

## Κλινική Έρευνα

## Η Κεντρική Γονιδιακή Αναστολή των $[\alpha]_{2B}$ Αδρενουποδοχέων δια της Χορήγησης Antisense (Αντιδρόμου) Plasmid DNA Οδηγεί σε Ελάττωση της Αρτηριακής Πίεσης σε Γενετικά Υπερτασικούς Επίμυες (SHR) in Vivo

ΕΛΕΝΗ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗ, ΕΚΑΤΕΡΙΝΑ ΚΙΝΤΣΟΥΡΑΧΒΙΛΙ, CONRADO JOHNS, ΕΙΡΗΝΗ ΓΑΒΡΑ, ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΓΑΒΡΑΣ

*Hypertension and Atherosclerosis Section, Department of Medicine, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts*

Λέξεις ευρετηρίου:  
Υπέρταση, γενετικά τροποποιημένοι επίμυες (SHR), αδρενεργικοί υποδοχείς  $[\alpha]_{2B}$ , τεχνολογία αντιδρόμου DNA.

Ημερ. παραλαβής εργασίας:  
25 Οκτωβρίου 2005·  
Ημερ. αποδοχής:  
27 Φεβρουαρίου 2006

Διεύθυνση  
Επικοινωνίας:  
Ελένη  
Τριανταφυλλίδη

Α. Κηφισίας 129,  
Τ.Κ. 115 25, Αθήνα  
e-mail:  
[seliani@hotmail.com](mailto:seliani@hotmail.com)

**Εισαγωγή:** Η συμμετοχή των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων (AR) στη διατήρηση της υπερτάσεως έχει αποδειχθεί διαμέσου μίας σειράς πειραμάτων, τουλάχιστον στο πειραματικό μοντέλο της νεφρογενούς αλατοεξαρτώμενης υπέρτασης. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  AR στην υπέρταση με την εφαρμογή της τεχνολογίας του αντιδρόμου DNA σε ένα άλλο πειραματικό μοντέλο υπέρτασης, τους γενετικά υπερτασικούς επίμυες (SHR).

**Μέθοδος-Αποτελέσματα:** Αντίδρομο DNA (AS-DNA) έναντι του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  AR με τη συμμετοχή πλασμιδίου ως φορέα χορηγήθηκε στην πλάγια κοιλία του εγκεφάλου σε διατρεφόμενα με εμπλουτισμένη αλατούχο τροφή SHRs (ομάδα AS) ενώ στην ομάδα control (ομάδα PL) χορηγήθηκε μόνο ο πλασμιδικός φορέας. Στην ομάδα AS διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) κατά  $31 \pm 12$  mmHg κατά μέσο όρο μέσα στις πρώτες είκοσι ώρες μετά την έγχυση του γενετικού υλικού. Στην ίδια ομάδα τα επίπεδα της ΑΠ μειώθηκαν την πρώτη ημέρα μετά την έγχυση από  $204 \pm 5,3$  mm Hg σε  $176,8 \pm 2,9$  mmHg ( $p=0,02$ ). Αντίθετα δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές της ΑΠ στην ομάδα ελέγχου. Οι δύο ομάδες πειραματόζων διατήρησαν σταθερό σωματικό βάρος κατά τη διάρκεια του πειράματος. Δεδομένου ότι η ακεραιότητα των ιστών είχε διατηρηθεί μετά την κεντρική έγχυση του αντιδρόμου DNA σε όλες τις εγκεφαλικές τομές των SHR που μελετήθηκαν, πιστεύεται ότι ο πυρήνας της μονήρους δεσμίδας (NTS) θα πρέπει να αποτελεί μία από τις θέσεις έκφρασης του γονιδίου των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  AR.

**Συμπεράσματα:** Η κεντρική έγχυση αντιδρόμου DNA έναντι του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων στο γενετικό υπερτασικό μοντέλο των SHR φαίνεται ότι οδηγεί σε σημαντικό αντιυπερτασικό αποτέλεσμα τουλάχιστον την πρώτη ημέρα μετά την έγχυση. Ο πυρήνας της μονήρους δεσμίδας (NTS) αποτελεί τον πρωτεύοντα πυρήνα δράσης των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων στα SHR.

**Η** υπέρταση αποτελεί μείζονα πα-  
ράγοντα κινδύνου για ποικίλες  
παθοφυσιολογικές καταστάσεις  
και νοσήματα μεταξύ των οποίων η αθη-  
ρωμάτωση, το αγγειακό εγκεφαλικό επει-  
σόδιο, η στεφανιαία νόσος, η καρδιακή

ανεπάρκεια, η περιφερική αγγειακή νό-  
σος και η νεφρική ανεπάρκεια. Το συ-  
μπαθητικό νευρικό σύστημα (ΣΝΣ) με  
τους αδρενουποδοχείς του (AR), κεντρι-  
κούς και περιφερικούς, παίζει σημαντικό  
ρόλο ως προς την ανάπτυξη αλλά και δια-

τήρηση της υπερτάσεως. Έχει αποδειχθεί ότι ενώ η διέγερση των  $[\alpha]_1$  αδρενοϋποδοχέων αυξάνει την αρτηριακή πίεση, οι  $[\alpha]_2$  αδρενοϋποδοχείς αναστέλλοντας την απελευθέρωση της νοραδρεναλίνης από τις νευρικές απολήξεις,<sup>1</sup> είναι δυνατόν να οδηγήσουν είτε σε υπερτασική, ( $[\alpha]_{2A}$ ), είτε σε υποτασική απάντηση, ( $[\alpha]_{2B}$ ).

Προηγούμενες μελέτες μας σε γενετικά τροποποιημένα επίμυες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι κεντρικοί  $[\alpha]_{2A}$  AR αποτελούν τον κυρίαρχο υπότυπο όσον αφορά την ανάπτυξη και διατήρηση της υπερτάσεως. Ταυτόχρονα διαπιστώθηκε ότι η αλατοεξααρτώμενη υπέρταση εξαρτάται κυρίως από τη διέγερση των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  AR, αφού η υποβολή σε ατελή νεφρεκτομή ποντικών με έλλειψη του ζεύγους γονιδίων των  $[\alpha]_{2B}$  AR, οδηγεί σε ανεπαρκή αύξηση της αρτηριακής πίεσης σαν απάντηση στην χρόνια φόρτιση με άλας.<sup>2-4</sup>

Οι γενετικά υπερτασικοί επίμυες (SHR) αποτελούν ένα γενετικό μοντέλο υπέρτασης ευρέως χρησιμοποιούμενο στην έρευνα. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του μοντέλου αυτού, είναι ότι εμφανίζει παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς της υπέρτασης σε ανθρώπους.<sup>5-6</sup>

Η υπέρταση ως μακροχρόνια πάθηση είναι φυσικό να εμφανίζει περιορισμούς στη θεραπεία της όπως η πτωχή συμμόρφωση των ασθενών, οφειλόμενη σε ένα βαθμό στις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων καθώς και στην ανάγκη καθημερινής τους χορήγησης. Ως εκ τούτου η διερεύνηση ανάπτυξης νέων θεραπευτικών στρατηγικών κρίνεται αναγκαία. Η γονιδιακή θεραπεία βασισόμενη σε υπερέκφραση ή αναστολή συγκεκριμένων γονιδίων αποτελεί μία νέα προσέγγιση στην θεραπευτική αντιμετώπιση της υπερτάσεως πλεονεκτώντας έναντι της σημερινής φαρμακευτικής θεραπείας ως προς την ειδικότητα και τη μεγαλύτερη διάρκεια των αποτελεσμάτων. Η στρατηγική χορήγησης αντίδρομου DNA (antisense), διαμέσου ενός αριθμού μηχανισμών, προσφέρει τη συναρπαστική δυνατότητα αναστολής της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου χωρίς να επηρεαστεί η λειτουργικότητα άλλων γονιδίων<sup>7</sup> αφού μόνο η παραγωγή των πρωτεϊνών-στόχων μειώνεται. Θεωρείται ότι η γενετική προσέγγιση της υπέρτασης με την χρήση της ορθόδρομης (sense) ή αντίδρομης (antisense) τεχνολογίας, θα αποτελέσει την θεραπεία εκλογής του μέλλοντος.<sup>8</sup>

Πρόσφατες μελέτες μας επί του πειραματικού μοντέλου της αλατοεξααρτώμενης υπέρτασης σε επίμυες Wistar-Kyoto, με την χρήση της τεχνολογίας των αντίδρομων ολιγονουκλεοτιδίων (antisense

oligodeoxynucleotide, AS-ODN) έναντι του  $[\alpha]_{2B}$  mRNA αλλά και την κεντρική χορήγηση antisense (AS) DNA διαμέσου πλασμιδικού (plasmid) φορέα, έναντι του γονιδίου του  $[\alpha]_{2B}$  AR, οδήγησαν σε σημαντική πτώση της αρτηριακής πίεσης για αρκετές ώρες ή αρκετές ημέρες αντίστοιχα.<sup>9-10</sup> Τα ανωτέρω περιγραφόμενα ευρήματα είναι ενδεικτικά τόσο του σημαντικού ρόλου των πλήρως λειτουργικών κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  AR στο μοντέλο της αλατοεξααρτώμενης υπέρτασης όσο και των δυνατοτήτων της γονιδιακής θεραπείας της υπέρτασης.

Με σκοπό να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  AR στην υπέρταση, χορηγήσαμε εντός της πλάγιας κοιλίας του εγκεφάλου, antisense (αντίδρομο) plasmid DNA έναντι των  $[\alpha]_{2B}$  AR, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό μοντέλο υπέρτασης τους γενετικά υπερτασικούς επίμυες (SHR).

## Υλικό και Μέθοδος

Τόσο η σύνθεση και προετοιμασία του πλασμιδίου όσο και ο *in vitro* έλεγχος της αποτελεσματικότητας του στα NG108-15 κύτταρα δια της αναστολής της πρωτεϊνικής έκφρασης έχουν ήδη περιγραφεί.<sup>9</sup>

## Πειραματικό μοντέλο

Δεκαεπτά άρρενες (17) γενετικά υπερτασικοί επίμυες (SHR), ηλικίας 11-19 εβδομάδων και βάρους 245-325 g χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, σύμφωνα με τις οδηγίες της επιτροπής for the Care and Use of Animals του Boston University Medical Center.

Υπό γενική αναισθησία με pentobarbital (50mg/kg ενδοπεριτοναϊκά), εμφυτεύτηκε ένας PA-C40 καθετήρας μετάδοσης της αρτηριακής πίεσης με τη μέθοδο της ραδιοτηλεμετρίας στην αορτή κάθε αρουραίου (Data Sciences International, St. Paul, MN). Το άπω, μήκους ενός εκατοστού, άκρο του καθετήρα (0,7 mm διάμετρος) εισήχθη αντίθετα με την αιματική ροή στην κοιλιακή αορτή άνωθεν του διχασμού της και σταθεροποιήθηκε με δύο σταγόνες μίας βιολογικής κόλλας και ενός 2 mm<sup>2</sup> cellulose fiber patch (επίθεμα από ίνες cellulose) στο σημείο εισόδου στην αρτηρία. Ακολούθησε συρραφή του σώματος του καθετήρα μετάδοσης στο κοιλιακό τοίχωμα. Την ίδια ημέρα μία 24 gauge οδηγός κάνουλα (Plastic One, Roanoke, VA) εμφυτεύθηκε στερεοταξικά στην αριστερή πλάγια κοιλία του εγκεφάλου, σύμφωνα με τις ακόλουθες παραμέτρους: 0,8 mm όπισθεν του βρέγματος, 1,3 mm επί του εκτός της μέσης γραμμής και 3,5 mm κάτωθεν της κρανιακής επιφανείας. Η

κάνουλα σταθεροποιήθηκε στο κρανίο με 3 βίδες και κρανιοπλαστικό τσιμέντο.

Πέντε έως επτά ημέρες αργότερα τα πειραματόζωα είχαν πλήρως αναρρώσει. Η αρτηριακή πίεση και η καρδιακή συχνότητα καταγράφηκαν για τρεις συνεχείς ημέρες με τα πειραματόζωα να λαμβάνουν φυσιολογική δίαιτα και στη συνέχεια για τρεις εβδομάδες με λήψη εμπλουτισμένης δίαιτας με 8% NaCl. Όλες οι καταγραφές αποθηκεύονταν σε ένα σύστημα ραδιοτηλεμετρίας διαβίβασης/παραλαβής στοιχείων (Data Sciences International, St. Paul, MN), το οποίο επιτρέπει στα πειραματόζωα να κινούνται ελεύθερα στα κλουβιά τους χωρίς φαρμακευτικούς ή φυσικούς περιορισμούς, στοιχεία που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αιμοδυναμικές παραμέτρους, όπως η αρτηριακή πίεση και η καρδιακή συχνότητα.

Την ημέρα της κεντρικής έγχυσης του πλασμιδικού AS-DNA (πλασμιδικό DNA με προσθήκη γενετικού υλικού antisense ως προς τον υποδοχέα  $\alpha 2B$ ) ή μόνο του πλασμιδικού DNA, ένας 31-gauge καθετήρας (Plastic One, Roanoke, VA) εισήλθε εντός του οδηγού καθετήρα προβάλλοντας εντός της πλαγίας κοιλίας του εγκεφάλου ένα mm χαμηλότερα από αυτόν ( $4,5 \text{ mm} + 1 \text{ mm} = 5,5 \text{ mm}$ ) και συνδεδεμένος στο εξωτερικό άκρο του με μία αντλία έγχυσης Harvard (model PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA). Οι εγχύσεις γίνονταν διαμέσου μίας Hamilton σύριγγας των 25  $\mu\text{l}$ .

Χορηγήθηκαν 500  $\mu\text{g}$  του pAd-Track-CMV-[ $\alpha$ ]-ha]<sub>2B</sub>-AR-AS σε οκτώ επίμυες (ομάδα AS, n=8) ή pAd-Track-CMV σε εννέα επίμυες (ομάδα PL, n=9), διαλυμένα σε 20  $\mu\text{l}$  ενός ρυθμιστικού διαλύματος 150 mmol/l sodium phosphate με ρυθμό 0,125  $\mu\text{l}/\text{min}$  για περισσότερο από 2 ώρες. Κατά τη διάρκεια του πειράματος οι επίμυες ήταν σε εγρήγορη και ελεύθεροι να κινηθούν στο κλουβί τους.

Η αρτηριακή πίεση και η καρδιακή συχνότητα καταγράφονταν για περιόδους 30" κάθε 2' για το χρονικό διάστημα ενός επταημέρου. Στο τέλος του πειράματος ακολούθησε ευθανασία των επιμύων και μελετήθηκε σε κάθε πειραματόζωο η θέση της κάνουλας μέσα στην πλάγια κοιλία του εγκεφάλου ενώ επιβεβαιώθηκε ιστολογικά και η ακεραιότητα των περιβαλλόντων ιστών.

Για να επιβεβαιωθεί η κατανομή του χορηγούμενου γενετικού υλικού εντός του εγκεφαλικού ιστού επιλέγησαν τρία πειραματόζωα στα οποία στο τέλος του πειράματος έγινε έγχυση διάρκειας 2-2,5h στην αριστερή πλάγια κοιλία του εγκεφάλου 500 $\mu\text{g}$  of pAd-Track-CMV-[ $\alpha$ ]<sub>2B</sub>-AR-AS με ενσωματωμένη την GFP (green fluroskein protein). Μετά από 72h

τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν και υπέστησαν ευθανασία. Οι εγκεφαλοι καταψύχθηκαν και στη συνέχεια με τη βοήθεια κρουτόμου κόπηκαν σε τομές πάχους 30  $\mu\text{m}$ . Η παρουσία του γενετικού υλικού επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του μικροσκοπίου φθορίζουσας χρωστικής, δια της ανιχνεύσεως της GFP.

### Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν τόσο στην ίδια ομάδα αλλά και μεταξύ των ομάδων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του paired και unpaired Student t-test αντίστοιχα, θεωρήθηκαν δε στατιστικά σημαντικές αν  $p < 0,05$ .

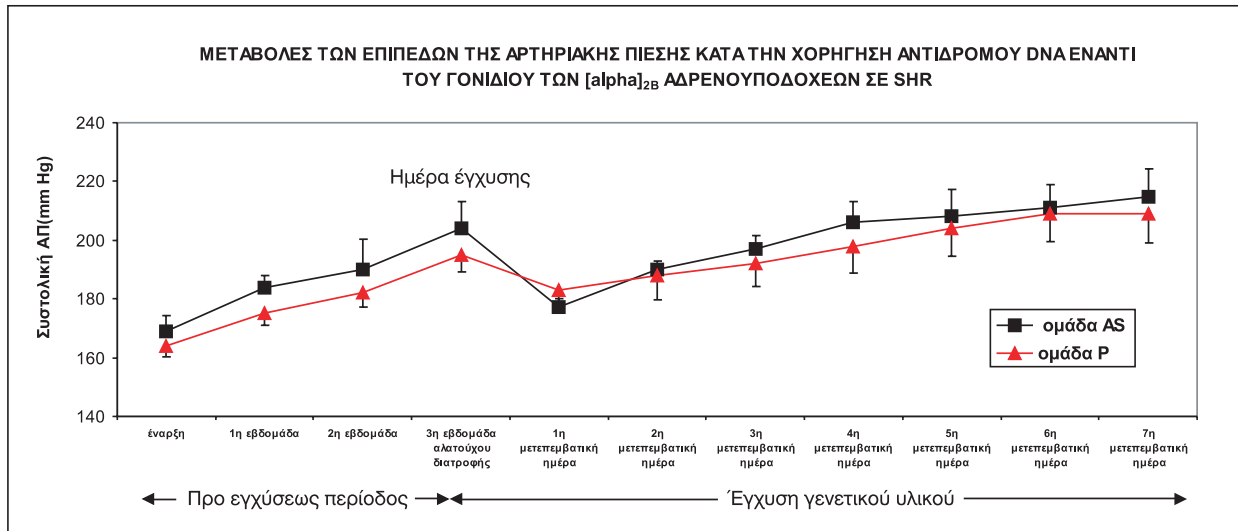
### Αποτελέσματα

Τα SHR είναι γενετικά υπερτασικοί επίμυες, οι οποίοι αναπτύσσουν υπέρταση όταν ενηλικιωθούν. Πράγματι οι SHR και των δύο ομάδων εμφάνιζαν στην έναρξη του πειράματος υψηλές βασικές τιμές αρτηριακής πίεσης, οι οποίες αυξήθηκαν περαιτέρω μετά την φόρτιση με άλας (ομάδα AS, πριν  $168,7 \pm 5,3 \text{ mmHg}$  έναντι μετά  $203,7 \pm 9 \text{ mmHg}$ ,  $p < 0,01$  και ομάδα PL, πριν  $164 \pm 3,9 \text{ mmHg}$  έναντι μετά  $195,1 \pm 6 \text{ mmHg}$ ,  $p = 0,001$ ).

Μετά την ενδοκοιλιακή έγχυση του γενετικού υλικού ακολούθησε καταγραφή της αρτηριακής πίεσης και της καρδιακής συχνότητας σε όλα τα πειραματόζωα για επτά συνεχείς ημέρες (Εικόνα 1). Η ομάδα AS εμφάνισε μία στατιστικά σημαντική μείωση της αρτηριακής πίεσης κατά μέσο όρο  $31 \pm 12 \text{ mmHg}$  μέσα στις πρώτες είκοσι ώρες μετά την έγχυση. Τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης για τις πρώτες ημέρες μετά την έγχυση ήταν:  $176,8 \pm 2,9 \text{ mmHg}$  ( $p = 0,02$ ),  $189,7 \pm 2,9 \text{ mmHg}$  ( $p = \text{NS}$ ) and  $197,3 \pm 4,8 \text{ mmHg}$  ( $p = \text{NS}$ ) την πρώτη, δεύτερη και τρίτη ημέρα αντίστοιχα. Επακόλουθα η αρτηριακή πίεση ανέκαμψε σταδιακά φθάνοντας στα προ εγχύσεως επίπεδα κατά την τέταρτη ημέρα ( $206,1 \pm 7,3 \text{ mmHg}$ ) ενώ αυξήθηκε περισσότερο αλλά όχι στατιστικά σημαντικά την έβδομη ημέρα ( $215,1 \pm 9,9 \text{ mmHg}$ ).

Αντίθετα, στην ομάδα PL διαπιστώθηκε μία μη στατιστικά σημαντική πτώση της αρτηριακής πίεσης κατά τις πρώτες τρεις ημέρες μετά την έγχυση, η οποία μετατράπηκε σε μία προοδευτικά μη σημαντικά αύξηση κατά την τέταρτη ημέρα.

Στην ομάδα AS διαπιστώθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της καρδιακής συχνότητας κατά την



**Εικόνα 1.** Καταγράφεται το αποτέλεσμα επί της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) μετά την κεντρική χορήγηση αντίδρομου DNA με πλασμιδικό φορέα (ομάδα AS) ή μόνο πλασμιδικού φορέα (ομάδα PL) έναντι του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων σε SHR διατροφόμενα με εμπλουτισμένη αλατούχο διαίτα. Η συστολική ΑΠ ήταν ήδη αυξημένη πριν την έναρξη του πειράματος και επακόλουθα αυξήθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό κατά τη διάρκεια των τριών εβδομάδων αλατούχου διατροφής. Η έγχυση του αντίδρομου DNA οδήγησε σε μία άμεση πτώση της ΑΠ της ομάδας AS, με μέγιστη τιμή στις 20 ώρες, και προοδευτική επιστροφή της στα προ έγχυσης επίπεδα κατά τη διάρκεια των επόμενων επτά ημερών. Στην ομάδα PL δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της ΑΠ παρά μία σταδιακή αύξηση αυτής κατά την διάρκεια των επόμενων επτά ημερών. \*  $p < 0.05$  έναντι των επιπέδων ΑΠ προ της έγχυσης γενετικού υλικού.

πρώτη ημέρα μετά την έγχυση, η οποία αποκαταστάθηκε κατά τη δεύτερη ημέρα. Αντίθετα στην ομάδα PL η καρδιακή συχνότητα αυξήθηκε κατά την πρώτη ημέρα μετά την έγχυση από  $313 \pm 5,8$  σφ/min σε  $342,2 \pm 5,4$  σφ/min ( $p < 0,01$ ) ενώ στη συνέχεια αποκαταστάθηκε στα προ εγχύσεως επίπεδα.

Όσον αφορά το σωματικό βάρος και οι δύο ομάδες πειραματόζωων παρουσίασαν μία μικρή μη σημαντική μείωση αυτού, η οποία παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Κανένα πειραματόζωο δεν εμφάνισε στοιχεία νευροτοξικότητας.

Διαπιστώθηκε από τη μελέτη των κατεψυγμένων εγκεφαλικών τομών ότι η πρόσληψη του AS DNA από τον εγκεφαλικό ιστό και η επακόλουθη έκφραση της GFP δεν ήταν διάχυτη αλλά περιορίστηκε σε συγκεκριμένες περιοχές παρακείμενες στην τρίτη και τέταρτη κοιλία του εγκεφάλου. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της GFP παρατηρήθηκαν στον πυρήνα της μονήρους δεσμίδας (NTS).

### Συζήτηση

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς και ιδιαίτερα οι υπότυποι τους,  $[\alpha]_{2A}$ ,  $[\alpha]_{2B}$ , και  $[\alpha]_{2C}$  φαίνεται ότι συμμετέχουν μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστή-

ματος στην ομοίωση της αρτηριακής πίεσης. Ιδιαίτερα οι  $[\alpha]_{2B}$  αδρενεργικοί υποδοχείς συμβάλλουν διαμέσου μίας συμπαθητικοτονικής διέγερσης στην κεντρική ρύθμιση του αγγειακού τόνου.<sup>14</sup>

Ανασκοπώντας μία σειρά μελετών, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε γενετικά τροποποιημένα επίμνες (knock-out), συμπεραίνουμε ότι μόνο εκείνα τα πειραματόζωα στα οποία απουσίαζε το γονίδιο των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων παρουσίαζαν μειωμένη υπερασική απάντηση σε συνθήκες μερικής νεφρεκτομής και χρόνιας φόρτισης με άλας σε σύγκριση με εκείνα εκ των οποίων έλειπαν τα γονίδια των  $[\alpha]_{2A}$  ή των  $[\alpha]_{2C}$  αδρενουποδοχέων.<sup>3,15-20</sup>

Πρόσφατα και χρησιμοποιώντας στο εργαστήριο μας την τεχνολογία του αντίδρομου DNA και των ολιγονουκλεοτιδίων (ODNs) καταλήξαμε ότι η κεντρική αναστολή της μετάφρασης του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων οδήγησε σε καταστολή της αναμενόμενης ανόδου της αρτηριακής πίεσης σε ένα πειραματικό μοντέλο αλατοεξαρωτώμενης υπέρτασης.<sup>9</sup> Επακόλουθα χρησιμοποιώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο υπέρτασης έναντι του γονιδίου των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  αδρενουποδοχέων και αντικαθιστώντας τα AS-ODNs με αντίδρομο DNA (AS DNA) διαμέσου πλασμιδικού φορέα (plasmid vector) επιτύ-

χαμε να αντιστρέψουμε την αναμενόμενη υπερτασική απάντηση για αρκετές ημέρες.<sup>10</sup>

Η συμμετοχή των κεντρικών  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχέων στη διατήρηση της υπέρτασης αποδείχθηκε από το σύνολο αυτών των πειραματικών σειρών τουλάχιστον όσον αφορά το μοντέλο της νεφρογενούς αλατοεξαρτώμενης υπέρτασης.<sup>21</sup>

Σε αντίθεση με την μέχρι σήμερα εφαρμοζόμενη αντιυπερτασική θεραπεία, η οποία απαιτεί καθημερινή λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων, η γονιδιακή θεραπεία όπου το DNA χορηγείται γυμνό ή με τη βοήθεια ειδικών φορέων (ιοί, πλασμίδια) υπόσχεται μακρόχρονα θεραπευτικά αποτελέσματα.<sup>22</sup> Επί του παρόντος χρησιμοποιούνται δύο στρατηγικές μέθοδοι: των αντίδρομων ολιγονουκλεοτιδίων (AS-ODN) and του αντίδρομου DNA (AS-DNA) μεταφερόμενου με ιούς ως φορείς έναντι γονιδίων με αγγειοσυσταστικές ιδιότητες.<sup>23-25</sup> Η αντίδρομη τεχνολογία επιτρέπει την αναστολή της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου διαμέσου της παραγωγής m-RNA, χωρίς να επηρεάζεται η λειτουργικότητα άλλων γονιδίων.<sup>26</sup> Κλινικές μελέτες χρησιμοποιώντας την αντίδρομη τεχνολογία έναντι του AIDS, νεοπλασματικών νόσων και ποικίλων άλλων γενετικών ή επίκτητων νοσημάτων δεικνύουν την κλινική αποτελεσματικότητα της.<sup>27</sup>

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για τη γονιδιακή θεραπεία της υπέρτασης είναι η μεταφορά του γενετικού υλικού. Τα πλασμίδια μοιάζουν αποτελεσματικοί και ασφαλείς φορείς αφού δεν ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό. Η προετοιμασία και η χρήση των πλασμιδίων, σε αντίθεση με τους αδενοσχετιζόμενους ιούς (adeno-associated virus, AAV), είναι απλή και ταυτόχρονα δεν υφίστανται περιορισμό στο μέγεθος του γενετικού υλικού προς μεταφορά. Το αντιυπερτασικό αποτέλεσμα διαρκεί μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τους ιούς ως φορείς, οδηγώντας έτσι σε μείωση της αρτηριακής πίεσης για μία περίπου εβδομάδα.<sup>28-29</sup> Οι ιοί ως φορείς χρησιμοποιούμενοι για γονιδιακή μεταφορά αν και είναι πιο αποτελεσματικοί μπορεί να οδηγήσουν σε χρωματοσωμική ενσωμάτωση τους με αποτέλεσμα χρωματοσωμικές ρήξεις ή καρκινογενέσεις.<sup>22</sup> Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι ότι οι ιοί χρειάζονται χρόνο ώστε η γενετική μηχανική να αποδείξει την ασφάλεια τους αλλά πιθανότατα στο μέλλον θα χρησιμοποιηθούν εκτενώς για τον παρατεταμένο έλεγχο της αρτηριακής πίεσης. Μέχρι τότε η ανάπτυξη και χρησιμοποίηση των AS-ODN μάλλον θα προηγηθεί αφού μπορούν να δράσουν σαν αντιυπερτασικά φάρμακα με μακροχρόνια αποτελέσματα.<sup>23-25</sup>

Στη μελέτη μας επιλέξαμε ένα πλασμιδικό φο-

ρέα, τον pAdTrak-CMV, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή GFP-ανιχνεύσιμων αδενοϊών, κάτω από την επίδραση ενός ισχυρού promoter.<sup>12</sup> Ο ίδιος φορέας είχε επιλεγεί και όταν επιτύχαμε να μειώσουμε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό την αρτηριακή πίεση σε υφολικά νεφρεκτομημένους τρεφόμενους με αλατούχο τροφή επίμυες, χρησιμοποιώντας AS πλασμιδικό DNA έναντι του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχέων. Στο ίδιο πείραμα παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχέων *in vitro* και *in vivo*.<sup>10</sup>

Τα γονίδια των  $B_1$  υποδοχέων, των υποδοχέων ασβεστίου και της καλκικρεΐνης απέτελεσαν αντίστοιχα στόχο αντίδρομης ή ορθόδρομης γονιδιακής θεραπείας.<sup>25</sup> Η χορήγηση του γονιδίου της ανθρώπινης καλκικρεΐνης προκάλεσε εμμένουσα πτώση της αρτηριακής πίεσης στα SHR διάρκειας έξι εβδομάδων.<sup>22</sup> Αλλά και η χορήγηση  $\beta 1$ -AS-ODN έναντι των  $\beta 1$  αδρενοϋποδοχέων σε SHR προκάλεσε σημαντική και παρατεταμένη μείωση στην αρτηριακή πίεση για ένα χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων χωρίς να επηρεάσει την καρδιακή συχνότητα.<sup>27</sup> Όταν το σύστημα RAS αποτέλεσε στόχο εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα. Η πρόσφατη εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας σε SHR έχει οδηγήσει σε εμμένουσα μείωση τόσο των επιπέδων και του ρυθμού αύξησης της υπερτασικής απάντησης όσο και της εμφάνισης υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας με τη χορήγηση μίας εφάπαξ δόσεως αντίδρομου DNA έναντι του γονιδίου του αγγειοτενσινογόνου ή των υποδοχέων AT1. Η μείωση της αρτηριακής πίεσης που παρατηρήθηκε μετά τη συστηματική χορήγηση αντίδρομων ολιγονουκλεοτιδίων (AS-ODN) ή αντίδρομου DNA (AS DNA) έναντι του γονιδίου του αγγειοτενσινογόνου σε SHR διατηρήθηκε από μερικές μέρες μέχρι μία εβδομάδα. Η χρησιμοποίηση κατιονικών λιπιδίων οδήγησε σε ενίσχυση του αντιυπερτασικού αποτελέσματος.<sup>28,30</sup> Η ενδοκαρδιακή χορήγηση AS DNA έναντι του γονιδίου των υποδοχέων AT1 με ιό ως φορέα σε SHR, αφενός οδήγησε σε σημαντική μακροχρόνια μείωση της αρτηριακής πίεσης για χρονικό διάστημα έως 36 ημερών και αφετέρου ανέστρεψε την νεφραγγειακή παθολογία.<sup>31</sup> Τέλος, όταν χορηγήθηκε AS DNA έναντι του γονιδίου του μεταρρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) σε SHR, διαπιστώθηκε ελάττωση των υψηλών επιπέδων της αρτηριακής πίεσης σε συνδυασμό με την πρόληψη εμφάνισης καρδιακών και νεφραγγειακών παθολογικών μεταβολών.<sup>32</sup>

Στη μελέτη μας, ενήλικες επίμυες SHR διατρεφόμενοι με τροφή εμπλουτισμένη με άλας, υποβλήθηκαν σε μία εφάπαξ κεντρική ενδοκοιλιακή έγχυση πλασμιδικού AS-DNA έναντι του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχέων. Η καταγραφή των μεταβολών της αρτηριακής πίεσης και καρδιακής συχνότητας γίνονταν σε κατάσταση εγρήγορσης του πειραματόζωου αφού είναι γνωστή η επίδραση της αναισθησίας στις καρδιαγγειακές αιμοδυναμικές παραμέτρους. Διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της αρτηριακής πίεσης τις πρώτες είκοσι ώρες μετά την έγχυση που έφθασε μέχρι 31 mmHg. Η αρτηριακή πίεση διατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη μόνο κατά την πρώτη μέρα μετά τη χορήγηση του πλασμιδικού AS-DNA και στη συνέχεια αυξήθηκε σταδιακά για να φθάσει τα προ εγχύσεως επίπεδα την τέταρτη ημέρα. Η ειδικότητα του αντιυπερτασικού αποτελέσματος της κεντρικής χορήγησης πλασμιδικού AS-DNA έναντι του γονιδίου των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχέων αποδείχθηκε λόγω της έλλειψης σημαντικής μείωσης της ΑΠ στην ομάδα control. Επιπρόσθετα, η έκφραση της GFP σε περιοχές όμορες του κοιλιακού συστήματος, όπως ο πυρήνας της μονήρους δεσμίδας (NTS), αποδεικνύει ότι το πλασμιδικό DNA προσελήφθη από τους ιστούς των περιοχών αυτών. Είναι γνωστό ότι ο πυρήνας της μονήρους δεσμίδας (NTS) αποτελεί μία από τις θέσεις τερματισμού κεντρομόλων νευρικών ιών προερχόμενων από πολλούς καρδιαγγειακούς υποδοχείς, μεταξύ των οποίων και οι  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχείς.<sup>33</sup>

Όσον αφορά την καρδιακή συχνότητα, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της κατά την πρώτη ημέρα μετά την έγχυση μόνο στην ομάδα που χορηγήθηκε πλασμιδικό DNA (ομάδα PL) ενώ αντίθετα δεν διαπιστώθηκαν αντίστοιχες μεταβολές στην ομάδα AS όπου χορηγήθηκε πλασμιδικό AS-DNA. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η πειραματική διαδικασία είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μία μικρής διάρκειας αντανάκλαστική ταχυκαρδία διαμέσου του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (ΣΝΣ). Το γεγονός ότι η ταχυκαρδία αυτή δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα AS πιθανά οφείλεται στην κεντρική καταστολή του ΣΝΣ διαμέσου της έγχυσης του AS-DNA έναντι του γονιδίου των υποδοχέων  $[\alpha]_{2B}$ .

Δεν διαπιστώσαμε ανεπιθύμητες ενέργειες όσον αφορά το σωματικό βάρος, την πρόσληψη νερού ή τροφής και την συμπεριφορά των πειραματόζωων σε σχέση με τη χρησιμοποίηση του πλασμιδίου ως φορέα DNA.

Η παρούσα ερευνητική μελέτη επιβεβαιώνει ακόμα μία φορά ότι οι  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αρτηριακής

υπέρτασης ακόμα και στο πειραματικό μοντέλο των γενετικά υπερτασικών αρουραίων τρεφόμενων με αυξημένη ποσότητα άλατος. Παρόλα αυτά η μικρής διάρκειας αναστροφή της βαριάς υπέρτασης σε αυτό το πειραματικό μοντέλο σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας όπου η πτώση της αρτηριακής πίεσης ήταν στατιστικά σημαντική για χρονικό διάστημα περίπου μίας εβδομάδος,<sup>10</sup> μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο πρωταρχικός ρόλος των  $[\alpha]_{2B}$  αδρενοϋποδοχέων σχετίζεται κυρίως με την αλατοεξαρτώμενη υπέρταση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας θα πρέπει να προστεθούν σε εκείνα που απορρέουν από τις αντίστοιχες προσπάθειες εφαρμογής γονιδιακής θεραπείας της υπέρτασης σε πειραματόζωα με απώτερο σκοπό την θεραπεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης στους ανθρώπους. Βέβαια έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση αντίδρομου DNA ως προς το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (AS-ACE) σε SHR ενσωματώθηκε στο γενετικό υλικό και μεταδόθηκε στους απογόνους των πειραματοζώων.<sup>32</sup> Ταυτόχρονα κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη ενός ρυθμιστικού συστήματος κατ' επίκλησιν, το οποίο θα τροποποιεί ή και θα σταματά τη δράση του αντίδρομου DNA τουλάχιστον για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο είτε λόγω της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών είτε σε κλινικές καταστάσεις όπως οι χειρουργικές επεμβάσεις και η εγκυμοσύνη, όταν δηλαδή η γονιδιακή θεραπεία δεν είναι η πλέον ενδεδειγμένη λύση. Τα ζητήματα που αφορούν τη γονιδιακή θεραπεία της υπέρτασης θα πρέπει βέβαια να λυθούν πριν την εφαρμογή της νέας τεχνολογίας στους ανθρώπους.

## Βιβλιογραφία

1. Aggarwal A, Esler MD, Socratous F, et al: Evidence for functional presynaptic alpha-2 adrenoceptors and their down-regulation in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 81: 1130.
2. Makaritsis PK, Johns C, Gavras I, et al: Role of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes in the acute hypertensive response to hypertonic saline infusion in anephric mice. *Hypertension*, 2000; 35: 609-613.
3. Makaritsis PK, Handy ED, Johns C, et al: Role of the  $\alpha_{2B}$ -adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension*, 1999; 33: 14-17.
4. Gavras I, Manolis AJ, Gavras H: The  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in hypertension and heart failure: experimental and clinical studies. *J Hypertension* 2001; 12: 2115-2124.
5. Lovenberg MW, Yamori Y: The role of dietary protein in hypertensive disease, in Laragh HJ, Brenner MB, (eds.): *Hypertension. Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, vol. 1, 2nd edition. Raven Press, New York, 1995; p 314.
6. Okamoto K: Spontaneously hypertension in rats, in Richter GW, Epstein MA, (eds.): *International review of experimen-*

- tal pathology, vol. 7. Academic Press, New York, 1969; pp 227-270.
7. Philips MI, Ambuhl P, Gyurko R: Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 177-187.
  8. Pachori SA, Huentelman JM, Francis CS, et al: The future of hypertension therapy; sense, antisense, or nonsense? *Hypertension* 2001; 37: 357-364.
  9. Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, et al: Effects of antisense oligodeoxynucleotide targeting of the  $\alpha_{2B}$ -adrenergic receptor mRNA in the central nervous system. *Hypertension* 2001; 38: 1075-1080.
  10. Kintsurashvili E, Johns C, Ignjacev I, et al: Central [alpha]<sub>2B</sub>-adrenergic receptor antisense in plasmid vector prolongs reversal of salt-dependent hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 961-967.
  11. Zeng DW, Harrison JK, D'Angelo DD, et al: Molecular characterization of a rat [alpha]<sub>2B</sub>-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3102-3106.
  12. He TC, Zhou S, da Costa LT, et al: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2509-2514.
  13. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
  14. Bede M, Philipp M, Knaus A, et al: alpha2-adrenergic receptor subtypes novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol Cell* 2004; 96(5): 343-348.
  15. MacMilan LB, Hein L, Smith MS, et al: Central hypotensive effects of the of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor subtype. *Science* 1996; 273: 801-803.
  16. Link RE, Desai K, Hein L, et al: Cardiovascular regulation in mice lacking  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes band c. *Science* 1996; 273: 803-805.
  17. Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, et al: Targeted inactivation of the gene encoding the mouse  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor homolog. *Mol Pharm* 1995; 48: 48-55.
  18. MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M: Gene targeting-homing in on  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtype function. *Trends Pharm Sci* 1997; 18: 211-219.
  19. Altman JD, Trendelenburg AU, MacMilan L, et al: Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharm* 1999; 56: 154-161.
  20. Makaritsis PK, Johns C, Gavras I, et al: Sympathoinhibitory function of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor subtype. *Hypertension* 1999; 34: 403-407.
  21. Feldman J, Bousquet P: Role of central  $\alpha_{2B}$  adrenergic receptors in blood pressure control and hypertension. *Journal of Hypertension* 2003; 21: 871-872.
  22. Wang C, Chao L, Chao J: Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1995; 95: 1710-1716.
  23. Philips MI: Gene therapy for hypertension: sense and antisense strategies. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1: 655-662.
  24. Philips MI: Gene therapy for hypertension. The preclinical data. *Methods Enzymol* 2002; 346: 3-13.
  25. Philips MI, Kimura B: Antisense therapeutics for hypertension: targeting the renin-angiotensin system. *Methods Mol Med* 2004; 106: 51-68.
  26. Helene C, Toulme JJ: Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049: 99-125.
  27. Zhang YC, Bui JD, Shen L, et al: 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: 682-688.
  28. Tang X, Mohucz D, Zhang C, et al: Intravenous angiotensinogen antisense in AAV-based vector decreases hypertension. *Heart Circ Physiol* 1999; 46: H2392-H2399.
  29. Philips MI: Gene therapy for hypertension. The preclinical data. *Hypertension* 2001; 38: 543-548.
  30. Tomita N, Morishita R, Higaki J, et al: Transient decrease in high blood pressure by in vivo transfer of antisense oligodeoxynucleotides against rat angiotensinogen. *Hypertension* 1995; 26: 131-136.
  31. Katovich MJ, Gelband CH, Reaves P, et al: Reversal of hypertension by angiotensin II type 1 receptor antisense gene therapy in the adult SHR. *Am J Physiol* 1999; 277: H1260-H1264.
  32. Wang H, Reaves PY, Gardon ML, et al: Angiotensin I-converting enzyme antisense gene therapy causes permanent anti-hypertensive effects in the SHR. *Hypertension* 2000; 35: 202-208.
  33. Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, et al: Enhanced depressor response to endothelial nitric oxide synthase gene transfer into the nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research* 2003; 26: 325-331.