

## ОБЗОРЫ

---

УДК 616.1/.9-055.5

© Долгих

### ДОСТИЖЕНИЯ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПОРАЖЕНИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ДРУГИХ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ В МОДЕЛЬНЫХ ОПЫТАХ НА ЖИВОТНЫХ.

*М.С. Долгих*

Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов,  
123182, Москва, Щукинская, 1; тел.: 190-45-31, эл. почта: Biolab@online.ru

Рассмотрены достижения генной и клеточной терапии в модельных экспериментах на животных при поражениях сердечно-сосудистой системы и перспективы их применения в клинической практике.

**Ключевые слова:** генная терапия, клеточная терапия, сердечно-сосудистая система, сократимость, сосудистая терапия, атеросклероз, тромбообразование.

**ВВЕДЕНИЕ.** Успехи молекулярной биологии за последние 20 лет привели к возникновению новых направлений медицины - генной и клеточной терапии. В настоящее время идентифицированы многие гены, мутации в которых не только вызывают наследственные болезни, но и способствуют появлению многофакторных заболеваний.

Нарушения функций органов пытаются "исправлять", вводя в эти органы здоровые клетки, несущие нормальный геном, или вводя новые генетические конструкции в клетки больного организма. Специалисты разных стран предпринимают попытки лечения этими методами болезней иммунитета, кроветворения, сердечно-сосудистой и нервной систем, обмена веществ, органов дыхания, кожи, суставов, а также злокачественных новообразований и даже вирусных инфекций. Среди перспективных медицинских направлений выделяют проведение клеточной терапии одновременно с генно-инженерными модификациями (это делает реальной трансплантацию трансгенных линий клеток в орган-мишень больного), а также лечение наследственных болезней *in utero*, то есть путем введения терапевтических генов в эмбрион, находящийся в матке [1].

Для генной и клеточной терапии сердечно-сосудистых болезней существуют несколько основных подходов, тесно связанных с нашими знаниями о патогенетических и молекулярных механизмах развития этих болезней, в их числе: реваскуляризация ишемизированного миокарда, повышение резистентности и сократительных свойств ишемизированных участков сердца, торможение пролиферативных процессов в сосудистой стенке (ведущих к сужению просвета сосудов), введение в элементы сосудистой стенки генов, ответственных за синтез оксида азота (ключевой регулятор сосудистого тонуса), восстановление системы нормальной регуляции кровяного давления, локальный синтез в сосудах антитромботических факторов и антикоагулянтов, терапия последствий атеросклероза и др. [2-5].

# **1. Лечение ишемической болезни сердца методами генной и клеточной терапии.**

*1.1. Регуляция контрактильной функции миокарда.* Ишемия и окислительный стресс являются главными механизмами повреждения ткани. Идеальной стратегией для превентивной/протективной генной терапии был бы подход, который обеспечил бы долговременную защиту ткани от ее повторного повреждения вследствие ишемии и реперфузии (последующего восстановления) при условии однократного введения терапевтического гена. Путём внутримиокардиальной инъекции с помощью рекомбинантного адено-ассоциированного вируса (rAAV) Melo et al. вводили крысам человеческий ген гемоксигеназы (hHO-1), который является эффективным терапевтическим геном для защиты миокарда от ишемических повреждений. Через 8 недель с помощью перевязки артерии (> 75%) вызывали острый инфаркт. Введенный ген обеспечивал долговременную защиту ткани сердца от повторных повреждений. Редукция инфарктной зоны сопровождалась уменьшением миокардиального перекисного окисления липидов и уменьшением количества белков - проапоптотического Bax и провоспалительного интерлейкина-1-бета, при увеличении уровня антиапоптотического белка Bcl-2. Это позволило предположить, что трансген проявляет свою кардиопротекторную активность отчасти путем уменьшения оксидативного стресса и воспаления вместе с уменьшением апоптотической смерти клеток [6].

Для лечения ишемической болезни сердца (ИБС) и инфарктов могут быть использованы разные стратегии. Одна из них может заключаться в попытке вызвать дифференцировку фибробластов рубцовых зон в кардиомиоциты (фибробласты не способны сокращаться, что нарушает контрактильную функцию миокарда [3]). Однако механизмы дифференцировки кардиомиоцитов и гены, участвующие в этом процессе, неизвестны. Поэтому пока предполагается выявить и картировать гены, участвующие в дифференцировке клеток, а затем с их помощью добиться желаемого результата.

Более реальная задача, которая уже успешно решается на экспериментальных животных, - дифференцировка фибробластов сердца в ткань скелетной мышцы с целью ограничения инфаркта путем переноса гена *MyoD* или путем дифференцировки васкулярных гладкомышечных клеток в клетки с фенотипом поперечно-полосатой мышцы, с последующим культивированием *in vitro* и введением в поврежденное сердце [7,8]. Семейство генов *MyoD* - генов миогенной транскрипции - отвечает за индукцию программы дифференцировки поперечно-полосатой мышцы. Если фибробласты трансдуцировать с высокой эффективностью геном *MyoD*, то эти фибробласты необратимо выходят из клеточного цикла и подвергаются миогенной дифференциации как *in vitro*, так и *in vivo* [9]. Поэтому ген *MyoD* является одним из основных миогенных факторов и считается перспективным для генной терапии сердца при хронической сердечной недостаточности. Там и соавт. [10] вводили ген *MyoD* в первичные фибробласты сердца новорожденной крысы с помощью ретровирусного вектора. Через 10 дней после инфекции экспрессия *MyoD* была обнаружена в 95% инфицированных клеток. Методом иммуноокрашивания в 95% клеток наблюдали также экспрессию маркеров миогенной дифференциации - тяжелой цепи миозина и специфического для миоцитов энхансера - фактора 2. Были отмечены спонтанные сокращения, образование многоядерных миотрубок. Таким образом, фибробласты сердца продемонстрировали способность превращаться в потенциально функциональные скелетные миоциты, способные к сокращению, как показали определенные морфологические и биохимические изменения [10].

Большое внимание уделяется исследованиям, помогающим выявить гены, нарушение работы которых связано с развитием патологического процесса, и определить уровень их экспрессии. Так, в работе Yang с соавт. [11] путем анализа на микрочипах была изучена экспрессия около 7000 генов сердца человека. Для эксперимента были взяты 2 сердца с диагнозами ишемической болезни в

последней стадии и дилатационной кардиомиопатии, а также 2 сердца от практически здоровых лиц. Была отмечена измененная экспрессия 5 групп генов, в том числе: 1) генов белков цитоскелета и миофибрилл (сокращающегося мышечного белка LIM-1, миомезина, легкой цепи регулятора несаркомерного миозина-MCL-2 и бета-актина); 2) генов, ответственных за деградацию и разрушение миокардиальных белков (альфа-1-антихимотрипсина, убиквитина и гелсолина); 3) генов, включенных в метаболизм (альфа-субъединицы АТФ-синтазы, субъединицы флавопротеина сукцинатдегидрогеназы - SDH Fp, альдозоредуктазы и транслоказы препротейна TIM-17; 4) генов, ответственных за синтез белка (фактора элонгации -2, фактор эукариотической инициации 4AII и фактор транскрипции homologue-HBZ17); 5) генов, кодирующих стрессовые белки (кристаллины). Изменения степени экспрессии генов совпадали с изменениями синтеза соответствующих белков [11]. Показано, что развитие фиброза в миокарде обусловлено изменениями в экспрессии генов клеток сердца. Перепрограммирование экспрессии генов сердца затрагивает в первую очередь: 1) контрактильные белки саркомеров, 2) регуляторы удержания кальция и другие факторы ионного транспорта, 3) секретируемые ростовые факторы и другие цитокины [12].

Изучение сократительных белков сердца и использование их генов могло бы существенно расширить методы кардиотерапии. В настоящее время существует ряд методов, которые позволяют изменять сократимость сердца определенным образом. Для того, чтобы эти изменения были стабильны и передавались из поколения в поколение, они должны быть внесены в геном зародышевых клеток путем трансгеноза или таргетинга генов. Благодаря удалению олигонуклеотидных последовательностей, кодирующих различные компоненты саркомеров, сократительный аппарат сердца может быть резко изменен. Хотя все сокращающиеся мышцы обладают общим белковым пулом, который очень консервативен, разные типы мышечных волокон характеризуются особыми, и часто уникальными, дополнительными изоформами контрактильных белков. Например, основные белки, находящиеся в сократительных мышцах - тяжелые цепи миозина - представлены в различных типах волокон множественными изоформами, которые кодируются уникальными, но близкородственными генами, и содержание изоформ характерно для каждого особого типа мышечных волокон. Как для большинства саркомерных генов, первый уровень контроля осуществляется на уровне активации гена, а транскрипция этих генов контролируется тканеспецифическим образом, зависимым от типа мышцы и стадии развития, так что различные типы мышц имеют уникальный и характерный набор белков тяжелых цепей миозина (MHCs). Белками, специфичными для типа мышцы, являются также легкие цепи миозина (MLCs), актины, компоненты тропонинового комплекса (TnT, TnC, TnI), миозин-связывающий белок C, титин, небулин, альфа-актинин и TM. Эти белки и их роль активно изучаются, в том числе методами трансгеноза и таргетинга генов. Управляемое "включение" и "выключение" экспрессии генов поможет разобраться в сложном механизме поведения мышечных волокон, в том числе волокон сердца. Когда пространственный и временной контроль экспрессии генов станет реальностью, кардиофизиологи смогут восстанавливать нормальную работу сердца [13].

При хронической сердечной недостаточности имеет место разрегулирование работы бета<sub>2</sub>-адренергического рецептора (бета<sub>2</sub>-АР) в кардиомиоцитах, что приводит к низкому уровню ответа на катехоламины. Медиаторные механизмы симпатического контроля деятельности сердца сложны. Катехоламины, среди которых наибольшую физиологическую значимость имеют адреналин и норадреналин, оказывают многогранное действие на функции сердца. Адренергические влияния касаются пейсмекерной активности, скорости проведения в атриовентрикулярном узле и волокнах Пуркинье, метаболизма и сократимости. В целом организме адренергические эффекты неоднозначны, так

как сопутствующие изменения артериального давления вызывают рефлекторные реакции, которые часто противоположны прямому действию симпатических аминов на миокард [14]. Успехи генной терапии в этой области имели бы важное значение для регуляции деятельности сердца.

Для коррекции работы бета<sub>2</sub>-адренергического рецептора (бета<sub>2</sub>-АР) и улучшения реакции на катехоламины с целью улучшения функции миокарда в левый желудочек сердца хомяка с кардиомиопатией линии Bio14.6 *in vivo* вводили инъекцией ген человеческого бета<sub>2</sub>-АР с помощью плазмидного вектора на основе вируса Эпштейна-Барра. Электрокардиографические исследования показали значительное улучшение работы миокарда в первые 2-4 дня после трансфера гена бета<sub>2</sub>-АР в сердце хомяка. Систематическое введение изопротеренола увеличивало функциональные показатели работы сердца до 7 дней, что свидетельствует в пользу генетической трансдукции. Методом RT-PCR мРНК трансгена была найдена в сердце, но отсутствовала в печени, селезенке или почках. Авторы считают, что метод может применяться при острой сердечной недостаточности [15].

Сверхэкспрессия гена бета-адренергического рецептора у трансгенных мышей в 200 раз увеличивала уровень адренергического рецептора наряду с возросшей контрактильностью мышцы сердца [16,17].

Активность ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) в миокарде и уровень ангиотензина II (AngII) в плазме увеличиваются после ишемии миокарда, что ведет к углублению повреждения миокарда и дисфункции сердца. На крысах была показана протективная роль нового антисмыслового олигонуклеотида (AS-ODN), направленного на АСЕ мРНК в ишемическом повреждении миокарда [18].

Пытаются влиять на гены, регулирующие уровень кальция в сердце. Фосфоламбан является фосфопротеином, деятельность которого в сердечной мышце связана с Ca<sup>2+</sup>-АТФазным насосом саркоплазматического ретикулума. Удаление и соответственно потеря фосфоламбана приводит к появлению гипердинамических параметров сердечной мышцы. Использование мышей - гетерозиготных нулей, которые содержали около 40% уровня фосфоламбана дикого типа, позволило построить кривую дозо-зависимости для этого белка [13,19]. Таким образом, инактивация экспрессии гена фосфоламбана - белка саркоплазматического ретикулума - увеличит контрактильность кардиомиоцитов.

Известны еще несколько генов, существенных для развития и функции сердца, в том числе кодирующие *hox-1,5*, альфа-рецептор ретиноевой кислоты, эндотелин-1. Удаление специфичного для мышц гена белка LIM ведет к развитию дилатационной кардиомиопатии (цит. по [13]).

Для улучшения сократимости сердца в ткани можно переносить и гены белков адгезии, вставочных дисков и щелевых контактов (например, коннексин-43) с целью установления взаимодействия между кардиомиоцитами реципиента и трансплантированными миоцитами. Механизмы дифференцировки, как и механизмы регуляции клеточного цикла, очень сложны и мало изучены, но все же уже известны некоторые ключевые гены, закрепленные в эволюции, манипулирование которыми может привести к желаемому результату.

Другой путь улучшения работы ишемизированного сердца - трансплантация в пораженный участок стволовых клеток или генетически модифицированных и культивированных *ex vivo* (вне тела реципиента) клеток скелетных мышц, взятых заранее у реципиента [20-26].

Мезенхимальные стволовые клетки человека (hMSCs), присутствующие во взрослом красном костном мозге, обладают способностью дифференцироваться в мезодермальные линии. Человеческий костный мозг вводили в сердца иммунодефицитных взрослых мышей и наблюдали, как стволовые клетки костного мозга дифференцировались в кардиомиоциты, что сопровождалось экспрессией гена *MyoD*. Экспрессия слабо-сокращающихся изоформ тяжелой цепи миозина позволила предположить, что введенные клетки костного мозга могут быть способны выполнять сократительную функцию сердца и могут быть полезны при имплантации в больное сердце [27].



Множество работ было выполнено с использованием пересадки эмбриональных и фетальных клеток как наиболее пластичных и легче подвергающихся дифференцировке в нужном направлении, а также не вызывающих острой иммунной реакции организма реципиента [28-31]. Однако в настоящее время в большинстве стран перешли к использованию стволовых или соматических клеток взрослых особей. Причем стволовые клетки берут главным образом из костного мозга [32,33], хотя в небольшом количестве они имеются в различных органах (например, овальные клетки печени).

Показана большая степень пластичности стволовых клеток костного мозга, которые в зависимости от условий способны образовывать клетки практически любого типа [25-31]. Выживание клеток после трансплантации, по-видимому, является главной проблемой клеточной трансплантологии, так как в ближайшие часы и сутки после трансплантации более половины пересаженных клеток погибает. Причины такой гибели - жесткие условия выделения клеток, их дальнейшего культивирования и введения в организм, неблагоприятное окружение (ишемизированная ткань) и иммунный ответ хозяина на измененную клетку. Не вполне ясны механизмы этой гибели, неясно, в каких случаях имеет место апоптоз, а в каких - некроз, поэтому успехи развития клеточной терапии в значительной степени будут зависеть от успехов научной разработки молекулярных механизмов программируемой клеточной гибели [32] и клеточного деления [33]. Сложность задачи усугубляется тем, что генно-модифицированные клетки, предназначенные для длительного функционирования в пораженном органе, неспособны, как правило, достаточно долго удерживать привнесенный ген, который в большинстве случаев перестает экспрессировать через несколько недель или месяцев после его введения в организм.

Коннексин-43 - основной белок щелевого пространства, важный для межклеточной коммуникации в мышце сердца. Получена клеточная линия скелетной мышцы крысы, сверхэкспрессирующая коннексин-43, которая может быть потенциальным источником клеток для трансплантации в поврежденное сердце и будет обладать способностью к улучшенной межклеточной коммуникации и ускоренной способностью к дифференциации в миоциты, что должно позволить пересаженным клеткам поперечно-полосатой мышцы сокращаться синхронно с кардиомиоцитами [34]. Межклеточные контакты обладают измененным распределением в больных сердцах, например, при ишемической болезни сердца. Ненормальное распределение щелевых контактов в эпикардиальной пограничной зоне инфарктов может приводить к аритмогенезу. Молекулярные механизмы межклеточного взаимодействия между трансплантированными и хозяйскими кардиомиоцитами активно изучаются. Методами иммунохимии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано, что пересаженные в поврежденные сердца неонатальные кардиомиоциты крысы способствовали восстановлению путей передачи электрического импульса к клеткам сердца хозяина с помощью восстановления щелевых контактов, причем окружение в инфарктном сердце могло влиять на локализацию щелевых контактов, десмосом и адгезивных молекул. Чтобы оценить восстановление клеточного взаимодействия и проанализировать распределение щелевых контактов, десмосом и адгезивных молекул, использовали антитела против коннексина-43, десмоплакина и кадгерина. Пересаженные неонатальные (3х-дневные) кардиомиоциты крысы определяли с помощью антител к альфа-актину гладких мышц. Хотя фетальные аллогенные кардиомиоциты приживаются лучше, чем неонатальные и тем более взрослые, они длительное время (более 2 месяцев) сохраняют свой фенотип, а также свойственные этому фенотипу функции, в том числе функции, свойственные незрелым клеткам [35].

Для пролонгации выживания трансплантируемых клеток вводят гены, кодирующие синтез специфических белков, таких как большой Т-антиген вируса SV-40, с-мус, Bcl-2, ген теломеразы, а также гены циклинов, запускающие цикл клеточной пролиферации и т.п. [36-48].

Трансфер человеческого гена Bcl-2, опосредуемый адено-ассоциированным вирусом, в нейроны гиппокампа гербилов, способствовал лучшему выживанию нейронов. Трансдукция Bcl-2 за 5 дней до ишемии мозга и даже через 1 час после ишемического инсульта предотвращала фрагментацию ДНК в CA1-нейронах, что обычно ассоциируется с клеточной смертью, индуцированной ишемией [45].

Миобласты мыши и человека, модифицированные большим Т-антигеном SV-40, не подвергались апоптозу. Клетки делились 35 раз и входили в состояние покоя. При дополнительном введении гена теломеразы в миобласты эти клетки пролиферировали существенно дольше и делились 55 раз [48].

*1.2. Сосудистая терапия.* Активно изучается возможность восстановления сосудистой системы сердечной мышцы после инфаркта миокарда при помощи генов, продукты которых индуцируют процесс ангиогенеза (сосудообразования) [49-54]. Перенос генов по сосудам потенциально открывает новые методы лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Генная терапия может быть использована для сверхэкспрессии терапевтически важных белков и коррекции генетических дефектов, а также для экспериментального контроля местного влияния различных генов в сосудах.

Для стимуляции сосудообразования вводят гены различных факторов ангиогенеза-FGF (фактор роста фибробластов), VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), TGF-бета (трансформирующий фактор роста). В обзоре Auer и соавт. [55] приводятся результаты многочисленных исследований по генной терапии кардиоваскулярной болезни. Перенос генов VEGF и FGF улучшали кровоток и развитие коллатералей в ишемизированной зоне миокарда.

Получен терапевтический эффект на животных моделях рестеноза и утолщения трансплантата вены с переносом генов, кодирующих NO-синтазу, тимидинкиназу, гомеобоксных генов задержки роста, генов тканевого ингибитора металлопротеиназ, ингибиторов циклинов и циклин-зависимых киназ, Fas-лиганда и гирудина, и антисмысловых олигонуклеотидов против факторов транскрипции или белков-регуляторов клеточного цикла. Сообщается о первых опытах по переносу гена VEGF и олигонуклеотидных ловушек на людях [55]. Факторы роста могут быть введены как непосредственно, так и с помощью генно-модифицированных миобластов. Так, было показано, что миобласты мыши, в которые были введены гены гормона роста человека и маркерный ген бета-галактозидазы из *E.coli*, экспрессировали продукты чужеродных рекомбинантных генов в течение 3 месяцев после введения их в мышцу мыши. Таким образом, миобласты могут служить для систематической доставки рекомбинантных белков [56].

Увеличенное накопление кининов после ишемического повреждения может способствовать процессам, ответственным за заживление тканей. Emanueli и соавт. использовали фармакологические и генетические подходы для изучения роли рецептора кинина  $B_1$  в процессе репаративного ангиогенеза на модели ишемии конечности мыши. Используя таргетинг рецептора кинина  $B_1$ , они показали, что  $B_1$  играет существенную роль в сопротивлении организма хозяина в ответ на ишемическое повреждение [53].

Уменьшение необходимости в пересадках сосудов и предотвращение тромбообразования представляет собой очень важное направление генной терапии. Основная идея в этой области - генетическая модификация сосудистого эндотелия при помощи генов, продукты которых могут предотвращать тромбообразование (например, тканевой активатор плазминогена). Доставлять гены к сосудистому эндотелию можно через катетер, введенный в кровеносный сосуд. С другой стороны, эндотелиальные клетки можно вырастить из биопсийного материала пациента, генетически модифицировать и покрыть ими синтетический сосудистый трансплантат до имплантации его в организм. Векторные системы и способы их доставки, которые используются в сосудистой генной терапии, постоянно совершенствуются и подробно рассматриваются в обзорах [5].

Последнее двадцатилетие ознаменовалось активным внедрением в клиническую практику лечения больных со стенозирующими заболеваниями сосудов инвазивных вмешательств - ангиопластики и атерэктомии. Принцип ангиопластики состоит в том, что под контролем рентгена в крупную артерию вводят баллонный катетер, который под давлением раздувают в месте сужения артерии. При этом атеросклеротическая бляшка раздавливается, увеличивается просвет сосуда и улучшается кровоток. При атерэктомии бляшка срезается специальными резцами. В настоящее время уровень успешных ангиопластик составляет 95-98%. Однако, в 30-50% случаев через несколько месяцев вновь происходит сужение сосуда в месте его повреждения (рестеноз) [3]. Клеточные и молекулярные механизмы развития рестеноза достаточно хорошо изучены. Наиболее важные из них - аномальная локальная активация деления и миграции гладкомышечных клеток сосудистой стенки, а также синтез ими внеклеточных белков в ответ на повреждение сосуда. Эти процессы приводят в результате к образованию неоинтимы на внутренней поверхности сосуда - фактически новой бляшки. Наиболее перспективным методом предотвращения образования неоинтимы, повидимому, является генная терапия, направленная на временное усиление или подавление образования в сосудах белков, регулирующих эти процессы [3,5].

Для терапии рестенозов используют цитостатический и цитотоксический подходы. Для ингибирования пролиферации клеток вводят гены, кодирующие белки, являющиеся естественными ингибиторами пролиферации. Таким геном является, например, ген ретинобластомы. Кодированный им белок блокирует входение клетки в клеточный цикл, образуя комплекс с фактором транскрипции E2F, причем подавляется синтез ДНК. К числу таких генов относится ген, кодирующий белок p21 - ингибитор циклин-зависимых протеиназ, обеспечивающих входение клетки в S-фазу. Ген *gax* также кодирует цитостатический белок. Во всех случаях достигалось эффективное подавление роста неоинтимы на 50-80% [5, 55].

Медиированный аденовирусом трансфер прокариотического гена цитозиндезаминазы (CD), который используют для ингибирования пролиферации раковых клеток, может быть использован также для ингибирования пролиферации гладкомышечных клеток сосудов в 2-3 раза и предотвращения образования неоинтимы. Продукт гена CD способен энзиматически метаболизировать 5-фторцитозин (5-FC), служащий лекарственным предшественником мощного антиметаболита 5-фторурацила (5-FU). Продукция 5-FU ведет к ингибированию синтеза ДНК и РНК в значительной мере благодаря ингибированию тимидилатсинтазной активности [57].

Потеря продукции NO эндотелием после повреждения артерии может также приводить к рестенозу, образованию неоинтимы и нарушению эластичности сосудов. На модели крыс было показано, что перенос гена, кодирующего NO-синтазу (NOS), с помощью аденовируса в поврежденные баллоном артерии может восстановить продукцию NO и ингибировать образование неоинтимы [58].

Для направленного торможения пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки с помощью антисмысловых олигонуклеотидных конструкций ингибируют ген основного фактора роста фибробластов (FGF basic) и посредством генных модификаций вмешиваются в процессы регуляции клеточного цикла. Используют введение антисмысловых олигонуклеотидов, подавляющих экспрессию протоонкогенов *c-myc* и *c-myc*, циклин-зависимых киназ 1 и 2 (CDK), ядерного антигена пролиферирующих клеток (PNCА) и фактора транскрипции E2F [5,55].

Урокиназа активно изучается в настоящее время как возможный потенциальный терапевтический продукт гена для генной терапии рестеноза и ишемических заболеваний. Урокиназа - это сериновая протеиназа, превращающая плазминоген в плазмин, который, в свою очередь, является протеиназой широкого спектра действия, способной расщеплять фибрин и компоненты внеклеточного

матрикса. Она продуцируется клетками крови и сосудов и является одним из компонентов системы фибринолиза, препятствующей развитию тромбозов. Но более важная функция урокиназы заключается в обеспечении направленного движения клеток, а следовательно, в регуляции таких процессов как, например, рост сосудов. Подавление экспрессии урокиназного рецептора с помощью антисмысловых олигонуклеотидов ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию эндотелиальных клеток [3,5]. Показано, что подавление экспрессии гена урокиназы, которая увеличивает деление эндотелиальных клеток, и активирование экспрессии гена Т-кадгерина, который подавляет деление и миграцию клеток эндотелия, приводит к существенно меньшему размеру неointимы или предотвращает ее образование [3].

Ингибирование критического фактора в регуляции клеточного цикла - фактора транскрипции E2F - также оказывает положительный эффект в лечении рестенозов [3,5].

Миграция сосудистых гладкомышечных клеток требует контролируемого протеолитического расщепления экстрацеллюлярного матрикса, окружающего клетку. Процесс прямого или опосредованного расщепления различных матриксных белков путем активирования матриксных протеиназ, в частности, металлопротеиназ, запускается плазмином. Ингибирование плазмина поможет остановить или затормозить миграцию сосудистых клеток и образование неointимы [55,59]. Для подавления миграции применяли сверхэкспрессию гена тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ, внесенного в аденовирусном векторе, что привело к подавлению роста неointимы на 50% [60,61]. Перенос гена p53 дикого типа также ингибировал образование неointимы у человека благодаря индукции апоптоза и урегулированию миграции гладкомышечных клеток [62].

При цитотоксическом подходе используют ген тимидинкиназы. Рекомбинантные аденовирусы являются эффективными векторами для доставки генов в клетки стенок артериальных сосудов и могут использоваться для ингибирования в них пролиферативного процесса при рестенозе. Доставка гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk) с последующей терапией ганцикловиром (стратегия генного суицида) ограничивает гиперплазию интимы после истончения интимы нормальных или атероматозных артерий. Трансфер гена HSV-tk в артериальные гладкомышечные клетки не имеет цитотоксического эффекта. После обработки ганцикловиром продукт гена HSV-tk фосфорилирует ганцикловир-аналог нуклеозида с образованием токсического компонента, который селективно убивает пролиферирующие клетки. Между тем, при аналогичном лечении склерозированных артерий могут иметь место трудности, связанные с опосредованными аденовирусом методами доставки гена tk. Поэтому ведется конструирование подходящих для доставки генов векторов. Например, был сконструирован репликативно-дефективный аденовирусный вектор, экспрессирующий tk (Ad-RSVtk), который показал селективную токсичность по отношению к артериальным гладкомышечным клеткам, обработанным ганцикловиром, включающим апоптоз *in vitro*. *In vivo* обработка ганцикловиром уменьшала образование неointимы после подкожного введения Ad-RSVtk во время ангиопластики атероматозных артерий [5,63].

Несмотря на существенные трудности, уже разработаны протоколы по генно-терапевтическому предотвращению повторного сужения (рестеноза) пересаженных кровеносных сосудов [3].

## **2. Предотвращение тромбообразования.**

Для предотвращения тромбообразования вводят гены компонентов фибринолитической системы, например, ген активатора плазминогена в составе ретровирусного вектора, что вызывает четко выраженный антитромботический эффект. Ген активатора плазминогена можно ввести в эндотелиальные клетки и после культивирования *in vitro* посеять эти клетки на интраваскулярный стент [64].



Генная терапия тромбообразования должна включать также локальную сверхэкспрессию NO-синтазы и гена циклооксигеназы [65], что приводит к увеличению синтеза NO и простагличина в сосудистой стенке и как следствие - к уменьшению агрегации тромбоцитов[5]. Регуляция коагуляции крови и фибринолиза сосудистыми эндотелиальными клетками является ключевым процессом, который поддерживает нормальное кровообращение в больших сосудах, также как в системе микроциркуляции.

Shears и соавт. использовали для трансплантации аорты крыс доноров ACI и реципиентов Wistar Furth с сильным несовпадением по главным и минорным антигенам гистосовместимости. Трансплантаты были собраны через 28 дней и в них было отмечено значительное увеличение индуцибельной NO-синтазы (iNOS) (мРНК и белка), а также утолщение интимы по сравнению с изотрансплантатами. Ингибирование продукции NO с помощью ингибитора iNOS увеличивало утолщение интимы на 57,2%, что указывало на то, что NO подавляет развитие склероза сосудов трансплантата. Было показано также, что циклоспорин А подавляет экспрессию iNOS в ответ на повреждение аорты, индуцированное баллоном. Аналогично, циклоспорин А подавлял экспрессию iNOS в трансплантатах аорты, что ассоциировалось с утолщением интимы на 65%. Трансдукция гена iNOS, полностью подавляла развитие атеросклероза как у реципиентов, принимавших циклоспорин А, так и у не принимавших его. Полученные результаты позволяют предположить, что ранняя, иммуноиндуцированная активация экспрессии iNOS частично защитит трансплантаты аорты от развития атеросклероза и что генная терапия может быть полезна в предотвращении развития этого неизлечимого другими методами патологического процесса [66].

Тромбомодулин (ТМ), мембранный гликопротеин васкулярных эндотелиальных клеток, связывается с тромбином и изменяет ферментативную специфичность тромбина. При связывании с ТМ тромбин теряет свою свертывающую способность и получает возможность активировать протеин С. Таким образом, ТМ работает как важный регулятор свертывания крови. У мышей дефицит по ТМ вызывает летальность эмбрионов, что приводит к предположению, что потеря экспрессии ТМ в васкулярной системе ведет к образованию тромбов и дефектам сосудов. Экспрессия гена ТМ подавляется провоспалительными цитокинами, бактериальными эндотоксинами и трансформирующим фактором роста (TGF-бета 1). Цитокины воспаления и эндотоксины индуцируют экспрессию тканевого фактора прокоагуляции в эндотелиальных клетках и моноцитах/макрофагах, подавляют экспрессию гена ТМ в эндотелиальных клетках, что приводит к тромбозу сосудов. Таким образом, перенос гена ТМ и его высокая экспрессия в васкулярных эндотелиальных клетках может стать терапевтическим подходом для лечения тромбообразования и обеспечения нормального кровообращения [67].

Недавние исследования, выполненные на нескольких видах лабораторных животных, показали, что при систематическом введении гирудин предотвращает тромбоз и образование неоинтимы после повреждения артерий. Гирудин ингибирует взаимодействие тромбина как с фибриногеном, так и с рецепторами тромбина, присутствующими на поверхности тромбоцитов и сосудистых клеток. Rade и соавт. сконструировали 2 кассеты-HV-1.1 и HV-1.2, включающие кДНК гирудина, которые кодировали зрелый гирудин-вариант1 с "привязанным" к нему сигнальным пептидом тканеспецифичного активатора плазминогена человека (t-PA)-HV-1.1 и с сигнальным пептидом ростового гормона человека-HV-1.2. Кассеты были субклонированы в ретровирусные векторы и использованы для трансдукции в васкулярные эндотелиальные клетки человека *in vitro*. Трансдуцированные клетки экспрессировали гирудин в течение по крайней мере 7 недель. Антитромботическая активность обоих вариантов *in vitro* была высокая. Авторы полагают, что эти генетические конструкции могут быть использованы *in vivo* для борьбы с тромбообразованием [68].

При генной терапии сосудистых заболеваний генетические конструкции, как правило, вводятся в просвет сосудов, измененных в результате развития атеросклероза, однако введение рекомбинантных вирусных векторов может вызывать воспалительные явления в этих сосудах и таким образом утяжелять течение болезни. Реальность такой опасности и пути ее преодоления должны изучаться применительно к каждому конкретному протоколу генной терапии сосудов [4]. Необходимо дальнейшее развитие векторов для переноса генов, техники доставки генов и оценки эффективности лечения, прежде чем будет достигнут полный терапевтический потенциал генной терапии сердечно-сосудистых болезней [55].

### 3. Генная терапия атеросклероза путем влияния на липидный обмен.

Атеросклероз - это многофакторное заболевание с выраженными последствиями для сосудов. Объектом внимания исследователей являются, в первую очередь, гены липидного обмена - ген рецептора липопротеина низкой плотности, ген липопротеинлипазы, а также ген аполипопротеина А-1 [4,69-72]. Четко выраженный антисклеротический эффект был получен при введении гена рецептора липопротеина низкой плотности экспериментальным животным, что приводило к нормализации содержания этого липопротеина в крови [71,72]. Этот подход пытались использовать для лечения больных с семейной гиперхолестеринемией [73]. Введение мышам с экспериментальной гиперлипидемией гена липопротеинлипазы - фермента, расщепляющего жиры, привело к резкому снижению содержания в крови липопротеинов, богатых триглицеридами, и вызвало общее снижение содержания холестерина в плазме крови [74]. Долговременное улучшение состояния при гиперхолестеринемии было получено после генной терапии *ex vivo* у LDLR-дефицитных кроликов [75]. Показано защитное антисклеротическое действие на коронарный трансплантат антисмыслового олигонуклеотида *cdk2*-киназы [76].

Механизмы развития атеросклероза многообразны, активно изучаются различные подходы генно-терапевтического лечения атеросклероза. Например, апоптоз является одним из физиологических механизмов, которые приводят к ремоделированию сосудов и образованию атеросклеротических бляшек у человека. Некоторые цистеиновые протеиназы, особенно интерлейкин-1 бета-превращающий фермент (ICE), недавно был найден в бляшках человека и предположительно именно этот фермент может быть ответствен за апоптотическую клеточную смерть. Другой ICE-подобный фермент - CPP-32 предположительно также вызывает апоптоз клеток млекопитающих. Этот фермент расщепляет и инактивирует с высокой эффективностью и специфичностью поли (ADP-рибозо)-полимеразу - фермент, который отвечает за репарацию ДНК и целостность генома. Экспериментально на людях было показано, что CPP-32 имеет высокий уровень экспрессии внутри атеросклеротических бляшек и тесно связан с апоптозом. Следовательно, ингибирование CPP-32 путем, например, введения гена антисмысловой последовательности должно будет способствовать задержке развития процесса атеросклероза [77].

Работы по генной терапии атеросклероза ведутся также путем генетической модификации сосудистых гладкомышечных клеток, пролиферация которых вносит существенный вклад в развитие атеросклероза. Основная идея этих исследований, как и при рестенозе - поиск способа долговременного блокирования *in vivo* пролиферации и миграционной активности гладкомышечных клеток. Показана возможность их генетического изменения *ex vivo* [4, 5, 66, 73, 75, 76, 78].

Генная терапия заболеваний печени потенциально способна корректировать ряд метаболических болезней, таких как семейная гиперхолестеринемия, дефицит альфа-1-антитрипсина или синдром Криглер-Найяра. Последнее заболевание отражает недостаточность функции гепатоцитов вследствие ненормальности мембранных рецепторов, что нарушает секрецию белка и трансцеллюлярный транспорт соответственно. Для перманентной генетической коррекции таких

болезней желательно иметь терапевтические генные конструкции, способные длительно экспрессировать нужный белок. Для этого необходимо обеспечить стабильную интеграцию конструкции в геном клетки-мишени. Такую стабильную интеграцию могут обеспечить ретровирусы, но поскольку взрослые гепатоциты делятся редко, а ретровирусы встраиваются только в делящиеся клетки, то разрабатываются (на крысах) варианты, когда гепатоциты заставляют пролиферировать с помощью трийодтиронина (ТЗ) и рекомбинантного ростового фактора гепатоцитов, а затем *in vivo* в портальную или хвостовую вену вводят ретровирусную конструкцию [79]. Аденовирусы, хотя и эффективно доставляют гены в культивируемые гепатоциты и в мышинные клетки печени *in vivo*, но существующие в настоящее время аденовирусные векторы вызывают иммунный и воспалительный ответ хозяина, что обычно ведет к быстрой элиминации трансдуцированных клеток. В настоящее время разрабатываются специфичные для печени вирусные векторы, основанные на геномах семейства вирусов гепатита В (так называемые гепадновирусы-гепатотропные ДНК-вирусы). Отсутствие такого способа доставки генов *in vivo*, который обеспечил бы их продолжительную экспрессию, является центральной проблемой применения генной терапии печени. Однако, был успешно применен *ex vivo* способ доставки гена липопротеина высокой плотности у пациентов с наследственной гиперхолестеринемией [4, 5, 70, 80].

Гепатоциты - паренхиматозные клетки печени, как известно, играют уникальную роль в физиологии млекопитающих. В печени синтезируются многие белки плазмы, включая белки системы комплемента и системы свёртывания. Гепатоциты также синтезируют большое разнообразие ферментов промежуточного метаболизма, и мутации, затрагивающие некоторые из этих белков, приводят к нарушениям, которые можно было бы лечить специфической генной терапией печени. Так, восстановление нормальных рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL) дикого типа клеток печени у лиц с мутантными рецепторами может уменьшить у последних гиперхолестеринемию. Кроме того, существует несколько важных хронических вирусных инфекций печени, а именно гепатиты В и С, для которых органо-специфичная доставка антивирусных компонентов (INF-альфа или других цитокинов) может иметь важное терапевтическое значение [81].

Трансплантация внутрь селезенки гепатоцитов, модифицированных геном IL-18, способствует реверсии фиброза печени при шистоматозе путем индукции доминантного иммунологического ответа Th1 [82].

Таким образом, генная терапия может быть привлекательным подходом для лечения фиброзов печени и атеросклероза.

#### **4. Восстановление системы нормальной регуляции кровяного давления.**

Лечение гипертонической болезни осложняется тем, что гипертония, как и атеросклероз, является многофакторной болезнью, причем молекулярные механизмы действия этих факторов изучены недостаточно.

Наиболее изученной является калликреин-кининовая система, поэтому основной подход генной терапии гипертонической болезни заключается во введении в организм пациента гена калликреина. Калликреин представляет собой сериновую протеиназу, превращающую предшественники кининогенов в активные кинины, которые влияют на регуляцию процессов вазодилатации и вазоконстрикции [4]. На большой группе детей (N 721 и N 484 - из 129 семей) в течение нескольких лет проводили исследования и подтвердили наследственную склонность к определенному уровню кровяного давления, а также обратную связь между уровнем кровяного давления и содержанием калликреина в моче, стабильно проявлявшуюся в течение 8 лет наблюдения. Такая стабильная связь имеет важное значение, так как калликреин включен в процесс образования мощных вазодилаторных пептидов и играет важную роль в развитии гипертензии у взрослых [83].

Было показано, что однократное внутривенное введение гена калликреина крысам со спонтанной гипертензией с помощью аденовирусного вектора удерживало давление в норме в течение 40 дней, в то время как внутривенное введение самого калликреина приводило лишь к кратковременному эффекту (несколько минут). Экспрессия трансгена была обнаружена в различных органах животных. Более ясные представления о молекулярных механизмах возникновения гипертензии помогут лучше использовать метод генной терапии для лечения этого заболевания [84].

#### **5. Генная терапия при трансплантации сердца и печени.**

Генная терапия при трансплантации органов представляет собой отдельную область исследований [85, 86]. Серьезная задача при трансплантации состоит в преодолении иммунологического ответа реципиента на антигены гистосовместимости донора (МНС). С этой целью стараются создать толерантность реципиента по отношению к донорской ткани, в частности, путем создания антигенного химеризма. Генная терапия может быть направлена на отдельный орган или ткань, может создать локальную иммуносупрессию, может быть направлена на специфический орган, если заранее вводить в донорский орган один или несколько антигенов реципиента, причем это может быть сделано непосредственно во время операции.

Толерантность может быть создана также путем введения генов антисмысловых последовательностей против антигенов донора, генов цитокинов и т.д. В настоящее время существует большой интерес к проблемам создания толерантности [85-89].

Реакция отторжения трансплантированного органа организмом реципиента преодолевается с помощью иммуносупрессантов, которые необходимо принимать постоянно. Генная терапия может предложить другой путь. Например, показано, что трансфер гена Bcl-2 может способствовать преодолению болезни трансплантат против хозяина (GVHD) после пересадки тонкой кишки и кожи у крыс разных пород. кДНК гена Bcl-2 человека в составе аденовирусного вектора вводили инъекциями в печень крысы. С помощью антител следили за локализацией Fas, FasL, Bcl-2 и за экспрессией Bax. Bcl-2 ингибировал увеличенную экспрессию Fas/Fas L и апоптоз в гепатоцитах. Процесс сопровождался также увеличением экспрессии Bax - другого гена, регулирующего клеточный цикл. Bcl-2 ингибировал апоптоз, медируемый Fas-системой, в коже и нативном кишечнике так же хорошо, как и в печени [90].

Введение иммуномодуляторов в трансплантаты путем трансфера генов может исключить побочные эффекты системной иммуносупрессии. Недавно были идентифицированы два гомолога хемокинов - vMIP-II и MC148, кодируемых герпесвирусом человека HHV-8 и *Molluscum contagiosum* соответственно, обладающие антагонистической активностью против разных CC и CXCR рецепторов хемокинов. Введение этих молекул в трансплантаты сердца могло бы блокировать инфильтрацию лейкоцитов в трансплантат и пролонгировать выживание трансплантатов. Плазмидную ДНК, кодирующую vMIP-II, MC148 и/или vIL-10, вводили в трансплантаты сердца крыс прямо во время операции. Трансфер генов по одному значительно пролонгировал выживание трансплантатов. Комбинированный трансфер одного из генов-антагонистов хемокинов с трансфером гена vIL-10, имеющим иной механизм иммуносупрессивного действия, еще более увеличивал пролонгацию выживания трансплантата. Таким образом, плазмидный трансфер генов - антагонистов хемокинов способен блокировать донор-специфический лимфоцитарный иммунитет внутри трансплантата и пролонгировать выживание последнего [87].

Ловушка против каппа В (NFB) ослабляет инфильтрацию в клетки миокарда и образование неоинтимы в артериях в трансплантатах сердца мышей [88].

Kurson и соавт. [91] показали, что трансфер человеческого гена бета<sub>2</sub>-адренергического рецептора с помощью аденовирусного вектора в донорские



сердца при трансплантации крысам существенно улучшал функцию сердца и способствовал выживанию трансплантата. Бета-адренергическая система является одним из самых мощных средств увеличения контрактильности сердца. Таким образом, генетические манипуляции могут быть новой полезной терапевтической стратегией для улучшения функции донорского сердца в послеоперационный период.

Показано, что экспрессия интерлейкина IL-10 после введения гена, кодирующего IL-10, непосредственно в сердца крыс в составе аденовирусного вектора, существенно уменьшала аллогенный иммунный ответ и способствовала пролонгации выживания трансплантата [89].

Генетическая модификация трансплантатов печени с помощью аденовирусного вектора, кодирующего Bcl-2, улучшает сохранение органа [39].

#### **6. Клеточная терапия.**

Проблемы собственно клеточной терапии изложены в специальных обзорах. Показана уникальная роль мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, весьма перспективных для клеточной и генно-клеточной терапии заболеваний разных органов [25, 92-103].

Перенос генетически модифицированных соматических клеток может играть важную роль в лечении различных болезней человека. Однако, получение генетически модифицированных клеток, способных достигать долговременной, высокого уровня, тканеспецифичной и регулируемой экспрессии внедренных генов, находится пока в стадии разработки. Гематopoэтические стволовые клетки наиболее широко используются для этих целей благодаря тому, что они легко трансплантируются, стабильны, и подвергаются самообновлению. Однако, трудности с их выделением, культивированием, внесением гена и его стабильной экспрессией ограничивают их применение. Используют также периферические лимфоциты крови, которые легко трансдуцировать, культивировать и трансплантировать, однако они имеют ограниченный срок жизни. Подходящими для доставки генов являются мезенхимальные клетки костного мозга. Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга можно культивировать *in vitro* и они могут развиваться в течение продолжительного периода времени. Показано, что модифицированные маркерным LacZ геном стромальные клетки проникают в костный мозг, селезенку, и в меньшей степени - в печень, почки и легкие, что делает их перспективными для генной терапии разных органов [103].

При трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга в сердце крыс после ишемического инфаркта, вызванного холодовым ожогом, происходило улучшение функциональных показателей сердца по сравнению с эмбриональными. Трансплантированные клетки, меченные маркерным геном LacZ с помощью аденовируса человека 5 типа, оставались в сердце не менее 1 месяца [93]. При трансплантации аутологичных клеток костного мозга в печень морских свинок, у которых вследствие специальной диеты развился атеросклероз, происходило улучшение биохимических показателей работы печени [94].

С точки зрения научной перспективы клеточная трансплантация в ближайшее время может стать стратегией компенсации сердечной недостаточности и ограничения инфарктов. Генно-клеточная технология может также быть использована для долговременной доставки необходимых рекомбинантных белков в сердце.

Успех генно-клеточной терапии в сильной степени зависит от возможности изолировать трансплантируемые клетки от иммунной системы хозяина. Практическое средство для достижения этого состояния-микроинкапсуляция терапевтических клеток в мембраны с селективной проводимостью. Теперь, когда стало возможным получение линий эмбриональных стволовых клеток человека, ясно, что их потенциал для исследований и для клиники безграничен [104].

Выбор типа донорских клеток диктуется, главным образом, выбранной конечной целью. Например, если целью трансплантата является увеличение числа миоцитов и вследствие этого улучшение сердечного выброса, вероятно, в качестве

донорских клеток следует выбрать миобласты (фетальной или стволовой природы). С другой стороны, если конечной целью является ограничение распространения зоны инфаркта миокарда, требования к донорским клеткам менее строги. Существующие данные указывают, что скелетные миобласты, пересаженные в поврежденное сердце, дифференцируются в миотрубки и способны ограничивать расширение зоны инфаркта. Фетальные кардиомиоциты, по-видимому, имеют высокую чувствительность к ишемии и их терапевтическое использование в конечном счете требует дополнительного вмешательства (например, лечения кардиопротекторными генами или лекарствами). Кардиомиоциты плода человека трудно получить в достаточном количестве, так как их способность размножаться в культуре ограничена. Проблема использования фетальных кардиомиоцитов сталкивается с этическими трудностями [92].

Скелетные миобласты имеют много положительных черт в качестве донорских клеток, включая способность к размножению *in vitro* и способность оставаться живыми в ишемизированной ткани. Способность к продолжительной пролиферации *in vivo* может быть преимуществом при трансплантации в поврежденный миокард в том смысле, что введение меньшего числа клеток в конечном счете привело бы к большему клеточному трансплантату. Кроме того, постепенное увеличение объема клеточного трансплантата *in situ* (в противоположность пересадке большой мышечной массы) позволило бы развиваться сопутствующему ангиогенезу, который, в свою очередь, увеличил бы жизнеспособность трансплантата [92].

Трансплантация клеток, генно-трансформированных с целью доставки рекомбинантных белков, могла бы также влиять на функцию сердца (например, клетки могли бы экспрессировать ростовой гормон для стимуляции утолщения стенки желудочков сердца при дилатационной кардиомиопатии). Гены специально подобранных белков могли бы стимулировать выживание и функцию самого трансплантата. Экспрессия ряда факторов, которые регулируют клеточный цикл и апоптоз (Bcl-2, циклины, теломераза), одинаково регулируются во время дифференцировки как кардио-, так и скелетных миоцитов, важна для их пролиферации и выживания. Использование таких факторов регуляции роста и выживания клеток для увеличения пролиферации или придания устойчивости к апоптозу донорским клеткам, вероятно, позволит повысить эффективность клеточной трансплантологии. Трансплантированные клетки могли бы также быть генетически трансформированы, чтобы *in situ* служить для мониторинга местного окружения и хода изменений во время прогрессирования болезни. Например, донорские клетки могли бы содержать кальциевые зонды или электрочувствительные репортерные гены для мониторинга функции сердца или другого органа. Репортерные гены, чувствительные к свободным радикалам кислорода, могли бы использоваться для слежения за уровнем количества этих молекул в интактных тканях [92].

Наконец, появилось новое научно-практическое направление - Surgiomics (от Surgery и Genomics), которое можно перевести приблизительно как генная хирургия. Трансфер генов, применение генной инженерии и геномных принципов и технологий может увеличить совместимость тканей и их прочность, и улучшить применение хирургической терапии для сердечно-сосудистых болезней. Хирургические имплантаты потенциально могут быть использованы как источники локальных и целевых генных продуктов. Применение генной хирургии обещает расширить возможности текущей хирургической терапии и вывести достижения хирургов на уровень клеточной и молекулярной физиологии. Такая синергическая эволюция хирургической и молекулярной науки потребует тесного сотрудничества специалистов биологических и медицинских наук и поможет трансформировать практику как медицины, так и, в частности, хирургии в 21 веке [16]. В таблице суммирована информация о генах, используемых в модельных экспериментах для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Таблица. Гены, используемые в модельных системах для лечения болезней сердечно-сосудистой системы.

<b>Ишемическая болезнь сердца.</b>	
Гены	Ссылки
1. Регуляция сократимости	
Myo D	[7, 8, 9, 10]
hHO-1 (гем-оксигеназа человека)	[6]
$\beta_2$ -AP ( $\beta_2$ -адренергический рецептор)	[4, 15, 17]
AS-ODN против Ang II	[18]
Фосфоламбан	[13, 19]
hox-1,5	[13]
$\alpha$ -рецептор ретиноевой кислоты	[13]
Эндотелин-1	[13]
LIM	[13]
Коннексин-43	[13, 34, 35]
2. Сосудистая терапия	
FGF (фактор роста фибробластов)	[50, 55]
VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия)	[50, 55]
TGF ( $\beta$ -трансформирующий фактор роста)	[50, 55]
HGF (фактор роста гепатоцитов)	[50, 55]
Гормон роста человека	[56]
Рецептор кинина B <sub>1</sub>	[53]
Rb (ретинобластома)	[5, 55]
p21 (ингибитор циклин-зависимых протеиназ)	[5, 55]
gax	[5, 55]
CD (цитозиндезаминаза)	[57]
NOS (NO-синтаза)	[58, 65]
TIMP 1	[60]
<u>AS-ODN против:</u>	
c-myc,	[5, 55]
c-myb,	[5, 55]
CDK 1 и 2 (циклин-зависимые киназы)	[5, 55]
PNCA (ядерный антиген пролиферирующих клеток)	[5, 55]
E <sub>2</sub> F	[5, 55]
Урокиназа	[3, 5]
T-кадгерин	[3]
Плазмин	[55, 61]
Тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ	[61, 62]
p53	[62]
HSV-tk	[63]
<b>Предотвращение тромбообразования.</b>	
Активатор плазминогена	[5, 64]
NO-синтаза	[5, 58]
i-NOS (индуцибельная NO-синтаза)	[66]
Циклооксигеназа	[5, 65]
Урокиназа	[3, 5]
Тромбомодулин	[67]
Гирудин	[68]
<b>Терапия атеросклероза.</b>	
Рецептор ЛНП (липопротеина низкой плотности)	[71, 72]
ЛВП (липопротеин высокой плотности)	[79, 80]
Липопротеинлипаза	[74]

Аполипопротеин А-1	[76]
AS-ODN cdk2-киназы	[76]
AS-ODN CPP-32	[77]
AS-ODN ICE	[77]
IL-18	[82, 83]
$\alpha$ -1-антитрипсин	[79]
<b>Регуляция кровяного давления.</b>	
Калликреин	[84]
<b>Терапия при трансплантации сердца.</b>	
MHC	[85, 86]
AS-O - MHC	[85, 86]
Bcl-2	[39, 90]
Bax	[39, 90]
IL-10	[89]
vMIP-II	[87]
vMC 14	[87]
NF B	[88]
vIL-10	[89]
$\beta_2$ -AP (адренэргический фактор)	[91]
<b>Пролонгация выживания клеток.</b>	
T-антиген вируса SV-40	[48]
Bcl-2	[36, 37, 38, 39]
Теломераза	[40]
Циклины	[41, 43]

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Самой серьезной проблемой как генной, так и клеточной трансплантации является кратковременность экспрессии внедренных генов и скорая гибель трансплантированных клеток (от нескольких дней до нескольких месяцев). Эта проблема решается с помощью многократного введения генов. В настоящее время получены в культуре *in vitro* линии кардиомиоцитов, такие как, например, AT-1 или C2C12 и другие, которые способны лучше выживать, будучи пересаженными в пораженное сердце, но при этом существует риск неопластической трансформации внутри органа-реципиента [99,100]. Активная разработка методов введения генов, способствующих выживанию клетки и ее пролиферации, поможет решению этого вопроса.

Вторая важная проблема - создание безопасных векторов. Ретровирусные вектора способны обеспечить длительную экспрессию трансгена, но, встраиваясь в геном делящихся клеток, могут вызвать непредсказуемые последствия, например, малигнизацию ткани. Аденовирусные вектора обладают существенной иммуногенностью и вызывают воспалительный процесс. Создание новых безопасных и специфичных способов введения гена, действующих локально, возможность следить за их экспрессией и управлять этой экспрессией находятся на пути осуществления. Активно разрабатываются невирусные вектора, а также вирусные вектора с минимальной иммуногенностью и с адресной доставкой гена путем снабжения его тканеспецифичными промоторами, а также промоторами, управляемыми лекарственными средствами или автоматически включающими экспрессию гена только в определенных ситуациях, например, при избытке глюкозы, при гипоксии, при повреждении сосуда [101]. Зная сложность работы генома, сложность регуляции этой работы, эволюционно отработанные принципы сохранения наследственных свойств индивида, трудно с оптимизмом ожидать в ближайшем будущем больших успехов в области генотерапии в целом. Однако, существует уже более 350 клинических протоколов лечения различных болезней генно-терапевтическими методами и более 3 тыс. пациентов, подвергавшихся такому лечению [1]. Есть успехи генной терапии определенных состояний



сердечно-сосудистой системы, в том числе на людях [50, 62]. Как видно из литературы, по-видимому, более эффективными окажутся эксперименты, когда одновременно будут вводиться несколько генов, функционально дополняющих друг друга. Привлекают внимание те работы, в которых трансфер гена в виде плазмидной ДНК производился локально непосредственно во время операции. На данном этапе исследований еще не накоплена достаточная статистика, чтобы можно было делать однозначные выводы по поводу конкретных генов. К сожалению, нет стандартизации экспериментов в работе разных лабораторий. Тем не менее, очевидно, что генная терапия в ближайшее время может занять свое место наряду с хирургией и фармакологическими методами лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Появление новых перспективных методов анализа работы генов, методов воздействия на их экспрессию, таких как метод интерференционной РНК (iRNA) [105,106] и метод аптамеров [107], наряду с дальнейшим развитием методов антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей (ODN) и рибозимов (каталитических РНК), несомненно будет способствовать развитию генной терапии в ближайшем будущем.

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Бочков Н.П. (2001) Медицинский курьер, **4-5**, 28-31.
2. Зеленин А.В. (1999) Вопр.мед. химии, **45**, 200-205.
3. Чазов Е.И., Ткачук В.А., Ширинский В.П. (1999) Вестник РАН, **69**, 16-31.
4. Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С. (1998) Молек.биол., **32**, 219-228.
5. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. (2000) Вопр.мед. хим., **46**, 293-310
6. Melo L.G., Agrawal R., Zhang L. et al. (2002) Circulation, **105**, 602-607.
7. Murry Ch.E., Kay M.A., Bartosek T. (1996) J. Clin. Invest., **98**, 2209-2217.
8. Graves D.C., Yablonska-Reuveni Z. (2000) J. Histochem.& Cytochem., **48**, 1173-1193.
9. Cossu G., Mavilio F. (2000) J. Clin. Invest., **105**, 1669-1674.
10. Tam S.K.C., Gu W., Nadal-Ginard B. (1995) J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **2109**, 918-924.
11. Yang J., Moravec Ch.S., Sussman M. et al. (2000) Circulation, **102**, 3046-3052.
12. Schneider M.D. (2000) Circulation, **102**, 3026-3027.
13. James J., Robbins J. (1997) Am. J. Physiol., **273** (Heart Circ.Physiol. 42), H2105-H2118.
14. Изаков В.Я. (1980) В кн."Физиология кровообращения. Физиология сердца". Изд. Наука, Ленинград. - с.36.
15. Tomiyasu K., Oda Y., Nomura M. et al. (2000) Gene Therapy, **7**, 2087-2093.
16. Dzdu V.J., Mann M.J., Ehsan A., Gnese D.P. (2000) J.Thorac.Cardiovasc. Surg., **121**, 201-216.
17. Milano C.A., Alien L.F., Rockman H.A. et al. (1994) Science, **265**, 582-586.
18. Chen H., Mohuczy D., Li D. et al. (2001) Gene Therapy, **8**, 804-810.
19. Koss K.L., Kranias E.G. (1996) Circ.Res, **79**, 1059-1063.
20. Asahara T. (2000) Gene Therapy, **7**, 451-457.
21. Wang J-S., Shum-Tim D., Galipeau J. et al. (2000) J.Thorac.Cardiovasc.Sur., **120**, 999-1006.
22. van der Kooy D, Weiss S. (2000) Science, **287** (5457), 1439-1441.
23. Weiss S., Reynolds B.A., Vescovi A.L. et al. (1996) Trends. Neurosci., **19**, 387-393.
24. Moore M.A.S. (1999) Clin. Implic. Bas. Res., **341**, 1-3.
25. Zibaitis A., Greentree D., Ma F. et al. (1994) Transplant. Proceed., **26**, 3294.
26. Nabel E.G (2002) Circulation, **105**, 672-674.
27. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. (2002) Circulation, **105**, 93-98.
28. Li R-K., Mickle D., Weisel R. et al. (1997) Circulation, **96**, II- 179-II-187.

29. *Soonpaa M.H., Koh G.Y., Klug M.G., Field L.J.* (1994) *Science*, **264**, 98-101.
30. *Li R-K., Mickle D.A.G., Weisel R.D. et al.* (1996) *Circulation Res.*, **78**, 283-288.
31. *Leor J., Patterson M., Quinones M.J. et al.* (1996) *Circulation*, **94**, II-332-II-336.
32. *Seshi B., Kumar S., Sellers D.* (2000) *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **26**, 234-246.
33. *Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al.* (1999) *J. Clin. Invest.*, **103**, 697-705.
34. *Suzuki K., Brand N.J., Khan M.A., et al.* (1999) *Circulation*, Suppl.1, **100**, 18-851.
35. *Matsushita T., Oyamada M., Karata H. et al.* (1999) *Circulation*, **100**, II-262-II-268.
36. *Banerjee P.P., Banerjee S., Brown T.R.* (2002) *Endocrinology*, **143**, 1825-1832.
37. *Ciardiello F., Tortora G.* (2002) *Ann.Oncol.*, **13**, 501-502.
38. *Bennett J., Zeng Y., Bajwa R. et al.* (1998) *Gene Therapy*, **5**, 1156-1164.
39. *Bilbao G., Contreras J.L., Gomez-Navarro J. et al.* (1999) *Transplantation*, **67**, 775-783.
40. *Егоров Е.Е.* (2000) В сб. Генная терапия - медицине будущего. Москва. с. 130-132.
41. *Kim W.H., Joo C.U., Ku J.H. et al.* (1998) *Korean J. Intern. Med.*, **13**, 77-82.
42. *Soonpaa M.H., Koh G.Y., Pajak L. et al.* (1997) *J. Clin. Invest.*, **99**, 2644-2654.
43. *Murray A.* (1995) *Cell*, **81**, 149-152.
44. *Yasuda M., Han J.W., Dionne C.A. et al.* (1999) *Cancer Res.*, **59**, 533-537.
45. *Shimazaki K., Urabe M., Monahan J. et al.* (2000) *Gene Therapy*, **7**, 1244-1249.
46. *Chen J., Flannery J.G., La Vail M.M. et al.* (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **93**, 7042-7047.
47. *Dupraz P., Rinsch C., Pralong W.F. et al.* (1999) *Gene Therapy*, **6**, 1160-1169.
48. *Seignuirin-Venin S., Bernard V., Tremblay J.P.* (2000) *Gene Therapy*, **7**, 619-623.
49. *Garcia-Martinez C., Opolon P., Trochon V. et al.* (1999) *Gene Therapy*, **6**, 1210-1221.
50. *Schumacher B., Pecher P., von Specht B.U., Stegman Th.* (1998) *Circulation*, **97**, 645-650.
51. *Aoki M., Morishita R., Taniyama Y. et al.* (2000) *Gene Therapy*, **7**, 417-427.
52. *Koh G.Y., Kim S-J., Klug M.G. et al.* (1995) *J. Clin. Invest.*, **95**, 114-121.
53. *Emanueli C., Salis M.B., Stacca T. et al.* (2002) *Circulation*, **105**, 360-366.
54. *Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka Ch. et al.* (2002) *Circulation*, **105**, 732-738.
55. *Auer J., Berent R., Schleicher K., Eber B.* (2000) *Herz*, **25**, 635-642.
56. *Dhawan J.K., Pan L.C., Pavlath G.K. et al.* (1991) *Science*, **254**, 1509-1512.
57. *Harrell R.L., Rajanayagan M.A., Doanes A.M.* (1997) *Circulation*, **96**, 621-627.
58. *Janssens S., Flaherty D., Nong Z. et al.* (1998) *Circulation*, **97**, 1274-1281.
59. *Lamfers M.L.M., Lardenoye J.H.P., de Vries M.R. et al.* (2001) *Gene Therapy*, **8**, 534-541.
60. *George S.J., Johnson J.L., Angelini G.D. et al.* (1998) *Hum. Gen. Ther.*, **9**, 867-877.
61. *Cheng I., Mantile G., Pauly R. et al.* (1998) *Circulation*, **98**, 2195-2201.
62. *George S.J., Angelini G.D., Capogrossi M.C., Baker A.H.* (2001) *Gene Therapy*, **8**, 668-676.
63. *Steg P., Tahlil O., Aubailly N. et al.* (1997) *Circulation*, **96**, 408-411.
64. *Dichek D.A., Neville R.F., Zwiebel J.A. et al.* (1989) *Circulation*, **80**, 1347-1353.
65. *Zoldhelyi P., McNatt J., Xu X-M. et al.* (1996) *Circulation*, **93**, 10-17.
66. *Shears L.L., Kawarahada N., Tzeng E. et al.* (1997) *J. Clin. Invest.*, **100**, 2035-2042.
67. *Mimuro J., Muramatsu S., Hakamada Y. et al.* (2001) *Gene Therapy*, **8**, 1690-1697.
68. *Rade J.J., Cheung M., Miyamoto S., Dichek D.A.* (1999) *Gene Therapy*, **6**, 385-392.
69. *Nabel E.* (1995) *Circulation*, **91**, 541-548.
70. *Wilson J.M., Grossman M., Raper S.E. et al.* (1992) *Hum. Gen. Ther.*, **3**, 179-222.
71. *Herz J., Herard R.D.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 2812-2818.
72. *Ishibashi S., Brown M.S., Goldstein J.L. et al.* (1993) *J. Clin. Invest.*, **92**, 536-537.
73. *Репин В.С., Сухих Г.Т.* (1998) В кн. Медицинская клеточная биология. Изд-во БЭБиМ АМН РФ, Москва. с.132-136.
74. *Zsigmond E., Kobayashi K., Tzung K-W. et al.* (1997) *Hum. Gen. Ther.*, **8**, 1921-1933.
75. *Chrowdhury J.M., Crossman M., Gupta S. et al.* (1991) *Science*, **254**, 1802-1805.

76. Suzuki J., Isobe M., Morishita R. et al. (1997) Nature Med., **3**, 900-903.
77. Mallat Z., Ohan J., Leseche G., Tedgui A. (1997) Circulation, **96**, 424-428.
78. Перевозчиков А.П., Дуже Э.Б., Серов С.М и др. (1997) Мол.биол., **31**, 216-223.
79. Forbes S.J., Themis M., Alison M.R. et al. (2000) Gene Therapy, **7**, 784-789.
80. Grossman M., Raper S.E., Wilson J.M. (1992) Hum. Gene Ther., **5**, 501-510.
81. Ganem D. (1999) PNAS, **96**, 11696-11697.
82. Zhang L.H., Pan J.P., Yao H.O. et al. (2001) Gene Therapy, **8**, 1333-1342.
83. Zinner S.H., Margolius H.S., Rosner B., Kass S.H. (1978) Circulation, **58**, 908-915.
84. Chao J., Chaj L. (1997) In: Gene Transfer in the circulation System. (K.L.March, ed.) Kluwer Academic Publishers Norwell MA, 499.
85. Knechtle S.J., Zhai Y., Fechner J. (1996) Transplant. Immunology, **4**, 257-264.
86. Guillot C., David A., Coathalem H. et al. (1999) Biochem. Soc. Trans., **27**, 864-869.
87. De Bruyne L.A., Li K., Bishop D.K., Bromberg J.S. (2000) Gene Therapy, **7**, 575-582.
88. Suzuki J., Morishita R., Amano J. et al. (2000) Gene Therapy, **7**, 1847-1852.
89. David A., Chetritt J., Guillot C. et al. (2000) Gene Therapy, **7**, 619-623.
90. Shiraishi M., Taira K., Sugawa H. et al. (2000) Transplant. Proc., **32**, 1263-1264.
91. Kypson A.P., Hendrickson S.C., Akhter S.A. et al. (1999) Gene Therapy, **6**, 1298-1304.
92. Reinlib L., Field L., Herman B. (2000) A Workshop of the Heart, Lung and Blood Institute. Circulation, **101**, e182-e187.
93. Потапов И.В., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А. (2001) Вестник трансплантологии и иск. органов, **2**, 53-62.
94. Берсенов А.В., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А. (2001) Вестник трансплантологии и иск. органов, **2**, 46-53.
95. Scorsin M., Marotte F., Sabri A. et al. (1996) Circulation, **94**, II-337-II-340.
96. Li R-K., Jia Z-Q., Weisel R.D. et al. (1999) Circulation, **100**, II-63-II69.
97. Minguell J.J., Erices A., Conget P. (2001) Exp. Biol. Med., **226**, 507-520.
98. Murry C.E., Wiseman R.W., Schwartz S.M., Hauschka S.D (1996) J. Clin. Invest., **11**, 2512-2523.
99. Koh G.Y., Soonpaa M.H., Klug M.G., Field L.J. (1993) Am. J. Physiol., **264** (Heart Circ.Physiol.33), H 1727-1733.
100. Koh G.Y., Klug M.G., Soonpaa M.H., Field L.J. (1993) J. Clin. Invest., **92**, 1548-1554.
101. Marelli D., Desrosiers C., el-Alfy M. et al. (1992) Cell Transplant., **1**, 383-390.
102. Kessler P.D., Byrne B.J. (1999) Ann. Rev. Physiol., **61**, 219-242.
103. Ding L., Lu S., Batchu R.B. et al. (1999) Gene Therapy, **6**, 1611-1616.
104. Aran J.M., Fillat C., Estivill X. (1999) Transplant. Proceed., **31**, 2228-2229.
105. Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohammed A.S. et al. (2003) Microbiol. & Molec. Rev., **67**, 657-685.
106. Cheng J.C., Moore T.B., Sakamoto K.M. (2003) Mol. Genet. Metab., **80**, 121-128.
107. Ylera F., Lurz.R., Erdman V.A., Furste J.P. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun., **290**, 1583-1588.

Поступила: 18. 03. 2004

**GENE AND CELL THERAPY APPROACHES TO CARDIOVASCULAR AND  
SYSTEMIC DISEASES IN MODELIC EXPERIMENTS ON ANIMALS**

*M.S. Dolguikh*

Institute of Transplantology and Artificial Organs, 1, Shchukinskaya, Moscow, 123182 Russia  
tel.: 190-45-31, e-mail: Biolab@online.ru

The therapeutic potential of gene and cell therapy in cardiovascular and systemic disease such as myocardial ischemia, postangioplasty restenosis, hypertension, arteriosclerosis, trombogenicity, posttransplantation complications is considered.

**Key words:** gene therapy, cell therapy, cardiovascular system, contractility, vascular therapy, atherosclerosis, thrombosis.