

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. К. ГУЛЕВСКИЙ, Е. С. АБАКУМОВА, И. И. ЩЕНЯВСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail:ivanou@rambler.ru

Получено 06.07.2011

В обзоре рассматриваются возможности генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Представлена информация о генных конструкциях, экспрессия которых может оказывать терапевтические эффекты, что целесообразно использовать в лечении различной патологии сердца и сосудов. Описаны используемые в генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний вирусные и плазмидные векторы, а также современные системы доставки терапевтических трансгенов к целевым тканям. Анализируются результаты экспериментальных и клинических исследований по генной терапии, направленных на поиск новых стратегий лечения сердечно-сосудистых заболеваний либо путем переноса трансгенов в составе рекомбинантных конструкций, кодирующих определенные протеины, либо модуляцией уровня экспрессии соответствующих генов в клетках сосудов и миокарда.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, генная терапия, генетические конструкции, рекомбинантные векторы, векторный таргетинг, системы доставки трансгенов.

Понятие «генная терапия» («генотерапия») подразумевает лечение с помощью введения в организм генетических конструкций, способных восстановить либо заменить дефектный ген, усилить экспрессию нормальных генов или заблокировать работу мутантных и чужеродных генов и восстановить экспрессию заблокированных. В настоящее время генная терапия рассматривается как универсальный подход к лечению практически всего спектра заболеваний, включая так называемые болезни современного общества (рак, атеросклероз, диабет и др.).

Теоретически генная терапия может быть применена относительно как соматических, так и половых клеток. В настоящее время генетический материал вводят только в соматические клетки, и он не передается половым клеткам, т. е. изменения, внесенные в геном пациента, не передаются потомству. Введение генетических конструкций в половые клетки с целью передачи генетической информации последующим поколениям в настоящее время в клинической практике не применяют. То же самое относится к фетальной генотерапии, при которой введение генов осуществляется *in utero* в зиготу или эмбрион на ранней стадии разви-

тия. При этом введенный генетический материал попадает во все клетки реципиента, включая половые клетки, что обеспечивает его передачу следующему поколению. К сожалению, фетальная генотерапия пока что недостаточно разработана для лечения наследственных болезней человека. В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента различают прямую (*in vivo*) и непрямую (*ex vivo*) генную терапию.

Терапевтические эффекты введения в клетки рекомбинантных или генетических конструкций и векторов при сердечно-сосудистых заболеваниях

Благодаря возможности с помощью полимеразной цепной реакции и гибридизации *in situ* определять экспрессию специфических генов в биоптатах, полученных из инфарцированного миокарда, поврежденной сосудистой стенки, атеросклеротической бляшки, а также ряда других современных методов, получено много новых данных о молекулярных механизмах заболеваний сердца и сосудов. Были идентифицированы гены, мутации которых являются причиной наследственных болезней или повышают риск многофакторных заболеваний.

На основании полученных в экспериментальных исследованиях данных сделан вывод о возможности сайт-специфической генной терапии при мерцательной аритмии путем гиперэкспрессии мутантного гена калиевого ионного канала, эффективность которой по электрофизиологическим показателям сравнима с антиаритмическими средствами III класса [1]. Экспрессия фактора роста гепатоцитов (HGF), обладающего антитромботическим и антифиброзным действием, в результате трансфекции соответствующего гена приводила к стимулированию ангиогенеза и последующему улучшению перфузии, снижению фиброза и апоптоза, а также способствовала восстановлению миоцитов после атрофии, снижая тем самым степень ремоделирования миокарда и улучшая его функции при сердечной недостаточности [2]. На модели сердечной недостаточности у собак показано, что интрамиокардиальная инъекция аденовирусного вектора, который содержал ген, кодирующий кальциевую АТФ-азу саркоплазматического ретикулума (*rAAV1-SERCA-2*), приводила к значительному улучшению систолической функции левого желудочка [3]. Генная терапия с использованием NF- κ B-зависимого гена *A20* может быть весьма эффективна в профилактике и лечении трансплантационной васкулопатии благодаря сочетанию его противовоспалительного и антиапоптозного действия в эндотелиоцитах или проапоптозного действия в гладкомышечных клетках [4]. На модели стентирования коронарной артерии свиньи показано, что применение стентов с покрытием, содержащим ретроаденовирусный вектор, в составе которого есть ген, кодирующий ингибитор металлопротеазы 3 (TIMP-3), подавляет миграцию гладкомышечных клеток и формирование неointимы, что может быть использовано для предотвращения стенового рестеноза в клинике [5]. Потенциальным трансгеном для предотвращения рестеноза при ангиопластике может служить ген онкосупрессора *p53* [6]. Блокада гена моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) ограничивала развитие неointимы в венах трансплантата у собак [7]. Снижению гиперплазии неointимы аорты кроликов после денудации эндотелия способствовал аденовирусомедиированный локальный перенос гена экстрацеллюлярной супероксиддисмутазы (AdEC-SOD) [8]. Трансфекция клеток сосудистых трансплантатов аденовирусным вектором, несущим ген фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), также может быть ис-

пользована для предотвращения постангиопластического рестеноза и утолщения стенки сосуда после сосудистых манипуляций [9]. Было также показано, что введение в составе аденовирусного вектора генов эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы (eNOS, iNOS) кроликам с поврежденной сонной артерией способствовало восстановлению эндотелия и снижению гиперплазии интимы, предотвращая тем самым развитие рестеноза [10].

В экспериментальных работах по терапевтическому ангиогенезу на моделях ишемии задней конечности у крысы и кролика, моделях острой и хронической ишемии миокарда у собак и мини-свиней изучался ангиогенный эффект как рекомбинантных факторов роста фибробластов (FGF-1 и FGF-2) и VEGF, так и кодирующих эти протеины генов (*VEGF₁₆₅*, *VEGF₁₂₁*, *VEGF₁₈₉* и *FGF₅*) [11, 12]. Одноразовое введение генов *VEGF₁₆₅*, *VEGF₁₂₁* и *VEGF₁₈₉* оказывало стимулирующий эффект на развитие коллатералей и новообразование капилляров, которые не регрессировали после прекращения введения вектора, и, следовательно, может использоваться в качестве альтернативы многократным инъекциям или инфузиям рекомбинантных факторов роста [12].

Для предотвращения развития рестеноза целесообразно вводить в клетки поврежденного участка сосудов либо трансгены энзимов, катализирующих превращение безвредных препаратов в токсические метаболиты, способные вызывать смерть уже вошедших в клеточный цикл клеток, либо трансгены, кодирующие протеины-цитостатики, которые ингибируют входение клеток в клеточный цикл. Для достижения цитотоксического эффекта с целью предотвращения рестенозов применяют введение гена тимидинкиназы простого герпеса, фосфорилирующей препарат ганцикловир — нуклеозидный аналог в токсический метаболит ганцикловирфосфат, способный прерывать синтез ДНК [13]. Генами, экспрессия которых приводит к повышению продукции протеинов-цитостатиков, являются ген ретинобластомы (кодируемый им протеин блокирует входение клетки в клеточный цикл, препятствуя синтезу ДНК) [14], ген, кодирующий протеин p21 (ингибитор циклин-зависимых киназ, обеспечивающих входение клетки в S-фазу) [15], и один из гомеобоксных генов *gax*, кодирующий цитостатический протеин [16]. Эффективное подавление роста неointимы достигалось путем введения антисмысловых олигонуклеотидов,

подавляющих экспрессию ядерного антигена пролиферирующих клеток и циклинзависимой киназы 2 [17]. Для снижения миграции гладкомышечных клеток из медиа в интиму вызывали гиперэкспрессию гена, кодирующего протеин — тканевой ингибитор матриксных металлопротеаз, что привело к подавлению роста неоинтимы в два раза [18]. Подавление экспрессии гена урокиназного рецептора ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию эндотелиальных клеток, что дает основание рассматривать основанный на данной стратегии подход в качестве потенциального терапевтического средства предотвращения рестеноза [19].

Для переноса трансгенов в клетки сосудов человека и животных используют различные векторные системы, включающие невирусные или вирусные векторы. Об эффективности переноса обычно судят по увеличению содержания протеина, кодируемого вносимым в клетки трансгеном, либо по экспрессии репортерного гена. Репортерными называют гены, которые присоединяют к регуляторным последовательностям других генов для исследования проявлений последних в клетках. Целевой ген и ген-репортер обычно встраивают в одну генетическую конструкцию, а затем вводят ее в ткань или организм. Широкое применение находят репортерные гены, кодирующие флюоресцентные и люминесцентные протеины.

Наиболее эффективная трансдукция клеток достигается с помощью вирусных векторов. Для достижения преимущественного действия трансгена в клетках определенной ткани (в миокарде, в эндотелиальных или гладкомышечных клетках) все чаще используют тканеспецифичные промоторы [20]. Включение энхансеров (сигнальных последовательностей нуклеотидов, усиливающих транскрипцию гена с данного промотора при посредстве протеинов-активаторов), таких как регуляторный элемент вируса гепатита сурка, может значительно увеличить уровень экспрессии трансгена. Показано, что рациональное сочетание элементов промотора и усилителя привело к 40-кратному увеличению уровня экспрессии трансгена в коронарных артериях свиньи после локального интравенузного введения [21].

Вирусные векторы, используемые в настоящее время для генной терапии, представлены модифицированными или ослабленными ретровирусами, аденовирусами, аденоассоциированными вирусами, вирусом герпеса 1-го типа, лентивирусами и т. д. Трансдук-

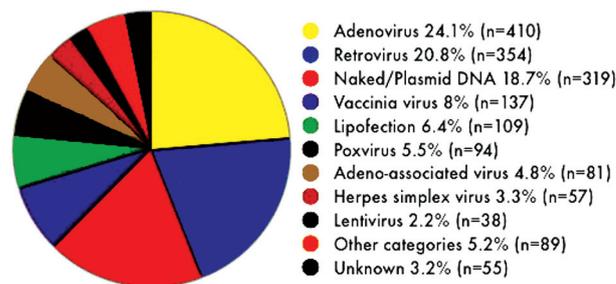
ция с помощью ретровирусных векторов может быть эффективной только в тканях с высоким уровнем пролиферации клеток. Разработка и использование коллагенориентированных ретровирусных векторов, включающих тканеспецифичный мотив, содержащий фактор Виллебранда, позволила добиться 20-кратного по сравнению с нецелевыми векторами повышения трансдукции клеток неоинтимы при системной и местной доставке [22]. Лентивирусные векторы, обладающие большим, чем другие виды ретровирусов, тропизмом относительно сердца и сосудов, эффективны и в отношении неделящихся клеток [23]. Аденовирусные векторы являются наиболее распространенным типом векторов, используемых в генной терапии при клинических испытаниях [24]. Многочисленные экспериментальные данные демонстрируют эффективность использования аденовирусных векторов по экспрессии как репортерного гена, так и трансгена в клетках сердечно-сосудистой системы [25, 26]. Однако иммуногенная природа аденовирусных векторов, которые вызывают как клеточное, так и гуморальное уничтожение вектора и вектор-трансдуцированных клеток, препятствует длительной экспрессии трансгена более чем 2–3 недели после трансдукции [27]. Этот недостаток был устранен путем создания «слабых» аденовирусных векторов, зависящих от помощника (HD, helper-dependent), лишенных практически всех вирусных генов [28]. Контрольно-проверочные исследования *in vivo* показали значительный потенциал HD-аденовирусных векторов в трансдукции миокарда [29] и сосудов. В качестве векторов используют аденоассоциированные вирусы (AAVs), которые иммуногенны в значительно меньшей степени, чем другие вирусные векторы, и поэтому обеспечивают более длительную экспрессию трансгенов вследствие стабильной интеграции рекомбинантной ДНК с геномом клетки-мишени [30, 31]. Основная проблема, связанная с векторами AAV, — относительно низкая эффективность переноса этих векторов. Эта проблема была частично решена путем разработки мутантных по тирозину [32] и AAV-векторов, содержащих самокомплементарные нуклеотидные последовательности [30].

В генной терапии существует подход, основанный на выключении функции информационной РНК (иРНК), кодирующей протеин, синтез которого необходимо подавить. Для этого создают конструкцию с обратным по отношению к кодирующей данный проте-

ин иРНК расположением нуклеотидов, которая, соединившись с комплементарной цепью нуклеотидов иРНК, мешает ей служить матрицей для синтеза протеина. Такая конструкция носит название антисмысловой РНК (antisense RNA). Антисмысловые РНК используют в качестве РНК-«приманок» или «олигонуклеотидных ловушек». Антисмысловые олигонуклеотидные ловушки широко использовались для снижения экспрессии на уровне РНК генов, причастных к сердечно-сосудистым заболеваниям [33, 34]. Однако эффективность этих средств в клинических условиях недостаточна. В последнее время экспоненциальный рост использования малых интерферирующих РНК (миРНК, англ. siRNA), которые обеспечивают повышенную и постоянную отрицательную регуляцию экспрессии генов-мишеней [35, 36, 37], возродил интерес к применению в лечении сердечно-сосудистых заболеваний метода «нокаута» — направленного разрушения гена с помощью гомологичной рекомбинации или «нокдауна» — значительного снижения уровня экспрессии гена. Малые интерферирующие РНК (миРНК) представляют собой короткие (как правило, длиной 21 нуклеотид) двухцепочечные РНК с двумя неспаренными выступающими нуклеотидами на 3'-конце. Экспрессия практически любого гена с известной последовательностью нуклеотидов может быть изменена при введении специфических миРНК. Антисмысловые конструкции вводят в организм либо в виде «голой» нуклеиновой кислоты, либо в составе вирусного вектора.

Невирусные плазмидные векторы, благодаря их низкой токсичности, считаются безопасными для терапевтического переноса генов. К сожалению, эффективность трансфекции тканей плазмидной ДНК *in vivo* очень низкая (не более 0,1%). Введение плазмид в комплексе с положительно заряженными липосомами, обволакивающими отрицательно заряженную ДНК, что способствует ее лучшему проникновению через отрицательно заряженную клеточную мембрану, дает возможность увеличить эффективность трансфекции до 4–5% [38]. Проводимые в последнее время работы по оптимизации переноса плазмиды с помощью включения элементов участка прикрепления к матриксу (MAR, matrix attachment region) [39] и тканеспецифических энхансеров [21, 40], а также стратегия предотвращения преждевременного сайленсинга [49] дают основания надеяться на увеличение и стабилизацию уровня экспрессии трансгенов, доставляе-

мых с помощью плазмидных векторов. Кроме того, плазмидная ДНК не встраивается в геном хозяина и обеспечивает лишь кратковременную (2–4 недели) экспрессию гена, чего зачастую недостаточно для получения терапевтического эффекта. Диаграмма, представленная на рис. 1, иллюстрирует количественное соотношение примеров использования различных видов векторов в генной терапии по данным протоколов клинических испытаний.



The Journal of Gene Medicine, © 2011 John Wiley and Sons Ltd www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Рис. 1. Генные векторы, используемые в клинике (по данным John Wiley and Sons Ltd на 2011 г.)

Векторный таргетинг и системы доставки генов

Клеткам различных тканей и органов присущ уникальный набор расположенных на клеточной поверхности детерминант, что теоретически позволяет обеспечивать точную доставку векторов в клетки определенного типа. На практике в результате сходства иммунофенотипа различных, близких по происхождению типов клеток, с которыми контактирует вектор на пути к цели, высокая степень таргетинга (целенаправленное изменение определенных генов — target-мишень — за счет гомологичной рекомбинации последовательностей, находящихся в хромосоме, с искусственно введенными в клетку последовательностями ДНК) *in vivo* достигается редко. В связи с этим перспективной в плане трансдукции для сердечно-сосудистой ткани является стратегия векторного таргетинга, основанная на любой генетической модификации протеинов векторной поверхности [42] или на прямой химической модификации векторов [43].

Обеспечение транспортировки препарата, содержащего рекомбинантный вектор, к определенной ткани является основной задачей систем доставки генов. Сведение к минимуму контакта между рекомбинантным вектором и биологическими жидкостями до

доставки к месту назначения очень важно для уменьшения разведения вектора и защиты поверхности вектора от неспецифических взаимодействий, наносящих ущерб его эффективности. Кроме того, эффективные системы доставки должны обеспечивать физическую устойчивость вектора в компетентных для трансфекции клеточных структурах целевого сайта, увеличивая тем самым вероятность доставки трансгена в клетки. Системы доставки конструируют таким образом, чтобы обеспечивать возможность включения элементов, облегчающих перенос генов в популяцию клеток-мишеней, модификацией локального экстрацеллюлярного матрикса или увеличением восприимчивости клеток-мишеней к трансдукции чужеродной ДНК [44].

Для использования в генной терапии успешно исследовали несколько стратегий контролируемого высвобождения. Например, при разработке сосудистых стентов в качестве покрытия, пролонгирующего высвобождение, были применены биосовместимые полимерные системы, включающие либо плазмидную ДНК [9, 45], либо вирусные векторы [5], поскольку такие покрытия могут обеспечивать локализованную генную терапию для кровеносных сосудов. Таргетинг рекомбинантных векторов на конкретные ткани или клетки также стал возможным благодаря инкорпорации векторов в полимерные наночастицы и липосомы с модифицированными поверхностями, которые содержат лиганды таргетинга, такие как антитела или рекомбинантные протеины с высоким сродством к биоразлагаемым наночастицам [46]. Кроме того, вирусные векторы, включенные в наночастицы, защищены от атак нейтрализующих антител и могут демонстрировать повышенную проникающую способность, поскольку способны избежать рецепторопосредованного поглощения [46].

Наиболее простой путь миокардиальной доставки гена — прямая инъекция вектора. Однако помимо технической сложности этот подход имеет низкую эффективность, так как трансдуцированные клетки обычно обнаруживаются только по ходу иглы [47]. Кроме того, экспрессия трансгена, как правило, низка из-за быстрого удаления вектора, усугубляемого местной воспалительной реакцией, инициированной повреждением тканей иглой [48]. Для достижения трансдукции миокарда была использована близость к сердечной мышце перикарда [49]. Полость перикарда является естественным

замкнутым резервуаром, который может ограничивать быстрое элиминирование экзогенной ДНК. Однако из-за ограниченной для аденовирусных векторов проницаемости плотной ткани перикарда для достижения в миокарде концентраций экзогенной ДНК, поддающихся обнаружению, необходимо сочетанное с вектором использование коллагеназы и гиалуронидазы [49]. Возможно достижение миокарда посредством региональной циркуляции с помощью селективной катетеризации коронарных сосудов. Интактный эндотелий коронарных артерий представляет существенный барьер для проникновения вектора в миокард, поэтому результаты трансдукции будут субоптимальными, если для увеличения проницаемости эндотелия использовать дополнительные средства: VEGF, гистамин [50] и т. п. Увеличения эффективности коронарной доставки гена можно достичь повышением давления с помощью кратковременной окклюзии оттока крови от сердца дистальнее начала коронарных артерий [51]. Максимальный перенос генов в миокард (трансфекция 78% кардиомиоцитов) был достигнут при одновременной доставке аденовирусных векторов через левую переднюю нисходящую артерию и большую вену сердца [52]. Были разработаны несколько типов конструкций внутрисердечных катетеров, позволяющих вводить 10–100 мкл экзогенной ДНК, и применены для миокардиального переноса генов в моделях на крупных животных. В этих системах обычно наблюдалось улучшение сохранения вектора на сайте доставки по сравнению с трансэпикардиальной инъекцией иглой [53]. Для местной интралюменальной доставки используют двойные баллонные катетеры, имеющие два раздуваемых баллона, которые служат для изоляции сегмента артерии [54]. Суспензию экзогенной рекомбинантной ДНК вводят капельно через замкнутый просвет в отдельный герметично изолированный сегмент артерии. Использование катетера Dispatch, оснащенного спиральными кольцами, позволяет обеспечить движение крови через центральный просвет одновременно с управляемой давлением доставкой вектора через прилегающее пространство вдоль артериальной стенки [55]. Также применяют такие катетерные технологии, как гидрогелевые баллонные катетеры с полимерным гелевым покрытием [56]. Как правило, при использовании гидрогелевых баллонов эффективно трансдуцируются только клетки эндотелия и меди артерии. Единственным типом сосудистого катетера, обес-

печивающим существенную трансдукцию адвентиция и внешнего слоя артерии, является инфильтрационный катетер. Он оснащен комплектом микроигл, которые после раздувания баллона могут разворачиваться и проникать внутрь окружающих слоев артерии. Затем в стенки сосудов через иглы вводится суспензия экзогенной ДНК [57]. Сосудистый адвентиций играет важную роль в развитии атеросклероза, рестеноза и других васкулопролиферативных заболеваний, в основе которых лежит несколько общих ключевых механизмов [58]. С целью влияния на патологические процессы в адвентиции было создано несколько систем доставки, обеспечивающих эффективную транспортировку терапевтических средств в периваскулярные области. Для экранирования ДНК в невирусном векторе разработаны липидные оболочки, разрушаемые кислотой, на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) [59]. При попадании вектора в клетку низкое значение pH способствует гидролизу и разрушению покрытия, при этом высвобождается переносимая экзогенная ДНК. Благодаря тому, что различные ПЭГ-липидные комплексы гидролизуются при различных значениях pH, становится возможным контролировать высвобождение ДНК за счет контроля pH. Для создания периваскулярного депо рекомбинантных векторов, заключенных в гель на основе неионогенных поверхностно-активных веществ, использовалась способность водных растворов сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля (Pluronic F-127, производитель — BASF) к обратимому гелеобразованию при температуре выше 20 °C [60]. Благодаря хорошей растворимости геля в тканевой жидкости высвобождение вектора из геля *in vivo* происходит относительно быстро. Вместе с тем, гель сохраняется на сайте доставки в течение нескольких часов, которых, как правило, достаточно для эффективной трансдукции. Скорость выделения экзогенной ДНК может быть замедлена добавлением в гель метилцеллюлозы [61]. В качестве периваскулярной системы доставки использовали также пропитанные аденовирусными векторами коллагеновые листы, обернутые вокруг поврежденных сонных артерий свиньи, что способствовало значительному увеличению переноса трансгенов в сравнении с контролем [62]. Доставка невирусных и вирусных генных векторов на конкретные сайты может осуществляться с помощью матриц, сформированных из человеческого фибриногена, фибронектина и тромбина [63]. Результаты этих исследо-

ваний можно рассматривать как многообещающие — кроме иммобилизации вектора, фибрин матрицы может способствовать трансфекции клеток-мишеней непосредственно через взаимодействие с интегрином [64].

Удобной платформой для местной сосудистой генной терапии являются стенты. Так, повышение локальной концентрации генных векторов в артерии в случае использования трансгенов, иммобилизованных на поверхности стентов, может быть достигнуто после введения меньших доз по сравнению с концентрацией, полученной с помощью введения не иммобилизованных векторов. Векторная иммобилизация на стенте также минимизирует дистальное распространение рекомбинантных молекул и ограничивает случайную инокуляцию нецелевых тканей. Однако полимерные покрытия стентов могут оказывать воспалительное действие [65]. Для минимизации воспалительной реакции на покрытие стента были использованы гидрофильные покрытия, содержащие фосфорилхолин или полибисфосфонат. Стенты, покрытые фосфорилхолином, оказались эффективными в передаче терапевтических генов. К их недостаткам относится, в частности, высвобождение экзогенной ДНК из покрытия по механизму пассивной элюции [5, 45]. Описана новая полибисфосфонатная модификация поверхности стента, позволяющая осуществлять доставку аденовирусных векторов из платформы стента к конкретным сайтам с использованием для связывания вектора антиаденовирусных антител или рекомбинантного фрагмента рецептора аденовируса Коксаки (CAR) [66]. Сообщалось о синтетических биодеградируемых линкерах, которые могут быть применены для прикрепления вирусных векторов к металлическим стентам. Была продемонстрирована эффективная сайт-специфическая трансдукция артериального субстрата аденовирусными векторами с геном-репортером, иммобилизованными на поверхности металлических стентов с полибисфосфонатными гидролизуемыми линкерами [67]. Поскольку могут быть синтезированы линкеры с заданной и варьирующей в широких пределах продолжительностью гидролиза, скорость высвобождения вектора с поверхности стента можно запрограммировать с учетом желаемых параметров. На модели стентовой ангиопластики сонной артерии крысы показан как высокий уровень экспрессии репортерного гена, так и антирестенозный эффект трансгенов в составе аденовирусных векторов, освобождаемых

с модифицированных полибисфосфонатом металлических стентов. Имобилизация на стентах аденовирусных векторов с геном, кодирующим индуцибельную NO-синтазу, привела к 40%-му снижению образования неинтимы на модели каротидного стентирования у крыс [67]. Все чаще для коронарных и периферических стентов разрабатывают наноструктурные покрытия. В частности, много внимания уделяется розетковидным нанотрубкам, которые способны к самосборке в биологических средах. Установлено, что таким образом можно достичь существенно улучшения эндотелизации металлических поверхностей стентов, обращенных в просвет сосуда [68].

Была исследована возможность кардиоваскулярной доставки генов с помощью магнитных наночастиц — синтетических биодеградируемых частиц субмикронного размера, обладающих магнитной чувствительностью, придаваемой им нанокристаллическим оксидом железа, которые способны доставлять экзогенную ДНК либо заключенной внутри частицы, либо прикрепленной к поверхности магнитной наночастицы [69]. Намагничивающее действие сильного однородного поля, как на магнитные наночастицы, так и на стальные стенты, позволяет управлять доставкой магнитных наночастиц к стентированному артериальному сегменту и может стать основой для разработки нового подхода к направленному лечению стенового рестеноза. На модели каротидного стентирования у крыс была продемонстрирована эффективность магнитной целевой доставки наночастиц вместе с аденовирусами, содержащими ген, кодирующий индуцибельную NO-синтазу, на 304 стента из нержавеющей стали [70].

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и упакованных определенным образом последовательностей ДНК в конкретные ткани или в системный кровоток больного. При терапии *ex vivo* специфические типы клеток выделяют из организма и культивируют, затем в них вводят чужеродные терапевтические гены, отбирают трансформированные клеточные клоны и вводят их тому же человеку. В качестве клеток-мишеней при этом используют клетки, способные к последующему делению (стволовые клетки костного мозга и т. п.). Это направление получило название клеточной генной терапии.

Трансплантация крысам с экспериментальным инфарктом миокарда (ИМ) клеток CD34⁺, трансфецированных плазмидой, которая несет ген, кодирующий VEGF-2, вы-

зывала выход эндотелиальных клеток-предшественников из костного мозга и улучшала васкуляризацию инфарктированного участка. При этом продукт функционирования гена способствовал выживанию самих клеток, подавляя каспазный путь апоптоза [71]. Трансфецированные аденовирусным вектором с *MyoD* фибробласты при введении их после экспериментального ИМ в зону грануляционной ткани приобретали фенотип клеток скелетной мышцы (рис. 2) [72]. Человеческие мезенхимальные стволовые клетки (МСК), трансфецированные рекомбинантным аденовирусом, содержащим ген *MyoD*, становились позитивными в отношении *MyoD*, десмина, саркомерического миозина, тропонина I и α -актинина. Присутствие α -актинина свидетельствовало о возникновении связей между саркомерами, однако при этом не было обнаружено маркерного протеина — коннексина 43. Новые клетки имели удлиненную форму, среди них встречались многоядерные, они реагировали со специфическими антителами медленной изоформы человеческого миозина, но не реагировали с быстрой изоформой. Таким образом, МСК под влиянием экспрессии экзогенного гена *MyoD* могут дифференцироваться в фенотип поперечно-полосатой мышцы. Экспрессия гена медленной изоформы тяжелой цепи миозина может свидетельствовать о способности новообразованных клеток выполнять функции кардиомиоцитов [73]. Однако клетки с одним экспрессированным геном, который в норме активен только у дифференцированных кардиомиоцитов, нельзя считать их полноценной заменой. Перспективной считают трансплантацию клеток, трансфецированных генетическими конструкциями, которые обеспечивают синтез веществ, регулирующих функцию миокарда.

Отсутствие достаточно большого клинического опыта генной терапии сердечно-сосудистых патологий не позволяет делать определенные выводы относительно преимуществ и недостатков различных векторов и систем доставки, которые были адаптированы к конкретным клиническим ситуациям.

Перспективы клинического применения генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний

На сегодняшний день генная терапия признана перспективным направлением в терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Определено много потенциальных терапевтических генов, использование которых в роли молекул-мишеней для генной те-

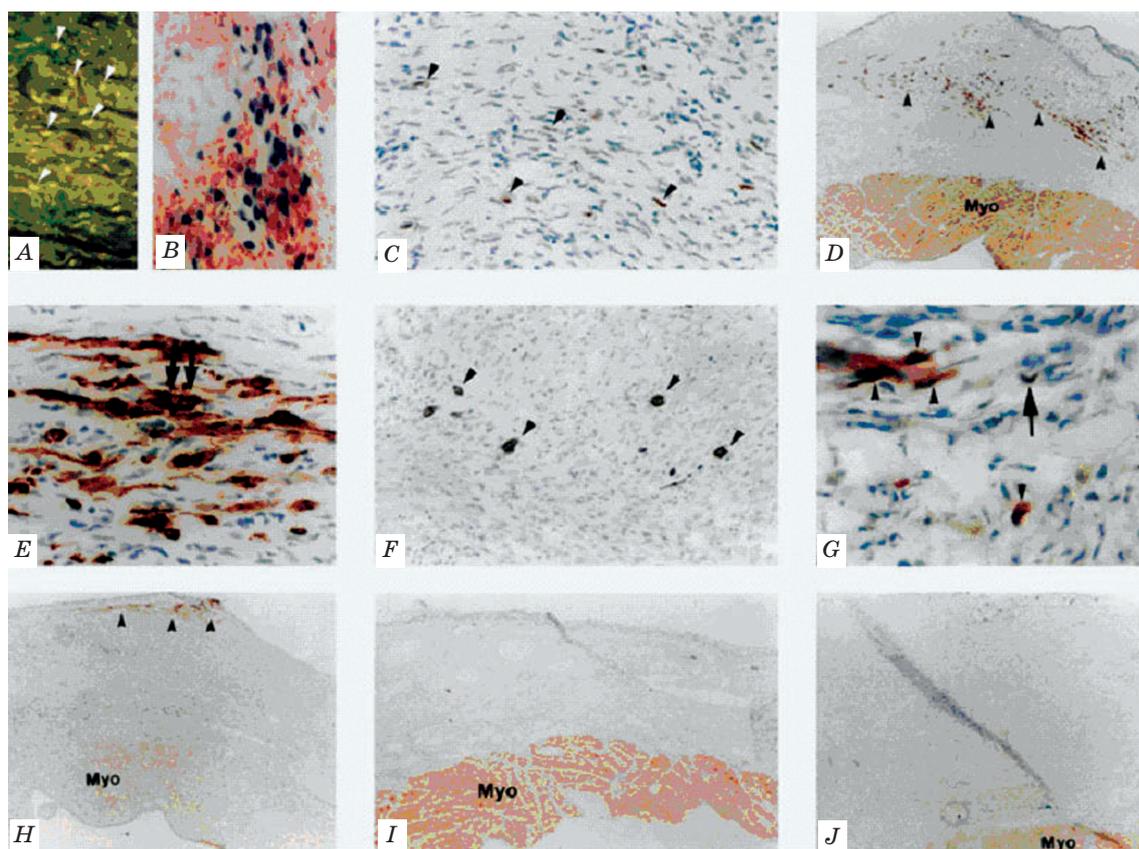


Рис. 2. Фибробласты, трансфицированные аденовирусным вектором с геном *MyoD*,

при введении их в зону грануляционной ткани после экспериментального ИМ:

A — иммунофлуоресцентная метка указывает на локализацию протеина *MyoD* в грануляционной ткани через 2 нед после повреждения миокарда. Ген *MyoD* в составе вирусного вектора вводили через 1 нед после травмы. Присутствуют многочисленные тонкостенные сосуды, содержащие эритроциты. $\times 400$;

B — гистохимия β -галактозидазы в грануляционной ткани сердца, получавшего контрольную аденовирусную ДНК с бактериальным геном β -галактозидазы. Для многочисленных клеток в грануляционной ткани характерно синее окрашивание ядер. $\times 430$;

C — иммунопероксидазное окрашивание миогенина в криповрежденном сердце, обработанном 10^{10} бляшкообразующих единиц аденовируса с геном *MyoD* через 1 нед после повреждения. $\times 450$;

D — миогенная дифференцировка в поврежденном сердце, полученная воздействием 10^{10} бляшкообразующих единиц аденовирусных частиц, содержащих ген *MyoD*. Неповрежденный миокард (*Myo*) виден в нижней части снимка благодаря перекрестной реакции антител. В поврежденной области — наибольшее число клеток, содержащих тяжелые цепи миозина. $\times 90$;

E — более сильное увеличение участков с окрашенными тяжелыми цепями миозина из **D** позволяет продемонстрировать удлиненные веретенообразные клетки. Стрелки указывают на два ядра, которые могут быть расположены в пределах одной клетки. $\times 450$;

F — окрашивание тяжелых цепей миозина сердца эмбрионального происхождения с относительно небольшим числом миофибр в пораженной области. $\times 225$;

G — двойное окрашивание миогенина и тяжелых цепей миозина эмбрионального происхождения. Миогенин — положительные клетки, в которых не окрашиваются тяжелые цепи миозина эмбрионального происхождения. $\times 1100$;

H — окрашивание с антителами взрослых быстрых тяжелых цепей миозина в том же сердце, что и на **D**. Лишь редкие клетки, обработанные ДНК с трансгеном *MyoD*, окрашены, и это свидетельствует, что большинство новых миофибр относится к эмбриональному фенотипу. $\times 90$;

I — окрашивание сердечных тяжелых цепей миозина в том же сердце, что и на **D**. Криповрежденный миокард (*Myo*), меченный антителами. В верхней части рисунка в поврежденной области нет меченых клеток, т. е. они не являются остаточными кардиомиоцитами. $\times 90$;

J — окрашивание эмбриональных тяжелых цепей миозина эмбрионального происхождения в контрольном сердце, титр вируса с геном β -галактозидазы 10^{10} бляшкообразующих единиц. Ни одна из клеток в поврежденной области не окрашивается, следовательно, экспрессия эмбриональных тяжелых цепей миозина эмбрионального происхождения имеет свою специфику при обработке экзогенной ДНК с геном *MyoD*. $\times 90$ (по данным [72])

рапии сердечно-сосудистых заболеваний является весьма многообещающим.

На разных экспериментальных моделях артериальной гипертензии продемонстрирован лечебный эффект генов, отвечающих за экспрессию предсердного натрийуретического гормона [73], эндотелиальной NO-синтазы [74] и калликрина [75, 76] при их внутривенном введении в составе плазмидных векторов. На модели экспериментального атеросклероза у животных также была убедительно продемонстрирована эффективность таргетной генной терапии. Показано, что блокирование пролиферации гладкомышечных клеток сосудистых аллотрансплантатов введением в них *ex vivo* антисмысловой ДНК с высоким сродством к фактору транскрипции E2F снижает риск развития атеросклероза трансплантата и улучшает функцию сосудистого эндотелия даже у кроликов, находящихся на атерогенной диете [77]. Однако сообщений об успешном использовании генной терапии атеросклероза в клинике пока нет.

Основной целью генной терапии ИМ является стимуляция ангиогенеза и ограничение зоны рубца. В экспериментах на животных и в клинике используют генные конструкции, кодирующие VEGF — гликопротеин, связывающийся только с эндотелиальными клетками и стимулирующий их пролиферацию, рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF-R), а также конструкции с последовательностями, вызывающими снижение экспрессии трансформирующего ростового фактора P (Transforming Growth Factor P, TGFp), который стимулирует формирование рубца. Исследовали возможность использования «голой» плазмидной ДНК с геном, кодирующим VEGF, для воздействия непосредственно на миокард путем инъекций через мини-торакаотомию. Был продемонстрирован терапевтический эффект при введении такой конструкции на пациентах со стабильной стенокардией. Наблюдаемое облегчение симптомов рассматривалось как свидетельство того, что экспрессия введенных генов достигла значительного уровня. Однако в данном исследовании использовалось недостаточно большое количество пациентов (пять) и отсутствовала контрольная группа (плацебо) [78]. Последующие аналогичные исследования проводили уже на большем числе пациентов. Так, на 30 пациентах с рефрактерной стенокардией был продемонстрирован терапевтический эффект введения путем торакаотомии гена VEGF в составе плазмидной ДНК, сохраняющийся до 6 [79] и даже до 24 месяцев [80]. Незначительное число пациентов и от-

сутствие контрольной группы (плацебо) ограничивает важность полученных данных. На основании многообещающих результатов терапии с использованием рекомбинантного фактора роста фибробластов (FGF) была исследована возможность и эффективность аденовирусной доставки гена FGF [81]. В данном многоцентровом двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании, охватившем 79 больных стенокардией, применяли миокардиальную доставку рекомбинантной конструкции Ad5-FGF4 с помощью катетеров. Хотя результаты теста на тредмилле и были выше исходных показателей, достоверных отличий показателей пациентов опытной группы от плацебо-контроля не наблюдали. Вместе с тем были получены доказательства безопасности этого средства: вектор не был выявлен с помощью ПЦР в моче и в половых клетках, не наблюдалось ретинопатии, ангиомы или миокардита.

Рандомизированное контролируемое исследование на человеческих сосудистых трансплантатах показало, что введение в сосуды *ex vivo* цис-элементов синтетической двухцепочечной ДНК с высоким сродством к фактору транскрипции E2F (средняя эффективность трансфекции — 89%) может блокировать пролиферацию клеток на 70–74%. У пациентов опытной группы к 30-му дню окклюзия трансплантата происходила значительно реже, чем у пациентов контрольной группы (11,8 и 25% соответственно) [82]. Результаты многоцентрового рандомизированного плацебо-контролируемого исследования 3014 пациентов, подвергшихся операции аортокоронарного шунтирования, показали, что в группе пациентов, венозные трансплантаты которых *in situ* были трансдуцированы эдифолигидом (приманочной ДНК к E2F), наблюдалось статистически значимое улучшение проходистости трансплантатов по сравнению с группой плацебо (83% против 78%, соответственно) [83].

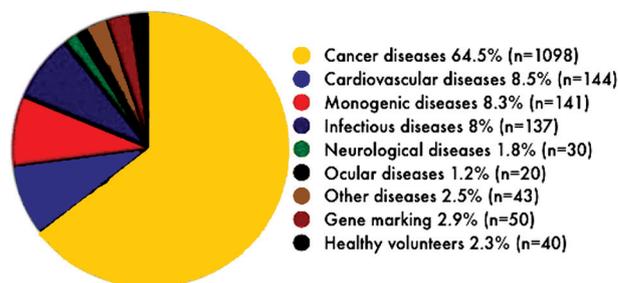
Проводились исследования по применению генной терапии для стимулирования ангиогенеза у пациентов с заболеваниями периферических сосудов. Была продемонстрирована эффективность терапевтического ангиогенеза с использованием переноса генов VEGF у пациента с критической ишемией конечностей [84]. В описанном случае использовали внутримышечные инъекции плазмидных векторов, содержащих ген, кодирующий VEGF₁₆₅. Хотя в этом испытании участвовало небольшое количество пациентов и не было контроля плацебо, оно продемонстрировало переносимость данного сред-

ства и его перспективную клиническую эффективность при лечении заболеваний периферических артерий. Обнадешивающие результаты были также получены на первом этапе клинических испытаний применения плазмидной ДНК, кодирующей VEGF₁₆₅, у пациентов с тяжелой хронической болезнью периферических сосудов. Инъекции хорошо переносились, и было показано повышенное образование коллатералей сосудов вокруг места инъекций. Такие симптомы, как ишемическая боль и ишемические язвы в пораженной конечности, исчезли или заметно уменьшились у значительного числа больных, но и в этих исследованиях также отсутствовала группа плацебо-контроля. Исследование эффективности использования аденовирусных векторов, содержащих ген VEGF₁₂₁, дало аналогичные результаты. Внутримышечное введение AdVEGF_{121.10} пяти пациентам с тяжелыми заболеваниями периферических сосудов способствовало улучшению функции эндотелия и усилению кровотока в нижних конечностях [85].

Эффекты введения различных генов были изучены на моделях экспериментального рестеноза сонных, бедренных и коронарных артерий у крысы, кролика и мини-свиней [86]. В клинике была предпринята попытка использовать при стентировании сосудов антирестенозный эффект VEGF, который обусловлен его способностью стимулировать синтез NO и простаглицина, препятствующих миграции и пролиферации сосудистых гладкомышечных клеток. Проведено двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование на 113 пациентах, в котором сравнивали эффекты доставки гена VEGF посредством плазмидного вектора и трансфекции сосудистых клеток аденовирусным вектором. Через 6 мес наблюдения с использованием ангиографии не было выявлено разницы в диаметре просвета стента, хотя был отмечен низкий общий уровень рестеноза (6%). Также следует отметить повышение перфузии миокарда на 6-м месяце после введения AdVEGF. Это может быть связано с более длительной экспрессией VEGF посредством аденовирусного вектора и с его более мощным действием на ангиогенез, чем на индукцию NO [87].

Таким образом, терапевтический перенос генов в сердечно-сосудистую систему представляет значительный научный интерес в качестве потенциального метода лечения для пациентов, у которых обычные терапевтические подходы оказались не эффективными.

По количеству зарегистрированных протоколов клинических испытаний по генной терапии во всем мире генная терапия сердечно-сосудистых заболеваний занимает второе место (рис. 3) [24].



The Journal of Gene Medicine, © 2011 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Рис. 3. Основные направления клинического применения генной терапии

Однако, несмотря на значительные усилия, прогресс в генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний остается довольно скромным, в основном из-за неспособности обеспечить доставку в определенное место трансгена в адекватной терапевтической дозе. В связи с этим актуальными являются поиск потенциальных терапевтических генов для экспрессии в клетках сосудов и миокарда и выбор не обладающих побочными эффектами векторных систем, способных обеспечить эффективное влияние на экспрессию этих генов, а также разработка механических средств, дающих возможность как можно менее травматичной доставки вектора к клеткам-мишеням и предотвращающих попадание генетического материала в системный кровоток.

Примерами методов, которые могут быть эффективны в клинике, являются системы доставки, использующие иммобилизованные рекомбинантные векторы и индуцированные магнитные поля для целевой доставки векторов к намагничивающимся имплантатам (например, к эндоваскулярным стальным стентам).

В последнее время возрос интерес к использованию адресной доставки стволовых клеток и клеток-предшественников для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Такой метод дает возможность использования в качестве имплантируемого материала аутологических клеток, которые могут трансдуцироваться *in situ* скаффолд-иммобилизованными экзогенными векторами [88]. Согласно данной концепции, дальнейший прогресс в области генной терапии может быть достигнут в результате объединения методов доставки трансгенов и тканевой инженерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Burton D. Y., Song C., Fishbein I. et al.* The incorporation of an ion channel gene mutation associated with the long QT syndrome (Q9E-hMiRP1) in a plasmid vector for site-specific arrhythmia gene therapy: *In vitro* and *in vivo* feasibility studies // *Hum. Gene Ther.* — 2003. — V. 14, N 9. — P. 907–922.
2. *Ahmet I., Sawa Y., Iwata K., Matsuda H.* Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates cardiac remodeling in the canine heart: A novel gene therapy for cardiomyopathy // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2002. — V. 124, N 5. — P. 957–963.
3. *Mi Y. F., Li X. Y., Tang L. J. et al.* Improvement in cardiac function after sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer in a beagle heart failure model // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 2009. — V. 122, N. 12. — P. 1423–1428.
4. *Daniel S., Patel V. I., Shrikhande G. V. et al.* The universal NF-kappaB inhibitor a20 protects from transplant vasculopathy by differentially affecting apoptosis in endothelial and smooth muscle cells // *Transplant. Proc.* — 2006. — V. 38, N 10. — P. 3225–3227.
5. *Johnson T. W., Wu Y. X., Herdeg C. et al.* Stent-based delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 adenovirus inhibits neointimal formation in porcine coronary arteries // *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — V. 25, N 4. — P. 754–759.
6. *Sanz-Gonzalez S. M., Barquin L., Garcia-Cao I. et al.* Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis // *Cardiovasc. Res.* — 2007. — V. 75, N 4. — P. 803–812.
7. *Tatewaki H., Egashira K., Kimura S. et al.* Blockade of monocyte chemoattractant protein-1 by adenoviral gene transfer inhibits experimental vein graft neointimal formation // *J. Vasc. Surg.* — 2007. — V. 45, N 6. — P. 1236–1243.
8. *Laatikainen L. E., Incoronato M., Castellone M. D. et al.* SOD3 decreases ischemic injury derived apoptosis through phosphorylation of Erk1/2, Akt, and FoxO3a // *PLoS One.* — 2011. — V. 6, N 8. — P. 24456.
9. *Hiltunen M. O., Laitinen M., Turunen M. P. et al.* Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta // *Circulation.* — 2000. — V. 102, N 18. — P. 2262–2268.
10. *Cooney R., Hynes S. O., Sharif F. et al.* Effect of gene delivery of NOS isoforms on intimal hyperplasia and endothelial regeneration after balloon injury // *Gene Ther.* — 2007. — V. 14, N 5. — P. 396–404.
11. *Banai S., Jaklitsch M. T., Shou M., et al.* Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs // *Circulation.* — 1994. — V. 89, N 5. — P. 2183–2189.
12. *Takeshita S., Tsurumi Y., Couffinahl T. et al.* Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development *in vivo* // *Lab. Invest.* — 1996. — V. 75, N 4. — P. 487–501.
13. *Guzman R. J., Hirschowitz E. A., Brody S. L. et al.* In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — V. 91, N 22. — P. 10732–10736.
14. *Chang M. W., Barr E., Seltzer J. et al.* Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product // *Science.* — 1995. — V. 267. — P. 518–522.
15. *Chang M. W., Barr E., Lu M. M. et al.* Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty // *J. Clin. Invest.* — 1995. — V. 96. — P. 2260–2268.
16. *Smith R., Branellec D., Gorski D. et al.* p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the gax homeodomain gene // *Genes Dev.* — 1997. — N 11. — P. 1674–1689.
17. *Morishita R., Gibbons G. H., Ellison K. E. et al.* Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1993. — V. 90, N 18. — P. 8474–8478.
18. *Cheng L., Mantile G., Pauly R. et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness *in vitro* and modulates neointimal development *in vivo* // *Circulation.* — 1998. — V. 98, N 20. — P. 2195–2201.
19. *Fibbi G., Caldini R., Chevanne M. et al.* Urokinase-dependent angiogenesis *in vitro* and diacylglycerol production are blocked by antisense oligonucleotides against the urokinase receptor // *Lab. Invest.* — 1998. — V. 78, N 9. — P. 1109–1119.
20. *Akyurek L. M., Yang Z. Y., Aoki K. et al.* SM22 α promoter targets gene expression to vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo* // *Mol. Med.* — 2000. — V. 6, N 11. — P. 983–991.

21. Appleby C. E., Kingston P. A., David A. et al. A novel combination of promoter and enhancers increases transgene expression in vascular smooth muscle cells *in vitro* and coronary arteries *in vivo* after adenovirus-mediated gene transfer // Gene Ther. — 2003. — V. 10, N 18. — P. 1616–1622.
22. Gordon E. M., Zhu N. L., Forney Prescott M. et al. Lesion-targeted injectable vectors for vascular restenosis // Hum. Gene Ther. — 2001. — V. 12, N 10. — P. 1277–1287.
23. Zhao J., Pettigrew G. J., Thomas J. Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo* // Basic. Res. Cardiol. — 2002. — V. 97, N 5. — P. 348–358.
24. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide // The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site John Wiley & Sons Inc; Hoboken, NJ, USA. — 2011.
25. Wright M. J., Wightman L. M., Latchman D. S., Marber M. S. *In vivo* myocardial gene transfer: Optimization and evaluation of intracoronary gene delivery *in vivo* // Gene Ther. — 2001. — V. 8, N 24. — P. 1833–1839.
26. Fishbein I., Chorny M., Levy R. J. Site-specific gene therapy for cardiovascular disease // Curr. Opin. Drug. Discov. Devel. — 2010. — V. 13, N 2. — P. 203–213.
27. Bangari D. S., Mittal S. K. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity // Curr. Gene Ther. — 2006. — V. 6, N 2. — P. 215–226.
28. Palmer D. J., Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy // Hum. Gene Ther. — 2005. — V. 16, N 1. — P. 1–16.
29. Fleury S., Driscoll R., Simeoni E. et al. Helper-dependent adenovirus vectors devoid of all viral genes cause less myocardial inflammation compared with first-generation adenovirus vectors // Basic. Res. Cardiol. — 2004. — V. 99, N 4. — P. 247–256.
30. Bish L. T., Sleeper M. M., Brainard B. et al. Percutaneous transendocardial delivery of self-complementary adeno-associated virus 6 achieves global cardiac gene transfer in canines // Mol. Ther. — 2008. — V. 16, N 12. — P. 1953–1959.
31. Dandapat A., Hu C. P., Li D. et al. Overexpression of TGF β 1 by adeno-associated virus type-2 vector protects myocardium from ischemia-reperfusion injury // Gene Ther. — 2008. — V. 15, N 6. — P. 415–423.
32. Zhong L., Li B., Mah C. S. et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: Point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — V. 105, N 22. — P. 7827–7832.
33. Kupatt C., Wichels R., Deiss M. et al. Retroinfusion of NF κ B decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs // Gene Ther. — 2002. — V. 9, N 8. — P. 518–526.
34. Li Y., Fukuda N., Kunitomo S. et al. Stent-based delivery of antisense oligodeoxynucleotides targeted to the PDGF A-chain decreases in-stent restenosis of the coronary artery // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 2006. — V. 48, N 4. — P. 184–190.
35. Dosenko V. E., Nagibin V. S., Tumanovskaya L. V. et al. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, preconditioning and ostconditioning of isolated cardiomyocytes // Pathophysiology. — 2006. — V. 13, N 2. — P. 119–125.
36. Lisovyy O. O., Dosenko V. E., Nagibin V. S. et al. Cardioprotective effect of 5-lipoxygenase gene (*ALOX5*) silencing in ischemia-reperfusion // Acta Biochim. Polon. — 2009. — V. 56, N 4. — P. 687–694.
37. Кириченко В. О., Нагібін В. С., Тумановська Л. В. та ін. Наслідки РНК-інтерференції генів убіквітину та протеасомної субодиниці β 7 у культивованих кардіоміоцитах // Biopolymers and Cell. — 2010. — V. 26, N 2. — P. 153–159.
38. Sarkar N., Blomberg P., Wardell E. et al. Nonsurgical direct delivery of plasmid DNA into rat heart: Time course, dose response, and the influence of different promoters on gene expression // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 2002. — V. 39, N 2. — P. 215–224.
39. Argyros O., Wong S. P., Niceta M. et al. Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector // Gene Ther. — 2008. — V. 15, N 24. — P. 1593–1605.
40. Papadakis E. D., Nicklin S. A., Baker A. H., White S. J. Promoters and control elements: Designing expression cassettes for gene therapy // Curr. Gene Ther. — 2004. — V. 4, N 1. — P. 89–113.
41. Hyde S. C., Pringle I. A., Abdullah S. et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression // Nat. Biotechnol. — 2008 — V. 26, N 5. — P. 549–551.
42. Noureddini S. C., Curiel D. T. Genetic targeting strategies for adenovirus // Mol. Pharm. — 2005. — V. 2, N 5. — P. 341–347.
43. Kreppel F., Kochanek S. Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: A scientific review and technical guide // Mol. Ther. — 2008. — V. 16, N 1. — P. 16–29.

44. *Perlstein I., Connolly J. M., Cui X. et al.* DNA delivery from an intravascular stent with a denatured collagen-poly(lactic-polyglycolic acid)-controlled release coating: Mechanisms of enhanced transfection // *Gene Ther.* — 2003. — V. 10, N 17. — P. 1420–1428.
45. *Walter D. H., Cejna M., Diaz-Sandoval L. et al.* Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents. An alternative strategy for inhibition of restenosis // *Circulation.* — 2004. — V. 110, N 1. — P. 36–45.
46. *Chorny M., Fishbein I., Alferiev I. S. et al.* Adenoviral gene vector tethering to nanoparticle surfaces results in receptor-independent cell entry and increased transgene expression // *Mol. Ther.* — 2006. — V. 14, N 3. — P. 382–391.
47. *French B. A., Mazur W., Geske R. S., Bolli R.* Direct *in vivo* gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors // *Circulation.* — 1994. — V. 90, N 5. — P. 2414–2424.
48. *Li J. J., Ueno H., Pan Y. et al.* Percutaneous transluminal gene transfer into canine myocardium *in vivo* by replication-defective adenovirus // *Cardiovasc. Res.* — 1995. — V. 30, N 1. — P. 97–105.
49. *Fromes Y., Salmon A., Wang X. et al.* Gene delivery to the myocardium by intrapericardial injection // *Gene Ther.* — 1999. — V. 6, N 4. — P. 683–688.
50. *Logeart D., Hatem S. N., Heimbürger M. et al.* How to optimize *in vivo* gene transfer to cardiac myocytes: Mechanical or pharmacological procedures? // *Hum. Gene Ther.* — 2001. — V. 12, N 13. — P. 1601–1610.
51. *Hajjar R. J., Schmidt U., Matsui T. et al.* Modulation of ventricular function through gene transfer *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — V. 95, N 9. — P. 5251–5256.
52. *Sasano T., Kikuchi K., McDonald A. D. et al.* Targeted high-efficiency, homogeneous myocardial gene transfer // *J. Mol. Cell Cardiol.* — 2007. — V. 42, N 5. — P. 954–961.
53. *Grossman P. M., Han Z., Palasis M. et al.* Incomplete retention after direct myocardial injection // *Catheter. Cardiovasc. Interv.* — 2002. — V. 55, N 3. — P. 392–397.
54. *Thompson M. M., Budd J. S., Eady S. L. et al.* A method to transluminally seed angioplasty sites with endothelial cells using a double balloon catheter // *Eur. J. Vasc. Surg.* — 1993. — V. 7, N 2. — P. 113–121.
55. *Tahlil O., Brami M., Feldman L. J. et al.* The Dispatch catheter as a delivery tool for arterial gene transfer // *Cardiovasc. Res.* — 1997. — V. 33, N 1. — P. 181–187.
56. *Riessen R., Rahimizadeh H., Blessing E. et al.* Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon // *Hum. Gene Ther.* — 1993. — V. 4, N 6. — P. 749–758.
57. *Barath P., Popov A., Dillehay G. L. et al.* Infiltrator angioplasty balloon catheter: A device for combined angioplasty and intramural site-specific treatment // *Cathet. Cardiovasc. Diagn.* — 1997. — V. 41, N 3. — P. 333–341.
58. *Maiellaro K., Taylor W. R.* The role of the adventitia in vascular inflammation // *Cardiovasc. Res.* — 2007. — V. 75, N 4. — P. 640–648.
59. *Wong J. B., Grosse S., Tabor A. B. et al.* Acid cleavable PEG-lipids for applications in a ternary gene delivery vector // *Mol. Biosyst.* — 2008. — V. 4, N 6. — P. 532–541.
60. *Villa A. E., Guzman L. A., Poptic E. J. et al.* Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury // *Circ. Res.* — 1995. — V. 76, N 4. — P. 505–513.
61. *Desai S. D., Blanchard J.* Evaluation of Pluronic F127-based sustained-release ocular delivery systems for pilocarpine using the albino rabbit eye model // *J. Pharm. Sci.* — 1998. — V. 87, N 10. — P. 1190–1195.
62. *Pakkanen T. M., Laitinen M., Hippeläinen M. et al.* Periadventitial lacZ gene transfer to pig carotid arteries using a biodegradable collagen collar or a wrap of collagen sheet with adenoviruses and plasmid-liposome complexes // *J. Gene. Med.* — 2000. — V. 2, N 1. — P. 52–60.
63. *Wan L., Li D., Wu Q.* Perivenous application of fibrin glue as external support enhanced adventitial adenovirus transfection in rabbit model // *J. Surg. Res.* — 2006. — V. 135, N 2. — P. 312–316.
64. *Lei P., Padmashali R. M., Andreadis S. T.* Cell-controlled and spatially arrayed gene delivery from fibrin hydrogels // *Biomaterials.* — 2009. — V. 30, N 22. — P. 3790–3799.
65. *Van der Giessen W. J., Lincoff A. M., Schwartz R. S.* Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and non-biodegradable polymers in porcine coronary arteries // *Circulation.* — 1996. — V. 94, N 7. — P. 1690–1716.
66. *Fishbein I., Alferiev I. S., Nyanguile O. et al.* Bisphosphonate-mediated gene vector delivery from the metal surfaces of stents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — V. 103, N 1. — P. 159–164.
67. *Fishbein I., Alferiev I., Bakay M. et al.* Local delivery of gene vectors from bare-metal stents by use of a biodegradable synthetic complex inhibits in-stent restenosis in rat carotid arteries // *Circulation.* — 2008. — V. 117, N 16. — P. 2096–2103.
68. *Fine E., Zhang L., Fenniri H., Webster T. J.* Enhanced endothelial cell functions on rosette nanotube-coated titanium vascular stents // *Int. J. Nanomedicine.* — 2009. — V. 4. — P. 91–97.
69. *McBain S. C., Yiu H. H., Dobson J.* Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery //

- Int. J. Nanomedicine. — 2008. — V. 3, N 2. — P. 169–180.
70. Polyak B., Fishbein I., Chorny M. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — V. 105, N 2. — P. 698–703.
71. Shintani S., Kusano K., Li M., Iwakura A., et al. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34+ cells and VEGF2 gene therapy after MI // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. — 2006. — N 3 (Suppl. 1). — P. 123–128.
72. Toma C., Pittenger M. F., Cahill K. S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // Circulation. — 2002. — V. 105, N 1. — P. 93–98.
73. Lin K. F., Chao J., Chao L. Human atrial natriuretic peptide gene delivery reduced blood pressure in hypertensive rats // Hypertension. — 1995. — V. 26. — P. 847–853.
74. Lin K. F., Chao L., Chao J. Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery // Ibid. — 1997. — V. 30. — P. 307–313.
75. Wang C., Chao L., Chao J. Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats // J. Clin. Invest. — 1995. — V. 95, N 4. — P. 1710–1716.
76. Yayama K., Wang C., Chao L., Chao J. Kallikrein gene delivery attenuates hypertension and cardiac hypertrophy and enhances renal function in Goldblatt hypertensive rats // Hypertension. — 1998. — V. 31, N 5. — P. 1104–1110.
77. Mann M. J., Gibbons G. H., Kernoff R. S. et al. Genetic engineering of vein grafts resistant to atherosclerosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — V. 92, N 10. — P. 4502–4506.
78. Leberer C., Gao G., Louboutin J. P. et al. Gene therapy with novel adeno-associated virus vector substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia // J. Gen. Med. — 2004. — V. 6, N 6. — P. 663–674.
79. Losordo D. W., Vale P. R., Hendel R. C. et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia // Circulation. — 2002. — V. 105, N 17. — P. 2012–2018.
80. Fortuin F. D., Vale P., Losordo D. W. et al. One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients // Am. J. Cardiol. — 2003. — V. 92, N 4. — P. 436–439.
81. Reilly J. P., Grise M. A., Fortuin F. D. et al. Long-term (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients // J. Interv. Cardiol. — 2005. — V. 18, N 1. — P. 27–31.
82. Grines C. L., Watkins M. W., Helmer G. et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris // Circulation. — 2002. — V. 105, N 11. — P. 1291–1297.
83. Mann M. J., Whittemore A. D., Donaldson M. C. et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial // Lancet. — 1999. — V. 354, N 9189. — P. 1493–1498.
84. Conte M. S., Bandyk D. F., Clowes A. W. et al. Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery // J. Vasc. Surg. — 2006. — V. 43, N 4. — P. 742–751.
85. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia // Circulation. — 1998. — V. 97, N 12. — P. 1114–1123.
86. Morishita R., Aoki M., Hashiya N. et al. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease // Hypertension. — 2004. — V. 44, N 2. — P. 203–209.
87. Sanghong Baek, Keith L. March. Gene Therapy for Restenosis. Getting Nearer the Heart of the Matter // Circulation Research. — 1998. — V. 82, N 3. — P. 295–305.
88. Hedman M., Hartikainen J., Syvanne M. et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). // Circulation. — 2003. — V. 107, N 21. — P. 2677–2683.

**ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ
ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ В ЛІКУВАННІ
СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

*О. К. Гулевський
О. С. Абакумова
І. Й. Щенявський*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: ivanou@rambler.ru

В огляді розглянуто можливості генної терапії серцево-судинних захворювань. Подано інформацію про генні конструкції, експресія яких може зумовлювати терапевтичні ефекти, що доцільно використовувати в лікуванні різної патології серця та судин. Описано використовувани в генній терапії серцево-судинних захворювань вірусні та плазмідні вектори, а також сучасні системи доставлення терапевтичних трансгенів до цільових тканин. Проаналізовано результати експериментальних та клінічних досліджень з генної терапії, спрямованих на пошук нових стратегій лікування серцево-судинних захворювань або перенесенням трансгенів у складі рекомбінантних конструкцій, що кодують певні протеїни, або модуляцією рівня експресії відповідних генів у клітинах судин і міокарда.

Ключові слова: серцево-судинні захворювання, генна терапія, генетичні конструкції, рекомбінантні вектори, векторний таргетинг, системи доставлення трансгенів.

**PROSPECTS OF GENE THERAPY
FOR THE TREATMENT
OF CARDIOVASCULAR DISEASES**

*A. K. Gulevsky
Ye. S. Abakumova
I. I. Schenyavsky*

Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv

E-mail: ivanou@rambler.ru

In the review possibilities of gene therapy of cardiovascular diseases are discussed. The information on gene structures, expression of which can exert therapeutic effects is given. These effects can be used in the treatment of various heart and blood vessels pathologies. The viral and plasmid vectors as well as modern delivery systems of therapeutic transgenes to the target tissues which are used in cardiovascular disease gene therapy are described. The results of experimental and clinical studies of gene therapy aimed to finding new cardiovascular disease treatment strategies either by transfer of transgenes encoding certain proteins in recombinant constructions or by modulation of expression of corresponding genes in vessel and myocardium cells are analyzed.

Key words: cardiovascular diseases, gene therapy, genetic constructions, recombinant vectors, vector targeting, transgenic delivery systems.