

Антисмысловые олигонуклеотиды для исследований механизмов гипертонической болезни и ее терапии

Л.О. Климов^{1,2}✉, А.А. Серяпина^{1,2}, В.Ф. Зарытова^{1,3}, А.С. Левина^{1,3}, А.Л. Маркель^{1,2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Артериальная гипертония – одно из наиболее распространенных хронических заболеваний у взрослых и пожилых людей во всем мире. Эта патология не только снижает качество жизни больных, но и может сопровождаться высоким риском осложнений. Несмотря на то что в настоящее время на рынке имеется большое количество антигипертензивных средств, в основном представляющих собой различные комбинации ингибиторов ренин-ангиотензиновой системы, блокаторов адrenoрецепторов в сочетании с диуретиками, нет общепринятого «золотого стандарта» препаратов, которые не имели бы побочных эффектов. В обзоре рассматриваются основные аспекты применения антисмысловых олигонуклеотидов в контексте артериальной гипертонии. Известно, что введение антисмысловых олигонуклеотидов – один из способов выключения работы того или иного гена, причем ключевой особенностью данной методики, отличающей ее от других, является высокая селективность. Однако при несомненных преимуществах метода существуют сложности его применения, связанные как со свойствами самих олигонуклеотидов (недостаточная устойчивость и неэффективное проникновение в клетки), так и с многообразием механизмов возникновения той или иной патологии, в частности гипертонической болезни. В настоящей работе приведена краткая характеристика основных групп мишеней для антисмыслового ингибирования гипертонической болезни. Отдельно рассматриваются новейшие мишени для терапии олигонуклеотидами – регуляторные микроРНК. Кроме того, обсуждаются основные модификации антисмысловых нуклеотидов, разработанные для увеличения длительности эффектов их действия и упрощения приема препаратов данного типа, в частности комбинирование антисмысловых олигонуклеотидов с экспрессирующими векторами на основе аденовируса. Особенное внимание уделено антисмысловым олигонуклеотидам в составе наноконструкций. В обзоре обсуждаются результаты применения конъюгатов антисмысловых нуклеотидов к гену ангиотензин-превращающего фермента и наночастиц диоксида титана (TiO₂) на крысах линии НИСАГ с индуцированной стрессом артериальной гипертонией. Показано, что использование антисмысловых олигонуклеотидов продолжает оставаться перспективной методикой для изучения механизмов возникновения различных форм гипертонической болезни, а также имеет высокий потенциал для терапевтического применения.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь; антисмысловые олигонуклеотиды; крысы линии НИСАГ; наночастицы.

Antisense oligonucleotides for the arterial hypertension mechanisms study and therapy

L.O. Klimov^{1,2}✉, A.A. Seryapina^{1,2},
V.F. Zarytova^{1,3}, A.S. Levina^{1,3}, A.L. Markel^{1,2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Arterial hypertension is one of the most common chronic diseases in adults all over the world. This pathology can not only reduce patients' life quality, but can also be accompanied by a number of complications. Despite the fact that there is a large group of antihypertensive drugs on the market, mainly representing different combinations of inhibitors of the renin-angiotensin system, adrenoceptor blockers in combination with diuretics, there is no generally accepted "gold standard" for drugs that would not have side effects. The review discusses the main aspects of antisense oligonucleotides use in the context of arterial hypertension. It is well known that the medical implementation of antisense oligonucleotides aims to block the expression of particular genes involved in the pathology development, and a key advantage of this technique is a high selectivity of the effect. However, with the undoubted advantages of the method, there are difficulties in its application, related both to the properties of the oligonucleotides themselves (insufficient stability and poor penetration into cells), and to the variety of mechanisms of the origin of a particular pathology, arterial hypertension, in our case. The review provides a brief description of the main molecular targets for antisense treatment of hypertensive disease. The newest targets for therapy with oligonucleotides – microRNAs – are discussed. The main modifications of antisense nucleotides, designed to increase the duration of their effects and simplify the delivery of this type of drugs to the targets are discussed, in particular, combining antisense oligonucleotides with adenovirus-based expression vectors. Particular attention is given to antisense oligonucleotides in the complex with nanoparticles. The review discusses the results of the use of titanium dioxide (TiO₂) containing antisense nanocomposites for the angiotensin converting enzyme in rats with stress induced arterial hypertension (ISIAH). It was shown that the use of antisense oligonucleotides continues to be

a promising technique for studying the mechanisms of various forms of hypertensive disease and has a high potential for therapeutic use.

Key words: hypertension; antisense oligonucleotides; ISIAH rat; nanoparticles.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Климов Л.О., Серяпина А.А., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Маркель А.Л. Антисмысловые олигонуклеотиды для исследований механизмов гипертонической болезни и ее терапии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):240-247. DOI 10.18699/VJ18.354

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Klimov L.O., Seryapina A.A., Zarytova V.F., Levina A.S., Markel A.L. Antisense oligonucleotides for the arterial hypertension mechanisms study and therapy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):240-247. DOI 10.18699/VJ18.354 (in Russian)

Блезни сердечно-сосудистой системы по-прежнему являются основной причиной смертности в мире, и гипертония играет центральную роль в качестве триггера для возникновения серьезных осложнений, таких как инфаркт миокарда, мозговой инсульт и нефросклероз. Несмотря на успехи медицины в создании эффективных антигипертензивных препаратов, необходимый контроль за уровнем артериального давления (АД) в настоящее время установлен в среднем менее чем у половины пациентов, страдающих гипертонической болезнью (Furberg, Alderman, 2014). Кроме того, большинство современных гипотензивных препаратов имеет много побочных эффектов. Таким образом, необходим поиск новых, более безопасных и эффективных методов лечения.

Одна из ключевых особенностей гипертонической болезни (ГБ) – стойкое повышение уровня АД – может происходить вследствие сочетания многих факторов, как средовых, так и генетических, причем вклад последних в формирование гипертензивного фенотипа может достигать 40–60% (Dominiczak, 2016). Возможно значительное снижение эффективности лечения ГБ с применением классического набора антигипертензивных средств, так как фармакологическому воздействию подвергаются не непосредственная причина заболевания, а, по сути, конечные звенья механизма регуляции АД, которым адресованы фармакологические агенты. Поскольку при этом исходная причина болезни не устраняется, проводимая терапия должна иметь перманентный характер, что во многом определяет как появление побочных эффектов, так и наличие эффекта привыкания, связанного с процессом адаптации организма к длительной терапии (Xie et al., 2016).

Таким образом, возникло понимание необходимости разработки высокоэффективных и адресованных исходным причинам (генам) препаратов, которые демонстрируют высокую специфичность по отношению к индивидуальным, свойственным конкретному больному, механизмам развития ГБ (Phillips, 1999).

Наследственные факторы артериальной гипертонии обусловлены изменениями функций конкретных генов. Причиной этого могут быть как мутации, приводящие к образованию белка с измененными свойствами, так и сложные многостадийные процессы, влияющие на экспрессию определенных генов, определяющих функции систем регуляции АД. Поэтому контроль за уровнем экспрессии генов ключевых систем контроля АД уже давно является важным звеном в разработке современных подходов к лечению ГБ.

Методы применения коротких антисмысловых последовательностей олигонуклеотидов, направленных на подавление транскрипционной активности определенных генов, должны способствовать более специфичной терапии, приближенной к исходным причинам патологии. Первоначально считалось, что использование этой технологии должно быть относительно несложным в силу простоты идеи, лежащей в основе метода. Предполагается, что определенная последовательность ДНК за счет комплементарного взаимодействия может связываться со специфической мРНК, ответственной за экспрессию транскрипции соответствующих генов, и таким образом ингибировать синтез определенного белка. Идея использования производных олигонуклеотидов как перспективных терапевтических препаратов была высказана более 40 лет назад (Belikova et al., 1967). Эффективное применение так называемого антисенс-подхода впервые продемонстрировано на примере ингибирования репликации вируса саркомы Рausca (Zamecnik, Stephenson, 1978). Эта работа привела к росту исследований, направленных на использование антисмысловых олигонуклеотидов.

Преимущества и проблемы использования олигонуклеотидов в качестве терапевтических агентов

Существенным достоинством терапии с использованием антисмысловых олигонуклеотидов по сравнению с доступными в настоящее время низкомолекулярными лекарствами является их способность действовать на генетическую первопричину заболевания за счет селективного распознавания определенных участков мишеней. Известно, что антисенс-олигонуклеотиды связываются с комплементарными участками таргетных РНК с образованием ДНК/РНК дуплексов, что ведет к блокированию функции РНК или ее расщеплению клеточными РНКазами (РНКаза-Н) (Spurgers et al., 2008; Bennett, Swayze, 2010; Mescalchin, Restle, 2011).

Таким образом, олигонуклеотиды могут избирательно блокировать синтез нежелательных белков, что может облегчить тяжесть течения заболевания и минимизировать побочные эффекты. Кроме того, возможно быстрое переадресирование олигонуклеотида на новую мишень путем изменения его нуклеотидной последовательности, в то время как на поиск новых фармацевтических препаратов могут понадобиться годы.

К настоящему времени десятки олигонуклеотидов, аптамеров, дезоксирибозимов, миРНК находятся на разных

стадиях клинических испытаний. Вкладываются значительные средства и усилия в создание лекарств нового поколения. Исследования на самых различных модельных системах подтвердили эффективность использования антисенс-олигонуклеотидов, однако эта стратегия пока не нашла широкого применения в медицинской практике. Основное препятствие для успешного применения антисенс-подхода – отсутствие эффективного способа доставки олигонуклеотидов и их различных производных к гену-мишени *in vitro* и *in vivo*. Во всех случаях для доставки олигонуклеотидов в клетки требуются дополнительные и в большинстве случаев токсичные трансфекционные реагенты (липофектамин, транспортные белки, липосомы) или физическое воздействие на клетки (электропорация).

Для доставки экзогенных НК в клетки используются две категории транспортеров: вирусные и невирусные векторы. Первые обеспечивают высокую эффективность трансфекции (Lim, 2012), однако представляют потенциальную опасность для организма, так как могут вызывать иммунный ответ, воспалительные реакции и даже канцерогенный эффект (Bouard et al., 2009).

Среди невирусных векторов широкое распространение получили катионные полимеры, разветвленные дендримеры, катионные липосомы, проникающие в клетки пептиды. Достаточно широко применяют наночастицы, которые по своей сути являются липосомами или подобными структурами (De Jong, Vorm, 2008; Bonner et al., 2009; Paganjpe, Müller-Goymann, 2014). Различные способы доставки производных нуклеиновых кислот интенсивно исследуются, однако их эффективность для трансфекции клеток все-таки ниже, чем при использовании вирусных векторов. Доставке терапевтических олигонуклеотидов в клетки посвящена серия обзоров (Boisguérin et al., 2015; Juliano, Carver, 2015; Wickstrom, 2015), в которых рассмотрен большой массив литературных данных и сделано заключение о целесообразности разработки лекарственных препаратов на основе фрагментов нуклеиновых кислот, что подтверждено не только фундаментальными исследованиями, но практикой представителей фармации и медицины.

В последние годы для доставки олигонуклеотидов в клетки начали успешно использовать неорганические наночастицы: золото, диоксид титана, углеродсодержащие материалы, обладающие магнитными свойствами наноструктуры на основе оксида железа и др. (Parveen et al., 2012). К преимуществам наночастиц относят, в частности, возможность одновременного переноса лекарственного средства и сигнальной молекулы для оценки концентрации препарата в ткани. Помимо этого, дизайн наноконструкта может быть подобран таким образом, чтобы осуществлять адресную доставку фармакологических агентов и улучшить фармакокинетику. Важное преимущество наночастиц по сравнению с другими транспортерами олигонуклеотидов – их способность защищать олигонуклеотиды от действия клеточных нуклеаз (Rosi et al., 2006; Pletnev et al., 2008).

Наночастицы диоксида титана привлекают особое внимание благодаря их способности проникать в клетки, биосовместимости, стабильности и возможности модификации поверхности для иммобилизации различных

соединений (Paunesku et al., 2003; Ravi Kumar et al., 2004; Fabian et al., 2008; Park et al., 2009). Показано, что TiO₂-наночастицы в относительно низких дозах (до 0.2 мг/мл) не токсичны для клеток (Jeng, Swanson, 2006), бактерий (Heinlaan et al., 2008) и животных (Fabian et al., 2008).

Наночастицы диоксида кремния используются также в качестве транспортного средства для доставки нуклеиновых кислот в клетки (Roy et al., 2008; Liu et al., 2011). Показано, что наночастицы SiO₂ с аминогруппами на поверхности могут связывать плазмидную ДНК, обеспечивать ее проникновение в клетки и даже в клеточные ядра, а также предохранять ДНК от действия внутриклеточных рестриктаз (Roy et al., 2005). В другой работе (Bharali et al., 2005) продемонстрировано, что комплекс плазмидной ДНК с NH₂-модифицированными SiO₂-наночастицами обеспечивает трансфекцию клеток мозга мышей и экспрессию в них доставляемых генов. Кроме того, сделан вывод о нетоксичности использованных композитов. Кремний – один из микроэлементов в организме человека, продукт его биodeградации, ортокремниевая кислота Si(OH)₄, найден почти во всех тканях человека. Во многих экспериментах показано, что кремниевая кислота, вводимая в человека, эффективно выходит из организма через почки (Park et al., 2009). Исследователи предполагают, что наночастицы силикагеля могут деградировать внутри лизосом, а растворенные продукты высвобождаются из клетки в кровяное русло и в дальнейшем выводятся через почки. Таким образом, выявлена способность наночастиц на основе силикагеля к биodeградации.

Доставка фрагментов нуклеиновых кислот в клетки – это только частичное решение проблемы их использования в живых системах. Другой важный аспект – доступность доставленных олигонуклеотидов для взаимодействия с мишенными нуклеиновыми кислотами внутри клетки. Очевидно, что стерические препятствия в случае прочно связанных с наночастицами олигонуклеотидов могут уменьшать эффективность их действия. Поэтому предпочтительнее использовать наноконструкты, в которых олигонуклеотиды соединены с наночастицами нековалентно. При этом после проникновения наноконструктов в клетки олигонуклеотиды могут высвобождаться с поверхности носителя и успешно выполнять свои функции.

Основные мишени для антисмысловой терапии гипертонической болезни

Ренин-ангиотензиновая система (РАС). Звенья ренин-ангиотензиновой системы по аналогии с известными фармакологическими блокаторами стали одними из первых мишеней для ингибирования ГБ. Показано, что такими мишенями могут быть гены ангиотензиногена и АТ1-рецептора ангиотензина-II. После однократного интрацеребровентрикулярного введения гипертензивным крысам линии SHR коротких (15 п. н.) антисмысловых олигодезоксинуклеотидов (ОДН), комплементарных мРНК этих генов, наблюдали достаточно продолжительное (до одной недели) снижение АД (Gyurko et al., 1993). Подобные эксперименты проведены на зрелых крысах, у которых артериальная гипертония была вызвана с помощью сужения почечных артерий (две почки – один зажим, 2К1С). Однако наблюдаемый антигипертензивный эффект в этом

эксперименте был менее продолжительным (Kagiyama et al., 2001). Следует отметить, что речь идет об ингибировании РАС мозга, что подчеркивает важность именно центральных механизмов контроля АД. Внутрисердечный метод введения антисмысловых препаратов использовался для ингибирования ангиотензин-превращающего фермента (АПФ). Величина, на которую при этом снижалось АД, меньше, чем при ингибировании АТ1-рецептора (15 мм рт.ст. и 30–60 мм рт.ст. соответственно). Однако эффект снижения АД был устойчивым, и, кроме того, ингибирование АПФ приводило к уменьшению патологических изменений миокарда и почечных артерий (Wang et al., 2000).

Позже значительный антигипертензивный эффект был достигнут при ингибировании работы системной РАС антисмысловыми олигонуклеотидами, связанными с молекулами азиалогликопротеина, используемого в качестве носителя-доставщика (Sugano et al., 2000). Введение этого препарата привело к значительному снижению АД у крыс SHR (180.7±4.4 мм рт.ст. по сравнению с 223.7±4.8 мм рт.ст. у животных контрольной группы). Следует отметить, что в эксперименте применяли многократное введение этого препарата на протяжении нескольких недель. Это стало подтверждением эффективности ингибирования РАС с помощью антисмысловых ОДН в получении антигипертензивного эффекта, однако не позволяло говорить о потенциальной возможности терапевтического использования такой модификации олигонуклеотидов в связи с необходимостью их повторного внутривенного введения.

Интересным применением антисмысловых препаратов в исследованиях механизмов ГБ стало не только ингибирование звеньев каскада РАС, активация которых приводит к повышению АД, но также воздействие на функцию потенциальных вазодилататоров. Так, к примеру, показано, что ингибирование ангиотензиновых рецепторов АТ2-типа непосредственно в почечном интерстиции на протяжении пяти дней вело к достаточно устойчивому повышению АД у нормотензивных животных. Тем самым, по сути, подтверждена вазодилататорная роль АТ2-рецепторов (Moore et al., 2001).

Адренергическая система – следующая система контроля АД, на которую действовали антисмысловыми ОДН. Непосредственной мишенью были гены адренорецепторов.

Впервые эффекты действия антисмысловых ОДН на мРНК адренорецепторов при артериальной гипертонии показаны на крысах линии SHR со спонтанной гипертонией: однократное внутривенное введение антагониста к β1-адренорецептору в комплексе с липосомами привело к снижению АД на 38±5 мм рт.ст., эффект сохранялся в течение 20 дней (Clare, Zhang et al., 1979; Zhang et al., 2000).

Эффективным оказалось также системное блокирование β1-адренорецептора у крыс с почечной гипертонией (модель 2К1С) при введении соответствующих ОДН в комплексе с липосомами. АД снизилось на 39 мм рт.ст., и эффект сохранялся до 27 дней. Помимо снижения АД, была нормализована сердечная функция, наблюдалось снижение массы миокарда левого желудочка и понижалась коллагенизация его стенки (Liang et al., 2007).

Позже было показано, что блокада α2В-адренорецептора тоже ведет к снижению АД. Так, на модели гипертонии, индуцированной хирургическим удалением почек с последующей повышенной солевой нагрузкой у крыс, продемонстрировано, что интрацеребровентрикулярное введение антисмысловых олигонуклеотидов к α2В-адренорецептору предотвращало повышение АД при солевой нагрузке, а также способствовало значительному уменьшению частоты сердечных сокращений (ЧСС): исходная ЧСС составляла 388±12.9 уд./мин, ЧСС при солевой нагрузке – 385±11.9, ЧСС в течение 3–6 часов после введения ОДН – 306±15.4 (Kintsurashvili et al., 2001). Первоначально коллектив исследователей не смог получить продолжительного эффекта. Тем не менее их последующая разработка рекомбинантного вектора позволила добиться того, что эффект антисмысловой терапии генов-адренорецепторов даже после однократного введения стал достигать не менее 16 дней (Shenouda et al., 2006). Однако попытки воспроизвести длительный антигипертензивный эффект с помощью этой же методики на крысах линии SHR со спонтанной гипертонией не привели к успеху (Ali, 2006; Triantafyllidi et al., 2006).

МикроРНК как потенциальная мишень для терапии ГБ с помощью антисмысловых ОДН. Активно развивающееся направление антисмысловой терапии, в частности терапии ГБ, – ингибирование регуляторных микроРНК (miR). Особенно перспективными выглядят подходы к лечению легочной формы гипертонической болезни. Впервые это показано на модели индуцированной гипоксией легочной гипертонии у мышей, у которых в качестве мишеней для ингибирования были miR-17, miR-21 и miR-92a. Продемонстрировано, что ингибирование miR-17 в результате внутривенного введения соответствующих антисмысловых антагонистов приводит к уменьшению систолического давления в правом желудочке, нормализации сердечного выброса и другим последствиям, характерным для ослабления легочной формы гипертонии, – например к снижению периферического сосудистого сопротивления в легочных артериях и уменьшению степени ремоделинга легочных кровеносных сосудов (Pullamsetti et al., 2012).

Впоследствии у крыс был открыт целый набор из более чем дюжины микроРНК, напрямую или косвенно участвующих в генезе легочной гипертонии и являющихся потенциальными мишенями для ее терапии. Эффекты ингибирования некоторых из них, в частности вышеупомянутая miR-17, а также miR-20a, уже проверены на экспериментальных моделях. Однако эти исследования показали, что действие таких антагонистов проявляется только после многократного применения, причем этот эффект может быть отсроченным. Кроме того, надежду на терапевтическое применение данных антагонистов сдерживают отсутствие каких-либо антидотов, а также потенциальная токсичность и недостаток информации о возможных осложнениях одновременного их применения с обычно используемыми фармацевтическими препаратами, например с гепарином, который, как известно, влияет на уровни циркулирующих микроРНК (Bienertova-Vasku et al., 2015). Тем не менее работы в данном направлении продолжают.

Помимо легочной гипертензии, описаны случаи системной артериальной гипертензии, когда микроРНК могут использоваться в качестве потенциальных мишеней для антигипертензивного воздействия с помощью антисмысловой терапии. Такими микроРНК могут быть miR, влияющие на экспрессию генов PAC как в почке, так и в других тканях (Zheng et al., 2010; Bátkai, Thum, 2012); miR-320, miR-143 и miR-145, непосредственно влияющие на ремоделирование сосудистой стенки и их тонус (Albinson et al., 2011; Ling et al., 2013; Deng et al., 2015), а также некоторые другие.

Варианты методик применения антисмысловых нуклеотидов в терапии ГБ

В настоящее время нет сомнений в перспективности использования антисенс-терапии. Тем не менее следует отметить негативные последствия, вызванные избыточной дозировкой, что было показано при тестировании соответствующих препаратов антисмысловых олигонуклеотидов на приматах. Так, при исследовании токсического действия соответствующих препаратов у обезьян наблюдались некоторые негативные эффекты после болюсных внутривенных инъекций, включающие выраженные гемодинамические изменения, в том числе избыточную системную гипотензию и снижение сердечного выброса. В некоторых случаях имела место даже гибель животных (Farman, Kornbrust, 2003). Поэтому перед исследователями стоит достаточно сложная задача по разработке таких модификаций олигонуклеотидов, которые были бы, с одной стороны, полностью безопасны для человека, но, с другой стороны, обладали достаточно длительным эффектом, а методика приема препаратов была максимально упрощена. Для достижения продолжительного эффекта при относительно невысоких дозировках вводимого агента можно применять два различных подхода: разработку агента, введение которого обеспечивает наработку антисмыслового олигонуклеотида непосредственно в организме реципиента в необходимых количествах, и увеличение времени «жизни» экзогенных антисмысловых нуклеотидов за счет их стабилизации различными методами, в том числе с помощью наночастиц.

Аденовирус. Первым подходом, который в значительной степени смог бы упростить методику применения антисмысловых олигонуклеотидов и способствовать тому, чтобы эффекты, вызываемые ими, сохранялись дольше, стало использование экспрессируемых векторов на основе аденовируса. Такие векторные системы способны трансдуцировать различные типы клеток: делящиеся и неделяющиеся, а также при их использовании достигаются высокие уровни экспрессии доставляемых генов. Исследования последних лет показали, что аденоассоциированные вирусы являются эффективными кардиотропными векторами (Cataliotti et al., 2011; Aguero et al., 2016).

В частности, в исследованиях гипертензии такой подход впервые применен для блокады АТ1-рецептора у крыс SHR. Причем у взрослых животных антигипертензивное действие, вызываемое однократным введением соответствующих модифицированных вирусных плазмид, могло длиться два месяца, а у молодых крыс применение такого подхода позволяло надолго отсрочить развитие ГБ

(Phillips, 1997). Позже в качестве гена-мишени для такого подхода был использован ген ренина (т. е. одно из начальных звеньев каскада PAC). Обнаружено, что при гипертензии, вызываемой холодовым воздействием, ингибирование мРНК гена ренина может быть очень эффективным мерой по сравнению с известным фармакологическим ингибированием этого фермента (Wang et al., 2005).

Преимущество данного метода – возможность добиться локальной продукции требуемого олигонуклеотида за счет того, что последовательности антисмысловых РНК, интегрированные в состав генома вирусной частицы, находятся под контролем тканеспецифичных промоторов. Это позволяет исследовать механизмы возникновения ГБ, в частности процессы, происходящие в мозге, где измененная экспрессия мРНК гена в конкретной структуре мозга может быть необходимой для формирования гипертензивного статуса при различных формах ГБ. Так, показано, что ингибирование синтеза АТ1-рецептора путем введения соответствующих конструкций в паравентрикулярное ядро гипоталамуса у крыс SHR может достаточно эффективно снижать АД, инактивировать симпатическую нервную систему, а также способствовать процессам ремоделирования миокарда и сосудов (Fan et al., 2012).

Следует отметить, что использование вирусных векторов имеет ряд ограничений, поскольку их применение может сопровождаться воспалительными реакциями или вызывать иммунный ответ. В связи с этим перспективы генной терапии, скорее всего, могут быть связаны с невирусными векторами, которые позволят осуществлять контролируемую во времени и безопасную доставку препаратов на основе нуклеиновых кислот для регуляции экспрессии генов в организме реципиента (Turnbull et al., 2016).

Наночастицы. В случае гипертонической болезни использование наночастиц в качестве транспортного агента для препаратов различной природы может иметь важное практическое значение, так как при некоторых формах болезни применимы неинвазивные способы введения наночастиц пациентам при сохранении всех остальных преимуществ данной методики.

В связи с этим потенциальная терапия легочной формы гипертонической болезни, связанной с дисфункцией синтеза оксида азота и измененным уровнем экспрессии генов некоторых других систем, исследована достаточно подробно и привела к многообещающим результатам: внутритрахеальное введение препарата аналога простаглицина в комплексе с наночастицами крысам с экспериментальной легочной гипертензией вызывала снижение артериального давления в правом желудочке, уменьшение степени гипертрофии правого желудочка и гладкомышечной стенки легочных артерий; наблюдалось отсутствие обычных побочных действий исследуемого препарата – воспалительных процессов, кровоизлияний или фиброза тканей печени, почки, селезенки и сердца (Nakamura et al., 2017).

Помимо этого, применение рапамицина как в свободной форме, так и в комплексе с наночастицами на основе полиэтиленгликоля также ослабляло развитие легочной формы артериальной гипертензии у крыс. Гистологический анализ выявил минимальные изменения в толщине легочной артерии и отсутствие ремоделирования желудочков сердца.

Важно отметить, что крысы, получавшие рапамицин в наночастицах, имели менее выраженные побочные эффекты препарата по сравнению с животными, получавшими свободный рапамицин (Segura-Ibarrá et al., 2017).

Ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа (PDE-5), в том числе силденафилцитрат (СЦ), также являются эффективными фармакологическими агентами в лечении легочной гипертензии (Barnett, Machado, 2006). Тем не менее СЦ можно применять только перорально или парентерально с большим количеством рисков. Точечная доставка СЦ в легкие посредством ингаляции предпочтительна. Недавно получены твердые наночастицы липидной природы, которые могут служить переносчиками СЦ. Однако, несмотря на все плюсы данного метода, требуются экспериментальные и клинические испытания, которые смогут гарантировать безопасность применения СЦ пациентами с легочной формой гипертонической болезни (Makled et al., 2017).

Иные способы терапии легочной гипертензии включают ингибирование простаглицлинового пути с использованием аналогов PGI₂ (илопрост, триптостинил, эпопростенол); ингибирование эндотелина (ET-1, участвующий в пролиферации гладких мышц и вазоконстрикции) с использованием антагонистов рецепторов эндотелина (например, босентана, матиентана и амбрисентана) (Chan, Loscalzo, 2008). Нет сомнений, что применение нанокompозитов, имеющих в своем составе препараты, направленные на упомянутые мишени, также будет исследовано в ближайшее время.

Следует отметить, что данные методы используют комплексы наночастиц с разнообразными фармакологическими агентами с присущими им недостатками, например ограниченной селективностью. Поэтому разработка комплексов наночастиц с антисмысловыми олигонуклеотидами, объединяющая сильные стороны обоих методов (длительный эффект однократного приема препарата, высокая селективность), стала бы наиболее оптимальным решением проблемы терапии разнообразных форм гипертонической болезни, в том числе легочной.

Нанокompозиты такого типа уже исследуются. Например, с помощью внутривенного введения композитов антисмысловых нуклеотидов и наночастиц полиэтиленгликоля и полиэтиленimina ингибировали синтез ангиотензиногена у крыс SHR со спонтанной гипертензией: процедура приводила к снижению АД на 30 ± 4 мм рт. ст., которое сохранялось в течение более 10 дней. Введение этих нанокompозитов привело к значительному снижению гипертрофии миокарда. Настоящее исследование показало, что подавление экспрессии гена ангиотензиногена оказывает значительное ингибирующее действие на гипертонию и сердечную гипертрофию у крыс SHR (Yuan et al., 2015). Тем не менее высокая степень инвазивности данного метода создает трудности для возможного применения его в клинической практике.

В работе (Repkova et al., 2017) проведено сравнение внутрибрюшинного и ингаляционного методов доставки антисмысловых последовательностей к гену ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в эксперименте на гипертонических крысах линии НИСАГ. Наследственная гипертензия крыс этой линии, обусловленная длительной селекцией на повышение АД в условиях мягкого эмоцио-

нального стресса, сопровождается, помимо прочего, изменениями экспрессии мРНК различных ферментов PАС, в том числе АПФ (Fedoseeva et al., 2013). Соответствующие антисмысловые ДНК-последовательности были связаны с полилизинном и диоксидом титана, образуя нанокompозиты вида TiO₂·PL-DNA. Подобные нанокompозиты на основе диоксида титана отличаются низкой токсичностью и высокой специфичностью, что доказано в ряде экспериментов по ингибированию репликации вируса гриппа А в клеточной системе (Levina et al., 2012, 2015, 2016).

В случае применения подобных нанокompозитов, содержащих антисмысловую олигонуклеотид, направленный на мРНК гена АПФ, ингаляционный метод рассматривался как предпочтительный подход для терапии гипертензии у крыс, так как АПФ синтезируется в основном в эндотелии легочных сосудов. Однако существуют некоторые методические ограничения данного способа, такие как отсутствие гарантии вдыхания крысами полного объема препарата, трудности в расчете концентрации и т. д. (эти трудности, однако, могут быть преодолены в работе с пациентами). При использовании ингаляционного метода введения нанокompозитов снижение АД у крыс НИСАГ было более выраженным (приблизительно на 30 мм рт. ст.), но менее продолжительным, чем при внутрибрюшинном введении. Тем не менее при ингаляционном методе пониженный уровень АД сохранялся в течение двух недель (Repkova et al., 2017). Таким образом, представляется перспективным дальнейшее изучение различных способов доставки нанокompозитного препарата АПФ, в том числе усовершенствование ингаляционного метода введения.

В заключение следует отметить, что с учетом достаточно большого объема накопленных сведений о механизмах ингибирования транскрипционной активности определенных генов с помощью антисмысловых последовательностей, а также активного исследования различных способов повышения эффективности препаратов антисмысловых олигонуклеотидов, в том числе в составе нанокompозитов, антисмысловая терапия гипертонических состояний представляет собой многообещающее и перспективное направление дальнейших исследований.

Разработка неинвазивных способов применения препаратов, установление подходящих для поставленных целей структур нанокompозитов, исследование соотношения длительности воздействия антисмысловой терапии и возможной токсичности препаратов важны для определения наиболее эффективных методик применения антисмысловых олигонуклеотидов в клинической практике.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-15-10073, and the Russian Ministry of Education and Science, State Project 0324-2018-0016.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aguero J., Ishikawa K., Hadri L., Santos-Gallego C.G., Fish K.M., Kohlbrenner E., Hammoudi N., Kho C., Lee A., Ibáñez B., García-Alvarez A., Zsebo K., Maron B.A., Plataki M., Fuster V., Leo-

- pold J.A., Hajjar R.J. Intratracheal gene delivery of SERCA2a ameliorates chronic post-capillary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016;67(17):2032-2046. DOI 10.1016/j.jacc.2016.02.049.
- Albinsson S., Skoura A., Yu J., DiLorenzo A., Fernández-Hernando C., Offermanns S., Miano J.M., Sessa W.C. Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PLoS ONE.* 2011;6(4):18869. DOI 10.1371/journal.pone.0018869.
- Ali Z.A. Making sense of antisense therapy for hypertension. *Hellenic J. Cardiol.* 2006;47(3):150-151.
- Barnett C.F., Machado R.F. Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* 2006;2(4):411-422.
- Bátka S., Thum T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets. *Curr. Hypertens. Rep.* 2012;14(1):79-87. DOI 10.1007/s11906-011-0235-6.
- Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloro-ethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967;8(37):3557-3562. DOI 10.1016/S0040-4039(01)89794-X.
- Bennet C.F., Swayze E.E. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010;50(1):259-293. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654.
- Bharali D.J., Klejbor I., Stachowiak E.K., Dutta P., Roy I., Kaur N., Bergery E.J., Prasad P.N., Stachowiak M.K. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(32):11539-11544. DOI 10.1073/pnas.0504926102.
- Bienertova-Vasku J., Novak J., Vasku A. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2015;9(3):221-234. DOI 10.1016/j.jash.2014.12.011.
- Boisguérin P., Deshayes S., Gait M.J., O'Donovan L., Godfrey C., Betts C.A., Wood M.J., Lebleu B. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:52-67. DOI 10.1016/j.addr.2015.02.008.
- Bonner J.C., Card J.W., Zeldin D.C. Nanoparticle-mediated drug delivery and pulmonary hypertension. *Hypertension.* 2009;53(5). DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.122846.
- Bouard D., Alazard-Dany N., Cosset F.-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* 2009;157(2):153-165. DOI 10.1038/bjp.2008.349.
- Cataliotti A., Tonne J.M., Bellavia D., Martin F.L., Oehler E.A., Harders G.E., Campbell J.M., Peng K.W., Russell S.J., Malatino L.S., Burnett J.C. Jr, Ikeda Y. Long-term cardiac pro-B-type natriuretic peptide gene delivery prevents the development of hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2011;123(12):1297-1305. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981720.
- Chan S.Y., Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008;44(1):14-30. DOI 10.1016/j.yjmcc.2007.09.006.
- Clare Zhang Y., Kimura B., Shen L., Phillips M.I. New beta-blocker: prolonged reduction in high blood pressure with beta(1) antisense oligodeoxynucleotides. *Hypertension.* 1979;35(1 Pt. 2):219-224. DOI 10.1161/01.HYP.35.1.219.
- De Jong W.H., Borm P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 2008;3(2):133-149.
- Deng L., Blanco F.J., Stevens H., Lu R., Caudrillier A., McBride M., McClure J.D., Grant J., Thomas M., Frid M., Stenmark K., White K., Seto A.G., Morrell N.W., Bradshaw A.C., MacLean M.R., Baker A.H. MicroRNA-143 activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 2015;117(10):870-883. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.115.306806.
- Dominiczak A.F. Genetic basis of blood pressure and hypertension. *J. Hypertens.* 2016;34:e33.
- Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* 2008;82(3):151-157. DOI 10.1007/s00204-007-0253-y.
- Fan Z., Zhang L., Shi Z., Gan X.B., Gao X.Y., Zhu G.Q. Artificial microRNA interference targeting AT1a receptors in paraventricular nucleus attenuates hypertension in rats. *Gene Ther.* 2012;19(8):810-817. DOI 10.1038/gt.2011.145.
- Farman C., Kornbrust D. Oligodeoxynucleotide studies in primates: antisense and immune stimulatory indications. *Toxicol. Pathol.* 2003;31(1):119-122. DOI 10.1080/01926230390174995.
- Fedoseeva L.A., Antonov E.V., Klimov L.O., Dymshits G.M., Markel A.L. Function of the renin-angiotensin-aldosterone system in the ISIAH rats with stress – sensitive arterial hypertension. Eds. A. Himura, T. Sato. *Renin-Angiotensin System.* N. Y.: Nova Science Publishers, Inc, 2013;1-44.
- Furberg C.D., Alderman M.H. JNC 8: Shortcomings in process and treatment recommendations. *Am. J. Hypertens.* 2014;27(12):1443-1445. DOI 10.1093/ajh/hpu158.
- Gyurko R., Wielbo D., Phillips M.I. Antisense inhibition of AT1 receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin. *Regul. Pept.* 1993;49(2):167-174.
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere.* 2008;71(7):1308-1316. DOI 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047.
- Jeng H.A., Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health, Part A.* 2006;41(12):2699-2711. DOI 10.1080/10934520600966177.
- Juliano R.L., Carver K. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:35-45. DOI 10.1016/j.addr.2015.04.005.
- Kagiyama S., Varela A., Phillips M.I., Galli S.M. Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;37(2 Pt. 2):371-375. DOI 10.1161/01.HYP.37.2.371.
- Kintsurashvili E., Gavras I., Johns C., Gavras H. Effects of antisense oligodeoxynucleotide targeting of the α 2B-adrenergic receptor messenger RNA in the central nervous system. *Hypertension.* 2001;38(5). DOI 10.1161/hy1101.093426.
- Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Malygin E.G., Mazurkova N.A., Zinov'ev V.V., Evdokimov A.A., Baborodin S.I., Zarytova V.F. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO₂-DNA nanocomposites. *Sci. Rep.* 2012;2:756. DOI 10.1038/srep00756.
- Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkova N.A., Makarevich E.V., Ismagilov Z.R., Zarytova V.F. Knockdown of different influenza A virus subtypes in cell culture by a single antisense oligodeoxyribonucleotide. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015;46(1):125-128. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.004.
- Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Nanoparticle-mediated nonviral DNA delivery for effective inhibition of influenza A viruses in cells. *IEEE Trans. Nanotechnol.* 2016;15(2):248-254. DOI 10.1109/TNANO.2016.2516561.
- Liang Y., Lin S., Zhou Y., Wang J., Yu X. Beta-1 adrenergic receptor antisense-oligodeoxynucleotides ameliorates left ventricular remodeling in 2-Kidney, 1-Clip rats. *J. Biomed. Sci.* 2007;14(1):155-164. DOI 10.1007/s11373-006-9128-0.
- Lim K. Retroviral integration profiles: their determinants and implications for gene therapy. *BMB Rep.* 2012;45(4):207-212.
- Ling S., Nanhwan M., Qian J., Kodakandla M., Castillo A.C., Thomas B., Liu H., Ye Y. Modulation of microRNAs in hypertension-induced arterial remodeling through the β 1 and β 3-adrenoreceptor pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013;65:127-136. DOI 10.1016/j.yjmcc.2013.10.003.
- Liu Y., Lou C., Yang H., Shi M., Miyoshi H. Silica nanoparticles as promising drug/gene delivery carriers and fluorescent nano-probes: recent advances. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2011;11(2):156-163.
- Makled S., Nafee N., Boraie N. Nebulized solid lipid nanoparticles for the potential treatment of pulmonary hypertension via targeted de-

- livery of phosphodiesterase-5-inhibitor. *Int. J. Pharm.* 2017;517(1): 312-321. DOI 10.1016/j.ijpharm.2016.12.026.
- Mescalchin A., Restle T. Oligomeric nucleic acids as antivirals. *Molecules.* 2011;16(12):1271-1296. DOI 10.3390/molecules16021271.
- Moore A.F., Heiderstadt N.T., Huang E., Howell N.L., Wang Z.Q., Siragy H.M., Carey R.M. Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure in conscious rats. *Hypertension.* 2001;37(5):1285-1291. DOI 10.1161/01.HYP.37.5.1285.
- Nakamura K., Matsubara H., Akagi S., Sarashina T., Ejiri K., Kawakita N., Yoshida M., Miyoshi T., Watanabe A., Nishii N., Ito H. Nanoparticle-mediated drug delivery system for pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Med.* 2017;6(5):48. DOI 10.3390/jcm6050048.
- Paranjpe M., Müller-Goymann C. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(4):5852-5873. DOI 10.3390/ijms15045852.
- Park J.H., Gu L., Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat. Mater.* 2009;8(4):331-336. DOI 10.1038/nmat2398.
- Parveen S., Misra R., Sahoo S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine.* 2012; 8(2):147-166. DOI 10.1016/j.nano.2011.05.016.
- Paunesku T., Rajh T., Wiederrecht G., Maser J., Vogt S., Stojičević N., Protić M., Lai B., Oryhon J., Thurnauer M., Woloschak G. Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites. *Nat. Mater.* 2003;2(5):343-346. DOI 10.1038/nmat875.
- Phillips M.I. Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2): 177-187. DOI 10.1161/01.HYP.29.1.177.
- Phillips M.I. Is gene therapy for hypertension possible? *Hypertension.* 1999;33(1):8-13. DOI 10.1161/01.HYP.33.1.8.
- Pletnev D., Evdokimov A., Belanov E., Malygin E., Balachnin S., Serova O., Zinoviev V., Zarytova V., Levina A., Repkova M., Ismagilov Z., Shikina N., Zagrebnyi S., Baiborodin S. Check of antiviral activity of nanocomposites with active check of antiviral activity of drugs based on nanocomposites, which contained oligonucleotides for direct splitting viral genome of influenza virus type A. *Antiviral Res.* 2008;78(2):A46. DOI 10.1016/j.antiviral.2008.01.092.
- Pullamsetti S.S., Doebele C., Fischer A., Savai R., Kojonazarov B., Dahal B.K., Ghofrani H.A., Weissmann N., Grimminger F., Bonauer A., Seeger W., Zeiher A.M., Dimmeler S., Schermuly R.T. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012;185(4):409-419. DOI 10.1164/rccm.201106-1093OC.
- Ravi Kumar M.N., Sameti M., Mohapatra S.S., Kong X., Lockey R.F., Bakowsky U., Lindenblatt G., Schmidt H., Lehr C.M. Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2004;4(7):876-881.
- Repkova M.N., Levina A.S., Seryapina A.A., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Zarytova V.F., Markel A.L. Toward gene therapy of hypertension: Experimental study on hypertensive ISIAH rats. *Biochemistry (Mosc.).* 2017;82(4):454-457. DOI 10.1134/S000629791704006X.
- Rosi N.L., Giljohann D.A., Thaxton C.S., Lytton-Jean A., Han M.S., Mirkin C.A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science.* 2006;312(5776). DOI 10.1126/science.1125559.
- Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Bharali D.J., Pudavar H.E., Mistretta R.A., Kaur N., Prasad P.N. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(2):279-284. DOI 10.1073/pnas.0408039101.
- Roy I., Stachowiak M.K., Bergery E.J. Nonviral gene transfection nanoparticles: function and applications in the brain. *Nanomedicine.* 2008;4(2):89-97. DOI 10.1016/j.nano.2008.01.002.
- Segura-Ibarra V., Amione-Guerra J., Cruz-Solbes A.S., Cara F.E., Iruegas-Nunez D.A., Wu S., Youker K.A., Bhimaraj A., Torre-Amione G., Ferrari M., Karmouty-Quintana H., Guha A., Blanco E. Rapamycin nanoparticles localize in diseased lung vasculature and prevent pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Pharm.* 2017;524(1): 257-267. DOI 10.1016/j.ijpharm.2017.03.069.
- Shenouda S., Johns C., Kintsurashvili E., Gavras I., Gavras H. Long-term inhibition of the central α 2B-adrenergic receptor gene via recombinant AAV-delivered antisense in hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 2006;19(11):1135-1143. DOI 10.1016/j.amjhyper.2006.04.001.
- Spurgers K.B., Sharkey C.M., Warfield K.L., Bavari S. Oligonucleotide antiviral therapeutics: Antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses. *Antivir. Res.* 2008;78:26-36. DOI 10.1016/j.antiviral.2007.12.008.
- Sugano M., Tsuchida K., Sawada S., Makino N. Reduction of plasma angiotensin II to normal levels by antisense oligodeoxynucleotides against liver angiotensinogen cannot completely attenuate vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2000; 18(6):725-731.
- Triantafyllidi H., Kintsurashvili E., Johns C., Gavras I., Gavras H. Central plasmid antisense administration reduces blood pressure inhibiting alpha2B adrenoceptor gene expression in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hellenic J. Cardiol.* 2006;47(3):144-149.
- Turnbull I.C., Eltoukhy A.A., Fish K.M., Nonnenmacher M., Ishikawa K., Chen J., Hajjar R.J., Anderson D.G., Costa K.D. Myocardial delivery of lipidoid nanoparticle carrying modRNA induces rapid and transient expression. *Mol. Ther.* 2016;24(1):66-75. DOI 10.1038/mt.2015.193.
- Wang H., Reaves P.Y., Gardon M.L., Keene K., Goldberg D.S., Gelband C.H., Katovich M.J., Raizada M.K. Angiotensin I-converting enzyme antisense gene therapy causes permanent antihypertensive effects in the SHR. *Hypertension.* 2000;35(1). DOI 10.1161/01.HYP.35.1.202.
- Wang X., Sun Z., Cade R. Prolonged attenuation of cold-induced hypertension by adenoviral delivery of renin antisense. *Kidney Int.* 2005;68(2):680-687. DOI 10.1111/j.1523-1755.2005.00446.x.
- Wickstrom E. DNA and RNA derivatives to optimize distribution and delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:25-34. Available at: DOI 10.1016/j.addr.2015.04.012.
- Xie X., Atkins E., Lv J., Bennett A., Neal B., Ninomiya T., Woodward M., MacMahon S., Turnbull F., Hillis G.S., Chalmers J., Mant J., Salam A., Rahimi K., Perkovic V., Rodgers A. Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2016; 387(10017):435-443. DOI 10.1016/S0140-6736(15)00805-3.
- Yuan L., Sheng J., Lu P., Wang Y.Q., Jin T., Du Q. Nanoparticle-mediated RNA interference of angiotensinogen decreases blood pressure and improves myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Med. Rep.* 2015;12(3):4657-4663. DOI 10.3892/mmr.2015.3909.
- Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978;75(1):280-284.
- Zhang Y.C., Bui J.D., Shen L., Phillips M.I. Antisense inhibition of beta(1)-adrenergic receptor mRNA in a single dose produces a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2000;101(6):682-688.
- Zheng L., Xu C.C., Chen W.D., Shen W.L., Ruan C.C., Zhu L.M., Zhu D.L., Gao P.J. MicroRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression and phenotypic differentiation in vascular adventitial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;400(4):483-488. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.08.067.