УДК 616-72

ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В ОБЛАСТИ РАЗРАБОТКИ ГЕН-ВЫДЕЛЯЮЩИХ КОРОНАРНЫХ СТЕНТОВ

Н. С. ФАТТАХОВ[1], Д. И. КУЛИКОВ[2], Л. С. ЛИТВИНОВА[1]

[1]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта». Калининград, Россия

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова». Санкт-Петербург, Россия

В настоящем обзоре систематизированы основные современные разработки и достижения в области ген-выделяющих стентов; обсуждены их преимущества и недостатки как потенциальной альтернативы непокрытым металлическим стентам и стентам, выделяющим лекарства. Рассмотрены основные стратегии оптимизации, необходимые для перевода основанных на применении ген-выделяющих стентов технологий из экспериментальной сферы в клиническую медицину.

Ключевые слова: ген-выделяющий стент, ген, рестеноз, вектор, ишемическая болезнь сердца, чрескожное коронарное вмешательство.

ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS IN THE FIELD OF GENE-ELUTING CORONARY STENTS

N. S. FATTAKHOV[1], D. I. KULIKOV[2], L. S. LITVINOVA[1]

[1]Immanuel Kant Baltic Federal University. Kaliningrad, Russia

[2]North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov. Saint-Petersburg, Russia

In this paper, we summarize the main recent developments and achievements in the field of gene-eluting stents, their advantages and disadvantages as a potential alternative to the bare metal stents and drug-eluting stents are discussed. The basic optimization strategies required for the translation of technologies based on the use of gene-eluting stents from experimental sphere to clinical medicine are examined.

Key words: gene-eluting stent, restenosis, vector, coronary heart disease, percutaneous coronary intervention.

Введение

Для лечения ишемической болезни сердца (ИБС) в зависимости от симптоматики, функциональной и анатомической сложности поражений может применяться либо только оптимальная медикаментозная терапия (ОМТ), либо ОМТ в сочетании с реваскуляризацией путем чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ) или аортокоронарное шунтирование (АКШ). Коронарное стентирование является разновидностью ЧКВ и рассматривается как менее инвазивная процедура по сравнению с АКШ. Несмотря на то что феноменальные достижения в области конструкций и материалов стентов улучшили результаты ЧКВ, по-прежнему остаются существенные недостатки, которые требуют внимания.

В настоящее время на рынке существуют два основных типа коронарных стентов: непокрытые металлические стенты (НМС) и стенты, выделяющие лекарства (СВЛ). СВЛ были разработаны как способ решения проблем, связанных с использованием НМС, таких как гиперплазия неоинтимы, ведущая к внутристентовому рестенозу. Однако применение СВЛ привело к другим проблемам, например, позднему тромбозу стента, который является серьезным и летальным осложнением [1]. В итоге возникает необходимость длительной двойной антитромбоцитарной терапии, являющейся значительной проблемой для пожилого населения [2]. Проблема неизбирательного характера цитостатических и цитотоксических препаратов, используемых в СВЛ, также имеет место. Кроме того, в настоящее время для СВЛ не предусмотрено возможностей для корректировки дозы препарата и кинетики его высвобождения, соответствующей состоянию патологических сосудов. Разработка полимерных покрытий стентов, обеспечивающих надежную доставку лекарствен-

ных веществ, и предсказуемое рассасывание полимерного биодеградируемого материала для контролируемого высвобождения препаратов требует значительных улучшений.

Развитие эффективных терапевтических стратегий для предотвращения и ингибирования рестеноза после ЧКВ имеет решающее значение для лечения ИБС. ГВС открывают перспективы преодоления некоторых биологических и технических проблем, присущих эндоваскулярным технологиям с применением НМС и СВЛ.

Концепция ген-выделяющих стентов

Использование специальных катетеров для доставки генно-инженерных конструкций в стенку сосуда предшествовало стент-опосредованным технологиям для сосудистой генной терапии [3]. Первоначальные исследования обеспечили важную информацию о трансфицируемости клеток адвентиции, медии и интимы (неоинтимы) различных экспериментальных видов и позволили выделить несколько потенциальных молекулярных мишеней для предотвращения рестеноза [4]. Однако степень трансдукции сосудистой ткани даже со сложными катетерными устройствами остается недостаточной для внедрения сосудистой генной терапии в клиническую практику, в основном из-за короткого внутрисосудистого времени удерживания доставляемых терапевтических генов.

С развитием области генной терапии, основанной на применении коронарных стентов, становится очевидным, что для устойчивого ингибирования образования неоинтимы в стентируемых артериях одинаково важны все три основных элемента ГВС: терапевтический ген, вектор и система доставки. Требования, предъявляемые к конструкциям ГВС, имеют несколько сходных характеристик в отношении платформ, используемых в СВЛ. Во-первых, доставка терапевтических агентов в обоих типах стентов не должна быть скомпрометирована их размещением на распорках стента. Во-вторых, полимерная матрица, наносимая на распорки данных типов стентов, должна выдерживать механические растяжения, связанные с изменением диаметра стента во время развертывания. Растрескивание, шелушение и отслоение полимерного покрытия во время имплантации стента должно быть предотвращено, так как процессы после его развертывания приводят к нерегулярности в скорости высвобождения терапевтического агента и могут способствовать эмболизации. В-третьих, полимерная матрица должна быть высокобиосовместимой. Если она вызывает тромбогенную и воспалительную реакции, то они должны быть минимальными.

Однако есть несколько важных различий в проектных характеристиках СВЛ и ГВС. В то время как СВЛ были разработаны для того, чтобы обеспечивать замедленное высвобождение и доставку низкомолекулярных терапевтических средств в стенки сосуда в течение трех месяцев, это условие не является необходимым для ГВС. Это связано с тем, что популяции клеток в стентированной артерии, в которые доставляются терапевтические гены, способны производить и секретировать трансгенный продукт в течение длительного периода времени.

Векторы и системы доставки в ген-выделяющих стентах

Вектор – молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая для передачи генетического материала другим клеткам. Потенциальные клетки, которые могут быть мишенями в стенке кровеносного сосуда, включают эндотелиоциты, гладкомышечные клетки (ГМК), макрофаги и фибробласты. Другие неклеточные мишени включают в себя матричные металлопротеины и коллаген [5].

Минимально необходимая продолжительность стент-ассоциированной устойчивости вектора в его активной трансдукционной форме не совсем ясна. Так как в медии и неоинтиме пролиферация ГМК начинается не ранее, чем через одну неделю после развертывания стента в моделях человека и высших животных [6], то популяция клеток-мишеней пока еще не присутствует в момент повреждения сосудов. Этот факт доказывает, что по крайней мере наличие двух- или трехнедельного периода высвобождения вектора точно необходимо. Стоит учесть, что, в отличие от лекарственных препаратов с низкой молеклярной массой, которые часто стабилизированы матричной иммобилизацией, генные векторы (особенно на основе вирусов) уязвимы и теряют свою активность, если не защищены должным образом.

Использование «голых» плазмид в качестве векторов показало неэффективность генной трансдукции и усилия в этой сфере направлены на повышение стабильности плазмид путем добавления липосом и полимеров. Несмотря на то что эти стратегии защиты плазмид позволяют улучшить их проникновение в клетку, они также снижают целевое воздействие генно-инженерных конструкций. Данные многих исследований показали более высокую степень трансфекции макрофагов в стенку кровеносного сосуда в преклинической модели при использовании липосом с плазмидной ДНК [7]. Исследование стентов с многослойным покрытием на основе протамина сульфата и плазмидной ДНК,

кодирующей фактор роста гепатоцитов, продемонстрировало успешную доставку генетического материала в преклинической модели [8].

Аденовирусные (Ad) векторы являются двухцепочечными ДНК-векторами, которые входят в клетку путем эндоцитоза с помощью коксаки-аденовирусного рецептора. Этот вектор (большинство серотипов) показал эффективную трансдукцию как для делящихся, так и для неделящихся клеток. Другое преимущество Ad-векторов включает их способность нести большую ДНК. Хотя трансгенная экспрессия с этим вектором является устойчивой, особенно в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, его широкое применение ограничено из-за быстрого выведения после Т-клеточного иммунного ответа против Ad-векторов [9]. Кроме того, была показана эффективная трансдукция в ГМК стенки кровеносного сосуда до 28 дней при применении ГВС [7]. В исследовании Fishbein и его коллег прикрепление Ad-векторов к стентам с использованием гидролизуемых сшивающих агентов или полиаллиламина бисфосфоната продемонстрировало обнадеживающие результаты в культуре клеток [10].

Аденоассоциированные вирусы (AAV) являются одноцепочечными ДНК-векторами, которые имеют более 100 серотипов в природе. Они вызывают гораздо меньше воспалительных реакций и показали хорошую тропность к кардиоваскулярным клеткам, включая кардиомиоциты, ГМК и фибробласты. Вектор AAV9 показал значительные перспективы для эффективной генной трансдукции в предклинических моделях после внутривенного введения [11]. Стойкая трансдукция гена в ГМК с вектором AAV2 до 28 дней была выявлена в предклинических исследованиях ГВС [12].

Лентивирусные векторы – векторы, которые могут стабильно интегрироваться в геном хозяина с помощью обратной транскрипции, что теоретически может вызывать длительную и эффективную генную трансдукцию. Тем не менее на сегодняшний день этот вектор имеет ограничения для генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний из-за недостатка тропности и потенциальной способности к онкогенезу [13].

Для эффективной и безопасной доставки генов векторами в нужное место сосуда используются различные подходы, в том числе с применением специальных покрытий (табл. 1). В частности, поли(молочная-согликолевая) кислота (PLGA) и полиэтиленимин (PEI) на основе наноносителей (наноконтейнеры для направленной доставки веществ) продемонстрировали свою перспективность в качестве эффективных систем доставки [12, 14]. PLGA показала лучший результат по сравнению с PEI на основе наноносителей [12]. Ограничения наноносителей с PEI включают низкую биодеградируемость, противоречие между эффективностью трансфекции и цитотоксичностью, в то время как PLGA демонстрирует низкую скорость высвобождения и низкую эффективность инкапсуляции плазмидной ДНК. Тем не менее значительные улучшения в технологии наноносителей способствуют эффективной генной трансфекции, меньшей системной токсичности, простоте модификации и являются многообещающими в плане достижения лучших клинических результатов.

Таблица 1

Основные виды иммобилизации векторов на поверхности стентов

Вид	Преимущество	Недостаток
Нанесение на покрытие стента	Высокая загрузка векторов, простота расширения масштабов	Неадекватная кинетика высвобождения, полимер-индуцированное воспаление
Прикрепление к поверхности стента	Контролируемая скорость высвобождения, отсутствие воспаления	Низкая загрузка генных векторов
Стентовая загрузка in-situ с помощью магнитного нацеливания	Нет векторных потерь на пути к месту доставки, возможность повторной загрузки	Ограниченный выбор стентовых материалов, вопросы безопасности магнитных наночастиц

Терапевтические гены, доставляемые с помощью ген-выделяющих стентов

Внутристентовый рестеноз представляет собой многофакторное патологическое состояние. Факторы с доказанным патогенным влиянием на развитие рестеноза включают эрозию эндотелия, прямое повреждение медиальных ГМК, что приводит к измененному апоптозу в этих клетках, пролиферации и синтезу внеклеточного матрикса, формированию пристеночного тромба, воспалению и реакции организма на стент и его покрытие как на инородные тела [15]. Соответственно, число молекулярных мишеней, имеющих отношение к ингибированию или стимуляции сигнальных путей, изменяющихся в ходе развития внутристентового рестеноза, чрезвычайно высоко. В обзорах описано более чем 150 различных генов, вовлеченных в регуляцию рестеноза, которые выступают в качестве мишеней для генной терапии с применением ГВС [16]. Лишь не-

большая часть этих генов была исследована в различных моделях с ГЭС.

Гены, ингибирующие пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток, ремоделирование внутриклеточного матрикса

Серин/треонинкиназа Akt1, также известная как протеинкиназа B, является важным узлом сигнального пути, который интегрирует информацию от нескольких пролифиративных путей, в том числе от фосфатидилинозитол-3-киназы [17]. Ранее были установлены активация Akt1 во время созревания неоинтимы [18] и антирестенозная эффективность ингибирования Akt1 [19]. В недавних исследованиях Che и коллеги [20] применили методы координационной химии для достижения стабильного прикрепления дофамин-конъюгированной гиалуроновой кислоты на стенты с помощью связей, образованных между дофаминовыми остатками и ионами металлов на поверхности стента. Дополнительно такие стенты были модифицированы полиплексами из коротких интерферирующих РНК (миРНК), Akt1 и поперечно сшитого дисульфидными связями PEI. Замедленное высвобождение миРНК с поверхности стента наблюдалось как минимум в течение 72 часов in situ. В исследовании in vivo стенты с Akt1 и миРНК, имплантированные в кроличьи подвздошные артерии, уменьшали степень внутристентового рестеноза на 50 % через 4 недели после развертывания по сравнению с НМС [20].

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF), существующий в двух гомодимерных (PDGF-AA, PDGF-BB) и гетеродимерной (PDGF-AB) формах, является хорошо организованным митогеном для ГМК [21] и промиграционным хемоаттрактантом [22]. Было показано, что все три изоформы способствуют накоплению ГМК in vitro и in vivo, демонстрируя относительно низкую активность по отношению к эндотелиальным клеткам [23]. Поэтому низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназной активности рецептора PDGF [24], а также генная терапия механизмов ингибирования PDGF-триггерных сигнальных каскадов [25, 26] являются привлекательными направлениями для селективного ингибирования роста ГМК, не влияя на эндотелиальную клеточную регенерацию. С этой целью Li и соавторы [27] синтезировали фосфоротиоатные антисмысловые олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН), сохраняющие длину до 15 оснований и блокирующие образование PDGF, соединили их с PEI, сформировав тем самым полиплексы, которые были абсорбированы на гидрогелевые покрытия стентов. Имплантированные в коронарные артерии здоровых молодых свиней стенты, элюирующие данные антисмысловые ОДН, способствовали 50 %-ному снижению утолщения неоинтимы по сравнению со стентами, элюирующими бессмысленные (нонсенс) ОДН и покрытыми обычными гидрогелями [27]. Было также установлено, что в срезах артерий животных, которым были имплантированы стенты с антисмысловыми PDGF-A ОДН, через 28 дней после стентирования была полностью сформирована эндотелиальная выстилка, в то время как эндотелиализация в артериях животных с сиролимус-выделяющими стентами была неоднородной спустя такое же количество времени [27]. Кроме того, полная эндотелиализация стентированных коронарных артерий свиней и снижение рестеноза на 40 % наблюдались при установке стентов с фосфоротиоатной морфолино-антисмысловой конструкцией и полифосфорилхолиновым покрытием [28].

Неоинтима внутри стента в основном формируется за счет медиальных ГМК и адвентициальных миофибробластов, которые заполняют пространство интимы травмированной артерии. Ремоделирование матрикса, вызываемое травмой сосудов, делает возможной беспрепятственную миграцию этих клеточных популяций вдоль градиентов специфических хемоаттрактантов [29]. Следовательно, стабилизация внеклеточного матрикса может служить ограничением миграции ГМК к неоинтиме. В соответствии с этой идеей Johnson и его коллеги [30] полностью иммобилизировали суспензию Ad-вектора, кодирующего синтез тканевого ингибитора металлопротеиназы-3 (TIMP3), на стенты из нержавеющей стали с полифосфорилхолиновым покрытием. На 28-е сутки после имплантации стента в сонные артерии свиньи объем неоинтимы был уменьшен на 40 и 50 % у животных с Ad-TIMP3-выделяющими стентами по сравнению со свиньями, которым были установлены НМС [30].

Гены, препятствующие рекрутированию воспалительных клеток

Сразу после развертывания стента запускается острый воспалительный ответ в виде тромбоцитарных и фибриновых отложений, а также массового рекрутирования нейтрофилов в области сосудистой травмы за счет участия P-селектина и рецептора CD11b/CD18 [31, 32]. Через несколько дней повышающаяся продукция интерлейкина-6, интерлейкина-8 и моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) поврежденными ГМК и апоптотическими нейтрофилами привлекает

моноциты, которые переселяются в ткань и становятся резидентными макрофагами, обозначив таким образом стадию хронического воспаления. Макрофаги являются ключевым типом клеток, связывающих воспаление и образование неоинтимы, так как продуцируемые и секретируемые ими хемокины (фактор некроза опухоли, интерлейкин-1 бета) и факторы роста (PDGF, фактор роста фибробластов-2, инсулиноподобный фактор роста) стимулируют миграцию и пролиферацию медиальных ГМК и адвентициальных миофибробластов, которые вместе формируют неоинтиму [31, 32, 33]. Поэтому эффективное сдерживание воспалительной реакции является общепризнанной антирестенозной стратегией [34, 35].

В соответствии с этим терапевтическим подходом Egashira и коллеги [21] оценили эффективность стентов с плазмидной ДНК, кодирующей доминантный негативный вариант MCP-1. Стенты, развернутые в подвздошных артериях кроликов и макак с гиперхолестеринемией, приводили к снижению инфильтрации макрофагов примерно на 20 % в месте имплантации стента и ослаблению рестеноза на 20–30 % по сравнению с НМС [36].

Транскрипционный фактор NF-κB принимает участие в регуляции многочисленных воспалительных медиаторов. Ohtani и коллеги [19] исследовали антисмысловые ОДН к NF-κB, включенные в полиуретановое стентовое покрытие. Стенты с такими генно-инженерными конструкциями, развернутые в бедренные артерии кроликов с гиперхолестеринемией, продемонстрировали через 4 недели примерно 30 %-ное снижение утолщения неоинтимы по сравнению с НМС и стентами с полиуретановым покрытием, а на 3-й и 10-й дни после имплантации после стентирования наблюдалось значительное снижение экспрессии воспалительных маркеров [37].

Гены, ингибирующие образование тромбов в стентированных артериях

Тромбоциты являются первыми клеточными элементами, которые контактируют с поверхностью устанавливаемых стентов. Поскольку и пациенты, и экспериментальные животные, которым проводится стентирование, предварительно принимают антитромбоцитарные и антикоагулянтые препараты, то острая закупорка стентированных артерий редко является проблемой. Однако при коронарном стентировании неокклюзирующий пристеночный тромб все же образуется. Если пристеночный тромб сохраняется, он заполняется мигрирующими ГМК, тем самым способствуя быстрому росту неоинтимы.

В попытке свести к минимуму активацию тромбоцитов в месте имплантации стента Takemoto и другие исследователи [38] разработали ГВС с включенной в него плазмидной ДНК, кодирующий эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролазу (NTPDase), ключевой регулятор формирования тромбоцитарного тромба. Эта молекула представляет собой связанный с мембраной фермент, который локально гидролизует аденозинтрифосфат, препятствуя таким образом агрегации тромбоцитов. Плазмидная ДНК была абсорбирована в катионизированное желатиновое гидрогелевое покрытие на распорки стента. Имплантация стентов, выделяющих NTPDase, в кроличьей модели бедренного повреждения, которое характеризуется высокой скоростью образования тромба, предотвращала возникновение внутрисосудистых тромбов, в то время как у 25 и 50 % бедренных артерий, в которые были установлены стенты с контрольными ßGal плазмидами, была нарушена проходимость на 3-й и 7-й день после стентирования. Было также установлено значительное уменьшение степени раннего рестеноза (на 7-й день) в сосудах со стентами с указанным ферментом в данном эксперименте [38].

Гены, повышающие продукцию оксида азота

Оксид азота (NO), побочный продукт ферментативного превращения L-аргинина в L-цитруллин, является одной из ключевых сигнальных молекул в сосудистом гомеостазе. Было показано, что увеличение продукции NO и его доступности предотвращает агрегацию тромбоцитов [39], ингибирует пролиферацию ГМК [40, 41], а также их миграцию [42], способствует росту эндотелия сосудов [43] и снижает экспрессию молекул клеточной адгезии эндотелием, подавляя проникновение активированных лейкоцитов в интиму артерий [44]. Кроме того, NO способствует жизнеспособности энотелиальных прогениторных клеток и повышает их способность регенерировать поврежденный эндотелий [45]. Плейотропный характер полезных действий NO позволяет рассматривать регуляцию его продукции в качестве приемлемой стратегии для предупреждения развития внутристентового рестеноза.

Антирестенозная активность генов эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) изоформ фермента NO-синтазы была исследована в животных моделях артериального повреждения с локальной доставкой генов, и в большинстве случаев были получены данные о сильных ингибирующих эффектах этих генов на образование неоинтимы

[46–48]. В исследованиях Sharif и коллег и [49] использовали стенты с полифосфорилхолиновым покрытием и Ad-eNOS-конструкциями для проверки гипотезы, что усиленная реэндотелизация и снижение рестеноза могут быть достигнуты в экспериментальной модели кролика с избыточной экспрессией eNOS, индуцированной ГВС. Авторы показали значительное восстановление эндотелиального слоя и уменьшение толщины неоинтимы у животных с гиперхолестеринемией с имплантированными Ad-eNOS-стентами, по сравнению с животными с контрольными Ad-βGal-выделяющими стентами и стентами с полифосфорилхолиновым покрытием. В попытке разработать ген-элюирующий стент на основе сверхэкспрессии eNOS, лишенный иммуногенных и провоспалительных Ad-белков, эта же группа ученых [7] недавно сообщила о препарате на основе липофектина, содержащего плазмиды с человеческой eNOS. Десять микрограммов такого липоплексного состава были равномерно нанесены на стенты с полифосфорилхолиновым покрытием. ГВС с невирусными векторами были развернуты в подвздошных артериях кроликов с гиперхолестеринемией и обеспечивали уровни экспрессии eNOS, сравнимые с ГВС, содержащими Ad-векторы. Существенного снижения показателей рестеноза в данном исследовании не наблюдалось. Авторы объясняют это расхождение тем, что липосомальные конструкции нацелены в первую очередь на популяцию макрофагов в пораженной артерии, а не ГМК.

В противоположность этому, используя аналогичную экспериментальную модель кролика для терапевтической оценки стентов, выделяющих липоплексы с eNOS, Brito с коллегами [46] продемонстрировали 30 %-ное снижение рестеноза, сопровождающееся снижением пролиферации на 50 % при имплантации таких стентов, по сравнению с контролем без векторов. Разница в дозе вектора (10 мкг против 25 мкг) и системах доставки, использованных в этих двух исследованиях, может объяснять различные результаты, подчеркивая важность надлежащих фармацевтических аспектов для выявления полного терапевтического потенциала ГВС.

В эксперименте на крысиных моделях было продемонстрировано, что использование генетических конструкций Ad-iNOS, иммобилизованных на поверхности ММС и стентов с полиаллиламин бисфосфонатом с помощью аффинных адаптеров [50] и гидролизуемых поперечных сшивок (линкеров) [51], приводило к 50- и 60 %-ному снижению неоинтимального утолщения по сравнению с артериями с имплантированными в них ММС. Недавние исследования, в которых оценивали синтез NO и продукцию активных форм кислорода в культивируемых ГМК и эндотелии, трансдуцированном векторами Ad-iNOS и привязанном к дискам из нержавеющей стали, показали, что сверхфизиологические уровни экспрессии iNOS, регулируемые иммобилизованными векторами, могут привести к разобщению iNOS и eNOS в связи с дефицитом аргинина и тетрагидробиоптерина [52]. Разобщенная форма NO-синтазы не может генерировать NO, продуцируя вместо него супероксид [53]. Если супероксид неффективно удаляется супероксиддисмутазой, то он запускает последовательность окислительно-восстановительных реакций, которые приводят к образованию множественных активных форм кислорода, вызывающих обширное повреждение ткани. Таким образом, применение фармакологических добавок с аргинином и тетрагидробиоптерином является хорошим инструментом для моделирования функции избыточно экспрессируемых изоформ NO-синтазы в артериальной стенке при применении соответствующих ген-элюирующих стентов.

Гены, стимулирующие реэндотелиализацию

С тех пор, как основополагающее исследование Asahara и соавторов [54], описывающее ингибирование рестеноза в крысиной модели с локально вводимым сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), было опубликовано (в 1995 году), стратегии, направленные на ослабление рестеноза за счет усиления реэндотелизации, вышли на первый план. Было показано, что ген человеческого VEGF-2 увеличивал реэндотелиализацию и снижал гиперплазию неоинтимы в предклинической модели с использованием ГВС на основе плазмид [55]. Индуцированная экспрессия VEGF приводила к росту и восстановлению эндотелия сосудов после повреждения. Также было показано, что повышение экспрессии гена простациклин-синтазы ускоряет реэндотелиализацию и предотвращает образования неоинтимы в травмированных баллоном артериях в предклинической модели [56]. Тем не менее этот эффект был замечен в сочетании с доставкой гена VEGF и вполне может быть связан с более поздней трансдукцией гена.

Направления дальнейших исследований

За последние два десятилетия многие преклинические исследования смогли подтвердить терапевтическое действие нескольких генов, а также продемонстрировать успешную и эффективную

доставку генов с использованием различных стратегий (табл. 2). Однако, несмотря на многообещающие результаты преклинических исследований ГВС, клинические испытания не показали аналогичный успех [1]. Это может быть связано с различиями в иммунных и воспалительных реакциях у моделей людей и животных, степени и скорости заживления участков повреждений в сосудистой стенке, а также зависеть от факторов, которые могут негативно влиять на уровни терапевтического переноса генов и объяснять тем самым отсутствие наблюдаемой клинической эффективности.

Таблица 2

Наиболее важные результаты исследований ген-выделяющих стентов

Достижения	Наиболее перспективные результаты
В области систем доставки	PEI- и PLGA на основе наноносителей
В области поиска генов-мишеней	Тканевый ингибитор металлопротеиназы-1 (TIMP-1). Ген ингибитора пути тканевого фактора (TFPI)
В области материалов	Гибридные стенты с VEGF плазмидой на наружной поверхности и паклитаксела во внутреннем ядре. Многослойные пленки для ген-элюирующего стентового покрытия
В области ингибирования рестеноза	Липоплекс-элюирующий стент с eNOS

Примечание. PLGA – поли(молочная-согликолевая) кислота; PEI – полиэтиленимин; VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза.

С учетом последних достижений вместо исследований на модельных животных все чаще используют 3D-клеточные культуры, или «органы-на-чипах». В контексте сердечно-сосудистых заболеваний и ЧКВ микроинженерная «артерия-на-чипе», которая способна имитировать микроструктуру, динамическую механическую микросреду, а также биохимические и функциональные свойства нативной коронарной артерии, была бы потенциально более лучшим предиктором клинических исходов, чем современные животные модели [57].

Будущие исследования должны быть сосредоточены на разработке методов повышения уровня специфической клеточной трансдукции/трансфекции. Комбинированная терапия, позволяющая высвобождение нескольких терапевтических агентов с различными механизмами действия (например, каждый из которых предназначен для разных регуляторных белков клеточного цикла или различных типов воздействия на рестеноз или тромбогенный процесс), также может стать возможным способом улучшения клинической эффективности.

Дальнейшая работа, связанная с оптимизацией всех трех основных компонентов ген-элюирующих стентов, должна быть сделана до того, как сосудистая генная терапия на основе стентов получит свое клиническое применение. В частности, адекватный неиммуногенный вектор (в идеале невирусный вектор) с надежным выделением и адекватным наведением на нужные клетки остается серьезной проблемой. Применение векторов на основе наноматериалов и таргетных лигандов к специфическим клеточным биомаркерам может быть потенциальным способом повышения доставки генно-инженерных конструкций в клетки-мишени с ограничением системной токсичности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Лупанов В. П.*, *Самко А. Н.*, *Бакашвили Г. Н.* Реальна ли угроза позднего тромбоза стента с лекарственным покрытием? Сравнение стентов с лекарственным покрытием. Фокус на эверолимус. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009; 8 (5): 80–91.

Lupanov V. P., *Samko A. N.*, *Bakashvili G. N.* Real′na li ugroza pozdnego tromboza stenta s lekarstvennym pokrytiem? Sravnenie stentov s lekarstvennym pokrytiem. Fokus na jeverolimus. Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika. 2009; 8 (5): 80–91.

2. *Лупанов В. П.*, *Самко А. Н.* Профилактика тромботических осложнений при чрескожных коронарных вмешательствах. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009; 8 (8): 85–96.

Lupanov V. P., *Samko A. N.* Profilaktika tromboticheskih oslozhnenij pri chreskozhnyh koronarnyh vmeshatel′stvah. Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika. 2009; 8 (8): 85–96.

3. *Гулевский А. К.*, *Абакумова Е. С.*, *Щенявский И. И.* Перспективы использования генной терапии в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Biotechnologia Acta. 2012; 5 (3): 18–32.

Gulevskij A. K., *Abakumova E. S.*, *Shhenjavskij I. I.* Perspektivy ispol′zovanija gennoj terapii v lechenii serdechno-sosudistyh zabolevanij. Biotechnologia Acta. 2012; 5 (3): 18–32.

4. *Шевченко Е. К.*, *Талицкий К. А.*, *Парфенов Е. В.* Перспективы повышения эффективности генной и клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: генетически модифицированные клетки. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010; 5 (2): 19–28.

Shevchenko E. K., *Talickij K. A.*, *Parfenov E. V.* Perspektivy povyshenija jeffektivnosti gennoj i kletochnoj terapii serdechno-sosudistyhzabolevanij: geneticheski modificirovannye kletki. Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija. 2010; 5 (2): 19–2.

5. *Yin R.-X.*, *Yang D.-Z.*, *Wu J.-Z.* Nanoparticle drug- and gene-eluting stents for the prevention and treatment of coronary restenosis. Theranostics. 2014; 4: 175–200. DOI:10.7150/thno.7210.

6. *Schwartz R. S.* Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling. Am. J. Cardiol. 1998; 81: 14–17.

7. *Sharif F.*, *Hynes S. O.*, *McCullagh K. J.*, *Ganley S.*, *Greiser U.*, *McHugh P.* et al. Gene-eluting stents: nonviral, liposome-based gene delivery of eNOS to the blood vessel wall in vivo results in enhanced endothelialization but does not reduce restenosis in a hypercholesterolemic model. Gene Ther. 2012; 19: 321–328. DOI:10.1038/gt.2011.92.

8. *Chang H.*, *Ren K. F.*, *Zhang H.*, *Wang J. L.*, *Wang B. L.*, *Ji J.* The (PrS/HGF-pDNA) multilayer films for gene-eluting stent coating: gene-protecting, anticoagulation, antibacterial properties, and in vivo antirestenosis evaluation. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. 2015; 103 (2): 430–439. DOI: 10.1002/jbm.b.33224.

9. *Kumar Singh R.*, *Chamberlain J. S.* Encapsidated adenovirus mini chromosomes allow delivery and expression of a 14KB dystrophin cDNA to muscle cells. Hum. Mol. Genet. 1996; 5: 913–921. DOI:10.1093/hmg/5.7.913.

10. *Fishbein I.*, *Forbes S. P.*, *Adamo R. F.*, *Chorny M.*, *Levy R. J.*, *Alferiev I. S.* Vascular gene transfer from metallic stent surfaces using adenoviral vectors tethered through hydrolysable cross-linkers. J. Vis. Exp. 2014; 90: 51653. DOI: 10.3791/51653.

11. *Xiao X.*, *Li J.*, *Samulski R. J.* Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated vectors. J. Virol. 1996; 70: 8098–8108.

12. *Sharif F.*, *Hynes S. O.*, *McMahon J.*, *Cooney R.*, *Conroy S.*, *Dockery P.* et al. Gene-eluting stents: comparison of adenoviral and adeno-associated viral gene delivery to the blood vessel wall in vivo. Hum Gene Ther. 2006; 17 (7): 741–750. DOI: 10.1089/hum.2006.17.741.

13. *Bonci D.*, *Cittadini A.*, *Latronico M. V.*, *Borello U.*, *Aycock J. K.*, *Drusco A.* et al. 'Advanced′ generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. Gene Ther. 2003; 10 (8): 630–636. DOI: 10.1038/sj.gt.3301886.

14. *Wang X.*, *Niu D.*, *Hu C.*, *Li P.* Polyethyleneimine-based nanocarriers for gene delivery. Curr. Pharm. Des. 2015; 21 (42): 6140–6156. DOI: 10.2174/1381612821666151027152907.

15. *Майлян Д. Э.*, *Афанасьев Ю. И.*, *Гагарина Д. О.*, *Майлян Э. А.* Современное состояние проблемы in-stent рестенозов. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2015. 30 (10): 5–12.

Majljan D. Je., *Afanas'ev Ju. I.*, *Gagarina D. O.*, *Majljan Je. A.* Sovremennoe sostojanie problemy in-stent restenozov. Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Medicina. Farmacija. 2015. 30 (10): 5–12.

16. *Винтизенко С. И.*, *Огородова Л. М.*, *Рукин К. Ю.*, *Петрова И. В.* Роль генетических факторов в механизмах развития ремоделирования коронарных артерий после имплантирования стентов. Бюллетень сибирской медицины. 2015; 14 (1): 102–109.

Vintizenko S. I., *Ogorodova L. M.*, *Rukin K. Ju.*, *Petrova I. V.* Rol′ geneticheskih faktorov v mehanizmah razvitija remodelirovanija koronarnyh arterij posle implantirovanija stentov. Bjulleten′ sibirskoj mediciny. 2015; 14(1): 102-109.

17. *Hers I.*, *Vincent E. E.*, *Tavaré J. M.* Akt signalling in health and disease. Cell. Signal. 2011; 23: 1515–1527.

18. *Zhou R. H.*, *Lee T. S.*, *Tsou T. C.*, *Rannou F.*, *Li Y. S.*, *Chien S.* et al. Stent implantation activates Akt in the vessel wall: role of mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003; 23: 2015–2020.

19. *Stabile E.*, *Zhou Y. F.*, *Saji M.*, *Castagna M.*, *Shou M.*, *Kinnaird T. D.* et al. Akt controls vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by delaying G1/S exit. Circ. Res. 2003; 93: 1059–1065.

20. *Che H. L.*, *Bae I. H.*, *Lim K. S.*, *Song I. T.*, *Lee H.*, *Muthiah M.* et al. Suppression of post-angioplasty restenosis with an Akt1 siRNA-embedded coronary stent in a rabbit model. Biomaterials. 2012; 33: 8548–8556.

21. *Fager G.*, *Hansson G. K.*, *Ottosson P.*, *Dahllof B.*, Bondjers. Human arterial smooth muscle cells in culture. Effects of platelet-derived growth factor and heparin on growth in vitro. Exp. Cell. Res. 1988; 176: 319–335.

22. *Grotendorst G. R.*, *Chang T.*, *Seppa H. E.*, *Kleinman H. K.*, *Martin G. R.* Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. J. Cell. Physiol. 1982; 113: 261–266.

23. *Kazlauskas A.*, *DiCorleto P. E.* Cultured endothelial cells do not respond to a platelet-derived growth-factor-like protein in an autocrine manner. Biochim. Biophys. Acta. 1985; 846: 405–412.

24. *Fishbein I.*, *Waltenberger J.*, *Banai S.*, *Rabinovich L.*, *Chorny M.*, *Levitzki A.* et al. Local delivery of plateletderived growth factor receptor-specific tyrphostin inhibits neointimal formation in rats. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20: 667–676.

25. *Deguchi J.*, *Namba T.*, *Hamada H.*, *Nakaoka T.*, *Abe J.*, *Sato O.* et al. Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury. Gene Ther. 1999; 6: 956–965.

26. *Lin Z. H.*, *Fukuda N.*, *Suzuki R.*, *Takagi H.*, *Ikeda Y.*, *Saito S.* et al. Adenovirus-encoded hammerhead ribozyme to PDGF A-chain mRNA inhibits neointima formation after arterial injury. J. Vasc. Res. 2004; 41: 305–313.

27. *Li Y.*, *Fukuda N.*, *Kunimoto S.*, *Yokoyama S.*, *Hagikura K.*, *Kawano T.* 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; 48: 184–190.

28. *Kipshidze N. N.*, *Iversen P.*, *Kim H. S.*, *Yiazdi H.*, *Dangas G.*, *Seaborn R.* et al. Advanced c-myc antisense (AVI-4126)-eluting phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with complete vascular healing and reduced neointimal formation in the porcine coronary restenosis model. Catheter Cardiovasc. Interv. 2004; 61: 518–527.

29. *Johnson C.*, *Galis Z. S.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004; 24: 54–60.

30. *Johnson T. W.*, *Wu Y. X.*, *Herdeg C.*, *Baumbach A.*, *Newby A. C.*, *Karsch K. R.* et al. Stent-based delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 adenovirus inhibits neointimal formation in porcine coronary arteries. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005; 25: 754–759.

31. *Chaabane C.*, *Otsuka F.*, *Virmani R.*, *Bochaton-Piallat M. L.* Biological responses in stented arteries. Cardiovasc. Res. 2013; 99: 353–363.

32. *Welt F. G.*, *Rogers C.* Inflammation and restenosis in the stent era. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002; 22: 1769–1776.

33. *Sarkar K.*, *Sharma S. K.*, *Sachdeva R.*, *Romeo F.*, *Garza L.*, *Mehta J. L.* Coronary artery restenosis: vascular biology and emerging therapeutic strategies. Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 2006; 4: 543–556.

34. *Inoue T.*, *Croce K.*, *Morooka T.*, *Sakuma M.*, *Node K.*, *Simon D. I.* Vascular inflammation and repair: implications for

re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. JACC. Cardiovasc. Interv. 2011; 4: 1057–1066.

35. *Danenberg H. D.*, *Fishbein I.*, *Gao J.*, *Mönkkönen J.*, *Reich R.*, *Gati I.* et al. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. Circulation. 2002; 106: 599–605.

36. *Egashira K.*, *Nakano K.*, *Ohtani K.*, *Funakoshi K.*, *Zhao G.*, *Ihara Y.* et al. Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007; 27: 2563–2568.

37. *Ohtani K.*, *Egashira K.*, *Nakano K.*, *Zhao G.*, *Funakoshi K.*, *Ihara Y.* et al. Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. Circulation. 2006; 114: 2773–2779.

38. *Takemoto Y.*, *Kawata H.*, *Soeda T.*, *Imagawa K.*, *Somekawa S.*, *Takeda Y.* et al. Human placental ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene transfer via gelatin-coated stents prevents in-stent thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009; 29: 857–862.

39. *Nong Z.*, *Hoylaerts M.*, *Van Pelt N.*, *Collen D.*, *Janssens S.* Nitric oxide inhalation inhibits platelet aggregation and platelet-mediated pulmonary thrombosis in rats. Circ. Res. 1997; 81: 865–869.

40. *Garg U. C.*, *Hassid A.* Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J. Clin. Invest. 1989; 83: 1774–1777.

41. *Groves P. H.*, *Banning A. P.*, *Penny W. J.*, *Newby A. C.*, *Cheadle H. A.*, *Lewis M. J.* The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell proliferation following porcine carotid angioplasty. Cardiovasc. Res. 1995; 30: 87–96.

42. *Sarkar R.*, *Meinberg E. G.*, *Stanley J. C.*, *Gordon D.*, *Webb R. C.* Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. Circ. Res. 1996; 78: 225–230.

43. *Papapetropoulos A.*, *García-Cardeña G.*, *Madri J. A.*, *Sessa W. C.* Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J. Clin. Invest. 1997; 100: 3131–3139.

44. *De Caterina R.*, *Libby P.*, *Peng H. B.*, *Thannickal V. J.*, *Rajavashisth T. B.*, *Gimbrone M. A.* et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J. Clin. Invest. 1995; 96: 60–68.

45. *Kong D.*, *Melo L. G.*, *Mangi A. A.*, *Zhang L.*, *Lopez-Ilasaca M.*, *Perrella M. A.* et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. Circulation. 2004; 109: 1769–1775.

46. *Brito L. A.*, *Chandrasekhar S.*, *Little S. R.*, *Amiji M. M.* Non-viral eNOS gene delivery and transfection with stents for the treatment of restenosis. Biomed. Eng. Online. 2010; 9: 56.

47. *Muhs A.*, *Heublein B.*, *Schletter J.*, *Herrmann A.*, *Rüdiger M.*, *Sturm M.* et al. Preclinical evaluation of inducible nitric oxide synthase lipoplex gene therapy for inhibition of stent-induced vascular neointimal lesion formation. Hum. Gene Ther. 2003; 14: 375–383.

48. *Wang K.*, *Kessler P. D.*, *Zhou Z.*, *Penn M. S.*, *Forudi F.*, *Zhou X.* et al. Local adenoviral-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits neointimal formation in the porcine coronary stented model. Mol. Ther. 2003; 7: 597–603.

49. *Sharif F.*, *Hynes S. O.*, *Cooney R.*, *Howard L.*, *McMahon J.*, *Daly K.* et al. Gene-eluting stents: adenovirusmediated delivery of eNOS to the blood vessel wall accelerates re-endothelialization and inhibits restenosis. Mol. Ther. 2008; 16: 1674–1680.

50. *Fishbein I.*, *Alferiev I. S.*, *Nyanguile O.*, *Gaster R.*, *Vohs J. M.*, *Wong G. S.* et al. Bisphosphonate-mediated gene vector delivery from the metal surfaces of stents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103: 159–164.

51. *Fishbein I.*, *Alferiev I.*, *Bakay M.*, *Stachelek S. J.*, *Sobolewski P.*, *Lai 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; 117: 2096–2103.

52. *Forbes S. P.*, *Alferiev I. S.*, *Chorny M.*, *Adamo R. F.*, *Levy R. J.*, *Fishbein I.* Modulation of NO and ROS production by AdiNOS transduced vascular cells through supplementation with L-Arg and BH4: Implications for gene therapy of restenosis. Atherosclerosis. 2013; 230: 23–32.

53. *Forstermann U.* Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2008; 5: 338–349.

54. *Asahara T.*, *Bauters C.*, *Pastore C.*, *Kearney M.*, *Rossow S.*, *Bunting S.* et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. Circulation. 1995; 91: 2793–2801.

55. *Walter D. H.*, *Cejna M.*, *Diaz-Sandoval L.*, *Willis S.*, *Kirkwood L.*, *Stratford P. W.* et al. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. Circulation. 2004; 110: 36–45. DOI: 10.1161/01.CIR.0000133324.38115.0A.

56. *Numaguchi Y.*, *Okumura K.*, *Harada M.*, *Naruse K.*, *Yamada M.*, *Osanai H.* et al. Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries. Cardiovasc. Res. 2004; 61: 177–185.

57. *Huh D.*, *Hamilton G. A.*, *Ingber D. E.* From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends. Cell. Biol. 2011; 21: 745−754.

Статья поступила 10.05.2016

Для корреспонденции:

Литвинова Лариса Сергеевна
Адрес: 236016, Калининград,
ул. Боткина, 3
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 – доб. 6631
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

For correspondence:

Litvinova Larisa
Address: 3, Botkina st., Kaliningrad,
236016, Russian Federation
Tel.: +7 (4012) 59-55-95 – ext. 6631
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru