

12. Goldstein J.C., C Muñoz-Pinedo, J-E Ricci, S R Adams, A Kelekar, Schuler, R Y Tsien and D R Green - *Cell Death and Differentiation*, 12, 453–462, [2005].
13. Sauviat M.P., Pages N. - *J.Soc.Biol.*;196(4):339-48. [2002].
14. Kroemer G. - *Biochemical & Biophysical Res. Communic.*, Vol.304:433-435, [2003].

## TERAPIA GENICĂ ÎN PATOLOGIIILE CORDULUI

**Mihail Taşnic**

(Cond. şt. – dr., conf. universitar, I. Cemortan)

Catedra Biologie Moleculară şi Genetică Umană USMF „Nicolae Testemiţanu”

### Summary

#### Gene therapy of heart diseases

Gene therapy offers large possibilities in heart diseases treatment: coronarian disease, congestive heart insufficiency, cardiomyopathy, and arrhythmias. Expression of therapeutic genes in target tissues assures angiogenesis, calcium intracellular homeostasis, apoptosis preventing and heart contractility genes modulation. Implementation of the gene therapy needs to resolve the following problems: selection of therapeutical genes, vectors and methods of their delivery.

#### Rezumat

Terapia genică oferă posibilităţi vaste în tratamentul patologiilor cardiace cum ar fi boala coronariană, insuficienţă cardiacă congestivă, cardiomiopatii, disritmii etc. Expresia genelor terapeutice în regiunile tisulare ţintă asigură angiogeneza terapeutică, homeostazia intracelulară a ionilor de calciu, preîntâmpinarea apoptozei şi modularea genelor ce controlează ritmul celular. Implementarea terapiei genice necesită soluţionarea problemelor legate de alegerea genelor terapeutice, vectorului, modului de introducere a vectorului în ţesutul ţintă etc.

#### Actualitatea temei

Patologiile cardiovasculare deţin locul întâi în rândul bolilor cu cea mai mare rată de morbiditate şi mortalitate mondială. Progresul tehnico-ştiinţific în domeniul terapiei genice oferă perspective largi în tratamentul, iar în unele cazuri şi profilaxia multor patologii cardiace precum: boala coronariană, insuficienţă cardiacă congestivă, cardiomiopatii, disritmii etc.

Implementarea terapiei genice în tratamentul pacienţilor cardiaci minimizează intervenţiile traumatice la nivelul cordului reducând complicaţiile postoperatorii şi tratând pacienţii la nivel molecular prin intermediul produşilor elaboraţi de propriile celule, activate prin modularea genică.

#### Obiectivele lucrării

Scopul actualului studiu este analiza datelor bibliografice recente privind succesele în domeniul tratamentului genic al afecţiunilor cordului de diversă geneză.

#### Rezultate şi discuţii

După o perioadă lungă de studii experimentale preclinice, terapia genică permite modularea genică la pacienţii cu diverse patologii ischemice, nereceptive la metodele terapeutice medicamentoase [6] şi a celor la care angiogeneza fiziologică este compromisă (vârsta înaintată, hipercolesterolemia, diabetul zaharat, disfuncţii endoteliale) [3]. Terapia genică a miocardului poate veni în ajutorul ameliorării stării pacienţilor cu boală coronariană, insuficienţă cardiacă congestivă sau disritmii greu tratabile. Un interes deosebit prezintă profilaxia genică a complicaţiilor stentingului coronarian [7, 8].

Terapia genică presupune transferul genelor de interes prin intermediul unor vectori specifici în regiunile tisulare cu expresie genică anormală. Odată pătruns în celula ţintă, vectorul trece în nucleu, asigurând integrarea „genelor terapeutice” în genomul gazdei urmată de expresia acestora.

Obiectivele terapiei genice sunt: substituirea unei gene defecte, introducerea în genom a unei secvențe nucleotidice absente, intensificarea producerii unei anumite proteine care ar avea efect terapeutic etc. [1].

Terapia genică necesită soluționarea următoarelor probleme: alegerea genelor terapeutice, alegerea vectorului potrivit, modul optim de introducere a vectorului în țesutul țintă, cantitatea necesară de vectori și gene, determinarea posibilităților reacții adverse etc. [1].

### **Mecanismele tratamentului genic al afecțiunilor miocardului**

Alegerea tacticii terapiei genice în tratarea afecțiunilor cordului depinde de etiologia acestora. În cazul patologiilor ischemice a miocardului, sarcina de bază a tratamentului genic este revascularizarea regiunilor ischemiate prin accelerarea neoformării vaselor colaterale (angiogeneza terapeutică).

Tratamentul genic al insuficienței cardiace congestive se axează pe trei direcții: modularea homeostaziei intracelulare a calciului; modularea activității receptorilor  $\beta$ -adrenergici și sporirea rezistenței cardiomiocitelor la apoptoză [1].

Disritmiile cardiace pot fi controlate transducând genele care controlează ritmul cordului în regiunile afectate [8].

**Patologiile ischemice ale cordului.** Deși hipoxia cronică a miocardului, deschide vasele colaterale nefuncționante anterior, acestea nu pot compensa în măsură deplină segmentul subepicardial stenozat de vas [2].

În condițiile hipoxiei acute angiogeneza dă naștere celulelor vasculare noi doar peste 24 de ore, timp în care cardiomiocitele se necrotizează. Sarcina majoră a angiogenezei terapeutice este accelerarea procesului de neoformare a vaselor colaterale. Aceasta ar restabili fluxul sangvin coronarian spre regiunile ischemiate de miocard și ar permite pătrunderea prin intermediul circulației sangvine restabilite a remediilor medicamentoase utilizate în tratamentul patologiilor în cauză [4].

Angiogeneza terapeutică a miocardului presupune inserarea genelor ce codifică factorii de creștere a rețelei vasculare (FGF, VEGF) în celulele regiunilor ischemiate [2]. Pătrunderea genelor respective în celulele țintă permite expresia lor, care la rândul său se manifestă prin sinteza factorilor de creștere ceea ce stimulează neoformarea vaselor sangvine. Utilizarea factorilor de creștere în calitate de remedii terapeutice necesită verificarea toxicității acestora, gradului de acțiune sistemică, efectului tumorigen [2].

Ideea precum că factorii angiogenici de creștere pot stimula revascularizarea țesutului ischemiat, a fost pentru prima dată verificată la pacienții cu ischemia periferică. Transferul genelor factorului endotelial de creștere (VEGF) a îmbunătățit starea pacienților înlăturând durerile de repaus și a vindecat ulcerele trofice. Pe angiografia realizată după tratament s-a depistat o rețea de vase colaterale noi, ceea ce dovedește eficiența angiogenezei terapeutice. Luând în considerație rezultatele obținute s-a trecut la a doua etapă de implementare a terapiei genice în tratarea pacienților cu patologii ischemice ale cordului [1].

Creșterea colateralelor este o combinație a schimbărilor endoteliale, proliferării celulelor musculare netede și remodelarea țesutului conjunctiv, deci factorii de creștere trebuie să aibă capacitatea să influențeze direct sau indirect o varietate largă de celule țintă: endoteliale, fibroblaști și celule musculare netede etc. [4].

Angiogeneza începe cu desprinderea de la capilarele preexistente, proliferarea și migrarea celulelor endoteliale, care are ca rezultat formarea unei rețele vasculare noi. Vasele neoformate se pot dezorganiza atât timp cât nu sunt completate cu pericite. Procesul este reglat de stimulatorii și inhibitorii angiogenezei [4].

**Insuficiența cardiacă congestivă.** Menținerea homeostaziei intracelulare a ionilor de calciu. Reducerea expresiei  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-zei reticulului sarcoplasmatic ( $\text{SERCa}^{2+}$ ) perturbă contractilitatea miocardului. Terapia genică a IC congestive presupune supraexpresia  $\text{SERCa}^{2+}$ , care conform experiențelor realizate pe animalele de laborator restabilește funcția sistolică și cea diastolică a cordului, și diminuează concentrația citosolică a ionilor de calciu. În rezultat se evită activarea cascadei de reacții ce ar induce hipertrofia miocardului și/sau moartea celulară.

Homeostazia calciului se poate menține și prin inhibarea expresiei *fosfolambanului* – inhibitorul pompei de calciu din reticulul sarcoplasmatic, în rezultat crește activitatea  $SERCa^{2+}$  [1].

*Sporirea rezistenței cardiomiocitelor la apoptoză.* Studiile efectuate au arătat efectul terapeutic benefic al transducerii genelor Bcl-2 și Akt în prolongarea rezistenței cardiomiocitelor la hipoxie. Expresia acestora blochează apoptoza indusă de p53 și hipoxie [1].

*Modularea activității receptorilor  $\beta$ -adrenergici.* Adenilatciclaza este una dintre enzimele cheie în semnalizarea transmembranară. Studiile au arătat că adenilatciclaza joacă un rol important în activitatea receptorilor  $\beta$ -adrenergici. Ultimele date demonstrează că în cazul cardiomiopatiilor supraexpresia izoformei VI ai adenilatciclazei crește răspunsul miocardului la stimularea  $\beta$ -adrenoreceptorilor. Efectul respectiv se bazează pe creșterea concentrației intracelulare a AMPc ceea ce s-a dovedit a fi suficient pentru a ameliora funcția cardiacă și a micșora dimensiunile cordului. Avantajul creșterii AMPc pe seama expresiei genelor transduse este lipsa activării proteinei G și lipsa influenței asupra numărului  $\beta$ -adrenoreceptorilor [5].

### **Alegerea vectorului**

Alegerea vectorului în terapia genică a miocardului este o problemă de soluționarea căreia depinde eficiența tratamentului, modul și calea de administrare a genelor de interes, acțiunea sistemică sau locală a produsului de expresie genică precum și posibilele reacții adverse [1].

Alegerea vectorului depinde și de nivelul de acțiune a proteinelor codificate de genele terapeutice. Astfel genele care codifică proteinele a căror activitate se realizează exclusiv intracelular trebuie transduse unui număr mare de celule țintă pentru a obține efectul dorit, iar genele care codifică proteinele cu acțiune extracelulară, pot fi transduse într-un număr redus de celule, la nivel tisular produsul expresiei acestora va stimula în masă populația celulară ce posedă receptori specifici [1].

Tratamentul genic al miocardului este favorizat de particularitățile histologice a țesutului muscular striat. S-a demonstrat că țesutul muscular în special cel ischemiat este foarte receptiv la ADN-ul plasmidic. Celula musculară striată este plurinucleată, deci vectorii au mai multe ținte la nivelul unei singure celule, transformarea genetică doar a unui nucleu va avea acțiune terapeutică.

În terapia genică a afecțiunilor cardiace se folosesc vectori virali (adenovirusi, retrovirusi, virusi adenoasociați, lentivirusi) și nonvirali (plasmide, liposomi, celule izolate transfectate) [1].

**Vectorii virali.** Adenovirusii posedă un potențial pronunțat de transducție pentru majoritatea celulelor [5]. Obținerea adenovirusilor este relativ simplă, însă utilizarea lor în calitate de vectori ar putea avea unele efecte secundare [1,5]. Printre particularitățile care defavorizează adenovirusii este efectul scurt al expresiei genice datorită distrugerii rapide a vectorilor de forțele imune ale organismului, este posibilă apariția miocarditei [5].

O alternativă ar fi folosirea vectorilor non-adenovirali. Rezultate pozitive au fost obținute pe animalele de laborator cu utilizarea în calitate de vectori a virusilor adenoasociați și a lentivirusilor (derivați ai virusului HIV) [5]. Transferul genelor utilizând acești vectori a accelerat revascularizarea miocardului compromis fără a provoca miocardita. Virusii adenoasociați și lentivirusii, pot infecta atât celulele proliferante cât și cele cu un potențial proliferativ diminuat [5], se caracterizează printr-o imunogenitate scăzută și posibilitate minimă de mutagenză la integrarea în genomul uman.

Dezavantajele virusilor adenoasociați și a lentivirusilor este lungimea limitată (până la 4,7 kb) a fragmentului nucleotidic pe care aceștia îl pot transporta; prezența genelor reziduale ai virusului HIV în genomul vectorului [5].

**Utilizarea vectorilor nonvirali.** Datele recente arată că supraexpresia genică de scurtă durată este optimă pentru terapia genică a miocardului, aceasta se obține prin folosirea în calitate de vectori ai terapiei genice a plasmidelor și liposomilor [5]. Principalul avantaj în utilizarea plasmidelor este costul mic de producere al acestora. Printre dezavantaje menționăm gradul înalt de imunogenitate precum și distrugerea rapidă a plasmidelor în organism, ceea ce sporește doza vectorilor utilizați în terapia genică.

O altă formă de vectori folosiți în terapia genică sunt liposomii. Liposomii reprezintă sfere lipidice cu conținut hidrofil în componența căruia se află fragmentul polinucleotidic de interes. Fuzionând cu membrana citoplasmatică a celulei țintă, liposomii „revarsă” conținutul în citoplasma celulară cu integrarea ulterioară a acestuia în genomul celulei gazdă [5].

Ultimele studii au arătat posibilitatea transferului genic prin metoda indirectă. Experiențele pe animale de laborator au permis transferul genic, în regiunile ischemiate ale miocardului, indirect, prin intermediul celulelor transfectate „ex vivo” [1].

În prezent se studiază nu doar vectorii ca entități biologice, dar și factorii fizici exogeni, care ar facilita transportul genelor terapeutice în celulă din locul injectării. Experiențele au arătat că expresia genelor transduse poate crește de 20 de ori, dacă imediat după injectarea preparatului se va aplica în regiunea respectivă o sursă de ultrasunet (1 MHz), care permeabilizează membranele celulare și îmbunătățește preluarea plasmidelor cu ADN-ul recombinat [1].

#### **Modalitățile de transfer a vectorilor recombiinați**

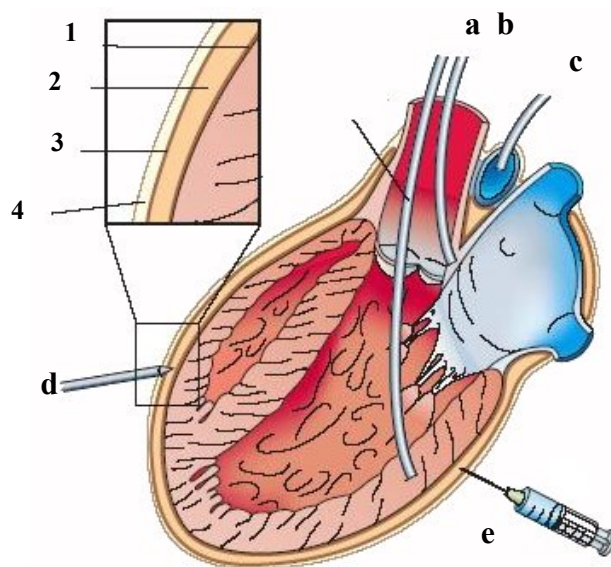
Rezultatele terapiei genice în mare măsură depind de metoda de introducere a vectorilor cu genele de interes în regiunile țintă. Anume de concentrația locală, a vectorilor va depinde viteza angiogenezei induse, timpul necesar restabilirii circulației în sectorul respectiv, cantitatea de gene administrată pacientului, numărul de proceduri și durata tratamentului etc. [1].

Spre soluționarea problemei respective s-au propus mai multe metode sistemice și locale de introducere a genelor de interes în organism.

Introducerea sistemică (intravenoasă) a vectorilor pune problema gradului de distribuție către regiunile ischemiate ale cordului și reținerea lor locală [2]. Aceeași problemă a apărut la introducerea directă a factorilor de creștere în circuitul sangvin. În ultimul caz cantitatea factorilor de creștere care vor ajunge la miocard a fost minimă, deoarece în majoritatea sa ei se cupleză cu globulinele sângelui (spre exemplu FGF cu  $\alpha$ -2-macroglobulina) care se leagă de receptorii celulelor Kupffer determinând acumularea factorilor de creștere în ficat [2].

Rezultate pozitive s-au obținut la introducerea locală a genelor ce codifică factorii de creștere sau a factorilor propriu-ziși. O serie de experiențe au demonstrat capacitatea țesutului muscular striat, inclusiv cardiac de a prelua și a exprima ADN-ul injectat local [4].

Metodele de injectare locală a vectorilor recombiinați sunt (fig. 1) [1]:



**Fig. 1. Variantele de introducere intracardiacă a vectorilor cu genele terapeutice. a – intramiocardial, prin cateter; b – intracoronarian; c – intravenos; d – intrapericardial (1-epicardul; 2 – cavitatea pericardială; 3 – foiața parietală a pericardului; 4 – foiața fibroasă a pericardului); e – intramiocardial, injectabil.**

1. subepicardial. După injecția intraoperatorie a vectorilor, materialul transgenic se distribuie în miocardului adiacent (gradientul de distribuție scade direct proporțional cu distanța de la locul injectării);
2. subendocardial. După injectarea intramiocardială prin intermediul cateterului, materialul transgenic se distribuie similar celui descris anterior;
3. intracoronarian. Injectarea remediilor transgenice direct în lumenul arterelor coronare permite distribuirea vectorilor către porțiunea de miocard și interstițiu vascularizate de artera respectivă. Neajunsul acestei metode este prezența obligatorie a arterelor permeabile sau a bypassului funcțional la pacienții cu ocluzie arterială;
4. retroperfuzia. Metoda se bazează pe canularizarea sinusului coronarian sau a venelor ce se varsă în acesta cu introducerea vectorilor recombinanți, ceea ce permite distribuirea retrogradă a vectorilor cu genele de interes către cardiomiocite și interstițiu;
5. intrapericardial. Accesul transtoracic în cavitatea pericardială permite introducerea intrapericardială a vectorilor respectivi. Aceștia se vor distribui în regiunile miocardului situate subepicardial.

În cazul disritmiilor cardiace tehnica de transfer a genelor ce controlează ritmul cardiac poartă denumirea de „gene painting” - „pictare genică”. Denumirea procedurii în cauză provine din modalitatea transducerii genelor în cordul afectat. Astfel, în timpul experiențelor realizate asupra animalelor de laborator suferinde de aritmii severe, pe suprafața atriului drept se aplica într-un strat uniform o substanță gelatinoasă, care conținea vectori cu genele HERG-G628S. Pătrunderea vectorilor în regiunea nodului sinoatrial a ameliorat starea animalelor. În rezultat, după 3 săptămâni ritmul cardiac a revenit la normal [8].

#### **Bibliografie**

1. Jeffrey M.I. *Myocardial gene therapy*. Nature, 2002, 415, p. 234-239.
2. Laham R.J., Rezaee M. et al. *Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution*. Drug Metabolism and Disposition, 1999, 27 (7), p. 821-826.
3. Markkanen J.E., Rissanen T.T. et al. *Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart-gene therapy*. Oxford Journals. Medicine. Cardiovascular Research, 65 (3), p. 656-664.
4. Schwary E.R., Speakman T. et al. *Evaluation of the effects of intramiocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation*. J. Am. Coll. Cardiol, 2000, 35, p. 1323-1330.
5. Sesti C., Kloner R. *Gene therapy in congestive heart failure*. Circulation, 2004, 110, p. 242-243.
6. Ylä-Herttuala S., Martin J.F. *Cardiovascular gene therapy*. Lancet, 2000, 355 (9199), p. 213-222.
7. Ylä-Herttuala S., Alitalo K. *Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth*. Nature Medicine, 2003, 9, p. 694-701.
8. [www.hopkinsmedicine.org/Press\\_releases/2004/11\\_07\\_04.html](http://www.hopkinsmedicine.org/Press_releases/2004/11_07_04.html)