

ОБЗОРЫ

УДК [616./9-055.5/7-092]-085
© Долгих М.С.

ГЕННО-КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РЕАКЦИИ ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА.

М.С. Долгих

НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ
123182, Москва, Щукинская, 1

В обзоре рассмотрены потенциальные возможности применения генной терапии в трансплантологии, способы преодоления реакции отторжения трансплантата при алло- и ксенотрансплантации путем ингибирования иммунной системы реципиента, а также проблема создания специфической толерантности организма хозяина к трансплантату путем создания смешанных антигенных химер генно-терапевтическими методами.

Ключевые слова: генная терапия, трансплантология, толерантность, вектора, антигенный химеризм

ВВЕДЕНИЕ. За последние десятилетия трансплантация органов достигла впечатляющих успехов благодаря использованию иммуносупрессивных средств. Однако, есть ряд серьезных проблем. Главная из них - недостаток донорских органов. Кроме того, длительная иммуносупрессия сопряжена с токсичностью, оппортунистическими инфекциями и высокой частотой возникновения раковых заболеваний (до 7 раз в течение 10 лет после трансплантации). Несмотря на иммуносупрессию, причиной неудачных пересадок является хроническое отторжение трансплантата. Около 50% почек отторгается в течение 10 лет после пересадки. Наконец, ранняя потеря трансплантата из-за клеточной смерти, независимо от иммунного узнавания, является частой проблемой как при клеточной трансплантации, так и при трансплантации васкуляризованного органа [1].

Патогенез отторжения пересаженного органа сложен и до конца не изучен. Причиной развития синдрома отторжения служат антигенные различия между донором и реципиентом. Активная ответная реакция организма реципиента направлена на распознавание чужеродных элементов и на разрушение клеток, несущих эти чужеродные элементы-антигены, следствием чего является иммунологическое повреждение пересаженного органа. Доказано, что в процессе нарушения функциональных и морфологических структур пересаженного аллогенного органа участвует иммунная система, а затем в механизм отторжения включаются многие патофизиологические, биохимические и морфологические (неиммунные) процессы. В ответ на иммунологическое повреждение

трансплантата организм незамедлительно включает неспецифические факторы агрессии (воспаление, нарушения свертывания крови и микроциркуляции и др.). Многочисленные данные экспериментальных и клинических исследований склоняют к мысли о том, что отторжение - это сложный вид острого или хронического асептического воспаления трансплантата [2].

Хроническое отторжение трансплантата обычно связывают с клеточными механизмами, когда Т-клетки распознают чужеродные антигены на поверхности эндотелиальных клеток трансплантата и медируют дальнейшее развитие реакции отторжения. Механизмы острого сосудистого отторжения трансплантата менее изучены и характеризуются активацией эндотелиальных клеток трансплантата независимо от Т-лимфоцитов [3].

Генная терапия предлагает новую стратегию решения некоторых из этих проблем. Целью терапии может быть создание толерантности трансплантата, под которым понимается иммунологическая индифферентность трансплантата в отсутствие иммуносупрессивных лекарств и хронического отторжения, или, по меньшей мере, при уменьшении необходимых доз иммуносупрессоров. Перенос генов имеет потенциальные преимущества по сравнению с систематическим введением соответствующих иммуносупрессивных биореагентов. Секретируемые белки, продуцируемые трансплантатом в результате переноса кодирующих эти белки генов в трансплантат, могли бы оказывать локальное иммуносупрессивное влияние, что позволило бы избежать генерализованной иммуносупрессии всего организма больного. Альтернативой секретируемым в результате генного переноса белкам могут быть прямые инъекции аналогичных рекомбинантных молекул (без предварительного переноса в трансплантат кодирующих их генов). Напротив, сверхэкспрессию связанных с мембраной молекул, таких как FasL, внутриклеточных белков (например, антиапоптотических молекул), или молекул, которые действуют в очень коротком диапазоне (таких как оксид азота - NO), до настоящего времени получали лишь путем генно-инженерных модификаций донорских тканей. Кроме того, трансплантация предоставляет возможность выполнять перенос генов *ex vivo*, что позволяет исключить многие осложнения, связанные с переносом генов *in vivo*, имеющим место в других клинических ситуациях [1].

При рассмотрении задач и стратегии генной терапии в трансплантологии необходимо учитывать сайт действия экспрессируемых молекул (внутриклеточные или мембранные молекулы) и характеристики клеток-мишеней (покоящиеся или делящиеся клетки, наличие экспрессии векторных вирусных рецепторов). В последние годы показано, что практически любая ткань может быть мишенью для переноса генов и что некоторые гены могут использоваться для продления выживания трансплантата. При этом применяют два основных подхода: ингибирование иммунного ответа реципиента против трансплантата и усиление протективных механизмов трансплантата.

1. Аллотрансплантация

1.1 Подходы генной терапии для предотвращения реакции отторжения трансплантата. При аллотрансплантации пересаживаемые донорские органы по определению неидентичны реципиенту по локусу главного комплекса гистосовместимости (МНС). При отсутствии иммуносупрессивной терапии иммунная система реципиента будет отторгать пересаживаемый орган, то есть трансплантат. Этот процесс медируется, главным образом, Т-клетками. Самотолерантность, то есть неспособность собственных Т-клеток реагировать против собственных тканей, создается, когда незрелые Т-клетки развиваются и обучаются в тимусе. Это происходит вследствие того, что большинство любых потенциально аутореактивных Т-клеток подвергается "негативной селекции", благодаря процессу клональной делеции, хотя клональная анергия (существование жизнеспособных Т-клеток, индифферентных к антигену) и поколение популяции регуляторных Т-клеток также могут играть роль. Главная цель трансплантационных иммунологов - индуцировать долговременную

толерантность по отношению к аллоантигенам трансплантата у реципиентов. Такое иммунологическое состояние позволило бы пациентам иметь нормальный иммунный ответ на чужеродные антигены (бактерии, вирусы и возникающие малигнизированные клетки), но быть толерантным по отношению к пересаженному органу и не отторгать его. В создании такой идеальной ситуации могла бы быть полезна генная терапия. Например, сами трансплантаты могли бы быть трансдуцированы с целью уменьшения их иммуногенности введением генов, блокирующих активацию Т-клеток, или донор-специфические антигены МНС могли бы быть введены реципиенту перед трансплантацией с целью индуцирования трансплантационной толерантности [4].

Во время отторжения экспрессия адгезивных молекул, таких как молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) и ее лиганды (LFA-1 и MAC-1), молекула васкулярной клеточной адгезии (VCAM-1) и молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС), активируется несколькими цитокинами, такими как интерлейкин-1, TNF-альфа и гамма-интерферон, вырабатываемыми активированными иммунокомпетентными клетками. Молекулы адгезии представляют собой гликопротеины клеточной поверхности. Эти гликопротеины важны для обеспечения сигналов во время узнавания антигенов для активации лимфоцитов и играют важную роль в патогенезе отторжения аллотрансплантата. Моноклональные антитела против молекул адгезии препятствуют межклеточному взаимодействию, уменьшая узнавание аллоантигенов и эффекторную функцию цитотоксических Т-клеток.

В обзоре Giannoukakis et al. [5] подробно разбираются процессы, происходящие после пересадки в трансплантате, и приводятся потенциальные модуляторы, которые могут способствовать минимизации ишемии и пролонгации выживания трансплантата. TNF-альфа, наряду с другими цитокинами, играет важную роль в процессе взаимодействия донорского органа с организмом реципиента. Моноклональные антитела против различных молекул адгезии, включая Р-селектин, ICAM-1 и антиген-1 лейкоцитарной функции (LFA-1) уменьшали остроту и последствия ишемического повреждения (ischemia/reperfusion injury - IRI) на моделях грызунов. Кроме активации молекул адгезии, цитокины могут способствовать образованию молекул, промежуточных для образования реактивного кислорода (РКП). Введение супероксиддисмутазы предотвращало острую почечную недостаточность у людей и способствовало выживанию трансплантата вследствие ингибирования влияния РКП вслед за реперфузией [5]. Zwacka et al. показали возможность использования аденовирусного вектора для доставки гена митохондриальной супероксиддисмутазы в печень мыши в качестве средства защиты против IRI и активации NF- κ B [6]. Эти наблюдения позволяют предположить, что возможно блокировать взаимодействие цитокина с его рецептором, активацию нейтрофилов и хемотаксис, образование РКП или комбинацию всех указанных факторов в предотвращении или минимизации IRI. Введение в организм реципиента трансплантата, особенно при наличии малейших повреждений, немедленно вызывает приток иммунных клеток реципиента, таких как макрофаги, НК-клетки, нейтрофилы, частично дендритные клетки, а также вызывает активацию эндотелиальных клеток в трансплантате или в прилегающих тканях. Уже сама хирургическая травма активизирует локальный иммунный ответ, медируемый антиген-неспецифическими процессами, которые могут включать комплемент, нейтрофилы, НК-клетки и макрофаги. Эти клетки затем могут инициировать воспалительный каскад, приводящий в результате к инфильтрату, состоящему из таких клеток, как Т- и В-лимфоциты, а также макрофаги и дендритные клетки (ДК), медирующие затем более специфичные антиген-зависимые процессы. Когда орган реваскуляризован, лейкоциты хозяина начинают мигрировать, "привязываясь" к эндотелию через молекулы адгезии клеточной поверхности семейства селектинов. В ответ на цитокины провоспаления типа TNF-альфа и

IL-1, эндотелиальные клетки экспрессируют E- и P-селектины, а последние затем взаимодействуют с нейтрофилами. Дальнейшая адгезия медируется интегринами, включающими LFA-1/ICAM-1 и очень поздним антигеном-4/молекулой-1 васкулярной клеточной адгезии (VLA-4/VCAM-1), которая способствует взаимодействию между лейкоцитами и эндотелиальными клетками. По-видимому, наиболее важными в отторжении трансплантата являются взаимодействия ICAM-1-LFA-1 и LFA-3-CD2. Эти процессы можно ингибировать либо с помощью специфических антител, либо с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, в том числе методами генной терапии, что подтверждено в экспериментах на животных, включая обезьян [1, 5].

Целью генно-терапевтической стратегии на уровне организма является ингибирование фаз инициации, развития и эффекторной фазы иммунного ответа реципиента против трансплантата. Ключевую роль в этом процессе играют Т-клетки, особенно CD4⁺ Т-клетки. Полная активация и пролиферация Т-клеток зависит от нескольких сигналов, вызванных взаимодействием Т-клеток и антиген-презентирующих клеток (АПК). Аллогенные пептиды главного комплекса гистосовместимости (МНС), экспрессируемые на АПК, распознаются рецепторами Т-клеток, что способствует появлению некоторых внутриклеточных сигналов, необходимых для активации Т-клеток. Однако одних этих сигналов недостаточно для полной активации Т-клеток. Необходимо еще костимуляторные сигналы, которые генерируются, главным образом, при взаимодействии молекул CD28 на Т-клетках с молекулами В7 на АПК. Экспрессия В7 зависит от доставки сигналов амплификации молекулами CD40 на АПК после взаимодействия с CD40L на Т-клетках. Для инициации и поддержания зависимого от Т-клеток иммунного ответа существенны также костимулирующие системы CD28-В7 и CD40-CD40L. Для полной активации Т-лимфоциты должны взаимодействовать с CD80 или CD86 через молекулу CD28. Кроме того, Т-клетки имеют также другой антиген клеточной поверхности, названный цитотоксическим антигеном-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), который может связываться даже с более высокой аффинностью с CD80 и CD86. В отличие от Т-клеточной костимуляции, медируемой CD28, сигнализация через CTLA-4, по-видимому, ослабляет и поэтому отменяет активацию. Тем не менее, блокада как CD40-CD40L, так и В7-CD28 путей была испытана с обнадеживающими результатами [5].

Амплификация Т-клеточного ответа и эффекторных механизмов (таких как клеточная цитотоксичность, продукция аллоантител, активация макрофагов и генерация медиаторов воспаления) требует продукции цитокинов и взаимодействия этих цитокинов с их рецепторами. Отторжение органов часто ассоциируется с увеличенной экспрессией генов цитокинов типа 1, таких как IL-2 или IFN-гамма, которые стимулируют презентацию антигенов и эффекторные механизмы [1].

1.2. Ингибирование иммунной системы реципиента методами генной терапии.

Ингибирование иммунного ответа на трансплантат может быть достигнуто как путем переноса генов непосредственно в клетки трансплантата, так и путем переноса генов в клетки иммунной системы реципиента. Перенос генов в трансплантат позволяет получать локальную продукцию иммуномодуляторных молекул, что могло бы создать микроокружение, действующее на клетки или их молекулы, непосредственно включенные в процесс антигенного узнавания трансплантата и его разрушения. В качестве альтернативы прямому модифицированию трансплантата, генетически измененные клетки можно котрансплантировать вместе с неизмененными клеточными трансплантатами для локального получения активных иммуносупрессивных биореагентов.

При генетической модификации иммунной системы реципиента перенос генов можно осуществлять либо в клетки костного мозга, либо в тимус для манипулирования селекцией В- или Т-лимфоцитов. Для блокировки презентации антигенов мишенью для генного переноса могут служить вторичные лимфоидные органы. В нескольких исследованиях перенос генов в клетки-предшественники костного мозга и в меньшей степени в тимус выполняли перед пересадкой органов

и тканей с хорошим результатом [1, 7-10, 28, 37]. Вторичные лимфоидные органы анатомически дисперсны и только недавно стали служить мишенью для генной модификации при использовании дендритных клеток.

1.3. Блокада костимулирующих сигналов. Изучается возможность блокады костимулирующих сигналов. Блокада взаимодействия B7/CD28 с экстрацеллюлярной частью CTLA4, связанной с Fc-фрагментом IgG (CTLA4Ig), обычно приводит к пролонгированному выживанию аллогенных васкуляризованных островков Лангерганса поджелудочной железы. Введение анти-CD40L-антител для блокирования взаимодействия CD40L/CD40 также приводило в результате к очевидному перманентному сохранению трансплантата у грызунов и приматов.

Перенос гена был описан только для CTLA4Ig, но перенос гена CD40Ig также можно представить себе в качестве подхода к блокированию отторжения трансплантата [1]. Перенос гена CTLA4Ig с помощью аденовирусного вектора в модели аллотрансплантации печени у крыс индуцировал неопределенно долгое выживание трансплантата [11].

В модели аллотрансплантации сердца крыс перенос гена CTLA4Ig с помощью аденовирусного вектора в миокард приводил к неопределенно долгому выживанию трансплантата у всех реципиентов, в то время как внутривенное введение соответствующего рекомбинантного белка (без предварительного переноса гена) приводило к увеличению срока выживания трансплантата только до 22 дней. Перенос гена приводил в результате к циркулированию CTLA4Ig в течение нескольких месяцев на высоком уровне и к ингибированию антиген-специфических гуморальных ответов. Однако, в эксперименте было показано, что не все иммунные реакции или лимфоидные компартменты подавлялись CDLA4Ig [1, 5].

В противоположность трансплантации васкуляризованных органов, на мышцах было показано, что аденовирусная трансдукция островковых клеток поджелудочной железы и трансдукция под капсулу почки генов, экспрессирующих CTLA4Ig, показали умеренную пролонгацию выживания трансплантата (от 9, 9 ± 2 дня до $21 \pm 2,2$ дня) у всех реципиентов. Важно, что выживание островковых клеток было сравнимо с выживанием, полученным путем систематического введения рекомбинантного белка и ассоциировалось с очень низким уровнем циркулирующих CTLA4Ig, как и при нормальном антиген-специфическом гуморальном иммунном ответе. Перенос гена CTLA4Ig в островковые клетки путем бомбардировки был неиммуногенным, но менее эффективным, и пролонгированное выживание модифицированных клеток составляло 50% случаев по сравнению с аденовирусной трансдукцией [1, 12]. Донорские дендритные клетки, трансдуцированные аденовирусом, кодирующим CTLA4Ig, показали пролонгированное выживание при инъекциях аллогенным реципиентам [13].

Таким образом, введение гена дает результаты лучшие или сравнимые с теми, которые получают при инъекции рекомбинантных белков с целью пролонгации выживания трансплантата.

1.4. Использование генов противовоспалительных цитокинов. Интересные результаты были получены с помощью манипулирования генами противовоспалительных цитокинов. Экспрессия цитокинов 2 типа или TGF-бета должна способствовать выживанию трансплантата путем ингибирования продукции цитокинов 1 типа и блокирования некоторых функций АПК и макрофагов [1]. Прямая инъекция плазмиды, то есть чистой ДНК, кодирующей TGF-бета1 без вирусного вектора, в не васкуляризованные неонатальные трансплантаты сердца у мышей, при пересадке взрослой мышши приводила к удвоению срока выживания трансплантата [14-16].

В других исследованиях было показано, что прямая инъекция в ткани сердца рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего TGF-бета1, приводила к пролонгированному выживанию васкуляризованного трансплантата сердца крыс, причем у значительной части реципиентов это выживание было неопределенно

долгим. Трансфер TGF-бета1 в участок, удаленный от трансплантата, не пролонгировал выживание трансплантата [17-19].

Сообщают, что перенос олигонуклеотидной последовательности, содержащей вирусный ген IL-10, также приводил к пролонгированному выживанию трансплантата сердца у мышей [20]. Вирусный цитокин IL-10 является цитокином вируса Эпштейн-Барра, он гомологичен клеточному цитокину IL-10, но не обладает иммуностимулирующей активностью Т-клеток [1]. Клеточный IL-10 способствует постоянному сохранению трансплантата печени и пролонгирует выживание трансплантата сердца у крыс. В обоих случаях были ингибированы локальные механизмы отторжения, хотя системная иммуносупрессия не определялась [21, 22].

1.5. Создание толерантности реципиента к трансплантату. Продукты генов главного комплекса гистосовместимости (МНС) являются основными медиаторами отторжения аллотрансплантата, и поэтому основной подход к созданию толерантности заключается в манипулировании иммунным ответом на аллогенные антигены МНС. Гены МНС представляют собой высококонсервативный полиморфный генный локус. Молекулы МНС - это поверхностные белки, которые представляют внутриклеточные пептиды их лиганду, Т-клеточному рецептору (TCR). Молекулы МНС класса I состоят из трех альфа-доменов и цепи бета-2-микроглобулина, которая не кодируется локусом гена МНС. Молекулы МНС 2 класса состоят из двух альфа-доменов и двух бета-доменов. Пептиды, которые презентуются на молекулах 1 класса, обычно происходят от внутриклеточных белков, в то время как молекулы 2 класса презентуют пептиды экстрацеллюлярного происхождения. Комплекс МНС запускает отторжение трансплантата, так как этот комплекс определяет различие между своим (сингенным) и "не своим" (аллогенным). В определенных ситуациях эта способность МНС может эксплуатироваться для достижения баланса иммунной системы от иммунитета до толерантности. На первых порах для создания толерантности применяли пре-трансплантационное переливание крови, но с ограниченным успехом [4]. Теперь же пытаются использовать перенос генов. Перенос генов МНС также полезен на моделях животных для изучения влияния аллогенных антигенов МНС на иммунные клетки реципиента без влияния на другие аллоантигены. Такой подход был впервые предпринят Madsen et al [7], когда единственный ген МНС 1 класса от донора был трансфицирован в мышечную клеточную линию реципиентного типа и введен реципиенту за 1-2 недели до трансплантации. При этом удалось не только достичь индифферентности к соответствующему трансплантату сердца, но было показано, что реципиент не нуждается в обработке всеми молекулами гистосовместимости донора. В работах Wong et al. трансдуцировали клетки костного мозга от реципиентной мыши с помощью ретровирусного вектора *ex vivo* геном МНС класса I [23]. Этот подход привел к долговременной индифферентности к полностью аллогенному трансплантату сердца. Претрансплантационное введение гена единственной донорской молекулы достаточно для неопределенно долгого выживания полностью аллогенного трансплантата сердца [24]. Реципиентов обрабатывают донорскими антигенами МНС, например, вводят донорский костный мозг или клетки крови, молекулы МНС и пептиды, в контексте неиммуногенной презентации антигена, то есть в отсутствие сигналов опасности или костимуляции. Пересадка донорского костного мозга может способствовать удержанию основного трансплантата, но связана с риском возникновения болезни трансплантат против хозяина (GVHD). Обнадеживающие результаты получены при аллогенной пересадке костного мозга в клинике. Донорские Т-клетки трансдуцировали *ex vivo* геном тимидинкиназы (tk) вируса простого герпеса 1 и вводили вместе с костным мозгом, истощенным по Т-клеткам. В случае GVHD-реакции трансплантат против хозяина- последующее введение аналогов нуклеозидов, таких как ганцикловир, селективно убивает пролиферирующие ТК+

аллореактивные Т-клетки, ответственные за GHVD [25].

Перенос генов МНС донорской природы в клетки костного мозга реципиентов дает явное преимущество. Высокий уровень МНС-полиморфизма не может быть препятствием к этому подходу, так как было показано, что презентация единственного аллельного продукта может в результате привести к ингибированию ответа реципиента на весь донорский гаплотип [6]. Другие авторы показали, что пересадка клеток костного мозга реципиента, трансдуцированных донорскими антигенами МНС класса 1 и 2 с помощью ретровируса, способствовала пролонгированному донор-специфическому выживанию органа [8, 9]. Выживание трансплантата было также пролонгировано вслед за экспрессией *ex vivo* донорских генов МНС класса 1 в фибробластах реципиента, которые систематически вводили в трансплантат реципиентов [6]. Неопределенно долгое выживание трансплантатов печени крыс у большинства реципиентов было получено в результате переноса с помощью плазмиды гена аллогенной молекулы МНС класса 1 в тимус *in vivo* вместе с антилимфоцитарной сывороткой [10, 26].

Способы доставки генов в органы с помощью методов *ex vivo* и *in vivo* постоянно совершенствуются, изучают также и способность различных органов удерживать экспрессирующиеся гены, а также распространять их в другие органы и ткани. Wang et al. показали на модели трансплантата сердца крыс, что после трансфера маркерных генов - *pRSVLacZ* и *pRSVL* их прямой инъекцией в ткани верхушки сердца синтез продуктов обоих генов определяли через 7, 27 и 60 дней после гетеротопной трансплантации. Однако, через месяц было очевидно снижение уровня экспрессии [27]. Acsadi et al., используя нативное сердце крысы, также показали подобную экспрессию гена в миокарде. Однако, *Lix* показал более низкий уровень экспрессии (2 недели). Терапия циклоспорином или использование мышечной ткани увеличивала стабильную экспрессию гена до 60 дней. Эти данные означают, что иммунная система способна регулировать экспрессию генов, что нежелательно для успешной трансплантации органов [28].

Shaked et al. использовали репликативно-дефектный ретровирус для доставки генов IL-7 и/или неомидии-фосфотрансферазы в условиях холодовой ишемии методом перфузии. Для опытов брали целые или усеченные трансплантаты печени крыс. Трансдукция отмечалась через 24 часа после перфузии и наблюдалась в течение 21 дня. Введение генов не влияло на метаболизм печени и усеченные трансплантаты увеличивались до нормальных размеров в течение 2 недель [29, 30].

Чтобы достичь более эффективной трансдукции, Csete et al. инфицировали при низких температурах, что важно при трансплантации, изолированные гепатоциты аденовирусным вектором, несущим *LacZ* ген под контролем цитомегаловирусного промотора. Эти гепатоциты культивировали и затем трансплантировали сингенным крысам. Вирусные белки присутствовали в течение 2 недель после трансплантации. Несмотря на столь короткое время экспрессии гена, этого времени может быть достаточно для преодоления клинических ограничений [31]. Drazan et al. расширили эти подходы внесением гена-супрессора рака в печень крыс. Было показано, что функция гепатоцитов не менялась при сверхэкспрессии гена p53, введенного аденовирусным вектором [32]. Сверхэкспрессия p53 может быть полезна при трансплантации клеток, несущих терапевтические гены, пролонгируя выживание пересаженных клеток.

Geissler et al. трансфицировали гепатоциты крыс кДНК, кодирующей как мембранный, так и секретируемый аллогенный белок МНС класса 1 - антиген RT1A. После экспозиции с трансфицированными гепатоцитами обоих типов аллогенные спленоциты крыс учитывали по результатам реакции цитотоксических лимфоцитов CTL. Перенос генов растворимого компонента МНС класса 1 в печень приводил к активации ответа CTL. Эти результаты позволяют предположить, что экспрессируемый гепатоцитами секретируемый алло-МНС-антиген может обладать иммуносупрессивными свойствами. Таким образом, была показана

особая роль печени для создания иммуносупрессии по сравнению с другими типами клеток, такими как мышечные или фибробласты [33]. Роль секретируемого МНС антигена подтверждена в других работах [34, 35].

Известно, что толерантность к антигенам МНС развивается путем презентации этих антигенов на эпителии тимуса. Имея в виду это свойство тимуса, Knechtle et al. попытались ввести МНС-антиген донора прямо в тимус еще до трансплантации. Авторы ввели кДНК донорского антигена МНС 1 класса (ACI-TR1.A, плазмидная форма) прямо в тимус крыс Lewis за 10 дней до трансплантации донорской печени ACI. Одновременно с инъекцией плазмиды крысам ввели внутривенно дозу антилимфоцитарной сыворотки. Девять из 13 крыс показали пролонгированное выживание трансплантата (>100 дней). У этих животных была индуцирована донор-специфическая индифферентность, то есть толерантность. Были найдены также доказательства клональной делеции, Т-клеточной анергии и показано присутствие Т-клеточных супрессоров, что подчеркивает комплексную природу этой тимус-индуцированной толерантности. Таким образом, приведенные данные ясно демонстрируют, что успешная трансплантация печени и формирование толерантности в тимусе взаимосвязаны. Более того, хотя в тимус был введен только один донорский антиген МНС класса 1, была индуцирована общая толерантность всего органа, несмотря на то, что животные имели полностью разные антигены МНС. Непрямой трансфер гена в тимус с использованием миобластов и миотрубок, как и фибробластов, в качестве клеточного посредника, также дал успешные результаты [10, 26, 36].

Csete et al. успешно инфицировали выделенные островковые клетки человека аденовирусным вектором AdHCMVsp1LacZ, содержащим кассету для экспрессии маркерного гена бета-галактозидазы. Инфицированные клетки выполняли свои функции, то есть отвечали на экзогенную глюкозу аналогично контрольным клеткам. Была показана эффективность этой системы *in vivo* переносом инфицированных таким же образом островковых мышечных клеток сингенным хозяевам. Эти островковые клетки были введены под капсулу почки мыши, у которой был вызван диабет с помощью стрептозотоцина. Функция островковых клеток была полноценной, и экспрессия внесенного белка не влияла отрицательно на эту функцию [37].

Chanine et al. трансфицировали мышечные клетки мыши (Н-2к) кДНК CTLA4Ig, белка сцепления, который препятствует активации Т-клеток блокированием коstimуляторного сигнала, трансдуцированного Т-клеточными рецепторами CD28 и CTLA4. CTLA4Ig-секретирующие миобласты котрансплантировали вместе с островковыми клетками под почечную капсулу диабетической мыши. Когда миобласты были сингенны хозяину (Н-2к), наблюдали их значительную пролонгацию, в среднем на 11,0-31,7 дней по сравнению с аллогенными (Н-2к) островковыми клетками. Когда миобласты были аллогенными, не наблюдали никакого преимущества в выживании. Постоянные уровни CTLA4Ig определяли вплоть до 60 дней после трансплантации [38].

Изменение иммунного ответа путем введения генов МНС донорского типа в костный мозг реципиента пытаются применить при пересадках гематопоетических стволовых клеток. Sykes et al. и Emery et al. выполнили ряд работ с целью показать возможность индуцирования трансплантационной толерантности путем введения в клетки костного мозга аллогенных генов МНС с помощью ретровируса [8, 9]. Emery et al. на модели мини-свиней показали, что аллогенная кДНК антигена класса 2 успешно экспрессировалась в моноядерных клетках периферической крови свиней, которым трансплантировали клетки аутологичного костного мозга, предварительно кокультивированные с ретровирусными супернатантами, с последующей трансплантацией почек. Эти исследования показали, что перенос аллогенных генов МНС с помощью ретровирусного вектора в костный мозг можно успешно применять в трансплантологии для создания толерантности [9].

Показано, что трансфер генов можно осуществлять в различные типы клеток (в клетки костного мозга, тимуса, сердца, печени, островковые и мускульные клетки, клетки кожи) с положительным результатом.

Таким образом, в настоящее время существуют три основные стратегии генной терапии отторжения трансплантата путем создания антигенного химеризма донор-реципиент с помощью МНС класса I: перенос генов МНС донора в тимус реципиента с последующей экспрессией антигенов МНС донора, экспрессия генетически измененными гепатоцитами растворимого антигена МНС класса I в результате переноса генов МНС донора в печень реципиента и экспрессия генномодифицированными клетками костного мозга антигена МНС класса I путем переноса генов МНС донора в костный мозг реципиента. При этом обычно используют протокол *ex vivo*, хотя иногда используют и протокол *in vivo* [10, 26, 36]. Применение процесса развития Т-клеток внутри тимуса с последующей индукцией толерантности было впервые описано Posselt et al. [39].

Реципиенты печени показывают в некоторых случаях способность удерживать МНС-несовместимые трансплантаты спонтанно, без обычной систематической иммуносупрессии после трансплантации. Предполагают, что это происходит вследствие пост-трансплантационного растворения и выделения в кровообращение донорских молекул МНС, которые впоследствии понижают аллореактивный ответ CTL [4].

Важность клеток костного мозга, особенно субпопуляции гематопозитических стволовых клеток (HSCs), в контексте генной терапии трудно переоценить. Их потенциал самообновления и дифференцировки во все гематопозитические линии делает их очень притягательными в качестве мишеней для переноса генов, особенно в тех ситуациях, как, например, генетические расстройства, когда требуется долговременная экспрессия трансгена. К сожалению, HSCs встречаются с очень низкой частотой в костном мозге и периферической крови, и вследствие этого трудно получить достаточное количество клеток для трансдукции *ex vivo* и последующего биологического эффекта. Очистка стволовых клеток для генной терапии основана, главным образом, на мобилизации стволовых клеток из костного мозга в систему периферического кровообращения с использованием таких агентов, как гранулоцит-макрофаг-колониальный стимулирующий фактор. Клетки затем собирают, используя метод флуоресцентного клеточного сортирования или магнитные шарики, покрытые антителами. Этот метод позитивного обогащения требует существования маркеров клеточной поверхности, потенциально специфичных для стволовых клеток, таких как *c-kit* (рецептор для фактора стволовых клеток у мышей) и CD38 у людей (хотя последнее неоднозначно). Негативное истощение, исключающее те клетки, которые определенно не являются стволовыми, представляет собой другой метод, который часто используется в комбинации с позитивной селекцией. Поиск новых специфичных маркеров для стволовых клеток в настоящее время представляет собой важнейшую задачу [4].

Костный мозг сам является часто трансплантируемой тканью, например, для пациентов, подвергшихся радикальной цитотоксической терапии при лейкомиях и других видах рака крови. Инфузия донорского костного мозга часто используется для обработки реципиентов перед трансплантацией плохо совместимого органа. Обработка реципиентов донорскими трансгенами МНС представляет собой более специфичный и безопасный метод. При этом не требуется введения живых донорских лимфоцитов и поэтому нет риска переноса клеток, которые индуцируют болезнь трансплантат против хозяина (GvHD) [4].

1.6. Стратегия индуцирования толерантности трансплантата. Толерантность, которая ликвидирует аллореактивность, была бы лучшей защитой против хронического отторжения. Толерантности достигают двумя путями: оптимизацией или минимизацией иммуносупрессии и созданием смешанного антигенного химеризма [40]. Введение истощенного по Т-клеткам костного мозга или гематопозитических стволовых клеток из аллогенного источника -

трансплантата реципиенту может привести к получению смешанного аллогенного химеризма. Смешанный аллогенный химеризм позволяет получить генерацию разнообразных Т-клеток, из которой аллореактивные лимфоциты должны быть удалены в тимусе (центральная толерантность). Смешанный химеризм не ингибируется циклоспорином или другими известными иммуносупрессивными агентами. К сожалению, этот химеризм у людей носит временный характер. Третий подход заключается в использовании биологических агентов, которые блокируют Т-клеточную костимуляцию. Этот подход особенно эффективен, когда его комбинируют с введением донорских клеток. Таким путем достигали толерантности к островковым клеткам поджелудочной железы у грызунов и приматов [38-40]. Schwarze et al. показали, что смешанный гематопозитический химеризм индуцировал долговременную толерантность к трансплантатам сердца у мини-свиней [41]. Однако, несмотря на создание толерантности, не всегда удается предотвратить болезнь хронического отторжения, например, васкулопатию аллотрансплантата сердца у мини-свиней [42, 43].

При реакции хронического отторжения активно экспрессируются от 100 до 300 генов цитокинов и других медиаторов воспаления в трансплантатах с хроническим отторжением по сравнению со стабильными трансплантатами. Как было показано на мышах, не имеющих гена гамма-интерферона и антител к нему, гамма-интерферон и лимфоциты, которые его продуцируют, играют особенно важную роль в хроническом отторжении [43-45]. Считают также, что в развитии хронического отторжения играют роль аутоиммунные процессы, медируемые трансплантацией. Наконец, непрямо аллоузнавание, по-видимому, является главным стержнем в общей картине развития хронического отторжения [43].

Стратегия индуцирования толерантности трансплантата может быть направлена на ингибирование продукции цитокинов типа 1, или, преимущественно, на активацию продукции цитокинов типа 2 (таких как IL-4, IL-10, IL-13) или TGF-бета. Инфильтрация трансплантата активированными иммунными клетками также требует взаимодействия между молекулами адгезии, экспрессируемыми эндотелиальными клетками, и лейкоцитами. Наконец, иммунный ответ можно выключить на более поздних стадиях путем замедления Т-клеток по нескольким механизмам. Например, молекулы CTLA-4, экспрессируемые на активированных Т-клетках, взаимодействуют с молекулами B7 и доставляют сигналы ингибирования к Т-клеткам. Белок сцепления, названный CTLA4Ig, был испытан на многочисленных аллогенных и ксеногенных моделях, как один, так и в комбинации с ксенобиотиками или антителами против молекул адгезии или CD40L для пролонгации выживания трансплантатов, в большинстве случаев с успехом, а иногда и с неопределенно долгим выживанием трансплантата. Белок CTLA-4Ig состоит из экстрацеллюлярного домена CTLA-4, который связывает CD80 и CD86 и Fc части IgG1 для стабилизации белка и пролонгирования его жизни *in vivo* [5].

Апоптоз активированных Т-клеток, в которых значительную роль играет взаимодействие Fas - Fas-L, также может выключить иммунный ответ. Все стадии, включенные в контролируемую активацию Т-клеток, являются потенциальными мишенями стратегии иммуносупрессии [1].

1.7. Иммуномодуляция с использованием дендритных клеток. Дендритные клетки (ДК) - одни из главных антиген-презентирующих клеток - представляют собой сложную гетерогенную систему, включающую бесчисленные субпопуляции, находящиеся в большинстве периферических тканей. ДК отличаются происхождением линий, экспрессией поверхностных молекул и биологическими функциями. Эти факторы, по-видимому, определяют Т-клеточные поляризующие сигналы и тип Т-клеточного ответа - Т-хелпер1, Т-хелпер2 или Т-регуляция, индуцированная ДК. ДК происходят из костного мозга, они способны индуцировать активацию Т-клеток, и таким образом инициировать иммунный ответ, но также способны и индуцировать толерантность. Механизм этой двойной функции до конца

не понят и поэтому существуют различные гипотезы, предполагающие тот или иной механизм действия ДК. При трансплантации органов проблема даже более сложная, вследствие сосуществования ДК донора, ответственных за прямое узнавание чужеродных антигенов Т-клетками, с ДК реципиента, ответственных за непрямую презентацию антигенов Т-клетками хозяина. Среди различных методов иммуноманипулирования, имеющих целью индуцирование толерантности, обнадеживающие, но неполные результаты дает блокада второго сигнального пути моноклональными антителами (анти-CD28, анти-B7, анти-CD40, анти-CD40L, CTLA4-Ig). Трансдукция незрелых ДК реципиента генами, кодирующими иммуносупрессивные или апоптотические молекулы, такие как IL-10, TGFb, CTLA4-Ig, Fas-лиганд, также способна индуцировать индифферентность. Другой многообещающий подход состоит в применении ассоциирующихся донорских клеток (клеток костного мозга, ДК, CD34+) и поликлональных или моноклональных антител (анти-CD4, анти-CD40L, CTLA4-Ig) для индуцирования микрохимеризма и частичной толерантности [42, 46-49].

Дендритные клетки считаются не только инициаторами и регуляторами иммунного ответа, но также потенциально мощным инструментом для терапевтических манипуляций с иммунной реактивностью при раке, инфекционных болезнях, отторжении трансплантата и аутоиммунных болезнях. ДК - высокоспециализированные мобильные "часовые", произошедшие от гемато-предшественников CD34+, которые передают антигены от периферических центров, таких как кожа или другие нелимфоидные ткани, к Т-клеткам во вторичных лимфоидных органах. Размер и мобильность ДК хорошо подходят для их роли захвата антигена и его презентации на редких, антиген-специфичных Т-клетках, экспрессирующих рецепторы, которые узнают антиген, связанный с молекулами МНС. Зрелые ДК синтезируют высокие уровни IL-12 и богаты продуктами МНС и многими молекулами-"аксессуарами", увеличивающими межклеточную адгезию (CD54, CD58) и костимуляцию (CD40, CD86). Толерогенность, по-видимому, связана с незрелыми ДК. В настоящее время очевидно, что ДК могут играть важную роль в регуляции периферической самотолерантности. Толерогенность ДК была доказана на экспериментальных моделях. ДК подавляли Т-клеточный ответ в Т-клеточном онтогенном, аллогенном, аутогенном и раковом иммунитете [42].

Некоторые агенты, такие как IL-10, TGF-бета или химерный белок сцепления CTLA-4Ig, блокирующий костимуляторный путь B7-CD28, или UV-B иррадиация, могут способствовать толерогенности ДК. Механизмы, лежащие в основе толерогенные свойства ДК, включают индукцию анергии, сдвиг к доминированию Th2-ответа, апоптоз или индукцию регуляторных клеток ('veto') [42, 5]. Так как ДК конститутивно экспрессируют антигены МНС и селективно взаимодействуют с Т-клетками хозяина, они стали в результате подходящей мишенью для генетических манипуляций с целью улучшения выживания трансплантата. Генами-кандидатами считают вирусный (*v*)IL-10, TGFb, Fas-L(CD95L) и CTLA4Ig. Использование вирусных векторов для модификации ДК *in vitro* уменьшает необходимость прямого введения векторных вирусных белков, в противоположность прямому введению вирусных векторов *in vivo*, и таким образом сводит к минимуму накопление антивирусных антител, что может предотвратить повторную обработку реципиента. Презентация *in vivo* аллоантигенов донорскими ДК в отсутствие костимуляции в дополнение к локальной продукции иммуносупрессивных молекул, таких как CTLA-4Ig, будет способствовать ингибированию анти-донорской реактивности и вызывать индукцию толерантности, наряду с минимизацией постоянного иммуносупрессивного влияния. Таким образом, используя генетически модифицированные ДК, можно улучшить терапию отторжения трансплантата [5, 47, 48].

В дополнение к дендритным клеткам, для индуцирования толерантности к аллоантигенам трансплантата можно использовать другие АПК, такие как

макрофаги. Zhang et al. показали способность АПК, дефицитных по Fas, индуцировать толерантность против аденовируса и, кроме того, эти авторы достигли аллоантиген-специфичной толерантности Т-клеток после аденовирусного переноса гена Fas-лиганда. Применяя этот подход, можно использовать генетически модифицированные ДК или другие АПК, экспрессирующие Fas-лиганд, наряду со специфическими аллоантигенами или даже аутоантигенами как средство достижения толерантности к трансплантату [5, 49, 50]. Проблеме толерантности в настоящее время уделяется много внимания и публикуется много работ, в том числе с применением ДК.

Хотя многие детали молекулярного механизма толерогенности ДК еще неясны, существующая информация предполагает, что дефицит костимуляторных молекул, экспрессия лигандов смерти (в особенности Fas-лиганда [CD95]), факторы микроокружения (особенно противовоспалительные/иммуносупрессивные цитокины) и ингибирование генов транскрипции регуляторных белков (например, ядерного фактора κ B) могут сообщать толерогенный потенциал ДК. Манипулирование ДК путем контроля их созревания и дифференциации, или генетическая модификация этих клеток с целью экспрессирования ими иммуносупрессивных молекул, открывают новые возможности для терапии отторжения трансплантата и аутоиммунной болезни. Уже достаточно много известно об управлении ДК. Ингибирование созревания ДК происходит при недостатке GM-CSF (гранулоцит-макрофаг колонийстимулирующий фактор). TGF-бета и IL-10 способствуют размножению распространению толерогенных ДК, NF- κ B усиливает толерогенность ДК [51].

Экспрессия генов иммуносупрессивных молекул ДК, таких как IL-10 и TGF-бета, молекул, блокирующих костимуляцию, таких как цитотоксический антиген Т-лимфоцитов (CTLA4Ig), или молекул, способных индуцировать апоптоз Т-клеток, таких как Fas-лиганд (FasL), увеличивают толерогенность ДК. Гены, кодирующие перечисленные молекулы, вводят в ДК с помощью аденовирусных или ретровирусных векторов, а также другими способами, например, электропорацией [51]. Billing et al. сообщили, что введение сингенных незрелых ДК, трансдуцированных аденовирусным вектором, кодирующим донорский антиген МНС класса I, в сочетании с анти-CD4 моноклональными антителами mAb, привело в результате к долговременному выживанию полностью аллогенных трансплантатов сердца [52]. Предварительная обработка реципиентов незрелыми донорскими ДК, происходящими из костного мозга, с использованием GM-CSF или GM-CSF+TGF-бета привело к значительной пролонгации выживания трансплантатов сердца у мышей [13]. Приводятся и другие разнообразные примеры применения модифицированных ДК в трансплантологии для создания толерантности, в том числе на добровольцах [51].

1.8. Перенос генов, индуцирующих апоптоз. Одним из основных механизмов, которым элиминируются активированные лимфоциты и регулируется степень иммунной реактивности, является апоптоз, запускаемый связыванием Fas-антигена клеточной поверхности с его лигандом (FasL/CD95L). Первые попытки обеспечить иммунопротекцию клеток с помощью Fas были противоречивы. В дальнейшем оказалось, что растворимый комплекс FasL обеспечивает защиту от апоптоза, в то время как связанный с мембраной комплекс отвечает за чувствительность [53]. Статистически достоверно показано, что при сверхэкспрессии растворимого FasL человека аллогенными островковыми клетками имеет место значительная пролонгация выживания трансплантата [12]. Дальнейшие исследования подтвердили роль FasL как иммунопротективной молекулы: было показано существенно пролонгированное выживание аллотрансплантата почки крысы, когда ген FasL вносили в донорскую почку с помощью аденовирусного вектора [54]. Хотя роль FasL как сигнального трансдуктора остается неясной, передача сигнала через Fas необходима для индукции апоптоза, и блокада взаимодействия Fas-FasL способна обеспечить

защиту аллогенному трансплантату. Эта защита может быть достигнута как сверхэкспрессией антагонистов в донорской ткани, так и введением трансгенов, кодирующих антагонисты, в сайт трансплантации хозяина. Существует еще одна возможность - растворимая химерная связь Fas-Ig [55]. Действительно, Fas-медирированная цитотоксическая активность Т-клеточного клона против клеток-мишеней сенсibilизированного реципиента могла быть предотвращена добавлением белка связывания Fas-Ig. Это позволяет предположить, что локальный трансфер высокого уровня кДНК Fas-Ig в аллотрансплантат может предотвратить FasL-зависимую деструкцию. С другой стороны, сигнально-дефективные варианты Fas, мутантные эффекторы, такие как FADD (Fas-ассоциированный белок домена смерти), ингибиторы проапоптотического каскада типа белка ctnA, кодируемого вирусом коровьей оспы, и члены семейства bcl-2, все могут быть полезны в подавлении индукции апоптоза, запускаемого Fas. Действительно, bcl-2 и другие члены этого семейства, такие как Bcl-x, продемонстрировали протективные свойства на моделях трансплантации костного мозга и при некрозе клеток вследствие гипоксии печени крысы после трансфекции гена, медирированного липосомами [5, 56].

Экспрессия тканями трансплантата молекул, индуцирующих апоптоз иммунных клеток, таких как FasL, может способствовать развитию толерантности к трансплантату индуцированием апоптоза Т-клеток, экспрессирующих Fas, реактивных по отношению к трансплантату. Однако, экспериментальные исследования дали неоднозначные результаты и показали, что регуляция воспаления и иммунного ответа Fas и FasL представляет собой сложный комплексный процесс, требующий дополнительного изучения [1, 10, 13].

1.9. Пути предотвращения острого отторжения. Как уже говорилось выше, острое отторжение и артериопатия трансплантата остаются тяжелыми проблемами при пересадках сердца. Артериопатия характеризуется утолщением интимы, связанным с пролиферацией клеток гладких мышц. Ингибирование экспрессии генов, вовлеченных в процессы острого отторжения и артериопатии, может быть осуществлено путем олигодезоксинуклеотидных "ловушек" (ODN). Так, на модели крысы показано, что антисмысловая последовательность ODN циклин-зависимой киназы 2 (cdk-2) и двухцепочечная ДНК с высокой аффинностью к E2F (E2F-ловушка) ингибируют образование неинтимы путем супрессии многих генов [57]. Ловушка против *цис*-элемента ядерного фактора каппа-В (NF-kB) предотвращает инфаркт миокарда подавлением экспрессии многих генов. NF-kB является критическим фактором в транскрипции многих генов, вовлеченных в воспаление и клеточную пролиферацию. Ловушка NF-kB, введенная *ex vivo*, замедляла у мышей как острое отторжение, так и артериопатию трансплантата блокированием активации ряда генов, среди которых были гены МНС класса I и II, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, а также cdk-2 киназы и cdc-2 киназы. Таким образом, на основе ДНК-технологии предложена новая терапевтическая стратегия для замедления острого отторжения трансплантатов сердца [57].

Одной из основных черт хронического воспаления также является появление артериопатий с диффузным утолщением интимы, образующимся в результате пролиферации васкулярных гладкомышечных клеток. На модели хронического отторжения сердца у грызунов ингибирование экспрессии циклин-зависимой киназы-2, важного фермента при переходе клетки из фазы G1 в S клеточного цикла, предотвращало пролиферацию гладкомышечных клеток и образование гиперплазии, и ингибировало экспрессию молекул клеточной адгезии эндотелиальными клетками [1, 57, 58]. Это было достигнуто путем доставки антисмысловых олигодезоксинуклеотидов в коронарные артерии с помощью комплексов японского гемагглютинирующего вируса с липосомами. Аналогично этому, медирированная сверхэкспрессия гена индуцибельной NO-синтазы (iNOS) ингибировала гиперплазию интимы на модели отторжения трансплантата аорты [59].

Введение молекул-иммуномодуляторов в аллотрансплантаты путем переноса генов может исключить побочные эффекты системной иммуносупрессии. Недавно были идентифицированы два гомолога хемокинов- *v-MIP-II* и *MC148*, кодируемые герпесвирусом человека HHV-8 и *Molluscum contagiosum* соответственно. Они обладают антагонистической активностью против многих рецепторов хемокинов CC и CXC. Перенос генов, отвечающих за синтез *v-MIP-II* и *MC148*, блокировал донор-специфический лимфоцитарный иммунитет (CTL) внутри аллотрансплантата сердца и заметно увеличивал срок выживания трансплантата у мышей, особенно если одновременно переносили ген *IL-10* [60]. Протоонкоген *c-myc* включается в митоген-индуцированную пролиферацию васкулярных гладкомышечных клеток, которые составляют основной путь атерогенеза. Ингибирование *c-myc* предотвращает пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток. С этой целью пытаются использовать антисмысловую стратегию или рибозимы [цит. по 5].

1.10. Неиммунная потеря трансплантатов. Значительная часть ранней неиммунной потери клеточных и васкуляризованных трансплантатов происходит за счет аноксии и за счет ишемических (*ischemia-reperfusion*) повреждений, которые запускают процесс накопления различных активных форм кислорода (АФК). Эти АФК ответственны за клеточную смерть внутри трансплантата, вызывая продукцию цитокинов и привлечение лейкоцитов. Оксидативный стресс также увеличивает вероятность последующего острого и хронического отторжения васкуляризованных трансплантатов [1]. Сверхэкспрессия гена митохондриальной супероксиддисмутазы, полученная с помощью аденовирусного вектора, введенного за 2 недели до ишемического повреждения, уменьшала постишемическое повреждение гепатоцитов васкуляризованного трансплантата печени крысы. Это уменьшение повреждения было связано с ингибированием редокс-медиаторной активацией факторов транскрипции - *NF-kB* и *AP1* [6].

Одним из ключевых моментов исследований переноса генов в трансплантологию является сверхэкспрессия антиапоптотических генов клетками трансплантата, причем имеется в виду не только предотвращение апоптоза вследствие ишемического повреждения, но и уменьшение гибели паренхиматозных клеток как результат основной болезни (например, при некоторых иммунных и неиммунных болезнях печени), или как следствие иммунных эффекторных механизмов, активных во время отторжения трансплантата. Эта антиапоптотическая стратегия была применена к модели подострой печеночной недостаточности, индуцированной введением анти-Fas антител. В этой модели трансплантируемые гепатоциты, экспрессирующие антиапоптотический ген *Bcl-2*, происходящий от трансгенных мышей, были устойчивы к апоптозу, переселяли печень и предотвращали смерть животных [61]. Кроме того, повреждение гепатоцитов и апоптоз могли быть предотвращены переносом гена *Bcl-2*, введенного с помощью аденовируса на модели ишемии печени [62].

Опубликованы данные о том, что *Bcl-2* защищает от апоптоза нервные клетки. Так, в культуре симпатических нейронов крысы сверхэкспрессия *Bcl-2*, введенного с помощью специально сконструированного вектора, предотвращала смерть нейронов, индуцированную отсутствием трофического фактора [63-65]. Ген *Bcl-2* с помощью аденоассоциированного вируса, неспособного к репликации, вносили в нейроны гиппокампа гербилов за 5 дней до ишемизации переднего мозга. Трансдукция *Bcl-2* предотвращала фрагментацию ДНК в CA1-нейронах, что обычно ассоциируется с клеточной смертью. Более того, применение *Bcl-2* через 1 час после ишемического инсульта также предотвращало фрагментацию ДНК [66]. В ряде работ показано, что сверхэкспрессия *Bcl-2* у трансгенных мышей увеличивала выживание фоторецепторов у мышей с дегенерацией сетчатки [63, 67]. *In vitro* было показано, что экспрессия антиапоптотических генов, таких как *Bcl-2*, *Bcl-xL* и *A-20*, не только защищает эндотелиальные клетки от апоптоза, но также ингибирует их активацию через *NF-kB* зависимые механизмы [1, 68].

Таким образом, генетическое модифицирование как самого трансплантата, так и иммунной системы будущего хозяина активно исследуется на моделях животных. Подводя итоги, следует отметить, что развиваются 3 основных подхода для достижения специфической иммуносупрессии и для исключения клеточного отторжения трансплантата:

1) Перенос генов, кодирующих иммуномодуляторные молекулы, такие как интерлейкины IL-10, IL-4, TGF-бета, которые действуют против Th1-лимфоцитов, участвующих в разрушении трансплантата.

2) Трансфекция или трансдукция генов, кодирующих молекулы, которые ингибируют костимуляторный сигнал активации Т-клеток, такие как антитела CTLA4-Ig или анти-CD-28, которые могут помочь иммунной системе хозяина быть специфично толерантной к аллоантигенам трансплантата.

3) Перенос в трансплантат генов, белковые продукты которых индуцируют апоптоз (Fas-лиганд). Эти молекулы при взаимодействии с Fas-молекулой, находящейся на поверхности активированных лейкоцитов, будут индуцировать программируемую клеточную смерть (PCD) таких лейкоцитов, при этом не позволяя осуществиться отторжению трансплантата, медирированного клетками [3].

1.11 Использование рибозимов для генной терапии в трансплантологии. В последнее время делаются активные попытки использовать рибозимы для целей генной терапии. Рибозимы представляют собой естественно встречающиеся молекулы РНК, которые могут действовать как энзимы и катализировать реакции по отношению к самим себе и к другим молекулам РНК. В результате генно-инженерных модификаций рибозимы могли бы расщеплять молекулы РНК специфическим образом в местах определенных последовательностей. В настоящее время используется множество различных рибозимов, чаще всего рибозим вируса гепатита дельта (HDV), рибозим слуховой косточки (HN) и шпилечный рибозим (HP). Все эти рибозимы первоначально получены в саморасщепляющейся форме и затем модифицированы для воздействия на внешние субстраты. Они имеют малые размеры и потому удобны для применения в генной терапии. Доставка рибозимов в клетки-мишени происходит путем прямой инъекции рибозимной РНК, путем прямой инъекции олигонуклеотидов, кодирующих рибозимы, или путем доставки генов рибозимов с помощью вирусного вектора, например, аденовируса. Была показана способность рибозимов подвергать таргетингу мРНК перфорины и Fas-лиганда *in vitro* в качестве терапии для предотвращения болезни трансплантат против хозяина (GvHD) перед аллогенной пересадкой костного мозга. Как уже говорилось выше, Fas-лиганд является молекулой клеточной поверхности и принадлежит к семейству рецепторов TNF. В клетку, несущую Fas, поступает сигнал смерти, приводящий к апоптозу. Перфорин, с другой стороны, представляет собой белок, который может полимеризоваться с образованием мембранных пор; это составляет важную часть киллерного механизма, используемого как CTLs, так и естественными киллерными клетками. Возможность разрушать мРНК перфорины и FasL в костном мозге донора с помощью рибозимов может быть полезным методом терапии GvHD [4, 69]. Другой потенциальной мишенью рибозимов в трансплантологии могут быть цитокины воспаления, такие как гамма-интерферон (IFN-гамма) или TNF-альфа, количество которых возрастает во время отторжения трансплантата. Хемокины, которые могут играть роль в направлении клеток воспаления к центру трансплантации и увеличивать их эффект, включая RANTES (регулируемые при активации, экспрессируемые и секретируемые нормальными Т-клетками), белок 1-бета (macrophage-inflammatory protein - MIP-1b), MCP-1-monocyte chemoattractant protein - белок, привлекающий хемокины к моноцитам, являются мощными будущими мишенями таргетинга генов для генной терапии рибозимами в трансплантологии [4]. Наконец, при ксеногенных пересадках, фермент альфа-(1,3)галактозилтрансфераза - основной фермент, связанный со сверхострым отторжением трансплантата, был подвергнут таргетингу рибозимом с помощью аденовирусного вектора, в результате чего комплемент-зависимая цитотоксичность значительно уменьшилась [4, 70].

1.12 Векторы для переноса генов. В этом обзоре мы не будем подробно рассматривать векторы для переноса генов. К числу векторов относятся ретровирусные векторы (MMLV-Moloney murine leukemia virus, HERV-C-human endogenous virus, lentivirus - HIV-1 и HIV-2). Ретровирусы в настоящее время очень широко распространены в клинической практике, так как способны обеспечить длительную экспрессию встраиваемого гена. Однако, они трансдуцируют только делящиеся клетки, которые находятся в стадии митоза и поэтому подходят для протоколов генного переноса полипотентных стволовых клеток (HSCs). Лентивирусы способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Они встраиваются в геном клетки-хозяина и имеют особый тропизм к CD4⁺ Т-клеткам, макрофагам и HSCs. Пока не вполне доказана безопасность лентивирусов и применение их ограничено. Вероятно, наиболее подходящим вектором для трансплантологии является аденовирус, так как он способен проникать в клетку-мишень при низких температурах (около 4°C), что позволяет проводить с ним претрансплантационные работы. Аденовирус не включается в геном клетки-мишени, а присутствует в ядре вне хромосомы в целом виде. Репликативно-дефектный аденовирус весьма широко используется в настоящее время, он имеет тропизм к широкому спектру клеток. Основным недостатком аденовирусного вектора заключается в том, что белки его оболочки вызывают иммунный ответ реципиента и реакцию воспаления. Поскольку аденовирус широко распространен среди людей, необходимо использовать его различные серотипы [71]. Кроме того, в настоящее время создаются варианты аденовируса, не содержащие иммуногенных белков. Используют также адено-ассоциированный вирус (AAV), вирусы простого герпеса (HSV) и вирус оспы (*Vaccinia virus*), а также вирусы гепатитов, имеющие тропность к печени. Все вирусы перед употреблением модифицируют так, что они теряют патогенность и способность к репликации в клетках человека/животного. Используют также липосомы (которые спонтанно связывают ДНК с образованием комплексов), фузигенные виросомы (с использованием гемагглютинирующего вируса Сендай (HVJ) и белка связывания (fusion protein), конъюгаты ДНК с лигандом (состоящие из ДНК-связывающего домена и лиганда для рецепторов клеточной поверхности), голую ДНК в виде плазмиды, а также баллистическую доставку генов с помощью нейтральных, например, золотых микросфер и трансфекцию с помощью фосфата кальция (которая весьма успешно применяется *in vitro*, но не подходит для экспериментов *in vivo*).

Весьма существенным обстоятельством успеха векторной генной терапии является то, с каким промотором связан в векторной кассете трансдуцируемый ген. Обычно исследователи используют промоторы и энхансеры (регуляторные элементы экспрессии) патогенных вирусов, так как они обеспечивают высокий уровень конститутивной экспрессии. Используют, например, промоторные и энхансерные элементы цитомегаловируса (CMV), вируса саркомы Рауса (RSV), SV40. Уровень и продолжительность экспрессии зависят от многих факторов, включая выбранный вектор, способ его введения и тип трансдуцируемой клетки. Низкий уровень и временный характер экспрессии перенесенного гена могут зависеть от ослабления действия промотора. Механизмы такого ослабления не вполне ясны, однако, экспериментально показано, что аденовирусные вектора индуцируют продукцию цитокинов, которые, воздействуя на трансдуцированную клетку, могут инициировать клеточные сигналы, которые модулируют экспрессию трансгена. Qin et al. показали, что экспрессию трансгена, контролируемую многими вирусными промоторами, ингибировали IFN-гамма и TNF-альфа, и что эти цитокины имели синергический эффект [4, 72]. Введение нейтрализующих анти-IFN-гамма моноклональных антител *in vivo* увеличивало экспрессию трансгена [4, 73]. На молекулярном уровне промоторы, происходящие от SV40, CMV и RSV, все имеют интерферон-зависимую последовательность. Ядерные факторы, продуцируемые как результат взаимодействия IFN-гамма на клеточной

поверхности, связываются с элементами в этих вирусных промоторах, что ингибирует транскрипцию трансгена [4, 74]. Таким образом, следует выбирать промоторы, окружение которых при попадании в трансдуцируемую клетку будет усиливать экспрессию. Например, промотор генов МНС класса I, возможно, был бы подходящим промотором для иммунорегуляторной генной терапии, так как цитокины воспаления, такие как IFN-гамма, действуют на этот промотор с увеличением транскрипции [4].

Работа над методами введения генов в клетки-мишени является остро актуальной и перспективной [75]. Успешно разрабатываются методы управления экспрессией трансдуцированных генов во времени путем последующего введения различных лекарств и путем введения суицидных генов.

2. Ксенотрансплантация.

Ксенотрансплантация потенциально может обеспечить решение проблемы недостатка органов для аллотрансплантации. Поэтому направление ксенотрансплантации активно развивается наряду с клеточной трансплантацией. Иммунологические и физиологические проблемы ксенотрансплантации подробно рассматриваются в соответствующей литературе [5, 76-79]. Иммунологический ответ при пересадках человеку органов животных других видов включает реакции сверхострого отторжения, в том числе взаимодействие между естественными ксенореактивными антителами и их мишенями - ксеноантигенами и активацию каскада системы комплемента, а также острое сосудистое отторжение и хроническое отторжение с активным участием Т-лимфоцитов. Генная терапия может быть полезна на всех стадиях преодоления иммунологического барьера.

Наиболее вероятным животным, которое предполагается использовать при ксенотрансплантации, является свинья вследствие ее распространенности, дешевизны, отсутствия этических соображений и относительной физиологической близости к человеку. Создание трансгенных свиней приведет к получению органов, менее чувствительных к иммунологической реакции хозяина, вызывающей отторжение трансплантата. При пересадке органов свиней приматам происходит реакция сверхострого отторжения, которую связывают с присутствием на поверхности сосудистых клеток свиных органов особых антигенов - гликопротеинов Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α Gal), которые находят во всех тканях свиней, но которых нет в организме приматов. Однако в организме приматов существуют антитела к указанным свиным гликопротеинам. Связывание анти- α Gal-антител с их антигеном на поверхности сосудов органов свиньи приводит к массивной активации каскада системы комплемента и активации эндотелиальных клеток, что приводит к потере их барьерных функций, геморрагиям, тромбозу и ишемии [78]. Чтобы преодолеть реакцию сверхострого отторжения и продлить выживание трансплантата, используют генно-инженерные технологии.

Трансплантация реципиентам клеток их собственного костного мозга, экспрессирующих донорские молекулы, была применена для ксенотрансплантации с целью индуцирования анергии к α Gal-эпитопу. Этот эпитоп является главной мишенью для преобразования естественных антител, которые медируют гиперактивное отторжение васкуляризованных ксенотрансплантатов. Было показано, что медирующая ретровирусом экспрессия в костном мозге альфа(1-3)-галактозилтрансферазы (α GT), ответственной за синтез α Gal-эпитопа, блокирует продукцию анти- α Gal-антител [80]. Было показано [81], что восстановление летально облученных α GT нокаутированных мышей (α GT⁰ мышей) с помощью клеток костного мозга, трансдуцированных α GT, или от GT-помета препятствует отторжению трансплантатов сердца от мышей дикого типа, медируемого антителами. То есть индукция молекулярного химеризма путем генной терапии препятствовала отторжению трансплантата сердца, медируемого антителами.

Чтобы получить свиней с низким уровнем экспрессии α Gal, в эмбрионы свиней микроинъекцией вводили ген фермента альфа-1,2-фукозилтрансферазы, который конкурирует с альфа-1,2-галактозилтрансферазой за лактозамин как за

акцепторный субстрат. В результате не образуется α Gal, который обычно получается в результате переноса молекулы галактозы к лактозаминовым остаткам с помощью альфа-1,2-галактозилтрансферазы.

Необходимо отметить, что α Gal антитела являются лишь одним из многих аспектов анти-свиного иммунного гуморального ответа у приматов до трансплантации и при длительном взаимодействии со свиным органом на первый план могут выйти другие, не менее важные антитела.

Для предотвращения реакции сверхострого отторжения и пролонгирования выживания ксенотрансплантата исследуется также возможность вмешательства в активацию каскада системы комплемента. Известно, что у людей активация системы комплемента модулируется видоспецифичными регуляторами, такими как фактор, ускоряющий распад (decay-accelerating factor - DAF), мембранный кофакторный белок (MCP) и CD59. *In vitro* было показано, что экспрессия DAF человека на эндотелиальных клетках аорты свиньи защищала их от лизиса комплементом человека. Недавно были получены свиньи, трансгенные по DAF человека, MCP и CD59, и экспрессирующие соответствующие факторы. *In vivo* был показан протективный эффект против сверхострого отторжения при успешной пересадке свиных сердец и почек нечеловекообразным обезьянам [77,78,82,83].

Острое сосудистое отторжение (acute vascular rejection - AVR) в основных чертах аналогично острому сосудистому отторжению при аллогенных пересадках. Недавние исследования установили вовлечение активированных эндотелиальных клеток ксенотрансплантата (ответ по 2 типу) в отсутствие Т-клеток и индукцию ряда провоспалительных генов. В результате этого явления происходит инфильтрация моноцитами и естественными киллерными клетками (NK), прокоагуляция, агрегация тромбоцитов и воспаление ксенотрансплантата [3]. На молекулярно-генетическом уровне происходит разрегулирование работы генов и синтеза белков в эндотелиальных клетках микрососудов. При этом затрагиваются гены тканевого фактора, Е-селектина, VCAM-1, ICAM-1, и гены некоторых цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1. Преодоление AVR является, возможно, наиболее сложной проблемой. Существует несколько подходов для решения этой проблемы. Один из них - преодоление активации эндотелиальных клеток или установления аккомодации (приспособляемости) ксенотрансплантата в присутствии антител против ксенотрансплантата и комплемента. В результате исследований на грызунах показана ключевая роль в этом процессе фактора транскрипции NF- κ B, некоторых антиапоптотических генов и лимфоцитов Th2. Антиапоптотические гены, такие как *A20*, *Bcl-2*, и *Bcl-xl* также способны ингибировать активацию NF- κ B. Исследователи успешно переносили свиные эндотелиальные клетки с этими генами и было показано, что эти эндотелиальные клетки оказывались устойчивыми к их активации *in vitro* в присутствии фактора активации TNF-альфа. При активации эндотелиальных клеток происходит потеря ими тромбомодулина и АТРазной активности клеточной поверхности, что приводит к потере антитромботических свойств этими клетками. Сохранение антитромботических свойств эндотелиальными клетками свиньи успешно решается с помощью генетических манипуляций. Недавно генетическими методами *in vitro* была получена стабильная экспрессия тромбомодулина человека на эндотелиальных клетках свиньи. Ведутся работы и по поддержанию стабильной АТРазной активности в окружении вновь пересаженного органа [3, 78, 82].

Таким образом, успешные эксперименты *in vivo* помогли определить стратегию генной терапии сосудистого отторжения (AVR). Она заключается в переносе генов антитромботических молекул (тромбомодулина, АТРазы) или ингибирования провоспалительных генов (фактор транскрипции NF- κ B) наряду со сверхэкспрессией протективных генов (*Bcl-2*, *Bcl-xl*) в эндотелии ксенотрансплантата [3, 84].

Роль клеточных механизмов в развитии реакции отторжения свиных ксенотрансплантатов изучена мало и, по-видимому, как и при

аллотрансплантации, медируется Т-лимфоцитами. При более детальном изучении этих механизмов можно будет идентифицировать новые потенциальные мишени для генетических модификаций. Целью клеточной терапии должна быть замена или увеличение биологической функции измененных органов или тканей. При этом могут быть модифицированы методами генной инженерии либо клеточные линии, либо аутологичные, аллогенные или ксеногенные первичные клетки с целью синтеза и секретирования растворимых факторов или активных веществ с системным эффектом [3].

Несмотря на обнадеживающие результаты, в целом область генной терапии в трансплантологии находится в начале своего развития. Необходимо лучше понять механизмы действия каскада цитокинов, роль Fas-лиганда и молекул МНС классов 1 и 2. Должны быть лучше развиты методы переноса генов и контроля их экспрессии. В будущем генная терапия способна решить некоторые из основных проблем трансплантологии, она должна найти свое место среди других, уже применяющихся методов иммуносупрессии.

Помимо развития техники введения генов, важно идентифицировать молекулярные мишени для уменьшения быстрой смерти клеток, наблюдающейся после трансплантации, для достижения толерантности и уменьшения хронического отторжения. Другие препятствия применения генной терапии в трансплантологии могут быть преодолимы. Так, иммунный ответ хозяина на вектор генного переноса может быть уменьшен экспрессией иммуносупрессивных генов. Могут быть также использованы некоторые другие формы иммуносупрессии. Основной недостаток метода генной терапии на сегодняшний день - это временная экспрессия генов, полученная с большинством векторов. В большинстве случаев введенный ген перестает работать в течение непродолжительного времени - от нескольких дней до нескольких месяцев. В таких случаях необходимы повторные переносы генов.

Проблема сохранения генов может быть решаемая, так как механизмы удержания трансплантата могут установиться спонтанно после короткого периода терапевтической иммуноинтервенции [1]. Например, известно явление клеточного химеризма без генной терапии у длительно живущих реципиентов аллотрансплантатов почки и особенно печени. Перенос иммуномодуляторных генов представляет собой полезный подход для манипуляции иммунным ответом.

Lee et al. добились уменьшения клеточного ответа (свинья против человека) изменением свиного МНС с помощью человеческих экзогенов *HLA DRW0401*. С помощью техники микроинъекций получили свинью, трансгенную по гену *HLA Dpw0401*. Экспрессию этого гена в моноцитах периферической крови (PBMCS) определяли с помощью RT-PCR и проточной цитометрии. Определяли также антигенность и клеточный ответ трансгена. Полученные данные указывают на возможность создания большей толерантности моноцитов периферической крови человека по отношению к свиным клеткам путем трансфера гена человеческого фенотипа *HLA Dpw0401* в клетки свиньи и путем создания генерации HLA-трансгенных свиней [76].

Гиперострое отторжение, медируемое ксенореактивными антителами (HAR), и замедленное отторжение ксенотрансплантата (или острое васкулярное отторжение) представляют главную опасность для выживания ксенотрансплантата. Успешно применялись различные стратегии для подавления указанных видов отторжения, включая использование органов от трансгенных свиней, несущих человеческий экзогенный фактор, усиливающий разрушение [84,85], истощение или подавление продукции ксенореактивных антител. Клеточный ответ, индуцированный различиями МНС между разными видами, может обеспечить продолжительное вредное влияние на трансплантат, даже если ксенотрансплантату удалось избежать гибели от гиперострого или острого васкулярного отторжения. Показано, что молекулы МНС могут эффективно индуцировать сильный Т-клеточный ответ человека через механизмы прямого или непрямого узнавания чужеродных антигенов. К этому процессу подключается

также анти-свиная цитотоксичность естественных киллеров человека, независимая от Т-клеток и антител [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Главные направления развития генной терапии в трансплантологии (органной или клеточной), по-видимому, определились. Эти направления заключаются в преодолении отторжения трансплантата (молекулярные механизмы которого не вполне ясны), в попытке отмены или уменьшения систематической супрессии иммунной системы организма реципиента, а также в развитии стратегии трансфера терапевтических генов и генов-"наблюдателей". Основная проблема применения генной терапии в трансплантации органов заключается в кратковременной экспрессии перенесенных генов при использовании имеющихся в настоящее время методов доставки генов. Следующая проблема, ограничивающая применение генной терапии - часто низкий уровень экспрессии внедренных генов. Иммунный ответ реципиента на белки векторов (например, аденовирусного вектора) и ослабление действия промоторов препятствуют долговременной экспрессии генов и создают дополнительные осложнения. Недостаточное понимание подходящих форм, количеств и локализации антигенов МНС классов 1 и 2 для представления иммунной системе, а также неполное понимание соответствующей окружающей среды для цитокинов, применяемых с целью удержания трансплантата, также являются проблемой, решение которой будет способствовать успешному применению генной терапии в трансплантологии.

Поэтому совершенствование техники генного переноса, создание новых векторов и не векторных систем переноса генов, более эффективных и безопасных, создание способов контроля за экспрессией генов и разработка способов управления этой экспрессией являются наиболее актуальными задачами на сегодняшний день. Границы между вирусными и невирусными векторами стираются и новые вектора будут гибридами, включающими качества различных векторов.

С точки зрения иммунологии, необходимо лучше изучить механизмы действия молекул МНС классов 1 и 2, чтобы успешно манипулировать ими для создания толерантности реципиента по отношению к трансплантату. Дальнейшее развитие понимания механизмов регулирования цитокинами процессов аллоиммунного ответа приведет к тому, что станет возможной и безопасной регуляция иммунного ответа реципиента путем контроля через воздействие на локальные и системные цитокины [26]. Развитие претрансплантационного микрохимеризма у реципиентов трансплантата путем введения сингенного костного мозга, трансдуцированного донорскими генами МНС классов 1 и 2, представляет собой многообещающий подход. Успехи в развитии методов выделения HSCs позволяют надеяться на улучшение положения в терапии GvHD.

В контексте органной и тканевой трансплантации генная терапия может использоваться для предотвращения острого и хронического отторжения пересаженных тканей как введением новых генов, способных препятствовать отторжению, как, например, иммуносупрессивные цитокины или молекулы-блокаторы костимуляции, так и введением антисмысловых нуклеиновых кислот для блокирования продукции молекул, ассоциирующихся с отторжением, таких как молекулы адгезии. Создание локальной донор-специфической толерантности методом претрансплантационного введения реципиенту донорских генов аллоантигенов может существенно уменьшить проблему мощной общей иммуносупрессии реципиента [42].

ЛИТЕРАТУРА.

1. Guillot C., Le Mauff B., Cuturi M.C., Anegon I. (2000) Gene Therapy, 7, 14-19.
2. Шумаков В.И., Левицкий Э.Р., Порядин Н.Ф., Алексеев Л.П. (1982) Синдром отторжения при трансплантации почки. Москва, Медицина.
3. Aran J-M., Fillat C., Estivill X. (1999) Transplant.Proceedings., 31, 2228-2229.
4. Fry J.W., Wood K.J. (1999) Exp.Rev.Mol.Med., Cambridge University Press ISSN. www-ermm.cbcu.cam.ac.uk

5. Giannoukakis N., Thomson A.W., Robbins P.D. (1999) *Gene Therapy*, **6**, 1499-1511.
6. Zwacka R.M., Zhou W.H., Zhang Y.L. et al. (1998) *Nature Med.*, **4**, 698-704.
7. Madsen J.C., Superina R.A., Wood K.J., Morris P. (1988) *Nature*, **332**, 161-164.
8. Sykes M., Sachs D.H., Nienhuis A.W. et al. (1993) *Transplantation*, **55**, 197-202.
9. Emery D.W., Sablinski T., Shimada H. et al. (1997) *Transplantation*, **64**, 1414-1423.
10. Knechtle S.J., Wang J., Graeb Ch. et al. (1997) *J.Immunol.*, **159**, 152-158.
11. Olthoff K.M., Judge T.A., Gelman A.E. et al. (1998) *Nature.Med.*, **4**, 194-200.
12. Gainer A.L., Suarez-Pinzon W.L., Min W.P. et al. (1998) *Transplant.Proc.*, **30**, 534.
13. Lu L., Gambotto A., Lee W.c. et al. (1999) *Gene Therapy*, **6**, 554-563.
14. Qin L., Chavin K.D., Ding Y. et al. (1995) *Transplantation*, **59**, 809-816.
15. Qin L., Ding Y., Bromberg J.S. (1999) *Transplant.Proceedings*, **31**, 882-883.
16. Qin L., Chavin K.D., Ding Y. et al. (1994) *Ann.Surg.*, **220**, 508-518.
17. Guillot C., David A., Coathalem H. et al. (1999) *Biochem.Soc.Trans.*, **27**, 864-869.
18. Josien R., Douillard P., Guillot C. et al. (1998) *J.Clin.Invest.*, **102**, 1920-1926.
19. Qin L.H., Ding Y.Z., Bromberg J.S. (1996) *Hum. Gene Therapy*, **7**, 1981-1988.
20. Qin L.H., Ding Y.Z., Pahud D.R. et al. (1997) *Hum.Gene Therapy*, **8**, 1365-1374.
21. Shinozaki K., Yahata H., Tanji H. et al. (1999) *Gene Therapy*, **6**, 816-822.
22. David A., Chetritt J., Guillot C. et al. (2000) *Gene Therapy*, **6**, 619-623.
23. Wong W., Stranford S.A., Morris P.J., Wood K.J. et al. (1997) *Transplant.Proc.*, **29**, 1130.
24. Wong W., Morris P.J., Wood K.J. (1997) *Transplantation*, **63**, 1490-1494.
25. Cohen J.L., Boyer O., Klatzmann D. (1999) *Immunol.Today*, **20**, 172-176.
26. Knechtle S.J. (1996) *Transplant. Proceedings*, **28**, Suppl.1., 19-23.
27. Wang J.-S., Shum-Tim D., Galipeau J. et al. (2000) *J.Thorac.Cardiovasc.Sur.*, **120**, 999-1006.
28. Acsadi G., Jiao S., Jani A. et al. (1991) *Nature New Biol.*, **2**, 71-81.
29. Shaked A., Csete M.E., Shiraishi M. et al. (1994) *Transplantation*, **57**, 32
30. Shaked A., Csete M.E., Drazan K.E. et al. (1994) *Transplantation*, **57**, 1508-1511.
31. Csete M.E., Drazan K.E., van Bree M. et al. (1994) *Transplantation*, **57**, 1502-1507
32. Drazan K.E., Shen X-D, Csete M.E. et al. (1994) *Surgery*, **116**, 197-203.
33. Geissler E.K., Korzun W.J., Graeb C. (1997) *Transplantation*, **64**, 782-786.
34. Geissler E.K., Graeb C., Tange S. et al. (2000) *Hum. Gene Therapy*, **11**, 459-469.
35. Geissler E.K., Scherer M.N., Graeb C. (2000) *Transplant.Int.*, **13**, Suppl.1: S452.
36. Knechtle S.J., Wang J., Jiao S. et al. (1994) *Transplantation*, **57**, 990-996
37. Csete M.E., Benhamon P.Y., Drazan K.E. et al. (1995) *Transplantation*, **59**, 263-266.
38. Chanine A.A., Yu M., McKernan M.M. et al. (1995) *Transplantation*, **59**, 1313-1318
39. Posselt A.M., Baker C.F., Tomaszewski J.E. et al. (1990) *Science*, **249**, 1293-1295.
40. Platt J.L., Lakkis F.G. (2001) *Transplantation.Suppl.*, **72**, S3-S4.
41. Schwarze M.L., Menard M.T., Fuchimoto Y. et al. (2000) *Ann.Thorac.Surg.*, **70**, 131
42. Madsen J.C. (2001) *Transplantation.Suppl.*, **72**, S10-S12
43. Hayry P., Aavik E., Loubtchenkov M., Koskinen P. (1998) *Graft*, **1**, 154
44. Raisanen-Sokolovski A., Glysing-Jensen T., Koglin J., Russel M.E. (1998) *Am.J.Pathol.*, **152**, 359
45. Russel P.S., Chase C.M., Winn H.J., Colvin R.B. (1994) *Transplantation*, **57**, 1367
46. Saas Ph., Tiberghien P. (2002) *Transplantation.Suppl.*, **73**, S12-S15.
47. Thomson A.W., Mazariegos G.V., Reyes J. et al. (2001) *Transplantation.Suppl.*, **72**, S13-S22.
48. Rifle G., Mousson Ch. (2002) *Transplantation.Suppl.*, **73**, S1-S2.
49. Steptoe R.J., Thomson A.W. (1996) *Clin Exp.Immunol.*, **105**, 397.
50. Zhang L.H., Pan J.P., Yao H.O. et al. (2001) *Gene Therapy*, **8**, 1333-1342.
51. Lu L., Thomson A.W. (2002) *Transplantation.Suppl.*, **73**, S19-S22
52. Billing J.S., Fry J.W., Wheeler P.R. et al. (2001) *British Transplantation Soc., 4th Annual Congress 2001, Jon Radcliffe Hospital Oxford, March 27-29, Abstr. L28*
53. Herve P. (2002) *Transplantation*, **73**, S43-S44.
54. Swenson K.M., Ke B., Wang T. et al. (1998) *Transplantation*, **65**, 155-160.
55. Hanabuchi S., Koyanagi M., Kawasaki A. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, **91**, 4930-4934.
56. Yamabe K., Shimizu S., JKamiike W. et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., **243**, 217-223.
57. Suzuki J., Morishita R., Amano J. et al. (2000) Gene Therapy, **7**, 1847-1852.
58. Suzuki J., Isobe M., Morishita R. et al. (1997) Nature Med., **3**, 900-903.
59. Shears L.L., Kawarahada N., Tzeng E. et al. (1997) J.Clin. Invest., **100**, 2035-2042.
60. De Bruyne L.A., Li K., Bishop D.K., Bromberg J.S. (2000) Gene Therapy, **7**, 575-582.
61. Mignon A., Guidotti J.E., Mitchell C. et al. (1998) Nature Med., **4**, 1185-1188.
62. Bilbao G., Contreras J.L., Gomez-Navarro J. et al. (1999) Transplantation, **67**, 775-783.
63. Bennett J., Zeng Y., Bajwa R. et al. (1998) Gene Therapy, **5**, 1156-1164.
64. Garcia I., Martinou I., Tsujimoto Y., Martinou J-C. (1992) Science, **258**, 302-304.
65. Allsopp T.E., Wyatt S., Paterson H.F., Davies A.M. (1993) Cell, **73**, 295-307.
66. Shimazaki K., Urabe M., Monahan J. et al. (2000) Gene Therapy, **7**, 1244-1249.
67. Chen J., Flannery J.G., La Vail M.M. et al. (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **93**, 7042-7047.
68. Badrichani A.Z., et al. (1999) J.Clin.Invest., **103**, 543-553.
69. Du Z., Ricirdi C., Podack E., Pastori R.L. (1997) Transplant.Proceedings, **29**, 2224-2225.
70. Hayashi S. et al. (1997) Transplant.Proc., **29**, 893
71. Hayashi S. (1996) Microb.Immunolog., **41**, 751-756.
72. Qin L.H., Ding Y.Z., Pahud D.R. et al. (1997) Hum Gene Therapy, **8**, 2019-2029.
73. Harms J.S., Splitter G.A. (1995) Hum.Gene Therapy, **6**, 1291-1297.
74. Gribaudo G., Ravaglia S., Caliendo A., Cavallo R. et al. (1993) Virology, **197**, 303-311.
75. Баранов В.С. (1999) Соросовский образов.журнал, **3**, 1-6.
76. Lee J.-M., Tu Ch.-F., Yang P.-W. et al. (2002) Transplantation, **73**, 193-197.
77. Schmoedel M., Bhatti F.N., Zaidi A. et al. (1998) Transplantation, **65**, 1570-1577.
78. Cozzi E., Soin B., Holmes B., White D. (2000) Transplant.Proceedings, **32**, 2701-2703.
79. Шумаков В.И., Тоневский А.Г. (2000) Иммунологические и физиологические проблемы ксенотрансплантации. Москва, Наука
80. Bracy J.L., Sachs D.H., Iakomini J. (1998) Science, **281**, 1845-1847.
81. Bracy J.L., Chase C.M., Russell P.S. et al. (2001) Gene Therapy, **8**, 1738-1744.
82. Cozzi E., Langford G.A., Pino-Chavez G. et al. (1996) Xenotransplantation, **3**, 128
83. Zaidi A., Schmoedel M., Bhatti F. et al. (1998) Transplantation, **65**, 1584-1590.
84. Bach F.H. (1998) Ann.Rev.Med., **49**, 301-310.
85. Cozzi E., Bhatti F., Schmoedel M. et al. (2000) Transplantation, **70**, 15-21.

Поступила 2.11.2002

GENE-CELL THERAPY AND POSSIBILITIES OF ITS APPLICATION IN TRANSPLANTOLOGY FOR PREVENTION OF TRANSPLANT REJECTION

M.S. Dolguikh

Institute of Transplantation and Artificial Organs, Shchukinskaya 1, Moscow, 123182, Russia.
tel.: 190-42-67; e-mail: Biolab@online.ru

Review considers perspectives and the main advantages in the development of the approaches to gene therapy in organ and cell transplantation. The methods of prevention in allo- and xenotransplantation by the inhibition of the recipient immune system, and the problem of specific tolerance to graft in host organism creation by mixed antigenic chimerism making by means of gene therapy methods are discussed.

Key words: gene therapy, transplantation, tolerance, antigenic chimerism, vectors.