

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Φαρμακογονιδιωματική και γονιδιακή θεραπεία στην καρδιακή ανεπάρκεια

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι μια από τις σημαντικότερες νοσολογικές οντότητες σήμερα και αποτελεί αιτία αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας στο δυτικό κόσμο. Δεν είναι μια ξεχωριστή νόσος, αλλά ουσιαστικά αποτελεί την κατάληξη συνυπαρχόντων παραγόντων, όπως αρτηριακής υπέρτασης, στεφανιαίας νόσου, μυοκαρδιοπαθειών. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, η ποιότητα της ζωής επηρεάζεται περισσότερο από κάθε άλλη νόσο και το οικονομικό κόστος είναι υπέρογκο. Έτσι, η μελέτη της και οι προσπάθειες για την ανακούφιση των ασθενών είναι ιδιαίτερης σημασίας. Ο σημερινός ιατρός διαθέτει μια ποικιλία από φαρμακευτικούς παράγοντες που βοηθούν στην αντιμετώπιση, σε μεγάλο βαθμό, των συμπτωμάτων της καρδιακής ανεπάρκειας, αλλά απ' ό,τι φαίνεται από τους δείκτες θνητότητας, που είναι ακόμα υψηλοί, πρέπει να μελετηθούν και νέα πεδία στη θεραπευτική της νόσου. Σκοπός της φαρμακογονιδιωματικής είναι η εύρεση παραλλαγών στο γονιδίωμα του κάθε ασθενούς, ώστε να αναπτυχθούν νέα φάρμακα που θα ανταποκρίνονται απόλυτα στο γονιδιακό του προφίλ. Με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών και κατάλληλων αλγορίθμων (DGE, differential gene expression profiling, βάσεις εκφραζόμενων γονιδίων κ.λπ.) γίνεται δυνατή η ανακάλυψη νέων γονιδιακών στόχων για μελλοντικές θεραπείες. Η γονιδιακή θεραπεία αφορά στην εισαγωγή ενός φυσιολογικού αλληλόμορφου γονιδίου, γιατί το κύτταρο είτε δεν εκφράζει το γονίδιο είτε το εκφράζει μειωμένο. Τα στάδια προετοιμασίας που απαιτούνται είναι: απομόνωση γονιδίου-στόχου, ανάπτυξη κατάλληλου οχήματος (vector), προσδιορισμός κυττάρου-στόχου, μέθοδος μεταφοράς, εύρεση άλλων θεραπευτικών στόχων. Οι μελετώμενοι στόχοι για γονιδιακή θεραπεία είναι οι παράγοντες VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), FGF (παράγοντας αύξησης ινοβλαστών), SOD (δισμουτάση του υπεροξειδίου), HO-1 (οξυγενάση της αίμης), αντιαποπρωτικό γονίδιο Bcl-2. Ακόμα, μελετάται η παρεμπόδιση της δράσης των bARK-κινασών, που θα συμβάλει στη μείωση της αδρενεργικής απευαισθητοποίησης η οποία παρατηρείται στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Οι ελπίδες για το μέλλον εναποτίθενται στη δύναμη της παρεμβολής RNA (RNA-interference), η οποία μπορεί να επιτρέψει υπερεκλεκτικά την αποικοδόμηση επιβλαβών για το κύτταρο πρωτεϊνών, ώστε να υποβοηθηθεί το μυοκάρδιο που δυσλειτουργεί στην αντιμετώπιση του απαιτούμενου μυοκαρδιακού φορτίου.

1. ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι μια από τις σημαντικότερες νοσολογικές οντότητες σήμερα και αποτελεί αιτία αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας στο δυτικό κόσμο.^{1,2} Δεν πρόκειται για μια ξεχωριστή νόσο, αλλά ουσιαστικά για την κατάληξη συνυπαρχόντων παραγόντων, όπως της αρτηριακής υπέρτασης, της στεφανιαίας νόσου και των διαφόρων μυοκαρδιοπαθειών. Η ποιότητα της ζωής επηρεάζεται στην καρδιακή ανεπάρκεια περισσότερο από κάθε άλλη νόσο,³ ενώ το κόστος φθάνει τα 22,5 δις \$ ετησίως.

Έτσι, η μελέτη της και οι προσπάθειες για την ανακούφιση των ασθενών είναι ιδιαίτερης σημασίας.

Ο σημερινός ιατρός διαθέτει μια ποικιλία από φαρμακευτικούς παράγοντες που βοηθούν στην αντιμετώπιση, σε μεγάλο βαθμό, των συμπτωμάτων της καρδιακής ανεπάρκειας, αλλά απ' ό,τι φαίνεται από τους δείκτες θνητότητας, που είναι ακόμα υψηλοί, πρέπει να μελετηθούν και νέα πεδία στη θεραπευτική της νόσου. Πιστεύεται ότι το μέλλον ανήκει στη φαρμακογονιδιωματική και στη γονιδιακή θεραπεία για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(4):439-453
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(4):439-453

Δ. Λύκουρας,
Δ. Δουγένης

Καρδιοθωρακοχειρουργική Κλινική,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών,
Ρίο

Pharmacogenomics and gene
therapy in heart failure

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Γονιδιακή θεραπεία
Καρδιακή ανεπάρκεια
Φαρμακογονιδιωματική

Υποβλήθηκε 8.5.2008
Εγκρίθηκε 30.6.2008

ασθενών και –γιατί όχι– και για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας κάποια ημέρα.

2. ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ

Όσον αφορά στα φάρμακα που υπάρχουν για την καρδιακή ανεπάρκεια, οι διαθέσιμες κατηγορίες και ουσίες που χρησιμοποιούνται έχουν ως στόχο:

- Τη μείωση του προφορτίου
- Τη μείωση του μεταφορτίου
- Τη βελτίωση της μυοκαρδιακής συσταλτικότητας.

Σύμφωνα με την κατάταξη της New York Heart Association (NYHA), υπάρχουν οι εξής τάξεις καρδιακής ανεπάρκειας:

- NYHA I: Καθόλου συμπτώματα στη συνήθη δραστηριότητα
- NYHA II: Ήπια συμπτωματολογία στις καθημερινές εργασίες. Ανακούφιση με την ανάπαυση
- NYHA III: Εκσεσημασμένα συμπτώματα, που εμποδίζουν τη συνήθη δραστηριότητα. Ανακούφιση μόνο στην ανάπαυση
- NYHA IV: Σοβαρά συμπτώματα ακόμα και όταν το άτομο αναπαύεται.

Ο πίνακας 1 παρουσιάζει τις διάφορες κατηγορίες φαρμάκων ανάλογα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της καρδιακής ανεπάρκειας. Εκτός από αυτές τις ομάδες φαρμάκων αξίζει να σημειωθούν και νεότερα φάρμακα, όπως το ALT-711 (alagebrum),⁴ που δρα μέσω ρήξης των συνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών που προκύπτουν μετά από προηγμένη γλυκοζυλίωση (AGE, advanced glycation),⁵ και το MCC-135 (caldaret),⁶ που αυξάνει την πρόσληψη και μειώνει την απώλεια Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Συνοπτικά, η εικόνα 1 παρέχει μια συνολική άποψη της δράσης των φαρμακευτικών παραγόντων στο κυκλοφορικό σύστημα.

3. ΦΑΡΜΑΚΟΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ

3.1. Τι είναι φαρμακογονιδιωματική;

Είναι γνωστό ότι τα περισσότερα φάρμακα έχουν μεγάλη διαφορά όσον αφορά στο θεραπευτικό αποτέλεσμα και την τοξικότητα από ασθενή σε ασθενή. Έρευνα στις ΗΠΑ υπολογίζει ότι 100.000 ασθενείς πεθαίνουν και 2.200.000 έχουν επιπλοκές στην υγεία τους λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών από φάρμακα. Η επίπτωση σε νοσηλευόμενους ασθενείς ανέρχεται σε ποσοστό 6–7%, με αποτέλεσμα στις ΗΠΑ οι ανεπιθύμητες ενέργειες από φάρμακα να αποτελούν την τέταρτη αιτία θανάτου.⁷

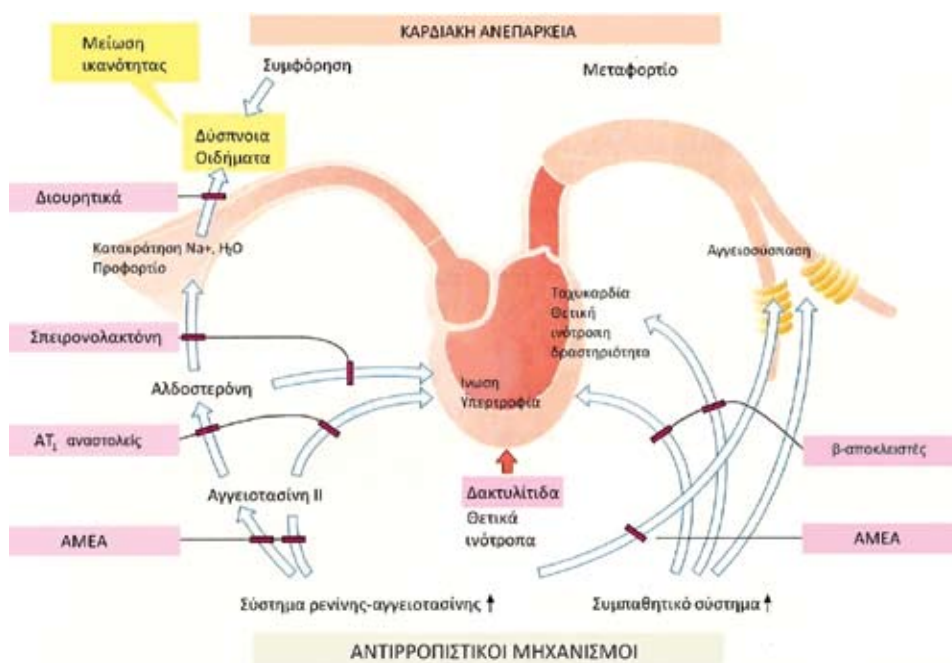
Στην καθημερινή ιατρική πράξη, προς το παρόν, προβλήματα στον ασθενή από τη χρήση ενός φαρμάκου διαπιστώνονται μόνο αφού αυτός το έχει ήδη χρησιμοποιήσει. Επιπλέον, ο κλινικός ιατρός προσαρμόζει τη δοσολογία βάσει στατιστικών μελετών σε προηγούμενους ασθενείς. Ωστόσο, αυτή η πρακτική της εμπειρικής δοκιμής πιστεύεται ότι αφενός εκθέτει τους ασθενείς σε δυνητικό κίνδυνο και αφετέρου οδηγεί σε απώλεια χρόνου, που μπορεί να είναι κρίσιμη για ορισμένους ασθενείς.

Γι' αυτούς τους λόγους, οι ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων και οι στόχοι των φαρμάκων αποτελούν σήμερα κύριο πεδίο μελέτης, με την εισαγωγή της γενετικής ανάλυσης και τη συμβολή της τεχνολογίας. Σε πολλές περιπτώσεις, οι διαφορές στην αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου οφείλονται σε πολυμορφισμούς γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν τη φαρμακευτική ουσία, μεταφορείς του φαρμάκου ή στόχους του. Με τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας, οι ανεπιθύμητες

Πίνακας 1. Κατηγορίες φαρμάκων στην καρδιακή ανεπάρκεια.

NYHA κατάταξη	I	II	III	IV
Συμπτώματα	–	Ήπια	Σημαντικά	Ακόμα και σε ανάπαυση
ACE αναστολείς	+	+	+	+
AT ₁ αναστολείς	Αντί για ACE αναστολείς όταν υπάρχουν ανεπιθύμητες ενέργειες, π.χ. βήχας			
β-αποκλειστές	Σε έμφραγμα, υπέρταση	+	+	+
Διουρητικά	Σε υπέρταση, οιδήματα	+	+	+
Ανταγωνιστές αλδοστερόνης	–	Σε υποκαλιαιμία	+	+
Δακτυλίτιδα	Σε ίνωση κόλπων	Σε ίνωση κόλπων	+	+

ACE: Μετατραπεπτικό ένζυμο αγγειοτασίνης, AT₁: Αγγειοτασίνη 1



Εικόνα 1. Φάρμακα και δράση τους στο κυκλοφορικό, στην καρδιακή ανεπάρκεια. ΑΜΕΑ: Αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτασίνης.

ενέργειες θα μειωθούν και η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα θα βελτιωθούν, με τη δημιουργία θεραπειών που θα στηρίζονται στη μελέτη του γονιδιώματος.^{8,9} Ο κάθε ασθενής, δηλαδή, θα έχει το «προσωπικό του φάρμακο», που θα ταιριάζει στο γονιδιακό του προφίλ.

3.2. Ανακάλυψη γονιδιακών στόχων

Για να είναι δυνατόν να ανακαλυφθούν γονιδιακές περιοχές που μας ενδιαφέρουν, πρέπει πρώτα απ’ όλα να εξασφαλιστεί το DNA, δηλαδή το γονιδίωμα εκείνο που περιέχει όλη τη γενετική πληροφορία. Υπάρχουν δύο τρόποι για να γίνει αυτό:

- Δημιουργία μιας cDNA βιβλιοθήκης, που να προέρχεται από το mRNA κυττάρων του ιστού που μας ενδιαφέρει. Έτσι, στη cDNA βιβλιοθήκη περιλαμβάνονται μόνο τα γονίδια εκείνα που εκφράζονται στο συγκεκριμένο ιστό και όχι το συνολικό γονιδίωμα του οργανισμού
- Λήψη του DNA από τα χρωμοσώματα του οργανισμού που μας ενδιαφέρει. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα να παραλαμβάνονται τόσο εσόνια όσο και εξόνια. Έτσι, στη συνέχεια πρέπει να χρησιμοποιηθούν υπολογιστικά εργαλεία ή μέθοδοι, όπως το northern-blot, για να εντοπιστούν οι γονιδιακές περιοχές ενδιαφέροντος, δηλαδή οι περιοχές που εκφράζονται στα κύτταρα-στόχους.

3.2.1. DGE (differential gene expression profiling) για την ανακάλυψη στόχων θεραπείας. Το DGE είναι μια τεχνική κατά την οποία μετρώνται διαφορές στην ποσότητα του mRNA που παράγεται από ένα γονίδιο ή από μια σειρά

γονιδίων μεταξύ δύο ιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να συγκριθούν ιστοί φυσιολογικοί με ιστούς παθολογικούς, που έχουν ένα συγκεκριμένο προβληματικό φαινότυπο. Ως αποτέλεσμα, αναγνωρίζουμε τα γονίδια που εκφράζονται ή δεν εκφράζονται στον ιστό που πάσχει και τα οποία ευθύνονται για τη συγκεκριμένη παθολογία. Οι κυριότεροι τύποι του DGE είναι οι εξής:

- GeneCalling. Αρχικά απομονώνεται mRNA από τον προς μελέτη ιστό και δημιουργείται η αντίστοιχη cDNA βιβλιοθήκη. Η βιβλιοθήκη αυτή οδηγείται σε πέψη με 96 ζεύγη περιοριστικών ενζύμων. Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται τμήματα ποικίλων μεγεθών. Στη συνέχεια, τα τμήματα αυτά συνδέονται με φθορίζουσες ουσίες και ακολουθεί πολλαπλασιασμός με PCR και ηλεκτροφόρηση σε MegaBACE gels για να διαχωριστούν και να μετρηθούν τα προϊόντα. Τα αποτελέσματα διοχετεύονται σε υπολογιστικά προγράμματα, όπου γίνονται οι συγκρίσεις των αποτελεσμάτων.¹⁰ Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε ποντίκια για το Gsa, το κοιλιακό νατριουρητικό πεπτιδίδιο και τον TGF-b.¹¹
- SAGE. Μια μικρή αλληλουχία-ετικέτα 10 bp χρησιμοποιείται για την αναγνώριση του cDNA μεταγράφου που προκύπτει από συγκεκριμένο mRNA και οι ετικέτες αυτές συγκεντρώνονται σε ένα μόριο DNA και αλληλουχούνται. Έτσι, μπορεί να αναγνωριστούν πολλές διαφορετικές αλληλουχίες μέσα στον ιστό.¹² Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση γονιδίων σε ιστούς στους οποίους χορηγήθηκαν ουσίες που θα οδηγούσαν σε αθηρογένεση.¹³

3.2.2. *Δημιουργία βάσης εκφραζόμενων γονιδίων.* Η βάση δεδομένων των εκφραζόμενων γονιδίων περιέχει πληροφορίες cDNA αλληλουχιών που προέρχονται από αλληλούχηση (sequencing) τμημάτων cDNA, τα οποία έχουν παραχθεί από mRNA. Στο σύστημα δημιουργούνται οι πρότυπες (assembled) αλληλουχίες του ιστού, με βάση τις οποίες γίνονται οι οποιοσδήποτε συγκρίσεις. Γνωρίζοντας το γονίδιο που εκφράζεται στη βάση αυτή, έχουμε ουσιαστικά και τις πρωτεΐνες που παράγονται στα ανωτέρω κύτταρα. Ωστόσο, η μέθοδος πρέπει να είναι προσεκτικά σχεδιασμένη, γιατί ένα κύτταρο μπορεί να παράγει από ελάχιστο έως τεράστιο αριθμό mRNA από ένα συγκεκριμένο γονίδιο.

Αφού προκύψει η αλληλουχία, σειρά έχουν τα λογισμικά επεξεργασίας. Δύο περιπτώσεις είναι το PHRED και το PHRAP.^{14,15} Το PHRED χρησιμοποιεί σύγκριση μιας βάσης (base-calling) και δίνει μια βαθμολογία για τον εντοπισμό μιας βάσης σε μια συγκεκριμένη θέση. Το PHRAP εξετάζει τις αλληλουχίες που εισάγονται με τις πρότυπες αλληλουχίες του συστήματος σύμφωνα με κριτήρια και αλγόριθμους.

Το SeqCalling θεωρείται ότι εξάγει αποτελέσματα προκατειλημμένα (biased), γι' αυτό ενδείκνυται η δημιουργία micro-arrays ή DNA chips για τον καλύτερο έλεγχο των επιθυμητών γονιδιακών στόχων.

Τα κυριότερα γονίδια που έχουν μελετηθεί σχετίζονται με γονίδια που εκφράζονται σε αιμοπετάλια και κύτταρα του ενδοθηλίου, γιατί αυτά παίζουν τον κύριο λόγο στις

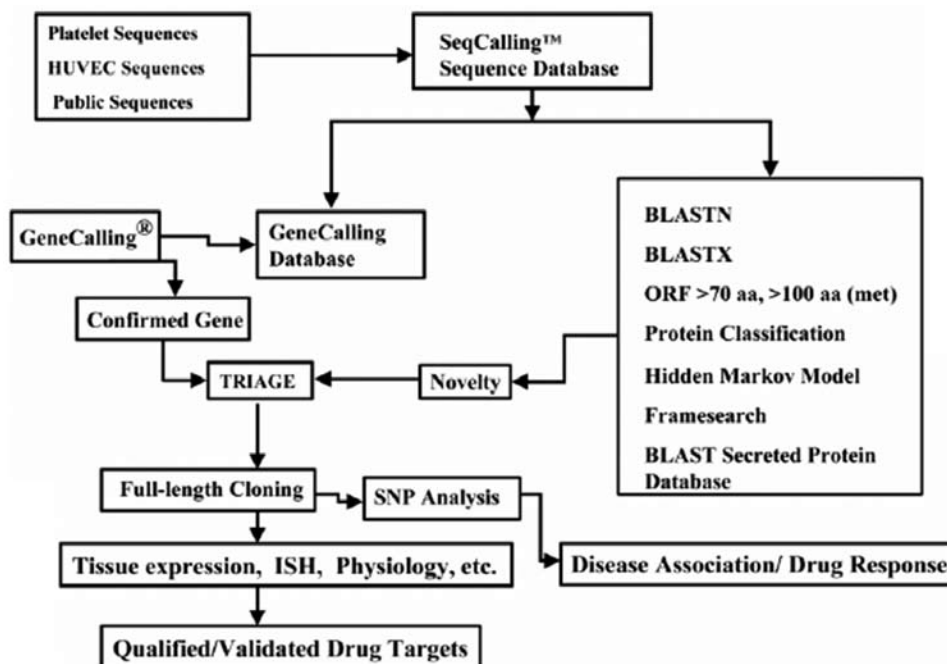
διαδικασίες θρόμβωσης, αθηροσκλήρωσης και νεοαγγείωσης.¹⁶

3.2.3. *Αλγόριθμος εύρεσης νέων γονιδιακών στόχων.* Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες, μπορεί να καθοριστεί συνοπτικά σε ένα σχήμα η σειρά των πράξεων που απαιτούνται για την απομόνωση μιας γονιδιακής αλληλουχίας, να διαπιστωθεί αν πρόκειται για νέο γονίδιο και να προταθεί έπειτα ως φαρμακευτικός στόχος (εικ. 2).

3.2.4. *Χρήση του expression pharmacogenomics (ExPg).* Μια τεχνική ανάλυσης του γονιδιώματος, που χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο ως εργαλείο για αύξηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας φαρμάκων, είναι το ExPg.

Το πιο χρονοβόρο κομμάτι της προετοιμασίας ενός νέου φαρμάκου αποτελούν οι δοκιμές τοξικότητας και αποτελεσματικότητάς του. Το ExPg θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τις διαδικασίες αυτές, ώστε να αποφευχθούν πιθανές αποσύρσεις φαρμάκων λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών.

Για παράδειγμα, τα φάρμακα καταστολής της όρεξης dexfenfluramine (DXF) και fenfluramine (FEN) αποσύρθηκαν λόγω καρδιοτοξικότητας και πρόκλησης βαλβιδοπαθειών, λόγω έκφρασης του υποδοχέα 5HT₂ στον καρδιακό ιστό.¹⁷ Τα δύο αυτά φάρμακα είναι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) και έχει αποδειχθεί ότι είχαν τοξική δράση στις βαλβίδες. Το ExPg χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμές γονιδιακής έκφρασης σε ιστό ποντικού μετά από χορήγηση DXF, FEN και θετικό δείκτη



Εικόνα 2. Αλγόριθμος εύρεσης νέων γονιδιακών στόχων.

(dihydroergotamine και sumatriptane) και αρνητικό δείκτη (fluoxetine και sibutramine). Προέκυψαν 19.000 τμήματα, τα οποία αναλύθηκαν με το GeneCalling.¹⁶

Ακόμη, το ExPg μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της έκφρασης γνωστών μονοπατιών που σχετίζονται με σηματοδότηση ή μεταβολική δραστηριότητα. Έτσι, μπορούν να βρεθούν γρηγορότερα νέοι πιθανοί στόχοι θεραπείας και να αναπτυχθούν τα κατάλληλα θεραπευτικά μέσα.

3.2.5. Απλοί πολυμορφισμοί (SPs) και πολυμορφισμοί μήκους νουκλεοτιδίου (SNPs). Σε αρκετές περιπτώσεις, η εκδήλωση της νόσου οφείλεται σε αλλαγές στην κωδικοποιητική αλληλουχία, με αποτέλεσμα διαφορετικό ποσό εκφραζόμενου mRNA, ή σε αλλαγές που οδηγούν σε προβληματική εκφραζόμενη πρωτεΐνη. Αυτοί είναι οι δύο τύποι πολυμορφισμών ενός γονιδίου (SP, sequence polymorphism).

Οι πολυμορφισμοί μήκους απλής βάσης (SNPs) αποτελούν αλλαγές μίας μοναδικής βάσης, που οδηγούν ορισμένες φορές σε διαφοροποιήσεις σε σημαντικά για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης αμινοξέα.

Άλλη περίπτωση είναι οι πολυμορφισμοί εισαγωγής/διαγραφής (in/del), που οδηγούν στη δημιουργία νέων αλληλόμορφων γονιδίων. Οι αλλαγές λαμβάνουν χώρα σε περιοχές τόσο εσονίων όσο και εξονίων, αλλά και σε περιοχές μεταξύ εσονίων/εξονίων.

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί είναι πολλές φορές η αιτία για την οποία οι ασθενείς απαντούν με διαφορετικό τρόπο στη φαρμακευτική θεραπεία, λόγω της επίδρασης ενζύμων του οργανισμού στο μεταβολισμό του φαρμάκου. Οι πολυμορφισμοί μπορεί να αφορούν σε υποδοχείς, διαύλους ιόντων, μεταφορείς κ.λπ. Έτσι, η γνώση των πολυμορφισμών μπορεί να επιτρέψει την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας.

Στο μέλλον, θα μπορούν να χρησιμοποιούνται ειδικά chips όπου θα είναι εγγεγραμμένοι οι πολυμορφισμοί των γονιδίων του ασθενούς και η γενετική προδιάθεση για κάποιο νόσημα, προκειμένου να μπορούν να γίνουν αναλύσεις σε προοπτικές μελέτες. Καθώς καταβάλλεται προσπάθεια χαρτογράφησης διαφόρων πολυμορφισμών, θα είναι δυνατή η δημιουργία ενός πλάνου με ανθρώπινους πολυμορφισμούς που αφορούν σε καρδιακά νοσήματα, όπως αθηροσκλήρωση, θρομβώσεις, δυσλιπιδαιμία.

Βέβαια, υπάρχουν και αρκετοί περιορισμοί στις συγκεκριμένες τεχνολογίες καταγραφής της γενετικής πληροφορίας, καθώς ελλοχεύει ο κίνδυνος του λάθους, επειδή απαιτείται προσεκτική αρχικοποίηση και σωστή χρήση των δεικτών. Επιπλέον, οι τεχνολογίες αυτές στηρίζονται σε cDNA βιβλιοθήκες που προκύπτουν από mRNA και εξαρτώνται

από τη διαθεσιμότητά του στον ιστό, αλλά δεν λαμβάνουν υπόψη το ποσό της πρωτεΐνης που παράγεται ούτε την πρωτεΐνη που αποικοδομείται ή ενδεχόμενες αλλαγές στη στερεοδιάταξή της.

Τέλος, επειδή η γονιδιωματική ανάλυση πραγματοποιείται από μεγάλες εταιρείες, συχνά τα δεδομένα δεν είναι άμεσα διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα για χρησιμοποίηση και, επιπλέον, αν τα δεδομένα που προκύπτουν χρησιμοποιηθούν ερευνητικά, πρέπει να μη θίγονται τα επιχειρηματικά συμφέροντα της εταιρείας.

4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η γονιδιακή θεραπεία αφορά στην εισαγωγή ενός φυσιολογικού αλληλόμορφου γονιδίου, γιατί το κύτταρο είτε δεν εκφράζει το γονίδιο είτε το εκφράζει μειωμένο. Για την επίτευξη του ανωτέρω στόχου απαιτείται η κατάλληλη προετοιμασία, η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Απομόνωση γονιδίου-στόχου
- Ανάπτυξη κατάλληλου οχήματος (vector)
- Προσδιορισμός κυττάρου-στόχου
- Μέθοδος μεταφοράς
- Εύρεση άλλων θεραπευτικών στόχων.

Ωστόσο, θα μπορούσε κάποιος να αναρωτηθεί γιατί απαιτείται γονιδιακή θεραπεία και δεν αρκεί απλώς η εξωτερική χορήγηση της πρωτεΐνης-προϊόντος του συγκεκριμένου σε κάθε περίπτωση γονιδίου (που θα ήταν δυνατόν να παρασκευαστεί σε τεράστια κλίμακα από βακτήρια). Η απάντηση προκύπτει από την ιδιαίτερη φύση των στόχων της θεραπείας. Η δράση πρωτεΐνης που θα μεταφερόταν μέσω έγχυσης δεν θα ήταν αποτελεσματική λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής αυξητικών και αγγειογενετικών παραγόντων, που αποτελούν σημαντικούς στόχους στην καρδιακή ανεπάρκεια.

4.1. Απομόνωση

Για να γίνει δυνατή η απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου πρέπει να δημιουργηθεί μια cDNA βιβλιοθήκη, η οποία θα περιέχει το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται στο συγκεκριμένο ιστό. Το DNA που εμπεριέχεται σε μια cDNA βιβλιοθήκη δεν είναι γενωμικό, με το πλεονέκτημα ότι μας προσφέρει το DNA που αντιστοιχεί στα εκφραζόμενα στο συγκεκριμένο ιστό γονίδια και μάλιστα εμπεριέχει αποκλειστικά κωδικοποιητικές αλληλουχίες.

Για να παρασκευαστεί η βιβλιοθήκη, αρχικά απομονώνεται ολικό mRNA από τα κύτταρα και κατόπιν, χρησιμοποιώντας το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή, συντίθενται

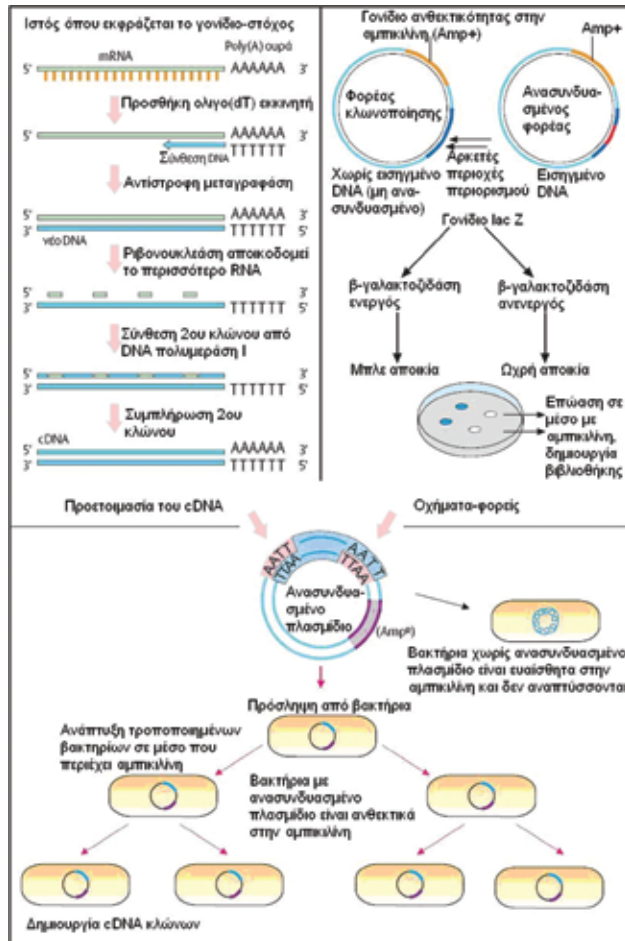
DNA αντίγραφο των μορίων των mRNA (cDNA, σύντηξη του όρου complement DNA, συμπληρωματικό DNA). Στη συνέχεια, τα μόρια του cDNA κλωνοποιούνται όπως και τα κλάσματα του γενωμικού DNA και έτσι παράγεται η cDNA βιβλιοθήκη (εικ. 3).

4.2. Οχήματα μεταφοράς (vectors)

Μετά την απομόνωση του γονιδίου, πρέπει να βρεθεί το κατάλληλο όχημα για να επιτευχθεί η εισαγωγή του γονιδίου που επιθυμούμε στο κύτταρο-στόχο. Με μεθόδους γενετικής μηχανικής το επιθυμητό γονίδιο εισάγεται στον κατάλληλο παράγοντα (συνήθως ιό) και στη συνέχεια γίνεται διαμόλυνση των κυττάρων-στόχων, ώστε να ενσωματωθεί το γονιδίωμα του ιού –άρα και του ένθετου γονιδίου μας– στο γενετικό υλικό των στόχων (εικ. 4).

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι τρόποι (πίν. 2):

- Χημικοί παράγοντες (λιποσώματα, ολιγονουκλεοτίδια)



Εικόνα 3. Σχηματισμός cDNA βιβλιοθήκης.

- Ιοί (ρετροϊοί, αδενοϊοί κ.λπ.), ανάλογα με την περίπτωση του κάθε γονιδίου.

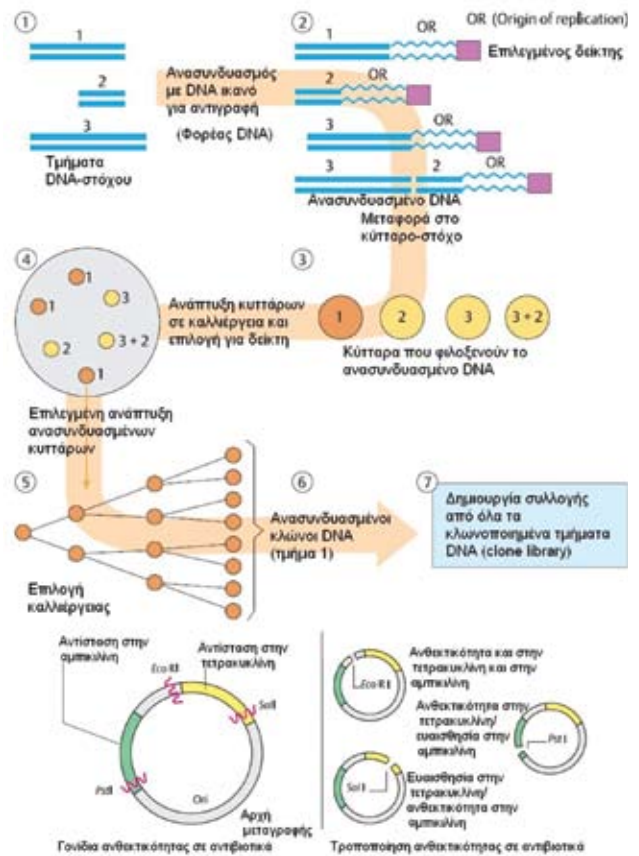
4.3. Κύτταρο-στόχος

Το κύτταρο-στόχος στη γονιδιακή θεραπεία είναι το καρδιακό μυϊκό κύτταρο, το οποίο στην πλειοψηφία των περιπτώσεων καρδιακής ανεπάρκειας έχει περάσει από μια φάση ισχαιμίας. Μετά από μια περίοδο ισχαιμίας, όμως, μια σειρά από αλλαγές πραγματοποιούνται στο μυοκαρδιακό κύτταρο, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.

4.4. Μέθοδος μεταφοράς

Στο βήμα αυτό εξετάζεται πώς πρέπει να γίνει η μεταφορά με μηχανικό τρόπο μέσα στον οργανισμό του ασθενούς, ώστε να επιτευχθεί η «διαμόλυνση». Η μεταφορά αυτή λαμβάνει χώρα:

- Στο επικάρδιο (ένεση)
- Στο ενδοκάρδιο (καθετήρας)
- Στα στεφανιαία αγγεία (καθετήρας)
- Στο περικάρδιο (ένεση).



Εικόνα 4. Ενσωμάτωση επιθυμητού γονιδίου σε πλασμιδίο.

Πίνακας 2. Χημικοί παράγοντες και ιοί που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία.

Πλασμίδια	Πολύ καλά ανεκτά Ασφαλέστατα ¹⁸	Μικρό ποσοστό μεταφοράς στον πυρήνα ¹⁹
Αδενοϊοί	Διαφοροποιούμενα και μη κύτταρα Καλό ποσοστό διαμόλυνσης	Δεν ενσωματώνονται στον πυρήνα → μικρός χρόνος έκφρασης ²⁰ Πιθανότητα ανοσιακής απόκρισης «στο ξένο» ²¹
Ρετροϊοί	Ενσωμάτωση στο γονιδίωμα Σταθερότητα στη μεταφορά	Ενσωμάτωση μόνο σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ²²
Lentiviruses	Υπότυπος ρετροϊών που ενσωματώνεται και σε μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα Σταθερότητα ²³	
AAV (adeno-associated-based vectors)	Ενσωμάτωση στο γονιδίωμα ²⁴ Σταθερότητα στη μεταφορά Μόλυνση και μη πολλαπλασιαζόμενων	Χωρούν μόνο 4,7 kb Κίνδυνος μεταλλάξεων
Λιποσώματα – ολιγονουκλεοτίδια (ODN-based)	Παντοδύναμη μεταφορά Εκλεκτικότητα για το ενδοθήλιο ²⁵ Κατάλληλη τροποποίηση αυξάνει μεταφορά - μειώνει τοξικότητα	

Πίνακας 3. Γονίδια των οποίων η έκφραση αλλάζει στη μυοκαρδιακή ισχαιμία.

Heat shock proteins (HSPs 27, 40, 70, 86, 105 kDa)	Προστασία κυτταρικής ακεραιότητας, μεταβολισμού και ομοιόστασης κατά τη διάρκεια και μετά από σοβαρές βλάβες ²⁶
Growth factors (brain-derived neurotrophic factor, vascular endothelial growth factor)	Προστασία κυτταρικής ακεραιότητας νευρικών και αγγειακών δομών
Modulators of apoptosis (plasminogen activator inhibitor 1 – a serine proteinase inhibitor)	Αντιαποπρωτικός παράγοντας ²⁷
Transcription factors (Atf3 – liver regenerating factor)	Ρύθμιση αύξησης, αντιαποπρωτικές ιδιότητες ²⁸
Cell survival promoters (B-cell translocation gene 2, growth arrest και DNA-damage inducible gene 45a)	Προαγωγή κυτταρικής επιβίωσης, προστασία νευρώνων από απόπτωση, επισκευή DNA ²⁹

4.5. Άλλοι θεραπευτικοί στόχοι

Μετά από την εφαρμογή της θεραπείας, είναι πιθανό να διαπιστωθεί χρησιμότητα του συγκεκριμένου γονιδίου και στην αντιμετώπιση άλλων στόχων της θεραπείας, αλλά και ο εντοπισμός νέων πιθανών θέσεων που απαιτούν παρέμβαση.

5. ΣΤΟΧΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Η συνηθέστερη αιτία καρδιακής ανεπάρκειας είναι η ισχαιμία του μυοκαρδίου, γι' αυτό και οι κυριότεροι στόχοι που θα εξεταστούν αφορούν στο μετεμφραγματικό μυοκάρδιο το οποίο αδυνατεί να ανταποκριθεί στις ανάγκες του σώματος, με αποτέλεσμα να ανεπαρκεί.

Μετά από την κρίσιμη περίοδο της ισχαιμίας του μυοκαρδιακού ιστού πραγματοποιούνται ορισμένες αλλαγές

στην έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων. Μετά από 20 min ισχαιμίας παρατηρείται θετική παλίνδρομη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το θερμικό shock (heat shock proteins, HSPs), των 27, 40, 70, 86 και 105 kDa. Αυτές οι πρωτεΐνες βοηθούν στη διατήρηση της ακεραιότητας του ιστού και της ομοιόστασης των κυττάρων του μετά από το σύμβαμα της ισχαιμίας.³⁰

Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης αυξητικών παραγόντων, όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor) και ο BDNF (brain-derived growth factor), οι οποίοι συμβάλλουν στην ακεραιότητα των μυοκαρδιακών και νευρικών δομών.³¹

Ο παράγοντας ενεργοποίησης της μεταγραφής (Atf3), γνωστός και ως παράγοντας προστασίας του ήπατος, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αύξησης μέσω του ελέγχου της έκφρασης γονιδίων καθυστερημένης απάντησης (π.χ. αυτά που ενέχονται στη σύνθεση του DNA).³² Ακόμη, μπορεί να αναστείλει και διεργασίες απόπτωσης.³³

Ο παράγοντας ενεργοποίησης του αναστολέα του πλασμινογόνου Ι είναι μια πρωτεάση σερίνης με αντιαποπρωτικές ιδιότητες, το γονίδιο Btg2 (B-cell translocation gene 2) προάγει την κυτταρική επιβίωση³⁴ και το γονίδιο Gadd45a (growth arrest και DNA damage-inducible gene 45 alpha) ελέγχει την επιδιόρθωση του DNA, τη σταθερότητα του γονιδιώματος και την αντίσταση στο stress.³⁵

5.1. Αγγειογένεση στο μυοκάρδιο

5.1.1. VEGF (vascular endothelial growth factor). Ο VEGF είναι μια αγγειογενετική γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ηπαρίνη και θεωρείται σημαντική για τη δημιουργία νέων

αγγείων στο ισχαιμικό μυοκάρδιο.³⁶ Πολλές μελέτες έχουν αναλύσει το ρόλο του VEGF στη διαδικασία αναγέννησης του αγγειακού δικτύου και έχει βρεθεί ότι υποβοηθείται από το μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιείται από την υποξία (hypoxia-inducible factor-1). Έξι δομικά παρόμοια γονίδια του VEGF έχουν βρεθεί και όλα εμφανίζουν παρόμοια αποτελεσματικότητα στη νεοαγγειογένεση. Το γονίδιο του VEGF ήταν το πρώτο που δοκιμάστηκε για γονιδιακή θεραπεία (πίν. 4).

Σε κλινικές μελέτες έχει επιτευχθεί η μεταφορά του γονιδίου στο κύτταρο-στόχο με τη χρήση γυμνού πλασμιδιακού DNA με άμεση ένεση στο ισχαιμικό μυοκάρδιο³⁷ (ή με mini-θωρακοτομή). Σε άλλες μελέτες, το γονίδιο του

Πίνακας 4. Κλινικές μελέτες γονιδιακής μεταφοράς γονιδίων του VEGF και του FGF.

Μελέτη	Αριθμός ασθενών	Μάρτυρας (Control) (Ναι/Όχι)	Γονίδιο/Φορέας	Οδός χορήγησης	Θεραπευτικό αποτέλεσμα
Losordo	5	Όχι	phVEGF ₁₆₅	Ενδομυοκαρδιακή ένεση	Μειωμένη στηθάγχη, μειωμένη χρήση NTG, βελτιωμένη μυοκαρδιακή επαναγγείωση
Rosengart	21	Όχι	AdVEGF _{121,10}	Ενδομυοκαρδιακή ένεση	Βελτιωμένη κατηγορία κατά CCS, βελτίωση κινητικότητας μυοκαρδίου
Symes	20	Όχι	phVEGF ₁₆₅	Ενδομυοκαρδιακή ένεση	Βελτίωση επαναγγείωσης, μειωμένη χρήση NTG και μειωμένη στηθάγχη
Vale	13	Όχι	phVEGF ₁₆₅	Ενδομυοκαρδιακή ένεση	Μείωση περιοχής ισχαιμικού μυοκαρδίου, μειωμένη συχνότητα στηθάγχης, μειωμένη χρήση NTG, βελτιωμένη αντοχή στη φυσική δραστηριότητα
Fortuin	30	Όχι	phVEGF-2	Ενδομυοκαρδιακή ένεση	Μειωμένη συχνότητα στηθάγχης, βελτιωμένη κατηγορία κατά CCS, βελτιωμένη αντοχή στη φυσική δραστηριότητα
Sarkar	7	Όχι	phVEGF-A ₁₆₅	Ενδομυοκαρδιακή ένεση	Μειωμένη χρήση NTG, βελτιωμένη καρδιακή λειτουργικότητα, βελτίωση επαναγγείωσης στο 60%, όχι βελτιωμένη αντοχή στη φυσική δραστηριότητα
Vale	6 (3/3)	Ναι	phVEGF-2	Ενδομυοκαρδιακή ένεση με χρήση καθετήρα	Μειωμένη συχνότητα στηθάγχης, μειωμένη χρήση NTG, ελάττωση περιοχής ισχαιμικού μυοκαρδίου, βελτίωση επαναγγείωσης
Losordo	19 (12/7)	Ναι	phVEGF-2	Ενδομυοκαρδιακή ένεση με χρήση καθετήρα	Βελτιωμένη κατηγορία κατά CCS, όχι βελτιωμένη αντοχή στη φυσική δραστηριότητα
Kupio Angiogenesis Trial (KAT), Hedman	103 (37 VEGF-Ad, 28 VEGF-P/L, 38 control)	Ναι	VEGF-Ad VEGF-P/L	Χορήγηση μέσω καθετήρα κατά τη διάρκεια αγγειοπλαστικής και τοποθέτησης stent	Βελτιωμένη επαναγγείωση με VEGF-Ad/όχι σημαντική βελτίωση σε ποσοστό επαναστένωσης, κατηγορία κατά CCS, χρήση NTG, αντοχή στη φυσική δραστηριότητα
Euroinject One Kastrup	80 (40/40)	Ναι	phVEGF-A ₁₆₅	Ενδομυοκαρδιακή ένεση με χρήση καθετήρα	Βελτιωμένη κινητικότητα μυοκαρδίου, όχι σημαντική διαφορά στην αντοχή στο stress
AGENT, Grines	79 (60/19)	Ναι	Ad5FGF-4	Ενδοστεφανιαία ένεση	Αύξηση αντοχής στο ETT
AGENT-2, Grines	52 (35/17)	Ναι	Ad5FGF-4	Ενδοστεφανιαία ένεση	Βελτιωμένη επαναγγείωση
AGENT 3+4	Διακόπηκε το 2004. Ανεπαρκής εκτίμηση αποτελεσματικότητας	-	-	-	-

Ad: Αδενοϊός, CCS: Canadian Cardiovascular Society, ETT: Exercise treadmill testing (δοκιμασία κόπωσης σε κυλιόμενο τάπητα), FGF: Fibroblast Growth Factor, Gtx: Μεταφορά γονιδίου, NTG: Νιτρώδη, ph: Πλασμίδιο, P/L: Πλασμίδιο/λιπόσωμα, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF έχει εισαχθεί σε αδενοϊό και η μεταφορά γίνεται με απευθείας ένεση.³⁸

Αποτέλεσμα όλων αυτών των θεραπειών ήταν η αύξηση των επιπέδων του VEGF, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως πιστευόταν αρχικά (π.χ. αιμαγγείωμα, αμφιβληστροειδοπάθεια).^{39,40} Το κλινικό αποτέλεσμα της βελτίωσης ήταν εμφανές, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της στηθάγχης καθώς και της χρήσης νιτρωδών από τους ασθενείς.⁴¹

5.1.2. FGF (fibroblast growth factor). Εκτός του VEGF, σημαντικότερος είναι ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF), επειδή και αυτός ενεργοποιεί την αγγειογένεση (πίν. 4). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση του FGF-2 είναι σχετικά καλώς ανεκτή, αλλά προκαλεί παροδική υπόταση για 1–3 ημέρες.^{42,43} Πάντως, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία μετά από 180 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της στηθάγχης και της απόδοσής τους στη δοκιμασία κόπωσης, μείωση της ισχαιμικής περιοχής και πάχυνση του τοιχώματος του μυοκαρδίου.⁴⁴

Η μεταφορά μπορεί να γίνει με εισαγωγή του γονιδίου σε αδενοϊό. Η πρακτική αυτή ακολουθήθηκε σε μια μελέτη, όπου σε αδενοϊό προστέθηκε το γονίδιο FGF-4 και ακολούθησε ενδοστεφανιαία έγχυση.^{45,46} Το αποτέλεσμα ήταν η αύξηση του ελεύθερου νιτρωδών χρόνου και η βελτιωμένη επαναγγείωση, που αποτελεί και τον προσδοκώμενο στόχο.

5.2. Προστασία από λανθασμένη επαναγγείωση

Η επαναγγείωση είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του μυοκαρδιακού ιστού. Όμως, θα πρέπει να γίνει με τον ορθό τρόπο, γιατί η λανθασμένη επαναγγείωση οδηγεί σε περαιτέρω προβλήματα ισχαιμίας του μυοκαρδίου λόγω οξειδωτικού stress ή σχηματισμού θρόμβων. Σε αυτή την κατεύθυνση έχουν μελετηθεί γονίδια που οδηγούν σε μείωση της συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών ή γενικά σε μείωση με κάποιον τρόπο του οξειδωτικού stress. Δυνητικά χρήσιμα γονίδια είναι αυτά της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD) και της οξυγονάσης της αίμης (heme oxygenase-1, HO-1). Οι μελέτες που έχουν γίνει αφορούν σε μελέτες στα ζώα, ενώ κλινικές μελέτες δεν έχουν ακόμα δημοσιευτεί.

5.2.1. SOD (superoxide dismutase). Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση του γονιδίου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου σε κουνέλια μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου αποτρέπει την εμφάνιση λαθροβιούτος (stunning) μυοκαρδίου.⁴⁷ Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αδενοϊού, στον οποίο προστέθηκε το γονίδιο SOD που είχε ληφθεί

από cDNA βιβλιοθήκη (Ad5/CMV/Ec-SOD), και έγινε με καθετηριασμό 3 ημέρες πριν από το χειρουργείο. Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος φορέας του γονιδίου γιατί προσδέεται σε εξωκυττάριας θέσεις στο ήπαρ,⁴⁸ όπου το γονίδιο «αποθηκεύεται» και δρα μόνον όταν χρειαστεί, χωρίς να δημιουργεί φλεγμονή στο μυοκάρδιο. Το αποτέλεσμα ήταν βελτιωμένη επαναγγείωση του προσβεβλημένου μυοκαρδιακού ιστού και όχι περαιτέρω απώλεια της λειτουργικότητας του ισχαιμικού μυοκαρδίου.

5.2.2. HO-1 (heme oxygenase 1). Το γονίδιο της οξυγονάσης της αίμης HO-1 έχει μελετηθεί ως πιθανός στόχος γονιδιακής θεραπείας σε ερευνητικό μοντέλο με ποντικούς, όπου υπήρχε βλάβη λόγω κακής επαναγγείωσης μετά από ισχαιμικό επεισόδιο.⁴⁹ Ανθρώπινο γονίδιο προστέθηκε στο όχημα μεταφοράς, που ήταν αδενοϊός, και ακολούθησε ένεση στο επικάρδιο του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας.⁵⁰ Η μεταφορά είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 75% της εμφραγματικής περιοχής και τη μείωση των επιπέδων προαποπτωτικών και προφλεγμονωδών παραγόντων.

Ένα στοιχείο που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη κατά τη χρήση της γονιδιακής θεραπείας στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress είναι ότι οι ασθενείς με ισχαιμική νόσο του μυοκαρδίου υπόκεινται σε επαναλαμβανόμενα επεισόδια μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Επομένως, για να είναι αποτελεσματικό το γονίδιο που θα χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει να εκφράζεται στις φάσεις της ισχαιμίας. Η θεραπεία με το SOD έχει μόνο βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα, ενώ η συνεργική δράση μακράς διάρκειας δράσης παραγόντων, όπως η HO-1, μπορεί να έχει ανεπιθύμητες ενέργειες (CO, οξειδωτικές ουσίες από μιτοχόνδρια κ.λπ.).

Τα «επαμφοτερίζοντα» οχήματα μεταφοράς (vigilant vectors) αναπτύχθηκαν προκειμένου η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών να γίνεται μόνον όταν υπάρχει ισχαιμία.⁵¹ Η δοκιμή έλαβε χώρα σε ποντίκια μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, όπου έγινε η χορήγηση vigilant hHO-1 πλασμιδίου και παρατηρήθηκαν λιγότερες περιοχές ίνωσης, αυξημένη έκφραση της hHO-1 και βελτιωμένη μυοκαρδιακή συσταλτικότητα μετά από το έμφραγμα.⁵²

5.3. Ο ρόλος του Ca²⁺ και της φωσφολαμπίνης

Μια άλλη άποψη στις μελέτες γονιδιακής θεραπείας είναι η απώλεια του ενδοκυττάριου ασβεστίου και η μείωση των επιπέδων του στο μυοκάρδιο που ανεπαρκεί. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, η δραστηριότητα του διαύλου SERCA2a (sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase 2a) μειώνεται, οδηγώντας σε μειωμένη μυοκαρδιακή συσταλτικότητα. Σε ποντίκια εισήχθη με ένεση στη βάση της αορτής το γονίδιο του διαύλου προσδεμένο σε

αδενοϊό (Ad.SERCA2a) και παρατηρήθηκε βελτίωση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου.^{53,54}

Προκειμένου να βελτιωθεί η σηματοδότηση στα καρδιακά κύτταρα μέσω του Ca^{2+} έχει μελετηθεί η μεταφορά του γονιδίου S100A1, το οποίο είναι μια ασβεστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη με πιθανή ινóτροπη δράση και ανευρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στον ισχαιμικό ιστό.^{55,56} Μετά από μελέτες διαπιστώθηκε ότι η χορήγησή του μπορεί να βελτιώσει τη συσταλτικότητα, να επαναφέρει τα επίπεδα Ca^{2+} σε φυσιολογικά όρια και να βελτιώσει τη δραστηριότητα του διαύλου SERCA2a. Άρα, ο ρόλος του γονιδίου αυτού μπορεί να είναι θεραπευτικός.

Τέλος, σημαντικός στη θεραπευτική προσπάθεια είναι και ο ρόλος της δέσμευσης της φωσφολαμπάνης (phospholamban) με γονιδιακές τεχνικές. Η φωσφολαμπάνη παρεμποδίζει τη δραστηριότητα του SERCA2a, άρα η δέσμευσή της αναμένεται να έχει υποβοηθητική δράση για το μυοκάρδιο. Μελέτες έχουν διεξαχθεί σε πειραματικά μοντέλα με ζώα⁵⁷ και σε κύτταρα από ανθρώπους που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου.⁵⁸ Στα ανθρώπινα αυτά κύτταρα χορηγήθηκε το προϊόν προσθήκης "antisense phospholamban" σε αδενοϊό, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της συσταλτικότητας. Τα επίπεδα φωσφολαμπάνης μειώθηκαν μετά από 48 ώρες, βελτιώνοντας τη δραστηριότητα του μυοκαρδιακού κυττάρου.

5.4. Αντιαποπρωτική δράση του Bcl-2

Ένας άλλος θεραπευτικός στόχος είναι να καταστούν τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα πιο ανθεκτικά στην απόπτωση. Έχει αποδειχθεί ότι η μεταφορά Bcl-2, Akt ή ενεργοποιημένων γονιδίων κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3' (PI-3 kinase genes) εμποδίζει την απόπτωση σε καρδιομυοκύτταρα. Η πρωτεΐνη του Bcl-2 έχει αντιαποπρωτική δράση και η έκφραση του Bcl-2 σε συνδυασμό με το tp53 εμποδίζει την απόπτωση.⁵⁹ Τα γονίδια της PI-3-kinase και του Akt (πρωτεϊνική κινάση B) χρησιμοποιήθηκαν, γιατί τα προϊόντα τους συμμετέχουν στο αντιαποπρωτικό μονοπάτι που αρχίζει με τη δράση του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (insulin-like growth factor-1).^{60,61}

Η επαναγγείωση οδηγεί σε αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση (down regulation) του αντιαποπρωτικού Bcl-2. Αντίθετα, επαναλαμβανόμενη ισχαιμία προκαλεί θετική παλίνδρομη ρύθμιση (up regulation). Έτσι, διαπιστώνεται ότι ο ρόλος του αντιαποπρωτικού γονιδίου Bcl-2 είναι προστατευτικός για το μυοκαρδιακό ιστό.

5.5. β-αδρενεργική δραστηριότητα και ο ρόλος του βARK

5.5.1. Δραστηριότητα του βARK. Οι σημαντικότερες

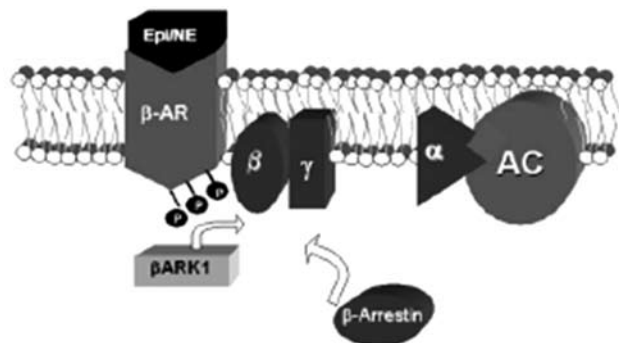
δράσεις του β-αδρενεργικού υποδοχέα είναι η ρύθμιση του καρδιακού ρυθμού και της συσταλτικότητας ως απάντηση στις κατεχολαμίνες. Οι μυοκαρδιακοί βARs (β-adrenergic receptors) είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι τόσο στους κόλπους όσο και στις κοιλίες της καρδιάς.⁶² Υπάρχουν οι υπότυποι β1, β2, β3, η αναλογία των οποίων είναι β1AR:β2AR=4:1.⁶³

Οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των G-πρωτεϊνικών υποδοχέων 7 διαβάσεων. Η σύνδεση μιας κατεχολαμίνης στο διαμεμβρανικό υποδοχέα οδηγεί στο διαχωρισμό του ετεροτριμερούς υποδοχέα στις υπομονάδες του G_α και $G_{\beta\gamma}$.⁶⁴ Η υπομονάδα α ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα την παραγωγή cAMP, το οποίο ελέγχει τα κανάλια ιόντων και ασκεί θετική ινóτροπο και χρονότροπο δράση (εικ. 5).⁶⁵

Όμως, ο υποδοχέας δεν μπορεί να μένει μόνιμα ενεργοποιημένος. Η απευαισθητοποίησή του συντελείται από μια οικογένεια κινάσεων σερίνης/θρεονίνης, που είναι γνωστές ως GPCR κινάσες (GRKs)⁶⁶ και αποτελούν ένζυμα πολύ μεγάλης εκλεκτικότητας. Οι μυοκαρδιακοί υπότυποι είναι οι GRK2, GRK3 και GRK5 και αναγνωρίζουν και φωσφορυλιώνουν μόνο υποδοχείς που έχουν συνδεθεί με κατεχολαμίνη.⁶⁷ Ειδικά, οι GRK2 και GRK3 έχουν την ονομασία βARK1 και βARK2, αντίστοιχα. Απευαισθητοποίηση μπορεί να γίνει ακόμα μέσω της β-αρρεστίνης.⁶⁸

5.5.2. Αλλαγές στην καρδιακή ανεπάρκεια. Έχει παρατηρηθεί ότι στην καρδιακή ανεπάρκεια η πυκνότητα και η ευαισθησία των β-αδρενεργικών υποδοχέων είναι μειωμένη.⁶⁹ Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η βARK1 είναι αυξημένη σε ανάλογες περιπτώσεις, γεγονός που υποδεικνύει έναν προφανή μηχανισμό για την παρατηρούμενη απευαισθητοποίηση των υποδοχέων. Ακόμα, η ισχαιμία του μυοκαρδίου και η υπέρταση (αιτία της καρδιακής ανεπάρκειας) σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα βARK1.^{70,71}

Αυξημένα επίπεδα βARK1 αποτελούν πρώιμο δείκτη



Εικόνα 5. Ο β-αδρενεργικός υποδοχέας και οι υπομονάδες του.

μυοκαρδιακής βλάβης, που αναμένεται να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια. Αυτό γίνεται φανερό και στους κλινικούς ιατρούς. Οι β-αδρενεργικοί αγωνιστές –συμπεριλαμβανομένης της επινεφρίνης και της νορεπινεφρίνης– είναι φάρμακα πρώτης γραμμής για οξείες καταστάσεις, αυξάνοντας το μεταφορτίο. Όμως, σε χρόνια χορήγηση το καρδιακό έργο μειώνεται δραματικά παρά τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής. Η απευαισθητοποίηση του συστήματος των β-αδρενεργικών υποδοχέων από το βARK1 εξηγεί το ανωτέρω φαινόμενο. Και πράγματι, τα ινóτροπα οδηγούν σε μειωμένη επιβίωση.⁷²

5.5.3. Δέσμευση της δράσης του βARK1 μέσω γονιδιακής θεραπείας. Θεωρώντας τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στο β-αδρενεργικό σύστημα κατά την καρδιακή ανεπάρκεια, είναι εμφανές ότι:

- Αύξηση της μυοκαρδιακής βARK1 μειώνει τη μυοκαρδιακή ικανότητα
- Δέσμευση της βARK1 από το βARKct ενισχύει την ινóτροπη απαντητικότητα.

Άρα, η δέσμευση του βARK1 από το βARKct μπορεί να συνδυαστεί με τη δέσμευση του βAR με β-αποκλειστές, καθώς η δράση τους είναι συνεργική, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του βARK1 και έτσι τον περιορισμό της παθολογικής β-αδρενεργικής απευαισθητοποίησης. Συνεπώς, όταν η καρδιά χρειαστεί ενίσχυση με ινóτροπα, αυτά θα μπορούν να χορηγηθούν και να δράσουν.^{73,74}

6. ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

Λαμβάνοντας υπόψη και την απονομή του βραβείου Nobel το 2006 στους Andrew Fire και Craig Mello για τη μελέτη τους σχετικά με την παρεμβολή RNA (RNA interference), είναι φανερό ότι οι μελλοντικοί στόχοι βρίσκονται σε αυτό το επίπεδο. Η συγκεκριμένη τεχνολογία είναι η πλέον δημοφιλής τεχνική λειτουργικής γονιδιωματικής και υπόσχεται πολλά για τη θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων στο μέλλον.⁷⁵

Η ανακάλυψη ότι το RNA μπορεί να δράσει ως καταλύτης έδωσε –στη δεκαετία του 1990– νέες προοπτικές στην έρευνα, οπότε και ανακαλύφθηκε ότι είναι σε θέση να καταλύει το διπλασιασμό του και τη σύνθεση άλλων μορίων RNA.

6.1. Ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα

Ένας μεγάλος αριθμός μορίων RNA δρα σε συνδυασμό με πρωτεΐνες σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (RNP complex). Υπάρχουν αλληλουχίες RNA που επηρεάζουν

τη μεταγραφή, τη μετάφραση, την αντιγραφή και τη χρωμοσωμική δομή. Ακόμα, άλλα σύμπλοκα ρυθμίζουν την επεξεργασία RNA και την παραγωγή RNA. Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά αυτά σύμπλοκα έχουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον.

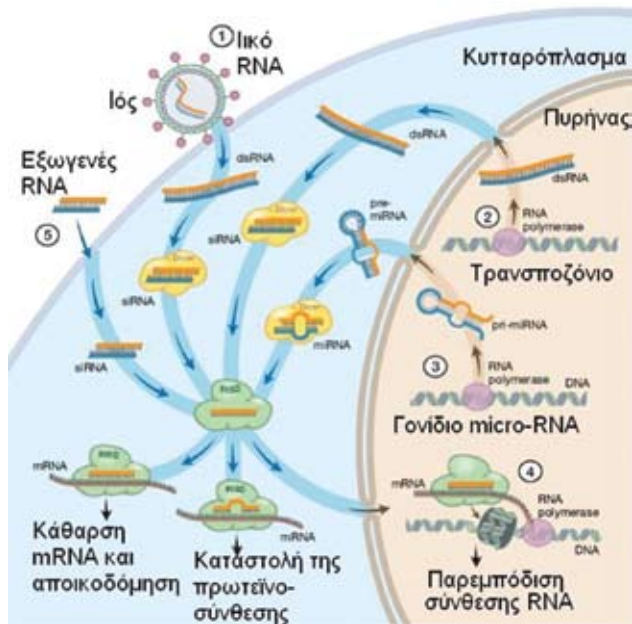
Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι αλληλουχίες RNA με θετική ή ακόμα και αντίθετη φορά μπορούσαν να προκαλέσουν σίγαση ορισμένων γονιδίων, αλλά όχι κατ' απόλυτο τρόπο. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε παρεμβολή RNA (iRNA, RNA interference). Το αποτέλεσμα είναι καλύτερο όταν γίνεται χρήση δίκλωνου μορίου RNA και αξίζει να σημειωθούν τα παρακάτω:

- Η σίγαση αρχίζει όταν γίνεται ένωση dsRNA (double-stranded RNA), αλλά επιτελείται σε μικρότερο βαθμό και με χορήγηση μονόκλωνου θετικής ή αντίθετης φοράς
- Η σίγαση είναι ειδική για mRNA που ήταν ομόλογο προς το χορηγούμενο dsRNA και δεν επηρεάζει άλλα mRNA
- Το dsRNA αλληλεπιδρά μόνο με ώριμο mRNA και όχι με εσόνια ούτε με αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε εκκινητές. Αυτό δείχνει ότι η διαδικασία της παρεμβολής γίνεται μετά τη μεταγραφή και πιθανότατα στο κυτταρόπλασμα
- Το mRNA-στόχος αποικοδομείται
- Μόνο λίγα μόρια dsRNA απαιτούνται για τη σίγαση του γονιδίου σε ένα μοναδικό κύτταρο. Άρα, η δράση είναι τύπου καταλύτη και όχι στοιχειομετρική
- Το dsRNA μπορεί να διασπαρεί στους ιστούς και να επεκταθεί και σε άλλα κύτταρα.

6.2. Η σημασία του RNAi

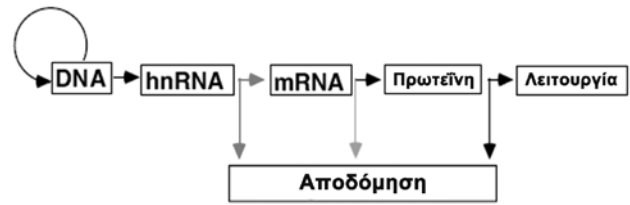
Από την αρχή έγινε αντιληπτή η σημασία της ανακάλυψης του RNAi, αρκεί βέβαια να ληφθούν υπόψη τα ακόλουθα (εικόνες 6, 7):

- Το RNAi δρα προστατευτικά εναντίον ιογενών λοιμώξεων, καθώς τμήματα dsRNA μπορούν να αντιμετωπίσουν μονόκλωνο RNA⁷⁶
- Το RNAi ενισχύει τη σταθερότητα του γονιδιώματος διατηρώντας «σιωπηλά» τα κινητά μέρη, τα τρανσποζόνια⁷⁷
- Μηχανισμοί που σχετίζονται με παρεμβολή RNA μειώνουν τη σύνθεση πρωτεϊνών και ρυθμίζουν το αναπτυξιακό δυναμικό του οργανισμού⁷⁸
- Μηχανισμοί RNAi περιορίζουν τη μεταγραφή, διατηρώντας τη χρωματίνη συμπυκνωμένη⁷⁹



Εικόνα 6. Κυτταρικές διεργασίες που στηρίζονται στο RNAi. Τα σύμπλοκα Dicer και RISC παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καταστροφή ιικού RNA που εισβάλλει στο κύτταρο (1), την εξάλειψη των μεταγράφων των κινητών στοιχείων (τρανσποζόνια) και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA (2), την παρεμπόδιση πρωτεϊνοσύνθεσης από μικρά RNAs που παράγονται εντός του κυττάρου (3) και τη μεσολαβούμενη από RNAi καταστολή της μεταγραφής (4). Το μηχανισμό αυτόν εκμεταλλευόμαστε και σε πειραματικές διαδικασίες, όπου siRNA εισάγεται σε κύτταρα για να εμποδίσει τη δράση ορισμένων γονιδίων (5). Το σχήμα των Dicer και RISC ποικίλλει (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 – Karolinska Institute).

- Το RNAi χρησιμοποιείται πειραματικά, για να γίνει καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων με πολύ μεγάλη ειδικότητα. Η πρακτική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε μέσω της καταστολής ορισμένων γονιδίων να διαπιστωθεί ο λειτουργικός τους ρόλος⁸⁰
- Το RNAi θα έχει σημαντική θέση στη γονιδιακή θεραπεία. Η δυνατότητα ελέγχου μέσω του RNAi συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων σε διαγονιδιακούς οργανισμούς έχει δημιουργήσει προοπτικές για μελλοντικές θεραπείες και αυτό γιατί πρόκειται για μια μέθοδο παντοδύναμη



Εικόνα 7. Ρόλος του siRNA στην παρεμπόδιση της δράσης του RNA.

και ακριβέστατη.^{81,82} Με τη χρήση δίκλωνου RNA 20–25 βάσεων, που ονομάζεται small interfering RNA (siRNA), αποικοδομούνται τα hnRNA και mRNA στόχου –το mRNA είναι απόν, ενώ το hnRNA μειώνεται σημαντικά, όχι όμως εντελώς– και δεσμεύεται η παραγωγή πρωτεΐνης. Δημιουργείται, λοιπόν, μεταφραστική και μερικές φορές μετα-μεταφραστική «σίγαση» ορισμένων γονιδίων.⁸³ Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της καρδιακής ανεπάρκειας θα μπορούσε να αποτελεί στόχο το γονίδιο της βARK, που –όπως φάνηκε παραπάνω– απαιτείται παρεμπόδιση της λειτουργίας του για να εξασφαλιστεί η λειτουργικότητα και η βιωσιμότητα του μυοκαρδίου.

7. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η μελέτη του γονιδιώματος του ασθενούς θα είναι στο μέλλον πρωταρχικής σημασίας, καθώς θα οδηγήσει στη διαλεύκανση της παθογένειας σε γονιδιακό επίπεδο της καρδιακής ανεπάρκειας και θα συμβάλει στην αντιμετώπισή της με θεραπείες που θα στοχεύουν όχι μόνο στο κύτταρο-στόχο, αλλά και στο εσωτερικό του μυοκαρδιακού κυττάρου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε για τη βοήθειά τους στη συγγραφή της βιβλιογραφικής ανασκόπησης την Α. Σκούρα («αλγόριθμοι για την ανακάλυψη νέων γονιδιακών στόχων»), το Θ. Κολοκοτρώνη και τον Ε. Κωλέτση.

ABSTRACT

Pharmacogenomics and gene therapy in heart failure

D. LYKOURAS, D. DOUGENIS

Department of Cardiothoracic Surgery, University Hospital of Patras, Rio-Patras, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(4):439–453

Heart failure is one of the most important medical states and is a major cause of morbidity and mortality in developed countries. It is not considered to be a disease itself, but the consequence of coexisting factors such as arterial hypertension, coronary heart disease and myocardopathies. The quality of life is affected more than in any other

disease and the cost of managing heart failure is high, so careful study and efforts to make patients feel better are of undoubted value. The therapeutic agents in use are numerous and are effective in curing most symptoms, but the mortality rates remain high, so new possibilities need to be studied. The role of pharmacogenomics is to find genetic variations in the genes of each patient, in order to develop new drugs suitable for the individual profile of the patient. The use of computers and special algorithms, such as differential gene expression profiling (DGE), expressed gene Databases, etc., will allow the discovery of gene targets for future therapies. Gene therapy is the technique that inserts a desirable allele into a cell, either because the cell does not have this allele or because the quantity of the produced protein is decreased. The steps that must be followed are: isolation of the target gene, development of an appropriate vector for gene transfer, identification of the target cell, *in vivo* gene delivery and identification of potential therapeutic targets. The targets for gene therapy are: vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), superoxide dismutase (SOD), heme-oxygenase gene (HO-1) and antiapoptotic gene Bcl-2. The blockage of β ARK kinases is also studied, because it will reduce the desensitization of adrenergic action that is seen in ischemic myocardial tissue. The hope lies the future in the power of RNA interference, which is going to allow the selective degeneration of proteins that are harmful for the cell, so as to help the myocardial cell to cope with the myocardial needs.

Key words: Gene therapy, Heart failure, Pharmacogenomics

The authors do not have any conflict of interest.

Βιβλιογραφία

1. McMURRAY JJ, STEWART S. Epidemiology, etiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 2000, 83:596–602
2. COWIE MR, WOOD DA, COATS AJ, THOMPSON SG, SURESH V, POOLE-WILSON PA ET AL. Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: A population-based study. *Heart* 2000, 83:505–510
3. STEWART AL, GREENFIELD S, HAYS RD, WELLS K, ROGERS WH, BERRY SD ET AL. Functional status and well-being of patients with chronic conditions. Results from the medical outcomes study. *JAMA* 1989, 262:907–913
4. ULRICH P, CERAMI A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001, 56:1–21
5. VASAN S, ZHANG X, ZHANG X, KAPURNIOTU A, BERNHAGEN J, TEICHBERG S ET AL. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 1996, 382:275–278
6. ZILE M, GAASCH W, LITTLE W, FRANCIS G, TAVAZZI L, CLELAND J ET AL. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose comparative study of the efficacy, tolerability, and safety of MCC-135 in subjects with chronic heart failure, NYHA class II/III (MCC-135-GO1 study): Rationale and design. *J Card Fail* 2004, 10:193–199
7. LAZAROU J, POMERANZ BH, COREY PN. Incidence of adverse reactions on hospitalized patients. A meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998, 279:1200–1205
8. MARCH R, CHEESEMAN K, DOHERTY M. Pharmacogenomics – legal, ethical and regulatory considerations. *Pharmacogenomics J* 2001, 1:2317–2327
9. VEENSTRA DL, HIGASHI MK, PHILLIPS KA. Assessing the cost-effectiveness of pharmacogenomics. *AAPS PharmSciTech* 2000, 2:29
10. SHIMKETS RA, LOWE DG, TAI JT, SEHL P, JIN H, YANG R ET AL. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nat Biotechnol* 1999, 17:798–803
11. GENG YJ, ISHIKAWA Y, VATNER DE, WAGNER TE, BISHOP SP, VATNER SF ET AL. Apoptosis of cardiac myocytes in Gs alpha transgenic mice. *Circ Res* 1999, 84:34–42
12. VELCULESCU VE, ZHANG L, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995, 270:484–487
13. DE WAARD V, VAN DEN BERG BM, VEKEN J, SCHULTZ-HEIENBROEK R, PANNEKOEK H, VAN ZONNEVELD AJ. Serial analysis of gene expression to assess the endothelial cell response to an atherogenic stimulus. *Gene* 1999, 226:1–8
14. EWING B, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998, 8:175–185
15. EWING B, HILLIER L, WENDL MC, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998, 8:186–194
16. ROTHBERG BE. The use of animal models in expression pharmacogenomic analysis. *Pharmacogenomics J* 2001, 1:48–58
17. FITZGERALD LW, BURN TC, BROWN BS, PATTERSON JP, CORJAY MH, VALENTINE PA ET AL. Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol Pharmacol* 2000, 57:75–81
18. KASTRUP J. Intramyocardial injection of genes with a novel percutaneous technique: Initial safety data of the Euroinject one study. *Heart Drug* 2001, 1:299–304
19. LAHAM RJ, SIMONS M, SELLEKE F. Gene transfer for angiogenesis in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 2001, 2:485–502
20. SAKODA T, KASAHARA N, HAMAMORI Y, KEDES L. A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J Mol*

- Cell Cardiol* 1999, 31:2037–2047
21. LEHRMAN S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999, 401:517–518
 22. FLUGELMAN MY, JAKLITSCH MT, NEWMAN KD, CASSCELLS W, BRATTHAUER GL, DICHEK DA. Low level *in vivo* gene transfer into the arterial wall through a perforated balloon catheter. *Circulation* 1992, 85:1110–1117
 23. SOEDA S, ODA M, OCHIAI T, SHIMENO H. Deficient release of plasminogen activator inhibitor-1 from astrocytes triggers apoptosis in neuronal cells. *Brain Res* 2001, 91:96–103
 24. SHIMPO M, IKEDA U, MAEDA Y, TAKAHASHI M, MIYASHITA H, MIZUKAMI H ET AL. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* 2002, 53:993–1001
 25. FELGNER PL, TSAI YJ, SUKHU L, WHEELER CJ, MANTHORPE M, MARSHALL J ET AL. Improved cationic lipid formulations for *in vivo* gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 772:126–139
 26. OKUBO S, WILDNER O, SHAH MR, CHELLIAH JC, HESS ML, KUKREJA RC. Gene transfer of heat-shock protein 70 reduces infarct size *in vivo* after ischemia/reperfusion in rabbit heart. *Circulation* 2001, 103:877–881
 27. SOEDA S, ODA M, OCHIAI T, SHIMENO H. Deficient release of plasminogen activator inhibitor-1 from astrocytes triggers apoptosis in neuronal cells. *Brain Res* 2001, 91:96–103
 28. NOBORI K, ITO H, TAMAMORI-ADACHI M, ADACHI S, ONO Y, KAWAUCHI J ET AL. ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: A novel cardioprotective role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol* 2002, 34:1387–1397
 29. CORRENTE G, GUARDAVACCARO D, TIRONE F. PC3 potentiates NGF-induced differentiation and protects neurons from apoptosis. *Neuroreport* 2002, 13:417–422
 30. CURRIE RW. Effect of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat-shock) proteins in isolated and perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1987, 19:795–808
 31. DAS DK, MAULIK N, MORARU II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995, 27:181–193
 32. HSU JC, BRAVO R, TAUB R. Interaction among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol Cell Biol* 1992, 12:4654–4665
 33. FORTUIN FD, VALE P, LOSORDO DW, SYMES J, DeLARIA GA, TYNER JJ ET AL. One year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid DNA by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* 2003, 92:436–439
 34. KWAAN HC, WANG J, SVOBODA K, DECLERCK PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumor growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer* 2000, 82:1702–1709
 35. HOLLANDER MC, SHEIKH MS, BULAVIN DV, LUNDGREN K, AUGERIHENMUELLER L, SHEHEE R ET AL. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 1999, 23:176–184
 36. SYMES JF. Gene therapy for ischemic heart disease: Therapeutic potential. *Am J Cardiovasc Drugs* 2001, 1:159–166
 37. LOSORDO DW, VALE PR, SYMES JF, DUNNINGTON CH, ESAKOF DD, MAYSKY M ET AL. 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
 38. ROSENGART TK, LEE LY, PATEL SR, SANBORN TA, PARIKH M, BERGMAN GW ET AL. Angiogenesis gene therapy: Phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999, 100:468–474
 39. SYMES JF, LOSORDO DW, VALE PR, LATHI KG, ESAKOF DD, MAYSKY M ET AL. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999, 68:830–837
 40. VALE PR, LOSORDO DW, MILLIKEN CE, MAYSKY M, ESAKOF DD, SYMES JF ET AL. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF165 gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000, 102:965–974
 41. VALE PR, LOSORDO DW, MILLIKEN CE, McDONALD MC, GRAVELIN LM, CURRY CM ET AL. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001, 103:2138–2143
 42. MELO LG, AGRAWAL R, ZHANG L, REZVANI M, MANGI AA, EHSAN A ET AL. Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation* 2002, 105:602–607
 43. SIMONS M, ANNEX BH, LAHAM RJ, KLEIMAN N, HENRY T, DAUERMAN H ET AL. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: Double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002, 105:788–793
 44. UNGER EF, GONCALVES L, EPSTEIN SE, CHEW EY, TRAPNELL CB, CANNON RO 3rd ET AL. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2000, 85:1414–1419
 45. GRINES CL, WATKINS MW, HELMER G, PENNY W, BRINKER J, MARMUR JD ET AL. Angiogenic gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina. *Circulation* 2002, 105:1291–1297
 46. GRINES CL, WATKINS MW, MAHMARIAN JJ, ISKANDRIAN AE, RADE JJ, MARROTT P ET AL. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003, 42:1339–1347
 47. LI Q, BOLLI R, QIU Y, TANG XL, MURPHREE SS, FRENCH BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation* 1998, 98:1438–1448
 48. KARLSSON K, MARKLUND S. Heparin-, dextran sulfate-, and protamine-induced release of extracellular-superoxide dismutase to plasma in pigs. *Biochim Biophys Acta* 1988, 967:110–114
 49. MELO LG, AGRAWAL R, ZHANG L, REZVANI M, MANGI AA, EHSAN A ET AL. Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation* 2002, 105:602–607

50. PLATT JL, NATH KA. Heme oxygenase: Protective gene or Trojan horse. *Nat Med* 1998, 4:1364–1365
51. PHILLIPS MI, TANG Y, SCHMIDT-OTT K, QIAN K, KAGIYAMA S. Vigilant vector: Heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension* 2002, 39:651–655
52. TANG YL, TANG Y, ZHANG YC, QIAN K, SHEN L, PHILLIPS MI. Protection from ischemic heart injury by a vigilant heme oxygenase-1 plasmid system. *Hypertension* 2004, 43:746–751
53. MIYAMOTO MI, DEL MONTE F, SCHMIDT U, DISALVO TS, KANG ZB, MATSUIT ET AL. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:793–798
54. DEL MONTE F, WILLIAMS E, LEBECHE D, SCHMIDT U, ROSENZWEIG A, GWATHMEY JK ET AL. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 2001, 104:1424–1429
55. REMPPIS A, GRETEN T, SCHÄFER BW, HUNZIKER P, ERNE P, KATUS HA ET AL. Altered expression of the Ca²⁺-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1313:253–257
56. MOST P, PLEGER ST, VÖLKERS M, HEIDT B, BOERRIES M, WEICHENHAN D ET AL. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest* 2004, 114:1550–1563
57. ZIOLO MT, MARTIN JL, BOSSUYT J, BERS DM, POGWIZD SM. Adenoviral gene transfer of mutant phospholamban rescues contractile dysfunction in failing rabbit myocytes with relatively preserved SERCA function. *Circ Res* 2005, 96:815–817
58. DEL MONTE F, HARDING SE, DEC GW, GWATHMEY JK, HAJJAR RJ. Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation* 2002, 105:904–907
59. KIRSHENBAUM LA, DE MOISSAC D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997, 96:1580–1585
60. MATSUIT, LI L, DEL MONTE F, FUKUI Y, FRANKE TF, HAJJAR RJ ET AL. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes *in vitro*. *Circulation* 1999, 100:2373–2379
61. FUJIO Y, NGUYEN T, WENCKER D, KITSIS RN, WALSH K. Akt promotes survival of cardiomyocytes *in vitro* and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000, 101:660–667
62. AHLQUIST RP. A study of the adrenergic receptors. *Am J Physiol* 1948, 153:586–600
63. BRODDE OE. β -adrenoreceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 1993, 60:405–430
64. DOHLMAN HG, THORNER J, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 1991, 60:653–688
65. HARTZELL HC. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog Biophys Mol Biol* 1988, 52:165–247
66. HAUSDORFF WP, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Turning off the signal: Desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* 1990, 4:2881–2889
67. BENOVIC JL, DeBLASI A, STONE WC, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. β -adrenergic receptor kinase: Primary structure delineates a multigene family. *Science* 1989, 246:235–240
68. LOHSE MJ, BENOVIC JL, CODINA J, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* 1990, 248:1547–1550
69. BRISTOW MR, GINSBURG R, MINOBE W, CUBICCIOTTI RS, SAGEMAN WS, LURIE K ET AL. Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982, 307:205–211
70. UNGERER M, KESSEBOHM K, KRONSBEN K, LOHSE MJ, RICHARDT G. Activation of β -adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res* 1996, 79:455–460
71. GROS R, BENOVIC JL, TAN CM, FELDMAN RD. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest* 1997, 99:2087–2093
72. PACKER M. The development of positive inotropic agents for chronic heart failure: How have we gone astray? *J Am Coll Cardiol* 1993, 22(Suppl A):119A–126A
73. LEFKOWITZ RJ, ROCKMAN HA, KOCH WJ. Catecholamines, cardiac β -adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation* 2000, 101:1634–1637
74. ILACCARINO G, TOMHAVE ED, LEFKOWITZ RJ, KOCH WJ. Reciprocal *in vivo* regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 1998, 98:1783–1989
75. MORRIS KV, CHAN SW, JACOBSEN SE, LOONEY DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004, 305:1289–1292
76. COVEY S. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 1997, 385:781–782
77. KETTING RF, HAVERKAMP TH, VAN LUENEN HG, PLASTERK RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNAase D. *Cell* 1999, 99:133–141
78. REINHART BJ, WEINSTEIN EG, RHOADES MW, BARTEL B, BARTEL DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 2002, 16:1616–1626
79. METTE MF, AUFSATZ W, VAN DER WINDEN J, MATZKE MA, MATZKE AJ. Transcriptional gene silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA. *EMBO J* 2000, 19:5194–5201
80. SIJEN T, VIJN I, REBOCHO A, VAN BLOKLAND R, ROELOFS D, MOL JN ET AL. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 2001, 11:436–440
81. DORSETT Y, TUSCHL T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev* 2004, 3:318–329
82. HANNON GJ, ROSE JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004, 431:371–378
83. HAMILTON AJ, BAULCOMBE DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999, 286:950–952

Corresponding author:

D. Dougenis, Department of Cardiothoracic Surgery, University of Patras, GR-265 00 Rio Achaia, Greece
 e-mail: ddougenis@med.upatras.gr

