



Terapia genowa chorób układu krążenia

Józef Dulak
Gen-Tech, Kraków

Gene therapy of cardiovascular diseases

Summary

Gene therapy is suggested to be beneficial for the treatment of diseases which are difficult or impossible to be cured by classical pharmacotherapy. Thus, the transfer of genetic material of potential therapeutic properties may be particularly helpful in the treatment of hereditary genetic disorders and cancer. However, serious technical obstacles, especially the lack of efficient vectors for the delivery of therapeutic genes have so far prevented the achievement of convincing therapeutic effects. On the other hand, the complications of atherosclerosis, such as heart or peripheral ischemia, seem to be good candidates for genetic strategies aimed particularly at stimulation of angiogenesis. As in this case therapeutic genes should be expressed locally and in a short time there is a good chance that the application of this therapy will take place earlier than in the case of other disorders. In this paper the first gene therapy clinical trials in human cardiovascular diseases are described. The latest investigations on the basic mechanisms of the blood vessel wall physiology and relationships between factors involved in angiogenesis are also briefly mentioned.

Key words:

gene therapy, atherosclerosis, angiogenesis, nitric oxide, vascular endothelial growth factor.

Adres do korespondencji Address for correspondence

Józef Dulak,
Gen-Tech,
ul. Stróża Rybna 16/6,
30-714 Kraków;
e-mail:
gen-tech@kraknet.pl lub
dulak@gen-tech.krakow.pl

biotechnologia

1 (48) 135-146 2000

1. Wprowadzenie

Terapia genowa polega na wprowadzeniu DNA lub RNA do komórek chorego organizmu w celu leczenia choroby. W zależności od tego, jakie komórki modyfikuje się przez transfer takiego materiału genetycznego, mamy do czynienia z somatyczną terapią genową lub terapią genową komórek linii płciowej. Z przyczyn etycznych dopuszczalna jest obecnie tylko somatyczna terapia genowa, modyfikująca aparat genetyczny komórek somatycznych.

2. Rodzaje terapii genowej

Lecznicy materiał genetyczny może być dostarczany do organizmu *ex vivo* oraz *in vivo* (1). W pierwszym przypadku chore komórki są pobierane z organizmu i transfekowane *in vitro*. Sposób taki zastosowano, np. w próbie leczenia chorych na homozygotyczną postać hipercholesterolemii rodzinnej, wprowadzając *in vitro* do hepatocytów chorych gen receptora lipoprotein o niskiej gęstości (rLDL), a następnie zmodyfikowane komórki wstrzyknięto do żyły wrotnej (2).

Terapia genowa *in vivo* polega na wprowadzeniu wektora, zawierającego leczniczy gen, bezpośrednio do komórek organizmu. W ten sposób, np. próbuje się stymulować tworzenie dodatkowych naczyń krwionośnych wstrzykując plazmid z genem czynnika wzrostu do niedotlenionego mięśnia sercowego, czy mięśni szkieletowych nóg.

Próby terapii genowej są obecnie podejmowane przede wszystkim w takich chorobach, które zagrażają życiu człowieka i dla których nie istnieją tradycyjne, skuteczne sposoby leczenia. Należą do nich choroby dziedziczne, np. mukowiscydoza, dystrofia mięśniowa Duchenne'a, czy genetyczna rodzinna hipercholesterolemia, złożone niedobory odporności i choroby nowotworowe (3). Za pomocą substytucyjnej terapii genowej można próbować leczyć oczywiście tylko takie choroby, dla których znana jest sekwencja genu, którego prawidłową postać wprowadza się do komórek. W innych chorobach, np. nowotworach, stosuje się także terapię „samobójczą” polegającą na użyciu genów, których ekspresja doprowadza do śmierci chorych komórek (4).

3. Sposoby wprowadzania genów terapeutycznych

3.1. Wektory

Największym problemem terapii genowej jest znalezienie skutecznych i bezpiecznych sposobów dostarczania genów terapeutycznych do chorych komórek. Rolę tę pełnią odpowiednio skonstruowane wektory (tab. 1). Wektory to odpowiednio zmodyfikowane wirusy lub plazmidy, które umożliwiają wprowadzenie genu terapeutycznego do komórki docelowej oraz powodują jego ekspresję (1).

W przypadku wektorów plazmidowych, a także, wówczas gdy czynnikiem terapeutycznym jest krótka sekwencja DNA ((antysens (5) lub pułapka oligonukleotydowa – ang. *decoy* (6)) niezbędne jest użycie dodatkowych środków, które umożliwią wprowadzenie materiału genetycznego do wybranych komórek.

Tabela 1

Rodzaje wektorów stosowanych w terapii genowej

Charakterystyka	Wektory retrowirusowe	Wektory adenowirusowe	Wektor wirusa opryszczki (HSV)	Wektory AAV (<i>adeno-associated virus</i>)	Wektor oparty na wirusie ospy (<i>vaccinia pox virus</i>)	Wektory plazmidowe
pojemność wektora	8 kb	7-8 kb	30 kb	4.5 kb	ponad 30 kb	teoretycznie bez ograniczeń
integracja do genomu komórki	tak	wyjątkowo	nie	tak (w określone miejsce na chromosomie 19)	nie	nie
specyficzność tkankowa	tak	tak	tak	nie	nie	nie
właściwości	transfekuje tylko komórki dzielące się	transfekuje także komórki nie dzielące się	transfekuje komórki centralnego układu nerwowego	transfekuje komórki nie dzielące się	transfekuje wiele typów komórek	transfekuje wiele typów komórek
sposób podawania	<i>ex vivo</i> lub <i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i> lub <i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i> lub <i>in vivo</i>	prawdopodobnie tylko <i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i> – podskórnie	<i>ex vivo</i> – (za pomocą liposomów) lub <i>in vivo</i> (w postaci tzw. nagiego DNA – np. do mięśni szkieletowych mięśnia sercowego)
czas trwania ekspresji	długotrwała	przejęciowa	przejęciowa	możliwa długotrwała ekspresja	przejęciowa	przejęciowa
poziom ekspresji	umiarkowany	wysoki	umiarkowany	umiarkowany	wysoki	zazwyczaj bardzo niski
bezpieczeństwo stosowania	ryzyko mutagenyzy insercyjnej	wysokie ryzyko reakcji zapalnej (prawdopodobnie niskie w przypadku wektorów IV generacji)	ryzyko mutagenyzy insercyjnej	ryzyko mutagenyzy	niebezpieczne u pacjentów z immunosupresją	bezpieczne

3.2. Metody transfekcji

Sposoby wprowadzania genów do komórek możemy podzielić na kilka rodzajów (tab. 2) (1). Można zatem stosować metody fizyczne, takie jak elektroporacja, czyli traktowanie komórek przez krótki okres wysokim napięciem. Dochodzi wówczas do powstania porów w błonie cytoplazmatycznej, przez które do komórki może się dostać wektor.

Tabela 2

Metody terapii genowej

I. Rodzaje terapii genowej

A. Podział ze względu na rodzaj transfekowanych komórek

1. Terapia somatyczna
2. Terapia komórek linii płciowej

II. Podział ze względu na sposób terapii

A. Terapia substytucyjna – wprowadzenie prawidłowej formy niefunkcjonalnego genu

B. Terapia hamująca:

- cytotoksyczna – aktywność genu terapeutycznego doprowadza do śmierci komórki
- hamowanie ekspresji genów komórkowych – stosowanie antysensów, rybozymów, aptamerów

III. Podział ze względu na sposób transferu genów

A. Chemiczne – transfekcja za pomocą fosforanu wapnia

B. Fizyczne

- elektroporacja
- „strzelba genowa” (*gene gun*)

C. Rekombinowane wektory wirusowe (tab. 1)

D. Wektory niewirusowe (plazmidowe)

- liposomy
- kompleksy ligand-polilizyna-DNA
- dendrimery
- endocytoza w oparciu na receptorach (np. liposomy HSVJ)
- syntetyczne kompleksy peptydowe
- sztuczne wektory wirusowe
- sztuczne chromosomy

IV. Podział ze względu na sposób administracji genów terapeutycznych

1. Implantacja zmienionych genetycznie komórek
2. Wstrzyknięcie nagiego DNA (plazmidy; antysensy, rybozomy, aptamery)
3. Endocytoza w oparciu na receptorach (np. liposomy HSVJ)

Metody chemiczne polegają na użyciu substancji umożliwiających wektorom wniknięcie do komórek (tab. 2). Najczęściej stosowane są liposomy kationitowe, które po otoczeniu ujemnie naładowanego DNA pobierane są przez komórki najprawdopodobniej

na drodze endocytozy (1,7). Ten sposób transfekcji stosuje się najczęściej, wówczas gdy wektorem zawierającym gen terapeutyczny jest plazmid. W odróżnieniu od nich wektory wirusowe nie wymagają zazwyczaj wspomagania. Wnikają do komórek dzięki łączeniu się z rozpoznawanym przez wirusa receptorem na powierzchni komórki.

Wydajność transfekcji zależy nie tylko od skutecznego wnikięcia wektora do komórki, ale i od tego, jak długo wektor utrzymuje się w komórce i jaka jest ekspresja wprowadzonego genu. Najdłuższą ekspresję zapewniają wektory wirusowe, zwłaszcza te, które integrują się do genomu komórki. Stąd np. wektory retrowirusowe są badane pod kątem ich zastosowania w chorobach dziedzicznych, gdy wymagana jest długotrwała, praktycznie przez całe życie ekspresja genu terapeutycznego. Wektory te mają jednak liczne wady, przede wszystkim taką, że zakażają tylko komórki dzielące się, co w istotny sposób ogranicza zakres ich stosowania (tab. 1).

Duże nadzieje wiąże się z wektorami adenowirusowymi, które mogą transfekować wiele rodzajów komórek i nie są zależne od ich podziałów (1). Dotychczas stosowane adenowirusy nie umożliwiały uzyskania długotrwałej ekspresji, bowiem często dochodziło do rozwoju reakcji zapalnej organizmu w odpowiedzi na białka adenowirusowe (8). Obecnie prowadzone są jednak badania nad tzw. adenowirusami IV generacji, które nie wywołują stanu zapalnego, i dzięki temu mogą zapewnić długotrwałą ekspresję genu terapeutycznego (1).

4. Próby kliniczne

Pierwsza próba terapii genowej u ludzi miała miejsce w roku 1990, kiedy to zespół Michaela Blaese'a i Frencha Andersona z Narodowego Instytutu Zdrowia w Bethesda (USA) wprowadził za pomocą wektora retrowirusowego gen deaminazy cytozynowej (ADA) do limfocytów wyizolowanych z krwi dziewczynki chorej na ciężki niedobór odporności spowodowany brakiem tego genu (9) (tab. 3). Zmodyfikowane genetycznie komórki wstrzyknięto do krwi dziecka, a całą procedurę powtarzano kilkakrotnie (9).

Dziewczynka ta, a także inna cierpiąca na tę chorobę, uczęszcza normalnie do szkoły, co wcześniej było niemożliwe w przypadku dzieci obarczonych tą chorobą. Trzeba jednak zaznaczyć, że doświadczenie to nie może być bez wątpliwości uznane za udaną próbę terapii genowej. Ze względów etycznych dziewczynkom nieprzerwanie podawane są zastrzyki zawierające gotowy enzym ADA. Stan zdrowia tych dzieci jest lepszy niż innych leczonych tylko samym enzymem (10,11), ale trudno jednoznacznie stwierdzić, czy poprawa u tych pacjentek spowodowana jest zastosowaną terapią genową.

Doświadczenie Andersona i jego współpracowników umożliwiło rozpoczęcie dalszych testów klinicznych terapii genowej. Do roku 1998 przeprowadzono lub rozpoczęto ponad 200 protokołów klinicznych terapii genowej, które objęły ponad 2000 pacjentów (tab. 3) (1,11).

Tabela 3

Próby terapii genowej u ludzi

I. Protokoły zatwierdzone w Stanach Zjednoczonych1. *AIDS*

- rybozomy trawiące RNA wirusa HIV
 - modyfikowane limfocyty cytotoksyczne (CD8+)
 - antysensy
 - komórki macierzyste krwi (CD34+) transfekowane rybozymem anti-HIV
-

2. *Nowotwory*

- immunoterapia (limfocyty transfekowane genem IL-4, IFN, IL-7, IL-12, GM-CSF, B7)
 - geny hamujące proliferację komórek (Rb, p53)
 - terapia cytotoksyczna (gen kinazy tymidylowej + gancyklowir; gen deaminazy cytozynowej + 5-fluorocytozyna)
 - wprowadzanie genów odporności na chemoterapię do zdrowych komórek hematopoetycznych
 - oligonukleotydy antysensowe (c-myc, c-fos)
-

3. *Choroby układu krążenia*

- terapia rodzinnej homozygotycznej hipercholesterolemii (gen receptora LDL)
 - stymulacja angiogenezy: w krytycznym niedokrwieniu kończyn (chromanie przestankowe)
 - w chorobie wieńcowej
 - w chorobie Buergera
-

4. *Choroby dziedziczne*

- niedobory odporności (gen ADA, inne geny)
 - mukowiscydoza (gen CFTR – kanału chlorkowego)
 - anemia Fanconiego
 - choroba Gauchera (gen glukocerebrosydyazy)
-

5. *Inne schorzenia – reumatoidalne zapalenie stawów (geny cytokin przeciwzapalnych)***II. Protokoły zatwierdzone w innych krajach**

- 1. Nowotwory – m.in. w Polsce, Poznań, immunizacja w czerniaku (IL-6 i rozpuszczalny receptor IL-6)
-

5. Terapia genowa w chorobach układu krążenia

Próby terapii genowej w chorobach układu krążenia podejmowane są w stosunku do takich schorzeń, w których zawodzi leczenie farmakologiczne, a zabiegi chirurgiczne nie są wystarczająco skuteczne lub pociągają za sobą szereg komplikacji. Większość z tych problemów jest konsekwencją miażdżycy tętnic (12-15).

Przyczyną rozwoju miażdżycy jest zaburzenie funkcji śródbłonna naczyń, wywołane m.in. nadmiernym stężeniem cholesterolu LDL (*low density lipoproteins*) i jego postaci zmodyfikowanych, czyli utlenionych LDL (16). Gromadzą się one w ścianie tętnic, a rozwi-

jająca się blaszka miażdżycowa zwęża światło naczynia. Pęknięcie niestabilnej blaszki miażdżycowej może doprowadzić do powstania zakrzepu, a w konsekwencji do zawału serca czy udaru mózgu.

Wspomniana już homozygotyczna rodzinna hipercholesterolemia jest przykładem genetycznie uwarunkowanej miażdżycy. Ze względu na mutacje genu receptora LDL (rLDL) zaburzone jest usuwanie nadmiaru cholesterolu z krążenia, co prowadzi do rozwoju miażdżycy już w dzieciństwie i wczesnej śmierci z powodu zawałów serca. Nie ma skutecznego lekarstwa na tę chorobę. Nieprzydatne okazują się leki obniżające poziom cholesterolu, tzw. statyny (inhibitory reduktazy HMGCoA), bowiem ich działanie wymaga obecności sprawnych receptorów LDL (zob. 17). Stosuje się zatem u tych chorych aferezę krwi, polegającą na jej filtrowaniu przez specjalne kolumny, w których osadza się nadmiar LDL (18). Zabieg taki, mimo że bardzo skuteczny, nie leczy jednak choroby, lecz tylko na pewien czas usuwa jej konsekwencje. Jest ponadto bardzo kosztowny i trzeba go stosować właściwie do końca życia pacjenta.

5.1. Terapia genowa rodzinnej hipercholesterolemii

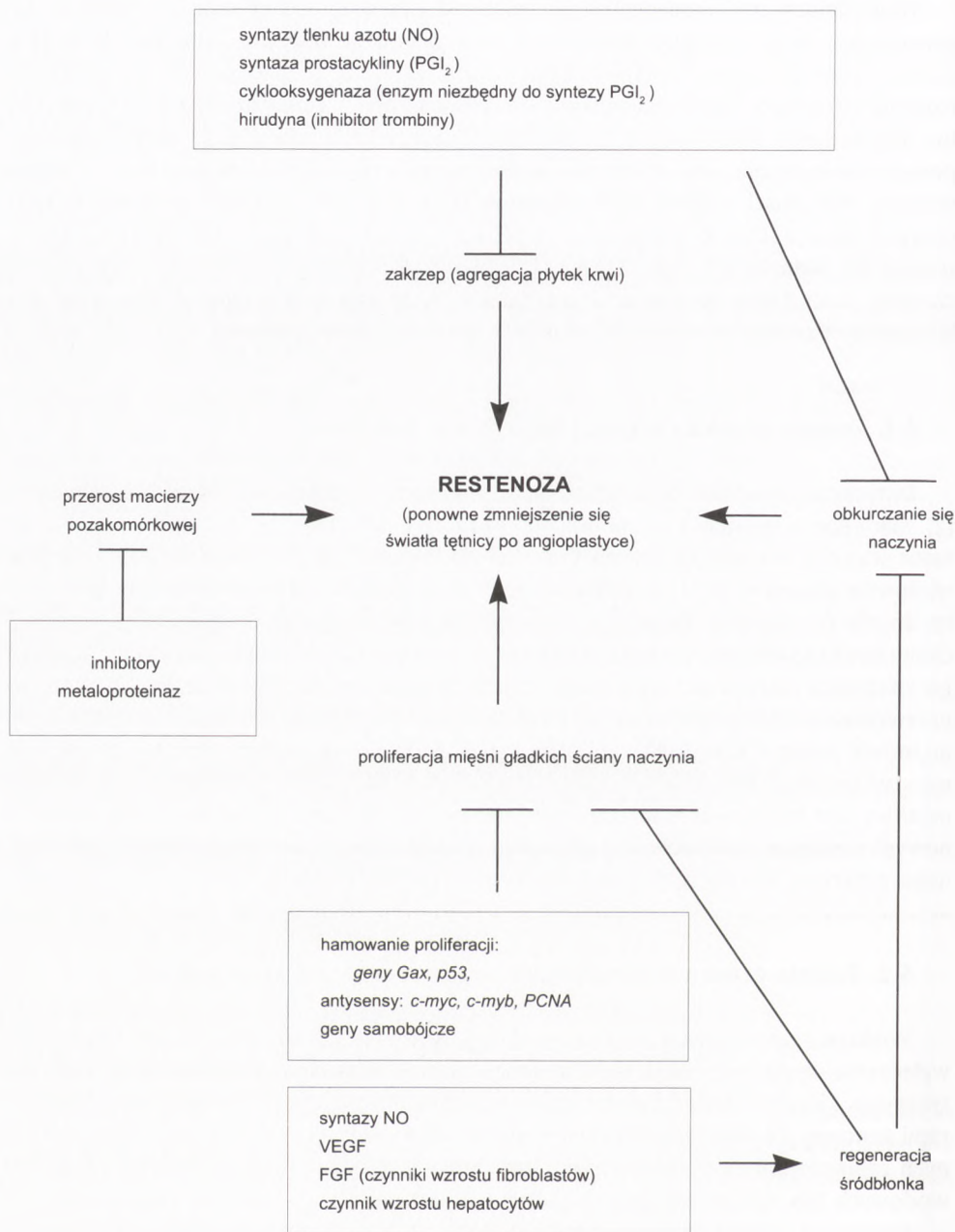
Dotychczas wiadomo o jednej próbie terapii genowej hipercholesterolemii człowieka (2). Mary Ann Grossman i Joseph Michel, badacze z Ann Arbor w Michigan, wycięli fragment wątroby sześciu pacjentom i *in vitro* wprowadzili do hepatocytów wektor z prawidłowym genem rLDL. U wszystkich osób, którym podano ich zmodyfikowane hepatocyty, doszło do ekspresji genu rLDL i obniżył się poziom cholesterolu we krwi. Stężenie cholesterolu spadło jednak tylko o kilkanaście procent (2). Wynik taki nie ma szczególniego znaczenia terapeutycznego, gdyż u tych chorych poziom cholesterolu LDL we krwi przewyższał wielokrotnie normalne stężenie charakterystyczne dla ludzi zdrowych. Trudno mówić zatem o sukcesie terapii genowej w sytuacji, gdy zmniejszenie zawartości LDL we krwi powinno być znaczne i długotrwałe. Jednakże badanie to dobitnie pokazuje, że możliwe jest korygowanie metabolizmu lipidów w organizmie. Być może zastosowanie nowych rodzajów wektorów, dających długotrwałą i wysoką ekspresję genu terapeutycznego przyczyni się do znalezienia skutecznej metody leczenia.

5.2. Terapia genowa w zapobieganiu restenozie naczyń krwionośnych

Większe szanse powodzenia ma terapia genowa w tych schorzeniach, w których dla wyleczenia wystarczyć może krótkotrwała, lokalnie wzmożona ekspresja genu terapeutycznego. Pierwsze próby doświadczalne wskazują na możliwość zastosowania takiej terapii genowej dla zapobiegania restenozie, która rozwija się u 30-50% pacjentów poddanych zabiegowi angioplastyki, czyli udroźnienia zwężonych przez miażdżycę tętnic obwodowych lub naczyń wieńcowych serca (zob. (12-15)).

Restenoza, czyli ponowne zwężenie się światła naczynia jest procesem złożonym (rys. 1) (19). Nie dochodzi jednak do niej, gdy zregeneruje się warstwa komórek śródbłonna, wyścielejących światło naczynia. Produkowane przez śródbłonek substancje,

TERAPIA GENOWA W ZAPOBIEGANIU RESTENOZIE



Rys. 1. Terapia genowa w zapobieganiu restenozie po zabiegach poszerzania zwężonego światła naczyń.

a zwłaszcza tlenek azotu (NO) i prostacyklina (PGI₂) skutecznie chronią ścianę naczynia przed zmianami patologicznymi, polegającymi m.in. na nadmiernym obkurczeniu się naczynia, proliferacji mięśni gładkich, przyleganiu do ściany płytek krwi i ich agregacji (16,20).

Pierwszą próbę powstrzymania rozwoju restenozy za pomocą zabiegu terapii genowej podjął zespół Victora Dzau ze Stanford University (21). Badacze ci wykazali, że wprowadzanie wołowego genu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu do uszkodzonej przez angioplastykę tętnicy szyjnej szczura hamuje zmniejszanie się światła naczynia. Wyniki te były później wielokrotnie potwierdzone przez innych badaczy (12-15).

5.3. Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF)

Restenozie można też zapobiec przyspieszając regenerację komórek uszkodzonego śródbłonka. Najlepszym jest dla tego rodzaju terapii specyficzny mitogen dla tych komórek – naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF- ang. *vascular endothelial growth factor*) (22).

VEGF jest produkowany przez wiele typów komórek, a w ścianie naczynia jego źródłem są przede wszystkim komórki mięśniowe (22). Najsilniejszym induktorem syntezy VEGF jest niedotlenienie tkanek. Syntezę VEGF obserwuje się zatem w niedotlenieniu mięśnia sercowego i szkieletowego (23). Z powodu niedotlenienia oraz działania cytokin do ekspresji VEGF dochodzi w ścianie naczynia po zabiegu angioplastyki u szczura (23,24). Również tlenek azotu może stymulować syntezę VEGF w mięśniach gładkich ściany naczynia (26). Z nieznanых powodów synteza VEGF jest jednak niewystarczająca, by wydajnie stymulować regenerację śródbłonka.

Podjęte zostały zatem próby wzmocnienia endogennej syntezy VEGF. Podanie egzogenego białka VEGF po angioplastyce doprowadziło do regeneracji śródbłonka i w konsekwencji zapobiegało proliferacji VSMC w tętnicach operowanych zwierząt (27,28). W dalszych badaniach dowiedziono, że transfekcja genu VEGF do tętnic biodrowych królika poddanych angioplastyce hamuje rozwój restenozy (29). Mimo niewielkiej wydajności transfekcji lokalna ekspresja genu VEGF w ścianie naczynia była na tyle wysoka, by stężenie białka VEGF w surowicy królików wzrosło dwukrotnie (29). Ponadto, krążący we krwi VEGF zapobiegał restenozie również w drugiej tętnicy biodrowej królika, poddanej angioplastyce, lecz bez miejscowej transfekcji genu (29).

Przedstawione wyniki pozwalają na przypuszczenie, że zwiększenie ekspresji VEGF przyczyni się do zahamowania rozwoju restenozy poprzez odtworzenie funkcjonalnego śródbłonka. W konsekwencji powinno dojść do przywrócenia generacji NO hamującego proliferację VSMC, utrzymującego fizjologiczny stan napięcia ściany naczynia oraz hamującego patologiczną aktywność płytek i leukocytów.

Mimo obiecujących wyników badań na zwierzętach dość odległa jest jednak, jak się wydaje, możliwość zastosowania transferu genów podczas angioplastyki tętnic człowieka. Jest to spowodowane przede wszystkim brakiem skutecznych cewników, które mogłyby posłużyć do wprowadzenia wektorów do ściany naczynia (30-32). U zwierząt transfer genu trwa zazwyczaj kilkanaście minut, w trakcie których przepływ krwi w tętnicy jest

bardzo ograniczony. Takiego zabiegu nie można stosować u ludzi. Problemem może być także wystarczająca wydajność transfekcji do tętnicy zmienionej przez miażdżycę, a z takim naczyńm mamy przecież do czynienia u pacjentów.

5.4. Terapia genowa stymuluje tworzenie naczyń krwionośnych

Znacznie bliższa, jak się wydaje, jest natomiast możliwość stosowania terapii genowej w stymulacji angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych, w niedokrwnionych kończynach bądź też w sercu.

W krytycznym niedokrwieniu kończyn dolnych dochodzi do znacznego niedotlenienia mięśni nóg na skutek zwężenia czy wręcz zamknięcia przez blaszki miażdżycowe światła tętnic (32). Rozwija się co prawda krążenie oboczne, ale jest ono niewystarczające. Pacjenci odczuwają silny ból w nogach i nie są w stanie pokonać nawet niewielkich odległości – chorobę tę nazywamy chromaniem przestankowym (32). Podejmowane próby angioplastyki nie zawsze przynoszą spodziewany efekt i chorym w skrajnych przypadkach grozi nawet amputacja (32).

Przypuszczano, że chromanie przestankowe może dość łatwo poddać się leczeniu za pomocą terapii genowej. Wynika to z właściwości komórek mięśni szkieletowych, które mogą być transfekowane nawet za pomocą tzw. nagiego DNA, czyli samego plazmidu, bez konieczności użycia liposomów (33).

W marcu 1998 r. Baumgartner i wsp. poinformowali o sukcesie domięśniowego podania plazmidu z cDNA VEGF dziewięciu chorym z krytycznym niedokrwieniem kończyn (34). Pod wpływem VEGF produkowanego przez ulegający ekspresji egzogeny cDNA owrzodzenia na nogach zagoiły się, co m.in. pozwoliło zapobiec amputacji grożącej trzem pacjentom.

Zespół ten, kierowany przez Jeffreya Isnera, stosuje również terapię genową u chorych z zaawansowaną chorobą wieńcową. Również i w tych badaniach stosowany jest VEGF. Chorzy otrzymywali do mięśnia sercowego zastrzyk plazmidu zawierającego cDNA tego czynnika. Po kilku miesiącach stan większości z nich znacznie się poprawił, a w sercu stwierdzono zwiększenie liczby naczyń krwionośnych.

Zespół Isnera podjął również próbę leczenia choroby Burgera – ciężkiego schorzenia naczyń żylnych, którego występowanie jest bardzo silnie związane z paleniem tytoniu (36). Pierwsze próby transferu genu VEGF wskazują na możliwość uzyskania pozytywnego efektu – stymulację angiogenezy w niedotlenionych kończynach (37). Gdyby terapia taka stała się powszechnie dostępna, byłaby to olbrzymia szansa dla tych ludzi, którym w miarę rozwoju choroby grozi amputacja kończyn.

6. Podsumowanie

Opisane przykłady zastosowania terapii genowej w chorobach układu krążenia poprzedzone były kilkuletnimi badaniami na zwierzętach. Pierwsze udane próby kliniczne pozwalają mieć nadzieję, że tam, gdzie możliwe jest zastosowanie prostych wektorów

i nie jest wymagana długotrwała ekspresja genu, terapia genowa będzie niedługo powszechnie stosowana. Dotyczy to w szczególności terapeutycznej stymulacji angiogenezy, którą można osiągnąć dość prostymi metodami. Duże nadzieje wiąże się również ze skierowaną na naczynia krwionośne terapią genową nowotworów, której celem jest zahamowanie angiogenezy, przyspieszającej rozwój nowotworów. Nadchodzące dziesięciolecie powinno wykazać, w jakim stopniu terapia genowa może być stosowana w praktyce lekarskiej.

Niektóre prace cytowane w tekście zostały wykonane przy współudziale autora w Zakładzie Biochemii Klinicznej Collegium Medicum UJ w Krakowie, w ramach kierowanego przez autora grantu KBN nr 4 P05A 131 14.

Literatura

- Jain K. K., (1998), *Textbook of Gene Therapy*, Hogrefe & Huber Publishers, Seattle, Toronto, Bern, Gottingen.
- Grossman M., Rader D. J., Muller D. W. M., et al. (1995), *Nature Med.*, 1, 1148-1154.
- Morgan R. A., Anderson W. F., (1993), *Annu Rev Biochem.*, 62, 191-217.
- Chang M. W., Barr E., Seltzer J., Jiang Y. Q., Nabel G. J., Parmacek M. S., Leiden J. M., (1995), *Science*, 267, 518-522.
- Antisense Therapeutics*, (1996), Ed. Agrawal S., Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Morishita R., Gibbons G. H., Horiuchi M., Ellison K. E., Nakajima M., Zhang L., Kaneda Y., Ogihara T., Dzau V. J., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5855-5859.
- Stephan D. K., Yang Z-Y., San H., Simari R. D., Wheeler C. J., Felgner P. L., Gordon D., Nabel G. J., Nabel E. G., (1996), *Hum. Gene Ther.*, 7, 1803-1812.
- Newman K. D., Dunn P. F., Owens J. W., Schulick A. H., Virmani R., Sukhova G., Libby P., Dichek D. A., (1995), *J. Clin. Invest.*, 96, 2955-2965.
- Blaese R. M., Culver K. W., Anderson W. F., (1990), *Human Gene Therapy*, 1, 399-410.
- Blaese R. M., Culver K. W., Miller A. D., et al. (1995), *Science*, 270, 475-480.
- Anderson W. F., (1998), *Nature*, 392 (6679 Suppl), 25-30.
- Laitinen M., Yla-Herttuala S., (1998), *Current Opinion Lipidol*, 9, 465-469.
- Gibbons G. H., Dzau V. J., (1996), *Science*, 272, 689-693.
- Dulak J., Józkwicz A., Heba G., Dembińska-Kieć A., (1997), *Czynniki Rzyka*, 3-4, 70-79.
- Dulak J., Dembińska-Kieć A., (1998), *Kardiologia Pol.*, 48, Suppl II, 106-108.
- Ross R., (1999), *New Engl. J. Med.*, 340, 115-126.
- Dulak J., Dembińska-Kieć A., (1999), *Czynniki Rzyka*, 1, 61-66.
- Bartus S., Konduracka E., Partyka Ł., Pankiewicz J., Dudek D., Piwowarska W., Dubiel J., Dziatkowiak A., Dembińska-Kieć A., (1997), *Acta Angiologica*, 3, 69-74.
- Bauters C., Meurice T., Hamon M., McFadden E., Lablanche J-M., Bertrand M. E., (1996), *Cardiovasc Res.*, 31, 835-846.
- Cooke J. P., Dzau V. J., (1997), *Ann Rev. Med.*, 48, 489-509.
- Von der Leyen H. E., Gibbons G. H., Morishita R., Lewis N. P., Zhang L., Nakajima M., Kaneda Y., Cooke J. P., Dzau V. J., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1137-1141.
- Neufeld G., Cohen T., Genginovitch S., Poltorak Z., (1999), *FASEB J.*, 13, 9-22.
- Dembińska-Kieć A., Dulak J., Partyka Ł., Krzesz R., Dudek D., Bartus S., Polus M., Guevara I., Wybrańska I., Krzemiński T., (1997), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 433, 163-167.
- Joly G. A., Schini V. B., Vanhoutte P. M., (1992), *Circ. Res.*, 71, 331-338.
- Dembińska-Kieć A., Dulak J., Partyka Ł., Huk I., Maliński T., (1997), *Nature Med.*, 3, 1177.
- Dulak J., Dembińska-Kieć A., Guevara I., Józkwicz A., Zdzienicka A., Żmudzińska-Grochot D., Florek I., Wójtowicz A., Szuba A., Cooke J. P., (2000), *Ather Thromb Vasc Biol*, 20.
- Banai S., Jaklitsch M. T., Shou M., Lazarous D. F., Scheinowitz M., Biro S., et al., (1994), *Circulation*, 89, 2183-2189.
- Takeshita S., Zhen L. P., Brogi E., Kearney M., Pu L. Q., Bunting S., et al. (1994), *J. Clin. Invest.*, 93, 662-670.

29. Asahara T., Bauters C., Pastore C., Kearney M., Rossow S., Bunting S., Ferrara N., Symes J. F., Isner J. M., (1995), *Circulation*, 91, 2793-2801.
30. De Young M. B., Dichek D. A., (1998), *Circ. Res.*, 82, 306-313.
31. Baek S., March K. L., (1998), *Circ. Res.*, 82, 295-305.
32. Topol E. J., Serruys P. W., (1998), *Circulation*, 98, 1802-1820.
33. Wolf J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., et al. (1990), *Science*, 274, 1465-1468.
34. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Kearney M., Walsh K., Isner J. M., (1998), *Circulation*, 97, 1114-1123.
35. Losordo D. W., Vale P. R., Symes J. F., Dunnington C. H., Esakof D. D., Maysky M., Asahare A. B., Lahti K., Isner J. M., (1998), *Circulation*, 98, 2800-2804.
36. Szuba A., Cooke J. P., (1998), *West J. Med.*, 168, 255-260.
37. Isner J. M., Baumgartner I., Rauh G., Schainfeld R., Blair R., Manor O., Razvi S., Symes J. F., (1998), *J. Vasc. Surg.*, 28, 964-973, Discussion 973-975.