

стороны, удается избежать ограничений генной терапии — низкой эффективности трансфекции *in vivo*, которая при использовании наиболее безопасного плазмидного вектора не превышает 1% клеток ткани, а также иммунных реакций на вирусные белки в случае использования аденовирусных векторов. Клетки можно трансфецировать (трансдуцировать) *in vitro*, нарастить нужное количество для последующего введения в организм, измерить количество секретируемого терапевтического белка — продукта трансгена. Это дает возможность относительно более точно, чем при прямой генной терапии, дозировать лечебный эффект, определять количество вводимых клеток и количество производимого ими терапевтического фактора. Кроме того, генетическая модификация клеток позволяет в ряде случаев повысить их жизнеспособность при введении в поврежденные ишемизированные ткани или же усилить их способность к хоумингу в участки повреждения.

В данном обзоре рассматриваются основные экспериментальные работы по использованию генетически модифицированных клеток и возможные области и перспективы их использования для лечения больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Генная и клеточная терапия при ишемической болезни сердца и ишемии нижних конечностей

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является основной причиной смерти взрослого населения в развитых странах. Несмотря на наличие эффективных методов лечения, у 5–10% (по некоторым данным — до 30%) больных ИБС не удается адекватно контролировать заболевание (так называемая рефрактерная ИБС). При тяжелом распространенном поражении коронарного русла реваскуляризация имеет преимущество перед консервативным лечением (по влиянию на отдаленный прогноз и качество жизни), однако у таких больных традиционные вмешательства на коронарных артериях (коронарная ангиопластика и коронарное шунтирование) далеко не всегда обеспечивают полноценную реваскуляризацию миокарда, либо же вообще невыполнимы. Нередко положительный эффект этих вмешательств оказывается временным, и по мере прогрессирования коронарного атеросклероза состояние больного вновь ухудшается. У большинства таких больных медикаментозная терапия недостаточно эффективна, качество жизни остается низким, а риск сердечно-сосудистых осложнений — высоким.

Клинически выраженный периферический атеросклероз (с перемежающейся хромотой) встречается у 2–3% мужчин и 1–2% женщин старше 60 лет, а бессимптомный периферический атеросклероз (снижение лодыжечно-плечевого индекса до 0,9 и ниже при отсутствии жалоб) — в 3–4 раза чаще. Доля пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИНК), определяющейся как острая или хроническая ишемическая боль в ноге в покое или хроническая ишемическая язва и(или) гангрена, возникшая вследствие окклюзионного атеросклеротического поражения сосудов ног, составляет 5–10% от всех больных с периферическим атеросклерозом. Причем треть случаев этой патологии приходится на сахарный диабет 2 типа. Консервативное лечение дает лишь временный эффект, а инвазивные методики, включающие в себя ангиопластику и стентирование (выполнимы только у 10% пациентов) и различные варианты шунтирования, трудновыполнимы при поражениях дистального русла,

шунты (за исключением аортоподвздошных) достаточно быстро окклюдуются. При тяжелой ишемии нижних конечностей консервативная терапия малоэффективна, и если пациент не является кандидатом для реваскуляризации (анатомическая протяженность поражения сосуда и распространенность процесса), риск потери конечности очень высок.

Поэтому на сегодняшний день имеется острая необходимость внедрения в клиническую практику новых методов реваскуляризации миокарда и нижних конечностей.

Терапевтический ангиогенез, называемый часто биологическим шунтированием, является одним из наиболее перспективных неинвазивных методов реваскуляризации при ишемических поражениях. Суть метода заключается в стимуляции ангиогенеза в ишемизированной ткани путем создания в ней повышенной концентрации ангиогенных факторов роста — естественных индукторов ангиогенеза. Природа создала механизмы частичной адаптации организма к регионарной ишемии путём «компенсаторного ангиогенеза» (т.е. развития коллатеральной сети) и ангиогенеза (развития новых капилляров), которые регулируются ангиогенными факторами. Однако этот процесс адаптации не способен полностью компенсировать недостаточность кровообращения в ишемизированных тканях при тяжелых стенозирующих поражениях магистральных сосудов. Основу лечебной тактики терапевтического ангиогенеза, предложенной М. Höckel в 1993 г. [1], составляет стимуляция естественного образования коллатеральных сосудов и пролиферации капилляров в ишемизированных тканях под действием ангиогенных факторов роста.

Терапевтический ангиогенез может стать методом выбора для больных с распространенным поражением коронарного или периферического артериального русла, которым нельзя выполнить адекватную реваскуляризацию.

Существует несколько способов создать в ткани необходимую для стимуляции ангиогенеза концентрацию факторов роста.

1. Введение в ткани-мишени препаратов рекомбинантных ангиогенных факторов роста.

2. Трансфекция клеток ишемизированного органа вводимыми *in vivo* генетическими конструкциями, содержащими гены ангиогенных факторов роста (генная терапия).

3. Введение в ткани-мишени клеток, способных продуцировать ангиогенные факторы роста или непосредственно участвовать в формировании сосудов (клеточная терапия).

Для стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде и скелетных мышцах используются все эти подходы.

С середины 1990-х гг. выполнено большое количество экспериментальных работ на моделях ишемии миокарда и задней конечности у мышей, крыс, кроликов, минисвиней, в которых была продемонстрирована возможность эффективной стимуляции ангиогенеза и ангиогенеза и восстановление перфузии тканей в ответ на местное введение ангиогенных факторов роста (VEGF, aFGF, bFGF, HGF и др.) или их генов [2].

Однако результаты клинических испытаний оказались менее оптимистичными. Если в небольших неконтролируемых исследованиях были получены весьма обнадеживающие результаты как у больных ИБС (уменьшение функционального класса стенокардии,

улучшение перфузии миокарда, формирование коллатералей, улучшение функции сердца) [3, 4], так и у больных с КИНК (устранение ишемических болей в покое, увеличение дистанции безболевой ходьбы, заживление трофических язв, улучшение кровотока по данным УЗДГ, улучшение васкуляризации по данным ангиографии) [5], то результаты двойных слепых плацебо-контролируемых исследований были оценены как смешанные и не представили однозначных доказательств эффективности генной терапии ни у больных ИБС, ни у больных с хронической ишемией нижних конечностей [6]. Так, например, в исследовании Euroinject-1 [7] плазмидная генетическая конструкция с геном VEGF-165 вводилась в зону гибернирующего миокарда трансэндокардиально с помощью катетера NOGA под контролем электро-механического картирования полости левого желудочка (80 больных ИБС с 3–4 классом стенокардии). Через три месяца не было обнаружено достоверных различий с плацебо по классу стенокардии и величине дефекта перфузии в покое и при нагрузке. Однако локальная сократимость стенки левого желудочка по данным вентрикулографии и локальное линейное укорочение по данным электро-механического картирования достоверно улучшились в группе генной терапии. В серии исследований AGENT-1, 2, 3 и 4 оценивалась эффективность генной терапии с помощью аденовирусной конструкции с геном FGF-4, вводимой внутрикороноарно неоперабельным больным ИБС, также были получены неоднозначные результаты. Так в исследовании AGENT-1 у 79 больных со стенокардией 2–4 класса через 4 нед. после введения большой дозы аденовирусной конструкции с геном FGF-4 существенно возросла толерантность к физической нагрузке [8], а в исследовании AGENT-2 — у большинства больных, получивших генную терапию, уменьшился дефект перфузии [9]. Однако в последующем межнациональном многоцентровом исследовании AGENT-4, которое проводилось в Европе, не было обнаружено различий с плацебо по увеличению толерантности к физической нагрузке у 116 пациентов [10]. Аналогичное исследование, проводившееся в США (AGENT-3) (416 больных, первичная конечная точка — увеличение толерантности к нагрузке через 3 мес.) [10] было остановлено из-за большого разброса значений толерантности к физической нагрузке в группах, делающее невозможным получение достоверных различий. Однако последующий более детальный анализ полученных данных в различных подгруппах больных установил, что генная терапия достоверно увеличивала толерантность к нагрузке в сравнении с плацебо в подгруппе больных старше 55 лет и с более тяжелой стенокардией (4 ф.к.).

Неоднородные результаты получены и при использовании генной терапии у больных с КИНК. В одном из первых рандомизированных исследований (VEGF peripheral vascular disease trial) 54 больным с КИНК внутриаартериально с помощью катетера вводили либо плазмидную ДНК VEGF-165 в комплексе с липосомами, либо VEGF-165 в аденовирусном векторе, либо физиологический раствор и через три месяца получили более выраженное увеличение коллатеральных сосудов, по данным цифровой субтракционной ангиографии в группах генной терапии [11]. В другом исследовании эффективность введения плазмидной ДНК VEGF-165 в мышцы ишемизированной конечности тестировалась у 54 больных сахарным диабетом 2 типа и КИНК. Хотя по первичной конечной точке (процент

ампутаций за 100 дней) не обнаружено достоверных различий с плацебо, по вторичным конечным точкам (лодыжечно-плечевой индекс, заживление трофических язв, боли в покое) значительное улучшение было в группе генной терапии [12,13]. В третьем исследовании (RAVE trial) у 105 больных при введении VEGF-121 в аденовирусном векторе внутримышечно в пораженную конечность через 3 мес. не обнаружено различий с контрольной группой по лодыжечно-плечевому индексу, времени максимальной ходьбы и качеству жизни [14]. Необходимо отметить, что в клинике не существует адекватного метода оценки ангиогенеза в отличие от экспериментальных работ, поэтому об ангиогенной эффективности генной терапии можно судить лишь косвенно по улучшению перфузии тканей или сократительной способности миокарда в случае ИБС.

С конца 1990-х гг. все большее внимание в качестве инструмента терапевтического ангиогенеза начинает привлекать клеточная терапия. Было обнаружено, что стволовые и прогениторные клетки продуцируют и секретируют в межклеточную среду широкий набор ангиогенных факторов роста. С другой стороны, углубленное изучение свойств эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), содержащихся во фракции гемопоэтических предшественников, показало, что они участвуют в формировании сосудов и во взрослом организме (васкулогенез) и при стимуляции факторами роста *in vitro* дифференцируются в эндотелиоциты. Эти данные создали теоретические предпосылки для использования стволовых и прогениторных клеток для стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях. В экспериментах на модели ишемии задней конечности у крысы и мыши инъекции ЭПК или мононуклеарной фракции костного мозга, содержащей гемопоэтические предшественники (CD34⁺клетки), приводили к улучшению кровоснабжения конечности (по данным лазерной доплерографии), увеличению количества коллатералей (по данным ангиографии и гистологического исследования). При этом новообразованные сосуды формировались не только за счет пролиферации эндотелиальных клеток *in situ*, но и за счет участия в формировании новых сосудов вводимых стволовых клеток (клетки метились с помощью маркерных генов) [15,16].

Способность стимулировать неоваскуляризацию ишемизированных скелетных мышц и миокарда убедительно продемонстрирована на экспериментальных моделях и для мезенхимных клеток костного мозга и жировой ткани [17,18]

Клинические исследования по клеточной терапии так же, как и в случае с генной терапией, дали значительно более скромные результаты. На сегодняшний день опубликовано несколько обзоров с мета-анализом результатов контролируемых исследований по применению клеточной терапии для лечения острого инфаркта миокарда (введение в инфаркт-связанную артерию) и хронической ишемической болезни с постинфарктным кардиосклерозом (введение в инфаркт-связанную артерию, трансэндокардиальное введение с помощью системы NOGA) [19–21]. Кратко, результаты этих аналитических работ показали, что использование клеток костного мозга для терапии острого инфаркта миокарда или хронической ИБС с постинфарктным кардиосклерозом дает весьма скромный, но достоверный эффект по сравнению с традиционной терапией (увеличение фракции выброса левого желудочка в

среднем на 2,5–3,5%, уменьшение конечного систолического объема на 4,6–7,4%, уменьшение размера инфаркта на 3,5–5,6%) [17, 18]. В то же время мобилизация клеток костного мозга с помощью G-CSF у больных с острым инфарктом миокарда при достаточно хорошей переносимости не продемонстрировала дополнительной эффективности в сравнении с традиционной терапией [22]. Использование «скелетных миобластов» у больных с ишемической кардиомиопатией, по данным рандомизированного многоцентрового исследования MAGIC, также не привело к достоверному положительному эффекту (увеличению фракции выброса левого желудочка) по сравнению с контрольной группой [23].

Эффективность клеточной терапии при ишемии нижних конечностей оценивалась в основном в исследованиях, в которые включали больных с КИНК, у которых реваскуляризация была технически невыполнима, а консервативная терапия неэффективна, так что единственной альтернативой терапевтическому ангиогенезу была ампутация конечности. Клетки мононуклеарной фракции костного мозга или мононуклеарной фракции периферической крови вводились в мышцы ишемизированной конечности или в бедренную артерию [24]. В ряде случаев использовалась предварительная мобилизация с помощью 3–5 дневного курса п/к инъекций GM-CSF [25].

Во всех исследованиях отмечалось увеличение лопаточно-плечевого индекса и напряжения кислорода в тканях, уменьшение болей в покое, исчезновение парестезий, увеличение длительности безболевого ходьбы, заживление трофических язв и улучшение перфузии конечности по данным сцинтиграфии с Tc-99m-тетрофосмином у значительной части больных. Однако окончательное суждение об эффективности клеточной терапии при ишемии нижних конечностей возможно только после проведения контролируемых исследований на достаточно больших группах больных.

При обсуждении причин недостаточной эффективности генной и клеточной терапии при заболеваниях ишемического генеза, помимо претензий к дизайну исследований и выбору конечных точек, указывают в случае генной терапии на низкую эффективность трансфекции тканей человека и недостаточную длительность экспрессии трансгена, а в случае клеточной терапии — на гибель значительного количества клеток после трансплантации в поврежденную и ишемизированную ткань, снижение функциональной активности прогениторных клеток у пожилых людей и больных ИБС, особенно в сочетании с диабетом 2 типа. Показано, что у больных ИБС ангиогенные и регенеративные свойства клеток костного мозга (способность формировать колонии, пролиферировать, мигрировать в ответ на VEGF и SDF-1 и стимулировать неоваскуляризацию ишемизированной конечности иммунодефицитных мышей), значительно снижены [17, 26]. Учитывая, что вклад паракринных эффектов трансплантированных клеток в неоваскуляризацию весьма существенен, возможно, именно секреторная активность клеток, а не их дифференцировочные свойства определяют ангиогенную и тканепротективную эффективность. Если это так, то усиление паракринных эффектов трансплантируемых клеток, путем их генетической трансформации с помощью конструкций, содержащих гены ангиогенных и антиапоптотических факторов, может быть перспективным подходом к повышению эффективности клеточной терапии.

Генетически модифицированные клетки для терапевтического ангиогенеза

Возможность повысить эффективность восстановления кровоснабжения и регенерации ишемизированных тканей с помощью генетически модифицированных прогениторных клеток исследовалась прежде всего с помощью клеток, трансформированных генетической конструкцией, несущей ген VEGF — основного регулятора ангиогенеза в эмбриональном и постнатальном периоде развития организма, что естественно, так как именно этот ген наиболее часто использовался для стимуляции ангиогенеза с помощью генной терапии. Различные типы клеток, включая мононуклеарную фракцию костного мозга или пуповинной крови, эндотелиальные клетки-предшественницы, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) костного мозга и «скелетные миобласты» тестировались в этих работах. Как правило, эффективность клеток, гиперэкспрессирующих VEGF, сравнивали с эффективностью нетрансформированных клеток (или) генной терапии с помощью конструкций, несущих ген VEGF. В работе Y. Ikeda с соавт. [28] клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека трансфецировали геном hVEGF-165 и маркерным геном GFP с помощью вектора HVJ (вирус Сендай). Трансфецированные клетки экспрессировали маркеры эндотелия (Flk-1, VE-кадгерин, PECAM-1, CD34, и Tie-2) и секретировали в среду VEGF. Клетки вводили в мышцы ишемизированной задней конечности крысы на фоне иммуносупрессии и получили более значительное усиление кровотока в конечности, чем при введении нетрансфецированных клеток пуповинной крови.

Использование модифицированных предшественников эндотелиальных клеток (ПЭК), гиперэкспрессирующих VEGF, позволило в 30 раз уменьшить количество клеток, необходимых для достижения желаемого эффекта [29], что очень важно для использования клеточной терапии в клинике, где проблема получения достаточного количества клеток стоит довольно остро.

Увеличить секреторную активность прогениторных клеток можно не только путем трансфекции (трансдукции) их генами факторов роста, но и воздействуя на внутриклеточные сигнальные пути. Такой подход был использован в работе Choi J.H. с соавт. [30]. Исследуя внутриклеточные функции киназы гликогенсинтетазы β (GSK3 β) авторы показали, что данный фермент является ключевым регулятором ряда внутриклеточных сигнальных каскадов, обеспечивающих выживание эндотелиоцитов и стимулирующих их миграцию. Они трансфецировали ЭПК *in vitro* плазмидой с геном каталитически неактивной GSK3 β , что приводило к подавлению сигнального пути β -катенина в ядро и усиливалась экспрессия ангиогенных ФР — VEGF и IL-8. Это стимулировало дифференцировку ЭПК в направлении эндотелиоцитов. Введение генетически модифицированных ЭПК человека, экспрессирующих GSK3 β , в мышцы ишемизированной конечности иммунодефицитных мышей приводило к увеличению капилляризации мышц, восстановлению кровотока и предотвращало развитие гангрены конечности. Эти эффекты были значительно более выраженными, чем при введении нетрансфецированных ЭПК.

Другим подходом к увеличению паракринных эффектов ЭПК в условиях ишемии может быть гиперэкспрессия в них транскрипционного фактора, индуцируемого

гипоксией — HIF-1 α , который регулирует экспрессию нескольких ангиогенных факторов. Показано, что трансфекция ЭПК вектором с геном HIF-1 α увеличивала в них экспрессию NO-синтазы и рецепторов к VEGF (Flk-1), секрецию VEGF и NO этими клетками, а также увеличивала их способность стимулировать ангиогенез и восстановление кровотока в ишемизированных мышцах задней конечности иммунодефицитных мышей [31, 32].

Эффективный ангиогенез в миокарде и скелетных мышцах невозможен без миогенеза, а миогенез — без ангиогенеза [33]. Известно, что VEGF, секретируемый «скелетными миобластами» в условиях ишемии, является важным антиапоптотическим фактором для мышечных волокон [34]. Было предположено, что использование «скелетных миобластов», сверхэкспрессирующих VEGF, позволит более эффективно стимулировать как ангио-, так и миогенез. В нескольких работах исследовали восстановление кровотока в ишемизированной конечности после введения модифицированных скелетных миобластов. С помощью аденовирусного вектора в миобласты, предварительно полученные из материала биопсии скелетных мышц кролика, вводили гены VEGF и ангиопоэтина-1. Модифицированные клетки трансплантировали в ишемизированные мышцы задней конечности кролика и получили значительную стимуляцию васкуляризации мышц как по данным ангиографического исследования (развитие коллатералей), так и по данным гистологического исследования (плотность сосудов — капилляров, мелких артерий) [35]. Количество сосудов в мышцах при введении трансформированных клеток было в 3 раза больше, чем при введении интактных «миобластов» или «миобластов», трансформированных «пустым» вектором. Использование вектора с геном одного фактора было менее эффективным, чем вектора с генами двух факторов. Та же группа авторов на модели инфаркта миокарда у минисвиней показала, что «скелетные миобласты», трансдуцированные аденовирусным вектором, несущим гены VEGF и ангиопоэтина-1, более эффективно восстанавливают функцию сердца после инфаркта и стимулируют образование стабильной функциональной сосудистой сети в перинфарктной зоне, чем немодифицированные миобласты или миобласты, трансдуцированные «пустым» вектором [36].

Возможность существенного повышения эффективности клеточной и генной терапии путем переноса генов с помощью клеток была убедительно продемонстрирована и в других работах на моделях инфаркта миокарда. Так в одном из первых в этой области исследований К. Suzuki с соавт. [37] в миокард перинфарктной зоны крыс вводили взвесь аутогенных миобластов, предварительно трансфецированных *in vitro* геном VEGF с помощью вектора HVJ (Сендай) в комплексе с липосомами. Авторы предположили, что в условиях острой ишемии VEGF, секретируемый генетически модифицированными «миобластами», будет способствовать улучшению перфузии миокарда и уменьшению размера инфаркта, а дифференцировка миобластов в функционально полноценные мышечные волокна будет препятствовать развитию неблагоприятного ремоделирования левого желудочка и сердечной недостаточности в дальнейшем. В экспериментальной группе действительно было достигнуто существенное уменьшение размеров инфаркта по сравнению с контрольной группой (введение физиологического раствора в перинфарктную зону), однако отсутствие группы сравнения, где животным вводили

бы нетрансфецированные «миобласты», наряду с отсутствием в работе оценки ангиогенеза снижает ценность полученных результатов. Тем не менее, было показано, что данная технология может успешно применяться при экспериментальном инфаркте. В дальнейшем было установлено, что введение в область рубца 4 млн миобластов, сверхэкспрессирующих VEGF, на модели криогенного повреждения миокарда у крыс более эффективно стимулировало ангиогенез, чем введение плазмиды с геном VEGF [38]. И так же, как и в предыдущем исследовании, отсутствие соответствующей контрольной группы (введение нетрансфецированных «миобластов») оставило открытым вопрос о вкладе секреции VEGF миобластами в общий эффект.

Ответ был получен в исследовании А. Askari с соавт. [39], где скелетные миобласты, трансформированные аденовирусным вектором, несущим ген VEGF-165, вводили в миокард перинфарктной зоны сердца крысы через 2 мес. после моделирования инфаркта миокарда (модель ишемической кардиомиопатии) (опытная группа). В группах сравнения животным вводили либо миобласты, трансдуцированные вектором с маркерным геном (группа клеточной терапии), или раствор самого вектора с геном VEGF (AdVEGF-165) (группа генной терапии), либо физиологический раствор (контрольная группа). В опытной группе и группе генной терапии количество сосудов в миокарде было, соответственно, в 3 и в 2 раза больше, чем в группе клеточной терапии. В то же время улучшение сократимости миокарда (по сравнению контрольной группой) наблюдалось только в группах животных, получивших введение «миобластов», при этом в группе с введением модифицированных клеток эффект был более выраженным, чем в группе с применением интактных миобластов. Улучшение функции коррелировало с меньшим количеством апоптозов в перинфарктной зоне у животных экспериментальной группы. Количество мышечных волокон в обеих группах значимо не отличалось, что свидетельствовало о том, что улучшение сократительной функции происходило не за счет более активной «дифференцировки» миобластов в мышечные волокна, а, вероятно, было обусловлено улучшением перфузии миокарда и предотвращением индуцированного ишемией апоптоза кардиомиоцитов вследствие секреции введенными клетками VEGF.

Значительная стимуляция ангиогенеза продуцирующими VEGF «миобластами» человека показана на модели хронической ишемии миокарда у свиньи с иммуносупрессией циклоспорином. Увеличение количества сосудов в 6 раз превышало эффект нетрансформированных клеток [40].

Возможность значительно улучшить функцию сердца после инфаркта и предотвратить развитие постинфарктного ремоделирования левого желудочка с помощью модифицированных «скелетных миобластов» показана в работе S. Rong с соавт. [41]. Миобласты были трансфецированы плазмидой, несущей ген гормона роста, который, как показано ранее, способен стимулировать ангиогенез и подавлять апоптоз клеток. Оказалось, что продуцирующие гормон роста «миобласты» были существенно эффективнее интактных «миобластов» как в стимуляции ангиогенеза, так и во влиянии на функцию сердца. Более того, такая модификация значительно улучшала выживаемость «миобластов» после трансплантации.

Эффективность генетически трансформированных прогениторных клеток костного мозга и периферической

крови исследована в нескольких работах. K. Nagikura с соавт. [42] вводили в периинфарктную зону сердца свиньи трансфецированные плазмидой с геном VEGF клетки мононуклеарной фракции, полученной из периферической крови. Для трансплантации использовали ретроградное введение в коронарные вены. Было показано, что введение трансфецированных клеток эффективно стимулировало образование коллатеральных сосудов и капилляризацию периинфарктной зоны и улучшало функцию сердца.

Наибольшее внимание в качестве инструмента клеточной терапии, направленной на стимуляцию неоваскуляризации и регенерации миокарда, привлекают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга (ММСК). Именно для этого типа клеток достаточно хорошо документирована способность к кардиомиоцитарной дифференцировке как *in vitro*, так и *in vivo* [43, 44]. ММСК секретируют широкий спектр ангиогенных и антиапоптотических факторов роста (VEGF, HGF, bFGF, SDF-1 и др.), имеют высокий пролиферативный потенциал и способность к самообновлению, что критично для обеспечения длительного эффекта клеточной терапии [45]. Эффективность стимуляции неоваскуляризации и улучшения функции сердца после инфаркта при трансплантации ММСК показана в экспериментальных [46] и клинических работах [47]. Помимо этого интенсивно изучается возможность повышения эффективности применения ММСК для клеточной терапии за счет генетической модификации этих клеток. В основу этих работ положена гипотеза о том, что усиление за счет генетической модификации продукции одного ангиогенного или антиапоптотического фактора позволит повысить эффективность стимуляции ангиогенеза и процессов репарации за счет синергизма с другими факторами, секретируемыми этими клетками. Одной из первых работ было исследование R. Matsumoto с соавт. [48], в котором МСК, модифицированные с помощью аденовирусного вектора с геном VEGF-165, вводились в периинфарктную зону сердца крысы через час после окклюзии передней нисходящей артерии (ПНА). Через месяц после инфаркта значительное улучшение показателей функции сердца, уменьшение размера инфаркта и увеличение плотности сосудов в периинфарктной зоне было отмечено у животных, которым вводили модифицированные клетки, по сравнению с животными, получившими только введение среды культивирования. Однако по сравнению с введением немодифицированных клеток, отмечались лишь тенденции к более значительному улучшению этих показателей. Достоверное повышение эффективности клеточной терапии инфаркта миокарда за счет модификации ММСК продемонстрировано в работе F. Gao с соавт. [49]. Размер инфаркта, параметры функции сердца и количество сосудов через месяц после перевязки ПНА и введения клеток были достоверно лучше у животных, получивших ММСК, трансдуцированные аденовирусом с геном VEGF как в сравнении с животными, получившими ММСК, трансдуцированные контрольным вектором, так и в сравнении с животными, получившими прямое введение аденовируса с геном VEGF. Часть трансплантированных ММСК дифференцировалась в кардиомиоцитарном направлении (меченные флуоресцентным красителем клетки экспрессировали тропонин Т), и только небольшое количество введенных клеток дифференцировалось в клетки сосудов. Большинство же сосудов в периинфарктной зоне не содержало меченых клеток. Эти ре-

зультаты показывают, что модифицированные ММСК эффективно стимулируют миогенез как за счет паракринных эффектов, так, возможно, и за счет дифференцировки в кардиомиоциты, и стимулируют ангиогенез, вероятно, за счет паракринных механизмов.

Эффективность трансформированных ММСК при их введении в миокард в отдаленные после инфаркта сроки изучалась в работе J. Yang с соавт. [50]. ММСК, сверхэкспрессирующие VEGF, вводились в периинфарктную зону сердца крысы через две недели после лигирования передней нисходящей артерии. В качестве контрольных групп использовались животные, которым вводили не трансформированные МСК, плазмиду с геном VEGF и среду культивирования клеток. Оказалось, что через 4 нед. после этих манипуляций наилучшие показатели функции и размеров сердца и наибольшая плотность сосудов в периинфарктной зоне были в группе животных, которым вводили трансформированные клетки, продуцирующие VEGF. Аналогичные результаты были получены и на модели ишемии миокарда у кролика при использовании ММСК, модифицированных с помощью аденовирусного вектора, несущего ген VEGF [51]. Более значительная (в сравнении с нетрансформированными клетками) стимуляция ангиоартериогенеза в постинфарктном сердце крысы была получена и при использовании трансформированных МСК, продуцирующих ангиопоэтин-1 — ангиогенный фактор, регулирующий образование стабильных, «зрелых» сосудов [52]. Недавно эффективная стимуляция ангиогенеза, улучшение функции сердца и выживаемости клеток после трансплантации продемонстрирована также при введении в периинфарктную зону сердца крысы генетически модифицированных ММСК, сверхэкспрессирующих ангиогенин [53].

Возможность повысить эффективность стимуляции неоваскуляризации тканей с помощью генетически модифицированных прогениторных клеток показана и на модели аутодермопластики лоскутом на ножке. Так трансплантация трансфецированных *in vitro* плазмидой rhVEGF-165 ЭПК, полученных из пуповинной крови человека, улучшала кровоснабжение и показатели сохранности ишемизированного кожного лоскута у мышей, в то время как интактные ЭПК по эффективности были сравнимы с плацебо [54]. На этой же модели была успешно применена аутооттрансплантация скелетных миобластов, трансфецированных геном FGF-2 и получены аналогичные результаты [55].

Обобщая результаты экспериментальных работ по использованию трансформированных прогениторных клеток для терапевтического ангиогенеза можно заключить, что имеющиеся данные убедительно показывают большую эффективность трансформированных клеток по сравнению с нетрансформированными клетками и генной терапией. Хотя следует признать, что далеко не во всех работах были использованы адекватные контрольные группы.

Повышение жизнеспособности трансплантируемых клеток, их хоуминга и интеграции в структуру ткани с помощью генетической модификации

Помимо повышения ангиогенной эффективности клеточной и генной терапии, важнейшей целью модификации трансплантируемых клеток является повышение их выживаемости после трансплантации. Гибель значительного количества клеток после введения в поврежденные ткани признается одной из наиболее

важных проблем, ограничивающих эффективность клеточной терапии. По данным J. Müller-Ehmsen с соавт. [56], более 70% неонатальных кардиомиоцитов, трансплантированных в миокард, погибает в течение первых 24 ч. Для увеличения выживаемости клеток после трансплантации разрабатываются различные подходы. Так цитопротективный эффект фармакологического preconditionирования был показан на «скелетных миообластах» *in vitro* и *in vivo* [57, 58]. Культивирование клеток перед трансплантацией в условиях гипоксии [59] или повышенной температуры [60] также увеличивало выживаемость клеток при гипоксии-реоксигенации *in vitro* и при трансплантации в сердце.

Важной внутриклеточной сигнальной молекулой, опосредующей антиапоптотические и пролиферативные сигналы, является Akt-киназа [61]. Впечатляющие результаты были получены при введении в сердце мыши после инфаркта модифицированных ретровирусной конструкцией мезенхимных клеток костного мозга, конститутивно экспрессирующих Akt-киназу. Функция сердца мыши почти полностью восстанавливалась при введении модифицированных клеток. Их эффект значительно лучше, чем эффект немодифицированных ММСК [62]. Первоначально полагали, что этот эффект обусловлен только уменьшением апоптотической гибели введенных клеток, однако последующие работы показали, что экспрессия Akt-киназы в несколько раз увеличивала экспрессию ангиогенных факторов роста клетками и, вероятнее всего, именно усиление паракринных влияний обусловило как повышение терапевтической эффективности модифицированных клеток, так и их выживание после трансплантации [63].

Существенным фактором для клеточной терапии является длительность эффекта. В этом плане интерес представляет экспериментальная работа группы ученых из Цинциннати (США). Они трансплантировали в перинфарктную зону сердца крысы генетически модифицированные ММСК, сверхэкспрессирующие одновременно Akt-киназу и ангиопоэтин-1 [64] и получили стабильную регистрирующуюся через 3 мес. стимуляцию ангиоarterиогенеза, улучшение функции сердца, приживление трансплантата и признаки дифференцировки трансплантированных клеток в кардиомиоцитарном направлении. Однако использование клеток, конститутивно экспрессирующих Akt-киназу, таит в себе опасность онкогенности [65], поэтому продвижение данной технологии в клинику требует проведения экспериментальных разработок регулируемой экспрессии Akt-киназы.

Удачная попытка увеличить выживаемость клеток после трансплантации была предпринята в работе W. Li с соавт. [66]. ММСК, полученные из костного мозга крысы, были трансфицированы антиапоптотическим геном Bcl-2 и введены в перинфарктную зону. Выживаемость модифицированных клеток была в два раза больше через 3 нед. после трансплантации, а стимуляция ангиогенеза и улучшение функции сердца были более выражены, чем при введении клеток, трансформированных «пустым» вектором.

Другой молекулой, обладающей антиапоптотической, противовоспалительной и цитопротективной активностью, является гемоксигеназа — HO-1 — фермент, катализирующий образование из гемоглобина биливердина, свободных ионов железа и оксида углерода (CO). Все эти три продукта защищают клетки от повреждения и смерти, индуцированных оксидативным стрессом [67]. Показано, что ММСК, трансфицированные плазмидой,

несущей ген HO-1 под промотором, регулируемым гипоксией, устойчивы к гипоксическому повреждению *in vitro* и значительно лучше, чем интактные ММСК, выживают при введении в ишемизированный миокард [68].

Наиболее приемлемым для клинического использования является внутрисосудистый способ трансплантации стволовых и прогениторных клеток. При таком способе введения эффективный «хоуминг» клеток — их миграция в зону повреждения и ишемии — могут существенно влиять на эффективность клеточной терапии. Клетки ишемизированных и поврежденных тканей секретируют различные факторы роста и цитокины, из которых наиболее важным сигналом к миграции и «хоумингу» является хемокин — фактор стромальных клеток (SDF-1), привлекающий гематопозитические стволовые клетки, несущие на своей поверхности рецептор к SDF-1 — молекулу адгезии CXCR4 [69]. Низкий уровень экспрессии CXCR4 обнаружен на минорной субпопуляции ММСК, а большинство ММСК не экспрессируют на своей поверхности CXCR4. Для улучшения миграции, «хоуминга» и выживания трансплантированных ММСК предложено трансформировать их генетическими конструкциями, несущими ген CXCR4. В исследованиях *in vitro* было показано, что трансдукция этих клеток с помощью ретровирусного вектора с геном CXCR4 значительно увеличивает их миграцию в трансвеллах в ответ на SDF-1 [70]. Внутривенное введение ММСК, экспрессирующих CXCR4, через 3 дня после моделирования инфаркта у крыс стимулировало их аккумуляцию в перинфарктной зоне, ангиогенез и миогенез, улучшало функцию сердца [71]. Эффективность модифицированных клеток была выше по сравнению с немодифицированными клетками.

Главной проблемой при трансплантации «скелетных миобластов» в миокард является отсутствие их электрической интеграции в миокард реципиента, поскольку зрелые скелетные мышечные волокна, конечный продукт дифференцировки «миобластов», не экспрессируют белок межклеточной адгезии N-кадгерин (N-Cad) и белок межклеточных контактов коннексин 43 (Cx43), обеспечивающие нормальное проведение электрического возбуждения от одного кардиомиоцита к другому. Таким образом, в месте имплантации «миобластов» образуется фрагмент поперечно-полосатой мышцы и формируется субстрат для возникновения повторного входа возбуждения. Это было продемонстрировано и при совместном культивировании «миобластов» и кардиомиоцитов [72]. В клинических испытаниях у некоторых больных после введения в миокард аутогенных миобластов возникали частые пароксизмы желудочковой тахикардии, что требовало имплантации кардиовертера-дефибриллятора [73]. Для преодоления этой существенной проблемы данного вида клеточной терапии и обеспечения адекватного электрического сопряжения образующихся мышечных волокон с кардиомиоцитами предложено трансформировать «миобласты» *in vitro* геном коннексина 43 (Cx43) [74]. Однако авторы работы столкнулись с неожиданным препятствием: модифицированные «миобласты» формировали мышечные волокна, экспрессирующие Cx43, но последние оказывались нежизнеспособными и гибли в течение 2 нед. Авторам удалось найти выход: они поставили ген Cx43 под контроль тканеспецифичного промотора — промотора гена мышечной креатинкиназы. Известно, что этот фермент экспрессируется только в зрелых мышечных волокнах. В результате удалось получить жизнеспособные мышечные волокна, эффективно экспрессирующие

Сх43 и формирующие контакты с кардиомиоцитами хозяина, что свидетельствовало в пользу формирования электрического сопряжения, хотя окончательно это не было доказано, так как электрофизиологические эксперименты не проводились.

Показано, что «миобласты» могут играть роль антиген-презентирующих клеток [75]. Поэтому экспрессия ими трансгена с высокой вероятностью может приводить к развитию иммунного ответа на трансгенный продукт или вирусные белки вектора, который может приводить к дополнительному повреждению мышечных волокон. Для уменьшения иммунного ответа предложено использование специфических промоторов, запускающих экспрессию только после окончания дифференцировки. Так, трансдукция миобластов аденовирусным вектором с геном люциферазы, который регулировался промотором мышечной креатинкиназы вместо обычного цитомегаловирусного промотора, уменьшала интенсивность иммунного ответа после трансплантации таких клеток, клетки лучше выживали и дольше экспрессировали трансген [76]. Альтернативный подход — трансфекция «миобластов» геном «атипичной» молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-G, который экспрессируется в мышцах при воспалении, а также «миобластами» в культуре [77]. Две изоформы этого белка — HLA-G1 (трансмембранный белок) и HLA-G5 (растворимая форма), экспрессируемые модифицированными «миобластами», предупреждали аллореактивный лизис последних за счет прямого подавления активности естественных киллеров, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Генетически модифицированные клетки в качестве биологических пейсмекеров

Тяжелые нарушения ритма сердца, обусловленные слабостью синусового узла или развитием полной блокады, требуют установки искусственных электронных водителей ритма. Несмотря на постоянное их совершенствование, они не лишены некоторых весьма существенных недостатков, таких как фиксированная частота пульса и ограниченный срок действия.

Одним из перспективных направлений в лечении таких нарушений ритма сердца может стать генетическая модификация «миобластов» или ММСК с целью придания им пейсмекерных свойств с последующей трансплантацией в миокард для создания биологического пейсмекера, который будет способен отвечать на физиологические стимулы [79]. Так, трансфекция ММСК плазмидой, несущей специфичный для клеток пейсмекеров ген *HCN2*, кодирующий α -субъединицу мембранного канала, обеспечивающего пейсмекерный ток *I_f*, придавала клеткам соответствующие свойства (временные и амплитудные показатели потенциалов покоя и действия, появление тока *I_f*, частота соб-

ственного ритма) [80]. Функциональная полноценность пейсмекера была продемонстрирована как *in vitro* при совместном культивировании с кардиомиоцитами желудочков, так и *in vivo* после субэпикардальной инъекции в сердце собаки, когда во время электрофизиологического исследования при индукции синусовой паузы регистрировался гемодинамически эффективный замещающий ритм нового пейсмекера. При гистологическом исследовании обнаруживались полноценные целевые контакты с кардиомиоцитами хозяина. Работы в этой области только начинаются и в случае успеха могли бы обеспечить замену электронных пейсмекеров на биологические, хотя на сегодняшний день перспектива их клинического применения не ясна.

Заключение

С развитием генной и клеточной терапии несомненно связывают перспективы решения многих проблем кардиологии и ангиологии, таких как восстановление кровоснабжения ишемизированных тканей, особенно в случаях невозможности провести эффективную хирургическую и эндоваскулярную реваскуляризацию, регенерация миокарда после инфаркта, восстановление функции сердца при сердечной недостаточности, лечение нарушений ритма и пр.

Несмотря на огромный потенциал, показанный в экспериментальных работах, успехи генной и клеточной терапии в клинике при используемых сегодня подходах невелики. Одним из путей повышения эффективности генной и клеточной терапии может быть генетическая модификация клеток, позволяющая улучшить их регенеративные свойства за счет усиления паракринной активности (секреции факторов роста), повышения жизнеспособности клеток при трансплантации, увеличения их способности к хоумингу и интеграции в ткань-мишень, создания клеток с новыми свойствами для замещения функции погибших клеток (биологические пейсмекеры).

В подавляющем большинстве экспериментальных работ генетически модифицированные клетки (стоволовые, прогениторные, «миобласты») оказались эффективнее немодифицированных или прямой генной терапии (введения генетических конструкций). Однако продвижение этой технологии в клинику требует, прежде всего, решения вопросов ее безопасности. И в этом плане разработка безопасных, желателно невирусных способов модификации клеток, использование регулируемых и тканеспецифичных промоторов, оценка возможных трансформаций модифицированных клеток, оценка длительных эффектов, в том числе побочных эффектов их трансплантации на лабораторных животных, должна предшествовать разработке клинических протоколов оценки эффективности этой технологии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Höckel M., Schlenger K., Doctrow S. Therapeutic angiogenesis. Arch. Surg. 1993; 128: 423–9.
2. Springer M.L. A balancing act: therapeutic approaches for the modulation of angiogenesis. Curr. Opin. Investig. Drugs. 2006; 7(3): 243–50.
3. Renault M-A., Osordo D.W. Therapeutic Myocardial Angiogenesis. Microvasc. Res. 2007; 74(2-3): 159–71.
4. Bashir R., Vale P.R., Isner J.M. et al. Angiogenic gene therapy: pre-clinical studies and phase I clinical data. Kidney Int. 2002; 61(1 Suppl): S110–4.
5. Attanasio S., Snell J. Therapeutic angiogenesis in the management of critical limb ischemia: current concepts and review. Cardiol. Rev. 2009; 17(3): 115–20.

6. Gupta R., Tongers J., Losordo D. Human studies of angiogenic gene therapy. Circ. Res. 2009; 105: 724–36.

7. Gyongyosi M., Khorsand A., Zamini S. et al. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. Circulation 2005; 112(suppl 1): I157–I65.

8. Grines C.L., Watkins M.W., Helmer G. et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. Circulation 2002; 105: 1291–7.

9. Grines C.L., Watkins M.W., Mahmarian J.J. et al. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its

effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 1339–47.

10. Henry T.D., Grines C.L., Watkins M.W. et al. Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50: 1038–46.

11. Makinen K., Manninen H., Hedman M. et al. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 2002; 6: 127–33.

12. Kusumanto Y.H., van Weel V., Mulder N.H. et al. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum. Gene Ther.* 2006; 17: 683–91.

13. Yla-Herttua S., Rissanen T.T., Vajanto I. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical application in cardiovascular medicine. *JMCC* 2007; 49: 1015–26.

14. Rajagopalan S., Mohler E.R., Lederman R.J. et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108(16): 1933–8.

15. Kalka C., Masuda H., Takahashi T. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *PNAS USA* 2000; 97(7): 3422–7.

16. Pesce M., Orlandi A., Iachininoto M.G. et al. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res.* 2003; 93(5): e51–62.

17. Iwase T., Nagaya N., Fujii T. et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res.* 2005; 66(3): 543–51.

18. Miranville A., Heeschen C., Sengenès C. et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110(3): 349–55.

19. Lipinski M.J., Biondi-Zoccai G.G., Abbate A. et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50(18): 1761–7.

20. Reffelmann T., Künemann S., Klöner R.A. Promise of blood- and bone marrow-derived stem cell transplantation for functional cardiac repair: putting it in perspective with existing therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53(4): 305–8.

21. Zhang S.N., Sun A.J., Ge J.B. et al. Intracoronary autologous bone marrow stem cells transfer for patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Int. J. Cardiol.* 2009; 136(2): 178–85.

22. Zohlnhüfer D., Dibra A., Koppa T. et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51(15): 1429–37.

23. Formigli L., Zecchi-Orlandini S., Meacci E. et al. Skeletal myoblasts for heart regeneration and repair: state of the art and perspectives on the mechanisms for functional cardiac benefits. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 16(8): 915–28.

24. Germani A., Di Campli C., Pompilio G. et al. Regenerative therapy in peripheral artery disease. *Cardiovasc. Ther.* 2009; 27(4): 289–304.

25. Kawamoto A., Katayama M., Handa N., et al. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 2009; 27(11): 2857–64.

26. Pittenger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 2004; 95(1): 9–20.

27. Sugihara S., Yamamoto Y., Matsuura T. et al. Age-related BM-MNC dysfunction hampers neovascularization. *Mech. Ageing. Dev.* 2007; 128(9): 511–6.

28. Ikeda Y., et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens. Res.* 2004; 27(2): 119–28.

29. Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C. et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002; 105(6): 732–8.

30. Choi J.H., Hur J., Yoon C.H. et al. Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3 β activity. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(47): 49430–8.

31. Jiang M., Wang B., Wang C. et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 α modified EPCs into ischemic limbs. *J. Cell. Biochem.* 2008; 103(1): 321–34.

32. Jiang M., Wang B., Wang C. et al. In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of HIF-1 α -modified endothelial progenitor cells (Ad-HIF-1 α -modified EPC for angiogenesis). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2008; 40(10): 2284–95.

33. Borselli C., Storrer H., Benesch-Lee F. et al. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *PNAS USA* 2009; 107(8): 3287–92.

34. Germani A., Di Carlo A., Mangoni A. et al. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am. J. Pathol.* 2003; 163(4): 1417–28.

35. Niagara M.I., Haider H.Kh., Ye L. et al. Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 2004; 40(4): 774–85.

36. Ye L., Haider H.Kh., Jiang S. et al. Improved angiogenic response in pig heart following ischaemic injury using human skeletal myoblast simultaneously expressing VEGF165 and angiopoietin-1. *Eur. J. Heart. Fail.* 2007; 9(1): 15–22.

37. Suzuki K., Murtuza B., Smolenski R.T. et al. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation* 2001; 104(12 Suppl 1): I207–12.

38. Sugimoto T., Inui K., Shimazaki Y. Gene therapy for myocardial angiogenesis: with direct intramuscular gene transfer of naked deoxyribonucleic acid encoding vascular endothelial growth factor and cell transplantation of vascular endothelial growth factor transfected H9c2 myoblast. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003; 51(5): 192–7.

39. Askari A., Unzek S., Goldman C.K. et al. Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in improved left ventricular function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy. *J Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43(10): 1908–14.

40. Law P.K., Haider K., Fang G. et al. Human VEGF165-myoblasts produce concomitant angiogenesis/myogenesis in the regenerative heart. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 263(1-2): 173–8.

41. Rong S.L., Wang Y.J., Wang X.L. et al. Recombinant human growth hormone secreted from tissue-engineered bioartificial muscle improves left ventricular function in rat with acute myocardial infarction. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2009; 122(19): 2352–9.

42. Hagikura K., Fukuda N., Yokoyama S.I. et al. Low invasive angiogenic therapy for myocardial infarction by retrograde transplantation of mononuclear cells expressing the VEGF gene. *Int J Cardiol.* 2009 Jan 22. [Epub ahead of print].

43. Tokcaer-Keskin Z., Akar A.R., Ayaloglu-Butun F. et al. Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2009; 87(2): 143–50.

44. Hattan N., Kawaguchi H., Ando K. et al. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65(2): 334–44.

45. Zou Z., Zhang Y., Hao L. et al. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010; 10(2): 215–30.

46. Tang J., Xie Q., Pan G. et al. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2006; 30(2): 353–61.

47. Schdfer R., Northoff H. Cardioprotection and cardiac regeneration by mesenchymal stem cells. *Panminerva Med.* 2008; 50(1): 31–9.

48. Matsumoto R., Omura T., Yoshiyama M. et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25(6): 1168–73.

49. Gao F., He T., Wang H. et al. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. *Can. J. Cardiol.* 2007; 23(11): 891–8.

50. Yang J., Zhou W., Zheng W. et al. Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology* 2007; 107(1): 17–29.

51. Gao C.Q., Yang M., Li L.B. et al. The experimental studies on cell transplantation into chronic ischemic myocardium using mesenchymal stem cells modified by recombinant adenovirus carrying vascular endothelial growth factors 165 gene. *Zhonghua. Wai. Ke. Za. Zhi.* 2007; 45(14): 990–3.

52. Sun L., Cui M., Wang Z. et al. Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 improve remodeling in a rat model of acute myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 357(3): 779–84.

53. Liu X.H., Bai C.G., Xu Z.Y. et al. Therapeutic potential of angiogenic modified mesenchymal stem cells: angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvasc. Res.* 2008; 76(1): 23–30.

54. Yi C.G., Guo S.Z., Zhang L.X. et al. Promotion of the survival of ischemic skin flap by transplanted endothelial progenitor cells transfected with VEGF165 gene: an experimental study with mice. *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* 2005; 85(7): 473–8.

55. Rinsch C., Quinodoz P., Pittet B. et al. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther.* 2001; 8(7): 523–33.

56. Müller-Ehmsen J., Peterson K.L., Kedes L. et al. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002; 105(14): 1720–6.

57. Pasha Z., Wang Y., Sheikh R. et al. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc. Res.* 2008; 77(1): 134–42.
58. Niagara M.L., Haider H.K., Jiang S. et al. Pharmacologically preconditioned skeletal myoblasts are resistant to oxidative stress and promote angiomyogenesis via release of paracrine factors in the infarcted heart. *Circ. Res.* 2007; 100: 545–55.
59. Hu X., Yu S.P., Fraser J.L. et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008; 135(4): 799–808.
60. Suzuki K., Smolenski R.T., Jayakumar J. et al. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 2000; 102: III216–21.
61. Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes. Dev.* 1999; 13: 2905–27.
62. Mangi A.A., Noiseux N., Kong D. et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 2003; 9: 1195–201.
63. Gneocchi M., He H., Liang O.D. et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* 2005; 11(4): 367–8.
64. Shujia J., Haider H.K., Idris N.M. et al. Stable therapeutic effects of mesenchymal stem cell-based multiple gene delivery for cardiac repair. *Cardiovasc. Res.* 2008; 77(3): 525–33.
65. Meuillet E.J., Mahadevan D., Vankayalapati H. et al. Specific inhibition of the Akt1 pleckstrin homology domain by D-3-deoxy-phosphatidyl-myo-inositol analogues. *Mol. Cancer Ther.* 2003; 2:389–99.
66. Li W., Ma N., Ong L.L. et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2118–27.
67. Otterbein L.E., Choi A.M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279: L1029–37.
68. Tang Y.L., Zhao Q., Qin X. et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 80: 229–36.
69. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 938: 83–95.
70. Bhakta S., Hong P., Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc. Revasc. Med.* 2006; 7(1): 19–24.
71. Zhang D., Fan G.C., Zhou X. et al. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008; 44(2): 281–92.
72. Abraham M.R., Henrikson C.A., Tung L. et al. Antiarrhythmic Engineering of Skeletal Myoblasts for Cardiac Transplantation. *Circ Res.* 2005; 97(2): 159–67.
73. Menasché P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007; 50(1): 7–17.
74. Abraham M.R., Henrikson C.A., Tung L. et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res.* 2005; 97(2): 159–67.
75. Cao B., Bruder J., Kovacs I. et al. Muscle stem cells can act as antigen-presenting cells: implication for gene therapy. *Gene Ther.* 2004; 11(17): 1321–30.
76. Cordier L., Gao G.P., Hack A.A. et al. Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther.* 2001; 12(2): 205–15.
77. Wiendl H., Mitsdoerffer M., Hofmeister V. et al. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 2003; 126(Pt 1): 176–85.
78. Mocini D., Colivicchi F., Santini M. Stem cell therapy for cardiac arrhythmias. *Ital Heart J.* 2005; 6(3): 267–71.
79. Rosen M.R., Brink P.R., Cohen I.S. et al. Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovasc. Res.* 2004; 64(1): 12–23.
80. Potapova I., Plotnikov A., Lu Z. et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ. Res.* 2004; 94(7): 952–9.
81. Tomita Y., Makino S., Hakuno D. et al. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2007; 45(2): 209–20.

Поступила: 15.03.2010