

УДК 616.1/9-055.5

© Е.В.Парфенова, В.А.Ткачук

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е.В. ПАРФЕНОВА, В.А.ТКАЧУК

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ
121552 Москва, 3-я Черепковская, 15А
тел. (095) 414-67-80, 414-67-12, факс (095) 414-67-12, 414-66-99

Рассмотрены перспективы применения генной терапии для лечения некоторых многофакторных болезней сердечно-сосудистой системы, таких как рестеноз после ангиопластики, ишемические болезни сердца и конечностей.

Ключевые слова: генная терапия, рестеноз, ангиогенез, урокиназа

ВВЕДЕНИЕ. Последние десятилетия XX века ознаменовались бурным развитием молекулярной медицины, обусловившим прогресс во многих областях медицинской науки. Разработка технологии рекомбинантной ДНК позволила создать такие лекарственные препараты как рекомбинантные активаторы плазминогена, без которых трудно себе представить современное лечение инфаркта миокарда и тромбозов. Полимеразная цепная реакция и гибридизация *in situ* позволили определять экспрессию специфических генов в крошечных образцах, полученных из миокарда, атеросклеротической бляшки, поврежденной сосудистой стенки, что значительно расширило представления о молекулярных механизмах заболеваний сердца и сосудов. И, наконец, решающие достижения программы «Геном человека» позволили идентифицировать гены, мутации которых приводят к наследственным болезням или увеличивают риск многофакторных заболеваний. Все вместе это обусловило появление генной терапии как новой стратегии в лечении как наследственных, так и мультифакториальных и ненаследственных болезней, направленной либо на замещение функции дефектного гена, либо на экспрессию генных продуктов, обладающих терапевтическим эффектом.

Данный обзор посвящен потенциальным возможностям генной терапии в лечении некоторых многофакторных болезней сердечно-сосудистой системы, таких как рестеноз и ишемические болезни сердца и конечностей.

Основные принципы генной терапии заболеваний сосудов

Для введения экзогенных ДНК в клетки сосудов человека или животного используют как непрямую или клеточную (*ex vivo*), так и прямую (*in vivo*) генную терапию. В первом случае из организма выделяются специфические типы клеток и культивируются вне организма, в них вводятся чужеродные терапевтические гены, затем трансформированные клеточные клоны отбираются и реинфузируются тому же человеку. Такой вид генной терапии используется для генетической трансформации эндотелиальных клеток и последующего покрытия этими клетками венозных шунтов и внутрисосудистых стентов [1, 2]. Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении терапевтических генов, встроенных в векторную систему в стенку сосуда, миокард или скелетные мышцы. Хотя для введения генов в сосуды используются оба подхода, все же в подавляющем большинстве работ применяли прямое введение.

Развитие сосудистой генной терапии шло по трем критически важным направлениям: 1) выбор потенциально терапевтических генов для экспрессии в клетках сосудов, т.е. таких генов, продукт работы которых в клетке будет вызывать желаемый терапевтический эффект; 2) выбор и одновременно совершенствование векторных систем, обеспечивающих эффективное проникновение и экспрессию этих генов в клетках сосудов, не вызывая при этом побочных эффектов; 3) разработка средств механической доставки этих векторов к клеткам-мишеням, которые могли бы относительно легко и по возможности менее травматично поместить вектор в нужное место сосуда и максимально избежать попадания генетического материала в системный кровоток.

Оптимальное сочетание этих трех элементов и определяет успех любой программы сосудистой генной терапии.

Векторные системы, которые используются для переноса генов в сосуды человека и животных, включают невирусные и вирусные векторы. Первые представлены плазмидной или «голой» ДНК, которая вводится в комплексе с липосомами, положительно заряженными липидными пузырьками, обволакивающими отрицательно заряженную ДНК и способствующими лучшему проникновению через отрицательно заряженную клеточную мембрану. Эффективность трансфекции тканей *in vivo* плазмидной ДНК очень низкая и не превышает 0,1%, т.е. одна клетка из тысячи. Последние модификации в составе липидов липосом позволяют увеличить эффективность трансфекции до 4-5% [3].

Такой метод переноса генов абсолютно неприемлем *in vivo* в тех случаях, когда необходимо экспрессировать белки, активные только в тех клетках, где они образуются. Но в тех случаях, когда экспрессируется белок, секретируемый клеткой, способный по паракринному механизму действовать на другие клетки, трансфекция даже 2-3% клеток может дать желаемый биологический эффект [4, 5].

Проникновение плазмидной ДНК в клетки может быть улучшено за счет создания комплексов, включающих аденовирусные белки, трансферрин и ДНК с полилизином, связывающимися на поверхности клетки с трансферриновыми рецепторами. Последующий эндоцитоз комплекса лиганд-рецептор приводит к интернализации всей конструкции клеткой [6]. Другой пример улучшения трансфекции сосудов плазмидной ДНК – липосомальный плазмидный вектор, инкорпорирующий элементы капсид вирусов (*fusigenic Sendai/HVJ-virus*) [7].

Плазмидная ДНК не встраивается в геном хозяина и обеспечивает только временную экспрессию гена – 2-4 недели.

Вирусные векторы представлены дефектными по репликации ретровирусами, аденовирусами и рядом других вирусов.

Ретровирусные векторы, способные интегрироваться в геном хозяина и обеспечивать длительную экспрессию введенного гена, применяются только для клеточной сосудистой генной терапии [1, 2]. Их применение для прямой генной терапии ограничено низкой эффективностью трансдукции, опасностью возможной онкогенности из-за случайного встраивания промоторов и тем, что они вносят ДНК только в пролиферирующие клетки [8]. Наиболее эффективная трансдукция клеток сосудов достигается при использовании аденовирусных векторов, которые способны трансдуцировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки. Они не интегрируются в геном хозяина, поэтому обеспечивают лишь кратковременную экспрессию гена - не более 4 недель. Их эффективность в сотни и тысяч раз выше, чем эффективность плазмидных или ретровирусных векторов [8-16]. Но их главным недостатком, особенно первого поколения аденовирусов, является развитие побочных иммунных и воспалительных реакций [17-20], что ограничивает возможность повторных введений и является главным камнем преткновения на пути широкого перехода сосудистой генной терапии от предклинических исследований к клиническим испытаниям [21]. Другие вирусные векторы (вирус простого герпеса, адено-ассоциированные вирусы) пока редко применяются для введения генов в клетки сосудов [22, 23].

Для доставки векторов в сосуд используются механические подходы, включающие внутрисосудистые доставочные системы, периваскулярные и миокардиальные методы доставки.

Внутрисосудистая доставка осуществляется как путем прямых инъекций или инфузий в просвет сосудов, так и с помощью различных конструкций, созданных на основе доставочных систем и баллонных катетеров для ангиопластики: пористые и микропористые диффузионные катетеры, двухбаллонные катетеры и многоканальцевые катетеры, катетеры с баллончиками, покрытыми гидрогелем, катетеры-инфилтраторы, катетеры, оснащенные устройством для ионофореза и пр. [24-32].

Показано, что при помещении векторных частиц в ткани, окружающие сосуд, локальная трансдукция выше, чем при их эндолуминальном введении [31-32].

Периваскулярная доставка генов в сосуд осуществляется с помощью специальных катетеров, с модифицированными иглами для прямых инъекций в периадвентициальную область [33], что позволяет полностью избежать системного попадания гена. Используется также введение генов в перикардиальное пространство, откуда они не могут легко диффундировать, что обеспечивает эффективную трансдукцию эпикардиального и париетального перикардиального мезотелиума [34-35].

Помимо этого используются прямые внутримышечные инъекции в ишемизированные мышцы конечности и внутримышечные инъекции растворов векторов, которые проводятся во время операций аорто-коронарного шунтирования (АКШ) с помощью малой торакотомии, а также из полости левого желудочка с помощью специальных катетеров с иглами для трансэндокардиальных инъекций [32].

Таким образом, к настоящему моменту разработан хотя и не идеальный, но уже достаточно эффективный и быстро совершенствующийся инструментарий, позволяющий доставлять терапевтические гены в сосудистую стенку. Определение же того, какие именно гены являются потенциально терапевтическими, напрямую зависит от прогресса в понимании клеточных и молекулярных механизмов заболеваний сосудов.

Поскольку большинство имеющихся сегодня векторных систем, использующихся для прямого переноса генов, обеспечивает только временную работу гена в клетке, то наилучшим образом для генной терапии подходят те патологии, при которых для достижения желаемого эффекта необходима лишь транзиторная экспрессия терапевтических генов.

РЕСТЕНОЗ

Практически идеальной мишенью для генной терапии является рестеноз – повторное сужение просвета артерии, которое развивается у 20-30 % больных в течение 6 месяцев после баллонной ангиопластики, стентирования, атерозктомии [36]. Механизмы развития рестеноза достаточно хорошо изучены, чему способствовало то, что эта проблема была одной из самых хорошо финансируемых в кардиологии США в течении нескольких лет [37, 38]. Его развитие имеет четкую очерченность во времени, а генетический материал может быть введен во время самой процедуры ангиопластики без дополнительных манипуляций.

Четыре перекрещивающиеся фазы, отражающие процесс ранозаживления в сосудистой стенке, описаны в процессе развития рестеноза [39]. Тромботическая и воспалительная стадии начинаются с момента повреждения сосуда и достигают максимума: первая – в течение первых часов, вторая – первых-вторых суток. Цитокины и факторы роста, выделяемые тромбоцитами и лейкоцитами в это время, активируют ГМК, которые фенотипически трансформируются, начинают пролиферировать и мигрировать из меди в интиму. Эти процессы достигают максимума на 7-ой день и заканчиваются через месяц после повреждения. На второй неделе промигрировавшие клетки начинают усиленно синтезировать матрикс, этот процесс достигает максимума через 3 месяца и продолжается около 6 месяцев. Все эти процессы приводят к развитию неинтимы, фактически новой бляшки и к ремоделированию сосудистой стенки, что в конечном итоге ведет к сужению просвета и возврату симптомов ишемии (стенокардии).

Основная цель генных модификаций при рестенозе состоит в том, чтобы оказать преходящее и строго локализованное специфическое воздействие на определенные клетки с тем, чтобы уменьшить тромбообразование, пролиферацию, миграцию и избыточный синтез матрикса, ускорить резидентелизацию раневой поверхности.

Эффекты введения различных генов на развитие экспериментального рестеноза изучены у крысы, кролика и мини-свиней в сонных, бедренных и коронарных артериях [3, 40].

Поскольку долгое время пролиферация ГМК считалась доминирующим процессом в развитии рестеноза, наилучшим образом была разработана именно антипролиферативная стратегия в генной терапии рестеноза [3, 13, 40, 41]. Она включала либо воздействия, которые ингибировали входение клеток в клеточный цикл (цитостатический подход), либо воздействия, которые вызывали смерть клетки, которая уже вошла в клеточный цикл (цитотоксический подход).

В качестве цитостатического подхода использовали введение в аденовирусном векторе в поврежденный участок сосуда генов, кодирующих белки, являющихся естественными ингибиторами пролиферации. Экспрессия этих генов обычно подавлена в пролиферирующих клетках. Такими генами являются ген ретинобластомы [9], кодируемый им белок блокирует входение клетки в клеточный цикл, образуя комплекс с фактором транскрипции E2F, что препятствует синтезу ДНК; ген, кодирующий белок p21-ингибитор циклин-зависимых киназ, обеспечивающих прохождение клетки в S-фазу [10, 11], и один

из гомеобоксных генов *gas*, кодирующий цитостатический белок [42]. С этой же целью экспрессировали мутантный неактивный протоонкоген из семейства *gas*, продукт которого является одним из звеньев в цепи передачи митогенного сигнала [43]. Во всех случаях достигалось эффективное подавление роста неointимы на 50-80%.

Другим цитостатическим подходом является подавление экспрессии белков, определяющих входение клетки в клеточный цикл и прохождение фаз цикла. Для этого использовали введение антисмысловых олигонуклеотидов, подавляющих экспрессию протоонкогенов *c-myc* и *c-myb* [44-46], циклин-зависимых киназы 1 и 2 (CDK) [47, 48] и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) [48], а также фактора транскрипции E2F [49]. Наиболее существенное подавление образования неointимы достигалось при совместном введении олигонуклеотидов против PCNA и CDK2 [48].

В 1997 году в США было инициировано мультицентровое исследование, в котором оценивается эффективность использования олигонуклеотидов против E2F в предотвращении стенозирования венозных шунтов, используемых при операциях АКШ [50].

В качестве цитотоксической стратегии для предотвращения рестенозов применяется введение гена тимидинкиназы простого герпеса [12]. Этот фермент фосфорилирует препарат ганцикловир – нуклеозидный аналог в токсический метаболит ганцикловир фосфат, способный прерывать синтез ДНК. Этот ген, называемый «суицидальным», вводился в аденовирусном векторе в сосуд после баллонирования. Затем животным в/в вводился ганцикловир, что вызывало эффективное подавление роста неointимы. С той же целью использовалось введение гена цитозиновой дезаминазы с последующим введением 5-фторцитозина [51, 52].

Генная терапия, направленная на подавление тромбообразования, включает локальную гиперэкспрессию NO-синтетазы, как эндотелиальной индуцибельной, так и гладкомышечной конститутивной [15, 53], и гена циклооксигеназы [16], что приводит к увеличению синтеза NO и простациклина в сосудистой стенке и как следствие – к уменьшению агрегации тромбоцитов, вазодилатации и пролиферации ГМК и подавлению роста неointимы. Введение гена гирудина, ингибирующего тромбин, также подавляло и развитие пристеночного тромбоза и рост неointимы [14]. Уменьшение тромбозов достигалось и с помощью покрытия стентов и венозных графтов генетически модифицированными эндотелиальными клетками, гиперэкспрессирующими активаторы плазминогена (tPA и uPA) [1, 2].

В более поздних исследованиях было показано, что активация миграции ГМК из медиа в интиму является не менее значимым процессом для формирования рестеноза, чем пролиферация [39, 54]. Однако гено-терапевтические подходы к подавлению миграции ГМК стали разрабатываться совсем недавно. Обеспечение миграции клеток *in vivo* осуществляется с участием различных протеаз, среди которых важную роль играют матриксные металлопротеазы [55]. Поэтому для подавления миграции использовали гиперэкспрессию в аденовирусном векторе тканевого ингибитора матриксных металлопротеаз, что привело к подавлению роста неointимы на 50% [55, 56].

Поскольку в эндотелии сосудов образуется много вазодилирующих факторов, подавляющих агрегацию тромбоцитов и пролиферацию ГМК, от быстроты и завершенности процесса реэндотелизации зависит в значительной степени интенсивность и продолжительность развития неointимы. Для ускорения

резидентализации успешно применяется введение в сосуд гена сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в виде плазмидной ДНК [4, 57]. При этом достигалось эффективное подавление роста неинтимы и уменьшение тромбозов после баллонной ангиопластики и стентирования, что было связано с ускоренной эндотелизацией стентов. В 1997 году в Финляндии было начато первое клиническое испытание введения VEGF после ангиопластики коронарных сосудов для предотвращения рестенозов [58].

Несмотря на значительное количество предклинических исследований, показавших высокую эффективность генной терапии в предотвращении рестенозов в модельных экспериментах на животных, продвижение генной терапии рестенозов в клинику идет очень медленно, что в значительной мере обусловлено тем фактом, что практически во всех предклинических исследованиях по генной терапии рестеноза эффективная доставка генов в клетки сосудов осуществлялась с помощью аденовирусов, применение которых у человека ограничено из-за опасности иммунных и воспалительных реакций.

Если генная терапия рестеноза еще только пытается выйти на стадию клинических испытаний, то в области лечения ишемических заболеваний сердца и нижних конечностей она уже сделала первые весьма обнадеживающие шаги.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АНГИОГЕНЕЗ

До недавнего времени клинические способы регуляции образования и роста кровеносных сосудов ограничивались лишь подавлением ангиогенеза с целью предотвращения образования, роста и метастазирования раковых опухолей. Однако в последнее время локальную стимуляцию ангиогенеза стали применять для лечения ишемических заболеваний миокарда и конечностей человека, а также при заживлении ран.

Основу новой лечебной тактики, которая была названа терапевтическим ангиогенезом, составляет введение в область ишемии ангиогенных факторов роста или их генов для стимуляции развития сосудов в области ишемии [59-61].

Эта тактика основана на использовании существующего в сосудистой системе потенциала для роста сосудов, который включает два вида процессов, развивающихся естественно в ответ на ангиогенные стимулы, которыми являются ишемия, гипоксия, воспаление, некроз. Это истинный ангиогенез, представляющий собой формирование новых капилляров, ответвляющихся от уже существующих, что позволяет увеличить плотность капилляров и уменьшить сосудистое сопротивление в области ишемии, обеспечивая доставку туда крови, и неоартериогенез, представляющий собой трансформацию уже предсуществующих артериол в небольшие мышечные артерии и ремоделирование предсуществующих коллатеральных сосудов, что обеспечивает кровоток в обход области обструкции [61-62].

Оба процесса, естественно, развиваются в ответ на ишемию тканей, обусловленную прогрессирующей обструкцией магистральных сосудов сердца или конечностей. Однако такой естественный компенсаторный процесс часто не способен адекватно обеспечивать потребность в кровоснабжении тканей при быстро нарастающей обструкции. Поскольку методы хирургической и эндоваскулярной реваскуляризации в ряде случаев не могут использоваться или не могут адекватно решить эту проблему, представляется перспективным использовать в таких случаях стимуляцию роста сосудов в ишемизированных тканях с помощью естественных стимуляторов ангио- и артериогенеза.

Ангиогенез представляет собой сложный процесс, включающий серию событий, происходящих в строгой последовательности [63]. В эти процессы

вовлечены эндотелиальные клетки и перициты [64], которые находятся в артериолах, капиллярах и пост-капиллярных венулах. Под влиянием ангиогенных стимулов, к которым относятся гипоксия [65], ишемия [66], механическое растяжение [67] и воспаление [68], эндотелиальные клетки и перициты активируются и начинают продуцировать протеазы (коллагеназы и активаторы плазминогена), способствующие разрушению базальной мембраны, откреплению этих клеток. Хемотактические факторы и митогены, продуцирующиеся различными клетками (в основном моноцитами) при ишемии и воспалении, обеспечивают сигналы для эндотелиальных клеток к миграции, инвазии в окружающие ткани и пролиферации. Следующей ступенью является дифференциация эндотелиальных клеток, возврат к фенотипу покоящихся клеток с замедлением пролиферации и миграции, установлением межклеточных контактов и формированием эндотелиальных трубочек. Финальной ступенью ангиогенеза является синтез новой базальной мембраны эндотелиальными клетками и перицитами. Процесс ангиогенеза включает, помимо пролиферации эндотелия, пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток сосудов (ГМК), адвентициальных фибробластов, ремоделирование внеклеточного матрикса, что необходимо для превращения предсуществующих коллатералей и артериол в полноценные мышечные артерии [59].

Процесс неоваскуляризации тканей регулируется стимуляторами и ингибиторами ангиогенеза, а также взаимодействием эндотелиальных клеток и ГМК с внеклеточным матриксом через интегрины [69,70]. Среди множества факторов роста, участвующих в регуляции ангио- и ангиогенеза, наиболее важными стимуляторами этих процессов являются представители семейства факторов роста фибробластов (FGF-1, FGF-2, FGF-5), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), а также трансформирующий фактор роста β (TGF- β). FGFs и VEGF интенсивно используются для индукции ангиогенеза как в эксперименте, так и в клинике.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) представляет собой ангиогенный гликопротеин, увеличивающий сосудистую проницаемость и продуцируемый различными типами клеток [71]. При этом эндотелиальные клетки обладают рецепторами для VEGF [72], но продуцируют VEGF только в состоянии аноксии. В отличие от других факторов роста, стимулирующих пролиферацию многих типов клеток, VEGF является селективным митогеном для эндотелиальных клеток [72].

В экспериментальных работах по терапевтическому ангиогенезу использовались как рекомбинантные ангиогенные факторы роста (FGF-1 и 2 и VEGF₁₆₅), так и их гены (VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉ и FGF-5). Их эффект изучался на моделях ишемии задней конечности у крысы и кролика и моделях острой и хронической ишемии миокарда у собак и минисвиной [61, 73-80]. Не останавливаясь детально на результатах этих многочисленных работ, необходимо отметить главное: практически во всех случаях введение факторов роста или их генов стимулировало развитие коллатералей и новых капилляров, которые, что очень важно, не регрессировали после прекращения введения факторов роста; однократное введение гена заменяло многократные инъекции или инфузии рекомбинантных факторов роста. Важно, что при введении генов практически не отмечалось побочных эффектов, таких как гипотензия, наблюдавшихся при введении факторов роста. И наконец эффективно стимулировать ангио- и ангиогенез в ишемизированных задних конечностях удавалось просто при

внутримышечном введении плазмидной ДНК, не применяя аденовирусный вектор. Все это позволило относительно быстро начать клинические испытания.

Первое клиническое применение генов ростовых факторов для стимуляции ангиогенеза было проведено у больных с критической ишемией нижних конечностей в результате прогрессирующего атеросклероза артерий, болями в покое и незаживающими трофическими язвами [81-83]. Эти больные не подходили для хирургической или эндоваскулярной реваскуляризации, и им в ближайшем будущем грозила ампутация. Плазмиды с кДНК VEGF₁₆₅ вводили внутриаартериально с помощью баллонного катетера, покрытого гидрогелем, в возрастающих дозах. Достоверное увеличение коллатеральных сосудов, регистрируемое дигитальной ангиографией, было получено только при использовании высоких доз препарата (2000 мкг). Эти исследования позволили говорить о дозозависимом действии введенной плазмиды. Настораживающим фактом было развитие пакуобразного ангиоматоза и выраженного отека конечности у больного, получившего наибольшую дозу.

В следующей работе этих же авторов использовались внутримышечные инъекции в пораженную конечность плазмидной кДНК VEGF₁₆₅ [84]. Анатомическая и функциональная эффективность этого метода была подтверждена увеличением уровня VEGF в плазме крови, увеличением кровотока в конечности, ангиографическими признаками развития коллатералей, уменьшением болевого синдрома, заживлением трофических язв и иммуногистохимическими доказательствами увеличения пролиферации эндотелиальных клеток в биопсийном материале. Это был первый клинический опыт терапевтического ангиогенеза, когда удалось увеличить перфузию пораженной конечности до того уровня, который обычно достигается при успешной хирургической или эндоваскулярной реваскуляризации. Оказалось, что прямое внутримышечное введение плазмидной ДНК VEGF₁₆₅ эффективно стимулирует развитие коллатералей, несмотря на более низкую эффективность трансфекции, чем обычно наблюдается при генной терапии, использующей аденовирусные векторы. Многообещающим был и тот факт, что плазмидная ДНК для клинического использования была без больших затрат приготовлена в достаточном количестве в лаборатории. Это определило более быстрое продвижение генной терапии от лаборатории в клинику, в отличие от терапии, использующей рекомбинантные белки, которая требует гораздо больших затрат и промышленных возможностей.

Очень важно, что несмотря на возрастание уровня VEGF в циркуляции увеличение коллатеральных сосудов отмечалось только в пораженной конечности. Это, вероятно, обусловлено "upregulation" рецепторов к VEGF в эндотелии сосудов при ишемии [85].

Это клиническое исследование по существу открыло дорогу для применения генной терапии, направленной на стимуляцию ангиогенеза, не только для лечения весьма обширной категории больных с критической ишемией нижних конечностей, но и для лечения еще более обширной категории больных ишемической болезнью сердца.

К настоящему моменту в литературе имеются сообщения о 8 клинических испытаниях по терапевтическому ангиогенезу у больных с тяжелой ишемией нижних конечностей [39, 86-88] и об 11 клинических испытаниях у больных ишемической болезнью сердца [61, 89-95], в пяти из которых исследуется введение рекомбинантных факторов роста и в шести – их генов. В одном из них у больных с множественными стенозами коронарных артерий и неэффективностью

антиангинальной терапии внутримиокардиально вводилась плазмидная ДНК VEGF₁₆₅ через небольшую левую переднюю торакотомию в ишемизированную передне-боковую стенку левого желудочка [93]. В другом исследовании проводилось внутримиокардиальное введение VEGF₁₂₁ в аденовирусном векторе во время операции аорто-коронарного шунтирования (АКШ) в область ишемизированного миокарда, которая не могла быть реваскуляризирована с помощью шунтирования [94]. В третьем мультицентровом исследовании изучается эффект внутрикоронарного введения гена FGF-4 в аденовирусном векторе [39, 61], в четвертом – гена индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора (HIF-1 α), который регулирует экспрессию гена VEGF [61]. В пятом и шестом исследованиях больным с тяжелой ишемией миокарда вводят плазмидную кДНК VEGF-C внутримиокардиально и внутрикоронарно [39]. Поскольку ни одно из этих клинических испытаний не проводится как двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, сделать в настоящий момент однозначное заключение об эффективности генной терапии при ишемической болезни сердца невозможно. Однако имеющиеся предварительные результаты оценки их краткосрочных эффектов весьма обнадеживающие. Прежде всего введение генетического материала в сердце и его сосуд хорошо переносилось всеми больными и не вызывало каких-либо побочных эффектов. Положительное действие во всех случаях выражалось в уменьшении стенокардии, улучшении перфузии миокарда и улучшении региональной сократимости миокарда. Однако окончательное суждение об эффективности и безопасности генной терапии, использующей гены факторов роста у больных ИБС, можно сделать только после больших контролируемых испытаний.

В настоящее время активно исследуется ангиогенная активность других белков, что позволяет определить новые потенциально терапевтические гены-кандидаты. Такими белками являются фактор роста гепатоцитов [96] и моноцитарный хемотактический протеин – 1 [97], ангиогенная активность которых показана в исследованиях на животных. Возможно, что в будущем применение комбинаций ангиогенных белков или их генов окажется более эффективным, чем использование одного фактора, так как позволит более точно моделировать физиологический ангиогенез.

Ген урокиназы как возможный потенциальный терапевтический ген для генной терапии рестеноза и ишемических заболеваний

Результаты наших собственных исследований, а также данные, полученные другими исследователями, позволяют нам высказать гипотезу о том, что одним из новых потенциально терапевтических генов для генной терапии, направленной на предотвращение рестеноза и стимуляцию ангиогенеза, может быть ген урокиназы.

Урокиназа - это фермент, сериновая протеаза, превращающая плазминоген в плазмин, протеазу широкой специфичности, способную расщиплять фибрин и компоненты внеклеточного матрикса. Она образуется клетками крови и сосудов и является одним из компонентов системы фибринолиза, препятствующей развитию тромбозов [98]. Но более важная функция урокиназы заключается в обеспечении направленного движения (миграция, хемотаксис) клеток, а следовательно, регуляции таких процессов как рост сосудов, ранозаживление, инвазия клеток и метастазирование [98-100].

Экспрессия урокиназы является частью программы, связанной с началом миграции клеток и абсолютно необходима для их перемещения из одного тканевого компартмента в другой [100-104].

Ключевым моментом клеточной инвазии является взаимодействие урокиназы со специфическим урокиназным рецептором, обнаруженным на многих типах клеток [105]. Рецептор урокиназы закреплен в мембране через липидный якорь - инозитолфосфогликан и проявляет повышенную латеральную подвижность в мембране, т.е. может концентрироваться в определенном участке в нужное время, при миграции - на лидирующем полюсе клетки. Это позволяет осуществлять строго направленную локальную деградацию внеклеточного матрикса, что критично для ее инвазии и миграции [105, 106].

Являясь ключевым регулятором внеклеточного протеолиза, урокиназа регулирует не только миграцию, но и пролиферацию многих клеток. Связавшись с рецептором, она активируется и активирует (сама или через образование плазмина) практически все факторы роста, участвующие в развитии рестеноза и стимуляции ангиогенеза, которые секретируются клетками в неактивных формах или же инактивированы связыванием с белками внеклеточного матрикса: bFGF, VEGF, фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиновый фактор роста (IGF), эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующего фактора роста - β (TGF- β) [107-110]. В свою очередь многие факторы роста способны стимулировать экспрессию урокиназы и ее рецептора [111]. Так, bFGF и VEGF усиливают экспрессию этих белков в эндотелиальных клетках. Существуют данные, указывающие на то, что урокиназа необходима и для реализации эффектов многих факторов роста [101, 112, 113,]. Наши исследования показывают, что урокиназа опосредует миграцию ГМК, вызванную такими мощными хемотактическими и митогенными агентами как тромбоцитарный фактор роста и фактор роста фибробластов [114].

Существуют много данных, указывающих и на непротеолитические, плазмин-независимые механизмы влияния урокиназы на миграцию и пролиферацию клеток [100, 115-118]. Так урокиназа усиливает взаимодействие урокиназного рецептора с белком матрикса витронектином и молекулами адгезии интегринами и регулирует таким образом адгезию клеток [119-121]. Связываясь с урокиназным рецептором и другими, еще не идентифицированными белками на поверхности клетки, урокиназа активирует систему внутриклеточной сигнализации, что приводит к фосфорилированию Src-, Janus-киназ и цитоскелетных белков, активации MAP- и STAT-киназ, что вызывает экспрессию специфических генов [122-125].

Однако не только эти свойства урокиназы привлекли к ней наше внимание. В последние 5 лет была выполнена серия элегантных работ по трансгенным мышам, дефектным по различным генам фибринолитической системы [126, 127]. Оказалось, что у мышей, лишенных гена урокиназы, практически не развивается неоинтима после повреждения артерии [126]. Если у этих мышей вызывали острый инфаркт миокарда, то у них была крайне замедленная реваскуляризация миокарда, которую не удавалось стимулировать VEGF, в отличие от мышей дикого типа [127].

Наши данные показывают, что после экспериментальной баллонной ангиопластики в поврежденном участке сосуда резко усиливается экспрессия урокиназы и ее рецептора [128-131]. Пик этой экспрессии совпадает с максимальной интенсивностью миграции и пролиферации сосудистых клеток.

Урокиназа является мультидоменным белком, в состав которого входит каталитический домен, домен, гомологичный эпидермальному фактору роста, участвующий в связывании белка со специфическим рецептором на поверхности многих типов клеток, и крингл-домен, функция которого пока не ясна. Для

исследования механизмов влияния урокиназы на развитие экспериментального рестеноза мы используем различные модифицированные формы рекомбинантной урокиназы или отдельные домены этого белка, которые получены путем экспрессии в *E.coli* [132]. Эти формы урокиназы наносятся сразу же после баллонирования на поврежденный сосуд периадвентициально в плуроническом геле, обеспечивающем их медленное выделение в течение 48 часов. Изучаются эффекты этих форм на миграцию, пролиферацию сосудистых клеток *in vivo*, а также на изменение структуры сосуда [130, 131]. Результаты этой работы показали, что протеолитически активная рекомбинантная урокиназа, имеющая структуру «дикого» типа, стимулирует миграцию ГМК, образование неointимы, неоадвентиции и развитие стеноза баллонированной артерии. Протеолитически неактивная урокиназа, полученная путем точечной мутации (замена гистидина на глютамин в положении 204 в активном центре молекулы), не оказывает подобного эффекта. Напротив, при ее нанесении наблюдается тенденция к меньшему развитию неointимы и не происходит сужения просвета артерии. Нанесение ингибирующих урокиназу антител или ингибитора плазмина альфа-антиплазмина подавляет миграцию ГМК, образование неointимы и развитие стеноза артерии (рис. 1). Эти данные позволяют нам высказать предположение о том, что подавление эффектов урокиназы, особенно связанных с протеолитической активностью этого белка, может предотвращать развитие рестенозов после ангиопластики.

В настоящее время нами разрабатываются генно-терапевтические подходы, позволяющие подавить эффекты урокиназы в поврежденной сосудистой стенке и тем самым повлиять на развитие рестеноза артерий после баллонирования. Такими подходами могут быть введение в стенку сосуда после экспериментальной ангиопластики мутантного гена, кодирующего протеолитически неактивную урокиназу, или введение химерной генетической конструкции, состоящей из кДНК, кодирующей аминотерминальный фрагмент урокиназы, обеспечивающий ее связывание на поверхности клетки, и кДНК ингибитора плазмина, например, α -антиплазмина. Связываясь с урокиназным рецептором, такие конструкции могли бы препятствовать эффектам эндогенной урокиназы и подавлять эффекты плазмина.

С другой стороны, способность урокиназы стимулировать процессы миграции, пролиферации и фенотипической трансформации эндотелиальных и гладкомышечных сосудистых клеток, а также активировать ангиогенные факторы роста, определяет и интерес к ней как к мишени для терапевтических влияний, направленных на регуляцию ангиогенеза.

Роль урокиназы в ангиогенезе впервые была отмечена на моделях васкуляризации роговицы [133]. Многими работами показана прямая роль урокиназы в опухолевом ангиогенезе [134].

Работы последних лет принесли много новых доказательств участия урокиназы и ее рецептора в ангиогенезе. Так, эндотелиальные клетки, в которых генно-инженерными методами гиперэкспрессирована урокиназа, обладают значительно большей инвазивностью, чем клетки с неизменной экспрессией урокиназы [135]. Рецепторы к урокиназе не экспрессированы в покоящихся эндотелиальных клетках, но появляются при активации этих клеток *in vitro*. Проангиогенные факторы роста (bFGF и VEGF) и гипоксия также стимулируют экспрессию урокиназного рецептора эндотелиальными клетками *in vitro* [111, 112, 136, 137], что приводит к увеличению протеолитической активности на

поверхности клетки, необходимой для направленного разрушения базальной мембраны внеклеточного матрикса при ее миграции и инвазии.

Помимо локализации протеолиза на клеточной поверхности связывание урокиназы с ее рецептором опосредует миграцию эндотелиальных клеток и формирование капилляроподобных трубочек через механизм, независимый от ее протеолитической активности, связанный с активацией внутриклеточных сигнальных систем [138, 139]. Так, формирование трубочек в матриксе стимулируется не только протеолитически активной урокиназой, но и аминотерминальным фрагментом урокиназы, связывающимся с рецептором, но не имеющим каталитического домена [140]. Связывание урокиназы с эндотелиальными клетками также необходимо для индукции образования капилляроподобных трубочек в фибриновом матриксе ангиогенными факторами роста [141]. Урокиназа значительно усиливает эффект ретиноидов, стимулирующих образование эндотелиальных трубочек и нивелирует ингибирующий этот процесс эффект стероидных гормонов [139].

Подавление экспрессии урокиназного рецептора с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию эндотелиальных клеток [138]. Показано, что индуцирование миграции эндотелиальных клеток bFGF и VEGF и стимуляция формирования капилляроподобных трубочек в фибриновом матриксе опосредуется урокиназой независимо от ее протеолитической активности [142-143].

Мы предполагаем, что повышение ее содержания в ишемизированных тканях может привести к стимуляции ангио- и артериогенеза благодаря активации латентных и высвобождению связанных в матриксе ангиогенных факторов роста, а также потенцированию их действия; стимуляции миграции и пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов; привлечению моноцитов в участок ишемии из кровотока и последующему выделению ими ангиогенных ростовых факторов и цитокинов; предотвращению тромбоза сосудов, который индуцируется гипоксией и служит дополнительным фактором, усугубляющим ишемию тканей при нарушениях магистрального кровотока.

Для стимуляции ангиогенеза мы предполагаем использовать внутримышечное введение плазмиды, содержащей кДНК урокиназы, в моделях ишемии нижних конечностей у животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Первые успехи использования генной терапии для коррекции определенных состояний при сердечно-сосудистых заболеваниях позволяют надеяться, что в недалеком будущем она займет, наряду с фармакотерапией и другими методами лечения, свое место в общей системе лечения этих болезней. Однако то, насколько эти надежды осуществляются зависит от того насколько успешно будут преодолены основные проблемы, связанные с возможностью клинического применения генной терапии при патологии сосудов. Прежде всего это проблема выбора наиболее оптимального терапевтического гена-кандидата. Предпочтение в этом плане должно быть отдано генам, кодирующим многофункциональные секретируемые белки, что позволяет снизить требования к параметрам трансфекции. Не решен также вопрос оптимальных комбинаций терапевтических генов, которые обладали бы комплементарным эффектом. Прогресс в области сосудистой генной терапии и ее продвижение в клинику напрямую связан с совершенствованием векторных систем: с разработкой эффективных невирусных векторов и снижением иммуногенности аденовирусных векторов. В последние годы интенсивно разрабатываются подходы, направленные на уменьшение иммунных реакций при использовании

аденовирусных векторов [145-150]. Разработка доставочных комплексов, включающих полимеры [151], а также плазмид, лучше проникающих в ядро клетки [152] позволяет надеяться на существенное улучшение эффективности невирусных векторов.

Важной проблемой, решение которой могло бы существенно расширить возможности клинического применения сосудистой генной терапии является обеспечение адресной доставки генов в клетки-мишени и регулируемой экспрессии генов. Эта проблема решается за счет использования тканеспецифических промоторов [153] и промоторов, которые активны только в определенных состояниях, например промоторы, активируемые гипоксией [154], изменением напряжения сосудистой стенки и повреждением эндотелия [155], фармакологическими агентами [156, 157]. Все это позволило бы обеспечить безопасность генной терапии, так как чужеродные гены активировались бы только тогда и там, когда и где это необходимо.

Преодоление этих проблем позволит значительно сократить время продвижения сосудистой генной терапии от предклинических к клиническим испытаниям.

Обзор написан в процессе работы по проекту 05 «Генодиагностика и генотерапия социально-значимых заболеваний человека», поддержанным Федеральной целевой научно-технической программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения».

ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dichek D.A., Anderson J., Kelly A.B., et al. Circulation. (1996). **93**. 201-209.
2. Dunn P.F., Newman K.D., Jones M. et al. (1996). Circulation. **93**. 1439-1446.
3. Baek S., March K.L. (1998). Circ. Res. **82**. 295-305.
4. Van Belle T., Tio F.O., Chen D. et al. (1997). J. Am. Coll. Cardiol. **29**. 1371-1379.
5. Takeshita S., Weir L., Chen D. et al. (1996). Biochem Biophys Res Commun. **227**. 628-635.
6. Kupfer J.M., Ruan X.M., Liu G. et al. (1996). Hum. Gene Ther. **5**. 1437-1443.
7. Dzau V.J., Mann M.J., Morishita R., Kaneda Y. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**. 11421-11425.
8. Flugelman M.Y., Jaklitsch M.T., Newman K.D. et al. (1992). Circulation. **85**. 1110-1117.
9. Chang M.W., Barr E., Seltzer J. et al. (1995). Science. **267**. 518-522.
10. Chang M.W., Barr E., Lu M.M. et al. (1995). J. Clin. Invest. **96**. 2260-2268.
11. Aprelikova O., Xiong Y., Liu E.T. (1995). J. Biol. Chem. **270**. 18195-18197.
12. Guzman R.J., Hirschowitz E.A., Brody S.L. et al. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**. 10732-10736.
13. Ohno T., Gordon D., San H. et al. (1994). Science. **265**. 781-784.
14. Rade J.J., Schulick A.H., Virmani R. et al. (1996). Nat. Med. **2**. 293-298.
15. Varenne O.H., Pislaru S., Gillijns H. et al. (1997). J. Am. Coll. Cardiol. **29**. 380A. Abstract.

16. Zoldhelyi P., McNatt J., Xu X-M. *et al.* (1996). *Circulation*. **93**. 10-17.
17. French B.A., Mazur W., Ali N.M., *et al.* (1994). *Circulation*. **90**. 2402-2413.
18. Schulick A.H., Vassalli G., Dunn P.F. *et al.* (1997). *J.Clin.Invest*. **99**. 202-219.
19. Gerszten R.E., Lusinskas F.W., Ding H.T. *et al.* (1996). *Circ. Res*. **79**. 1205-1215.
20. Newman R.L., Dunn P.F., Owens J.W. *et al.* (1995). *J. Clin. Invest*. **96**. 2955-2965.
21. Marshall E. (199). *Science*. **286**. 2244-2245.
22. Gnatenko D., Arnold T.E., Zolotukhin S. *et al.* (1997). *J. Invest. Med*. **45**. 87-98.
23. Lynch C.M., Hara P.S., Leonard J.C. *et al.* (1997). *Circ. Res*. **80**. 497-505.
24. Gonschior P., Pahl C., Huehens T.Y. *et al.* (1995). *Am. Heart. J.*, **130**. 1174-1181.
25. Willard J.E., Landau C., Glamann D.B. *et al.* (1994). *Circulation*. **89**. 2190-2197.
26. March K.L., Madison J.E., Trapnell B.C. (1995). *Hum. Gene Ther*. **6**. 41-53.
27. Feldman L.J., Pastore C.J., Aubailly N. *et al.* (1997). *Gene Ther*. **4**. 189-198.
28. Landau C., Pirwitz M.J., Willard M.A. *et al.* (1995). *Am. Heart J*. **129**. 1051-1057.
29. Tahlil O., Brami M., Feldman L.J. *et al.* (1997). *Cardiovasc.Res*. **33**. 181-187.
30. Steg P.G., Feldman L.J., Scoazec J.Y. *et al.* (1994). *Circulation*. **90**. 1648-1656.
31. Fernandez-Ortiz A., Meyer B.J., Mailhac A. *et al.* (1994). *Circulation*. **89**. 1518-1522.
32. Kornowsky R., Fuchs S., Leon M.B. *et al.* (2000). *Circulation*. **101**. 454-458.
33. Mehdi K., Wilensky R.L., Baek S.Y., Trapnell B.C., March K.L. (1996). *J. Am. Coll. Cardiol*. **27**. 164A. Abstract.
34. Woody M., Mehdi K., Zipes D.P. *et al.* (1996). *J. Am. Coll. Cardiol*. **27**. 31F. Abstract.
35. Lamping K.G., Roiss C.D., Chun J.A. (1997). *Am. J. Physiol.*. **272**. H310-H317.
36. Strauss W.E., Fortin T., Hartigan P. *et al.* (1995). *Circulation*. **92**. 1710-1719.
37. Califf R.M. (1995). *Am.Heart.J*. **130**. 680-684.
38. Topol E.J., Ellis S.G., Cosgrove D.M. (1993) *Circulation*. **87**: 1489-1497.
39. Nikol S., Huehns T., Höfling B. (1996). *Atherosclerosis*. **123**. 17-31.
40. Yla-Herttuala S., Martin J.F. (2000). *Lancet*. **355**. 213-222.
41. Simari R.D., San H., Rekhter M. *et al.* (1996). *J. Clin. Invest*. **98**. 225-235.
42. Smith R., Branellec D., Gorski D. *et al.* (1997). *Genes Dev*. **11** 1674-1689.
43. Indolfi C., Avedimento E.V., Rapacciuolo A. *et al.* (1995). *Nat. Med*. **1**. 541-545.
44. Bennett M.R., Anglin S., McEwan J.R. *et al.* (1994). *J. Clin. Invest*. **93**. 820.
45. Edelman E.R., Simons M., Sirois M.G., Rosenberg R.D. (1995). *Circ. Res*. **76**. 176.
46. Shi Y., Fard A., Galco A., Hutchinson H.G., Vermani P., *et al.* (1994). *Circulation*. **90**. 944.
47. Abe J., Zhou W., Taguchi J., Takuwa N., Miki K., *et al.* (1994). *Biochem. Biophys. Res Commun*. **198**. 16.

48. Morishita R, Gibbons G.H., Ellison K.E., Nakajima M., Zhang L., et al. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **90**. 8474.
49. Morishita R, Higaki J, Tomita N, Ogihara T. (1998). *Circ. Res.* **82**: 1023-1028.
50. Mann M.J., Whittemore A.D., Donaldson M.L. (1999). *Lancet*. **354**. 1493-1498.
51. Mullen C.A., Kilstrup M., Blaese R.M. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**. 33-37.
52. Harrell R.L., Rajanayagam Sharmini M.A., Masharn Doanes A. et al. (1997). *Circulation*. **96**. 621-627.
53. Von der Leyen H.E., Gibbons G.H., Morishita R. et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**. 1137-1141.
54. Reidy M.A., Colleen I., Lindner V. (1996). *Circ. Res.* **78**. 405-414.
55. George S.J., Johnson J.L., Angelini G.D. et al. (1998). *Hum Gene Ther.* **9**. 867-877.
56. Cheng I., Mantile G., Pauly R. et al. (1998). *Circulation*. **98**. 2195-2201.
57. Isner J.M., Walsh K., Rosenfield K. et al. (1996). *Hum. Gene Ther.* **7**. 989-1011.
58. Laitinen M., Hartikainen J., Eranen J. et al. (2000). *Hum. Gene Ther.* **11**. 263-270.
59. Lewis B.S., Flugelman M.Y., Weisz A. et al. (1997). *Cardiovascular Res.* **35**. 480-489.
60. Melillo G., Scoccianti M., Kovesdi I. et al. (1997). *Cardiovascular Res.* **35**. 490-497.
61. Helisch A., Ware A. (1999). *Thrombosis Haemostasis*. **82**. 772-780.
62. Schaper W, Schaper J. (1993). Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.
63. Fan TP, Jaggar R, Bicknell R. (1995). *Trends Pharmacol Sci.* **16**. 57-66.
64. Shepro D, Morel NM. (1993). *FASEB J.* **7**. 1031-1038.
65. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. (1992). *Nature*. **359**. 843-845.
66. Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, et al. (1994). *J Physiol* **267**. H1948-1954.
67. Resnick N, Gimbrone MA. (1995). *FASEB J.* **9**. 874-882.
68. Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C. (1991). *Pharmacol Ther.* **51**. 195-216.
69. Folkman J, Shing Y. (1992). *J Biol Chem.* **267**. 10931-10934.
70. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. (1994). *Histol Histopathol.* **9**. 807-843.
71. Connolly DT. (1991). *J Cell Biochem.* **47**. 219-223.
72. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. (1992). *Endocr Rev.* **13**. 18-32.
73. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. (1994). *Circulation*. **89**. 2183-2189.
74. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. (1995). *J Vasc Surg.* **21**. 314-325.
75. Takeshita S., Tsurumi Y., Couffinahl. et al. (1996). *Lab Invest.* **75**. 487-501.
76. Unger EF, Banai S, Shou M. et al. (1994). *Am J Physiol* **266**. 1588-1595.
77. Asahara T., Bauters C., Zheng L.P. et al. (1995). *Circulation*. **92**. II-365-371.
78. Muhlhauser J., Merrill M.J., Pili R. et al. (1995). *Circ. Res.* **77**. 1077-1086.
79. Chleboun J.O., Martins R.N., Mitchell C.A. et al. (1992). *Biochem. Biophys. Res Commun.* **185**. 510-516.
80. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. (1994). *J Clin Invest.* **93**. 662-670.
81. Isner JM, Pieczek A, Scainfeld R, et al. (1996). *Lancet*. **348**. 370-374.
82. Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. (1995). *Circulation*. **91**. 2687-2692.

83. *Isner JM, Walsh K, Symes J, et al.* (1995). *Circulation*. **91**. 1687-1692.
84. *Baumgaertner I, Pieczek A, Manor O, et al.* (1998). *Circulation*. **97**. 1114-1123.
85. *Tuder R.M., Flook B.E., Voelkel N.F.* (1995). *J. Clin. Invest.* **95**. 1798-1809.
86. *Laitinen M., Makinen K., Manninen H. et al.* (1998). *Hum. Gene Ther.* **9**. 1481-1486.
87. *Makinen K., Laitinen M., Manninen H. et al.* (1999). *Circulation*. **100**. I-770.
88. *Lazarous D.F., Unger E.F., Epstein S.E. et al.* (1998). *Circulation*. **98**. I-456.
89. *Schumacher B., Pecher P. von Specht B.U., Stegmann T.* (1998). *Circulation*. **97**. 645-650.
90. *Sellke F.W., Laham R.J., Edelman E.R., Pearlman J.D., Simons M.* (1998). *Ann. Thorac. Surg.* **65**. 1540-1544.
91. *Laham R.J., Leimbach M., Chronos N.A. et al.* (1999). *J. Am. Coll. Cardiol.* **33** (Suppl. A). 383a.
92. *Laham R.J., Sellke F.W., Ware J.A., Pearlman J.D., Edelman E.R., Simons M.* (1999). *J. Am. Coll. Cardiol.* **33** (Suppl. A). 383A-384a.
93. *Losordo D.W., Vale P.R., Symes J.F. et al.* (1998). *Circulation*. **98**. 2800-2804.
94. *Rosengart T.K., Patel S.R., Lee L.Y. et al.* (1998). *Circulation*. **98** (Suppl. 1). 1-321.
95. *Henry T.D., Annex B.H., Azrin M.A. et al.* (1999). *J. Am. Coll. Cardiol.* **33** (Suppl. A). 384a.
96. *Nakamura S., Moriguchi A., Nakamura Y. et al.* (1998). *Circulation*. **98** (Suppl. 1) 1-268.
97. *Ito W.D., Arras M., Winkler B. et al.* (1997). *Circ. Res.* **80**. 829-837.
98. *Vassalli J.-D., Sappino A.-P., Belin D.* (1991). *J. Clin. Invest.* **88**. 1067-1072.
99. *Tkachuk V.A., Stepanova V.V., Little P.J., Bobic A.* (1996). *Clin. and Exp. Pharm. and Physiol.* **23** (9). 759-765.
100. *Stepanova, V.V.; Bobik, A.; Bibilashvily, R.; Belogurov, A.; Rybalkin, I.; Domogatsky, S.; Little, P.J.; Goncharova, E. and Tkachuk, V.* (1997). *FEBS Lett.* **414**. 471-474
101. *Pepper M.S., Sappino A.-P., Stöcklin R. et al.* (1993). *J. Cell Biol.* **122**. 673-684.
102. *Ossowski L.* (1992). *Cancer Res.* **52**. 6754-6760.
103. *Okada S.S., Grobmeyer S.R., Barnathan E.S.* (1996). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**. 1269-1276.
104. *Gyetko M.P., Todd R.R., Wilkinson C.C., Sitrin R.G.* (1994). *J. Clin. Invest.* **93**. 1380-1387.
105. *Vassalli J.-D.* (1994). *Fibrinolysis*. **8**. Suppl. 1. 172-181.
106. *Okada S.S., Tomaszewski J.A., Barnathan E.S.* (1995). *Exp. Cell Res.* **217**. 180-187.
107. *Lyons R.M., Gentry L.E., Purchio A.F., Moses H.L.* (1990). *J. Cell. Biol.* **110**. 1361-1367.
108. *Park J.T., Keller G.A., Ferrara N.* (1993). *Mol. Biol. Cell* **4**(12). 1317-26.
109. *Remacle-Bonnet M.M., Garrouste F.L., Pommier G.J.* (1997). *Int. J. Cancer.* **72**. 835-843.
110. *Mars W.M., Zarnegar R., Michalopoulos G.K.* (1993). *Am. J. Pathol.* **143**. 949-958.

111. *Mandriota S.J., Seghezzi G., Vassalli J.D. et al.* (1995). *J. Biol. Chem.* **270**(17). 9709-9716.
112. *Mignatti P., Mazziere R., Rifkin D.B. J.* (1991). *Cell. Biol.* **113**(5). 1093-201.
113. *Mandriota S.J., Pepper M.S.* (1997). *J. Cell. Sci.* **110**. 2293-2302.
114. *Мухина С.А., Степанова В.В., Матвеев М.Ю., Домогатский С.П., Ткачук В.А.* (1998). *Вопр. мед. хим.* **44**. 84-90.
115. *Stepanova V., Mukhina S., Koehler E. et al.* (1999) *Mol. Cell. Biochem.*...
116. *Okada S.S., Tomaszewski J.A., Barnathan E.S.* (1995). *Exp. Cell Res.* **217**. 180-187.
117. *Lu H., Mabilat C., Yeh P. et al.* (1996). *FEBS Letteres.* **380**. 21-24.
118. *Stahl A., Mueller B.* (1994). *Cancer. Res.* **54**. 3006-3071.
119. *Wei Y., Lukashev M., Simon D.I. et al.* (1996). *Science.* **273**. 1551-1555.
120. *Waltz D.A., Natkin L.R., Fujita R.M. et al.* (1997). *J. Clin. Invest.* **100**. 58-67.
121. *Veber M., Parry C.N., Strömlad S. et al.* (1996). *J. Biol. Chem.* **271**. 29393-29399.
122. *Wang N., Planus E., Pouchelet M. et al.* (1995). *Amer. J. Physiol.* **268**. C1062-C1066.
123. *Dumler I., Hucho F., Gulba D.* (1997). *Fibrinolysis Proteolysis.* **11** (suppl 2). 165-169.
124. *Dumler I., Petri T., Schleuning W.-D.* (1993). *FEBS Lett* **322**. 37-40.
125. *Dumler I., Weis A., Mayboroda O.A. et al.* (1998). *J. Biol. Chem.* **273**. 315-321.
126. *Carmeliet P., Callen D.* (1996). *Haemostasis.* **26** (Suppl 4). 132-153.
127. *Heymans S., Luttmann A., Nuyens D. et al.* (1999). *Nature Medicine.* **5**. 1135-1142.
128. *Плеханова О.С., Калинина Н.И., Волынская Е.А., Парфенова Е.В.* (2000). *Росс. Физиол. Журнал им. И.М. Сеченова.* **86**. 18-27.
129. *Parfyonova Ye., Plekhanova O., Bibilashvily R., Stepanova V., Kalinina N.I., Bobik A., Tkachuk V.A.* (1999). *Europ. Heart J.* **20**. №2589 492
130. *Парфенова Е.В., Плеханова О.С., Калинина Н.И., Бибилашвили Р.Ш., Бобик А., Ткачук В.А.* (2000). *Кардиология, принята в печать.*
131. *Плеханова О.С., Волынская Е.А., Калинина Н.И., Парфенова Е.В.* (2000). *Бюлл. эксп. биол. мед., принята в печать.*
132. *Belogurov A.A., Bibilashvili R.S., Goryunova L.E.* (1993). *Patent No.* 1692151.
133. *Berman M., Winthrop D., Ausprunk D. et al.* (1982). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **22**. 191-199.
134. *Andreassen P.A., Kjoller I., Christensen L. et al.* (1997). *Int. J. Cancer.* **72**. 1-22.
135. *Gualandris A., Conejo T.L., Giunciuglio D. et al.* (1997). *Microvasc. Res.* **53**. 254-60.
136. *Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R.* (1992). *Biochem Biophys Res Commun.* **189**. 824-831.
137. *Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M.S. et al.* (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**. 11709-11714.
138. *Fibbi G., Caldini R., Chevanne M et al.* (1998). *Lab. Invest.* **78**(9). 1109-1119.
139. *Lansink M., Koolwijk P., Van Hinsbergh V., Kooistra T.* (1998). *Blood.* **92**(3). 927-938.
140. *Schnaper H.W., Barnathan E.S., Mazar A. et al.* (1995). *J. Cell. Physiol.* **165**. 107-118.

141. Koolwijk P., Van Erck MGM, De Vree WJA et al. (1996). J. Cell. Biol. **132**(6). 1177-1188.
142. Odecon L.E., Sato Y., Rifcin D.B. (1992). J. Cell. Physiol. **150**. 2587-2563.
143. Min H.Y., Doyle L.V., Vitt C.R. (1996). Cancer. Res. **56**(10). 2428-2433.
144. Tang H., Kerins D.M., Hao Q. et al. (1998). J. Biol. Chem. **273**(29). 18268-18272.
145. Zhou H., O'Neal W., Morral N., Beaudet A.L. (1996). J. Virol. **70**. 7030-7038.
146. Fisher K.J., Choi H., Burda J et al. (1996). Virology. **217**. 11-22.
147. GuCrette B., Vilquinn J.T., Gingras M. (1996). Hum. Gene Ther. **7**. 1455-1463.
148. Zsengeller Z.K., Boivin G.P., Sawchuk S.S. (1997). Hum. Gene Ther. **8**. 935-941.
149. Wickham T.J., Carrion M.E., Kovesdi I. (1995). Gene Ther. **2**. 750-756.
150. Wickham T.J., Segal D.M., Roelvink P.W. (1995). J. Virol. **70**. 6831-6838.
151. Stephan D.J., Yang Z-W., San H. et al. (1996). Hum. Gene Ther. **7**. 1803-1812.
152. Zanta M.E., Belguise-Valladier P., Behr J-P. (1999). Proc. Nat. Acad. Sci. USA **96**. 91-96.
153. Franz W-M., Rothmann T., Frey N., Katus H. (1997). Cardiovasc. Res. **35**. 560-566.
154. Faller D. (1999). Clinic. Experiment. Pharmacol. Physiol. **26**. 74-84.
155. Symes J.F., Losardo D.W., Vale P.R. et al (1999). Ann. Thorac. Surg. **68**. 830-837.
156. Burein M.M., Schiedner J., Kochanek S. et al. (1999). Proc. Nat. Acad. Sci. USA **96**. 355-360.
157. Ye X., Rivera V.M., Zolrick P. et al. (1999). Science. **283**. 88-91.

Поступила 27.04.00.

PERSPECTIVES OF CARDIOVASCULAR GENE THERAPY

YE.V.PARFYONOVA, V.A.TKACHUK

Cardiology Research Center of Russia. 3-rd Cherepkovskaya 15a, Moscow, Russia 121552
tel. (095) 414-67-80, 414-67-12, fax (095) 414-67-12, 414-66-99

The therapeutic potential of gene therapy in cardiovascular disease such as post-angioplasty restenosis, myocardial ischaemia and severe peripheral artery disease ischemia are considered.

Key words: gene therapy, restenosis, angiogenesis, urokinase,