

**Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski**

**Grzegorz Korpanty**

**Zastosowanie albuminowych mikrosfer w nieinwazyjnym,  
tkankowo selektywnym wprowadzeniu materiału  
genetycznego do komórek mięśnia sercowego**

**PRACA DOKTORSKA**

**Promotor pracy – Prof. dr hab. med. Teresa Adamek-Guzik**

**Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi Collegium  
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego**

**Kraków 2005**



***Mojej Kochanej Żonie Anuli oraz Synowi Jasiowi, pracę tę dedykuję***



## Spis treści

Wykaz skrótów używanych w pracy .....	7
Podziękowania .....	9
1. Wprowadzenie .....	11
1.1. Zasady oraz zastosowanie terapii genowej .....	13
1.2. Historia terapeutycznego zastosowania materiału genetycznego ..	14
1.3. Wektory stosowane w terapii genowej chorób układu sercowo- naczyniowego oraz metody wprowadzania materiału genetycznego do komórek .....	15
1.3.1. Wektory wirusowe .....	17
1.3.1.1. Retrowirusy .....	17
1.3.1.1.1. Lentivirusy .....	17
1.3.1.2. Adenowirusy .....	18
1.3.1.3. Wirusy skojarzone z Adenowirusami .....	18
1.3.2. Wektory niewirusowe .....	19
1.3.2.1. Liposomy .....	19
1.3.3. Metody wprowadzania wektorów do organizmu .....	20
1.3.3.1. Metoda wstrzykiwania materiału genetycznego .....	20
1.3.3.2. Próby nieinwazyjnego podawania materiału genetycznego do organizmów wielokomórkowych .....	21
1.4. Zastosowanie metod terapii genowej w próbach leczenia choroby niedokrwiennej serca .....	22
1.4.1. Mechanizmy angiogenezy .....	22
1.4.1.1. Struktura i funkcje naczyniowego czynnika wzrostu komórek śródbłonna .....	24
1.4.2. Mechanizmy arteriogenezy .....	28
1.5. Próby zastosowania metod terapii genowej w innych chorobach układu sercowo-naczyniowego .....	29
1.6. Wykorzystanie komórek macierzystych pnia (stem cells) w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego.....	30
1.7. Zasady echokardiografii kontrastowej .....	30
1.7.1. Terapeutyczne zastosowanie echokardiograficznych środków kontrastowych.....	33
1.7.2. Próby nieinwazyjnej oceny stanów dysfunkcji śródbłonna za pomocą echokardiograficznych środków kontrastowych .....	34
2. Założenia i cel pracy .....	36
3. Materiał i metodyka .....	38
3.1. Grupa badana .....	38
3.2. Metody .....	38
3.2.1. Przygotowanie materiału genetycznego w postaci plazmidu	38

3.2.2. Wytwarzanie albuminowych mikrosfer połączonych z materiałem genetycznym.....	40
3.2.3. Przygotowanie zwierząt oraz podanie genu za pomocą powodowanej falą ultradźwiękową destrukcji mikrosfer (UTMD) .....	41
3.2.4. Badania histochemiczne oraz immunohistochemiczne .....	42
3.2.5. Histochemiczne barwienie komórek śródbłonka naczyniowego za pomocą lektyny BS-I ( <i>Griffonia simplicifolia</i> ) .....	43
3.2.6. Immunohistochemiczne barwienie CD31(PECAM-1) – swoistego markera komórek śródbłonka naczyniowego, alfa-aktyny mięśni gładkich oraz hVEGF <sub>165</sub> .....	43
3.2.7. Barwienie preparatów <i>myocardium</i> hematoksyliną – eozyną	44
3.2.8. Barwienie preparatów <i>myocardium</i> metodą Giemsy .....	45
3.2.9. Wykrywanie obecności hVEGF <sub>165</sub> w mięśniu sercowym za pomocą techniki Western blot .....	45
3.2.10. Ocena gęstości naczyń włosowatych (kapilar) i arteriol w preparatach <i>myocardium</i> .....	47
3.2.11. Echokardiograficzna ocena funkcji <i>myocardium</i> przez określenie frakcji skracania oraz masy lewej komory mięśnia sercowego .....	47
3.3. Analiza statystyczna .....	48
4. Wyniki .....	49
4.1. Ocena ekspresji genu dla hVEGF <sub>165</sub> w mięśniu sercowym za pomocą metody Western blot oraz immunohistochemicznie .....	49
4.2. Badania histologiczne mięśnia sercowego w grupie zwierząt, która otrzymała plazmid dla hVEGF <sub>165</sub> .....	50
4.3. Zmiany gęstości kapilar oraz arteriol na terenie <i>myocardium</i> .....	53
4.4. Echokardiograficzna ocena funkcji <i>myocardium</i> .....	56
5. Dyskusja .....	58
6. Wnioski .....	68
7. Streszczenie .....	69
8. Piśmiennictwo .....	73
9. Wykaz fotografii, rycin i tabel .....	87

## Wykaz skrótów używanych w pracy

**AAVs** – wirusy skojarzone z adenowirusami  
**ADA** – deaminaza adenozyiny  
**DNA** – kwas dezoksyrybonukleinowy  
**dsDNA** – dwuniciowy DNA  
**EGF** – epidermalny czynnik wzrostu  
**FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów  
**HIF 1 $\alpha$**  – indukowany przez hipoksję czynnik (transkrypcyjny) 1 alfa  
**hVEGF** – ludzki naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka  
**ICAM-1** – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1  
**IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu  
**IgG** – immunoglobuliny klasy G  
**IL** – interleukina  
**MCP-1** – białko chemotaktyczne dla monocytów 1  
**MI** – indeks mechaniczny fali ultradźwiękowej  
**mRNA** – informacyjny kwas rybonukleinowy  
**NO** – tlenek azotu  
**PAI-1** – inhibitor aktywatora plazminogenu 1  
**PBS** – bufor fosforanowy  
**PDGF-B** – pochodzący z płytek czynnik wzrostu B  
**PIGF** – łożyskowy czynnik wzrostu  
**PTCA** – przezskórna wewnątrznacyniowa plastyka tętnic wieńcowych  
**RNA** – kwas rybonukleinowy  
**ssDNA** – jednoniciowy DNA  
**TGF** – transformujący czynnik wzrostu  
**TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy guza alfa  
**UTMD** – powodowana falą ultradźwiękową destrukcja mikrosfer  
**VCAM** – naczyniowa cząsteczka adhezyjna  
**VEGF** – naczyniowy czynnik wzrostu komórek śródbłónka  
**VEGFR** – receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu komórek śródbłónka  
**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia





## Podziękowania

Mojemu Promotorowi, Szanownej Pani Profesor dr hab. med. Teresie Adamek-Guzik, Kierownikowi Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, składam wyrazy głębokiej wdzięczności za opiekę promotorską podczas studiów doktoranckich, wszelką pomoc oraz cenne uwagi i wskazówki, które mi pomogły w przygotowaniu ostatecznej wersji niniejszej pracy.

Serdeczne podziękowania składam na ręce doktora Petera Frenkela za umożliwienie mi przeprowadzenia części doświadczalnej mojej pracy doktorskiej na University of Texas Southwestern Medical School at Dallas, Texas, USA oraz za wszelką okazaną mi pomoc i przyjaźń podczas naszej współpracy.

Serdecznie dziękuję technikowi laboratoryjnemu, To Hoa Thai, za naukę cierpliwości oraz pomoc w trakcie powstawania części doświadczalnej mojej pracy doktorskiej.

*I would like to thank doctor Peter Frenkel for making the experimental part of my PhD desertation possible at the University of Texas Southwestern Medical School at Dallas, Texas, USA. I am very grateful for all his help and friendship I experienced during our collaboration.*

*I thank To Hoa Thai, laboratory technician, for teaching me patience and for all his assistance in the experimental part of my PhD desertation.*



## 1. Wprowadzenie

Choroby układu sercowo-naczyniowego, u podłoża których leży miażdżyca naczyń tętniczych są nadal główną przyczyną śmiertelności w populacjach krajów Europy oraz Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej (4,38). Pomimo znacznego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie identyfikacji czynników ryzyka, profilaktyki, diagnostyki oraz metod leczenia, wg raportu Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization; WHO*) około 17 milionów ludzi na świecie, z czego około 4 miliony w Europie, umiera każdego roku z powodu choroby niedokrwiennej serca, udaru mózgu oraz niewydolności krążenia. Obecnie z powodu choroby niedokrwiennej serca umiera na świecie rocznie około 7 milionów ludzi. WHO przewiduje, że w 2020 roku liczba osób, u których będzie ona przyczyną śmierci wyniesie około 11 milionów (25,55,205). Niedokrwienie kończyn dolnych spowodowane miażdżycą tętnic rozwija się każdego roku u ok. 500-1000 na 1 milion osób, a jakość życia tych pacjentów jest porównywana z jakością życia chorych w fazie terminalnej choroby nowotworowej (1,56).

Pomimo zwiększonego dostępu chorych do wiedzy na temat tego czym jest miażdżyca, jak jej zapobiegać i jak bronić się przed jej skutkami oraz bez względu na coraz bardziej zaawansowane metody diagnostyczne i terapeutyczne, stanowi ona bardzo poważny problem epidemiologiczny na całym świecie. Za przyczynę tego zjawiska uznaje się zmiany w stylu życia, które przyspieszają rozwój miażdżycy. Główny nacisk kładzie się na palenie tytoniu, brak aktywności fizycznej oraz nawyki żywieniowe sprzyjające otyłości, cukrzycy typu II oraz hiperlipidemii. Choroby układu sercowo-naczyniowego spowodowane miażdżycą przestają być kojarzone wyłącznie z krajami wysoko rozwiniętymi ale dotyczą również mieszkańców krajów rozwijających się. Przyjmuje się, iż oprócz klasycznych czynników ryzyka miażdżycy, niska waga urodzeniowa noworodków oraz niedobór folianów w diecie, występujące częściej w tych krajach w porównaniu z krajami wysoko rozwiniętymi, stanowią jedną z możliwych przyczyn obserwowanych zjawisk (4).

Miażdżyca nie jest problemem cywilizacji nowożytnej lecz jej ślady odnajdujemy już w Starożytności. Zainteresowanie historią Starożytnego Egiptu w XIX wieku stało się przyczyną

wielu odkryć, które przybliżyły nas do poznania tej cywilizacji oraz życia starożytnych Egipcjan. Rozpoczęte ponad 150 lat temu badania zmumifikowanych ciał faraonów dały początek nowej dziedzinie nauki – paleopatologii. Jej pionier Sir Marc Armand Ruffer, ówczesny profesor Szkoły Medycznej w Kairze, zdefiniował ją jako „naukę o chorobach, o których możemy wnioskować na podstawie szczątków ludzkich bądź zwierzęcych pochodzących z przeszłości”. Szczególnie wiele cennych informacji na temat chorób serca i naczyń w Starożytnym Egipcie udało się uzyskać dzięki badaniom pod nazwą *Manchester Mummy Project* przeprowadzonych w latach 70-tych XX wieku na Manchester University's School of Biological Sciences (178,195).

Zmiany świadczące o miażdżycy w tętnicach Faraona Ramzesa II, który był władcą Egiptu w latach 1279-1213 p.n.e., opisano po raz pierwszy w 1852 roku podczas badań jego mumii (182). Najbardziej zaawansowane zmiany miażdżycowe stwierdzono natomiast w 1909 roku podczas badań mumii Faraona Meneftaha (192). Pierwszy opis nagłej śmierci, spowodowanej prawdopodobnie zawałem mięśnia sercowego, pochodzi z płaskorzeźb umieszczonych na ścianach grobowca zamożnego Egipcjanina, żyjącego w trakcie trwania VI Dynastii w latach 2625-2475 p.n.e (21).

Na podstawie wyników tych prac, możemy dzisiaj wnioskować o stanie zdrowia, chorobach oraz o prawdopodobnych przyczynach śmierci starożytnych Egipcjan. Zaawansowana miażdżycy aorty z towarzyszącymi masywnymi zwapnieniami oraz rozsiane w małych i średnich tętnicach płytki miażdżycowe nie były rzadkim znaleziskiem podczas badań wielu innych mumii. Zdziwiająco jest również to, że morfologia zmian miażdżycowych w tętnicach faraonów jest bardzo podobna do tej, którą znajdujemy dzisiaj w naczyniach współcześnie żyjących ludzi (130). Za ich prawdopodobną przyczynę przyjmuje się dietę, która w przypadku bogatych Egipcjan - a tych właśnie poddawano balsamowaniu i ich szczątki są dzisiaj przedmiotem badań - obfitowała w mięso, tłuszcze zwierzęce oraz jaja. Wraz z siedzącym trybem życia tej warstwy społecznej, sprzyjała ona rozwojowi miażdżycy. Badania innych niż egipskie, zachowanych szczątków ludzkich, pochodzących z różnych okresów w przeszłości, również stanowią dowód na to, że miażdżycy trapi człowieka już od bardzo dawna (36,231).

Dzisiaj, dzięki coraz doskonalszym narzędziom badawczym z zakresu biologii molekularnej, staje się możliwe przybliżenie naszej wiedzy o patofizjologii miażdżycy. Prowadzi to do lepszego zrozumienia mechanizmów wyzwalających, podtrzymujących oraz hamujących ten proces. W przyszłości wyniki tych badań pozwolą na opracowanie jeszcze bardziej skutecznych metod jej zapobiegania oraz leczenia. Prowadzone badania nad coraz bardziej efektywnymi środkami farmakologicznymi, inwazyjnymi, chirurgicznymi oraz nowymi metodami terapii (terapia genowa, wykorzystanie komórek macierzystych pnia), mają na celu opracowanie skuteczniejszych

metod leczenia miażdżycy oraz jej powikłań. Szczególnie duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem metod terapii genowej, która w obecnej chwili stanowi przedmiot intensywnych badań oraz prób klinicznych.

### **1.1. Zasady oraz zastosowanie terapii genowej**

Terapią genową nazywamy wprowadzanie materiału genetycznego w postaci kwasów nukleinowych do wnętrza komórek w celu wywołania efektu terapeutycznego (166). W większości przypadków, materiałem genetycznym jest kwas dezoksyrybonukleinowy (*Deoxyribonucleic acid; DNA*), którego sekwencja albo zastępuje wadliwy gen (np. będący wynikiem mutacji) albo koduje dodatkowe białko(a) posiadające właściwości lecznicze. Terapia genowa obejmuje również działania polegające na wprowadzaniu kwasów nukleinowych do wnętrza komórki w celu wywarcia wpływu na sposób ekspresji danego genu. Takie zadanie spełniają fragmenty DNA zwane oligodeoksynukleotydami, których sekwencja jest komplementarna do informacyjnego kwasu rybonukleinowego (*mRNA; messenger Ribonucleic Acid*). Poprzez oddziaływanie z mRNA, regulują one proces powstawania białkowego produktu genu (translację).

Terapia genowa z chwilą jej wprowadzenia do badań klinicznych, miała znaleźć zastosowanie wyłącznie w przypadku schorzeń, u podłoża których leży dziedziczny (wrodzony) defekt pojedynczego genu powstały na drodze mutacji. W chwili obecnej, dzięki coraz większej wiedzy na temat mechanizmów powstawania chorób i coraz lepszemu rozumieniu ich patofizjologii, terapia genowa może stać się sposobem leczenia schorzeń o charakterze nabytym, w etiologii których dochodzi do zaburzenia prawidłowej ekspresji oraz regulacji wielu genów. Przykładem mogą być choroby układu sercowo-naczyniowego takie jak miażdżycy, pierwotne nadciśnienie tętnicze, problem restenozy po zabiegach przezskórnej wewnątrznacyniowej angioplastyki tętnic wieńcowych (*Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty; PTCA*) oraz zjawisko angiogenezy i arteriogenezy w niedokrwionym mięśniu sercowym oraz kończynach (197). Warunkami *sine qua non* terapii genowej są: zidentyfikowanie genu, którego ekspresja wywołałaby działanie lecznicze w danym modelu choroby i zaprojektowanie

odpowiedniego wektora oraz bezpiecznego i skutecznego sposobu jego wprowadzenia do komórek organizmu.

## **1.2. Historia terapeutycznego zastosowania materiału genetycznego**

W 1928 roku, Frederick Griffiths zauważył, że zjadliwy szczep *Pneumococcus* był zdolny do przekazania swoich chorobotwórczych własności (transformacji) szczepowi niezdolnemu (171). Dopiero w 1944 roku okazało się, że za to zjawisko odpowiedzialny jest DNA. Odkrycie to stanowiło pierwszy krok w kierunku terapeutycznego wykorzystania materiału genetycznego (8). Od tego momentu musiały upłynąć 62 lata aby ta obserwacja znalazła swoje zastosowanie kliniczne.

Po raz pierwszy u człowieka terapię genową zastosowano w leczeniu dziedzicznego autosomalnie recesywnie niedoboru deaminazy adenozy (ADA; *Adenosine Deaminase*) prowadzącego do zaburzenia odporności typu humoralnego i komórkowego. 14 września 1990 roku, czteroletniej dziewczynce cierpiącej na tę chorobę, podano genetycznie zmodyfikowane jej własne limfocyty T, do których został wprowadzony brakujący gen kodujący ADA. W wyniku przeprowadzonej terapii uzyskano poprawę stanu zdrowia pacjentki oraz funkcjonowania jej układu odpornościowego (17,18).

Pierwszym genem, który został wprowadzony do mięśnia sercowego człowieka był gen dla ludzkiego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna 121 (*Human Vascular Endothelial Growth Factor 121*; *hVEGF<sub>121</sub>*) (176). Dokonano tego 17 grudnia 1997 roku w ramach badania pierwszej fazy, mającego na celu pobudzenie zjawiska angiogenezy na terenie mięśnia sercowego u pacjentów cierpiących z powodu zaawansowanej choroby wieńcowej. Badanie to dało początek wielu klinicznym próbom zastosowania terapii genowej w leczeniu choroby niedokrwiennej serca oraz miażdżycy tętnic kończyn dolnych u pacjentów, u których zostały wyczerpane sposoby skutecznej terapii metodami farmakologicznymi, inwazyjnymi oraz chirurgicznymi (69,84). Stało się ono również początkiem trwającej do dzisiaj dyskusji nad bezpieczeństwem oraz skutecznością wykorzystania metod terapii genowej w zjawisku angiogenezy w tej grupie chorych (54).

### **1.3. Wektory stosowane w terapii genowej chorób układu sercowo - naczyniowego oraz metody wprowadzania materiału genetycznego do komórek**

Idealny model terapii genowej zakłada komórkowo, tkankowo bądź narządowo swoiste wprowadzenie materiału genetycznego, którego skutkiem jest działanie terapeutyczne pozbawione systemowych efektów ubocznych. Jednym z największych problemów ograniczających skuteczność tej metody jest trudność we wprowadzeniu odpowiedniego genu do wybranej grupy komórek docelowych w taki sposób, aby ściśle określona ilość produktu genu zadziałała leczniczo w danym modelu choroby. Cząsteczka DNA posiada bardzo ograniczoną zdolność penetracji przez błonę do wnętrza komórki oraz jest narażona na unieczynnienie przez cytoplazmatyczne nukleazy – enzymy degradujące kwasy nukleinowe. Z tego względu konieczne było opracowanie efektywnego sposobu wprowadzenia genów do komórek. Takie zadanie spełniają wektory. Idealny wektor powinien w sposób efektywny wprowadzać geny o różnej wielkości do komórek, tkanek bądź narządów w warunkach *in vivo*, zapewniając trwałą, lokalną oraz poddającą się regulacji ekspresję tych genów w immunokompetentnym organizmie, wywołując przy tym minimalną odpowiedź zapalną oraz immunologiczną.

Taki doskonały, uniwersalny wektor, który znalazłby zastosowanie w wielu modelach chorobowych nie istnieje i zapewne nigdy nie powstanie. Jego struktura i funkcja zależy bowiem od molekularnych mechanizmów leżących u podłoża danej choroby, w której ma być stosowana terapia genowa oraz od schematu ekspresji (stała bądź czasowa) wprowadzonego genu (118).

Wektory stosowane zarówno w przypadku prób leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego oraz w innych schorzeniach możemy podzielić na wirusowe oraz niewirusowe. Wektory wirusowe obejmują Retrowirusy, Lentivirusy, Adenowirusy oraz wirusy skojarzone z Adenowirusami (*Adeno-associated Viruses; AAVs*). Dzięki metodom inżynierii genetycznej, sekwencje genów, które są odpowiedzialne za zjawisko lizy komórek zakażonych przez wirusy oraz kodujące sekwencje białek strukturalnych wirusa, mogą zostać usunięte. Na ich miejsce są wprowadzane geny o działaniu terapeutycznym. Najczęściej stosowanymi niewirusowymi wektorami są liposomy i polimery

kationowe oraz DNA w postaci plazmidu (120). Ogólną charakterystykę oraz podział wektorów zawiera tabela 1.

Tabela 1. Porównanie właściwości wektorów wirusowych oraz niewirusowych stosowanych we wprowadzaniu materiału genetycznego do komórek.

	Retrowirusy	Adenowirusy	Wirusy skojarzone z Adenowirusem (AAVs)	Plazmidy/ Liposomy
Wielkość wprowadzanego genu	6-7 tysięcy par zasad (kb)	7-5 kb	2-4,5 kb	Teoretycznie nieograniczona
Rodzaj kwasu nukleinowego	RNA	dsDNA	ssDNA	RNA/DNA
Efektywność transfekcji	Średnia/ Niska	Średnia	Zmienna	Bardzo niska
Prolifercja komórek docelowych	Wymagana do transfekcji	Nie wymagana do transfekcji	Nie wymagana do transfekcji	Nie wymagana do transfekcji
Ekspresja wprowadzonego genu	Stała/ Czasowa	Czasowa	Stała/ Czasowa	Czasowa
Główne zalety	Integracja z genomem komórki docelowej	Efektywna transfekcja komórek będących w spoczynku oraz aktywnie dzielących się	Względnie duża efektywność transfekcji  Możliwość integracji z genomem komórki docelowej zapewniająca długotrwałą ekspresję genu	Bezpieczne  Tanie
Główne wady	Możliwość mutacji insercyjnej	Silna odpowiedź zapalna i wtórna odpowiedź immunologiczna	Trudne w przygotowaniu; możliwość powodowania mutacji	Niska efektywność transfekcji



### **1.3.1. Wektory wirusowe**

Skuteczne wprowadzenie terapeutycznego genu do komórki docelowej oraz właściwa jego ekspresja, stanowią najważniejsze cele i zarazem największe ograniczenia terapii genowej. Wirusy są naturalnymi nośnikami materiału genetycznego, których cykl życiowy zależy od połączenia się cząsteczki kwasu nukleinowego wirusa z genomem komórki gospodarza. Cecha ta sprawia, że niektóre wirusy po odpowiedniej molekularnej modyfikacji, polegającej na usunięciu części wirusowego genomu odpowiedzialnego za właściwości infekcyjne i chorobotwórcze, mogą stanowić wektory dla genów terapeutycznych (219).

#### **1.3.1.1. Retrowirusy**

Retrowirusy jako materiał genetyczny posiadają jednoniciowy kwas rybonukleinowy (RNA). Po dostaniu się do wnętrza komórki, na podstawie wirusowego RNA, za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy, powstaje dwuniciowy DNA. Ulega on, najczęściej w sposób przypadkowy, integracji z genomem gospodarza tylko w aktywnie dzielących się komórkach (137). Nie zapewnia to jednak nieprzerwanej ekspresji wprowadzonego za ich pomocą genu (144). Retrowirusy nie są skuteczne w transfekowaniu komórek układu sercowo-naczyniowego (komórek śródbłonka, mięśni gładkich naczyń oraz kardiomiocytów), które w większości znajdują się w stanie spoczynku (66). Ze względu na przypadkowy charakter integracji z genomem gospodarza istnieje duże niebezpieczeństwo zaistnienia mutacji, których skutki mogą być szkodliwe dla organizmu oraz trudne do przewidzenia (np. niebezpieczeństwo promocji nowotworowej komórek poddanych transfekcji). Fakt ten bardzo ogranicza zastosowanie Retrowirusów w terapii genowej człowieka (226).

##### **1.3.1.1.1. Lentivirusy**

Lentivirusy należą do klasy Retrowirusów. Są one zdolne transfekować ostatecznie zróżnicowane oraz pozostające w spoczynku komórki, co może okazać się w przyszłości pomocne w transfekcji komórek nerwowych, kardiomiocytów oraz komórek śródbłonka naczyniowego i mięśni gładkich naczyń. Wirus ludzkiego niedoboru odporności HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), powodujący nabyty zespół niedoboru odporności –

AIDS (*Aquired Immunodeficiency Syndrome*) – należy to tej grupy wirusów. Ze względów bezpieczeństwa nie są one jednak szeroko stosowane w terapii genowej u człowieka (22,168).

### **1.3.1.2. Adenowirusy**

Adenowirusy, odkryte w 1953 roku, są jednymi z najczęstszych patogenów powodujących wirusowe infekcje górnych dróg oddechowych u człowieka (90,177). Jako materiał genetyczny posiadają dwuniciowy DNA, który nie ulega integracji z genomem gospodarza i pozostaje w jądrze komórkowym w formie episomu. Uniemożliwia to długotrwałą ekspresję genu wprowadzonego za ich pomocą (14,74). Charakteryzują się one uogólnioną oraz stosunkowo wysoką efektywnością transfekcji różnych rodzajów komórek, zarówno proliferujących jak i będących w spoczynku. Silna odpowiedź immunologiczna na transfekcję, uogólniona narządowo oraz przejściowa ekspresja wprowadzonego materiału genetycznego decydują o ograniczonych możliwościach zastosowania Adenowirusów w terapii genowej człowieka (74).

### **1.3.1.3. Wirusy skojarzone z Adenowirusami**

Wirusy skojarzone z Adenowirusami (AAVs) należą do grupy *Parvoviridae* (15,16). Materiał genetyczny wirusa, którym jest stosunkowo mała cząsteczka DNA, ulega integracji z genomem transfekowanej komórki. W komórkach człowieka najczęściej dochodzi do tego zjawiska na ramieniu długim chromosomu 19 (19q13.4) (101). Ponieważ AAVs nie są zdolne do samodzielnej replikacji, stąd dla ich cyklu życiowego wymagane jest jednoczesne zakażenie (superinfekcja) innym rodzajem wirusa (tzw. wirusem pomocniczym), którym jest albo Adenowirus, albo Wirus opryszczki prostej (*Herpes Simplex Virus; HSV*) (15,34).

Wirusy skojarzone z Adenowirusami stanowią bardzo obiecujący model wektora możliwy do zastosowania w terapii genowej wybranych schorzeń układu sercowo-naczyniowego ze względu na fakt, iż nie są one patogenne dla człowieka (nie wykazano bowiem istnienia żadnej choroby czy patologii związanej z infekcją AAVs). Posiadają one zdolność do transfekcji zarówno komórek aktywnie dzielących się jak i będących w spoczynku.

Odpowiedź zapalna oraz immunologiczna jest mniejsza niż w przypadku Adenowirusów, a ich materiał genetyczny ulega integracji z genomem gospodarza, zapewniając trwałą ekspresję wprowadzonego za ich pomocą genu (103,129,224). Faktem, który ogranicza ich zastosowanie jest wielkość wprowadzanego genu terapeutycznego – jego sekwencja nie może przekraczać 4900 par zasad (143).

### **1.3.2. Wektory niewirusowe**

Ze względu na niedogodności związane z zastosowaniem wirusów jako nośników materiału genetycznego w próbach terapii genowej, wektory niewirusowe stanowią atrakcyjną alternatywę. Do najczęściej stosowanych niewirusowych metod transfekcji należy wstrzykiwanie do narządu docelowego DNA w postaci plazmidu oraz wykorzystanie do tego celu sztucznie skonstruowanych nośników materiału genetycznego, jakim są liposomy oraz polimery kationowe (152).

#### **1.3.2.1. Liposomy**

Liposomy stanowią najbardziej popularną grupę wektorów niewirusowych stosowanych w terapii genowej człowieka (24,145). Po raz pierwszy wykorzystano je przy wprowadzaniu kwasów nukleinowych do komórek w 1987 roku i od tego czasu trwają intensywne badania nad nowymi ich rodzajami (59). Swoją budową chemiczną przypominają fosfolipidy błony komórkowej i dzięki temu mają zdolność formowania struktur bardzo przypominających jej budowę oraz łączenia się z nią. Obecność grup hydroksylowych w części hydrofilnej liposomu umożliwia tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy liposomem a grupami fosforanowymi nukleotydów budujących kwas nukleinowy. Większa efektywność tej reakcji jest obserwowana w przypadku liposomów multiwalentnych, które posiadają więcej niż jeden dodatni ładunek elektryczny. Integracja DNA bądź RNA z liposomem może się również odbywać na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych i prowadzi zwykle do opłaszczenia przez liposom materiału genetycznego (33,92). Po połączeniu się kompleksu liposom-kwas nukleinowy (lipopleks) z błoną komórkową, ulega on internalizacji na drodze fuzji lub na drodze endocytozy. Następnie, kwas nukleinowy zostaje

uwolniony do cytoplazmy, skąd zwykle tylko mała jego część wędruje do jądra komórkowego i ulega integracji z genomem komórki (114,230). Efektywność transfekcji za pomocą liposomów zależy od składu liposomu, rodzaju transfekowanych komórek oraz od ich etapu cyklu komórkowego (42,209). Zaletami zastosowania liposomów w terapii genowej są łatwość ich przygotowania, teoretyczny brak ograniczeń co do wielkości terapeutycznego genu, który ma zostać wprowadzony za ich pomocą, zmniejszone ryzyko powstania mutacji ze względu na bardzo ograniczoną integrację z genomem oraz brak specyficznej odpowiedzi immunologicznej (210). Do wad tej metody należą: przejściowy charakter ekspresji genu, mała efektywność transfekcji komórek oraz brak komórkowej i tkankowej selektywności transfekcji. Jak wskazują badania ostatnich lat, skutkiem prób terapii genowej za pomocą kompleksów liposom-kwas nukleinowy, może być nieswoista odpowiedź zapalna, w szczególności na terenie krążenia płucnego (122,226).

### **1.3.3. Metody wprowadzania wektorów do organizmu**

Nie udało się dotychczas skonstruować doskonałego i uniwersalnego wektora dla materiału genetycznego. Nie istnieje również pozbawiona działań niepożądanych metoda jego wprowadzania do komórek oraz narządów docelowych. Najczęściej stosowaną metodą jest iniekcja donarządowa, dożylna lub dotętnicza za pomocą cewnika (*catheter-based gene transfer*). Dożylny i dotętniczny sposób podawania nie zapewnia jednak selektywnej ekspresji genu w narządzie docelowym a donarządowe podanie materiału genetycznego jest wykonywane najczęściej w sposób inwazyjny podczas zabiegu chirurgicznego. Celem prowadzonych obecnie badań jest opracowanie metody, za pomocą której możliwe będzie wprowadzanie materiału genetycznego w sposób bezpieczny, nieinwazyjny oraz tkankowo swoisty (124).

#### **1.3.3.1. Metoda wstrzykiwania materiału genetycznego**

Najprostszą metodą narządowo selektywnego wprowadzania materiału genetycznego jest jego mechaniczne wstrzykiwanie. Po raz pierwszy dokonano tego typu zabiegu w 1990 roku, wstrzykując DNA do mięśnia szkieletowego myszy (222). Od tego czasu, ze względu na warunki

bezpieczeństwa oraz techniczną łatwość wykonania tego zabiegu, metoda ta znalazła zastosowanie zarówno w projektach badawczych jak i w badaniach klinicznych z udziałem ludzi. Dzięki niej udało się umieścić materiał genetyczny w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych, wątrobie, gruczole tarczowym, nerkach, skórze oraz guzach nowotworowych (153). W celu zwiększenia wydajności ekspresji materiału genetycznego podejmuje się próby iniekcji wysokociśnieniowych, „elektroporacji“ (zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych dla kwasów nukleinowych poprzez poddawanie komórek, tkanki bądź narządu działaniu impulsów pola elektrycznego) oraz transfekcji wspomaganych falą ultradźwiękową (121,200).

### **1.3.3.2. Próby nieinwazyjnego podawania materiału genetycznego do organizmów wielokomórkowych**

Wprowadzenie materiału genetycznego do organizmu w sposób nieinwazyjny oraz selektywny stanowi przedmiot badań w ośrodkach zajmujących się opracowaniem nowych metod terapii genowej. Zastosowanie wirusów niesie ze sobą niebezpieczeństwo trudnej do przewidzenia reakcji immunologicznej oraz zapalnej ustroju, która może doprowadzić do śmiertelnej w skutkach ostrej niewydolności wielonarządowej. Zakończona tragicznie jedna z klinicznych prób leczenia rzadkiego wrodzonego defektu metabolizmu (niedobór enzymu transkarbamyazy ornitynowej) za pomocą podania wektora adenowirusowego, wywołała burzliwą dyskusję nad bezpieczeństwem stosowania oraz wieloma bioetycznymi aspektami terapii genowej (31,199). Metody inwazyjne oraz wykorzystujące wektory wirusowe, ze względu na rosnące obawy dotyczące ich bezpieczeństwa, zostaną prawdopodobnie w przyszłości zarzucone na rzecz sposobów nieinwazyjnych oraz niewirusowych.

Pierwszych prób nad nieinwazyjnym podaniem materiału genetycznego, poprzez inhalację aerozolu zawierającego gen terapeutyczny, dokonano w przypadku chorób układu oddechowego. Znane są próby leczenia w ten sposób takich chorób jak mukowiscydoza, rozedma płuc na tle niedoboru alfa-1-antytrypsyny, nowotwory oraz astma oskrzelowa (72,175). Zjawisko elektroporacji znalazło również swoje zastosowanie w próbach

nieinwazyjnego podania materiału genetycznego do komórek skóry w warunkach *in vivo* (229).

#### **1.4. Zastosowanie metod terapii genowej w próbach leczenia choroby niedokrwiennej serca**

W przypadku leczenia choroby niedokrwiennej serca, kluczowymi zjawiskami, które mogą być wykorzystane w terapii genowej są angiogeneza, arteriogeneza (procesy, prowadzące do powstawania nowych naczyń krwionośnych: odpowiednio kapilar i arteriol), zapobieganie zjawisku restenozy po zabiegach PTCA i chirurgicznego pomostowania naczyń wieńcowych oraz genetyczna modyfikacja metabolizmu lipidów w przypadkach hiperlipidemii.

Waskulogeneza, czyli proces tworzenia się nowych naczyń z komórek prekursorowych dla endotelium oraz na drodze ich proliferacji z istniejących już komórek śródbłona naczyniowego, warunkuje prawidłowy rozwój tkanek i narządów w trakcie życia płodowego. W okresie pozapłodowym, zjawisko powstawania nowych naczyń nazywamy angiogenezą (173). Podawanie czynników wzrostu naczyń oraz genów powodujących ich powstawanie może w przyszłości okazać się skuteczną metodą leczenia chorób, u podłoża których leży niedokrwienie spowodowane ich niewystarczającą ilością. Wiele ośrodków na świecie zakończyło badania pierwszej fazy w celu ustalenia bezpieczeństwa stosowania tych metod. Badania kliniczne drugiej oraz trzeciej fazy są w toku (53,80,84).

##### **1.4.1. Mechanizmy angiogenezy**

Po raz pierwszy terminu *angiogeneza*, w celu opisu zjawiska powstawania nowych naczyń krwionośnych na terenie poroża jelenia, użył brytyjski chirurg, John Hunter w 1787 roku (98). Amerykański patolog z Bostonu, Dr Arthur Tremain Hertig, zauważył jako pierwszy w 1935 roku tworzenie się nowych kapilar na terenie łożyska małp człekokształtnych a kluczowe znaczenie angiogenezy w miejscowym rozwoju guzów litych oraz powstawaniu ich odległych przerzutów postulował po raz pierwszy w 1971 Dr Judah Folkman (68,88).

Zjawisko angiogenezy w warunkach fizjologii występuje rzadko i ma miejsce podczas dojrzewania ciała żółtego na terenie jajnika, powstawania błony doczesnej w macicy w trakcie cyklu miesięcznego oraz podczas formowania się łożyska. Jest ono natomiast kluczowym zjawiskiem towarzyszącym wielu patologicznym procesom takim jak reumatoidalne zapalenie stawów, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, łuszczyca, endometrioza, retinopatia cukrzycowa, rozwój płytki miażdżycowej oraz jej niestabilność, gojenie się rany, nowotwory oraz powstawanie ich przerzutów (27-30,174). Najsilniejszym bodźcem dla angiogenezy jest tkankowa hipoksja. W odpowiedzi na zmniejszone ciśnienie parcjalne tlenu w komórce, jak również pod wpływem trombiny, powstającej podczas krzepnięcia krwi, dochodzi do aktywacji tlenowo-zależnego czynnika transkrypcyjnego HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*). Powoduje to ekspresję genów dla wielu czynników inicjujących i podtrzymujących proces angiogenezy. Należą do nich między innymi naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna (*Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF*) oraz jego śródbłonkowe receptory VEGFR1 i VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1,-2*), neuropilina-1, angiopoetyna-2 oraz jej receptory Tie-1 i Tie-2 (*Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-1, -2*), pochodzący z płytek czynnik wzrostu B (*Platelet Derived Growth Factor-B; PDGF-B*), transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ -1 (*Transforming Growth Factor Beta-1; TGF $\beta$ -1;*), inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1; PAI-1*) oraz tlenek azotu (*Nitric oxide; NO*) (76,167,189).

Efekt działania NO na procesy angiogenezy zależy od jego stężenia i jest realizowany za pośrednictwem HIF-1 $\alpha$ . W dużych ilościach NO hamuje, zaś przy małym stężeniu pobudza ekspresję genu dla VEGF, który zwiększa produkcję NO. Tlenek azotu, jako czynnik zarówno stymulujący i efektorowy względem VEGF, odgrywa szczególną rolę w procesie angiogenezy. Dokładne poznanie wzajemnych zależności pomiędzy tymi substancjami może w przyszłości zostać wykorzystane w zapobieganiu oraz leczeniu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, stanowiącej podłoże dla rozwoju miażdżycy (46,49,108).

Proces angiogenezy jest bardzo dokładnie regulowany na drodze zrównoważonego współdziałania wielu czynników, które wpływają na aktywację komórek śródbłonka, ich proliferację, formowanie kapilar oraz stabilizację przez pericyty (35,100). Z tego względu, efektywna terapia genowa mająca doprowadzić do powstania pełnowartościowych i funkcjonalnych naczyń, wymagać będzie w przyszłości zastosowania bardziej złożonych i zbliżonych do rzeczywistych warunków procedur niż podawanie jednego tylko czynnika wzrostu w postaci genu bądź jego białkowego produktu. Wiele substancji i mechanizmów, które biorą udział w tym skomplikowanym procesie nie jest jeszcze do końca poznanych a ich odkrycie będzie kluczowe dla powodzenia tego typu terapii.

#### **1.4.1.1. Struktura i funkcje naczyniowego czynnika wzrostu komórek śródbłonka**

W 1983 roku, Donald Senger wraz z grupą badaczy kierowaną przez Harolda Dvoraka z Beth Israel Hospital w Bostonie, wyizolował białko produkowane przez komórki nowotworowe guza wątroby (*hepatocarcinoma*) świnki morskiej, które zwiększało przepuszczalność naczyń krwionośnych dla wielkocząsteczkowych substancji. Nazwano je naczyniowym czynnikiem przepuszczalności (*Vascular Permeability Factor; VPF*) i zaproponowano hipotezę, że stanowi ono jedną z głównych substancji będącej przyczyną zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych występującej na terenie guzów nowotworowych (190). W 1989 roku grupa Napoleona Ferrary wyizolowała białko produkowane przez komórki przysadki mózgowej wołu, które wykazywało selektywną aktywność mitogenną wyłącznie w stosunku do komórek śródbłonka naczyniowego i nazwała je naczyniowym czynnikiem wzrostu śródbłonka – VEGF (62). W tym samym roku, Jean Ploüet i Denis Gospodarowicz na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Francisco, wyizolowali białko o podobnych właściwościach z komórek przysadki mózgowej myszy i nazwali je waskulotropiną (*vasculotropin*) (161). W wyniku przeprowadzonych w późniejszym czasie badań, VPF, VEGF oraz waskulotropina okazały się być tymi samymi substancjami. Odkrycie ludzkiego VEGF, jak również poznanie jego sekwencji aminokwasowej i struktury genu, zawdzięczamy grupie Daniela Connolly'ego i Napoleona Ferrary (37,119). Na przestrzeni ostatnich odkryto szereg innych czynników wzrostu śródbłonka (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E), przypominających swoją budową oraz funkcją VEGF (213).

VEGF, nazywany również VEGF-A, wraz z łożyskowym czynnikiem wzrostu (*Placental Growth Factor; PlGF*), ze względu na wzajemne molekularne podobieństwo, należy do grupy czynników wzrostu



pochodzących z płytek krwi (*Platelet derived growth factors family*). Występuje on w postaci homodimeru o łącznej masie cząsteczkowej 42 kilodaltonów. Stymuluje swoiście wzrost, proliferację oraz migrację komórek śródbłonna naczyniowego, odgrywając kluczową rolę w procesach waskulogenezy, organogenezy oraz angiogenezy (63). Z pojedynczego genu dla ludzkiego VEGF, na drodze postranskrypcyjnej modyfikacji mRNA, powstaje 5 różnych cząsteczek tego białka, (izoform) zawierających 121, 145, 165, 189 oraz 206 aminokwasów, nazywanych odpowiednio VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> i VEGF<sub>206</sub> (215). Najpowszechniej występującą izoformą jest VEGF<sub>165</sub> zaś obecność VEGF<sub>206</sub> wykryto dotychczas wyłącznie na terenie komórek wątroby płodu (94,148). VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> i VEGF<sub>206</sub> posiadają domeny wiążące heparynę, które ułatwiają im zakotwiczenie się na terenie macierzy zewnątrzkomórkowej, skąd są uwalniane za pośrednictwem metaloproteinaz. VEGF<sub>121</sub> nie posiada powinowactwa do heparyny i występuje w osoczu jako wolne białko, zaś VEGF<sub>189</sub> i VEGF<sub>206</sub> występują wyłącznie w postaci związanej z macierzą zewnątrzkomórkową. Obecność domeny wiążącej heparynę na terenie cząsteczki VEGF warunkuje jego mitogenne właściwości (160). VEGF<sub>165</sub>, najczęstsza izoforma oraz wywołująca największy efekt biologiczny w procesie angiogenezy, posiada pośrednie właściwości – jest obecna w postaci wolnego białka w osoczu oraz w formie związanej (95,106). Z tego względu, najbardziej uzasadnione wydaje się zastosowanie właśnie tej izoformy w próbach stymulowania angiogenezy w celach terapeutycznych.

Głównym czynnikiem powodującym ekspresję genu dla VEGF jest tkankowa hipoksja, zaś kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym, który jest w sposób bezpośredni związany z tym zjawiskiem jest HIF-1 $\alpha$  (48,188). Ponadto, pod wpływem wielu innych czynników wzrostu oraz cytokin takich jak: naskórkowy czynnik wzrostu (*Epidermal Growth Factor; EGF*), transformujący czynnik wzrostu alfa i beta (*Transforming Growth Factor alpha, -beta; TGF- $\alpha$ , - $\beta$* ), czynnik wzrostu keratynocytów, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (*Insulin-like Growth Factor 1; IGF-1*), PDGF, czynnik wzrostu fibroblastów (*Fibroblasts Growth Factor; FGF*), interleukina-1 $\alpha$  (*Interleukin-1 $\alpha$ ; IL-1 $\alpha$* ) oraz interleukina-6 (*Interleukin-6; IL-6*), dochodzi do

zwiększonej produkcji VEGF. Świadczy to o istniejących parakrynnych i autokrynnych mechanizmach współdziałających wraz z lokalnie występującą hipoksją w procesie regulacji tkankowego poziomu VEGF (64,148). Mutacje, których wynikiem jest zwiększona ekspresja pewnych rodzajów onkogenów (np. Ras, Raf), również prowadzą do zwiększonej ekspresji genu dla VEGF, który indukuje powstawanie nowych naczyń krwionośnych na terenie guza nowotworowego (82,155).

Istnieją 3 rodzaje receptorów dla VEGF – VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3. Posiadają one aktywność kinazy tyrozynowej a ich zewnątrzkomórkowa część zawiera domeny podobne do tych, z których zbudowane są immunoglobuliny klasy G (IgG) (113,193). Na terenie komórek śródbłonna naczyniowego znajdują się dodatkowe receptory wiążące VEGF, którymi są Neuropilina-1 oraz Neuropilina-2. Nie posiadają one aktywności kinazy tyrozynowej i służą one jako koreceptory zwiększające efektywność wiązania VEGF z właściwymi receptorami (149). Różne rodzaje VEGF posiadają zróżnicowane powinowactwo do receptorów z czego wynikają również odmienne skutki ich pobudzenia, przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Rodzaje VEGF, ich receptory oraz efekty ich pobudzenia.

Rodzaj VEGF	Receptor(y)	Efekty pobudzenia
VEGF-A (VEGF)	VEGFR1, VEGFR2, Neuropilina-1	Angiogeneza
VEGF-B	VEGFR1	Angiogeneza na terenie mięśnia sercowego; rozwój płodowy <i>myocardium</i> (organogeneza)
VEGF-C, -D	VEGFR2, VEGFR3	Powstawanie naczyń limfatycznych
VEGF-E	VEGFR2	Angiogeneza

Przyłączenie się cząsteczki VEGF do receptora powoduje aktywację kinazy tyrozynowej, która poprzez fosforylację wielu innych wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych, w tym innych kinaz białkowych takich jak białkowa kinaza B (*Protein Kinase B; PKB*), oraz C (*Protein Kinase*

C; PKC), uruchamia kaskadę reakcji prowadzących do powstania efektów zależnych od rodzaju komórek, na których znajdują się receptory dla VEGF (75,227).

VEGF jest produkowany przez różne rodzaje komórek i bierze udział w wielu procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. Komórki produkujące VEGF oraz jego zróżnicowane funkcje przedstawia tabela 3 (60,61,73).

Tabela 3. Komórki produkujące VEGF oraz jego biologiczna aktywność w procesach fizjologicznych i patologicznych.

Komórki produkujące VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endoderma w czasie rozwoju płodowego</li> <li>• Syncytiotrofoblast</li> <li>• Endotelium naczyń</li> <li>• Mastocyty</li> <li>• Makrofagi, Astrocyty</li> <li>• Megakariocyty i płytki krwi</li> <li>• Komórki nabłonkowe kłębuszków nerkowych</li> <li>• Kardiomiocyty</li> <li>• Komórki mięśni szkieletowych</li> <li>• Osteoblasty, Fibroblasty</li> <li>• Komórki ziarniste i tekalne jajników</li> </ul>
Biologiczna aktywność VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitogen dla komórek śródbłonna naczyniowego</li> <li>• Stymuluje migrację komórek endotelium naczyniowego podczas angiogenezy oraz ekspresję molekuł adhezyjnych na jego powierzchni</li> <li>• Zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych</li> <li>• Pobudza ekspresję metaloproteinaz, aktywatorów plazminogenu oraz receptora dla urokinazy</li> <li>• Stymuluje produkcję NO i prostacykliny przez śródbłonek</li> <li>• Działa chemotaktycznie na makrofagi oraz mastocyty</li> <li>• Wpływa na proces różnicowania się komórek hematopoetycznych pnia</li> <li>• Pobudza proces dojrzewania ciała żółtego w jajniku</li> </ul>

#### 1.4.2. Mechanizmy arteriogenezy

Drugą postacią formowania się nowych naczyń krwionośnych w trakcie życia pozapłodowego jest arteriogeneza. W swojej naturze różni się ona od angiogenezy zarówno produktem końcowym, którym są arteriole oraz tętnice krążenia obocznego, jak i mechanizmem powstawania oraz czynnikami regulującymi. Polega ona na wykształceniu się funkcjonalnego krążenia obocznego na poziomie arteriol i małych tętnic z istniejących już wcześniej anastomoz (85,87).

Po raz pierwszy istnienie naczyń krążenia obocznego w mięśniu sercowym zauważył angielski lekarz Richard Lower w 1669 roku na Uniwersytecie w Oxfordzie opisując anatomię krążenia wieńcowego (127). Wskazał on w swoich badaniach nie tylko na ich obecność ale również wykazał, że stanowią one alternatywną drogę przepływu krwi podczas zakrzepicy oraz zatorowości tętniczej. Odkrycie Lowera zostało potwierdzone w XVIII wieku przez Albrechta von Hallera, a następnie w XX wieku przez Wenera Spalteholza.

W przeciwieństwie do angiogenezy, arteriogeneza przebiega w warunkach normoksemii lub prawie normoksemii. Hipoksja oraz VEGF, które są głównymi bodźcami stymulującymi angiogenezę, nie odgrywają tak dużej roli w procesie arteriogenezy. Czynnikiem odpowiedzialnym za zainicjowanie oraz dalszy rozwój krążenia obocznego na drodze arteriogenezy jest zwiększona siła tarcia naczyniowego (*shear stress*), spowodowana wzmożonym przepływem krwi w istniejących już naczyniach krwionośnych, które łączą ze sobą obszar poddany niedokrwieniu oraz zdrową tkankę. Na tej drodze dochodzi do aktywacji komórek śródbłonna czego wynikiem jest zwiększona ekspresja cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), selektyn oraz czynników chemotaktycznych dla monocytów takich jak MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*). Powoduje to zwiększoną adhezję i migrację monocytów przez ścianę naczynia a ich transformacja w makrofagi tkankowe, jest jednym z kluczowych zjawisk w procesie arteriogenezy. Makrofagi są źródłem wielu cytokin i czynników wzrostu takich jak czynnik martwicy guza alfa (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$* ) oraz czynnik wzrostu

fibroblastów-2 (*Fibroblast Growth Factor-2; FGF-2*), które są ważnymi mediatorami arteriogenezy (23,91,183,217).

W podobny sposób dochodzi również do napływu limfocytów T-CD4+ do miejsc powstawania nowych arteriol. O ich znaczeniu w tym procesie świadczy fakt upośledzonej arteriogenezy w zwierzęcym modelu niedokrwinnym u myszy z uwarunkowanym genetycznie niedoborem limfocytów T-CD4+. Zdolność produkowania przez te komórki wielu czynników wzrostu oraz cytokin o charakterze zapalnym i immunomodulującym, stanowi o ich roli w procesie powstawania arteriol (204).

### **1.5. Próby zastosowania terapii genowej w innych chorobach układu sercowo-naczyniowego**

Poza angiogenezą, podejmuje się próby leczenia zaburzeń lipidowych leżących u podłoża rozwoju miażdżycy poprzez genetyczną modyfikację ekspresji receptorów dla lipoprotein oraz działania enzymów biorących udział w metabolizmie lipidów (111,112,169).

Zjawisko restenozy po zabiegach PTCA stanowi poważne odległe powikłanie, które polega na zwiększonej proliferacji komórek mięśni gładkich w obrębie zmiany miażdżycowej tętnicy, w miejscu dokonania jej plastyki. Ze względu na długą listę czynników, które wpływają na te zjawiska oraz stosunkowo niską ekspresję potencjalnie terapeutycznych genów wprowadzanych w obręb ściany naczyniowej, terapia genowa restenozy sprawia jeszcze wiele problemów (179,180).

Zastosowanie metod terapii genowej w leczeniu pierwotnego nadciśnienia tętniczego jest również utrudnione i ograniczone ze względu na nie do końca określone geny, których zastosowanie mogłoby okazać się skuteczne w aspekcie tego typu terapii (3,11,83,89,99,128,202). Obecnie duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem genów kodujących czynniki naczyniorozkurczowe takie jak bradykinina oraz syntaza tlenu azotu (47,159,191).

## **1.6. Wykorzystanie komórek macierzystych pnia (*stem cells*) w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego**

Wyzolowanie ze szpiku kostnego oraz z ostatecznie wyróżnicowanych tkanek i narządów organizmu, puli komórek posiadających zdolności regeneracyjne (komórki totipotencjalne; komórki pnia; *stem cells*), podobnych do tych jakie posiadają komórki embrionalne, zainspirowało szereg badań mających na celu wykorzystanie tych właściwości w leczeniu wybranych grup chorób (71,170,220). Długotrwałe niedokrwienie, obejmujące duży obszar mięśnia sercowego w przebiegu zawału prowadzi do martwicy kardiomiocytów. Jej skutkiem jest nieodwracalna utrata struktury oraz funkcji *myocardium*, prowadząca do niewydolności serca. Ograniczone możliwości regeneracyjne mięśnia sercowego sprawiają, że jedynym sposobem leczenia tak uszkodzonego serca jest jego przeszczep (146). Możliwość wyhodowania w warunkach *in vitro* mioblastów i kardiomiocytów z komórek pnia, a następnie podania ich do mięśnia sercowego, otworzyła nowe możliwości terapeutyczne, których wykorzystanie w przyszłości pozwoli na „komórkowe“ wspomaganie funkcji serca, uszkodzonego przez rozległy zawał (105,50,157).

Klasyczna terapia genowa, wraz z wykorzystaniem komórek macierzystych pnia (*stem cells*) oraz komórek modyfikowanych genetycznie w warunkach *in vitro*, może w przyszłości okazać się skutecznym sposobem leczenia wybranych chorób układu sercowo-naczyniowego (77,102,181).

## **1.7. Zasady echokardiografii kontrastowej**

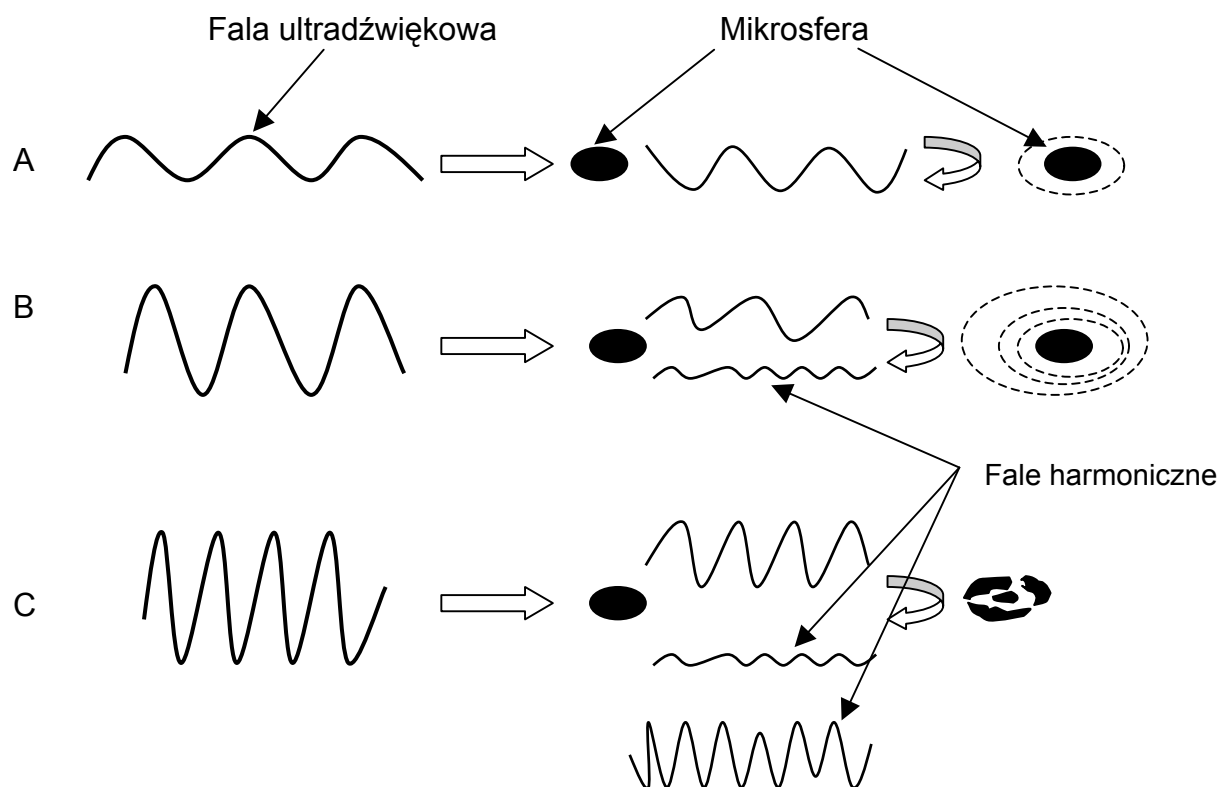
Echokardiografia kontrastowa jest nieinwazyjną techniką obrazowania mięśnia sercowego oraz analizy wielkości krążenia wieńcowego (104). Początki jej zastosowania sięgają późnych lat sześćdziesiątych XX wieku, kiedy po raz pierwszy udało się uwidocznić struktury pnia aorty za pomocą ultradźwięków oraz podanego dooortalnie, uprzednio wstrząśniętego, roztworu soli fizjologicznej (78). Pierwszymi substancjami używanymi jako środki kontrastowe w echokardiografii, poza solą fizjologiczną, były roztwory nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ), 5%-owej dekstrozy, jodowych środków kontrastowych stosowanych w diagnostyce radiologicznej oraz krew (43). Toksyczność oraz techniczne niedoskonałości związane z tymi pierwszymi

środkami były przyczyną intensywnych badań nad opracowaniem doskonalszych preparatów. W 1984 roku po raz pierwszy jako echokardiograficznego środka kontrastowego użyto wypełnionych powietrzem mikrosfer powstałych w trakcie działania fal ultradźwiękowych (sonifikacji) na 70%-owy roztwór sorbitolu i dekstrozy (58). Przez ostatnich kilka lat dokonał się bardzo duży postęp w dziedzinie dożylnych środków kontrastowych oraz aparatury echokardiograficznej i komputerowej metody analizy danych. Dzięki temu, możliwa jest dokładna ocena funkcji *myocardium*, granic wsierdzia oraz próba oceny wielkości przepływu wieńcowego za pomocą tej metody (131,135,158).

Stosowane obecnie echokardiograficzne środki kontrastowe składają się z białkowych lub białkowo-lipidowych mikrosfer wypełnionych gazem o dużej masie cząsteczkowej (np. perfluoropropanem), który zapewnia im większą trwałość oraz stabilność podczas przechodzenia przez łożysko krążenia płucnego. Ich hemodynamiczne właściwości są bardzo zbliżone do krwinek czerwonych. Mikrosfery poddane działaniu fali ultradźwiękowej, w zależności od tzw. indeksu mechanicznego (*Mechanical Index; MI*) – stosunku wielkości częstotliwości oraz mocy fali – bądź wpadają w rezonans, bądź ulegają destrukcji (Ryc.1).

Za pomocą wartości MI określany jest tzw. bioefekt fali ultradźwiękowej czyli efekt jej działania na tkankę lub narząd. Liczbowo MI jest wprost proporcjonalny do wielkości mocy, a odwrotnie proporcjonalny do kwadratu częstotliwości fali. Fala ultradźwiękowa o małej wartości MI (mniejszej od 0.1), wprawia mikrosfery znajdujące się w jej polu w rezonans zgody ze swoją częstotliwością. Zjawisko to nazywane jest oscylacją liniową (*linear oscillation*) (Ryc. 1A). Gdy MI waha się pomiędzy 0.1 a 0.3, mikrosfery bardziej gwałtownie zwiększają swoją objętość i wielkość. Średnio dochodzi do ponad 50-krotnego zwiększenia się objętości mikrosfery w porównaniu z wartością wyjściową. Podczas tego zjawiska dochodzi do powstawania fal ultradźwiękowych o innej częstotliwości niż częstotliwość działającej fali (Ryc. 1 B). Nazywamy je falami harmonicznymi, które mogą być rejestrowane oraz analizowane (43). Dzięki tym właściwościom echokardiograficznych środków kontrastowych, na podstawie analizy fal harmonicznymi możliwa jest próba oceny przepływu wieńcowego (186). Jeżeli wartość MI przekracza 0.3,

mikrosfery ulegają nadmiernym zmianom wielkości, co prowadzi do ich destrukcji w przebiegu oscylacji nieliniowej (*non-linear oscillation*) i do powstania szeregu fal harmonicznycch o różnych częstotliwościach (Ryc. 1 C) (44,185).



Rycina 1. Wpływ różnych wielkości indeksu mechanicznego (MI) na zachowanie się mikrosfer w polu fal ultradźwiękowych; dokładny opis znajduje się w tekście; A –  $MI < 0.1$ , B –  $MI = 0.1-0.3$ , C –  $MI > 0.3$

Dzięki osiągnięciom techniki echokardiograficznej udało się skonstruować głowice, które emitują zsynchronizowaną z cyklem pracy serca falę ultradźwiękową. Odbierają one również fale rozproszone od mikrosfer znajdujących się w naczyniach krwionośnych, zmniejszając jednocześnie odbiór sygnału, który pochodzi z tkanek otaczających. Sygnał ten w postaci fal harmonicznycch jest proporcjonalny do ilości mikrosfer ulegających destrukcji i może być za pomocą oprogramowania komputerowego analizowany cyfrowo. Jeżeli do niszczenia mikrosfer dochodzi w okresie końcowo-skurczowym cyklu pracy serca (*end-systole*), kiedy prawie cała



objętość krwi znajduje się w naczyniach włosowatych mikrokrażenia wieńcowego, możliwa staje się ocena gęstości kapilar w mięśniu sercowym na podstawie analizy fal harmonicznnych powstałych na skutek destrukcji mikrosfer (45,158). W powszechnym stosowaniu znajdują się dzisiaj następujące echokardiograficzne środki kontrastowe: Levovist<sup>®</sup>, Optison<sup>®</sup>, Sonazoid<sup>®</sup>, SonoVue<sup>®</sup> oraz Definity<sup>®</sup>.

### **1.7.1. Terapeutyczne zastosowanie echokardiograficznych środków kontrastowych**

Fale ultradźwiękowe stanowią od wielu lat jedną z najbardziej powszechnych, bezpiecznych oraz nieinwazyjnych metod diagnostyki obrazowej. Ze względu na fakt, że fala ultradźwiękowa jest pewną postacią energii, w zależności od jej indeksu mechanicznego oraz od tego czy jest to fala ciągła czy w postaci impulsów, może powodować powstawanie pewnych zmian w zakresie funkcji komórek oraz tkanek włącznie ze zmianami w sposobie ekspresji materiału genetycznego (6).

Podczas procesu destrukcji mikrosfer w kapilarach przy użyciu fali ultradźwiękowej, dochodzi do przejściowej, ograniczonej utraty ciągłości śródbłona i do zwiększonej przepuszczalności naczyń włosowatych (9,165,198). Echokardiograficzne środki kontrastowe w postaci białkowych, lipidowych czy białkowo-lipidowych mikrosfer, zostały zaprojektowane przede wszystkim w celach diagnostycznych. Mechaniczne skutki ich oddziaływania z falą ultradźwiękową oraz zdolność wiązania przez składniki błony mikrosfer (białka, fosfolipidy) kwasów nukleinowych oraz leków, sprawiają, że możliwe staje się coraz szersze ich zastosowanie terapeutyczne. Albuminowe mikrosfery jako nośniki materiału genetycznego oraz leków mogą być wykorzystane jako narzędzie w próbach terapii wybranych grup chorób (211,215,216). Możliwe jest również ich zastosowanie w procesie usprawniania śródnaczyniowej trombolizy zakrzepu (163,187).

Za pomocą selektywnej, powodowanej falami ultradźwiękowymi destrukcji mikrosfer (*UTMD; Ultrasound Targeted Microbubbles Destruction*), materiał genetyczny połączony z białkową lub białkowo-lipidową otoczką mikrosfer, zostaje uwolniony w tkance lub narządzie znajdującym się w polu działania fali ultradźwiękowej. Mechaniczne naruszenie struktury śródbłona

będące wynikiem destrukcji mikrosfer, zwiększa przepuszczalność naczyń oraz zdolność penetracji materiału genetycznego w głąb tkanki, zaś fale ultradźwiękowe wspomagają w sposób niespecyficzny proces inkorporacji obcego materiału genetycznego do genomu komórek poddawanych ich działaniu. Za pomocą UTMD udało się ostatnio wprowadzić w sposób wybiórczy do komórek mięśnia sercowego szczura obcy gen, wykorzystując zrekombinowane adenowirusy jako wektor dla materiału genetycznego (194).

### **1.7.2. Próby nieinwazyjnej oceny stanów dysfunkcji śródbłonka za pomocą echokardiograficznych środków kontrastowych**

Zaburzenie funkcji komórek śródbłonka leży u podłoża wielu patologii naczyniowych. Próba oceny oraz monitorowania tego zjawiska opiera się na analizie zależnych od tlenu azotu funkcji rozkurczowych naczyń (218). Do najczęściej stosowanych w tym celu metod należą: oceniana ultrasonograficznie odpowiedź rozkurczowa tętnicy ramiennej na zwiększony przepływ krwi (*flow mediated vasodilation*) lub na podaną nitroglicerynę (*NTG-induced vasodilation*) oraz analizowany za pomocą pletyzmografii impedancyjnej, wpływ czynników naczyniorozkurczowych na wielkość przepływu krwi na terenie przedramienia (5,57). Testy te, przez fakt, że oceniają wyłącznie jeden parametr, posiadają ograniczoną wartość diagnostyczną.

Wbudowanie w strukturę echokardiograficznych środków kontrastowych przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko określonym antygenom obecnym na powierzchni endotelium, stworzyło nowe możliwości nieinwazyjnej, narządowo selektywnej, jakościowej i ilościowej próby oceny funkcji śródbłonka naczyniowego. Dzięki obecnym na powierzchni mikrosfer przeciwciałom przeciwko molekułom adhezyjnej ICAM-1, udało się za pomocą metod echokardiografii kontrastowej potwierdzić nieinwazyjnie zjawisko odrzucania przeszczepionego serca w modelu zwierzęcym oraz wykryć zmienione zapalnie płytki miażdżycowe (123,221). Za pomocą skonstruowanych na tej samej zasadzie mikrosfer skierowanych przeciwko integrynie  $\alpha_v\beta_3$  obecnej na powierzchni nowopowstałych naczyń,

udało się zlokalizować w sposób nieinwazyjny miejsca angiogenezy na terenie guza nowotworowego (51).

Metoda ta może w przyszłości być doskonałym uzupełnieniem dla powszechnie dzisiaj stosowanych sposobów oceny dysfunkcji śródbłonna oraz być pomocną w bardziej wszechstronnej i nieinwazyjnej analizie patologii naczyniowych.

## 2. Założenia i cel pracy

Zastosowanie wektorów wirusowych oraz inwazyjne metody podawania materiału genetycznego niosą ze sobą możliwość wystąpienia poważnych powikłań oraz działań niepożądanych. Prowadzone obecnie badania mają na celu opracowanie niewirusowych, tkankowo swoistych wektorów oraz nieinwazyjnych metod wprowadzania materiału genetycznego do wybranych komórek organizmu.

Jedną z metod, która w przyszłości może okazać się skuteczna w nieinwazyjnym i tkankowo selektywnym wprowadzaniu materiału genetycznego do komórek i tkanek, jest powodowana falą ultradźwiękową destrukcja mikrosfer (*Ultrasound Targeted Microbubbles Destruction; UTMD*). Obecnie możliwe jest za pomocą tej metody dokonanie transfekcji komórek obcym materiałem genetycznym w postaci plazmidu w warunkach *in vitro* (70). W piśmiennictwie światowym nie ma opracowania na temat wprowadzenia potencjalnie terapeutycznego genu w postaci plazmidu w warunkach *in vivo* przy pomocy tej metody. W związku z tym, uzasadnionym wydaje się podjęcie próby wprowadzenia obcego materiału genetycznego w postaci niewirusowego wektora (plazmidu) w sposób tkankowo selektywny i nieinwazyjny przy pomocy UTMD.

Celem pracy jest próba udzielenia odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy możliwe jest za pomocą UTMD tkankowo swoiste, nieinwazyjne wprowadzenie materiału genetycznego w postaci niewirusowego wektora (plazmidu) zawierającego gen dla ludzkiego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna 165 (*Vascular Endothelial Growth Factor 165; hVEGF<sub>165</sub>*) do mięśnia sercowego szczura?
2. Czy ekspresja genu dla hVEGF<sub>165</sub> wprowadzonego przy pomocy UTMD będzie ograniczona do narządu docelowego oraz czy spowoduje zmiany w gęstości naczyń (kapilar oraz arteriol) w obrębie mięśnia sercowego?

3. Czy i w jaki sposób UTMD wpływa na funkcję *myocardium* badanych zwierząt ocenianą jako frakcja skracania oraz przyrost masy lewej komory serca przy pomocy badania echokardiograficznego?

Niniejsza praca doktorska została w części doświadczalnej wykonana w całości na University of Texas Southwestern Medical School w Dallas w Teksasie w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, w laboratorium Dr Petera Frenkela. Stanowi ona kontynuację badań nad opracowaniem nieinwazyjnych, tkankowo swoistych metod wprowadzania materiału genetycznego do mięśnia sercowego w ramach grantu American Heart Association (# 0150586N).

### **3. Materiał i metodyka**

#### **3.1. Grupa badana**

Badanie wykonano w modelu zwierzęcym u 35 szczurów płci męskiej rasy Sprague Dawley o masie 300 – 350 g. Szczury zostały losowo przydzielone do 3 grup: I, II i III o liczebności 10 sztuk w każdej z nich. Kryterium podziału stanowił czas od momentu podania materiału genetycznego za pomocą UTMD, do punktu końcowego badania. Osobnikom kolejno w grupach I, II oraz III, po przeprowadzeniu badania echokardiograficznego (patrz Metody), została podana dootrzwewnowo letalna dawka pentobarbitalu odpowiednio po 5, 10 oraz 30 dniach od wprowadzenia genu. W każdej z trzech grup, gen dla hVEGF<sub>165</sub> (Grupa VEGF), otrzymało 5 szczurów. Grupę kontrolną stanowiło 5 osobników w każdej grupie, które jako gen kontrolny otrzymały gen dla enzymu lucyferazy, będący pod kontrolą tego samego promotora co gen dla hVEGF<sub>165</sub> (Grupa kontrolna).

U pięciu szczurów, których nie poddano uprzednio żadnym procedurom doświadczalnym, ustalono histologicznie średnią gęstość kapilar i arteriol na terenie *myocardium* oraz echokardiograficznie funkcję *myocardium* (Grupa 0). Dane te posłużyły jako wartości referencyjne dla porównania danych pochodzących od zwierząt poddanych zabiegowi UTMD (Grupa VEGF i Grupa kontrolna).

#### **3.2. Metody**

##### **3.2.1. Przygotowanie materiału genetycznego w postaci plazmidu**

Użycie plazmidu zawierającego gen dla ludzkiego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna 165 (hVEGF<sub>165</sub>), będącego pod kontrolą promotora wirusa Cytomegalii – CMV-hVEGF<sub>165</sub>, było możliwe dzięki życzliwości Roberta Gerard'a z Division of Cardiology, University of Texas Southwestern Medical School at Dallas, USA. Plazmid z genem kontrolnym dla enzymu lucyferazy został skonstruowany na bazie wektora pCDNA3 (Invitrogen, USA). Izolację plazmidów przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu alkalicznej lizy (132).

Szczep *E.coli* DH5 $\alpha$  zawierający plazmid dla hVEGF<sub>165</sub> inkubowano przez 18 h w temperaturze 37 °C w płynnym podłożu zawierającym kazeinę bogatą w tryptofan (Bacto Tryptone; Difco Lab.; USA) o stężeniu 1 %, ekstrakt z drożdży (Yeast Extract Powder, ICN Biomedicals Inc; USA) o stężeniu 2 % oraz glicerol o stężeniu 0.5 % rozpuszczone w buforze fosforanowym. Następnie roztwór podłoża odwirowano przy prędkości 5000 obr/min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Powstały osad, zawieszono w 10 ml roztworu o temperaturze 4 °C, zawierającego dekstrozę o stężeniu 50 mM, Tris-HCl o stężeniu 15 mM i pH 8.0 oraz EDTA o stężeniu 10 mM i pH 8.0. Po 10 minutach dodano 15 ml roztworu zawierającego 0.2 N NaOH i 1 % SDS i delikatnie mieszano w temperaturze 4°C przez 5 minut. Następnie dodano 10 ml roztworu o temperaturze 4°C zawierającego octan potasu (CH<sub>3</sub>COOK) o stężeniu 3 M i kwasu octowego (CH<sub>3</sub>COOH) o stężeniu 12 %, pozostawiono na lodzie przez 10 minut, odwirowano przy prędkości 8000 obr/min przez 15 minut w temperaturze 4 °C i ponownie przeniesiono na lód. Po 15 minutach dodano 25 ml izopropanolu, dokładnie wymieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Ponownie odwirowano przy prędkości 5000 obr/min przez 10 minut w temperaturze pokojowej i usunięto nadsącz a powstały osad rozpuszczono w 3 ml roztworu Tris-HCl o stężeniu 10 mM, pH 8.0 i temperaturze 4 °C. Dodano 3 ml roztworu chlorku litu (LiCl) o stężeniu 5M, wymieszano i odwirowano przy prędkości 8000 obr/min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Przeniesiono nadsącz do nowej probówki, dodano 6 ml izopropanolu, wymieszano i odwirowano przy prędkości 5000 obr/min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Usunięto nadsącz i odparowano osad, który następnie rozpuszczono w 500  $\mu$ l roztworu Tris-HCl o stężeniu 10 mM i pH 8.0. Dodano 15  $\mu$ l roztworu Rnazy A o stężeniu 60mg/ml i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 2 h. Dodano 5  $\mu$ l roztworu proteiny K o stężeniu 20 mg/ml oraz 10  $\mu$ l roztworu SDS o stężeniu 10 % i inkubowano przez 1 h w temperaturze 56°C. Następnie dodano 500  $\mu$ l mieszaniny fenolu i chloroformu (zmieszanych w stosunku 1:1), zmieszano energicznie i odwirowano przy prędkości 14000 obr/min przez 3 minuty i zebrano nadsącz, po czym ponownie dodano 500  $\mu$ l mieszaniny fenolu i chloroformu i wirowano przy tej samej prędkości. Następnie dodano 500  $\mu$ l

roztworu chloroformu, po wymieszaniu odwirowano przy prędkości 14000 obr/min przez 1 minutę, zebrano nadsącz i dodano 500  $\mu$ l chloroformu i odwirowano przy tej samej prędkości. Powstały nadsącz przeniesiono do probówki i dodano 50  $\mu$ l roztworu octanu sodu o stężeniu 3 M i 1 ml etanolu o stężeniu 100 % i przechowano przez okres 18 h w temperaturze  $-20$  °C. Następnie wirowano przy prędkości 13000 obr/min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Usunięto nadsącz i przemyto osad dwukrotnie etanolem o stężeniu 70 %, odwirowano przy prędkości 14000 obr/min przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Usunięto nadsącz zawierający etanol i odparowano osad w temperaturze pokojowej przez 2 h. Następnie rozpuszczono osad w 500  $\mu$ l roztworu Tris-HCl o stężeniu 10 mM i pH 8.0.

Jakościową oraz ilościową analizę wyizolowanego w ten sposób DNA przeprowadzono na podstawie pomiarów spektrofluorometrycznych przy długości fali 260 nm i 280 nm (stosunek wartości ekstynkcji przy długości fali 260 nm i 280 nm wynosił 2.0) oraz za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym.

### **3.2.2. Wytwarzanie albuminowych mikrosfer połączonych z materiałem genetycznym**

Albuminowe mikrosfery były wytwarzane wg zmodyfikowanego schematu opisanego w literaturze (162). Roztwór buforu fosforanowego (PBS; Phosphate Buffered Saline, Gibco, Invitrogen, USA; nr katalogu 1131041) w ilości 1.2 ml zawierający 5 % albuminę ludzką (MP Biomedicals Inc., USA; nr katalogu 82305), 10 % dekstrozę (Sigma-Aldrich, USA; nr katalogu 25,307-3) oraz DNA w postaci plazmidu o stężeniu 4 mg/ml, był poddany działaniu fali ultradźwiękowej o częstotliwości 20 kHz za pomocą sondy sprzężonej z generatorem ultradźwięków XL2020 (Heat Systems Inc., Farmingdale, New York, USA) przez 8 sekund. Po tym czasie probówkę z powstałym w ten sposób roztworem mikrosfer umieszczano na lodzie do momentu podania zwierzęciu. Do probówki z roztworem poddawany działaniu fali ultradźwiękowej, przez cały czas wytwarzania albuminowych mikrosfer był podawany perfluoropropan ( $C_3F_8$ ) (Air Products, Inc., Allentown, PA, USA), który wypełnia wnętrze mikrosfer i stabilizuje ich strukturę.



### **3.2.3. Przygotowanie zwierząt oraz podanie genu za pomocą powodowanej falą ultradźwiękową destrukcji mikrosfer (UTMD)**

Wszystkie procedury jakie wykonywano u zwierząt, były zgodne z zaleceniami Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences National Research Council opublikowanymi w „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, National Academy Press Washington, D.C., 1996 oraz uprzednio zatwierdzone przez Komisję Etyczną działającą przy Research and Development Committee of Veterans Affairs North Texas Health Care System, Dallas Department of Veterans Affairs Medical Center, USA.

Szczury rasy Sprague Dawley (Harlan, USA) o masie 300 – 350 g, zostały poddane anestezji za pomocą dootrzewnowego podania 0.4 ml roztworu chlorowodoru ketaminy (60 mg/kg) oraz ksylazyny (5 mg/kg) zmieszanych w stosunku 2:1, a następnie zostały umieszczone w pozycji poziomej na grzbiecie.

Sierść z powierzchni klatki piersiowej została usunięta za pomocą elektrycznej maszynki do golenia (Wahl Clipper Corp., Sterling, IL, USA). Na odnóżach zwierzęcia zostały umieszczone elektrody (Red Dot™, 3M Health Care Products, Canada) w celu rejestrowania zapisu fali elektrokardiograficznej (EKG) podczas zabiegu. Przed zabiegiem UTMD u każdego zwierzęcia dokonano rutynowego badania echokardiograficznego w celu uzyskania wartości frakcji skracania oraz oceny masy lewej komory mięśnia sercowego. Badanie to wykonano ponownie przy odpowiednim punkcie końcowym eksperymentu.

Następnie, po nacięciu skóry w okolicy szyjnej po stronie prawej oraz wypreparowaniu żyły szyjnej, został wprowadzony do niej polietylenowy cewnik (PE 50, Becton Dickinson, MD, USA). Pięć szczurów w każdej z grup (I, II, III) otrzymało bądź albuminowe mikrosfery z DNA dla hVEGF<sub>165</sub> bądź z DNA dla kontrolnego genu enzymu lucyferazy. Roztwór mikrosfer z DNA o objętości 1 ml, rozcieńczony uprzednio buforem fosforanowym w stosunku 1:1, został podany dożylnie za pomocą pompy infuzyjnej (Genie, Kent Scientific, USA) w czasie 20 minut z prędkością 3 ml/h. Albuminowe mikrosfery przez ten czas były poddawane działaniu fali ultradźwiękowej za pomocą aparatu echokardiograficznego Sonos 5500 (Agilent Technologies,

Andover, MA, USA) z użyciem transtorakalnej głowicy S3 o częstotliwości 1.3-3.6 Mhz. Głowica została przyłożona do powierzchni klatki piersiowej zwierzęcia w ten sposób, aby uzyskać za jej pomocą obraz mięśnia sercowego w osi krótkiej w połowie jego długości. Aparat echokardiograficzny został zaprogramowany na podstawie zapisu EKG tak, aby emitował falę ultradźwiękową o częstotliwości 1.3 MHz w trakcie trwania fazy końcowo-skurczowej (w tym celu, emisja impulsu fali ultradźwiękowej była opóźniona o 40-75 ms względem załamka R elektrokardiogramu), w odstępach czasowych równych czterem ewolucjom serca. Indeks mechaniczny (stosunek mocy fali ultradźwiękowej do kwadratu jej częstotliwości) wynosił 1.6. Po zakończeniu procedury, zwierzęta ulegały samoistnemu wybudzeniu. Nie zanotowano przypadków śmiertelnych podczas trwania zabiegu oraz w czasie obserwacji przez 5, 10 i 30 dni po zabiegu.

Zwierzętom w zależności od grupy, w której się znajdowały, po 5 (Grupa I), 10 (Grupa II) oraz 30 (Grupa III) dniach od podania genu, po powtórnych wykonaniu echokardiograficznych pomiarów frakcji skracania oraz masy lewej komory mięśnia sercowego, została dootrzewnowo podana letalna dawka pentobarbitalu. Mięsień sercowy, płuca, wątroba oraz śledziona zostały pobrane od każdego zwierzęcia w celu wykonania preparatów histologicznych oraz oceny obecności hVEGF<sub>165</sub> za pomocą metody Western blot.

#### **3.2.4. Badania histochemiczne oraz immunohistochemiczne**

Mięsień sercowy pobrany od zwierzęcia został utrwalony w mieszaninie składającej się z roztworów 100 %-owego metanolu, kwasu octowego oraz chloroformu zmieszanych w stosunku 6:3:1. Po 24 h, tkanki w kasetach histologicznych zostały umieszczone w roztworze 70 %-owego roztworu etanolu a następnie zatopione w parafinowych bloczkach. Skrawki tkanki o grubości 5  $\mu\text{m}$  były barwione histochemicznie oraz immunohistochemicznie. Wykonano również rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną oraz metodą Giemsy. Wszystkie preparaty oceniano za pomocą mikroskopu świetlnego (Olympus CH-2; Olympus Optical Co. Ltd, Japan).

### **3.2.5. Histochemiczne barwienie komórek śródbłonka naczyniowego za pomocą lektyny BS-I (*Griffonia simplicifolia*)**

Uzyskane z parafinowych bloczków skrawki tkanki poddawano procesowi deparafinizacji, który polegał na trzykrotnym płukaniu w roztworze ksylenu oraz na stopniowym uwodnieniu w kolejnych rozcieńczeniach alkoholu etylowego (100 % - 95 % - 50 %). Po uprzednim płukaniu w roztworze PBS, materiał inkubowano kolejno przez 1 h z 10 %-owym roztworem płodowej surowicy wołu w łaźni wodnej o temp. 37 °C w celu zablokowania nieswoistych miejsc wiązania. Następnie, preparaty poddawano działaniu alkoholowego roztworu 0.3 % nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w temperaturze pokojowej, w celu zahamowania endogennej aktywności enzymu peroksydazy. Preparaty inkubowano z biotynylowaną lektyną BS-I (*Griffonia simplicifolia* agglutinin I: BS-I lectin biotinylated; Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu L-3759) o stężeniu 10 µg/ml przez okres 18 h w temperaturze 4 °C. Reakcję barwną wywoływano za pomocą roztworu czterochloru diaminobenzyny – DAKO<sup>®</sup> DAB Chromogen (DAKO Corporation, USA) po wcześniejszej inkubacji przez 1 h w temperaturze pokojowej z roztworem peroksydazy chrzanowej zkonjugowanej ze streptawidyną o stężeniu 5 µg/ml. Preparaty barwiono hematoksyliną a następnie zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym z użyciem Cytoseal<sup>™</sup> 60 (Richard-Allan Scientific, USA).

### **3.2.6. Immunohistochemiczne barwienie CD31(PECAM-1) – swoistego markera komórek śródbłonka naczyniowego, alfa-aktyny mięśni gładkich oraz hVEGF<sub>165</sub>**

Po procesie deparafinizacji i uwodnienia wg schematu opisanego poprzednio, preparaty przeznaczone do wykonania barwień immunohistochemicznych gotowano w roztworze cytrynianu sodu o stężeniu 0.01 M i wartości pH=6.6 w kuchni mikrofalowej o mocy 900 W przez okres 20 minut. Materiał inkubowano następnie przez okres 1 h z roztworem 10 %-owej płodowej surowicy wołu w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C w celu zablokowania nieswoistych miejsc wiązania przeciwciał a następnie z alkoholowym roztworem 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w celu zahamowania endogennej

aktywności enzymu peroksydazy. Każdy z preparatów osobno poddawano inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi dla: antygenu CD31(PECAM-1) (BD Pharmingen, USA; nr katalogu 550300) w rozcieńczeniu 1:50, alfa-aktyny mięśni gładkich (Cell Marque Corp., USA; nr katalogu CMC535) w rozcieńczeniu 1:20 oraz dla hVEGF<sub>165</sub> (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; nr katalogu sc-152-G) o stężeniu 1 µg/ml przez 18 h w temperaturze 4 °C. Reakcję barwną wywoływano za pomocą roztworu czterochloru diaminobenzyny – DAKO<sup>®</sup> DAB Chromogen (DAKO Corporation, USA) po wcześniejszej 1 h inkubacji w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi zkonjugowanymi z biotyną, a następnie z kompleksem streptawidyny i peroksydazy chrzanowej z zastosowaniem odpowiednich zestawów: „Goat ABC Staining System” (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; nr katalogu sc-2023) dla hVEGF<sub>165</sub> oraz „Mouse ABC Staining System” (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; nr katalogu sc-2017) dla CD31(PECAM-1) oraz alfa-aktyny mięśni gładkich. Preparaty barwiono hematoksyliną i zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym z użyciem Cytoseal<sup>™</sup> 60.

### **3.2.7. Barwienie preparatów *myocardium* hematoksyliną – eozyną**

Proces deparafinizacji i uwodnienia wykonano jak poprzednio. Preparaty następnie umieszczano w roztworze hematoksyliny (Hematoxylin, Richard-Allan Scientific, USA; nr katalogu 7211) przez 1 minutę i płukano w wodzie destylowanej. Następnie płukano w roztworze alkoholu etylowego o stężeniu 95% przez 1 minutę i umieszczano w roztworze eozyny (Eosin Ploxine Stain Working, Poly Scientific, USA; nr katalogu s176) na 10 sekund. Po dwukrotnym płukaniu w roztworze alkoholu etylowego o stężeniu 100 %, preparaty umieszczano w roztworze ksylenu o stężeniu 100 % na 5 minut. Preparaty następnie suszono w temperaturze pokojowej i zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym z użyciem Cytoseal<sup>™</sup> 60.

### **3.2.8. Barwienie preparatów *myocardium* metodą Giemsy**

Po procesie deparafinizacji i uwodnienia przeprowadzonego wg opisanego wcześniej schematu oraz trzykrotnym płukaniu w roztworze PBS o pH 5.0, preparaty umieszczano w roztworze Giemsy (Wright-Giemsa Stain Solution, Richard-Allan Scientific, USA; nr katalogu 89013) na 1 minutę. Następnie trzykrotnie płukano w roztworze PBS o pH 5.0, suszono w temperaturze pokojowej i zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym z użyciem Cytoseal™ 60.

### **3.2.9. Wykrywanie obecności hVEGF<sub>165</sub> w mięśniu sercowym za pomocą techniki Western blot**

Fragmety *myocardium* pobierano od zwierząt w momencie końcowym badania w trakcie uzyskiwania materiału na badania histologiczne. Tkanę ważono poddawano następnie homogenizacji przy użyciu elektrycznego homogenizatora Ultra Turrax T-25 (IKA Works Inc., USA) w roztworze PBS zawierającego niejonowy detergent Nonidet P-40 (Amersham Biosciences, USA; nr katalogu US1928) o stężeniu 1 %, sól sodową deoksyholanu o stężeniu 0.5 % (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu D5670), fluorek fenylometylosulfonylu – PMSF (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu P7626) o stężeniu 0.05 M, 30 µl roztworu aprotyniny (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu A6279) na każdy ml buforu oraz sól sodową kwasu ortowanadowego – Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu S6508). Na każdy 1 g tkanki użyto do homogenizacji 2 ml roztworu buforu.

W każdej z próbek oceniano stężenie białka całkowitego metodą spektrofluorometryczną, używając zestawu „BCA Protein assay Reagent kit” (Pierce, IL, USA; nr katalogu 23227). Do 2 ml roztworu roboczego, wchodzącego w skład zestawu, dodawano 100 µl homogenatu mięśnia sercowego szczura, inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C i oznaczano ekstynkcję przy pomocy spektrofluorometru przy długości fali 562 nm. Każdego pomiaru stężenia białka całkowitego dokonywano dwukrotnie i obliczano średnią arytmetyczną, na podstawie której odczytywano stężenie białka z wykresu krzywej standardowej sporządzanej za każdym razem podczas dokonywania oznaczeń.

Homogenaty zawierające jednakową ilość białka (50 µg) poddano rozdzielaniu za pomocą elektroforezy z użyciem 12 %-owego żelu poliakrylamidowego (Ready gel 12 % Tris-HCl; Bio-Rad, USA; nr katalogu 161-1156), przy napięciu 120 V przez 1 h w buforze Tris-glycine SDS (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu 51306) w temperaturze pokojowej. Następnie rozdzielone próbki przenoszono z żelu, również przy pomocy elektroforezy przy napięciu 35 V przez 1h na membranę z fluorku polivinylidenu (PVDF) (Immobilon<sup>TM</sup>-P, transfer membranes; Millipore Corp., Bedford, MA, USA; nr katalogu IPVHN20200) w buforze zawierającym Tris-glicynę (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu 93015), alkohol metylowy oraz wodę destylowaną zmieszanych w stosunku 1:2:7 w temperaturze 4 °C (19).

Po uprzednim zablokowaniu niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał za pomocą roztworu 5 %-owego mleka w proszku (Carnation powdered milk, Nestle, USA) rozpuszczonego w buforze TBS zawierającym 0.05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich Inc., USA; nr katalogu T9039), membranę poddano inkubacji z roztworem mysich przeciwciał monoklonalnych klasy IgG skierowanych przeciwko hVEGF<sub>165</sub> (R&D Systems, Inc., USA; nr katalogu MAB293,) przez 18 h w temperaturze 4 °C. Przeciwciała rozpuszczono w stosunku 1: 1000 w 5 %-owym roztworze albuminy surowicy wołu (Equitech-Bio, TX, USA; nr katalogu BAH 67-1000) w buforze TBS z dodatkiem 0.1 % Tween-20. Następnie membranę przemywano trzykrotnie w buforze TBS zawierającym 0.1 % Tween-20 przez 5 minut i inkubowano z kozimi przeciwciałami drugorzędowymi zkonjugowanymi z peroksydazą chrzanową (R&D Systems, Inc., USA; nr katalogu HAF007), skierowanymi przeciwko monoklonalnym przeciwciałom mysim klasy IgG, przez 1 h w temperaturze pokojowej. Przeciwciała drugorzędowe rozpuszczono w stosunku 1: 50000 w 5 %-owym roztworze albuminy wołu w buforze TBS zawierającym 0.1% Tween-20. Następnie membranę przemywano trzykrotnie w buforze TBS zawierającym 0.1% Tween-20 przez 5 minut.

Reakcję barwną wywoływano za pomocą chemiluminescencyjnego substratu dla peroksydazy chrzanowej (SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA) z użyciem kliszy fotograficznej

(Hyperfilm™ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, UK Limited, England; nr katalogu RPN1674K).

### **3.2.10. Ocena gęstości naczyń włosowatych (kapilar) i arteriol w preparatach *myocardium***

Naczynia uwidocznione za pomocą lektyny BS-I o średnicy mniejszej niż 10 µm były kwalifikowane jako naczynia włosowate (kapilary), zaś te o średnicy 30-100 µm, które wykazywały potwierdzoną immunohistochemiczną obecność alfa-aktyny mięśni gładkich, uważane były za arteriole.

Naczynia (kapilary oraz arteriole) liczone w 50 losowo wybranych polach w preparacie pochodzącym od każdego zwierzęcia, przy 400-krotnym powiększeniu pod mikroskopem świetlnym (Olympus CH-2; Olympus Optical Co. Ltd, Japan).

Gęstość naczyń została przedstawiona jako ich ilość przypadająca na powierzchnię 1 mm<sup>2</sup>.

### **3.2.11. Echokardiograficzna ocena funkcji *myocardium* przez określenie frakcji skracania oraz masy lewej komory mięśnia sercowego**

Wszystkich pomiarów dokonano na podstawie cyfrowych obrazów *myocardium* uzyskanych za pomocą głowicy S12 (5-12 MHz) aparatu echokardiograficznego Sonos 5500 (Agilent Technologies, Andover, MA, USA).

Przybliżoną wartość masy lewej komory (MLK) uzyskano wg wzoru:

$$\text{MLK} = 1.05 \times \{[5/6A_1(L+t)] - [5/6A_2(L)]\},$$

gdzie  $A_1$  – pomiar długości obwodu granic nasierdza;  $A_2$  – pomiar długości obwodu granic wsierdza;  $L$  – długość lewej komory zmierzona od koniszka serca do punktu znajdującego się w połowie długości podstawy serca;  $t$  – grubość ściany lewej komory mięśnia sercowego. Wartości  $A_1$ ,  $A_2$  oraz  $t$  uzyskano w fazie końcowo-rozkurczowej cyklu pracy serca w osi krótkiej, zaś wartość  $L$  została zmierzona w osi długiej.

Frakcja skracania mięśnia sercowego (FS) została obliczona na podstawie wzoru:

$$FS = [(LVEDA-LVESA)/LVEDA] \times 100\%,$$

gdzie LVEDA – powierzchnia lewej komory serca w fazie końcowo-rozkurczowej w  $\text{cm}^2$  (*Left Ventricle End-Diastolic Area*), LVESA – powierzchnia lewej komory serca w fazie końcowo-skurczowej w  $\text{cm}^2$  (*Left Ventricle End-Systolic Area*) (107).

Wartości wskaźników LVEDA oraz LVESA zostały obliczone automatycznie przez oprogramowanie komputerowe echokardiografu na podstawie pomiarów obwodu nasierdzia oraz wsierdza dokonanych w osi krótkiej w połowie długości mięśnia sercowego, odpowiednio podczas fazy rozkurczowej i skurczowej.

### **3.3. Analiza statystyczna**

Dla zmiennych mierzalnych do porównania (lub do oceny statystycznej istotności obserwowanych różnic) zastosowano testy parametryczne: *t*-Studenta i ANOVA oraz nieparametryczne: U Manna-Whitneya oraz kolejności par Wilcoxon. Wartości *p* mniejsze od 0.05 uznano za statystycznie znamienne. Dane liczbowe zostały przedstawione jako wartości średnie  $\pm$  błąd standardowy średniej (*SEM; Standard Error of the Mean*). W obliczeniach statystycznych zastosowano program StatView SAS Institute Inc. for Mac2 Win<sup>®</sup> software 1990-94 Altura Software Inc.

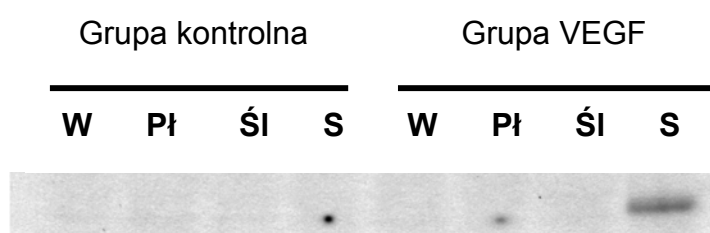


#### 4. Wyniki

Ogółem 30 szczurów zostało poddanych zabiegowi UTMD. Wszystkie zwierzęta przeżyły zabieg i nie zanotowano śmierci żadnego z nich przed ustalonym wcześniej punktem końcowym badania zależnym od grupy, do której zostały wcześniej przydzielone. Nie odnotowano zmian w ich aktywności oraz łaknieniu podczas okresu obserwacji. W trakcie pobierania narządów wewnętrznych – mięśnia sercowego, płuc, wątroby oraz śledziony – nie uwidoczniło makroskopowo naczynek, guzów oraz innych widocznych patologii w obrębie klatki piersiowej oraz jamy brzusznej.

##### 4.1. Ocena ekspresji genu dla hVEGF<sub>165</sub> w mięśniu sercowym za pomocą metody Western blot oraz immunohistochemicznie

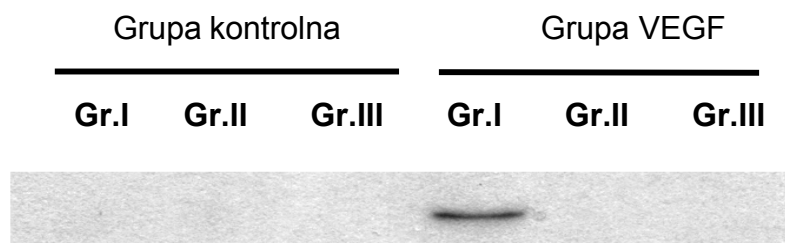
Obecność białkowego produktu genu specyficznego dla hVEGF<sub>165</sub> o masie 42 kD została potwierdzona za pomocą metody Western blot. Nie wykazano obecności innych izoform hVEGF: hVEGF<sub>121</sub>, hVEGF<sub>189</sub> i hVEGF<sub>206</sub>. Izoforma hVEGF<sub>165</sub> była wykrywalna tylko w homogenatach mięśnia sercowego i tylko u zwierząt, które otrzymały plazmid dla hVEGF<sub>165</sub>. W homogenatach pochodzących z tkanek leżących w pobliżu narządu docelowego dla UTMD (płuca, śledziona, wątroba) nie wykazano ekspresji genu dla hVEGF<sub>165</sub> (Ryc. 2).



Rycina 2. Tkankowo swoista ekspresja genu dla hVEGF<sub>165</sub> na terenie *myocardium*, wykazana za pomocą metody Western blot w homogenatach tkanek pobranych od zwierząt w Grupie I (5 dni po zabiegu); (W-wątroba, Pł-płuca, Śl-śledziona, S-serce)

O czasowej ekspresji genu świadczy fakt obecności jego produktu tylko u zwierząt z Grupy I (5 dni po zabiegu). Zarówno w Grupach II i III oraz u

zwierząt, które otrzymały plazmid z genem kontrolnym, nie wykazano obecności hVEGF<sub>165</sub> za pomocą metody Western blot (Ryc. 3).



Rycina 3. Czasowa ekspresja genu dla hVEGF<sub>165</sub> wykazana za pomocą metody Western blot w homogenatach mięśnia sercowego w Grupie VEGF po 5 dniach od zabiegu; Gr.I – 5 dni po zabiegu, Gr.II – 10 dni po zabiegu, Gr.III – 30 dni po zabiegu

Obecność hVEGF<sub>165</sub> na terenie mięśnia sercowego została również potwierdzona za pomocą immunohistochemii (Fotografia 1 B, D).

#### 4.2. Badania histologiczne mięśnia sercowego w grupie zwierząt, która otrzymała plazmid dla hVEGF<sub>165</sub>

W mięśniu sercowym szczurów, którym za pomocą metody UTMD podano plazmid dla hVEGF<sub>165</sub>, 5 i 10 dni po zabiegu wykazano obecność rozproszonych na terenie *myocardium* skupisk aktywnych proliferacyjnie komórek z widocznymi figurami podziałowymi (Fot. 1 C,E). Większość z nich miała wrzecionowaty kształt i znajdowała się w bezpośrednim sąsiedztwie kapilar. Wykazana immunohistochemicznie obecność  $\alpha$ -aktyny mięśni gładkich na terenie niektórych z nich, pozwala przypuszczać, iż są to fibroblasty oraz miofibroblasty. Barwienie metodą Giemsy nie uwidocznilo wśród tych skupisk komórek o charakterze zapalnym (Fot. 1 E, H).

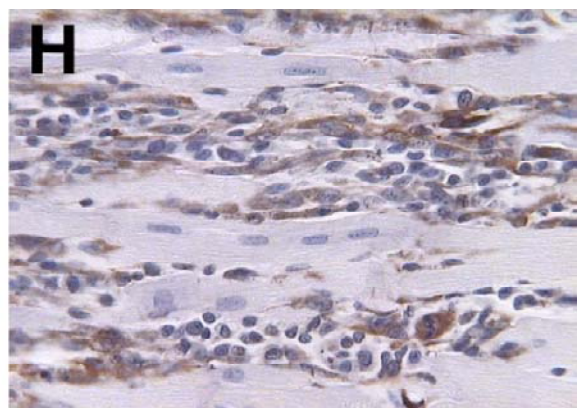
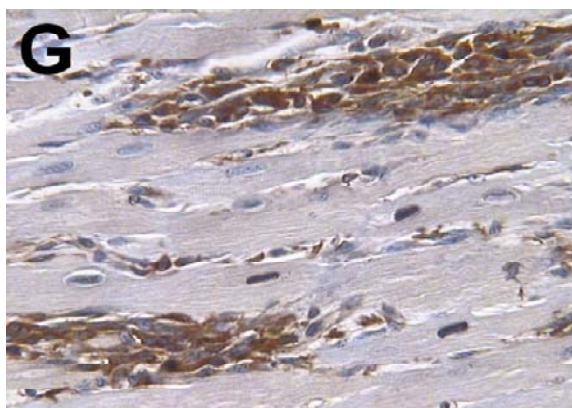
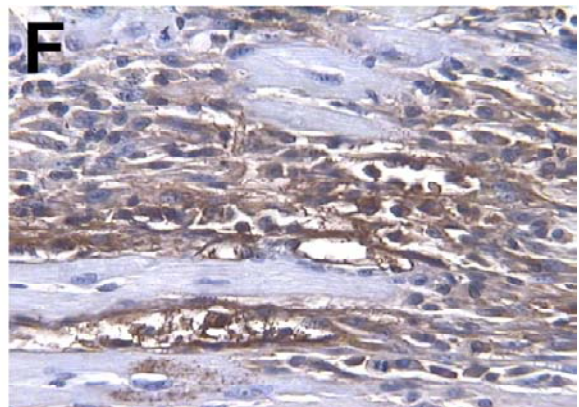
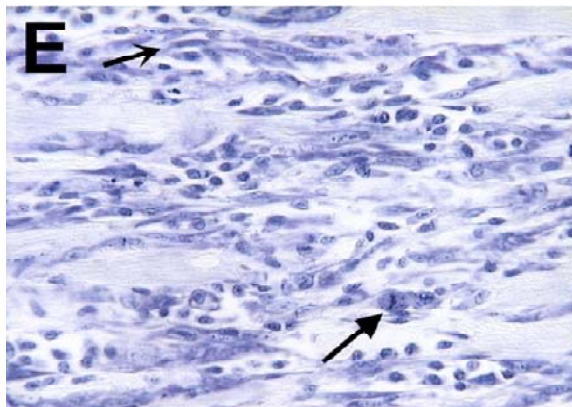
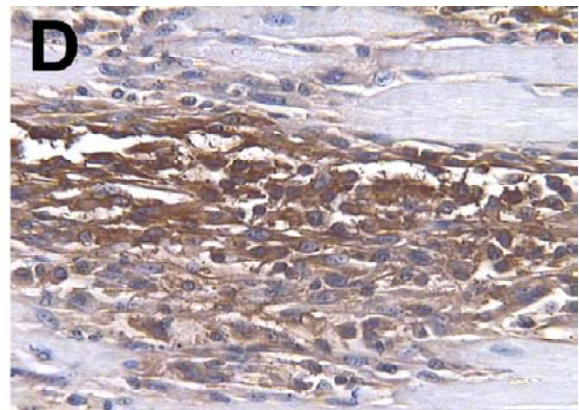
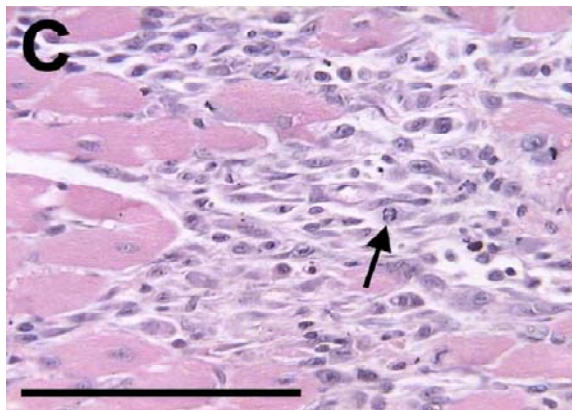
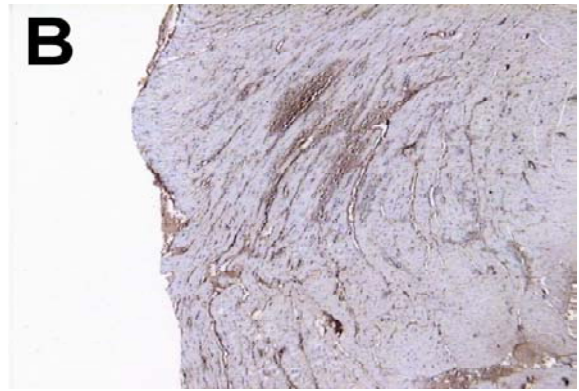
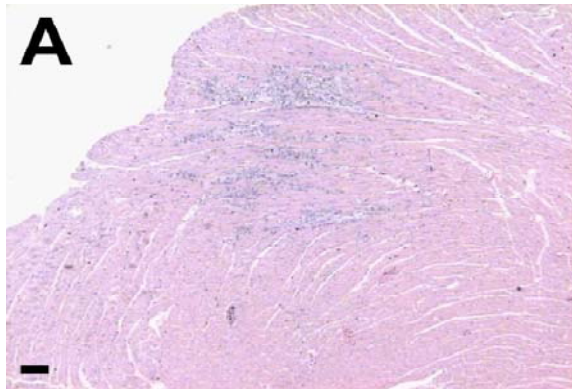
Za pomocą badania immunohistochemicznego na terenie większości tych komórek wykazano obecność hVEGF<sub>165</sub>, co potwierdza ich udaną transfekcję plazmidem z genem dla hVEGF<sub>165</sub>. Pośrednim dowodem transfekcji również komórek śródbłonna plazmidem dla hVEGF<sub>165</sub>, jest obecność na powierzchni niektórych z tych komórek markerów endotelium

naczyniowego – CD31(PECAM-1) oraz lektyny BS-I (*Griffonia simplicifolia*) – wykazana metodą immuno- oraz histochemii (Fot. 1 F,G). Istnienia podobnych zmian nie uwidoczniło w badaniu histologicznym mięśnia sercowego u zwierząt z Grupy kontrolnej w każdym z punktów końcowych badania oraz 30 dni po zabiegu UTMD w Grupie VEGF.

---

Fotografia 1 (str. 52). Obraz histologiczny mięśnia sercowego w Grupie VEGF 5 dni po zabiegu UTMD.

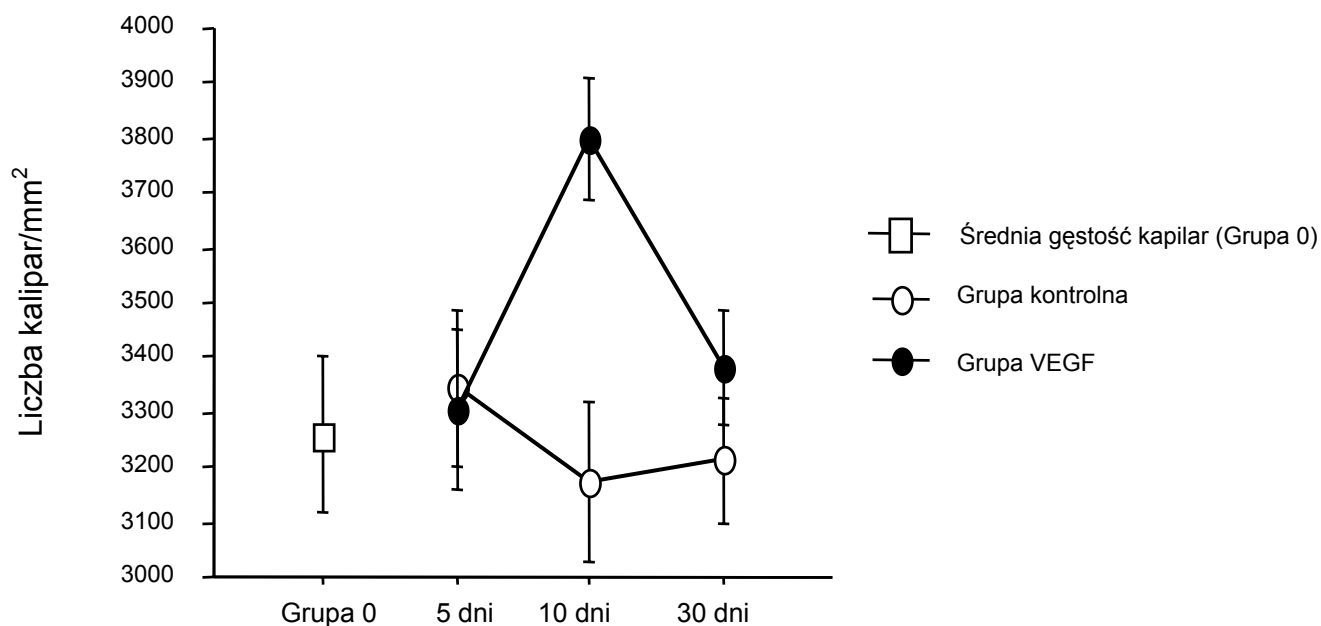
A,C – rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną ujawniające skupiska komórek o wrzecionowatym kształcie z zaznaczonymi figurami podziałowymi (strzałka zamknięta); B,D – potwierdzona immunohistochemicznie obecność hVEGF; E – barwienie metodą Giemsy wykazujące brak komórek o charakterze zapalnym; strzałka otwarta wskazuje komórkę o wrzecionowatym kształcie a strzałka zamknięta figurę podziałową; F – wykazana immunohistochemicznie obecność swoistego dla komórek śródbłonna markera CD31; G – pozytywne barwienie histochemiczne lektyną BS-I (*Griffonia simplicifolia*) jako alternatywnego markera endotelium; H – obecność  $\alpha$ -aktyny mięśni gładkich; A, B – powiększenie 40x; C-H – powiększenie 400x; Podłużna linia (A,C) oznacza długość 100 $\mu$ m.



### 4.3. Zmiany gęstości kapilar oraz arterioli na terenie *myocardium*

5 dni po zabiegu UTMD (Grupa I), nie zaobserwowano statystycznie znamienych różnic w gęstości kapilar pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

W 10 dni po zabiegu (Grupa II), wyłącznie w grupie zwierząt, które otrzymały plazmid z genem dla hVEGF<sub>165</sub>, zaobserwowano wzrost gęstości kapilar (Ryc. 4).



Rycina 4. Gęstość kapilar na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.

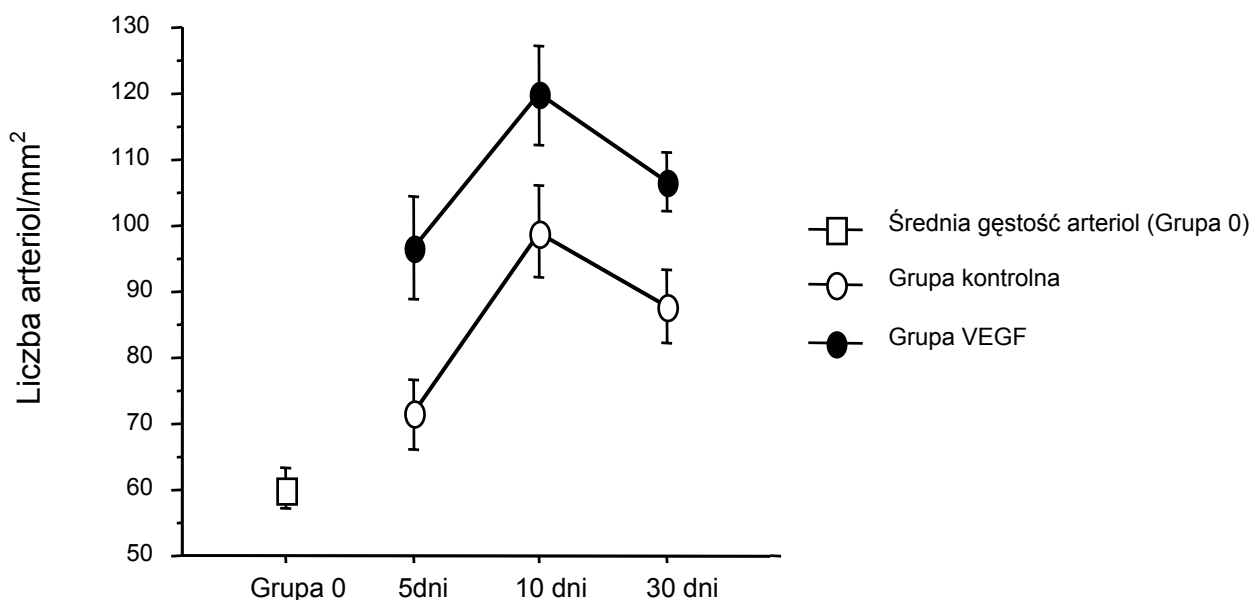
Średnia gęstość kapilar wzrosła w sposób statystycznie znamieny ( $p < 0.05$ ) w Grupie VEGF ( $3.8 \pm 0.11 \times 10^3 / \text{mm}^2$ ) zarówno w porównaniu z Grupą kontrolną ( $3.17 \pm 0.15 \times 10^3 / \text{mm}^2$ ), jak również z Grupą 0 ( $3.26 \pm 0.14 \times 10^3 / \text{mm}^2$ ) (Tab. 4, Fot. 2).

Po 30 dniach (Grupa III) różnice w gęstości kapilar powróciły do wartości początkowych i nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami za wyjątkiem Grupy VEGF, gdzie gęstość kapilar była nadal nieznacznie większa niż w Grupie kontrolnej ( $p = 0.045$ ) (Ryc. 4, Tab. 4).

Tabela 4. Zmiany gęstości kapilar na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.

	Średnia gęstość kapilar/ mm <sup>2</sup>	Wartości znamienności statystycznej <i>p</i>	
		Względem Grupy 0	Względem Grupy kontrolnej
<b>Grupa 0</b>	3.26±0.14 x10 <sup>3</sup>		
<b>Grupa I (5 dni)</b>			
Grupa kontrolna	3.34±0.14x10 <sup>3</sup>	0.4584	-
Grupa VEGF	3.31±0.14x10 <sup>3</sup>	0.6474	0.7396
<b>Grupa II (10 dni)</b>			
Grupa kontrolna	3.17±0.15x10 <sup>3</sup>	0.4553	-
Grupa VEGF	3.8±0.11x10 <sup>3</sup>	<0.05	<0.05
<b>Grupa III (30 dni)</b>			
Grupa kontrolna	3.21±0.11x10 <sup>3</sup>	0.6248	-
Grupa VEGF	3.38±0.1x10 <sup>3</sup>	0.1837	0.0452

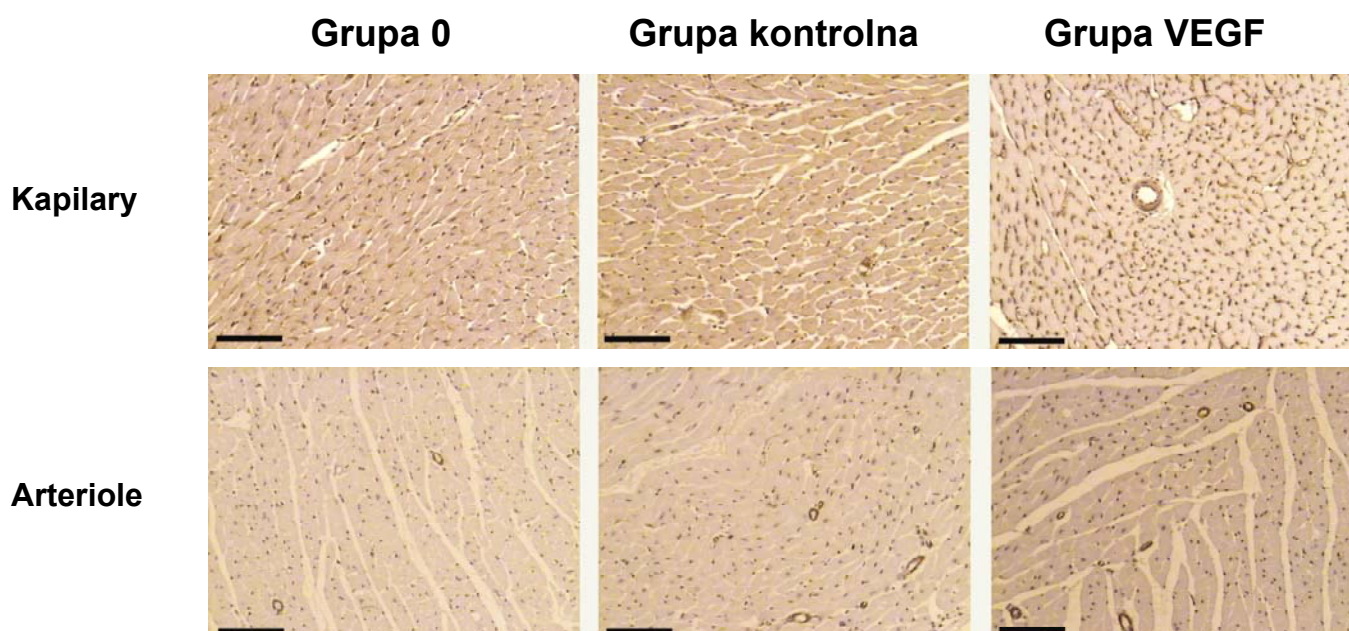
Średnia gęstość arterioli (naczyni mikrokrążenia o średnicy 30-100 μm charakteryzujących się obecnością alfa-aktyny mięśni gładkich w strukturze ściany) na terenie *myocardium*, wzrosła zarówno u szczurów, które otrzymały plazmid z genem dla hVEGF<sub>165</sub> jak i w Grupie kontrolnej, w porównaniu z Grupą 0 (Rycina 5).



Rycina 5. Średnia gęstość arterioli na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.

Tabela 5. Zmiany gęstości arterioli na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.

	Średnia gęstość arterioli/ mm <sup>2</sup>	Wartości znamienneści statystycznej <i>p</i>	
		Względem Grupy 0	Względem Grupy kontrolnej
<b>Grupa 0</b>	60.1±1.6		
<b>Grupa I (5 dni)</b>			
Grupa kontrolna	71.6±2.7	0.014	-
Grupa VEGF	96.8±3.9	<0.05	<0.05
<b>Grupa II (10 dni)</b>			
Grupa kontrolna	99.1±3.4	<0.05	-
Grupa VEGF	119.8±3.7	<0.05	<0.05
<b>Grupa III (30 dni)</b>			
Grupa Kontrolna	87.1±2.8	<0.05	-
Grupa VEGF	106.7±2.3	<0.05	<0.05



Fotografia 2. Gęstość kapilar i arterioli na terenie *myocardium* w badanych grupach (Grupa 0, Grupa kontrolna oraz Grupa VEGF) 10 dni po zabiegu UTMD; Powiększenie 200x, podłużna linia oznacza długość 100 μm.

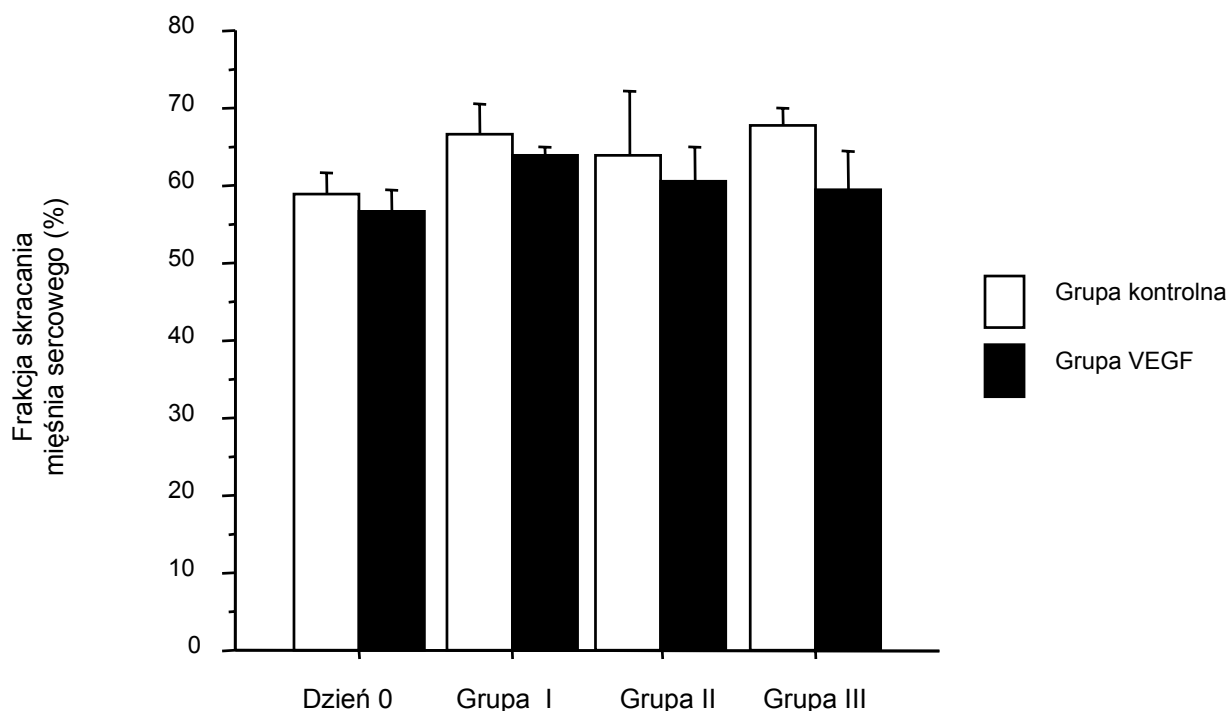
Statystycznie znamienne różnice odnotowano we wszystkich obserwowanych punktach czasowych badania (Ryc. 5, Tab. 5). W danym punkcie końcowym badania, ilość arterioli/mm<sup>2</sup> była większa w Grupie VEGF niż w Grupie kontrolnej. Największy wzrost zaobserwowano po 10 dniach od zabiegu (Grupa II) w Grupie VEGF (119.8±3.7) w porównaniu zarówno z

Grupą kontrolną ( $99.1 \pm 3.4$ ) jak i z Grupą 0 ( $60.1 \pm 1.6$ ). Po 30 dniach (Grupa III), średnia gęstość arterioli zmniejszyła się znacząco w porównaniu z Grupą II ( $p=0.01$ ). Pozostawała ona jednak nadal znacząco większa w porównaniu z Grupą 0 ( $p<0.05$ ) oraz z wartościami w Grupie I ( $p<0.05$ ) (Fot.2).

#### 4.4. Echokardiograficzna ocena funkcji *myocardium*

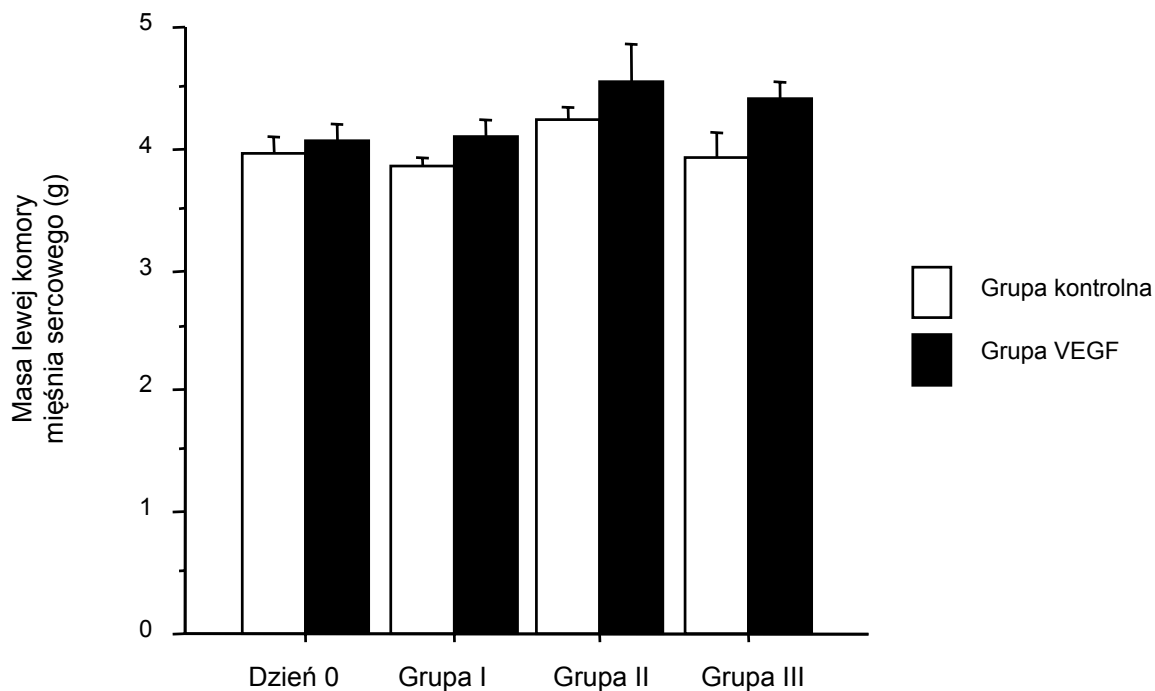
Funkcję *myocardium* oceniano na podstawie pomiarów echokardiograficznych wartości frakcji skracania oraz przyrostu masy lewej komory mięśnia sercowego.

W kolejnych punktach końcowych badania oraz w dniu zabiegu UTMD (Dzień 0), nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy Grupą VEGF i Grupą kontrolną (Ryc. 6, 7; Tab. 6).



Rycina 6. Wartości frakcji skracania mięśnia sercowego ocenione echokardiograficznie w badanych grupach zwierząt.





Rycina 7. Wartości masy lewej komory mięśnia sercowego ocenione echokardiograficznie w badanych grupach zwierząt.

Tabela 6. Wartości frakcji skracania oraz masa lewej komory mięśnia sercowego oceniane echokardiograficznie w badanych grupach zwierząt.

Punkt czasowy	Frakcja skracania mięśnia sercowego (%)		Wartość $p$	Masa lewej komory mięśnia sercowego (g)		Wartość $p$
	Grupa VEGF	Grupa Kontrolna		Grupa VEGF	Grupa Kontrolna	
Dzień 0 (zabiegu UTMD)	53.8±3.0	59.6±2.8	0.26	4.17±0.1	3.82±0.1	0.14
5 dni po zabiegu UTMD	63.9±0.8	66.8±3.6	0.39	4.08±0.2	3.85±0.1	0.34
10 dni po zabiegu UTMD	60.7±4.1	64.0±8.5	0.77	4.54±0.3	4.22±0.1	0.44
30 dni po zabiegu UTMD	59.4±5.0	67.9±2.1	0.26	4.41±0.2	3.93±0.2	0.2

## 5. Dyskusja

*„By all means keep your enthusiasm, but let verification be its constant companion”*

*„Z pewnością zachowaj swój entuzjazm, lecz niech krytycyzm będzie jego stałym towarzyszem”*

Ludwik Pasteur (1822-1895)

W ostatnich latach jesteśmy świadkami powstawania nowych leków, których struktura oraz funkcja jest coraz częściej zaprojektowana w laboratorium badawczym a nie jest dziełem szczęśliwego trafu. Miejsce działania tych substancji przenosi się coraz bardziej w głąb struktur komórkowych. Leki stosowane w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego mogą stanowić tego przykład. Unowocześnione beta blokery, działające na poziomie śródbłonna naczyniowego inhibitory konwertazy angiotensyny oraz nowe leki przeciwplatekcyjne i cytoprotekcyjne, w ciągu ostatnich kilkunastu lat wydłużyły życie oraz polepszyły jego jakość u wielu pacjentów cierpiących na choroby układu sercowo-naczyniowego. Coraz większa dostępność oraz skuteczność zabiegów inwazyjnych i chirurgicznych takich jak PTCA, chirurgiczne pomostowanie tętnic wieńcowych, rewaskularyzacja mięśnia sercowego za pomocą lasera, trombandarterektomia, czy w końcu przeszczep serca wraz z coraz bardziej skutecznymi preparatami farmakologicznymi stanowią o postępie jaki się dokonał w terapii kardiologicznej.

Niestety, nawet na obecnym poziomie wiedzy i umiejętności, w grupie pacjentów z wielonaczyniową chorobą wieńcową oraz rozszanymi zmianami miażdżycowymi w tętnicach wieńcowych, konwencjonalne metody zarówno farmakologiczne, inwazyjne i chirurgiczne nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. U około 30-50% pacjentów, u których wykonano zabieg PTCA dochodzi do zjawiska restenozy naczynia wieńcowego w miejscu interwencji (93). Pomimo znacznego zmniejszenia się śmiertelności okołoperacyjnej oraz odległej po zabiegach chirurgicznego pomostowania tętnic wieńcowych, duży odsetek pacjentów posiada ubytki neurologiczne będące skutkiem krążenia pozaustrojowego, a zjawisko późnej restenozy pomostów (zwłaszcza żylnych) występuje u około 60 % z nich po 10 latach od zabiegu

(150,180). Nadzieją dla tej grupy chorych, która być może w przyszłości zaowocuje skuteczną, alternatywną i bezpieczną metodą leczenia, jest terapia genowa (179).

Znaczny postęp w dziedzinie genetyki człowieka oraz poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podłoża wielu chorób, prowadzą do coraz śmielszego sięgania po gen jako po nowoczesne *panaceum* na schorzenia trapiące człowieka od wieków. Przyszłe kliniczne zastosowanie metod terapii genowej zależy od opracowania bezpiecznych, narządowo-swoistych oraz efektywnych metod wprowadzania materiału genetycznego do komórek w warunkach *in vivo*. Na przestrzeni ostatnich lat jesteśmy świadkami „wzlotów i upadków” zarówno doświadczalnych, jak i klinicznych prób terapeutycznego modyfikowania genomu komórek. Ryzyko możliwych powikłań oraz działań niepożądanych towarzyszących terapii genowej u ludzi, stanowi jedną z najważniejszych przeszkód, stojących na drodze do jej upowszechnienia w klinice. Badania prowadzone nad udoskonaleniem wektorów niewirusowych oraz nieinwazyjnych metod ich wprowadzania do komórek, służą zwiększeniu bezpieczeństwa terapii genowej. Powodzenie tych badań może w przyszłości pomóc pokonać ograniczenia, które towarzyszą temu sposobowi leczenia oraz stanowić lepszą i bezpieczniejszą metodę leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego w porównaniu z metodami stosowanymi obecnie.

Celem niniejszej pracy była próba zastosowania metody polegającej na destrukcji albuminowych mikrosfer przez falę ultradźwiękową (UTMD) w nieinwazyjnym, tkankowo swoistym wprowadzeniu materiału genetycznego w postaci plazmidu do komórek mięśnia sercowego. Ocenie poddano czas trwania i efekty biologiczne jego ekspresji oraz bezpieczeństwo tej metody w warunkach *in vivo*.

Za pomocą techniki UTMD w sposób nieinwazyjny dokonano transfekcji mięśnia sercowego szczura plazmidem zawierającym gen dla ludzkiego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna 165 (hVEGF<sub>165</sub>). W literaturze światowej, nie ma w chwili obecnej doniesień o zastosowaniu metody UTMD w transfekcji komórek *myocardium* genem w postaci plazmidu w modelu *in vivo*, którego ekspresja miałaby zastosowanie terapeutyczne. Grupa Paula Grayburna z University of Texas Southwestern Medical School

at Dallas dokonała udanej transfekcji kardiomiocytów genem „kontrolnym“ dla enzymu  $\beta$ -galaktozydazy przy pomocy UTMD. Jako wektora w tym modelu eksperymentalnym wykorzystano adenowirusa, a poważnym efektem ubocznym zaobserwowanym przez tych badaczy była nieswoista transfekcja wątroby związana z tropizmem adenowirusa (194). Niniejsza praca jest pierwszą próbą nieinwazyjnego oraz tkankowo selektywnego podania genu do mięśnia sercowego, którego ekspresja może mieć potencjalny skutek terapeutyczny.

Ekspresja genu dla hVEGF<sub>165</sub> wprowadzonego do komórek *myocardium* przy pomocy UTMD w niniejszej pracy miała charakter narządowo selektywny a białkowy produkt genu był wykrywalny wyłącznie po 5 dniach od dokonania transfekcji. Jak wykazały badania histochemiczne oraz immunohistochemiczne, komórkami, które uległy transfekcji na terenie *myocardium* były fibroblasty, miofibroblasty oraz komórki śródbłonna naczyniowego. W homogenatach tkanek pochodzących z narządów leżących w bezpośrednim oraz bliskim sąsiedztwie mięśnia sercowego (płuca, śledziona, wątroba) nie uwidoczono ekspresji genu dla hVEGF<sub>165</sub> w żadnym z wcześniej ustalonych punktów końcowych badania. Skutki czasowej ekspresji tego genu w postaci zmian gęstości naczyń mikrokrążenia zaobserwowano wyłącznie na terenie mięśnia sercowego, który był poddany zabiegowi UTMD.

Na skutek przejściowej ekspresji genu dla hVEGF<sub>165</sub>, 10 dni po zabiegu UTMD (Grupa II), zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost gęstości kapilar w Grupie VEGF w porównaniu z grupą, która otrzymała plazmid kontrolny i Grupą 0. Brak znamienych statystycznie różnic gęstości kapilar po 5 dniach od zabiegu, kiedy za pomocą metody Western blot wykazano obecność hVEGF<sub>165</sub>, może tłumaczyć zbyt krótka odległość czasowa pomiędzy transfekcją genem dla hVEGF<sub>165</sub> a jego tkankową ekspresją, która byłaby wystarczająca dla pobudzenia zjawiska angiogenezy ocenianej za pomocą gęstości kapilar. Ponowna ocena gęstości naczyń włosowatych w Grupie VEGF po 30 dniach od zabiegu (Grupa III) wykazała jej spadek. Pozostała ona jednak nadal znamienne większa od wartości w Grupie kontrolnej. Wy tłumaczeniem dla tej obserwacji może być zjawisko

regresji kapilar, które powstały pod wpływem powstałego hVEGF<sub>165</sub>. Wśród prawdopodobnych przyczyn tego zjawiska należy wymienić fakt jednorazowego podania genu dla hVEGF<sub>165</sub> w formie plazmidu, który nie zapewnia trwałej ekspresji. Dowodem tego jest obecność hVEGF<sub>165</sub> na terenie *myocardium* wyłącznie po 5 dniach od transfekcji. Ponadto warunki normoksemii, w jakich było wykonane niniejsze badanie oraz zastosowane w tym modelu wyłącznie pojedynczego czynnika pobudzającego proces angiogenezy może odpowiadać za zjawisko regresji naczyń włosowatych na drodze apoptozy (136,141,228).

VEGF jest specyficznym mitogenem dla komórek śródbłonka, warunkując ich prawidłowe funkcjonowanie oraz proliferację, która stanowi kluczowe zjawisko podczas powstawania nowych naczyń. Głównym czynnikiem regulującym poziom VEGF jest ciśnienie parcjalne tlenu w komórkach. Hipoksja stanowi najsilniejszy bodziec stymulujący dla jego produkcji. W warunkach normoksji, VEGF pełni funkcje ochronne dla komórek endotelium oraz hamuje ich apoptozę (228). Badania prowadzone przez James'a Hershey'a nad procesami angiogenezy i arteriogenezy w modelu niedokrwinnym kończyn u królika, potwierdziły uznaną szeroko obserwację, że proces angiogenezy jest ściśle związany ze zjawiskiem hipoksji oraz towarzyszącej jej zwiększonej ekspresji genu dla VEGF. Wzrost gęstości kapilar w tym modelu zaobserwowano piątego dnia po wystąpieniu niedokrwienia i korelował on w sposób znamieny z tkankową hipoksją oraz podwyższonym poziomem VEGF. W ciągu kolejnych 10 dni odnotowano jednak spadek gęstości naczyń włosowatych, a w 40 dniu obserwacji powróciła ona do wartości wyjściowych korelując ze spadkiem ekspresji genu dla VEGF. Przyczyną regresji kapilar w opisanym powyżej modelu był najprawdopodobniej spadek poziomu VEGF, będący skutkiem powstania krążenia obocznego, które przywróciło prawidłowy poziom ciśnienia parcjalnego tlenu (87). Wyniki niniejszej pracy potwierdzają obserwację ścisłej zależności gęstości naczyń włosowatych od tkankowego poziomu VEGF.

Odmiennej charakter zmian zaobserwowano w przypadku oceny gęstości arteriol. W każdym punkcie końcowym badania, po 5, 10 oraz 30 dniach od zabiegu UTMD, w porównaniu z Grupą 0 wykazano wzrost ich gęstości zarówno u zwierząt, które otrzymały gen dla hVEGF<sub>165</sub> jak i u tych,

które otrzymały plazmid kontrolny. Wzrost gęstości arteriol był znamienne większy w Grupie VEGF niż w Grupie kontrolnej. Najbardziej widoczne różnice wystąpiły po 10 dniach od zabiegu UTMD (Grupa II), kiedy gęstość arteriol była największa spośród wszystkich punktów końcowych badania. W Grupie III (30 dni po zabiegu UTMD) odnotowano jej spadek w porównaniu z Grupą II, zarówno w Grupie VEGF jak i w Grupie kontrolnej. Nadal jednak była ona znamienne większa niż w Grupie 0 i Grupie I. Obecność większej ilości arteriol na terenie *myocardium* zwierząt, które otrzymały gen dla hVEGF<sub>165</sub>, potwierdzają wyniki opublikowanych ostatnio badań, w których wykazano indukowanie przez VEGF formowania się nie tylko kapilar (angiogenezy), ale również arteriol (arteriogenezy) (39,147,203). Zanikanie arteriol wraz z upływem czasu od zadziałania bodźca wywołującego arteriogenezę w tym modelu doświadczalnym, wynika prawdopodobnie z faktu, że w warunkach normoksemii ich ilość na terenie *myocardium*, podobnie jak naczyń włosowatych, jest wystarczająca dla aktualnych potrzeb metabolicznych. Dalsza obserwacja ich gęstości w punktach czasowych bardziej odległych niż 30 dni, w warunkach zarówno normo-, jak i hipoksemii może być pomocna w bliższym poznaniu czynników wyzwalających, dynamiki oraz mechanizmu tego zjawiska. Znacznie bardziej ograniczoną regresję arteriol, w porównaniu z kapilarami, po 30 dniach od zabiegu UTMD, tłumaczy prawdopodobnie opisany już wcześniej, stabilizujący oraz „ochronny” efekt mięśni gładkich na naczynia włosowate oraz ich udział w zjawisku remodelingu naczyniowego (26,40,41,81).

Mechanizm wzrostu gęstości arteriol (arteriogenezy) na terenie *myocardium* u zwierząt w Grupie Kontrolnej nie jest znany. Obserwacja ta potwierdza wykazany przez innych badaczy efekt stymulowania arteriogenezy w mięśniu szkieletowym szczura na skutek wewnątrznaczyniowej destrukcji albuminowych mikrosfer przez falę ultradźwiękową (201). Wiele poznanych dotychczas procesów fizyko-chemicznych, które towarzyszą temu zjawisku (kawitacja, efekty termalne, nieenzymatyczna produkcja wolnych rodników tlenowych), może w niespecyficzny sposób aktywować komórki śródbłona naczyniowego i w ten sposób stymulować mechanizmy arteriogenezy w przedstawionym modelu (79,109,139,223). Ograniczone naruszenie ciągłości kapilar na terenie mikrokrążenia spowodowane destrukcją mikrosfer przez

fale ultradźwiękowe, a następnie proces ich remodelingu naczyniowego w miejscach „mikrourazów naczyniowych”, może również stanowić częściowe wyjaśnienie obserwowanego zjawiska (9,165,198). Ponadto, destrukcja albuminowych mikrosfer przez falę ultradźwiękową indukuje w nieswoisty sposób ekspresję genów dla czynników, które biorą udział w procesie arteriogenezy takich jak MCP-1 czy Cyclooxygenaza-2 (COX-2) (110). Rola zastosowanego w niniejszej pracy kontrolnego wektora dla enzymu lucyferazy w procesie stymulowania arteriogenezy wydaje się być mało prawdopodobna, lecz nie można jej wykluczyć z całkowitą pewnością. Zastosowanie w przyszłości tzw. pustego wektora („empty vector”), pozwoli na jednoznaczną odpowiedź na to pytanie.

Terapeutyczne stymulowanie złożonych procesów angiogenezy oraz arteriogenezy, pomimo znajomości wielu mechanizmów oraz czynników biorących w nich udział, nadal sprawia trudność, czego dowodem są wyniki badań klinicznych (86). Zastosowanie pojedynczych czynników pobudzających te procesy, czy to w postaci genów czy ich białkowych produktów, nie prowadzi do powstania funkcjonalnych i dojrzałych naczyń krwionośnych (65). Wyniki niniejszej pracy potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące ograniczonej czasowo angiogenezy, będącej wynikiem jednorazowego podania wyłącznie pojedynczego czynnika wzrostu naczyń. Dowodem na to jest fakt, iż po 30 dniach od podania genu dla hVEGF<sub>165</sub>, gęstość kapilar powróciła niemal do wartości początkowych. Brak obecności naczynek oraz obrzęków, będących wynikiem ekspresji hVEGF<sub>165</sub> w tym modelu, a obserwowanych przez innych badaczy, wynika z faktu, iż gen dla hVEGF<sub>165</sub> podany w postaci plazmidu uległ ograniczonej ilościowo, przestrzennie oraz czasowo ekspresji na terenie *myocardium* (97). Stężenie hVEGF<sub>165</sub> na terenie mięśnia sercowego nie było prawdopodobnie dzięki temu na tyle wysokie, aby spowodować rozwój naczynek oraz zwiększyć znacząco przepuszczalność naczyń krwionośnych, która prowadziłaby do obrzęku tkanki.

Jednym ze sposobów na zwiększenie efektywności terapeutycznej angiogenezy w przyszłości jest jednoczesne podawanie więcej niż jednego czynnika wzrostu naczyń, np. VEGF i Angiopoetyn (7,32,125,212). Na odpowiedź czeka jednak jeszcze wiele pytań dotyczących między innymi

tego, jakie czynniki, w jakiej kolejności i przez jak długi czas powinny być podawane, aby skutkiem ich skoordynowanego działania było powstanie naczyń o właściwej ilości i jakości w pożądanym miejscu.

Genetyczne stymulowanie angiogenezy jest również możliwe przez zastosowanie genów dla czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za pobudzanie ekspresji genów wpływających na procesy angiogenezy. Naczynia utworzone w ten sposób są wynikiem współdziałania grupy genów, których ekspresja jest zależna od danego czynnika transkrypcyjnego (np. HIF-1 $\alpha$ ), a warunki towarzyszące procesowi formowania się nowych naczyń są bardziej zbliżone do tych występujących w warunkach *in vivo*. Dzięki temu terapia genowa wykorzystująca czynniki transkrypcyjne może w przyszłości okazać się metodą bardziej skuteczną, która będzie prowadziła do powstania pełnowartościowych naczyń. Wyniki badań w modelu zwierzęcym potwierdzają jej wyższość nad dotychczasowymi sposobami, które wykorzystują pojedyncze geny dla czynników wzrostu naczyń (52,172).

Możliwość terapeutycznego zastosowania czynników wzrostu naczyń, zarówno w postaci genu, jak i jego białkowego produktu, stanowi przedmiot zaawansowanych prób klinicznych u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca oraz miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych (10,126,196). W większości przypadków do ich podawania wymagana jest procedura inwazyjna: iniekcje dotętnicze, dowieńcowe lub bezpośrednio do mięśnia sercowego podczas zabiegu chirurgicznego pomostowania naczyń wieńcowych lub do mięśni szkieletowych. Miejscowe wprowadzenie oraz lokalna ekspresja materiału genetycznego nadal pozostaje „piętą Achilleś” prób terapii genowej. Podawanie genów dla naczyńiowych czynników wzrostu, które pobudzają proces angiogenezy, może w przyszłości okazać się alternatywną dla farmakoterapii oraz metod inwazyjnych i chirurgii, metodą leczenia chorób, u podłoża których leży miażdżycza tętnic. Pacjenci z zaawansowanymi oraz rozsianymi zmianami miażdżycowymi stanowią liczniejszą z roku na rok grupę, dla której terapia genowa może stanowić uzupełniającą dla dotychczasowych sposobów, metodę leczenia. Opracowanie bezpiecznych oraz efektywnych sposobów podawania materiału genetycznego w sposób selektywny tylko do tkanek dotkniętych



niedokrwieniem, może okazać się pomocne w przyszłej terapii tych pacjentów. Dzięki zastosowaniu niewirusowych wektorów oraz uzyskaniu tkankowej selektywności drogą metod nieinwazyjnych, możliwe będzie ograniczenie występowania wielu niebezpiecznych efektów niepożądanych towarzyszących próbom terapii genowej (142,151). W przypadku stymulowania procesu angiogenezy, szczególnie ważne są narządowa swoistość oraz lokalna i ograniczona w czasie ekspresja genu, którego efektem działania jest powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Wśród najbardziej niebezpiecznych w swych skutkach działań niepożądanych, które mogą towarzyszyć próbom leczenia stanów niedokrwiennych poprzez pobudzanie procesu angiogenezy są: przyspieszenie procesu miażdżycowego, uaktywnienie się niemożliwie klinicznie procesu nowotworowego oraz tworzenie się naczynek (54,67,117). Opracowanie nowych, bardziej precyzyjnych metod podawania materiału genetycznego do wybranych tkanek i narządów oraz zastosowanie genów pozostających pod kontrolą specyficznych promotorów (np.: komórkowo-swoistych, zależnych od warunków tlenowych środowiska wewnątrzkomórkowego czy indukowanych lekami) może w przyszłości ograniczyć w dużym stopniu występowanie skutków ubocznych związanych z niekontrolowaną czasowo oraz przestrzennie ekspresją genów dla naczyniowych czynników wzrostu (13,134,140,164).

Jak wykazała niniejsza praca, użycie mikrosfer jako nośników materiału genetycznego oraz miejscowe jego uwalnianie przy pomocy fali ultradźwiękowej może okazać się skutecznym i bezpiecznym sposobem terapii genowej chorób układu sercowo-naczyniowego. Zarówno badania wykonane przez innych autorów w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, potwierdzają skuteczność tej metody w transfekcji komórek materiałem genetycznym w postaci wektorów wirusowych oraz niewirusowych (215,216,194). Skuteczność nieinwazyjnego wprowadzania materiału genetycznego do komórek i tkanek z wykorzystaniem echokardiograficznych środków kontrastowych, którą oceniano na podstawie narządowo-swoistej ekspresji, wykazano w licznych modelach doświadczalnych (2,12,96,133,138, 184,207,208). Dokładny mechanizm odpowiedzialny za ten efekt nie jest do końca poznany. Istnieje jednak zgodne przekonanie, że oddziaływanie

mechaniczne fali ultradźwiękowej na struktury komórkowe oraz zjawiska towarzyszące wewnątrznaczyniowej destrukcji mikrosfer przez ultradźwięki, odgrywają tutaj kluczowe rolę. Pod ich wpływem dochodzi do nieswoistego zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej oraz błony jądrowej dla takich makromolekuł takich jak kwasy nukleinowe czy białka. Za pomocą mikroskopu elektronowego, udało się uwidocznić pory w strukturach błonowych komórek poddanych działaniu ultradźwięków, które są odpowiedzialne za zjawisko wzrostu przepuszczalności (20,154,206). Energia mechaniczna fali ultradźwiękowej może również w nieswoisty sposób zwiększać efektywność ekspresji wprowadzonego już materiału genetycznego, będąc jednym z prawdopodobnych mechanizmów wspomagających transfekcję (115,116).

Metoda UTMD, wydaje się być również metodą bezpieczną. Jak wykazały pomiary frakcji skracania oraz przyrostu masy lewej komory mięśnia sercowego w niniejszej pracy, wprowadzenie materiału genetycznego z jej zastosowaniem nie miało wpływu na ocenianą echokardiograficznie funkcję *myocardium*. Towarzysząca UTMD ograniczona utrata ciągłości śródbłonka naczyniowego kapilar, ma prawdopodobnie charakter przejściowy i nie powoduje upośledzenia funkcji serca. Na odpowiedź czeka jednak pytanie czy UTMD nie wpływa w sposób trwały na funkcję śródbłonka naczyniowego.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań pozwalają przypuszczać, iż wewnątrznaczyniowa, powodowana falą ultradźwiękową destrukcja mikrosfer będących nośnikami materiału genetycznego, może w przyszłości okazać się bezpieczną, efektywną, oraz tkankowo swoistą metodą nieinwazyjnego wprowadzania terapeutycznych genów do mięśnia sercowego. Dalszej, dokładnej analizy wymaga możliwość zastosowania metody UTMD w stymulowaniu procesu angiogenezy i arteriogenezy na terenie mięśnia sercowego. Bardziej odległa w czasie, niż zastosowana w niniejszej pracy, ocena gęstości kapilar i arteriol, da pełniejszy obraz efektywności tej metody oraz pomoże w bliższym poznaniu mechanizmów leżących u podstaw genetycznej transfekcji w warunkach *in vivo* za pomocą UTMD. Cennym uzupełnieniem może okazać się określenie ewentualnego wpływu wzrostu gęstości arteriol na terenie *myocardium* na wielkość przepływu wieńcowego krwi u zwierząt poddanych zabiegowi UTMD w

badanych grupach. Wskazana wydaje się również próba zastosowania modelu niedokrwienego oraz porównawcza ocena zarówno gęstości naczyń mikrokrażenia w odpowiedzi na podanie genu dla VEGF jak również wpływ jego ekspresji na parametry hemodynamiczne funkcji *myocardium* oceniane za pomocą echokardiografii.

## 6. Wnioski

1. Zastosowanie powodowanej falą ultradźwiękową destrukcji albuminowych mikrofer (UTMD), na podstawie przedstawionych wyników badań, potwierdza użyteczność tej metody w nieinwazyjnym oraz tkankowo selektywnym wprowadzaniu materiału genetycznego w postaci plazmidu dla ludzkiego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka 165 (hVEGF<sub>165</sub>) do komórek mięśnia sercowego.

2. Ograniczona czasowo oraz narządowo swoista ekspresja wprowadzonego plazmidu z genem kodującym hVEGF<sub>165</sub>, spowodowała potwierdzony histochemicznie oraz immunohistochemicznie przejściowy wzrost gęstości kapilar na terenie mięśnia sercowego.

3. Metoda ta wydaje się być bezpieczną i nie wpływa na funkcję *myocardium* ocenianą echokardiograficznie za pomocą frakcji skracania oraz przyrostu masy lewej komory mięśnia sercowego.

4. Proces destrukcji podanych dożylnie albuminowych mikrofer przez falę ultradźwiękową, zarówno w grupie zwierząt, które otrzymały plazmid z genem dla hVEGF<sub>165</sub> jak i w Grupie kontrolnej, spowodował wzrost gęstości arteriol na terenie *myocardium* (arteriogenezę). Dokładny mechanizm będący przyczyną tego zjawiska w Grupie kontrolnej nie jest znany i wymaga dalszych badań. Prawdopodobnym wyjaśnieniem może być fakt niespecyficznego aktywacji komórek śródbłonka naczyniowego przez efekty fizykochemiczne towarzyszące procesowi destrukcji mikrofer przez falę ultradźwiękową oraz nieswoiste pobudzenie ekspresji genów pobudzających zjawisko arteriogenezy.

## 7. Streszczenie

Gen dla ludzkiego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka 165 (hVEGF<sub>165</sub>) w postaci plazmidu, został wprowadzony nieinwazyjnie oraz narządowo selektywnie do mięśnia sercowego szczura za pomocą powodowanej falą ultradźwiękową destrukcji albuminowych mikrosfer (UTMD).

Zmiany w strukturze mikrokrążenia pod postacią zmian gęstości kapilar oraz arteriol oceniano po 5, 10 oraz 30 dniach od zabiegu UTMD. W grupie zwierząt, które otrzymały plazmid z genem dla hVEGF<sub>165</sub> (Grupa VEGF), 10 dni po jego wprowadzeniu zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost średniej gęstości kapilar z  $3.26 \pm 0.14 \times 10^3 / \text{mm}^2$  do  $3.8 \pm 0.11 \times 10^3 / \text{mm}^2$  oraz arteriol z  $60.1 \pm 1.6 / \text{mm}^2$  to  $119.8 \pm 3.7 / \text{mm}^2$ .

W Grupie kontrolnej nie zaobserwowano zmian w gęstości naczyń włosowatych (kapilar) we wszystkich punktach końcowych badania. Po 30 dniach od zabiegu UTMD w Grupie VEGF, gęstość kapilar uległa zmniejszeniu i była tylko nieznacznie większa w porównaniu z Grupą kontrolną.

Średnia gęstość arteriol wzrosła zarówno u zwierząt w Grupie VEGF jak i w Grupie kontrolnej, w porównaniu z wcześniej określoną średnią gęstością arteriol u szczurów tej rasy (Grupą 0). Statystycznie znamienne różnice zaobserwowano we wszystkich obserwowanych punktach czasowych badania. W każdym punkcie końcowym badania, ilość arteriol/ $\text{mm}^2$  była większa w Grupie VEGF niż w Grupie kontrolnej. Największy wzrost zaobserwowano po 10 dniach od zabiegu w Grupie VEGF ( $119.8 \pm 3.7 / \text{mm}^2$ ) w porównaniu zarówno z Grupą kontrolną ( $99.1 \pm 3.4 \text{ mm}^2$ ) jak i z Grupą 0 ( $60.1 \pm 1.6 \text{ mm}^2$ ). Po 30 dniach średnia gęstość arteriol w Grupie VEGF i Grupie kontrolnej zmniejszyła się, pozostając jednak nadal znamienne większa w porównaniu z Grupą 0 oraz z wartościami obserwowanymi po 5 i 10 dniach od zabiegu UTMD.

Zastosowanie metody UTMD, jak wykazały wyniki dokonanych echokardiograficznie pomiarów frakcji skracania oraz przyrostu masy lewej komory mięśnia sercowego, nie wpłynęło na funkcję *myocardium*.

Niniejsze badanie opisuje nieinwazyjne, narządowo selektywne podanie genu o potencjalnie terapeutycznym znaczeniu w postaci niewirusowego wektora (plazmidu) do mięśnia sercowego szczura za pomocą destrukcji albuminowych mikrosfer przez falę ultradźwiękową (UTMD). Ekspresja genu wprowadzonego za pomocą tej metody była ograniczona wyłącznie do narządu docelowego dla zabiegu UTMD. W grupie zwierząt, która otrzymała kontrolny plazmid z genem dla enzymu lucyferazy, na terenie *myocardium*, wykazano znamienne wzrost gęstości arteriol w porównaniu z ustalonymi wcześniej wartościami. Zjawisko to jest spowodowane prawdopodobnie nieswoistym oddziaływaniem procesu wewnątrznaczyniowej destrukcji albuminowych mikrosfer pod wpływem fali ultradźwiękowej na łożysko mikrokrażenia mięśnia sercowego oraz ekspresję genów pobudzających zjawisko arteriogenezy. Dokładny komórkowy oraz molekularny mechanizm tego zjawiska, jak również wpływ na przepływ wieńcowy krwi wymaga dalszych badań.

## Summary

Viral vectors combined with invasive methods of therapeutic genes delivery remain the major obstacles, that make tissue specific gene therapy difficult. The promising method of non-invasive and selective delivery of therapeutic compounds is ultrasound targeted microbubbles destruction (UTMD) technique.

The aim of the study was to investigate the use of UTMD as a novel, non-invasive and tissue selective method of plasmid DNA delivery, and to assess the biological effects of the UTMD delivery of gene encoding human vascular endothelial growth factor 165 (hVEGF<sub>165</sub>) into rat myocardium.

Structural changes in microcirculation were assessed after 5, 10 and 30 days following the UTMD procedure. Ten days after UTMD-mediated delivery of the hVEGF<sub>165</sub> gene there was a statistically significant increase of both mean capillary density (from  $3.26 \pm 0.14 \times 10^3 / \text{mm}^2$  to  $3.8 \pm 0.11 \times 10^3 / \text{mm}^2$ ) and arteriole density (from  $60.1 \pm 1.6 / \text{mm}^2$  to  $119.8 \pm 3.7 / \text{mm}^2$ ).

Thirty days after UTMD-mediated gene delivery in VEGF Group capillary density was only slightly increased compared to control treated animals (Control Group), that received plasmid DNA encoding luciferase gene.

Mean arteriolar density increased in both the VEGF and Control Groups when compared with the mean values obtained from untreated animals (Group 0). Statistically significant changes were observed at each end-time point of the study and the number of arterioles per  $\text{mm}^2$  was greater in VEGF Group than in Control Group. The highest arteriolar density was noted in animals from VEGF Group 10 days after UTMD procedure ( $119.8 \pm 3.7 / \text{mm}^2$ ) when compared with Control Group and Group 0,  $99.1 \pm 3.4 / \text{mm}^2$  and  $60.1 \pm 1.6 / \text{mm}^2$  respectively. At the 30 day end-time point of the study, mean arteriolar density in both VEGF and Control Groups decreased but remained significantly higher when compared with Group 0 and the values at 5 and 10 day end-time points.

The UTMD procedure did not affect the myocardial function and performance - echocardiographically assessed fractional shortening of the

myocardium together with left ventricle mass measurements remained unchanged.

The study demonstrates the non-invasive and selective delivery of a gene using non-viral vector (plasmid) to rat myocardium using ultrasound targeted microbubbles destruction technique (UTMD). Expression of delivered gene was restricted to the UTMD targeted organ. There was a significant increase in arteriolar density in animals, that received control plasmid with luciferase gene. This finding is probably due to non-specific effects of UTMD on microcirculation and expression of genes that promote arteriogenesis. The exact molecular mechanism of this phenomenon together with the impact of UTMD-stimulated arteriogenesis on coronary blood flow remains to be determined.



## 8. Piśmiennictwo

1. Albers M, Fratezi AC, De Luccia N. Assessment of quality of life of patients with severe ischemia as a result of infrainguinal arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 1992; 16: 54-59.
2. Amabile PG, Waugh JM, Lewis TN, Elkins CJ, Janas W, Dake MD. High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1975-1980.
3. Ambrosius WT, Bloem LJ, Zhou L, Rebhun JF, Snyder PM, Wagner MA, Guo C, Pratt JH. Genetic variants in the epithelial sodium channel in relation to aldosterone and potassium excretion and risk for hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 631-637.
4. American Heart Association: 2002. Heart and Stroke Statistical Update, 2002. <http://www.americanheart.org/statistics/otherservd.html>.
5. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 631-638.
6. Aoyama T, Hosseinkhani H, Yamamoto S, Ogawa O, Tabata Y. Enhanced expression of plasmid DNA-cationized gelatin complex by ultrasound in murine muscle. *J Control Release* 2002; 80: 3453-3456.
7. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-240.
8. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 1944; 79: 137-158.
9. Ay T, Havaux X, Van Camp G, Campanelli B, Gisellu G, Pasquet A, Deneff JF, Melin JA, Vanoverschelde JL. Destruction of contrast microbubbles by ultrasound: effects on myocardial function, coronary perfusion pressure, and microvascular integrity. *Circulation* 2001; 104: 461-466.
10. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-1123.
11. Baxendale-Cox DM. An overview of essential hypertension in americans as a multifactorial phenomenon: interaction of biologic and environmental factors. *Prog Cardiovasc Nurs* 2000; 15: 43-49.
12. Beerli R, Guerrero JL, Supple G, Sullivan S, Levine RA, Hajjar RJ. New efficient catheter-based system for myocardial gene delivery. *Circulation* 2002; 106: 1756-1759.
13. Bekeredjian R, Chen S, Frenkel PA, Grayburn PA, Shohet RV. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation* 2003; 108: 1022-1026.
14. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275: 1320-1323.
- 15.

16. Berns KI, Giraud C. Biology of adenovirus-associated virus. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1996; 28: 1-23.
17. Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 1995; 17: 237-245.
18. Blaese RM, Culver KM, Anderson WF, Nienhuis A, Dunbar C, Chang L, Mullen C, Carter C, Leitman S. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with human ADA gene. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 521-527.
19. Blaese RM. Development of gene therapy for immunodeficiency: Adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res* 1993; 33: S49-S55.
20. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
21. Brayman AA, Lizotte LM, Miller MW. Erosion of artificial endothelia in vitro by pulsed ultrasound: acoustic pressure, frequency, membrane orientation and microbubble contrast agent dependence. *Ultrasound Med Biol* 1999; 25: 1305-1320.
22. Bruetsch WL. The earliest record of sudden death possibly due to atherosclerotic coronary artery occlusion. *Circulation* 1959; 20: 438-441.
23. Buchschacher GL. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26: 1-11.
24. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W. Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation* 2003; 10: 371-379.
25. Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1995; 1: 39-46.
26. Cardiovascular Diseases – Prevention and Control. WHO CVD Strategy, 2001/2002.
27. Carmeliet P, Collen D. Genetic analysis of blood vessel formation. Role of endothelial versus smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 271-281.
28. Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol* 1997; 273: H2091-H2104.
29. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
30. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003; 9: 653-659.
31. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
32. Carmen IH. A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath. *Mol Ther* 2001; 3: 425-428.
33. Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2573-2578.
34. Chesnoy S, Huang L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 27-47.

35. Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 1980; 33: 739-748.
36. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signalling during development. *Nature Med* 2003; 9: 661-668.
37. Cockburn A, Cockburn E, editors. *Mummies, disease and ancient cultures*. Cambridge University Press, Cambridge 1980.
38. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 1989; 264(33): 20017-20024.
39. *Coronary Heart Disease Statistics*. British Heart Foundation 2002.
40. Crottogini A, Meckert PC, Vera Janavel G, Lascano E, Negroni J, Del Valle H, Dulbecco E, Werba P, Cuniberti L, Martinez V, De Lorenzi A, Telayna J, Mele A, Fernandez JL, Marangunich L, Criscuolo M, Capogrossi MC, Laguens R. Arteriogenesis induced by intramyocardial vascular endothelial growth factor 165 gene transfer in chronically ischemic pigs. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1307-1318.
41. D'Amore PA. Capillary growth: a two-cell system. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 49-56.
42. Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* 2001; 52: 107-149.
43. Davis ME. Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 128-131.
44. De Jong N, Bouakaz A, Frinking P. Basic acoustic properties of microbubbles. *Echocardiography* 2002; 19: 229-240.
45. De Jong N, Cornet R, Lancee CT. Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres, I: simulations. *Ultrasonics* 1994; 32: 447-453.
46. De Jong N, Cornet R, Lancee CT. Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres, II: measurements. *Ultrasonics* 1994; 32: 455-459.
47. Dembińska-Kieć A, Dulak J, Partyka Ł, Huk I, Maliński T. VEGF-nitric oxide reciprocal regulation. *Nat Med* 1997; 3: 1177.
48. Dominiczak AF, Negrin DC, Clark JS, Brosnan MJ, McBride MW, Alexander MY. Genes and hypertension: from gene mapping in experimental models to vascular gene transfer strategies. *Hypertension* 2000; 35: 164-172.
49. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol* 2001; 280: C1367-C1374.
50. Dulak J, Józkowicz A, Dembińska-Kieć A, Guevara I, Zdzienicka A, Żmudzińska-Grochot D, Florek I, Wójtowicz A, Szuba A, Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 659-666.
51. El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, Yacoub MH. Myocyte transplantation for myocardial repair: a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1724-1733.
52. Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, Klibanov AL, Kaul S, Shaffrey ME, Sklenar J, Lindner JR. Imaging tumor angiogenesis with contrast

- ultrasound and microbubbles targeted to  $\alpha_v\beta_3$ . *Circulation* 2003; 108: 336-341.
53. Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, Arbeit JM. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 2001; 15: 2520-2532.
  54. Emanuelli C, Madeddu P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 951-958.
  55. Epstein SE, Kornowski R, Fuchs R, Dvorak HF. Angiogenesis therapy. Amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation* 2001; 104: 115-119.
  56. European Cardiovascular Disease Statistics. British Heart Foundation 2000.
  57. European Working Group on Critical Leg Ischemia. Second European consensus document on critical leg ischemia. *Circulation* 1991; 84(4 Suppl): IV1-26.
  58. Farouque HM, Meredith IT. The assessment of endothelial function in humans. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 445-454.
  59. Feinstein SB, Ten Cate FJ, Zwehl W, Ong K, Maurer G, Tei C, Shah PM, Meerbaum S, Corday E. Two-dimensional contrast echocardiography. I. In vitro development and quantitative analysis of echo contrast agents. *J Am Coll Cardiol* 1984; 3: 14-20.
  60. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7417.
  61. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
  62. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
  63. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858.
  64. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77: 527-543.
  65. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 1-30.
  66. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 617-624.
  67. Flugelman MY, Jaklitsch MT, Newman KD, Casscells W, Bratthauer GL, Dichek DA. Low level in vivo transfer into the arterial wall through a perforated balloon catheter. *Circulation* 1992; 85: 1110-1117.
  68. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29(6 Suppl 16): 15-18.
  69. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
  70. Freedman SB. Clinical trials of gene therapy for atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 653-661.

71. Frenkel PA, Chen S, Thai T, Shohet RV, Grayburn PA. DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound mediated transfection in vitro. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 817-822.
72. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100: 143-155.
73. Gautam A, Waldrep JC, Densmore CL. Aerosol gene therapy. *Mol Biotechnol* 2003; 23: 51-60.
74. Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med* 2003; 81: 20-31.
75. Ginsberg HS. The life and times of adenoviruses. *Adv Virus Res* 1999; 54: 1-13.
76. Gliko G, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biol Int* 2002; 26: 751-759.
77. Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. Role of p22<sup>phox</sup>-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.
78. Graham RM, Bishopric NH, Webster KA. Gene and cell therapy for heart disease. *IUBMB Life* 2002; 54: 59-66.
79. Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol* 1968; 3: 356-366.
80. Greenleaf WJ, Bolander ME, Sarkar G, Goldring MB, Greenleaf JF. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 587-595.
81. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; 105: 1291-1297.
82. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 1999; 58: 128-136.
83. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 25915-25919.
84. Hamet P, Pausova Z, Adriachev V, Adriacheva K, Tremblay J. Hypertension genes and environment. *J Hypertens* 1998; 16: 397-418.
85. Hammond HK, McKirnan MD. Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 561-567.
86. Helisch A, Shaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 2003; 10: 83-97.
87. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER; VIVA Investigators. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-1365.
88. Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, Hartman HA, Gilberto DB, Rogers IT, Cook JJ. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between

- capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 618-625.
89. Hertig A. Angiogenesis in early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey. *Contrib Embryol* 1935; 25: 37-62.
  90. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S, Vincent M, Ganten D, Georges M, Lanthrop GM. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991; 353: 521-529.
  91. Hillemann MR, Werner JR. Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 85: 183-188.
  92. Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR, Ozaki CK. Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* 2002; 105: 1639-1641.
  93. Hofland HE, Shephard L, Sullivan SM. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7305-7309.
  94. Horlitz M, Sigwart U, Niebauer J. Fighting restenosis after coronary angioplasty: contemporary and future treatment options. *Int J Cardiol* 2002; 83: 199-205.
  95. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806-1814.
  96. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 26031-26037.
  97. Huber PE, Pfisterer P. In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther* 2000; 7: 1516-1525.
  98. Hunter J. *Lectures on the Principles of Surgery*. London 1835-1837.
  99. Isner JM, Vale PR, Symes JF, Losordo DW. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res* 2001; 89: 389-400.
  100. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67: 213-224.
  101. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Med* 2003; 9: 685-693.
  102. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Therapy* 1994; 1: 51-64.
  103. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. *JAMA* 2001; 285: 545-550.
  104. Kaplitt MG, Xiao X, Samulski RJ, Li J, Ojamaa K, Klein IL, Makimura H, Kaplitt MJ, Strumpf RK, Diethrich EB. Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 1669-1676.

105. Kaul S. Myocardial contrast echocardiography: basic principles. *Cardiovasc Dis* 2001; 44: 1-11.
106. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-414.
107. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996; 271: 7788-7795.
108. Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick BS, Hoit BD. Assessment of left ventricular mass in mice: comparison between two-dimensional and M-mode echocardiography. *Echocardiography* 2002; 19: 199-205.
109. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 49-56.
110. Kondo T, Misik V, Riesz P. Effect of gas-containing microspheres and echo contrast agents on free radical formation by ultrasound. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 605-612.
111. Korpanty G, Thai T, Chen S, Grayburn PA, Frenkel PA. Upregulation of Inflammatory Genes in Rat Myocardium Following Ultrasonic Microbubble Destruction. *Circulation* 2003; Suppl IV, 108:IV-658.
112. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 721-727.
113. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss JF 3rd, Wilson JM. Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat Genet* 1996; 13: 54-62.
114. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829-3337.
115. Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P, Oberling F, Brambilla E, Behr JP. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996; 3:1010-1017.
116. Lawrie A, Brisken AF, Francis SE, Cumberland DC, Crossman DC, Newman CM. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther* 2000; 7: 2023-2037.
117. Lawrie A, Brisken AF, Francis SE, Tayler DI, Chamberlain J, Crossman DC, Cumberland DC, Newman CM. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation* 1999; 99: 2617-2620.
118. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898-901.
119. Leiden JM. Human gene therapy. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2000; 86: 923-925.

120. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
121. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy* 2000; 7: 31-34.
122. Li S, Ma Z. Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001; 1: 201-226.
123. Li S, Wu SP, Whitmore M, Loeffert EJ, Wang L, Watkins SC, Pitt BR, Huang L. Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am J Physiol* 1999; 276: L796-L804.
124. Lindner JR. Detection of inflamed plaques with contrast ultrasound. *Am J Cardiol* 2002; 90: 32L-35L.
125. Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J Control Release* 2002; 78: 259-266.
126. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11205-11210.
127. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-2804.
128. Lower R. *Early science in Oxford*. Oxford University Press, Oxford 1932.
129. Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens* 1998; 16: 1871-1878.
130. Lynch CM, Hora PS, Leonard JC, Williams JK, Dean RH, Geary RL. Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ Res* 1997; 80: 497-505.
131. Magee R. Arterial disease in antiquity. *Med J Aust* 1998; 169: 663-666.
132. Main ML, Grayburn PA. Clinical applications of transpulmonary contrast echocardiography. *Am Heart J* 1999; 137: 144-153.
133. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.
134. Manome Y, Nakamura M, Ohno T, Furuhashi H. Ultrasound facilitates transduction of naked plasmid DNA into colon carcinoma cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1521-1528.
135. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 1998; 101: 527-535.
136. Mayer S, Grayburn PA. Myocardial contrast agents: recent advances and future directions. *Prog Cardiovasc Dis* 2001; 44: 33-44.
137. Meeson AP, Argilla M, Ko K, Witte L, Lang RA. VEGF deprivation-induced apoptosis is a component of programmed capillary regression. *Development*. 1999; 126: 1407-1415.
138. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4239-4242.



139. Miller DL, Bao S, Gies RA, Thrall BD. Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors. *Ultrasound Med Biol* 1999; 25: 1425-1430.
140. Miller DL, Gies RA. The interaction of ultrasonic heating and cavitation in vascular bioeffects on mouse intestine. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 123-128.
141. Miller N, Whelan J. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 803-815.
142. Mitchell CA, Risau W, Drexler HC. Regression of vessels in the tunica vasculosa lentis is initiated by coordinated endothelial apoptosis: a role for vascular endothelial growth factor as a survival factor for endothelium. *Dev Dyn* 1998; 213: 322-333.
143. Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J* 2002; 66: 1077-1086.
144. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 158: 97-129.
145. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into arterial wall. *Science* 1990; 249: 1285-1288.
146. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11307-11311.
147. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92: 139-150.
148. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A(164/165) and PlGF. Roles in Angiogenesis and Arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 169-175.
149. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
150. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 13-19.
151. Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B, Gaver V, Grocott H, Jones RH, Mark DB, Reves JG, Blumenthal JA. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 2001; 344: 395-402.
152. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002; 9: 1647-1652.
153. Nishikawa M, Hashida M. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 275-283.
154. Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 861-870.
155. Ogawa K, Tachibana K, Uchida T, Tai T, Yamashita N, Tsujita N, Miyauchi R. High-resolution scanning electron microscopic evaluation of cell-membrane porosity by ultrasound. *Med Electron Microsc* 2001; 34: 249-253.

156. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3609-3614.
157. Ophir J, Parker KJ. Contrast agents in diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1990; 15: 319-333.
158. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; 7(3 Suppl): 86-88.
159. Oshita A, Ohmori K, Yu Y, Kondo I, Takeuchi H, Takagi Y, Wada Y, Yukiiri K, Mizushige K, Kohno M. Myocardial blood flow measurements in rats with simple pulsing contrast echocardiography. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 459-466.
160. Pachori AS, Huentelman MJ, Francis SC, Gelband CH, Katovich MJ, Raizada MK. The future of hypertension therapy: sense, antisense, or nonsense? *Hypertension* 2001; 37(2 Part 2): 357-364.
161. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-1326.
162. 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: 3801-3806.
163. Porter TR, Li S, Kilzer K. Smaller intravenous perfluorocarbon-containing microbubbles produce greater myocardial contrast with intermittent harmonic imaging and better delineation of risk area during acute myocardial ischemia. *J Am Soc Echocardiogr* 1997; 10: 792-797.
164. Porter TR, Xie F. Ultrasound, microbubbles, and thrombolysis. *Prog Cardiovasc Dis* 2001; 44: 101-110.
165. Prentice H, Bishopric NH, Hicks MN, Discher DJ, Wu X, Wylie AA, Webster KA. Regulated expression of a foreign gene targeted to the ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 567-574.
166. Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 1998; 98: 1264-1267.
167. Prince HM. Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* 1998; 30: 335-347.
168. Pugh CW, Ratcliffe P. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Med* 2003; 9: 677-683.
169. Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 937-951.
170. Rader DJ, Tietge UJ. Gene therapy for dyslipidemia: clinical prospects. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1: 58-69.
171. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Med* 2003; 9: 702-712.
172. Raven PH, Johnson JB. The genetic material; w: Biology 2-nd edn. Times Mirror/Mosby College Publishing, St. Louis 1989.

173. Rebar EJ, Huang Y, Hickey R, Nath AK, Meoli D, Nath S, Chen B, Xu L, Liang Y, Jamieson AC, Zhang L, Spratt SK, Case CC, Wolffe A, Giordano FJ. Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. *Nat Med* 2002; 8: 1427-1432.
174. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
175. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-674.
176. Rochat T, Morris MA. Gene therapy for cystic fibrosis by means of aerosol. *J Aerosol Med* 2002; 15: 229-235.
177. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of and adenovirus vector expressing VEGF<sub>121</sub> cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100: 468-474.
178. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degradation in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84: 570-573.
179. Ruffer MA. On arterial lesions found in Egyptian mummies. *J Pathol Bactriol* 1911; 15: 453-462.
180. Rutanen J, Markkanen J, Yla-Herttuala S. Gene therapy for restenosis: current status. *Drugs* 2002; 62: 1575-1585.
181. Rutanen J, Puhakka H, Yla-Herttuala S. Post-intervention vessel remodeling. *Gene Ther* 2002; 9: 1487-1491.
182. Sakai T, Ling Y, Payne TR, Huard J. The use of ex vivo gene transfer based on muscle-derived stem cells for cardiovascular medicine. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 115-120.
183. Sandison AT. Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy. *Med History* 1962; 6: 77-81.
184. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 2000; 436: 257-270.
185. Schratzberger P, Krainin JG, Schratzberger G, Silver M, Ma H, Kearney M, Zuk RF, Brisken AF, Losordo DW, Isner JM. Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol Ther* 2002; 6: 576-583.
186. Schrope BA, Newhouse VL, Uhlendorf V. Simulated capillary blood flow measurement using a nonlinear ultrasonic contrast agent. *Ultrason Imaging* 1992; 14: 134-158.
187. Schrope BA, Newhouse VL. Second harmonic ultrasonic blood perfusion measurement. *Ultrasound Med Biol* 1993; 19: 567-579.
188. Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, McCreery TP, Sweitzer RH, Unger EC, Lindner JR, Matsunaga TO. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi. *Invest Radiol* 2002; 37: 587-593.
189. Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 993-998.

190. Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 588-594.
191. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219: 983-985.
192. Sethi AA, Nordestgaard BG, Gronholdt ML, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease. *Hypertension* 2003; 41: 1202-1211.
193. Shattock SG. Report on the pathology of King Menepthah. *Lancet* 1909; 1: 319.
194. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 59-83.
195. Shohet RV, Chen S, Zhou YT, Wang Z, Meidell RS, Unger RH, Grayburn PA. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation* 2000; 101: 2554-2556.
196. Sigerist HE. Primitive and archaic medicine. Oxford University Press. Oxford 1967.
197. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation* 2000; 102: E73-E86.
198. Sinnaeve P, Varenne O, Collen D, Janssens S. Gene therapy in cardiovascular system: an update. *Cardiovascular Res* 1999; 44: 498-506.
199. Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, Skalak TC, Kaul S. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation* 1998; 98: 290-293.
200. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 91-99.
201. Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2000; 2: 178-187.
202. Song J, Ming Qi, Kaul S, Price RJ. Stimulation of arteriogenesis in skeletal muscle by microbubbles destruction with ultrasound. *Circulation* 2002; 106: 1550-1555.
203. Soubrier F. Blood pressure gene at the angiotensin I-converting enzyme locus: chronicle of gene foretold. *Circulation* 1998; 97: 1763-1765.
204. Springer ML, Ozawa CR, Banfi A, Kraft PE, Ip TK, Brazelton TR, Blau HM. Localized arteriole formation directly adjacent to the site of VEGF-Induced angiogenesis in muscle. *Mol Ther* 2003; 7: 441-449.
205. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003; 108: 205-210.
206. Strona internetowa World Health Organization, [www.who.int/ncd/cvd](http://www.who.int/ncd/cvd).
207. Tachibana K, Uchida T, Ogawa K, Yamashita N, Tamura K. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet* 1999; 353: 1409.

208. Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, Oshita A, Shinomiya K, Yu Y, Takagi Y, Mizushige K, Kangawa K, Kohno M. Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 231-238.
209. Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 2002; 9: 372-380.
210. Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 647-652.
211. Templeton NS. Liposomal Delivery of Nucleic Acids in vivo. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 857-867.
212. Teupe C, Richter S, Fisslthaler B, Randriamboavonjy V, Ihling C, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded microbubbles improves vasoreactivity. *Circulation* 2002; 105: 1104-1109.
213. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000; 6: 460-463.
214. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1198-1206.
215. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 199; 266: 11947-11954.
216. Unger EC, Hersh E, Vannan M, Matsunaga TO, McCreery T. Local drug and gene delivery through microbubbles. *Prog Cardiovasc Dis* 2001; 44: 45-54.
217. Unger EC, Hersh E, Vannan M, McCreery T. Gene delivery using ultrasound contrast agents. *Echocardiography* 2001; 18: 355-361.
218. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 543-553.
219. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 546-549.
220. Walther W, Stein U. Viral vectors for gene therapy. A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 2000; 60: 249-271.
221. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
222. Weller GE, Lu E, Csikari MM, Klibanov AL, Fischer D, Wagner WR, Villanueva FS. Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation* 2003; 108: 218-224.

223. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-1468.
224. Wu J, Ross JP, Chiu JF. Reparable sonoporation generated by microstreaming. *J Acoust Soc Am* 2002; 111: 1460-1464.
225. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long term gene transfer into muscle tissue of immunokompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996; 70: 8098-8108.
226. Yee JK, Zaia JA. Prospects for gene therapy using HIV-based vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26: 159-174.
227. Yew NS, Wang KX, Przybylska M, Bagley RG, Stedman M, Marshall J, Scheule RK, Cheng SH. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 223-234.
228. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568-581.
229. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1375-1386.
230. Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, Rabussay DP. Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572: 1-9.
231. Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1189:195-203.
232. Zimmerman MR. The paleopathology of the cardiovascular system. *Texas Heart Inst J* 1993; 20: 252-257.

## **9. Wykaz fotografii, rycin, i tabel**

### **9.1. Wykaz fotografii**

- 9.1.1.** Fotografia 1 (str. 52). Obraz histologiczny mięśnia sercowego w Grupie VEGF 5 dni po zabiegu UTMD.
- 9.1.2.** Fotografia 2 (str. 55). Gęstość kapilar i arteriol na terenie *myocardium* w badanych grupach.

### **9.2. Wykaz rycin**

- 9.2.1.** Rycina 1 (str. 32). Wpływ różnych wielkości indeksu mechanicznego (MI) na zachowanie się mikrosfer w polu fal ultradźwiękowych.
- 9.2.2.** Rycina 2 (str. 49). Tkankowo swoista ekspresja genu dla hVEGF<sub>165</sub> na terenie *myocardium*, wykazana za pomocą metody Western blot w homogenatach tkanek pobranych od zwierząt w Grupie I (5 dni po zabiegu).
- 9.2.3.** Rycina 3 (str. 50). Czasowa ekspresja genu dla hVEGF<sub>165</sub> wykazana za pomocą metody Western blot w homogenatach mięśnia sercowego w Grupie VEGF po 5 dniach od zabiegu.
- 9.2.4.** Rycina 4 (str. 53). Gęstość kapilar na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.
- 9.2.5.** Rycina 5 (str. 54). Średnia gęstość arteriol na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.
- 9.2.6.** Rycina 6 (str. 56). Wartości frakcji skracania mięśnia sercowego ocenione echokardiograficznie w badanych grupach zwierząt.
- 9.2.7.** Rycina 7 (str. 57). Wartości masy lewej komory mięśnia sercowego ocenione echokardiograficznie w badanych grupach zwierząt.

### **9.3. Wykaz tabel**

- 9.3.1.** Tabela 1 (str. 16). Porównanie właściwości wektorów wirusowych oraz niewirusowych stosowanych we wprowadzaniu materiału genetycznego do komórek.
- 9.3.2.** Tabela 2 (str. 26). Rodzaje VEGF, ich receptory oraz efekty ich pobudzenia.

- 9.3.3.** Tabela 3 (str. 27). Komórki produkujące VEGF oraz jego biologiczna aktywność w procesach fizjologicznych i patologicznych.
- 9.3.4.** Tabela 4 (str. 54). Zmiany gęstości kapilar na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.
- 9.3.5.** Tabela 5 (str. 55). Zmiany gęstości arteriol na terenie *myocardium* w badanych grupach zwierząt.
- 9.3.6.** Tabela 6 (str. 57). Wartości frakcji skracania oraz masa lewej komory mięśnia sercowego oceniane echokardiograficznie w badanych grupach zwierząt.