

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ СОСУДОВ

А. В. ЗЕЛЕНИН

Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта,
Российская академии наук, Москва, ул. Вавилова, 34, 117984, Россия

Генная терапия (ГТ) заболеваний сосудов представляет собой новую перспективную область современной биомедицины, основанную на введении в организм больного генетических конструкций с лечебной целью. В статье рассматриваются основные направления ГТ заболеваний сосудов: торможение пролиферативных процессов в сосудистой стенке; введение в элементы сосудистой стенки генов, ответственных за синтез окиси азота; восстановление нормальной системы регуляции кровяного давления; синтез в сосудах тромбозомболитических факторов и антикоагулянтов; ГТ атеросклероза; реваскуляризация ишемического миокарда и торможение процесса васкуляризации опухолей как подход к лечению рака.

Ключевые слова: генная терапия, заболевания сосудов, атеросклероз, реваскуляризация, торможение васкуляризации.

Последние годы знаменуются стремительным развитием нового направления биомедицинской науки, получившего название генной терапии (ГТ) [1-3]. В высокоразвитых в промышленном отношении странах, в первую очередь в США, в разработку экспериментальных основ ГТ и проведение доклинических и клинических испытаний вкладываются огромные средства (миллиарды долларов США) как из бюджетных источников, так и за счет различных фармацевтических и биотехнологических компаний. Все чаще ГТ называют основой медицины грядущего столетия.

ГТ представляет собой медицинский подход, основанный на введении генов с лечебными целями. Оказавшись в организме больного, эти обычно чужие, но часто и "родные" гены начинают работать, т.е. выполнять свою биологическую функцию. Они реплицируются в трансфицированных клетках, транскрибируются в них, наконец, транслируются, в результате чего синтезируется белок, кодируемый введенным геном. Этот новый или содержащийся в организме в недостаточной количестве белок оказывает лечебный эффект.

Существует альтернативная схема ГТ, при которой действие введенной генетической конструкции основано не на ее функционировании и синтезе соответствующего белка, а на подавлении функции избыточно или неправильно экспрессируемого "больного" гена с помощью так называемых антисмысловых конструкций [1,3]. Это направление ГТ, которое мы назвали "негативной" ГТ [3], имеет значительно меньшее распространение, по сравнению с классической "позитивной" ГТ.

Классификацию ГТ проводят и на основе иных критериев. В частности, строго разделяют ГТ соматических и половых клеток [1,3]. Проведение ГТ манипуляций в отношении половых клеток считается, как правило, недопустимым, исходя из соображений биоэтики и генетической безопасности [1,3,4].

Методы и подходы ГТ стремительно развиваются, в основном, за счет экспериментов, проводимых на животных и клетках *in vitro*. Однако в отношении

ряда заболеваний человека уже начаты клинические испытания, часть из которых дала достаточно выраженный лечебный эффект.

Объектом ГТ являются самые разнообразные болезни как наследственные, имеющие в своей основе дефект одного определенного гена, так и разнообразные по этиологии и патогенезу приобретенные заболевания, ГТ которых осуществляется за счет введения генетических конструкций, оказывающих необходимый лечебный эффект [1,3].

В настоящее время наибольшее число клинических протоколов ГТ относится к лечению разнообразных онкологических заболеваний [1,3].

Значительное место в экспериментальной и клинической ГТ занимает лечение заболеваний сосудистой системы [5,6], рассмотрению которых посвящена данная статья.

Большая часть ГТ подходов к лечению сосудистых заболеваний основано на введении генетических конструкций в просвет сосудов, пораженных заболеванием; при этом "лечебные" гены в зависимости от их строения, наличия или отсутствия специальных участков, ответственных за взаимодействие с клетками больного и способа введения, проникают в эндотелий и (или) гладкомышечные элементы сосудистой стенки и оказывают ожидаемый лечебный эффект либо за счет индуцированного синтеза необходимого белка, либо подавления функции поврежденного или чрезмерно экспрессирующегося гена. В других случаях лечебный эффект достигается (или, по крайней мере, ожидается его получение) в результате более общих воздействий на организм, например, при введении генов, замедляющих развитие атеросклеротического процесса.

В ГТ заболеваний сосудов используют обычные генные конструкции, представляющие собой в основном гены, клонированные в плазмиде, либо входящие в состав различных вирусных векторов (ретровирусных, аденовирусных и т.д.) [2,3,6].

Большое значение для эффективной ГТ сосудов имеет создание генетических конструкций, специфически экспрессирующихся в клетках сосудистой стенки (эндотелиальных и гладкомышечных). Предпринимаются попытки усовершенствовать способы локальной доставки генетического материала. В частности, с этой целью предложено использовать механическую манжету - воротник (advential collar), надеваемый на артерию [7] и усиливающий процесс трансфекции. Этому же способствует и использование специфических белков оболочки вируса, связывающих вводимую генетическую конструкцию с коллагеновым матриксом сосудистой стенки [8], или полимерного препарата полноксимера 407 [9].

Ниже рассмотрены наиболее важные подходы к ГТ заболеваний сосудов.

Торможение пролиферативных процессов в сосудистой стенке

Чрезвычайно важной проблемой лечения сосудистых заболеваний является разработка эффективных и адекватных методов борьбы с рестенозом, наступающим после хирургической пластики и баллонного расширения сосудов, а также первичных стенозов, развивающихся вследствие травматических поражений [10,11].

ГТ рестеноза основана на направленном торможении пролиферации элементов сосудистой стенки, в первую очередь, гладкомышечных клеток [6]. Генетические конструкции вводятся эндоваскулярно, периваскулярно или внутримышечно в стенку сосудов, нуждающихся в лечении.

Мишенью ГТ в большинстве случаев является ген основного фактора роста фибробластов (basic FGF), на который воздействуют с помощью введения антисмысловых конструкций [10-12]. Торможение пролиферации гладкомышечных клеток может достигаться также с помощью воздействия на гены с-тус [13] и циклин-зависимой протеинкиназы, подавление активности которой нарушает фосфорилирование факторов роста клеток и, таким образом, угнетает размножение миоцитов сосудистой стенки [14].

Среди других генов, вмешательство в функцию которых используется в экспериментах по разработке подходов к лечению и профилактике рестеноза,

следует упомянуть гены ретинобластомы, цитозиндезаминазы, NO-синтазы и др. (подробнее см. [5,6,10,11]).

Несмотря на широкий фронт исследований в этой области и весьма обнадеживающие результаты, высказываются сомнения в возможности использования предлагаемых методов в их современном виде в клинике [11].

Введение в элементы сосудистой стенки генов, ответственных за синтез окиси азота

Как известно, окись азота, синтезируемая клетками сосудистого эндотелия, является ключевым естественным регулятором сосудистого тонуса [15], а также ингибитором процессов пролиферации клеток сосудистой стенки и продуцирования сосудистого матрикса [16]. Поэтому перспективными представляются попытки вмешательства в эти процессы путем введения гена, кодирующего фермент, ответственный за синтез NO. В опытах на выделенных сосудах головного мозга собаки показано, что введение генетических конструкций, содержащих ген, ответственный за синтез эндотелиальной NO-синтазы [15], приводит к повышению уровня этого фермента в стенке сосудов и стимуляции синтеза цГМФ.

Предполагается, что введение соответствующих генетических конструкций в спинномозговую жидкость может оказаться перспективным подходом к лечению спазматических заболеваний сосудов головного мозга.

Другая группа исследователей [16] использовала локальное внутриартериальное введение гена эндотелиальной NO-синтазы для торможения пролиферации гладкомышечных клеток и формирования неointимы в сонных артериях крысы, поврежденных в результате баллонного расширения сосудистого просвета. По всей видимости, терапевтический эффект достигался в результате стимуляции синтеза цГМФ. Дополнительные сведения об этом направлении исследований можно найти в [5,15,16].

Восстановление системы нормальной регуляции кровяного давления

Предложенный с этой целью подход основан на введении в организм гена, кодирующего белок калликреин [17]. Этот белок представляет собой сериновую протеиназу - фермент, превращающий предшественники кининов в активные кинины, влияющие на регуляцию процессов вазодилатации и вазоконстрикции. Установлено существование обратной связи между содержанием калликреина в моче и уровнем кровяного давления [18]. Показано, что внутривенное введение калликреина вызывает снижение кровяного давления, однако этот эффект оказывается кратковременным (длится несколько минут) [19]. Ген клеточного калликреина вводили внутривенно в составе аденовирусного вектора крысам со спонтанной гипертензией [17]. Экспрессия трансгена была обнаружена в печени, почках, селезенке, надпочечниках и аорте экспериментальных животных. Выраженный гипотензивный эффект сохранялся в течение длительного времени - до 40 дней после введения этой генной конструкции. Полученные результаты свидетельствуют в пользу несомненной перспективности использованного ГТ подхода для лечения гипертензии.

Локальный синтез в сосудах тромбозмобилических факторов и антикоагулянтов

Показано [20], что введение в клетки сосудистого эндотелия конструкции, содержащей ген активатора плазминогена в составе ретровирусного вектора, вызывает четко выраженный антитромботический эффект.

Генная терапия атеросклероза

Эта область ГТ относится к лечению несосудистых заболеваний с четко выраженными сосудистыми последствиями [6]. Речь идет о ГТ нарушений липидного обмена, в первую очередь, наследственной семейной гиперхолестеринемии. Описан ряд достаточно успешных попыток введения экспериментальным животным гена рецептора липопротеина низкой плотности, что приводило к нормализации содержания этого вещества в крови, т.е. оказывало четко выраженный антиатеросклеротический эффект [21,22]. Описаны попытки использовать этот подход для лечения больных с семейной гиперхолестеринемией [5,23].

Жигмонд и др. [24] осуществили введение в организм мышей гена липопротеинлипазы - фермента, вызывающего разрушение липопротеинов, богатых триглицеридами. Введение этого гена в составе аденовирусного вектора мышам с экспериментальной гиперлипидемией привело к резкому снижению содержания в крови липопротеинов, богатых триглицеридами и, более того, вызвало общее снижение содержания холестерина в плазме крови.

Подробнее о попытках ГТ нарушений липопротеидного обмена см. [5,6].

Два направления ГТ, разбираемые ниже, не относятся, строго говоря, к лечению сосудистых заболеваний, но настолько тесно связаны с темой статьи, что должны быть рассмотрены в ней.

В основе этих направлений лежит вмешательство в процесс образования сосудов *de novo* (ангиогенеза).

Реваскуляризация ишемического миокарда

Индукция ангиогенеза происходит в основном в результате воздействия генов из семейств факторов роста фибробластов и эндотелия. В качестве альтернативы или дополнения используются гены рецепторов этих факторов. Генетические конструкции вводят как в сосуды больного миокарда, так и путем прямой инъекции в ткани поврежденного сердца.

Показано [6,25-27], что инъекция первого фактора роста фибробластов (FGF-1) в миокард больных, перенесших хирургическую пластику коронарных сосудов, приводит к реваскуляризации миокарда вокруг места инъекции. Это исследование открывает возможности для воздействия на процесс реваскуляризации миокарда путем локального введения гена, кодирующего FGF-1. В пользу этого предложения свидетельствуют результаты работ, в которых было показано, что локальное введение гена сосудистого фактора роста фибробластов человека (VEGF) приводит к росту новых кровеносных сосудов в забрюшинной жировой ткани, характеризующейся в норме весьма низким уровнем васкуляризации [28]. На Первом конгрессе американского общества генной терапии (в мае 1998 г) [30] апологетами этого метода ГТ васкуляризация больного сердца была громко названа созданием новых сосудов для старого сердца (*new vessels for the old heart*).

Торможение процесса васкуляризации опухолей как подход к лечению рака

Одной из громких медико-биологических сенсаций последнего времени явились работы, связанные с попытками подавления роста опухолей путем введения факторов, тормозящих их васкуляризацию [30]. Наибольшие успехи были достигнуты при введении двух ингибиторов ангиогенеза - ангиостатина и эндостатина [31]. В качестве логичного развития этих исследований была предпринята успешная попытка торможения процесса васкуляризации опухолей с помощью введения в них генов, кодирующих ингибиторы васкуляризации [32-34]. В результате этих опытов было обнаружено существенное торможение роста опухолей и высказано мнение о чрезвычайной перспективности разрабатываемого подхода. Будущее покажет реальность этих ожиданий [35]. Очевидно, что успех этого вида противоопухолевой терапии в значительной степени зависит от эффективности и длительности экспрессии используемых генетических конструкций и от возможности их направленного введения в опухоль.

Использование приемов ГТ, как и любых новых методов лечения, требует соблюдения необходимых условий безопасности и проведения специальных доклинических и клинических испытаний. В случае ГТ к обычным условиям безопасности присоединяются требования генетической безопасности как в отношении конкретного пациента, так и применительно к геному будущих поколений. Возникающие проблемы являются объектом пристального внимания медицинской общественности мира. Разработаны правила выполнения ГТ процедур (подробнее см. [1,3,4]). Тщательно разработанная разрешительная система ГТ процедур на разных уровнях (создание и выбор наиболее адекватных рекомбинантных конструкций, проведение экспериментов на клетках *in vitro* и на животных, доклинические и клинические испытания, протоколы для проведения ГТ)

существует в США. Разрешение на проведение таких исследований даются Комитетом по рекомбинантным молекулам (RAC) при Национальном Институте здоровья (NIH) и Национальным управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами (FDA). Конкретные, очень подробные протоколы доклинических и клинических испытаний публикуются в американском журнале "Генная терапия человека" (Human Gene Therapy).

Естественно, что ГТ сосудистых заболеваний должна проводиться при строгом соблюдении этих общих правил и установлений. Однако есть одно особое обстоятельство, которое надо учитывать в этом случае. Дело в том, что при ГТ сосудистых заболеваний генетические конструкции, как правило, вводятся в просвет сосудов, измененных в результате развития атеросклероза. Поэтому необходимо убедиться в том, что экспрессия введенных генов не приведет к нежелательным последствиям. Недавно опубликованные данные [36] показывают, что эти опасения не лишены оснований. Оказалось, что введение рекомбинантных вирусных векторов может вызывать воспалительные явления в пораженных атеросклерозом сосудах и таким образом утягивать течение болезни. Реальность такой опасности и пути ее продолжения должны изучаться применительно к каждому конкретному протоколу ГТ сосудов.

Подводя итоги сказанному, следует отметить, что ГТ представляет собой обширную область медицины и биологии, основанную на использовании широкого круга сложнейших ультрасовременных технологий. Для клинического использования ГТ необходимо владение этими технологиями и теснейшая кооперация специалистов самого разного профиля (врачей, генных инженеров, молекулярных и клеточных биологов, биоэтиков и т.д.). Реальные достижения ГТ еще имеют пока еще весьма скромные размеры, однако знакомство с ее успехами, а также владение технологиями, лежащими в ее основе, необходимо для того, чтобы не пропустить тот момент, когда ГТ заболеваний сосудов станет достоянием практической медицины.

Настоящая работа финансировалась Программой Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ (грант 96-15-967640)

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Culver K.W.* (1994) Gene Therapy. A Handbook for Physicians. N.Y. Mary Ann Liebert Inc. Publishers, pp. 1-117.
2. *Wolff J.A., Lederberg J.* (1993) In: Gene therapeutics. Methods and Application of Direct Gene Transfer (J.A.Wolff, Ed). Birkhauser, pp. 3-25.
3. *Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С.* (1998) Молекуляр. биология. **32**, 219-228.
4. *Зеленин А.В.* (1999) Генетика. в печати.
5. *Nabel E.G.* (1995). Circulation, **19**, 541-548.
6. *Fox J.C.* (1998) In: Stem cell biology and gene therapy. (P.J.Quesenberry, G.S.Stein, B.G.Forget, S.W.Weissman, Eds) Wiley-Liss, 471-502
7. *Laitinen M., Pakkaren T., Donetti E., Baetta R., Luoma J., Lehtolainen P., Viita H., Agrawal R., Miyanochara A., Friedmann T., Risau W., Martin J.F., Soma M.* (1997) Human Gene Therapy, **8**, 1645-1650,
8. *Hall F.L., Gordon E.M., Wu L. Zhu N.L., Skotzko M.J., Starnes V.A., Anderson W.F.* (1997) Human Gene Therapy, **8**, 2183-2192.
9. *Van Belle E., Maillard L., Rivard A., Farbe J-E., Couffinhal T., Kearney M., Branellec D., Feldman L.J., Walsh K., Isner J.M.* (1998) Human Gene Therapy, **9**, 1013-1024,
10. *Back S., March K.L.* (1998) Circulation Research, **82**, 295-305.
11. *De Young M.B., Dichek D.A.* (1998) Circulation Research, **82**, 306-313.
12. *Fox J.C., Shanley J.R.* (1996) J.Biol.Chem., **271**, 12578-12584.
13. *Bennet M.R.* (1994) J. Clin. Invest., **92**, 823-828.

14. *Morishita R., Gibbons G.H., Ellison K.E., Nakajima M., Zhang L., Kaneda Y., Ogihara T., Dzan V.J.* (1993) *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **90**, 8474-8478.
15. *Chen A.F.Y., O'Brien T., Tsutsui M., Kinoshita H., Pomplii V.J., Crotty T.B., Spector D.J., Katusic Z.S.* (1997) *Circulation Research*, **80**, 327-335.
16. *Janssens S., Flaherty D., Nong Z., Varenne O., van Pelt N., Haustermans C., Zoldheyi P., Gerrard R., Collen D.* (1998) *Circulation*, **97**, 1274-1281.
17. *Jin L., Zhang J.J., Chao L., Chao J.* (1997) *Human Gene Therapy*, **8**, 1753-1761.
18. *Zinner S.H., Margolius H.S., Rosner B., Kass S.H.* (1978) *Circulation*, **58**, 908-915.
19. *Chao J, Chaj L.* (1997) In: *Gene Trnsansfer in the Circulation System.* (K.L. March, ed.) Kluwer Academic Publishers. Norwell MA. 499-473.
20. *Dichek D.A., Anderson J., Kelly A.B., Hanson S.R., Harker L.A.* (1996) *Circulation*, **93**, 301-309.
21. *Herz J., Herard R.D.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2812-2818.
22. *Ishibashi S., Brown M.S., Goldstein J.L., Gerard R.D., Hammer R.E., Herz J.* (1993) *J. Clin. Invest.*, **92**, 883-893.
23. *Crowdhury J.M., Crossman M., Gupta S., Crowdhury N.R., Baker J.R., Milson J.M.* (1991) *Science*, **254**, 1802-1805.
24. *Zsigmond E., Kobayashi K., Tzung K-W., Li L., Fuke Y., Chan L.* (1997) *Human Gene Therapy*, **8**, 1921-1933.
25. *Thomas K.A.* (1996) *J.Biol.Chem.*, **271**, 603-606.
26. *Schumacher M.D., Pecher M.D., von Specht B.U., Stegmann T.* (1998) *Circulation*. **97**, 645-650.
27. *Folkman J.* (1998) *Circulation.*, **97**, 628-629.
28. *Magovern C.J., Mack C.A., Zhang J., Rosengart T.K., Isom O.W., Crystal R.G.* (1997) *Human Gene Therapy*, **8**, 215-227.
29. *1st Annual meeting of the American Society of Gene Therapy.* (1998). Seattle, Washington. American Society Of Gene Therapy, Thorefare, New Jersey, USA.
30. *Harris A.L.* (1997) *Lancet*, **349**, 13-15.
31. *Harris A.L.* (1998) *Lancet*, **351**, 1598-1599.
32. *Kong H.L., Hecht D., Song W., Koverdi I., Hackett N.R., Yayon A., Crystal R.G.* (1998) *Human Gene Therapy*, **9**, 823-833.
33. *Paillard F.* (1998) *Human Gene Therapy*, **9**, 768-770.
34. *Griscelli F., Li H., Bennaceur-Griscelli A., Soria J., Opolon P. Soria C., Perricaudet M., Yeh P., Lu H.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **95**, 6367-6372.
35. *Sato T.N.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **95**, 5843-5844.
36. *Schneider D.B., Fly C.A., Dichek D.A., Gear R.L.* (1998) *Human Gene Therapy.*, **9**, 815-821.

Поступила 02.04.99.

GENE THERAPY OF VASCULAR DISEASES

A.V.ZELENIN

V.A. Engeldhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul.vavilova, 34, Moscow, 117984, Russia

Gene therapy of vascular diseases represents a new perspective field in the modern biomedical science. It is based on the employment of genetic constructions for medical treatment. The paper reviews major directions in gene therapy of vascular diseases: inhibition of proliferative processes in the vascular wall; administration into the elements of vascular wall of genes responsible for nitric oxide synthesis; normalisation of blood pressure regulatory system; synthesis of thromboembolic factors and anticoagulants; gene therapy of atherosclerosis; revascularisation of ischaemic myocardium and inhibition of tumor vascularisation.

Key words: gene therapy, vascular diseases, atherosclerosis, revascularisation, inhibition of vascularisation