

Др Срђан ЂУРОВИЋ

ГЕНСКО-ТЕРАПЕУТСКИ ПРИСТУПИ КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА

I. УВОД

Акумулирање знања о молекуларној позадини болести и консеквентно повећање опсежности програма за генетски *screening* омогућило је јасније дефинирање индивидуа са ризиком за генска обољења, те успостављање критеријума за циљне болести, а тиме и отварање могућности за рану дијагностику и терапију.

Генска терапија се најчешће може дефинирати као трансфер нуклеинских киселина у соматске ћелије с резултирајућим терапеутским ефектом. Овај приступ задобија многе терапеутске примјене, од којих би најочигледније биле корекција моногенских наслједних болести попут цистичне фиброзе, ADA дефицита (SCID), хемоглобинопатија и др. Међутим, многе друге примјене су могуће и обухватају генски трансфер који стимулира имуни одговор, модулира специфичне Т-ћелије (тзв. „killer-cells”), активира пролијек, или зауставља, на молекуларном нивоу, репликацију вируса. У првим студијама на пацијентима резултати су били изненађујуће контрадикторни и веома тешко доступни за објективну евалуацију из више разлога.

Међутим, рани ентузијазам везан за ово подручје се наставља усмјеравањем студија из генске терапије на опсежније и строже дефинирање на нивоу базичних наука и лимитирањем клиничке примјене само на случајеве гдје су референтна базална истраживања направљена у складу с постављеним критеријумима. Нови вектори, усавршени у посљедње вријеме, способни да пробију баријере ефикасности и дурације експресије (знане потешкоће с векторима старијих генерација), те повећано разумијевање биологије неких ограничавајућих процеса доприносе вјери у даље усавршавање и примјену овог подручја.

Молекуларни третман захтијева, прије свега, молекуларну манипулацију или алтерацију дефинисаног циља или циљне популације ћелија.

Принципијелно би се ова манипулација могла одвијати на два начина: (I) *ex vivo* модификацијом, којом се ћелије након *in vitro* модификације уносе поново у тијело пацијента, или (II) *in vivo* модификацијом, која би се одвијала *in situ*. Оба приступа укључују један од следећих механизма:

– (I) *замјена гена* – која се састоји од замјене неактивног или дефектног гена с „новим” (или додатним) који представља функционалну копију гена од интереса. На овај начин се одржава нормална продукција одговарајућег протеина и коригују недостаци везани за дефицит. Ова техника се користи нпр. за третман ADA дефицита, или цистичне фиброзе, или при третману канцера, гдје се тзв. „wild-type” p53 ген уноси да би се кориговали дефекти изазвани мутантним p53 геном и тако задржала/обновила нормална тумор-супресорска улога овог гена.

– (II) *додавање гена* – подразумејева инсерцију новог гена у ћелије и на тај начин омогућава продукцију протеина који у нормалним околностима није присутан у ћелији. Нпр. страна HLA молекула, ко-стимулаторни протеин, или цитокин могу бити додани и тако стимулирати имуни одговор на канцер ћелије, или ген одговоран за активност „про-лијек” конвертаза (знан као суицидални лијек) може бити уметнут и тако проузроковати конверзију не-активног „про-лијека” у активни метаболит ограничавајући тако мјесто дјеловања самог лијека само на ћелије у којима је направљен генски трансфер.

– (III) *контрола гена* – која подразумејева алтерацију или контролу експресије гена. Нпр. експресија мутантног онкогена или тумор-супресор гена у туморским ћелијама може бити супримирана употребом „антисенсе” или рибозим молекула које дјелују тако да инактивирају циљну mRNA (mRNA одговарајућег гена) и на тај начин превенирају продукцију специфичног протеина.

Генска терапија се први пут употребила 1990 на пацијентима с ADA дефицитом (1). Од тада више од 100 клиничких студија је било иницирано широм свијета. Највећи број студија је извођен за третман тумора (предоминантно малигних меланома и хематолошких обољења), али су инициране и студије за генску терапију генетских болести, AIDS-а, и кардиоваскуларних обољења.

Један од првих триала за генску терапију кардиоваскуларних обољења је урађен код не-дијабетицких пацијената с болом при одмарању и исхемичним улцерацијама доњих екстремитета (2). Иако је примарно десигниран као триал за испитивање сигурности употребе генске терапије, студија је такође испитивала ефекат генског трансфера VEGF (vascular endothelial growth factor) у индукцији ангиогенезе, и тако изазваног побољшања ткивне микроциркулације у критичном исхемичном екстремитету. Пацијенти су добијали VEGF-DNA у луминални ендотелиум профунда феморис артерије уз употребу балона за ангиопластику обложеног с хидрогел-полимером који је садржао VEGF-DNA. Прелиминар-

ни резултати су показали обећавајуће ефекте (повећање протока крви и нестанак симптома) и студија се наставља с укључивањем већег броја пацијената. Друге групе које су радиле са истим геном су такође извијестиле о побољшању колатералне формације крвних жила, повлачењу исхемичних улцера и др. корисним ефектима (3).

Надаље, фактор који сигнификантно доприноси неуспјеху артеријалних *by-pass* графтова и ре-стенози након ангиопластике је хиперплазија глатких мишића. Генски трансфер направљен у току саме операције или РТСА, кориштењем VEGF или iNOS гена инхибира пролиферацију глатких мишића и тако превенира хиперплазију (4, 5)

Генска терапија се користи за корекције дефеката на генима или за стимулацију/инхибицију експресије гена који су терапеутски важни. Стимулација експресије терапеутски корисних гена је нарочито присутна код третмана кардиоваскуларних болести и тим се приступом локално или системски повећава експресија терапеутског фактора. Једна од најјачих предности генске терапије у поређењу с приступима класичне фармакологије је могућност једнократне локалне администрације гена која може резултирати у дуготрајном терапеутском ефекту, с dostatном концентрацијом генског продукта у ткиву на које се жели дјеловати, и без системских би-ефеката.

Крвне жиле су једне од најдоступнијих мета за генску терапију због њихове анатомске локализације и лаког приступа. Друга предност, у техничком смислу, је да се код већине обољења, само пролазном експресијом трансфектираног гена постижу бенефицијални биолошки ефекти, што отклања и посљедице вишекратног понављања генског трансфера или стабилне експресије и нежељених дејстава који су повезани с овим техникама код генске терапије других болести.

Међутим, и поред овога, могућност и успјешност васкуларног генског трансфера још увијек садржи многа питања и недоумице. Курентна подручја за кардиоваскуларну генску терапију обухватају терапеутску ангиогенезу у исхемичном миокарду и код периферне атеросклерозе, превенцију ре-стенозе након РТСА, уграђивања стента, и након *by-pass* графтова, одржавање стабилности васкуларних протеза и анастомоза, и превенцију формирања тромба. С друге стране, све бројнији су и покушаји постизања локалних ефеката путем васкуларног ген трансфера у пулмоналним артеријама, ендотхелиуму, и миокарду.

Ефикасни генски трансфер подразумијева и ефикасни систем преносиоца (вектора) вирусне или липосомске природе.

II. ВЕКТОРИ ЗА ГЕНСКУ ТЕРАПИЈУ

Ако се сама DNA („naked DNA”) трансфектира, у контакту с ћелијским мембранама само мали дио DNA ће моћи проћи у ћелије, што дово-

ди до слабо ефикасног генског трансфера. Због тога, молекула – носач или вектор се употребљава да би се повећао степен ефикасности генског трансфера. Најчешће се користе плазмиди, липосомални комплекси, ретровируси, аденовируси и адено-асоцирани вируси.

Липосомални или полимерни комплекси побољшавају достављање DNA у цитоплазму, док само мали дио DNA доспије до једра гдје остаје екстрахромозомално лоциран и усмјерава пролазну експресију трансгена.

Ретровируси улазе у ћелију преко специфичних рецептора, након којих се (вирусна) геномска RNA реверзно транскрибира у DNA која се, затим, стабилно интегрира у геном домаћина. Због тога, генски трансфер уз кориштење ретровируса као вектора може водити до дуготрајних ефеката генског трансфера, нпр. мутагенезе. Надаље, ретровируси могу преносити гене само у ћелије које пролиферирају, па је тако и употреба ретровируса као вектора ограничена. Ретровируси с дефектном репликацијом се у *in vitro* условима производе у облику паковања с одређеним делецијама оригиналних ретровируса, па се могући патогени ефекти на тај начин сведе на најмању могућу мјеру

Аденовируси такође улазе у цитоплазму ћелија преко посебних рецептора. Трансген се ослобађа након сједињавања комплекса аденовирус-трансген с лизозомима, након чега се ослобађа у цитоплазму и даље преноси у једро. Трансфер аденовирусом не доводи до стабилне интеграције трансгена у геном домаћина, и трансген остаје екстрахромозомално лоциран и проузрокује само пролазну, временски ограничену експресију. Новија генерација адено-асоцираних вируса који су репликационо дефицијентни се такође производе *in vitro* у облику специјално пакованих ћелија које не садрже компоненте аденовируса које су патогене и које би представљале потенцијални биолошки ризик.

Плазмиди и липозоми су релативно једноставни за продукцију и имају много бољи сигурносни профил у смислу биолошког ризика, али су мање ефикасни у поређењу с вирусима. Међутим, липидне формуле и синтетски катионски полимерски носачи развијени у новије вријеме јасно побољшавају ефикасност ове врсте генског трансфера.

Тако подручје развијања нових врста вектора наставља да буде једно од најдинамичнијих и најактивнијих суб-подручја генске терапије. Далјим усавршавањима се настоји савладати најважније препреке код до сада употребљаваних вектора: имунолошке и инфламаторне реакције повезане с кориштењем вируса као вектора, и слаба/недовољна ефикасност плаزمида и липозома. Свакако, не постоји један вектор који би био најбољи за свако ткиво и сваку специфичну патолошку потребу у кардиоваскуларном систему, па се тако и употреба вектора дефинише у складу са специфичним захтјевима појединог циља.

III. УНОШЕЊЕ (ТРАНСФЕР) ГЕНА

Успјешност генске терапије је одређена комбинацијом ефеката генског трансфера у циљно ткиво, уласка новог генског материјала у ћелије, и експресије трансфектираног гена у циљном ткиву (6). Када постоји специфични (за дато ткиво или орган) физички или биолошки метод за генски трансфер, он знатно побољшава експресију трансфектираног гена у циљном ткиву или органу. Примјер ефикасног физичког циљања је генски трансфер преко катетера у срце и крвне жиле. Различити типови катетера: микропорозни, обложени хидрогелом, балонски катетери с каналима, и др. доступни су и генски материјал се може пренијети директно у зид крвне жиле (7). Осим тога, ова метода минимално компромитује конфор пацијента, с обзиром да су у већини стандардних процедура крвне жиле већ перфориране или манипулиране, па се интраваскуларни генски трансфер може обављати паралелно с овим процедурама (РТСА, нпр.).

Осим тога, ако се жели постићи трансфер у глатке мишиће одређеног подручја, или у ендотхелиум – ген се може, методама генског инжењеринга, „повезати” на промоторе који диригирају експресију гена само у тим ћелијама, па се овим методама може постићи жељена специфичност у односу на врсту ћелија и ткива које се желе модифицирати. Осим тога, тиме се може и спријечити опасност од системске леказе и системског ефекта, као могућег нежељеног ефекта код нпр. заустављања пролиферације глатких мишића, када се жели зауставити раст само глатких мишића, а не и других ћелија.

Међутим, као што се и очекивало, извјештено је и о проблемима везаним за генски трансфер код студија на пацијентима. У једној од студија примијењена је слаба ефикасност интраваскуларног генског трансфера кроз баријере атеросклеротских лезија и липидима богатих атерома (8). Алтернатива у овом случају би могла бити адвентицијални генски трансфер путем Sialistic или биодеградбилног гела или директним ињекцијама у адвентицијални слој (9-11).

Интрамускуларне ињекције плазмидске DNA или виралних вектора који кодирају ангиогенетске факторе раста су коришћене за периферну васкуларну болест (12) и исхемични миокард (13). Ови приступи обећавају да постану једноставан и ефикасан начин повећања броја капилара у исхемичном мишићу. Једна од могућих и обећавајућих алтернатива је инјицирање биодеградирајућих микросфера обложених рекомбинантним факторима раста или плазмидима који кодирају факторе раста у мање артериоле или капиларе (14).

Уношење генског материјала у перикард је такође постала могућа и потенцијалне примјене обухватају третман исхемије миокарда, кардијалне инсуфицијенције и кардиомиопатија. Међутим, умјешно би било пажљиво адресирати ризик од интраперикардијалног крварења и друге компликације прије него што се крене с клиничким примјенама (15).

IV. МОЛЕКУЛАРНО-ПАТОЛОШКИ ЦИЉЕВИ ГЕНСКЕ ТЕРАПИЈЕ КАРДИОВАСКУЛАРНИХ БОЛЕСТИ

Исхемија

Патофизиолошка позадина се угрубо може дефинирати као недостатак кисеоника, па се напори метода генске терапије који су примарно усмјерени ка повећању броја мањих крвних судова у исхемичном ткиву чине логичним. Та тзв. терапеутска ангиогенеза је најновији терапеутски приступ усмјерен ка овом циљу, који је праћен с пуно нада. Као што је раније поменуто, VEGF је највише коришћен фактор раста у сврху стимулације терапеутске ангиогенезе. VEGF фамилија се састоји од неколико чланова: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентални фактор раста. VEGF-A се јавља у облику више изоформи које се разликују по секвенци аминокиселина и које су настале различитим процесавањем mRNA: VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206 (16-17). Већ сада су рапортирани бенефицијални ефекти употребе аденовируса који продуцира VEGF-A или VEGF-C на оштећеним артеријама експерименталних животиња (18-9). У нашој лабораторији су у току истраживања ефекта појединих изоформи VEGF на различите типове ендотхелиума (аорте, коронарне артерије, и илијачне артерије) и прелиминарни резултати свједоче да је терапеутски одговор ендотхелиума овисан како о врсти VEGF-изоформе, тако и о ткивном поријеклу ендотхелиума.

Једно од неодговорених питања у овој области је свакако и то да ли је исхемија есенцијална да би ангиогенетски фактори били активни. Ово питање је врло релевантно, јер чак и у озбиљној периферној артеријалној болести, исхемија није константна него се развија након вјежбања/рада. Надаље, више пажње заслужују потенцијални ризици ове терапије, који су такође рапортирани, попут хемангиома или стимулације ангиогенезе код тумора (20). Претјерана неоваскуларизација у атеросклеротским лезијама могла би довести и до хеморагије унутар plaquea или rupture plaquea. Ове компликације би се требало превазићи усавршањем метода за постизање веће ткивне специфичности генског конструкта и промотора. И, коначно, локални трансфер гена до срца или угрожених крвних жила требало би моћи смањити ризик системске контаминације других ткива и органа.

Ре-стеноза након РТСА, „in-stent” ре-стеноза, неуспјеси
„by-pass графтова”, артеријална цитопротекција

Према најновијим подацима у око 20% балон-дилатираних пацијената (РТСА, stenting) се након 6 мјесеци јави ре-стеноза (21). Код венских

графтова, процес ре-стенозе се одвија спорије, али око 50% графтова се оклудира након 5 година (22). Ово су веома актуелни циљеви за генску терапију која се највише усмјерава ка заустављању пролиферације и миграције глатких мишића, које леже у основи процеса задебљања интима/неоинтимијализације. Такође, постоје и напори усмјерени на заустављање формирања везивног ткива и нежељених ефеката фактора раста.

Да би били ефективни, сви горе наведени молекули би требало да буду успјешно трансфектирани у већини ћелија захваћеног органа и да буду у стању да задрже интрацелуларну активност и стабилност. Трансфер гена који продуцирају дифузибилне или секреторне медијаторе, попут NO (nitric oxide) или металопроотеиназа имају пуно веће изгледе на успјешност, с обзиром на то да трансфекција само малог броја ћелија у захваћеном органу може, због дифузибилности продукта, резултирати dostatним физиолошким учинком. Тако, студије које су користиле трансфекцију гена за синтезу NO-синтазе (23-5), металопроотеиназа и сл. (25-6) показале су смањење неоинтимијализације.

Једна од могућности у случају ове групе поремећаја је и трансфекција *in vitro*: аутологне ћелије се трансфектирају у *in vitro* условима у ћелијским културама и након тога реимплантирају на мјесто гдје је продукција високе концентрације генског продукта пожељна.

Ангиогенетски фактори имају такође примјену и код проблематике ре-стенозе, јер одржавање интактног ендотхелиума свакако утиче на спречавање формирања неоинтима. Уз то, активни ендотхелиум успјешно контролише миграцију и пролиферацију глатких мишића па су бенефицијални ефекти поменутих трансфера VEGF-DNA примијећени осим код исхемије и код проблема с ре-стенозом (27).

Атерогенеза и тромбогенеза

Многи гени и фактори околине могу бити укључени у настајање атеросклеротских лезија. Било који локални приступ за терапију атеросклерозе је мање вјероватан и до сада се тежиште пребацује на примарну превенцију. Међутим, неколико наслеђених генетских дефеката који могу довести до атеросклерозе могу бити болести-кандидати за лијечење генском терапијом. Типичан примјер је дефицит LDL рецептора у фамилијарној хиперхолестеролемији, који може бити третиран генским трансфером LDL рецептора у јетру (28-30). Пацијенти с дефектом липопротеинске липазе или хепатицне липазе се такође могу разматрати као кандидати за генски трансфер гена за синтезу ових ензима у јетру или мишиће (31-3). Повећане концентрације атерогеног Lp(a) липопротеина могу бити смањене третманом с рибозимима који инхибирају синтезу овог липопротеина (34), као и многе друге атеросклеротске ситуације.

V. ЕТИЧКИ ПРОБЛЕМИ

Генска терапија је, као потпуно нова дисциплина, била врло озбиљно критикована од самог почетка.

Иако су све студије за генску терапију кардиоваскуларних болести базиране на локалној трансфекцији соматских ћелија и никаква манипулација генетског материјала полних ћелија није укључена, ефикасним усавршавањем нових вирусних вектора расте и потенцијална могућност трансдукције генетског материјала и ненамјерне интермисије из соматских у полне ћелије. Једна од алтернатива би била праћење развоја адекватних не-вирусних векторских модела и инкорпорација тих новијих метода у нове експерименте.

С друге стране, за већину болести је потребна само пролазна експресија трансгена, тако да самим тиме одсуствују посљедице које би биле посљедице дуготрајније активности гена. Наравно, треба нагласити да се озбиљни имунолошки одговори или чак и смрт описана у новије вријеме може очекивати код приступа који користе аденовирусом-потпомогнут генски трансфер.

Када се успије обезбиједити солидна документација о безбједности и ефикасности генске терапије за кардиоваскуларне болести, други фундаментални етички проблеми везани за употребу пролазне (транзијентне) генске терапије у кардиоваскуларним болестима, нарочито код старијих, нерепродуктивних људи не би смјели бити проблематични. Свакако, отвореност студија које обухватају манипулацију генетског материјала за супервизијска тијела и заинтересоване аудиторije свакако ће доприносити и спрјечавању научних грешака и недостатака контаката с јавношћу који су се раније дешавале.

Генска терапија већ одавно не подразумева само инсерцију природних гена за корекцију генетских оштећења, већ и инхибицију активности „штетних” гена „antisense” — олигонуклеотидима или рибозомима, или употребу ћелија култивираних у култури ћелија (тзв. „фармацеутских фабрика”). Финансијски аспекти генерирани са ових и неколико горе наведених примјера свједоче о великој заинтересованости водећих фармацеутских компанија о овом подручју. Економске рационалности као нпр. чињеница да цијена третмана пацијената с тумором мозга у USA износи у просјеку око 20.000 USD, док генска терапија с вирусом и геном за тирозин киназу кошта око 10.000 USD за један третман (који је довољан) даље стимулирају комерцијалну заинтересованост. Очекује се да ће комерцијализација генске терапије битно смањити трошкове лијечења карактеристичних кандидат-болести, и сви су изгледи да ће генска терапија бити економски рационалнији избор.

Међутим, овај повећани притисак на брзо увођење нових студија и тестирање све већег броја гена доводи до опасности извођења предухитрених клиничких пројеката који не би били утемељени на добро и ваља-

но довршеним базичним истраживањима. Тако би се могло десити да добре идеје и замисли могу бити компромитиране претјераном журбом за патентима, лиценцама и уопште економским профитом (који би, тако искомпромитован, могао, у крајњем случају, бити мањи од могућег). Формирањем националних савјета за генску терапију, те укључивањем ових савјета у тијела која се баве легализацијом и одобравањем експерименталних клиничких студија свакако би се могле отклонити неке последице и неспоразуми који су се недавно десили.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475-80.
2. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rossow S, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease [news]. *Circulation* 1995; 91: 2687-92.
3. 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: 1114-23.
4. Shears LL 2nd, Kibbe MR, Murdock AD, Billiar TR, Lizonova A, Kovsesdi I, Watkins SC, Tzeng E. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. *Journal of the American College of Surgeons* 1998; 187: 295-306.
5. Ylä-Herttuala S. Gene therapy for cardiovascular diseases. *Annals of Medicine* 1996; 28: 89-93.
6. Ylä-Herttuala S. Vascular gene transfer. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 72-76.
7. Bailey SR. Mechanisms of delivery and local drug technologies. *Semin Interv Cardiol* 1996; 1: 17-23.
8. Laitinen M, Mäkinen K, Manninen H, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischaemia. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1481-86.
9. Laitinen M, Zachary I, Breier G, et al. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1737-44.
10. Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg R. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 1992; 359: 67-73.
11. Morishita R, Gibbons GH, ELison KE, et al. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest* 1994; 93: 1458-64.
12. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281-90.
13. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, et al. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 168-77.

14. Arras M, Mollnau H, Strasser R, et al. The delivery of angiogenic factors to the heart by microsphere therapy. *Nat Biotechnol* 1998; 15: 159-62.
15. Lamping KG, Rios CD, Chun JA, Ooboshi H, Davidson BL, Heistad DD. Intrapericardial administration of adenovirus for gene transfer. *Am J Physiol* 1997; 272: H310-17.
16. Ferrara N, Buntling S. Vascular endothelial growth factors, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5: 35-44.
17. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
18. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-70.
19. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183-89.
20. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998; 2: 549-58.
21. Narins CR, Holmes DR, Topol EJ. A call for provisional stenting: the balloon is back. *Circulation* 1998; 97: 1298-305.
22. Grondin CM, Campeau L, Lespérance J, Ewalbert M, Bourassa MG. Comparison of late changes in internal mammary artery and subvenous vein crafts in two consecutive series of patients 10 years after operation. *Circulation* 1984; 70: 208-12.
23. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1137-41.
24. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 1998; 97: 1274-81.
25. Kullo IJ, Mozes G, Schwartz RS, et al. Adventitial gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to rabbit carotid arteries alters vascular reactivity. *Circulation* 1997; 96: 2254-61.
26. George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 867-77.
27. Cheng L, Mantile G, Pauly R, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation* 1998; 98: 2195-201.
28. Grossman M, Rader DJ, Muller DMW, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995; 1: 1148-54.
29. Kozarsky KF, McKinley DR, Austin LL, Raper SE, Stratford-Perricaudet LD, Wilson JM. In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbit with recombinant adenoviruses. *J Biol Chem* 1994; 269: 13695-703.
30. Pakkanen T, Laitinen M, Hippeläinen M, et al. Enhanced plasma cholesterol lowering effect of retrovirus-mediated LDL receptor gene transfer to WHHL rabbit liver after improved surgical technique and stimulation of hepatocyte proliferation by combined partial liver resection and thymidine kinase-ganciclovir treatment. *Gene Ther* 1999; 6: 34-41.

31. Zsigmont E, Kobayashi K, Tzung KW, Li I, Fuke Y, Chan L. Adenovirus-mediated gene transfer of human lipoprotein lipase ameliorates the hyperlipidemias associated with apolipoprotein E and LDL receptor deficiencies in mice. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1921-33.

32. Ashbourne Excoffon KJ, Liu G, Miao L, et al. Correction of hypertriglyceridemia and impaired fat tolerance in lipoprotein lipase-deficient mice by adenovirus-mediated expression of human lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2532-39.

33. Applebaum-Bowden D, Kobayashi J, Kashyap VS, et al. Hepatic lipase gene therapy in hepatic lipase-deficient mice. Adenovirus-mediated replacement of a lipolytic enzyme to the vascular endothelium. *J Clin Invest* 1996; 97: 799-805.

34. Djurovic S, Berg K. Reduction of apo(a) concentrations in cell culture medium by hammerhead ribozymes. *Journal of Gene Medicine* 1999; 1(6) Suppl.: 40.

Srdan ĐUROVIĆ

Summary

Gene therapy has been used to correct genetic defects or to stimulate/inhibit expression of gene products that are therapeutically useful. In cardiovascular diseases, gene therapy can be used to overexpress therapeutically important proteins and to correct genetic defects caused by altered expression of various genes in a local vascular compartment. One of the particular features of vascular gene transfer is that blood vessels are among the easiest targets for gene therapy because of ease of access.

Efficient gene transfer requires effective plasmid and viral gene-transfer systems. Several methods for efficient gene-transfer and their advantages/disadvantages has been discussed in the text.

Targets for cardiovascular gene therapy include. therapeutic angiogenesis in ischaemic myocardium and limb muscles, prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and of bypass-graft failure, maintenance of the patency of vascular prosthesis and anastomoses, and prevention of thrombus formation.

The prevention of postangioplasty and in-stent restenosis is an important target for gene therapy, as well, since these disorders lead to the obstruction of balloon-dilated arteries within 6 months of the procedure in 20% of patients. The restenosis process with vein grafts is slower, but about 50% of the grafts will be occluded in 5 years. Beneficial effects have been reported in animal models of restenosis or vein-graft thickening with the transfer of genes coding for VEGF, nitric-oxide synthase, thymidine kinase, retinoblastoma, growth arrest homoeobox, tissue inhibitor of metalloproteinases, cyclin or cyclin-dependent kinase inhibitors, and antisense oligonucleotides/ribozymes against transcription factors or cell-cycle regulatory proteins.

Additionally, severe inherited genetic defects that may lead to atherosclerosis, might be target for gene therapy and therapeutic effects have been reported here as well.

Cardiovascular gene therapy is based on a transient expression of the transgene is required to achieve a therapeutic effect. With further development of safety and efficacy of cardiovascular gene therapy, there should be no fundamental ethical difficulties for use gene therapy in cardiovascular diseases.

