

A GÉNTERÁPIA MINT A NEUROPROTEKCIÓ ÚJ LEHETŐSÉGE

GÁL ANIKÓ, NAGY ZOLTÁN

Molekuláris biológiai ismereteink bővülésével a jövőben számos betegség kezelésére ígér új terápiás megoldást a génterápia. Kísérletek folynak az agyi ischaemiás kórképek génterápiás kezelésének elméleti alapjainak kidolgozására is.

A fokális agyi ischaemia centrumában, az ischaemiás magban a károsodást követően hamar kialakul a nekrotikus jellegű sejtpusztulás. Az ezt körülvevő zónában, a penumbrában, a – többnyire apoptotikus jellegű – sejtpusztulás lassabban következik be. Az apoptotikus-nekrotikus kaskád több szinten befolyásolható. Az ezt szabályozó gének módosításával hatékony eredmény remélhető az ischaemiás agykárosodás mérséklésére.

Az agyi vasculáris kórképek génterápiájában kísérletek folytak a subarachnoidalis haemorrhagia után a vasospasmus megelőzésére, a kollaterális erek növekedésének serkentésére, és az atheroscleroticus plakk stabilizációjára, illetve a thrombosis és a restenosis gátlására. Újabb adatok szerint a vírusmediálta transzferek ígéretes megoldást jelenthetnek a neuroprotekción területén is. Biztató kísérletek történtek antiapoptotikus, reperfüziós, pro- és antiinflammatorikus, transzkripciós, növekedési faktor, NOS (nitrogén-oxid-szintáz) és SOD (szuperoxid-diszmutáz), proteáz- és proteázinhibitor gének bevitelével.

génterápia, agyi ischaemia, apoptózis, nekrozis

A molekuláris biológia és a genetika fejlődésével a betegségek patomechanizmusainak feltárása mellett a terápia új lehetőségei is megnyíltak. Egyre több kórkép háttérében ismerik fel a gének, az expresszálandó géntermékek, illetve a szignalizációs útvonalak szerepét.

Számos neurodegeneratív betegségben – például: Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór, egyes mitochondrialis kórképek – részben már feltárták a kialakuló neuronpusztulást eredményező szignalizációs utakat; folyamatosan bővülnek az ismereteink az ischaemiás, hypoxiás eredetű idegszövet-pusztulás molekuláris biológiájával kapcsolatban is. Az apoptotikus és a nekrotikus útvonalak megismerése lehetővé tette a pro-, és antiapoptotikus faktorok alkalmazását (1). Ezzel párhuzamosan a géntechnológia fejlődésével egyre közelebb kerülünk a génterápiás módosításokhoz (2).

A génterápiás lehetőséget nyújthat genetikai, illetve egyéb – anyagcsere-, idegrendszeri stb. – betegségekben, az immunválasz módosításában (például autoimmun betegségek kezelése stb.), illetve a fertőző betegségek elleni immunizálásban (3, 4).

Az első génpótlás – retrovírusvektor használatával – az adozin-dezamináz- (ADA-) hiányra irá-

Gene therapy as a new tool for neuroprotection

Gene therapy is an emerging new strategy for the treatment of several disorders including brain ischaemia.

In the core of the focal brain ischaemia early necrotic cell death occurs, while in the penumbra region cell loss develops more slowly and is mostly apoptosis. By modifying the genes that participate in the apoptotic-necrotic cascade an efficient reduction of the ischaemic brain damage can be achieved.

There are several possible strategies for cerebral vascular gene therapy: prevention of vasospasm after a subarachnoid haemorrhage, stimulation of growth of collateral blood vessels in the ischaemic area as well as stabilisation of atherosclerotic plaques, inhibition of thrombosis, and prevention of restenosis. Recent data suggest that virus-mediated gene transfer may also be applied for neuroprotection.

There have been promising results in gene transfer experiments with various sets of therapeutic genes including antiapoptotic, reperfusion, pro- and antiinflammatory, transcription factor, growth factor, nitric oxide synthase (NOS), superoxide dismutase (SOD), protease and protease inhibitor genes.

gene therapy, brain ischaemia, apoptosis, necrosis

nyult. Klinikai kísérletek folynak cystás fibrosisban, familiáris hypercholesterinaemiában szenvedő betegek kezelésére is. Folyik a génterápiás protokollok kidolgozása a herpeszvírus, a malária, az AIDS, a tuberculosis, a hepatitis elleni immunizálásra. Fertőző ágensekkel szembeni immunválasz DNS-vakcinák alkalmazásával érhető el.

Az agyi károsodások kezelésére a különböző génterápiás eljárások közül a valódi génterápiát (géncsere, gén-replacement) alkalmazzák. E kísérleti eljárásokban a hordozómolekulák (vektorok) között mind a virális – például retro-, adenovírus-konstruktok –, mind a nem virális típusok is megtalálhatóak (például plazmid). A valódi génterápia során célunk a beteg sejtjeiben a normális génexpresszió elérése. Ez a hiányzó vagy elégtelen működésű gén pótlásával, vagy a túlzott aktivitású gén gátlásával érhető el (5). Az in vivo eljárás során a terápiás gént valamilyen vektorhoz kötik és ezt a keringésbe, a liquorba, esetleg az izomszövetbe juttatva viszik be a szervezetbe. Ennél az eljárásnál az eredményesség feltétele, hogy a vektor ismerje fel a célsejteket, és a gént csak ezekben juttassa be (például a vektort egy specifikus liganddal jelölik, amelynek receptora csak a célsejt felszínén található).

Génterápiás vektorok

A hatékony transzfer érdekében vektorokra (hordozómolekulára) van szükség. Típusa alapján megkülönböztethető: plazmid, virális, nem virális vektor. A vírusvektorok használatakor alapkövetelmény, hogy a transzfecció során a vírus szaporodása nélkül legyenek képesek bejuttatni a sejtekbe a terápiás gént (6).

Vírus alapú vektorok

Jelenleg leggyakrabban retro- és adenovírus alapú vektorokat használnak. További lehetőségek a vakcina-, herpesz-, polio- és adenoasszociált vírus alapú vektorok. Újabbak a lentivírus (HIV) alapú, illetve a retro-, és a HIV-vírusok keresztezéséből származó vektorok, ezek kialakítása intenzív fejlesztés tárgya.

Retrovirális vektorok

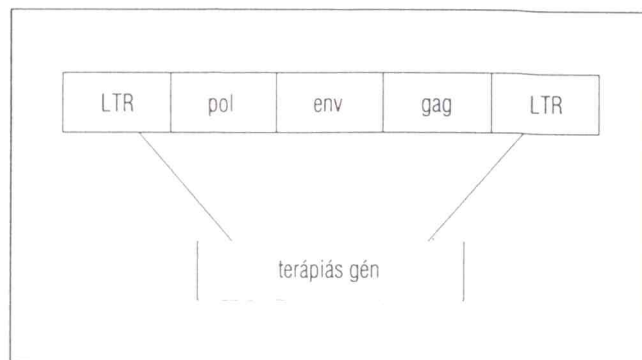
A retrovírusok (1. ábra) 8-10 ezer nukleotid hosszú, diploid RNS-vírusok. A sejtek felszínén található receptorokhoz a vírusburokban lévő fehérjék kötődnek. A bekerülő vírus-RNS-t a *pol* gén által kódolt reverz transzkriptáz kétláncú DNS-sé alakítja át. Az így keletkezett vírus-DNS integrálódik a gazdasejt genomjába.

Retrovirális vektoroknál a módosítás a provírus szintjén történik. A *pol*, *gag*, *env* géneket cserélik a terápiás géntre, majd a vírus-DNS-t transzfeccióval egy csomagoló sejt vonalra. E sejtek egy helper provírus segítségével termelik a *pol*, *gag*, *env* fehérjéket és a rekombináns vírus-RNS-t becsomagolva fertőző vírusokat termelnek. A célsejtekben provírus képződik, ez integrálódik a genomba, és a bevitt gén által kódolt fehérje magas expresszióját idézi elő (7).

Adenovirális vektorok

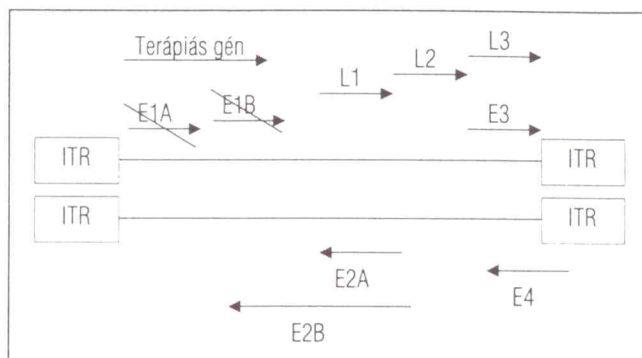
A vírus genomja 36 ezer bázispár hosszú, lineáris kétláncú DNS-ből áll, ezen helyezkednek el a korai és a késői gének. Fertőzéskor a vírus sejt felszíni fehérjékhez kötődve jut be a sejtbe. A sejtet inter- és metafázisban egyaránt képes megfertőzni. A vírus szaporodásához mind a virális, mind a celluláris fehérjék szükségesek. A korai gének (E1A, E1B) expressziója indítja be a késői gének (L1-5) működését (2. ábra). Az E1A, E1B gének hiányában a vírus szaporodásra képtelen.

Az adenovírus alapú vektorok lineáris DNS-ében a korai régió (E1A, E1B) egy részét cserélik ki a terápiás géntre. A vírus előállítása, fenntartása csak speciális E1A-t és E1B-t termelő komplementáló sejt vonalakban lehetséges. A terápiás gént tartalmazó adenovírus-konstruktok a cél-



1. ábra. A retrovíruskonstrukt általános szerkezete

LTR: long terminal repeat; pol: a reverz transzkriptáz kódoló gén; env: a vírus glikoproteidjeit kódoló gén; gag: a vírus magját kódoló gén



2. ábra. Adenovírus-konstrukt általános szerkezete

ITR: inverz terminal repeat; E1-E4: korai gének; L1-L3: késői gének

sejtekbe egy integrin által közvetített endocitózissal jutnak be. Ezután a vírusok kitornek az endoszómákból, és a sejt magban extrakromoszomális DNS-ként expresszálják a terápiás gént, tehát nem integrálódnak a genomba. Az adenovírus alapú vektorok előnye, hogy a retrovírusokkal szemben nagyobb határfokkal fertőzik meg a sejteket. Az integrálódás hiányában csak ideiglenes génbevitelre alkalmasak, ez ideális például a postischaeмиás károsodások kivédésére. [Használatukat korlátozza, hogy az adenovírus-fertőzést követően immunitás alakul ki az adenovírus ellen, ez meggátolhatja a génbevitelt, illetve a génbevitelt követően toxikus immunreakciókat válthat ki (7).]

Az adenovírus-konstruktok tehát jól használhatók olyan esetekben, amikor egy adott géntermék rövid távú expressziója a cél (például az ischaemiás állapotok kezelésére antiapoptotikus gének ideiglenes overexpresszálása).

Egyéb vírusok

Egyéb vírusok is – adenoasszociált vírusok, herpeszvírusok, alfavírusok, poxvírusok – képesek integrálni az általuk kódolt transzgént a célsejt genomjába. A retrovírusokkal ellentétben szállítóképeségük gyengébb, így

hatásfokuk kisebb. A herpeszvírusok, neurotropiájuk miatt, az idegrendszeri géntranszferben játszhatnak nagyobb szerepet.

Nem virális vektorok

Fehérje-, aminosav-polimer burokkal bevont géntranszfer

In vitro kísérletek folynak egyéb, elsősorban fehérje-, illetve aminosav-polimer burokkal (polyplex) bevont géntranszferrel is.

Tiszta DNS

Biztató eredményeket mutat vakcinációs kísérletekben (daganat, illetve mikrobák ellen) a tiszta DNS (naked DNS) bevitele (8).

Liposzómavektorok

Liposzómavektorok használatakor a terápiás gént tartalmazó rekombináns plazmidot kationos liposzómával egyesítik, és így juttatják a célsejtekbe. A géntranszfer hatásfoka kicsi, de mivel a komplex nagy dózisban alkalmazható, a terápiás hatás elérhető (6).

Mesterséges kromoszómák

Újabban plazmid helyett mesterséges miniatűr kromoszómák előállítására, illetve bevitelére is folynak kísérletek (YAC: yeast associated chromosome, BAC: bacteria associated chromosome, PAC: P1 plazmid associated chromosome). A mesterséges kromoszómák nagy előnye, hogy stabilak, a rekombináció és a kimérismus nem jellemzi. Több százezer bázispár befogadására alkalmas. Az emlőssejtekbe bevitele elektroporációval történik.

Plazmidok

A plazmidok nem esszenciális, extrakromoszomális, cirkuláris kétszálú DNS-ek. A baktériumok kisméretű cDNS-ei, amelyek a baktériumtól függetlenül tudnak replikálódni.

A plazmidokat leggyakrabban *elektroporézis* révén transfektálják az emlőssejtekbe. Az elektroporézis során az adott gént – a csupasz DNS-molekulát, 2500–8000 bázispár – a sejtekhez adják, majd a sejteket elektromos sokknak vetik alá, így a DNS a sejtbe jut. Az in vitro elektroporáció hatásfoka elérheti a 100%-ot is, míg az in vivo rendszerekben ez sokkal alacsonyabb, ezért ez csak felületi génbevételre alkalmas.

A génterápia klinikai alkalmazása

Ischaemiás betegségek

– az antiapoptózis kezelés elvi alapjai

A neuronális apoptózis nemcsak az egyedfejlődés során jelentős, hanem különböző sejtpusztulással jellemzett állapotokban is fontos tényező. A neuronokban a sejtpusztulás apoptózis, nekrozis vagy a kettő kombinációja révén alakul ki (2, 9).

A fokális agyi ischaemia centrumában a károsodást követően gyorsan nekrotikus jellegű sejtpusztulás figyelhető meg. Az ezt körülvevő zónában, a penumbra-ban, a többnyire apoptotikus jellegű sejtpusztulás lassabban alakul ki. A sejtpusztulás mérséklésére irányuló kísérletek így kivétel nélkül a penumbra régió megmentését célozzák. A penumbra nem egységes, az ischaemiát követően időben és térben több rétegét különíthetjük el (10). Az egyes rétegekben zajló biokémiai változások sejtpusztuláshoz vagy regenerációhoz vezetnek. A penumbra rétegeiben HSP-70 (hősokkprotein-70), HIF (hypoxia inducible factor) és FOS/IEGs fokozott megjelenése jellemző. A penumbra és az ép agyszövet határán neuralis plaszticitást szabályozó fehérjék (GAP43, MAP2) mutathatók ki. A penumbra-ban négy órával az ischaemiát követően az apoptotikus sejtek száma a nekrotikus sejtekhez képest 9:1, míg a magban ez az arány 1:1 (11).

A neuronális apoptózisban a mitochondriális útvonal jelentős szerepet játszik (12). A neuronális apoptózis során az ischaemiás területen nő a Bax expressziója, és a citoplazmából a mitochondriumokba transzlokálódik, míg a Bcl-2 és a Bcl-X_L expressziója csökken, így e fehérjék nem tudják gátolni a proapoptotikus Bax transzlokációját. Az ischaemiás penumbra-ban a sejtek apoptózisa és nekrozisa jellemző, ennek aránya a betegség súlyosságától függ (13, 14). Az apoptózist extracelluláris jelek is beindíthatják, például a Fas kötődése a receptorához (Fas-R), amely a kaszpáz-8 és a Bid hasításán keresztül aktiválja a mitochondriumdepolarizációt (14).

A neuronális apoptózis effektorfolyamatában mind a kaszpázfüggő, mind a kaszpázfüggetlen útvonal – AIF (apoptosis inducing factor) – szerepe ismert (15, 16).

A penumbrarégióban zajló különböző biokémiai folyamatok befolyásolása lehetőséget jelent az antiapoptotikus neuroprotektív terápia kidolgozására.

Génterápiás kísérletek

Az apoptotikus-nekrotikus kaszkád sok ponton támadható. Így az ebben szerepet játszó gének módosításával hatékony eredményt érhetünk el az agyi katasztrófák célzott kezelésében. Számos tanulmány jel-

1. táblázat. Az eddigi génterápiás kísérletek kezelési cél és a terápiás géncsoportok szerint

Gén	Vektor	Beviteli hely	Kezelési cél
eNOS	adenovírus	cisterna magna	subarachnoid haemorrhagia
ECSOD	adenovírus	cisterna magna	
antisense preproendotelin-1	oligodeoxi-nukleotid	cisterna magna	
prepro-CGRP	adenovírus	cisterna magna	
NF-κB	oligodeoxi-nukleotid	cisterna magna	
bFGF	adenovírus	kamra	a kollaterális keringés javítása
hepatocytá növekedési faktor	HVJ-liposzóma komplex	cisterna magna	
apolipoprotein E	adenovírus	szisztémás injekció	artériás betegségek
anti-MCP1	HVJ-liposzóma komplex	femorális izom	
szöveti faktor útvonal gátló	adenovírus	carotis	
hirudin	adenovírus	carotis	
TPA	adenovírus	femorális artéria	
E2F	oligodeoxi-nukleotid	carotis	
calbindin D28K	Herpes simplex vírus	striatum	
glükózttranszporter	plazmid	striatum	agyi ischaemia
HSP72	Herpes simplex vírus	striatum	
IL1-ra	adenovírus	oldalkamra	
IL-10	adenovírus	oldalkamra	
TGF-β1	adenovírus	oldalkamra	
hepatocytá növekedési faktor	HVJ-liposzóma komplex	cisterna magna	
bcl-2	adeno associated vírus	hippocampus	
neural apoptosis inhibitor protein	adenovírus	hippocampus	
ciklooxygenáz-1	adenovírus	oldalkamra	
redox-inducible antioxidáns fehérje	adenovírus	putamen	

anti-MCP1: anti monocyta chemoattractant protein 1, bFGF: basic fibroblast growth factor, CGRP: calcitonin gene-related peptide, E2F: elongációs transzkripció faktor, ECSOD: extracelluláris szuperoxid-dismutáz, eNOS: endothelialis nitrogén-oxid szintáz, HSP-72: hőszokkprotein-72, IL1-ra: interleukin1 receptor antagonist, IL-10- interleukin 10, NF-κB: nukleáris transzkripció faktor, TGF-β1: transforming growth factor β1, TPA: szöveti plazminogén aktivátor

zi a génterápiás próbálkozásokat cerebrovasculáris betegségekben is, bár ezek klinikai alkalmazása jelenleg még nem áll rendelkezésre. Az agyi ischaemiás állapotok génterápiás kezelésének a behatárolt terápiás ablak szab határt. Az ischaemiás állapotok terápiájában a neuroprotekciónak szerepet játszó gének aktivációjának, és a korai folyamatokban aktiválódó gének gátlásának van jelentősége (17).

Az eddigi kísérleteket a kívánt kezelési cél és az alkalmazott terápiás géncsoportok szerint osztályozhatjuk.

A kezelési cél szerint a vasculáris génterápia eddigi irányai:

- a subarachnoidalis haemorrhagia után a vasospasmus megelőzése,
- a kollaterális erek növekedésének serkentése,
- az atheroscleroticus plakk stabilizációja, illetve a thrombosis és a restenosis gátlása (1. táblázat).

Újabb adatok szerint a vírus által mediált transzferek ígéretes megoldást adhatnak a stroke klinikai kezelésében (18).

Az in vitro és in vivo ischaemiás modelleken végzett kísérletekben eddig az antiapoptotikus, gyulladást segítő, transzkripció, növekedési faktor és hőszokkprotein (HSPs), proteáz és proteázinhibitor, illetve NOS és SOD gének bevitelével próbálkoztak.

Az antiapoptotikus gének bevitel

Az antiapoptotikus gének közül az apoptózis mitochondriális útvonalában kulcsszerepet játszó Bcl-2 fehérjecsald antiapoptotikus tagjainak befolyásolása lehet eredményes a neuronális rendszerekben. A családba tartozó fehérjék két nagy csoportba sorolhatók, egyes tagok antiapoptotikus (például: Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, MCL-1, A1, CED-9, E1B19k, BHRF1 és a BNIP3L), míg mások proapoptotikus hatásúak (például: Bax, Bad, Bik, Bid) (19, 20). A pro- és antiapoptotikus Bcl-2 fehérjék aránya szabályozza a mitochondrium membránpermeabilitását, a citokróm-c kiáramlását. A Bcl-2 család tagjai egymással homo- és heterodimereket alkotnak. A sejtek sorsa – túlélés vagy sejthalál – a képződött homo- és heterodimerek arányától függ (21). A Bax-Bax homodimer túlsúlya apoptózishoz vezet. A Bax homodimerek képződése és membránba beépülése gátolható a Bax-Bcl-2 fehérje (például: Bcl-2, Bcl-X_L) heterodimerének kialakulásával (20). A Bax a tBid lipidekkel is kapcsolatba léphet, olyan lipid- vagy lipid-fehérje pórusokat hozva létre, amelyek elég nagyok ahhoz, hogy az intermembrán térből a fehérjéket a citoplazmába engedjék (22).

A Bcl-2 fehérjecsald mitochondriális pórus formálásában szerepet játszó – és ezen keresztül a citokróm-c kiáram-

lását segítő – bcl-2, bcl-X₁ bevitelle többféle modellben is hatékonyan bizonyult. Ezt a neuroprotektív hatást többféle konstrukt (vírusszerkezet) alkalmazásával is elérték, így *Herpes simplex* (23), adenovírus vírusvektorral (24, 25), liposzómavektorral (26). A kísérletek eredményéből megállapítható, hogy az in vitro és az in vivo modellekben a bcl-2 upreguláció egyaránt csökkentette az apoptotikus sejtek számát és a laesio nagyságát a neuronokban. (Saját, nem közölt vizsgálatainkban az adeno-bcl-X₁-bevétel ugyan szignifikánsan csökkentette az apoptózist, de növelte a sejtnekrózis arányát.) A Bcl-2-overexpresszió (a génkifejeződés emelkedése) neuroprotektív hatása kifejezett. A bcl-2 direkt agyba vitele *Herpes simplex*-vírusvektorral (*HSV-bcl-2*) védi a striatalis neuronokat az ischaemiával szemben, a hippocampalis régióban pedig az oxidatív történések, a hypoglykaemia és a glutamáttoxicitás ellen (27, 28).

Yang és munkatársai karakterizáltak egy antioxidáns fehérjét, amely a SAG (sensitive to apoptosis gene) terméke. Ez a fehérje véd a reaktív oxigéngyökök (ROS) által indukált apoptózistól: bevitelle csökkentette a ROS koncentrációját, ezáltal az apoptotizált sejtek számát (29).

A tranziens agyi ischaemiát követően szelektíven nő az antiapoptotikus NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein, neuronális apoptózist gátló fehérje) koncentrációja. Az in vivo NAIP-bevételt követően a hippocampusban a NAIP overexpressziója és az ischaemiás terület csökkenése figyelhető meg (30).

Reperfúziós pro- és antiinflammatorikus gének

A stroke kialakulása után a periischaemiás területen és a penumbrarégióban – elsősorban a reperfúzió során – citokinaktiválódás (például: IL-1, IL-1 β , IL-10, TGF- β) jellemző. Az interleukin-1 β fontos szerepet játszik a stroke-ot követő gyulladásos folyamatok beindításában (31). A gyulladásos folyamatok szabályozása géntranszferrel (IL-10, TGF- β , IL-1-receptor-antagonista) eredményesen csökkenti az ischaemiás laesio nagyságát (32–34).

Transzkripció, növekedési faktor gének

A neuroprotektív stratégiák további lehetőségeit képviseli a transzkripció, növekedési faktorok alkalmazása. Kísérletek történtek FGF-2 (fibroblast growth factor) (35), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (36), NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1), VEGF (vascular endothelial growth factor) (37), HGF (hepatocytá growth factor) gének bejuttatására. Ezek eredményéről általánosan elmondható, hogy a terápiás gén bevitelle valamilyen módon neuroprotektívot okoz.

Az FGF-2 (fibroblastnövekedési faktor) fehérje szerepet játszik a neuro- és az angiogenezisben. Adeno-

FGF-2 agyba vitelét követően az FGF-2-expresszió szignifikánsan nőtt a liquorban, az agykárosodás nagysága pedig csökkent. Emellett az FGF-2 gén segítette az ischaemiás területen – gyrus dentatus, hippocampus CA1, subventricularis zóna – a progenitorsejtek transzformálódását neuronokká (38).

Az NGF gén bevitelle liposzómavektorral csökkentette a kolinerg neuronokat a septumban (39). Az NGF gén transzferenciója a hippocampus CA1-CA2 régióját képes megvédeni az ischaemiás hatásokkal szemben (40, 41).

A VEGF-bevitel (adenoasszociált víruskonstruktum) csökkentette az oedema nagyságát és a hippocampus CA1-régiójában a sejtpusztulást (42, 43). A HGF vagy VEGF gén transzferenciója szintén csökkentette az oedemat és a vér-agy gát károsodását a HGF neuro- és angiogén hatásán keresztül (44), illetve a subarachnoideális felszínre vitele növeli az agyi véráramlást és serkenti az angiogenezist (45).

Proteáz és proteázinhibitor gének bevitelle

Az SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) a szerin-proteáz gátlásán keresztül véd az agyi ischaemia ellen. Az ADV/SLPI szignifikánsan csökkentette az ischaemias terület nagyságát (46).

A ciklooxigenáz-1 növeli a neuroprotektív prosztaglandinok szintézisét. Adenovírus-mediált ciklooxigenáz-1 és bicsztronos (két expresszióra képesek gént tartalmazó rendszer) ciklooxigenáz-1/prosztaciklin-szintáz géntranszfer által véd az ischaemia ellen, hogy szelektíven növeli a prosztaglandin-, és csökkenti a leukotriénszintet (47).

NOS és SOD gének

A cerebrovascularis betegségek génterápiás kezelésére esélyes lehet az endothelialis nitrogén-oxid-szintáz gén is. Az eNOS az atheroscleroticus erekben növeli az acetilkolinra adott választ, így a normális erekhez hasonló relaxációt eredményezhet. Ennek alapján a cerebrovascularis betegségek kezelésében az eNOS géntranszfer hatékony terápia lehet. A géntranszfer követően ex vivo modellek-nél mind az endotheliumban, mind az adventitiában a vascularis funkciók javulását észlelték (48).

Az oxidatív stressz endotheldiszfunkciót idéz elő. Ennek helyreállítására képesek a szuperoxid-diszmutáz (SODs) gének in vitro és in vivo bevitelle, amely egy endothel bázisú génterápia alapját képezheti (49).

Egyéb gének alkalmazása

A glükóztranszporter gén (GLUT-1) bevitelle azáltal véd az ischaemiás folyamatok ellen, hogy növeli a felhasználható glükóz mennyiségét (50).

A mutáns MCP-1 (monocyta chemoattractant protein-1) adenovírusal való bevitel is csökkenti az infarktus nagyságát. Fokális agyi ischaemia után az MCP-1 az ischaemiás cortexben jelenik meg (51).

Újabb adatok szerint a calbindin D28K-overexpresszió neuroprotektív hatást fejt ki, így a calbindin gén bevitel is hatékony lehet a stroke kezelésében. A calbindin D28K jelentősége abban áll, hogy endogén kalciumkötő fehérjeként gátolja az intracelluláris kalciumakkumulációt. Fokális stroke kísérleti modelljében a génbevitt követően a kezelés hatására az ischaemiás területen csökkent az elpusztult sejtek száma (50).

A penumbra adott régiójában a hő sokkproteinek (HSPs) magas expressziója jellemző. Például a HSP-72 növeli az ischaemia után a striatalis neuronok túlélését, tehát e gén bevitel is hatékony eszközzé válhat a stroke kezelésében (52).

Összefoglalás

Az eddigi in vitro és in vivo kísérleti rendszerekben a géntranszfer alkalmazása eredményes neuroprotektív eredményezhet. A módszer fejlesztése ígéretes az agyi infarktus nagysága és a maradványtünetek súlyossága csökkentésében.

A génterápia további előnyét az adja, hogy az eddigi klinikai tapasztalatok jelentős mellékhatásról nem számolnak be. A megfelelő vektorok alkalmazásával elérhető, hogy az adott géntermék csak addig expresszálódjon, míg a terápia hatását kifejti. Különböző bicisztronos konstrukciók alkalmazásával lehetővé teszi, hogy például csak az ischaemiás területen növelje a célgén kifejeződését.

Az eddigi génterápiás kísérletek eredményei biztatóak; ennek alapján remélhető, hogy az idegrendszeri kórképek kezelésében belátható időn belül célzott, hatékony terápia kidolgozására lesz mód.

IRODALOM

- Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, Sugita M. Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischaemia in mice. *Neuroscience* 1998;83(2):439-48.
- Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C. Neurodegenerative disorders and ischaemic brain diseases. *Apoptosis* 2001;6(1-2):69-81.
- Friedmann T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Amer* 1997;276:80.
- Mathisen PM, Tuohy VK. Gene therapy in the treatment of autoimmune disease. *Immunol Today* 1998;19:103.
- Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 1998;392:25-30.
- Szeberényi József. Molekuláris sejtből. Budapest-Pécs: Dialóg Campus Kiadó; 1999.
- Russel SJ. Gene therapy. *Br. Med J* 1997;315:1289-92.
- Felguer PL. Non viral strategies for gene therapy. *Scientific American* 1997;276:86-90.
- Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Ju WY, Wadia J, Tatton NA. Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription. *J Neural Transm* 1997;49(Suppl):245-68.
- Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20(7):1011-32.
- Nagy Z, Simon L, Nemes Z. Apoptózis jelentősége az agyi ischaemiás szövetkárosodások kialakulásában. In: Apoptózis. *Kopper L, Fésüs L (eds.)*. Budapest: Medicina; 2002.
- Akhtar RS, Ness JM, Roth KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):189-203.
- Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, Sugita M. Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischaemia in mice. *Neuroscience* 1998;83(2):439-48.
- Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(2):267-82.
- Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29(5):472-81.
- Dubois-Dauphin M, Pfister Y, Vallet PG, Savioz A. Prevention of apoptotic neuronal death by controlling procaspases? A point of view. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36(2-3):196-203.
- Toyoda K, Chu Y, Heistad DD. Gene therapy for cerebral vascular disease: update 2003. *Br J Pharmacol* 2003;139(1):1-9.
- Yenari MA, Sapolsky RM. Gene therapy in neurological disease. *Methods Mol Med* 2005;104:75-88.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419.
- Hergartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop* 1999;13:1899-911.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
- Lawrence MS, McLaughlin JR, Sun GH, Ho DY, McIntosh L, Kunis DM, et al. Herpes simplex viral vectors expressing Bcl-2 are neuroprotective when delivered after a stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17(7):740-4.
- Shinoura N, Satou R, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of Bcl-X(L) protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;254(2):221-31.
- Ishida A, Kawakami H, Yasuzumi F, Morishita R. Gene therapy for cerebral infarction (cerebral ischaemia). *No To Shinkei* 2002;54(3):213-9.
- Cao YJ, Shibata T, Rainov NG. Liposome-mediated transfer of the bcl-2 gene results in neuroprotection after in vivo transient focal cerebral ischaemia in an animal model. *Gene Ther* 2002;9(6):415-9.
- Matthew E, Andreason P, Pettigrew K, Carson RE, Herscovitch P, Cohen R, et al. Benzodiazepine receptors mediate regional blood flow changes in the living human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2775-9.
- Zhao H, Yenari MA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Mild postischaemic hypothermia prolongs the time window for gene therapy by inhibiting cytochrome C release. *Stroke* 2004;35(2):572-7.
- Yang GY, Pang L, Ge HL, Tan M, Ye W, Liu XH, et al. Attenuation of ischaemia-induced mouse brain injury by SAG, a redox-inducible antioxidant protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21(6):722-33.
- Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, Hakim AM, et al. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischaemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 1997;3(9):997-1004.
- Yang GY, Mao Y, Zhou LF, Ye W, Liu XH, Gong C, Lorriss Betz A. Attenuation of temporary focal cerebral ischaemic injury in the mouse following transfection with interleukin-1 receptor antagonist. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;72(2):129-37.
- Toyoda K, Chu Y, Heistad DD. Gene therapy for cerebral vascular disease: update 2003. *Br J Pharmacol* 2003;139(1):1-9.
- Betz AL, Yang GY, Davidson BL. Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15(4):547-51.

- 34 Tsai TH, Chen SL, Xiao X, Chiang YH, Lin SZ, Kuo SW, et al. Gene treatment of cerebral stroke by rAAV vector delivering IL1ra in a rat model. *Neuroreport* 2003;14(6):803-7.
- 35 Watanabe T, Okuda Y, Nonoguchi N, Zhao MZ, Kajimoto Y, Furutama D, et al. Postischaemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(11):1205-13.
- 36 Harvey BK, Chang CF, Chiang YH, Bowers WJ, Morales M, Hoffer BJ, et al. HSV amplicon delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor is neuroprotective against ischaemic injury. *Exp Neurol* 2003;183(1):47-55.
- 37 Shirakura M, Inoue M, Fujikawa S, Washizawa K, Komaba S, Maeda M, et al. Postischaemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils. *Gene Ther* 2004;11(9):784-90.
- 38 Matsuoka N, Nozaki K, Takagi Y, Nishimura M, Hayashi J, Miyatake S, Hashimoto N. Adenovirus-mediated gene transfer of fibroblast growth factor-2 increases BrdU-positive cells after forebrain ischaemia in gerbils. *Stroke* 2003;34(6):1519-25.
- 39 Zou LL, Huang L, Hayes RL, Black C, Qiu YH, Perez-Polo JR, et al. Liposome-mediated NGF gene transfection following neuronal injury: potential therapeutic applications. *Gene Ther* 1999;6(6):994-1005.
- 40 Pechan PA, Yoshida T, Panahian N, Moskowitz MA, Breakfield XO. Genetically modified fibroblasts producing NGF protect hippocampal neurons after ischaemia in the rat. *Neuroreport* 1995;6(4):669-72.
- 41 Andsberg G, Kokaia Z, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O, Mandel RJ. Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischaemia model in rats. *Neurobiol Dis* 2002;9(2):187-204.
- 42 Bellomo M, Adamo EB, Deodato B, Catania MA, Mannucci C, Marini H, et al. Enhancement of expression of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischaemia injury in the gerbil. *Pharmacol Res* 2003;48(3):309-17.
- 43 Wang R, Zhang X, Zhang J, Xiu R. Gene transfer of vascular endothelial growth factor plasmid/liposome complexes in glioma cells in vitro: the implication for the treatment of cerebral ischaemic diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;23(2-4):303-6.
- 44 Shimamura M, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischaemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischaemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* 2004;109(3):424-31.
- 45 Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Kokuzawa J, Aoki M, Matsumoto K, et al. Gene transfer of hepatocyte growth factor to subarachnoid space in cerebral hypoperfusion model. *Hypertension* 2002;39(5):1028-34.
- 46 Wang X, Li X, Xu L, Zhan Y, Yaish-Ohad S, Erhardt JA, et al. Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischaemic stroke: adenoviral expression of SLPI protects brain from ischaemic injury. *Mol Pharmacol* 2003;64(4):833-40.
- 47 Lin H, Lin TN, Cheung WM, Nian GM, Tseng PH, Chen SF, et al. Cyclooxygenase-1 and bicistronic cyclooxygenase 1/prostacyclin synthase gene transfer protect against ischaemic cerebral infarction. *Circulation* 2002;105(16):1962-9.
- 48 Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M. Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral circulation. *Mech Ageing Dev* 2000;116(2-3):95-101.
- 49 Fennell JP, Brosnan MJ, Frater AJ, Hamilton CA, Alexander MY, Nicklin SA, et al. Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Ther* 2002;9(2):110-7.
- 50 Yenari MA, Minami M, Sun GH, Meier TJ, Kunis DM, McLaughlin JR, et al. Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischaemia. *Stroke* 2001;32(4):1028-35.
- 51 Kumai Y, Ooboshi H, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Egashira K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy protects against focal brain ischaemia in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(12):1359-68.
- 52 Hoehn B, Ringer TM, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK, Yenari MA. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischaemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21(11):1303-9.