżenia zaktywowanej urazem ekspresji VEGFR-2 i metaloproteinaz tkankowych w ścianie tętnicy.

Według wiedzy autora jest to pierwsze badanie oceniające wpływ wewnątrznaczyniowego transferu genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* na ścianę tętnicy. We wcześniejszych badaniach wewnątrznaczyniowego transferu genu *VEGF-C*, najbardziej zbliżonego budową oraz właściwościami biologicznymi do VEGF-D członka rodziny VEGF, stopień regeneracji warstwy śródbłonka oraz przyrost warstwy wewnętrznej (neointymy) oceniano znacznie później niż w niniejszym badaniu, bo w 14, 21 i 28 dniu po transferze [90,137]. Nie można wykluczyć, iż ocena tych parametrów w siódmym dniu po transferze w niniejszym badaniu była zbyt wczesna i dlatego niewykazano istotnych różnic między porównywanymi grupami. Ponadto, badania z VEGF-C zostały przeprowadzone w modelu restenozy aorty, a nie tętnicy szyjnej, a do transferu wykorzystano cewnik infuzyjno-perfuzyjny bez przerywania przepływu krwi przez naczynie, co może tłumaczyć rozbieżność wyników.

Uzyskane wyniki, mimo braku oczekiwanego wpływu transferu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* na odbudowę integralności warstwy śródbłonka oraz rozwój neointymy, wskazują na istotne działanie przeciwzapalne transferu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* oraz jego zdolność do redukcji ekspresji metaloproteinaz tkankowych w ścianie tętnicy szyjnej królika. Pozwala to na ostrożny optymizm co do potencjalnego naczynioprotekcyjnego działania VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>. Niewątpliwie konieczne jest kontynuowanie badań w celu pełnego wyjaśnienia mechanizmów obserwowanych zjawisk oraz dalsze badania w modelach zwierzęcych w celu wykazania ewentualnej przydatności klinicznej VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

### Wnioski:

10. Wewnątrznaczyniowy transfer genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* do ściany tętnicy szyjnej królika po urazie mechanicznym nie przyspiesza odtworzenia integralności warstwy śródbłonka oraz nie prowadzi do redukcji przyrostu warstwy wewnętrznej.
11. Transfer genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* do ściany nieuszkodzonej tętnicy prowadzi do redukcji komórkowego odczynu zapalnego i liczby komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej tętnicy, związanych z zastosowaniem wektora adenowirusowego.
12. Transfer genu *VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>* do ściany tętnicy prawidłowej oraz poddanej wcześniejszemu urazowi mechanicznemu prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji receptora VEGFR-2 oraz metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej (MMP-2 i MMP-9) w porównaniu do tętnic poddanych transferowi *LacZ*.

- 
13. Uzyskane wyniki nie wykluczają potencjalnego wykorzystania naczynioprotekcyjnego działania VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>. Konieczne jest jednak kontynuowanie badań w celu pełnego wyjaśnienia mechanizmów obserwowanych zjawisk oraz dalsze badania w modelach zwierzęcych w celu wykazania ewentualnej przydatności klinicznej VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

## 6. PODSUMOWANIE

Badania eksperymentalne i kliniczne dobrze udokumentowały możliwości i bezpieczeństwo transferu genów do układu sercowo-naczyniowego. Pierwsze istotne efekty lecznicze w postaci ograniczenia degeneracji przęseł żylnych i terapeutycznej angiogenezy udokumentowano w badaniach klinicznych. Jednak terapia genowa chorób układu sercowo-naczyniowego pozostaje nadal eksperymentalną metodą leczenia, stosowaną tylko w ramach badań klinicznych. Zanim zostaną osiągnięte lepsze efekty terapeutyczne, trzeba rozwiązać wiele problemów, takich jak: niska efektywność transferu genów zwłaszcza do naczyń krwionośnych, krótkotrwała ekspresja przy zastosowaniu wektorów nieintegrujących, brak kontroli poziomu i czasu trwania ekspresji, czy ucieczka wektora poza obszary docelowe transferu. Dlatego tak ważny jest rozwój nowych wektorów, metod transferu oraz specyficznych i regulowanych układów ekspresyjnych. Rozwój wiedzy na temat molekularnego podłoża chorób układu krążenia oraz poznanie struktury i funkcji naszego genomu pozwala na identyfikację nowych genów o potencjale terapeutycznym i wprowadzenie nowych protokołów terapii genowej, takich jak: terapia skojarzona, czy sekwencyjna. Przedmiotem prezentowanej rozprawy są badania dotyczące wzbudzających wiele nadziei i zainteresowania wektorów AAV. Po raz pierwszy porównano w tym samym modelu eksperymentalnym wewnątrznaczyniowy transfer genów przy pomocy wektorów AAV i wektorów adenowirusowych do ściany tętnicy *in vivo*. Ponadto, po raz pierwszy zbadano możliwość komórkowo-swoistego transferu genów do komórek śródbłonna przy pomocy wektora AAV z promotorem Tie-1 oraz możliwość zastosowania inhibitora enzymów proteosomalnych MG-132 dla zwiększenia efektywności transferu genów do ściany tętnic przy pomocy wektora AAV. Dotychczas niepodejmowanym zagadnieniem były również potencjalne właściwości naczynioprotekcyjne mało poznanego VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>. Eksperymenty wewnątrznaczyniowego transferu genów do ściany prawidłowej i poddanej urazowi tętnicy przeprowadzono w modelu tętnicy szyjnej królika *in vivo*.

Uzyskane wyniki wskazują, iż wektory AAV, podobnie jak Adv, są skutecznymi i efektywnymi narzędziami transferu genów do ściany tętnic przy czym istnieją istotne różnice w typie transdukowanych komórek oraz w czasie trwania ekspresji transgenu między porównywanymi systemami wektorów. Wektory AAV efektywnie transdukuje komórki VSMC warstwy środkowej tętnicy, mimo zachowania integralności warstwy komórek EC i elastycznej błony wewnętrznej. Natomiast wektory te są mało skuteczne w transferze genów do EC. Wektory Adv wysoce efektywnie transdukuje komórki EC warstwy wewnętrznej tętnicy prawidłowej. Dla efektywnego transferu genów do VSMC warstwy środkowej wektory Adv wymagają uszkodzenia warstwy EC i elastycznej błony wewnętrznej. Do szczególnie korzystnych cech wektorów AAV, wykazanych w niniejszej pracy, należy długotrwała ekspresja transgenu bez indukcji istotnej odpowiedzi



zapalnej. Według wiedzy autora czas trwania ekspresji transgenu w ścianie tętnicy po transferze przy pomocy wektora AAV wykazany w niniejszej pracy jest najdłuższym opisanym do tej pory. Natomiast wektory Adv charakteryzują się krótkotrwałą ekspresją transgenu (poniżej 14 dni) oraz indukcją istotnego odczynu zapalnego i zmian patologicznych naczyń.

Próba uzyskania komórkowo swoistego transferu genów do EC przy pomocy wektora AAV nie powiodła się. Transfer genu reporterowego przy pomocy wektora AAV z promotorem Tie-1 nie prowadzi do komórkowo swoistej ekspresji w komórkach śródbłonna tętnicy szyjnej królika, natomiast promotor Tie-1 wykazuje aktywność transkrypcyjną w komórkach VSMC warstwy środkowej tętnicy. Również próba zwiększenia efektywności wektorów AAV w transferze genów do ściany tętnicy przy pomocy hamowania aktywności enzymów proteosomalnych zakończyła się niepowodzeniem. Zastosowanie inhibitora aktywności proteosomalnej MG-132 nie prowadzi do zwiększenia efektywności transferu genów do ściany prawidłowej tętnicy przy pomocy wektora AAV z promotorem CMV i Tie-1. Najprawdopodobniej efektywność transdukcji komórek VSMC warstwy środkowej tętnicy szyjnej królika przez AAV, podobnie jak innych komórek mięśniowych, nie jest zależna od aktywności mechanizmów proteosomalnych. Po zastosowaniu MG-132 w czasie transferu genów z użyciem AAV nie obserwowano istotnych lokalnych zmian toksycznych oraz zapalnych w ścianie tętnicy.

Wyniki badań dotyczących naczynioprotekcyjnego działania  $VEGF-D_{\Delta N\Delta C}$  wykazały, że wewnątrznaczyniowy transfer genu  $VEGF-D_{\Delta N\Delta C}$  do ściany tętnicy po urazie balonowym nie przyspiesza odtworzenia integralności warstwy śródbłonna oraz nie prowadzi do redukcji przyrostu warstwy wewnętrznej ocenianych siedem dni po transferze. Jednak zaobserwowano, iż transfer genu  $VEGF-D_{\Delta N\Delta C}$  do ściany nieuszkodzonej tętnicy prowadzi do redukcji komórkowego odczynu zapalnego i liczby komórek proliferujących w warstwie wewnętrznej tętnicy. Ponadto transfer genu  $VEGF-D_{\Delta N\Delta C}$  tak do ściany prawidłowej, jak i poddanej wcześniejszemu urazowi mechanicznemu tętnicy prowadzi do niższej ekspresji receptora VEGFR-2 oraz metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej (MMP-2 i MMP-9) w porównaniu do tętnic poddanych transferowi genu *LacZ*.

Uzyskane wyniki wskazujące na istotne różnice między wektorami AAV i Adv z pewnością mają duże znaczenie zarówno dla przyszłych badań eksperymentalnych transferu genów do ściany tętnic, jak i dla potencjalnych zastosowań tych wektorów w terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego. Wyniki badań dotyczących transferu genu  $VEGF-D_{\Delta N\Delta C}$  do ściany tętnicy częściowo potwierdzają naczynioprotekcyjne działanie tego czynnika. Konieczne jest jednak kontynuowanie badań w celu pełnego wyjaśnienia mechanizmów obserwowanych zjawisk oraz dalsze badania w modelach eksperymentalnych w celu

wykazania ewentualnej przydatności klinicznej VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

## 7. SUMMARY

Gene therapy is a novel rapidly evolving field of medicine, which potentially offers new treatments for cardiovascular diseases. With the use of gene transfer methods it is possible to modify somatic cells in vascular wall or myocardium to overexpress or inhibit pathologically important proteins and achieve therapeutic effects. Prevention and treatment of atherosclerosis, prevention of restenosis after vascular interventions such as percutaneous coronary angioplasty (PTCA), percutaneous peripheral angioplasty (PTA) or stent implantation, prevention of venous grafts failure and therapeutic angiogenesis are the major aims of experimental studies and clinical gene therapy. The promise of gene therapy in the treatment of cardiovascular diseases remains high. Experimental studies have well established the proof of principle that gene transfer to cardiovascular system can achieve therapeutic effects. First human clinical trials provided the initial evidence of feasibility and safety of the novel therapy. There are also first successful reports on the prevention of neointimal hyperplasia and promotion of therapeutic angiogenesis in clinical trials. However, there are still important questions regarding efficiency, utility, and safety of gene transfer in the treatment of diverse cardiovascular diseases. Therefore, there is great interest in developing optimal strategies and vectors for efficient, targeted gene delivery into a vessel wall.

The major aims of the present study were:

1. Investigation of the novel adeno-associated viruses (AAV) for their usefulness to transduce rabbit arteries *in vivo* in comparison to adenoviral vectors (Adv).
2. Evaluation of the utility of Tie-1 promoter for the AAV-mediated cell type-specific gene transfer to endothelial cells (EC) of rabbit carotid artery *in vivo*.
3. Testing the potential utility of MG-132 proteasome inhibitor (Z-LLL- carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) for increasing the efficiency of intravascular AAV-mediated gene transfer to normal rabbit carotid artery *in vivo*.
4. Evaluation of the potential protective role of the local, intravascular VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> gene transfers to normal and balloon injured rabbit carotid arteries mediated by adenoviral vectors *in vivo*.

All presented studies were performed in Department of Biotechnology and Molecular Medicine, A.I. Virtanen Institute, University of Kuopio led by Prof. Seppo Ylä-Herttua. All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Kuopio. About 100 μl of viruses (AAV-

CMV-eGFP, AAV-Tie1-eGFP, Adv-CMV-LacZ, Adv-CMV-VEGF- $D_{\Delta N\Delta C}$ ) or placebo solution (0.9% NaCl) were injected intraluminally into transiently isolated normal or balloon injured carotid artery segments of New Zealand White rabbits *in vivo*. At the end of the experiment rabbits were anaesthetized and heparinized, and both left and right carotid arteries were exposed and harvested for the analysis. Gene transfer efficacy was scored separately in endothelium, intima, media and adventitia by counting the number of eGFP- or  $\beta$ -gal-positive cells per cross-section. Morphology and presence of inflammation after the AAV or the Adv gene transfers and the mock treatment were determined using hematoxylin-eosin (H&E) staining and specific immunostainings.

In normal arteries AAV transduced mainly medial smooth muscle cells (VSMC) while Adv transduced exclusively endothelial cells (EC). Mechanical injury to EC layer and internal elastic lamina enabled Adv to penetrate and transduce medial VSMC. Transgene expression in EC after the AAV-mediated gene transfer was very low. Transgene expression in VSMC persisted for at least 100 days after the AAV treatment whereas Adv-mediated effect diminished in 14 days. AAV caused only a modest increase in EC VCAM-1 expression and proliferation rate of vascular cells as compared to the mock-treated arteries while Adv caused an extensive inflammatory cell infiltration, VCAM-1 expression, vascular cell proliferation and morphological damages.

The eGFP reporter gene expression was compared after AAV-Tie1-eGFP and AAV-CMV-eGFP intraluminal gene transfers to normal rabbit carotid arteries. Low transgene expression was detected in vascular smooth muscle cells (VSMC) in media and no expression was present in EC and in adventitia after AAV-Tie-eGFP gene transfer. Gene expression in VSMC was significantly lower in comparison with the expression after AAV-CMV-eGFP gene transfer.

The efficiency of AAV-CMV-eGFP and AAV-Tie-eGFP gene transfers with or without the use of 40mM MG-132 were compared. The Mg-132 did not lead to the increase in the numbers of efficiently transduced vascular cells 21 and 42 days after AAV gene transfers with either CMV or Tie-1 promoter. However, there were no significant toxic changes and inflammatory infiltrates present in histologically analyzed arterial segments after AAV gene transfer with the use of MG-132.

To test the potential protective role of VEGF- $D_{\Delta N\Delta C}$  the results of local, intravascular VEGF- $D_{\Delta N\Delta C}$  and LacZ gene transfers to normal and balloon injured rabbit carotid arteries mediated by adenoviral vectors were compared. The VEGF- $D_{\Delta N\Delta C}$  gene transfer did not accelerate the reendothelisation and did not prevent the neointima formation in injured arteries. However, the VEGF- $D_{\Delta N\Delta C}$  gene transfer to normal arteries led to the significant decrease in local inflammatory cell infiltrates in vascular wall and to significant decrease in the number of proliferating cells in intima compared to LacZ treated arteries. Moreover, the

---

VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> gene transfer to normal and injured arteries was associated with decrease in matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and VEGFR-2 expression.

In conclusion, significant differences were observed between the AAV and the Adv vectors in their patterns of arterial transduction and consequent inflammatory responses after intravascular gene transfer to rabbit carotid artery *in vivo*. These distinct properties may be utilized for different experimental protocols of gene transfer and gene therapy applications for the treatment of cardiovascular diseases. There is some optimism in regard to the potential vasculo-protective properties of VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub>, however the precise mechanism of observed phenomena and potential clinical utility of VEGF-D<sub>ΔNΔC</sub> in cardiovascular gene therapy requires future research. Unfortunately, the Tie-1 promoter did not result in specific transgene expression in endothelial cells and the use of the MG-132 proteasome inhibitor did not lead to the increase in AAV mediated gene transfer efficiency to normal rabbit arteries with the CMV or Tie1 promoter.

## 8. PIŚMIENICTWO

1. Aase K., Lymboussaki A., Kaipainen A., Olofsson B., Alitalo K., Eriksson U. Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn.* 1999, 215, 12-25.
2. Achen M.G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A.F., Alitalo K., Stacker S.A. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998,95,548-53.
3. Airene K.J., Hiltunen M.O., Turunen M.P., Turunen A.M., Laitinen O.H., Kulomaa M.S., Yla-Herttuala S. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* 2000,7,1499-504.
4. Anderson W.F., Fletcher J.C.. Gene therapy in human beings: When is it ethical to begin? *New Engl. J. Med.* 1980,303,1293-7.
5. Anderson W.F. Human Gene Therapy: The Initial Concepts. w: Gene Therapy for Diseases of the Lung, Brigham K.L., red, Marcel Dekker, Inc. 1997,3-16.
6. Arnold T.E., Gnatenko D., Bahou W.F. In vivo gene transfer into rat arterial walls with novel adeno-associated virus vectors. *J. Vasc. Surg.* 1997,25,347-55.
7. Arsic N., Zentilin L., Zacchigna S., Santoro D., Stanta G., Salvi A., Sinagra G., Giacca M. Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors. *Mol. Ther.* 2003,7,450-9.
8. Asahara T., Bauters C., Pastore C., Kearney M., Rossow S., Bunting S., Ferrara N., Symes J.F., Isner J.M. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation.* 1995,91,2793-801.
9. Asahara T., Chen D., Tsurumi Y., Kearney M., Rossow S., Passeri J., Symes J.F., Isner J.M. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation.* 1996,94,3291-302.
10. Autiero M., Waltenberger J., Communi D., Kranz A., Moons L., Lambrechts D., Kroll J., Plaisance S., De Mol M., Bono F., Kliche S., Fellbrich G., Ballmer-Hofer K., Maglione D., Mayr-Beyrle U., Dewerchin

- M., Dombrowski S., Stanimirovic D., Van Hummelen P., Dehio C., Hicklin D.J., Persico G., Herbert J.M., Communi D., Shibuya M., Collen D., Conway E.M., Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003, 9, 936-43.
11. Avantiaggiato V., Orlandini M., Acampora D., Oliviero S., Simeone A. Embryonic expression pattern of the murine figf gene, a growth factor belonging to platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Mech. Dev.* 1998,73,221-4.
  12. Bainbridge J.W., Mistry A., Binley K., De Alwis M., Thrasher A.J., Naylor S., Ali R.R. Hypoxia-regulated transgene expression in experimental retinal and choroidal neovascularization. *Gene Ther.* 2003,10,1049-54.
  13. Baker A.H. Designing gene delivery vectors for cardiovascular gene therapy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004,84,279-99.
  14. Barbato J.E., Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 2004,40,187-93.
  15. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Kearney M., Walsh K., Isner J.M. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* 1998;97:1114-23.
  16. Bekerredjian R., Chen S., Frenkel P.A., Grayburn P.A., Shohet R.V. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation.* 2003,108,1022-6.
  17. Bellomo D., Headrick J.P., Silins G.U., Paterson C.A., Thomas P.S., Gartside M., Mould A., Cahill M.M., Tonks I.D., Grimmond S.M., Townson S., Wells C., Little M., Cummings M.C., Hayward N.K., Kay G.F. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ. Res.* 2000 Feb. 4,86(2),E29-35.
  18. Bendeck M.P., Irvin C., Reidy M.A. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ. Res.* 1996,78,38-43.
  19. Benoit P., Emmanuel F., Caillaud J.M., Bassinet L., Castro G., Gallix P. et al. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999,99,105-10.
  20. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2003,3,401-10.

21. Bessis N., GarciaCozar F.J., Boissier M.C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 2004,11 Suppl. 1,S10-7.
22. Bhardwaj S., Roy H., Gruchala M., Viita H., Kholova I., Kokina I., Achen M.G., Stacker S.A., Hedman M., Alitalo K., Yla-Herttuala S. Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. *Hum. Gene Ther.* 2003,14,1451-62.
23. Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P., Greenblatt J.J., Rosenberg S.A., Klien H., Berger M., Muller C.A., Ramsey J.W., Muul L., Morgan R.A., Anderson W.F. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA deficiency SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995,270,475-80.
24. Bonci D., Cittadini A., Latronico M.V., Borello U., Aycock J.K., Drusco A., Innocenzi A., Follenzi A., Lavitrano M., Monti M.G., Ross J. Jr, Naldini L., Peschle C., Cossu G., Condorelli G. 'Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 2003,10,630-6.
25. Boumater Steege J.C., Baeten C.I., Thijssen V.L., Satijn S.A., Verhoeven I.C., Hillen H.F., Wagstaff J., Griffioen A.W.. Angiogenic profile of breast carcinoma, determines leukocyte infiltration. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 7171-8.
26. Brousseau M.E., Wang J., Demosky S.J. Jr., Vaisman B.L., Talley G.D., Santamarina-Fojo S. et al. Correction of hypoalphalipoproteinemia in LDL receptor-deficient rabbits by lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 1998, 39,1558-67.
27. Bultmann A., Eberle J., Haas J. Ubiquitination of the human immunodeficiency virus type 1 env glycoprotein. *J. Virol.* 2000,74,5373-6.
28. Burgess T.L., Fisher E.F., Ross S.L., Bready J.V., Qian Y.X., Bayewitch L.A. et al. The antiproliferative activity of c-myb and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995,92,4051-5.
29. Burke P.A., Lehmann-Bruinsma K., Powell J.S. Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1995,207,348-54.
30. Byzova T.V., Goldman C.K., Jankau J., Chen J., Cabrera G., Achen M.G., Stacker S.A., Carnevale K.A., Siemionow M., Deitcher S.R., DiCorleto P.E. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood.* 2002,99,4434-42.



31. Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., Vandendriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate K.H., Foidart J.M., Schaper W., Charnock-Jones D.S., Hicklin D.J., Herbert J.M., Collen D., Persico M.G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 2001,7,575-83.
32. 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. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000,288,669-72.
33. Celletti F.L., Waugh J.M., Amabile P.G., Brendolan A., Hilfiker P.R., Dake M.D. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 2001,7,425-9.
34. Chen Y.X., Nakashima Y., Tanaka K., Shiraishi S., Nakagawa K., Sueishi K. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 1999,19,131-9.
35. Chen-Konak L., Guetta-Shubin Y., Yahav H., Shay-Salit A., Zilberman M., Binah O., Resnick N. Transcriptional and post-translation regulation of the Tie1 receptor by fluid shear stress changes in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2003,17,2121-3.
36. Chu D., Sullivan C.C., Weitzman M.D., Du L., Wolf P.L., Jamieson S.W., Thistlethwaite P.A. Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003,126,671-9.
37. Chu D., Thistlethwaite P.A., Sullivan C.C., Grifman M.S., Weitzman M.D. Gene delivery to the mammalian heart using AAV vectors. *Methods. Mol. Biol.* 2004,246,213-24.
38. Chu Y., Iida S., Lund D.D., Weiss R.M., DiBona G.F., Watanabe Y., Faraci F.M., Heistad D.D. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ. Res.* 2003,92,461-8.
39. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin. Thromb. Hemost.* 2000,26,561-9.
40. Coffin R.S., Howard M.K., Cumming D.V., Dollery C.M., McEwan J., Yellon D.M., Marber M.S., MacLean A.R., Brown S.M., Latchman D.S. Gene delivery to the heart in vivo and to cardiac myocytes and vascular

- smooth muscle cells in vitro using herpes virus vectors. *Gene Ther.* 1996, 3, 560-6.
41. Couto L.B., Pierce G.F. AAV-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr Opin.Mol.Ther.* 2003,5,517-23.
  42. Crook M.F., Akyurek L.M. Gene transfer strategies to inhibit neointima formation. *Trends Cardiovasc Med.* 2003,13,102-6.
  43. Danialou G., Comtois A.S., Dudley R.W., Nalbantoglu J., Gilbert R., Karpapati G., Jones D.H., Petrof B.J. Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol. Ther.* 2002,6,687-93.
  44. Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J. Gene. Med.* 2004,6,S125-38.
  45. Ding W., Yan Z., Zak R., Saavedra M., Rodman D.M., Engelhardt J.F. Second-strand genome conversion of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and AAV-5 is not rate limiting following apical infection of polarized human airway epithelia. *J. Virol.* 2003,77,7361-6.
  46. Douar A.M., Poulard K., Stockholm D., Danos O. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J. Virol.* 2001,75,1824-33.
  47. Duan D., Yue Y., Yan Z., Yang J., Engelhardt J.F. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J. Clin. Invest.* 2000,105,1573-87.
  48. Dulak J., Jozkowicz A., Foresti R., Kasza A., Frick M., Huk I., Green C.J., Pachinger O., Weidinger F., Motterlini R. Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal.* 2002,4,229-40.
  49. Dulak J., Józkwicz A., Guevara I., Dembinska-Kiec A. Gene transfer of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase-implications for gene therapy in cardiovascular diseases. *Pol. J. Pharmacol.* 1999,51,233-41.
  50. Dulak J., Józkwicz A. Terapia genowa chorób układu krążenia. *Biotechnologia* 2004,3,35-54.
  51. Durand E., Scoazec A., Lafont A., Boddaert J., Al Hajzen A., Addad F., Mirshahi M., Desnos M., Tedgui A., Mallat Z. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion. *Circulation.* 2004,109,2503-6.

52. Eglitis M.A., Kantoff P., Gilboa E., Anderson W.F. Gene expression in mice after high efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science* 1985,30,1395-8.
53. Enholm B., Paavonen K., Ristimaki A., Kumar V., Gunji Y., Klefstrom J., Kivinen L., Laiho M., Olofsson B., Joukov V., Eriksson U., Alitalo K. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997, 14, 2475-83.
54. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003,9,669-76.
55. Flotte T.R. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther.* 2004,11,805-10.
56. Flotte T.R. Recombinant adeno-associated virus vectors for cystic fibrosis gene therapy. *Curr Opin. Mol. Ther.* 2001,3,497-502.
57. Friedman J.M., Dill F.J., Hayden M.R., McGillivray B.C. *Genetyka*. Red. Limon J. Urban&Partner Wrocław 1997.
58. Fuller M., Anson D.S. Can the use of HIV-1 derived gene transfer vectors for clinical application be justified? *Curr Gene Ther.* 2004,4,65-77.
59. Galis Z., Sukhova G.K., Lark M.W., Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 1994,94,2493-501.
60. Garcia S.I., Alvarez A.L., Porto P.I., Garfunkel V.M., Finkielman S., Priola C.J. Antisense inhibition of thyrotropin-releasing hormone reduces arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001,37,376-80
61. Gnatenko D., Arnold T.E., Zolotukhin S., Nuovo G.J., Muzyczka N., Bahou W.F. Characterization of recombinant adeno-associated virus-2 as a vehicle for gene delivery and expression into vascular cells. *J. Investig. Med.* 1997,45,87-98.
62. Godbey W.T., Mikos A.G. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J. Control. Release* 2001,72,115-25.
63. Greeve J., Jona V.K., Chowdhury N.R., Horwitz M.S., Chowdhury J.R. Hepatic gene transfer of the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme results in a reduction of plasma LDL levels in normal and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Lipid. Res.* 1996, 37, 2001-17.

64. Grimm D., Kay M.A. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2003,3,281-304.
65. Grimm D., Kern A., Rittner K., and Kleinschmidt J.A. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 1998,9, 2745-60.
66. Grines C.L., Watkins M.W., Mahmarian J.J., Iskandrian A.E., Rade J.J., Marrott P., Pratt C., Kleiman N.; Angiogene GENE Therapy (AGENT-2) Study Group. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J. Am Coll. Cardiol.* 2003,42,1339-47.
67. Grossman M., Rader D.J., Muller D.W., Kolansky D.M., Kozarsky K., Clark B.J. et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat. Med.* 1995,1,1148-54.
68. Grube E. E2F Decoy-gene therapy in bypass grafts. American Heart Association 2001 Meeting (Plenary session: Late Breaking Clinical Trials).2001
69. Gruchała M., Bhardwaj S., Pajusola K., Roy H., Rissanen T.T., Kokina I., Kholova I., Markkanen J.E., Rutanen J., Heikura T., Alitalo K., Bueler H., Yla-Herttuala S. Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. *J. Gene. Med.* 2004,6,545-54.
70. Gruchała M., Cieciewicz D., Ochman K., Targonski R., Dubaniewicz W., Sobiczewski W., Wasag B., Drewla P., Skarzynski P., Romanowski P., Limon J., Rynkiewicz A. Association between the PI(A) platelet glycoprotein GPIIIa polymorphism and extent of coronary artery disease. *Int.J. Cardiol.* 2003,88,229-37.
71. Gruchała M., Cieciewicz D., Wasag B., Targonski R., Dubaniewicz W., Nowak A., Sobiczewski W., Ochman K., Romanowski P., Limon J., Rynkiewicz A. Association of the ScaI atrial natriuretic peptide gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Am Heart J.* 2003,145,125-31.
72. Gruchała M., Roy H., Bhardwaj S., Yla-Herttuala S. Gene therapy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm. Des.* 2004,10,407-23.
73. Gruchała M., Rynkiewicz A. Aspekty genetyczne choroby niedokrwiennej serca. Red: Różyło W., Ciechanowicz A. Genetyka chorób układu krążenia. Medycyna Praktyczna Warszawa, 2002.
74. Gruchała M., Rynkiewicz A. Podstawy genetyki w kardiologii. ViaMedica Gdańsk, 2003.

75. Guttmacher A.E., Collins F.S. Genomic Medicine: Genomic Medicine - A Primer. *N. Engl J. Med.* 2002,347,1512-20.
76. Guzman R.J., Hirschowitz E.A., Brody S.L., Crystal R.G., Epstein S.E., Finkel T. In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91, 10732-6.
77. Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003, 302,415-9.
78. Hansen J., Qing K., Kwon H.J., Mah C., Srivastava A. Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts. *J. Virol.* 2000,74,992-6.
79. Hansen J., Qing K., Srivastava A. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J. Virol.* 2001,75,4080-90.
80. Hao X., Mansson-Broberg A., Blomberg P., Dellgren G., Siddiqui A.J., Grinnemo K.H., Wardell E., Sylven C. Angiogenic and cardiac functional effects of dual gene transfer of VEGF-A165 and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004,322,292-6.
81. Harrell R.L., Rajanayagam S., Doanes A.M., Guzman R.J., Hirschowitz E.A., Crystal R.G. et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal accumulation by adenovirus-mediated gene transfer of cytosine deaminase. *Circulation.* 1997,96,621-7.
82. Hatva E., Kaipainen A., Mentula P., Jaaskelainen J., Paetau A., Haltia M., Alitalo K. Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J. Pathol.* 1995,146,368-78.
83. Hausner E.A., Orsini J.A., Foster L.L., Modzelewski T.C., Merrill J.J., Perkowski S.Z., Slee A. Vascular endothelial growth factor in porcine coronary arteries following balloon angioplasty. *J. Invest. Surg.* 1999, 12, 15-23.
84. Haviernik P., Bunting K.D. Safety concerns related to hematopoietic stem cell gene transfer using retroviral vectors. *Curr Gene Ther.* 2004,4,263-76.

85. Hayashi K., Nakamura S., Morishita R., Moriguchi A., Aoki M., Matsumoto K. et al. In vivo transfer of human hepatocyte growth factor gene accelerates re-endothelialization and inhibits neointimal formation after balloon injury in rat model. *Gene Ther.* 2000, 7,1664-71.
86. Hayashi T., Sumi D., Juliet P.A., Matsui-Hirai H., Asai-Tanaka Y., Kano H., Fukatsu A., Tsunekawa T., Miyazaki A., Iguchi A., Ignarro L.J.. Gene transfer of endothelial NO synthase, but not eNOS plus inducible NOS, regressed atherosclerosis in rabbits. *Cardiovasc. Res.* 2004,61,339-51.
87. He Y., Karpanen T., Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004,1654,3-12.
88. 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. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation.* 2003, 107, 2677-83.
89. Herrmann J., Ciechanover A., Lerman L.O., Lerman A. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases-a hypothesis extended. *Cardiovasc. Res.* 2004,61,11-21.
90. 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. Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation.* 2000,102,2262-8.
91. Hiltunen M.O., Turunen M.P., Turunen A.M., Rissanen T.T., Laitinen M., Kosma V.M., Yla-Herttuala S. Biodistribution of adenoviral vector to non-target tissues after local in vivo gene transfer to arterial wall using intravascular and periadventitial gene delivery methods. *FASEB J.* 2000, 14, 2230-6.
92. Hiltunen M.O., Turunen M.P., Yla-Herttuala S. Gene therapy methods in cardiovascular diseases. *Methods Enzymol.* 2002,346,311-20.
93. Hong K.H., Ryu J., Han K.H. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood.* 2004 Oct 21, DOI 10.1182/blood-2004-08-3178.
94. Humbert M., Sitbon O., Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2004,351,1425-36.

95. Huser A., Hofmann C. Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications. *Am J. Pharmacogenomics.* 2003,3,53-63.
96. Hutter R., Carrick F.E., Valdiviezo C., Wolinsky C., Rudge J.S., Wiegand S.J., Fuster V., Badimon J.J., Sauter B.V. Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation.* 2004,110,2430-5.
97. Iljin K., Dube A., Kontusaari S., Korhonen J., Lahtinen I., Oettgen P., Alitalo K. Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *FASEB J.* 1999,13,377-86.
98. Indolfi C., Avvedimento E.V., Rapacciuolo A., Di Lorenzo E., Esposito G., Stabile E. et al. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat. Med.* 1995,1,541-5.
99. Indolfi C., Mongiardo A., Curcio A., Torella D. Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Trends. Cardiovasc. Med.* 2003,13,142-8.
100. 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., Matsuguchi K., Becker A.E., Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation.* 1998,98,2108-16.
101. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R., Blair R., Haley L., Asahara T., Rosenfield K., Razvi S., Walsh K., Symes J.F. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 1996,348,370-4.
102. Isner J.M., Vale P.R., Symes J.F., Losordo D.W. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ. Res.* 2001, 89,389-400.
103. Ito W.D., Arras M., Winkler B., Scholz D., Schaper J., Schaper W. Monocyte chemoattractant protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ. Res.* 1997,80,829-37.
104. Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain R.K., Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 1997,276,1423-5.
105. Jiang M., Mezentsev A., Kemp R., Byun K., Falck J.R., Miano J.M., Nasjletti A., Abraham N.G., Laniado-Schwartzman M. Smooth muscle-

- specific expression of CYP4A1 induces endothelial sprouting in renal arterial microvessels. *Circ. Res.* 2004,94,167-74.
106. Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996,15,290-8.
  107. Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 1997,16,3898-911.
  108. Joyner A., Keller G., Phillips R.A., Bernstein A. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* 1983,305,556-8.
  109. Kaipainen A., Vlaykova T., Hatva E., Bohling T., Jekunen A., Pyrhonen S., Alitalo K. Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase messenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas. *Cancer Res.* 1994,54,6571-7.
  110. Kankkonen H.M., Turunen M.P., Hiltunen M.O., Lehtolainen P., Koponen J., Leppanen P., Turunen A.M., Yla-Herttuala S. Feline immunodeficiency virus and retrovirus-mediated adventitial ex vivo gene transfer to rabbit carotid artery using autologous vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004,36,333-41.
  111. Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T.V., Jeltsch M., Jackson D.G., Talikka M., Rauvala H., Betsholtz C., Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 2004,5,74-80.
  112. Karkkainen M.J., Saaristo A., Jussila L., Karila K.A., Lawrence E.C., Pajusola K., Bueler H., Eichmann A., Kauppinen R., Kettunen M.I., Yla-Herttuala S., Finegold D.N., Ferrell R.E., Alitalo K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98, 12677-82.
  113. Kashyap V.S., Santamarina-Fojo S., Brown D.R., Parrott C.L., Applebaum-Bowden D., Meyn S. et al. Apolipoprotein E deficiency in mice: gene replacement and prevention of atherosclerosis using adenovirus vectors. *J. Clin. Invest.* 1995,96,1612-20.
  114. Katovich M.J., Reaves P.Y., Francis S.C., Pachori A.S., Wang H.W., Raizada M.K. Gene therapy attenuates the elevated blood pressure and glucose intolerance in an insulin-resistant model of hypertension. *J. Hypertens.* 2001,19,1553-8.



115. Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 2001, 7, 33-40.
116. Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D.T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989,246,1309-12.
117. Khoury M.J., McCabe L.L., McCabe E.R.B. Genomic Medicine: Population Screening in the Age of Genomic Medicine. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 50-8
118. Kim I., Moon S.O., Kim S.H., Kim H.J., Koh Y.S., Koh G.Y. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001,276,7614-20.
119. Kipshidze N., Dangas G., Tsapenko M., Moses J., Leon M.B., Kutryk M., Serruys P. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004,44,733-9.
120. Kipshidze N., Leon M.B., Tsapenko M., Falotico R., Kopia G.A., Moses J. Update on sirolimus drug-eluting stents. *Curr.Pharm.Des.* 2004,10,337-48.
121. Kondo I., Ohmori K., Oshita A., Takeuchi H., Fuke S., Shinomiya K., Noma T., Namba T., Kohno M. Treatment of acute myocardial infarction by hepatocyte growth factor gene transfer: the first demonstration of myocardial transfer of a „functional” gene using ultrasonic microbubble destruction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004,44,644-53.
122. Kontos C.D., Cha E.H., York J.D., Peters K.G. The endothelial receptor tyrosine kinase Tie1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to inhibit apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2002,22,1704-13.
123. Korhonen J., Lahtinen I., Halmekyto M., Alhonen L., Janne J., Dumont D., Alitalo K. Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood.* 1995,86,1828-35.
124. Korhonen J., Partanen J., Armstrong E., Vaahtokari A., Elenius K., Jalakanen M., Alitalo K. Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. *Blood.* 1992, 80, 2548-55.
125. Korhonen J., Polvi A., Partanen J., Alitalo K. The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene.* 1994 Feb., 9(2),395-403.

126. Kozarsky K.F., Bonen D.K., Giannoni F., Funahashi T., Wilson J.M., Davidson N.O. Hepatic expression of the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme (apobec-1) ameliorates hypercholesterolemia in LDL receptor-deficient rabbits. *Hum. Gene Ther.* 1996,7,943-57.
127. Kozarsky K.F., McKinley D.R., Austin L.L., Raper S.E., Stratford-Perricaudet L.D., Wilson J.M. In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenoviruses. *J. Biol. Chem.* 1994, 269,13695-702.
128. Kumai T., Tateishi T., Tanaka M., Watanabe M., Shimizu H., Kobayashi S. Tyrosine hydroxylase antisense gene therapy causes hypotensive effects in the spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2001,19,1769-73.
129. Kutryk M.J., Foley D.P., van den Brand M., Hamburger J.N., van der Giessen W.J., deFeyter P.J., Bruining N., Sabate M., Serruys P.W.; ITALICS Trial. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002,39,281-7.
130. Kuzuya M., Satake S., Esaki T., Yamada K., Hayashi T., Naito M., Asai K., Iguchi A. Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque. *J. Cell. Physiol.* 1995,164,658-67.
131. Laitinen M., Hartikainen J., Hiltunen M.O., Eranen J., Kiviniemi M., Narvanen O., Makinen K., Manninen H., Syvanne M., Martin J.F., Laakso M., Yla-Herttuala S. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum. Gene Ther.* 2000,11,263-70.
132. Laitinen M., Makinen K., Manninen H., Matsi P., Kossila M., Agrawal R.S., Pakkanen T., Luoma J.S., Viita H., Hartikainen J., Alhava E., Laakso M., Yla-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum. Gene Ther.* 1998,9,1481-6.
133. 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. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum. Gene Ther.* 1997,8,1737-44.
134. Laukkanen J., Lehtolainen P., Gough P.J., Greaves D.R., Gordon S., Yla-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted form of

- human macrophage scavenger receptor inhibits modified low-density lipoprotein degradation and foam-cell formation in macrophages. *Circulation* 2000,101,1091-6.
135. Lederberg J. Biological future of man. w: Wolstenholme G., red. *Man and His Future*. London, Churchill, 1963,265.
  136. Lee R.J., Springer M.L., Blanco-Bose W.E., Shaw R., Ursell P.C., Blau H.M. VEGF gene delivery to myocardium. Deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000,102,898-901.
  137. Leppanen O., Rutanen J., Hiltunen M.O., Rissanen T.T., Turunen M.P., Sjoblom T., Bruggen J., Backstrom G., Carlsson M., Buchdunger E., Bergqvist D., Alitalo K., Heldin C.H., Ostman A., Yla-Herttuala S. Oral imatinib mesylate (STI571/gleevec) improves the efficacy of local intravascular vascular endothelial growth factor-C gene transfer in reducing neointimal growth in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2004, 109, 1140-6.
  138. Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989,246,1306-9.
  139. Luttun A., Tjwa M., Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2002,979,80-93.
  140. Luttun A., Tjwa M., Moons L., Wu Y., Angelillo-Scherrer A., Liao F., Nagy J.A., Hooper A., Priller J., De Klerck B., Compernelle V., Daci E., Bohlen P., Dewerchin M., Herbert J.M., Fava R., Matthys P., Carmeliet G., Collen D., Dvorak H.F., Hicklin D.J., Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat. Med.* 2002,8,831-40.
  141. Lynch C.M., Hara P.S., Leonard J.C., Williams J.K., Dean R.H., Geary R.L.. Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ. Res.* 1997, 80,497-505.
  142. Lyttle D.J., Fraser K.M., Fleming S.B., Mercer A.A., Robinson A.J. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.* 1994,68,84-92.
  143. Maeda Y., Ikeda U., Ogasawara Y., Urabe M., Takizawa T., Saito T., Colosi P., Kurtzman G., Shimada K., Ozawa K. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc Res.* 1997,35,514-21.

144. Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico M.G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991,88,9267-71.
145. Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M.G., Aprelikova O., Alitalo K. et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993,8,925-31.
146. Makinen K., Manninen H., Hedman M., Matsi P., Mussalo H., Alhava E., Yla-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. *Mol. Ther.* 2002, 6,127-33.
147. 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. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 1999,354,1493-8.
148. Mann M.J. Novel strategies for the prevention of bypass graft failure. *Bio-Drugs.* 2004,18,1-8.
149. Mann R., Mulligan R.C., Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell.* 1983,33,153-9.
150. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999,286,2244-5.
151. Marumo T., Schini-Kerth V.B., Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes.* 1999,48,1131-7.
152. McCarty D.M., Young S.M., Samulski R.J. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 2004,38,819-45.
153. McFadden E.P., Stabile E., Regar E., Cheneau E., Ong A.T., Kinnaird T., Suddath W.O., Weissman N.J., Torguson R., Kent K.M., Pichard A.D., Satler L.F., Waksman R., Serruys P.W. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet.* 2004,364,1519-21.
154. Mehdi K., Wilensky R.L., Baek S.H., Trapnell B.C., March K.L. Efficient adenovirus-mediated perivascular gene transfer and protein delivery by a transvascular injection catheter. *J. Am Coll. Cardiol.* 1996,27,164A.

155. Merten O.W. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J. Gene Med.* 2004,6,S105-24.
156. Migdal M., Huppertz B., Tessler S., Comforti A., Shibuya M., Reich R., Baumann H., Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J. Biol. Chem.* 1998,273,22272-8.
157. Miller A.D., Jolly D.J., Friedmann T., Verma I.M. A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): gene transfer into cells obtained from humans deficient in HPRT. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* 1983,80,4709-13.
158. Miller D.G., Petek L.M., Russell D.W. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat. Genet.* 2004,36,767-73.
159. Modlich U., Pugh C.W., Bicknell R. Increasing endothelial cell specific expression by the use of heterologous hypoxic and cytokine-inducible enhancers. *Gene Ther.* 2000,7,896-902.
160. Monahan P.E., Samulski R.J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol. Med. Today.* 2000,6,433-40.
161. Morice M.C., Serruys P.W., Sousa J.E., Fajadet J., Ban Hayashi E., Perin M., Colombo A., Schuler G., Barragan P., Guagliumi G., Molnar F., Falotico R.; RAVEL Study Group. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Engl. J. Med.* 2002,346,1773-80.
162. Morishige K., Shimokawa H., Matsumoto Y., Eto Y., Uwatoku T., Abe K., Sueishi K., Takeshita A. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries in vivo. *Cardiovasc. Res.* 2003,57,572-85.
163. Morishita R., Aoki M., Hashiya N., Makino H., Yamasaki K., Azuma J., Sawa Y., Matsuda H., Kaneda Y., Ogihara T. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension.* 2004,44,203-9.
164. Morishita R., Gibbons G.H., Ellison K.E., Nakajima M., Zhang L., Kaneda Y. et al. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993,90,8474-8.
165. Mulder L.C., Muesing M.A. Degradation of HIV-1 integrase by the N-end rule pathway. *J. Biol. Chem.* 2000,275,29749-53.
166. Nabel E.G., Plautz G., Boyce F.M., Stanley J.C., Nabel G.J. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. *Science.* 1989,244,1342-4.

167. Nabel E.G., Plautz G., Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science*. 1990,249,1285-8.
168. Nakai H., Montini E., Fuess S., Storm T.A., Grompe M., Kay M.A. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet*. 2003,34,297-302.
169. Neil P. Fam, Subodh Verma, Michael Kutryk, and Duncan J. Stewart. *Clinician Guide to Angiogenesis Circulation* 2003,108,2613-8
170. Newman K.D., Dunn P.F., Owens J.W., Schulick A.H., Virmani R., Sukhova G., Libby P., Dichek D.A. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 1995,96,2955-65.
171. Nicklin S.A., Buening H., Dishart K.L., de Alwis M., Girod A., Hacker U., Thrasher A.J., Ali R.R., Hallek M., Baker A.H. Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol. Ther.* 2001,4,174-81.
172. Nicklin S.A., Reynolds P.N., Brosnan J., White S.J., Curiel D.T., Dominiczak A.F. et al. Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium. *Hypertension* 2001,38,65-70.
173. Nicklin S.A., White S.J., Nicol C.G., Von Seggern D.J., Baker A.H. In vitro and in vivo characterisation of endothelial cell selective adenoviral vectors. *J. Gene Med.* 2004,6,300-8.
174. Niidome T., Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 2002,9,1647-52.
175. Nirenberg M.W., Matthaei J.H. The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. Coli* Upon Naturally Occuring or Synthetic Polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1961,47,1588-1602.
176. Numaguchi Y., Okumura K., Harada M., Naruse K., Yamada M., Osanai H., Matsui H., Ito M., Murohara T. Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries. *Cardiovasc Res.* 2004,61,177-85.
177. Odorisio T., Schietroma C., Zaccaria M.L., Cianfarani F., Tiveron C., Tangelo L., Failla C.M., Zambruno G. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J. Cell. Sci.* 2002,115,2559-67.
178. Ogawa S., Oku A., Sawano A., Yamaguchi S., Yazaki Y., Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor: VEGF-E (NZ-7 VEGF) preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1998,273,31273-82.

179. Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M.S., Mandriota S.J., Aase K., Kumar V., Gunji Y., Jeltsch M.M., Shibuya M., Alitalo K., Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998,95,11709-14.
180. Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R.F., Alitalo K., Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996,93,2576-81.
181. Olofsson B., Pajusola K., von Euler G., Chilov D., Alitalo K., Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J. Biol. Chem.* 1996,271,19310-7.
182. Ono M., Sawa Y., Fukushima N., Suhara H., Nakamura T., Yokoyama C., Tanabe T., Matsuda H. Gene transfer of hepatocyte growth factor with prostacyclin synthase in severe pulmonary hypertension of rats. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2004,26,1092-7.
183. Orlandini M., Marconcini L., Ferruzzi R., Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93,11675-80.
184. 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. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat. Med.* 2003,9,183-90.
185. Pajusola K., Gruchala M., Joch H., Luscher T.F., Yla-Herttuala S., Bueler H. Cell-type-specific characteristics modulate the transduction efficiency of adeno-associated virus type 2 and restrain infection of endothelial cells. *J. Virol.* 2002,76,11530-40.
186. Pakkanen T.M., Laitinen M., Hippelainen M., Kallionpaa H., Lehtolainen P., Leppanen P. et al. Enhanced plasma cholesterol lowering effect of retrovirus-mediated LDL receptor gene transfer to WHHL rabbit liver after improved surgical technique and stimulation of hepatocyte proliferation by combined partial liver resection and thymidine kinase--ganciclovir treatment. *Gene Ther.* 1999,6,34-41.
187. Papalambros E., Sigala F., Georgopoulos S., Panou N., Kavatzas N., Agapitos M., Bastounis E. Vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 expression in human carotid atherosclerotic plaques:

- relationship with plaque destabilization via neovascularization. *Cerebrovasc Dis.* 2004,18,160-5.
188. Parenti A., Bellik L., Brogelli L., Filippi S., Ledda F. Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2004,286,H1978-84.
189. Park J.E., Chen H.H., Winer J., Houck K.A., Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 1994,269,25646-54.
190. Paterna J.C., Moccetti T., Mura A., Feldon J., and Bueler H. Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther.* 2000,7, 1304-11.
191. Peden C.S., Burger C., Muzyczka N., Mandel R.J. Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J. Virol.* 2004,78,6344-59.
192. Phillips M.I. Gene therapy for hypertension: the preclinical data. *Methods Enzymol.* 2002,346,3-13.
193. Pieroni L., La Monica N. Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector. *Curr Opin. Mol. Ther.* 2001,3,464-7.
194. Plouet J., Schilling J., Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989,8,3801-6.
195. Pollman M.J., Hall J.L., Mann M.J., Zhang L., Gibbons G.H. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat. Med.* 1998,4, 222-7.
196. Porat R.M., Grunewald M., Globerman A., Itin A., Barshtein G., Alhonen L., Alitalo K., Keshet E. Specific induction of tie1 promoter by disturbed flow in atherosclerosis-prone vascular niches and flow-obstructing pathologies. *Circ. Res.* 2004,94,394-401.
197. Puri M.C., Rossant J., Alitalo K., Bernstein A., Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J.* 1995,14,5884-91.
198. Puumalainen A.M., Vapalahti M., Agrawal R.S., Kossila M., Laukkanen J., Lehtolainen P., Viita H., Paljarvi L., Vanninen R., Yla-Herttuala S. Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 1998,9,1769-74.



199. Quarck R., De Geest B., Stengel D., Mertens A., Lox M., Theilmeier G. et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001,103,2495-500.
200. Rade J.J., Schulick A.H., Virmani R., Dichek D.A. Local adenoviral-mediated expression of recombinant hirudin reduces neointima formation after arterial injury. *Nat. Med.* 1996,2,293-8.
201. Raman K.G., Shapiro R.A., Tzeng E., Kibbe M.R. Adenovirus-mediated nitric oxide synthase gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 2004,279,225-34.
202. Reaves P.Y., Beck C.R., Wang H.W., Raizada M.K., Katovich M.J. Endothelial-independent prevention of high blood pressure in L-NAME-treated rats by angiotensin II type I receptor antisense gene therapy. *Exp. Physiol.* 2003,88,467-73.
203. Rensing B.J., Vos J., Smits P.C., Foley D.P., van den Brand M.J., van der Giessen W.J., de Feijter P.J., Serruys P.W. Coronary restenosis elimination with a sirolimus eluting stent: first European human experience with 6-month angiographic and intravascular ultrasonic follow-up. *Eur. Heart. J.* 2001,22,2125-30.
204. Richter M., Iwata A., Nyhuis J., Nitta Y., Miller A.D., Halbert C.L., Allen M.D. Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo. *Physiol. Genomics.* 2000,2,117-27.
205. Rissanen T.T., Markkanen J.E., Arve K., Rutanen J., Kettunen M.I., Vajanto I., Jauhiainen S., Cashion L., Gruchala M., Narvanen O., Taipale P., Kauppinen R.A., Rubanyi G.M., Yla-Herttuala S. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J.* 2003,17,100-2.
206. Rissanen T.T., Markkanen J.E., Gruchala M., Heikura T., Puranen A., Kettunen M.I., Kholova I., Kauppinen R.A., Achen M.G., Stacker S.A., Alitalo K., Yla-Herttuala S. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ. Res.* 2003,92,1098-106.
207. Roks A.J., Henning R.H., Buikema H., Pinto Y.M., Kraak M.J., Tio R.A., de Zeeuw D., Haisma H.J., Wilschut J., van Gilst W.H. Recombinant Semliki Forest virus as a vector system for fast and selective in vivo gene delivery into balloon-injured rat aorta. *Gene Ther.* 2002,9,95-101.
208. Rolling F., Nong Z., Pisvin S., Collen D. Adeno-associated virus-mediated gene transfer into rat carotid arteries. *Gene Ther.* 1997,4,757-61.

209. Rome J.J., Shayani V., Flugelman M.Y., Newman K.D., Farb A., Virmani R. et al. Anatomic barriers influence the distribution of in vivo gene transfer into the arterial wall. Modeling with microscopic tracer particles and verification with a recombinant adenoviral vector. *Arterioscler Thromb* 1994,14,148-61.
210. Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R.A., Moen R., Karson E.M.; Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Merino M.J., Culver K., Miller A.D., Blaese M.D., Anderson, WF. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *New Engl. J. Med.* 1990,323,570-8.
211. Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R., Sanborn T.A., Parikh M., Bergman G.W. et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999,3,100,468-74.
212. Rutanen J., Leppanen P., Tuomisto T.T., Rissanen T.T., Hiltunen M.O., Vajanto I., Niemi M., Hakkinen T., Karkola K., Stacker S.A., Achen M.G., Alitalo K., Yla-Herttuala S. Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res.* 2003,59,971-9.
213. Rutanen J., Puhakka H., Yla-Herttuala S. Post-intervention vessel remodeling. *Gene Ther.* 2002,9,1487-91.
214. Rutanen J., Rissanen T.T., Markkanen J.E., Gruchala M., Silvennoinen P., Kivela A., Hedman A., Hedman M., Heikura T., Orden M.R., Stacker S.A., Achen M.G., Hartikainen J., Yla-Herttuala S. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation.* 2004,109,1029-35.
215. Saenz D.T., Poeschla E.M. FIV: from lentivirus to lentivector. *J. Gene Med.* 2004,6,S95-104.
216. Sata M., Saiura A., Kunisato A., Tojo A., Okada S., Tokuhisa T., Hirai H., Makuuchi M., Hirata Y., Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* 2002,8,403-9.
217. Schulick A.H., Dong G., Newman K.D., Virmani R., Dichek D.A. Endothelium-specific in vivo gene transfer. *Circ. Res.* 1995,77,475-85.
218. Schulick A.H., Newman K.D., Virmani R., Dichek D.A. In vivo gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation* 1995,91,2407-14.

219. Schwartz R.S., Henry T.D. Pathophysiology of coronary artery restenosis. *Rev. Cardiovasc Med.* 2002,3 Suppl. 5,S4-9.
220. Seguret-Mace S., Latta-Mahieu M., Castro G., Luc G., Fruchart J.C., Rubin E. et al. Potential gene therapy for lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)-deficient and hypoalphalipoproteinemic patients with adenovirus-mediated transfer of human LCAT gene. *Circulation* 1996,94,2177-84.
221. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983,219,983-5.
222. Shibata M., Suzuki H., Nakatani M., Koba S., Geshi E., Katagiri T., Takeyama Y. The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem. Cell. Biol.* 2001,116,471-81.
223. Shimpo M., Ikeda U., Maeda Y., Takahashi M., Miyashita H., Mizukami H., Urabe M., Kume A., Takizawa T., Shibuya M., Ozawa K., Shimada K. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res.* 2002,53,993-1001.
224. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992,359,843-5.
225. Siminiak T., Fiszer D., Jerzykowska O., Grygielska B., Kalmucki P., Kurpisz M. Percutaneous autologous myoblast transplantation in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment-report on two cases. *Kardiol. Pol.* 2003,59,492-501.
226. Somia N. Gene transfer by retroviral vectors: an overview. *Methods Mol. Biol.* 2004,246,463-90.
227. Sousa J.E., Costa M.A., Abizaid A.C., Rensing B.J., Abizaid A.S., Tanajura L.F., Kozuma K., Van Langenhove G., Sousa A.G., Falotico R., Jaeger J., Popma J.J., Serruys P.W. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001,104,2007-11.
228. St George J.A.. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther.* 2003,10,1135-41.
229. Stacker S.A., Stenvers K., Caesar C., Vitali A., Domagala T., Nice E., Roufail S., Simpson R.J., Moritz R., Karpanen T., Alitalo K., Achen M.G. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic

- processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* 1999,274,32127-36.
230. Stewart D.J., Langille B.L. Tied down by shear force: role for Tie1 in post-natal vascular remodeling? *Circ. Res.* 2004,20,94,271-2.
231. Stewart D.J. A phase 2, randomized, multicenter, 26-week study to assess the efficacy and safety of BIOBYPASS (AdGVVEGF121.10) delivered through minimally invasive surgery versus maximum medical treatment in patients with severe angina, advanced coronary artery disease, and no options for revascularization. *Circulation.* 2002, 106, 2986-a.Abstract.
232. Strous G.J., Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J. Cell. Sci.* 1999,112,1417-23.
233. Suhara H., Sawa Y., Fukushima N., Kagisaki K., Yokoyama C., Tanabe T., Ohtake S., Matsuda H. Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for the treatment of pulmonary hypertension in rats. *J. Thorac. Cardiovasc Surg.* 2002,123,855-61.
234. Summerford C., Samulski R.J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 1998,72,1438-45.
235. Suzuki J., Isobe M., Morishita R., Aoki M., Horie S., Okubo Y. et al. Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nat. Med.* 1997,3,900-3.
236. Sylven C., Sarkar N., Insulander P., Kenneback G., Blomberg P., Islam K. et al. Catheter-based transendocardial myocardial gene transfer. *J. Interv. Cardiol.* 2002,15,7-13.
237. Symes J.F., Losordo D.W., Vale P.R., Lathi K.G., Esakof D.D., Mayskiy M., Isner J.M. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann. Thorac. Surg.* 1999,68,830-6.
238. Szala S. red. *Terapia genowa.* Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, 2003.
239. Szybalska E.H., Szybalski W. Genetics of human cell lines. IV. DNA mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1962,48, 2026-34.
240. Szybalski W., DNA-mediated genetic transformation of human cell lines. *Proc. 12th Ann Session Natl. Poultry Breeder's Roundtable, Kansas City* 1963,90-109.
241. Tabata H., Silver M., Isner J.M. Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis in vivo: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc Res.* 1997,35,470-9.

242. Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Namba T., Yamasaki K., Hashiya N., Aoki M., Ogihara T., Yasufumi K., Morishita R. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*. 2002;105:1233-9.
243. Tatum E.L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. w: Lyght C.E., red. *Reflections on Research and the Future of Medicine*. New York: McGraw-Hill, 1967,31-13.
244. Tenenbaum L., Lehtonen E., Monahan P.E. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 2003, 3, 545-65.
245. Teramoto S., Ishii T., Matsuse T., Fukuchi Y. Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently transduce foreign gene into bovine aortic endothelial cells: comparison with adenovirus vectors. *Jpn J. Pharmacol.* 2000,84,206-12.
246. Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2003,4,346-58.
247. Tsukamoto K., Smith P., Glick J.M., Rader D.J. Liver-directed gene transfer and prolonged expression of three major human ApoE isoforms in ApoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1997,100,107-14.
248. Turunen M.P., Puhakka H.L., Koponen J.K., Hiltunen M.O., Rutanen J., Leppanen O., Turunen A.M., Narvanen A., Newby A.C., Baker A.H., Yla-Herttuala S. Peptide-retargeted adenovirus encoding a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreases restenosis after intravascular gene transfer. *Mol. Ther.* 2002,6,306-12.
249. Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E., Maysky M., Esakof D.D., Symes J.F. et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000,102, 965-74.
250. Veikkola T., Jussila L., Makinen T., Karpanen T., Jeltsch M., Petrova T.V., Kubo H., Thurston G., McDonald D.M., Achen M.G., Stacker S.A., Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001,20,1223-31.
251. Visner G.A., Lu F., Zhou H., Liu J., Kazemfar K., Agarwal A. Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells: implications in the antiproliferative response to rapamycin. *Circulation*. 2003, 107, 911-6.

252. Volpers C., Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J. Gene Med.* 2004,6,S164-71.
253. Von Der Thusen J.H., Kuiper J., Fekkes M.L., De Vos P., Van Berkel T.J., Biessen E.A. Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J.* 2001,15,2730-2.
254. Walter D.H., Cejna M., Diaz-Sandoval L., Willis S., Kirkwood L., Stratford P.W., Tietz A.B., Kirchmair R., Silver M., Curry C., Wecker A., Yoon Y.S., Heidenreich R., Hanley A., Kearney M., Tio F.O., Kuenzler P., Isner J.M., Losordo D.W. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation.* 2004,110,36-45.
255. Wang H., Keiser J.A. Expression of membrane-type matrix metalloproteinases in rabbit neointimal tissue and its correlation with matrix metalloproteinase-2 activation. *J. Vasc. Res.* 1997,35,45-54.
256. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res.* 1998;83:832-40.
257. Wang T., Li H., Zhao C., Chen C., Li J., Chao J., Chao L., Xiao X., Wang D.W. Recombinant adeno-associated virus-mediated kallikrein gene therapy reduces hypertension and attenuates its cardiovascular injuries. *Gene Ther.* 2004,11,1342-50.
258. Wang Z., Castresana M.R., Newman W.H. Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001,285,669-74.
259. Waston J.D., Crick F.H. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953,171,964-7,.
260. Watanabe S., Temin H.M. Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors. *Molec. Cel. Biol.* 1983,3,2241-9.
261. Waugh J.M., Yuksel E., Li J., Kuo M.D., Kattash M., Saxena R. et al. Local overexpression of thrombomodulin for in vivo prevention of arterial thrombosis in a rabbit model. *Circ. Res.* 1999,84,84-92.
262. White S.J., Nicklin S.A., Buning H., Brosnan M.J., Leike K., Papadakis E.D., Hallek M., Baker A.H. Targeted gene delivery to vascular tissue in vivo by tropism-modified adeno-associated virus vectors. *Circulation.* 2004,109,513-9.
263. Willis R.C., Jolly D.J., Miller A.D., Plent M.M., Esty A.C., Anderson P.J., Chang H.C., Jones O.W., Seegmiller J.E., Friedmann T. Partial phenotypic

- correction of human Lesch-Nyhan (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase-deficient) lymphoblasts with a transmissible retroviral vector. *J. Biol. Chem.* 1984,259,7842-9.
264. Wilson J.M. Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther.* 1992,3,179-222.
265. Wise L.M., Veikkola T., Mercer A.A., Savory L.J., Fleming S.B., Caesar C. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR-2 and neuropilin-1. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 1999, 96,3071-6.
266. Work L.M., Nicklin S.A., Baker A.H. Targeting gene therapy vectors to the vascular endothelium. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2003,5,163-70.
267. Work L.M., Ritchie N., Nicklin S.A., Reynolds P.N., Baker A.H. Dual targeting of gene delivery by genetic modification of adenovirus serotype 5 fibers and cell-selective transcriptional control. *Gene Ther.* 2004, 11, 1296-300.
268. Yamada Y., Nezu J., Shimane M., Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics.* 1997,42,483-8.
269. Yamauchi A., Ito Y., Morikawa M., Kobune M., Huang J., Sasaki K., Takahashi K., Nakamura K., Dehari H., Niitsu Y., Abe T., Hamada H. Pre-administration of angiopoietin-1 followed by VEGF induces functional and mature vascular formation in a rabbit ischemic model. *J. Gene Med.* 2003, 5,994-1004.
270. Yan Z., Zak R., Luxton G.W., Ritchie T.C., Bantel-Schaal U., Engelhardt J.F. Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J. Virol.* 2002,76,2043-53.
271. Yang Y., Vanin E.F., Whitt M.A., Fornerod M., Zwart R., Schneiderman R.D., Grosveld G., Nienhuis A.W. Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum. Gene Ther.* 1995,6,1203-13.
272. Ylä-Herttuala S., Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat. Med.* 2003,9,694-701.
273. Ylä-Herttuala S., Luoma J., Viita H., Hiltunen T., Sisto T., Nikkari T. Transfer of 15-lipoxygenase gene into rabbit iliac arteries results in the appearance of oxidation-specific lipid-protein adducts characteristic of oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1995,95,2692-8.

274. Ylä-Herttuala S., Palinski W., Rosenfeld M.E., Parthasarathy S., Carew T.E., Butler S. et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 1989,84, 1086-95.
275. Zabala M., Wang L., Hernandez-Alcoceba R., Hillen W., Qian C., Prieto J., Kramer M.G. Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. *Cancer Res.* 2004, 64,2799-804.
276. Zaiss A.K., Liu Q., Bowen G.P., Wong N.C., Bartlett J.S., Muruve D.A. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 2002,76,4580-90.
277. Zempo N., Koyama N., Kenagy R.D., Lea H.J., Clowes A.W. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 1996,16,28-33.
278. Zhang M., Zhang B.H., Chen L., An W. Overexpression of heme oxygenase-1 protects smooth muscle cells against oxidative injury and inhibits cell proliferation. *Cell. Res.* 2002,12,123-32.
279. Zhang Y.C., Bui J.D., Shen L.P., Phillips M.I. Antisense inhibition of  $\beta$ 1-adrenoceptor mRNA in a single dose produces a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2000,101,682-8.
280. Zhao Q., Egashira K., Hiasa K., Ishibashi M., Inoue S., Ohtani K., Tan C., Shibuya M., Takeshita A., Sunagawa K. Essential role of vascular endothelial growth factor and flt-1 signals in neointimal formation after periaortic injury. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2004,24,2284-9.
281. Zhao Q., Ishibashi M., Hiasa K., Tan C., Takeshita A., Egashira K. Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling. *Hypertension* 2004,44,264-70.
282. Zhao Y.D., Campbell A.I., Robb M., Ng D., Stewart D.J. Protective role of angiotensin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 2003, 92, 984-91.
283. Zhou YF, Stabile E, Walker J, Shou M, Baffour R, Yu Z, Rott D, Yancopoulos GD, Rudge JS, Epstein SE. Effects of gene delivery on collateral development in chronic hypoperfusion: diverse effects of angiotensin-1 versus vascular endothelial growth factor. *J. Am Coll. Cardiol.* 2004, 44, 897-903.



- 
284. Zoldhelyi P., McNatt J., Xu X.M., Loose-Mitchell D., Meidell R.S., Clubb F.J. Jr et al. Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. *Circulation* 1996,93,10–17.