

Возможные молекулярные механизмы функционирования плазмидных конструкций, содержащих ген VEGF

(КТТИ 2011;VI(3):24–28)

А.С. Григорян, К.Г. Шевченко

ОАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва

Some possible molecular mechanisms of VEGF encoding plasmids functioning

A.S. Grigorian, K.G. Schevchenko

Human Stem Cells Institute, Moscow

Гентерапевтические подходы к восстановлению перфузии ишемизированной ткани считаются весьма перспективными, однако до настоящего времени неизвестны все молекулярные механизмы, позволяющие плазмиде со встроенным терапевтическим геном проникнуть в клетку-мишень, и лежащие в основе положительных клинических эффектов терапии. В данном обзоре обсуждаются возможные молекулярные механизмы проникновения плазмидных конструкций, несущих ген ангиогенного фактора VEGF (vascular endothelial growth factor), в цитоплазму и ядро клетки-мишени, а также предлагаются способы повышения эффективности трансфекции клеток и экспрессии интересующего гена.

Ключевые слова: генная терапия, терапевтический ангиогенез, VEGF.

Введение. Гентерапевтические подходы к восстановлению перфузии ишемизированных тканей.

Клинический опыт

Генная терапия сердечно-сосудистых заболеваний в настоящее время одно из наиболее востребованных направлений исследований в области разработки новых систем лечения. Прежде всего это обусловлено большой социальной значимостью и широким распространением этой группы заболеваний. Как и в случае с онкологическими заболеваниями, генная терапия зачастую оказывается единственной альтернативой хирургическому вмешательству и (или) средством, существенно улучшающим результаты хирургического лечения. Различные клинко-анатомические формы атеросклероза, проявляющиеся такими состояниями как поражение миокарда в случае коронарной недостаточности, или мышц конечностей при хронической ишемии нижних конечностей, являются одной из самых важных мишеней при разработке гентерапевтических препаратов. Один из наиболее перспективных подходов к восстановлению кровоснабжения ишемизированной мышечной ткани — генная терапия, направленная на обеспечение роста новых кровеносных сосудов.

Как известно, ангиогенез начинается с миграции клеток эндотелия в межклеточное пространство в направлении закладываемого сосуда. Основными молекулярными факторами, инициирующими и контролирующими данный процесс, являются в большей степени различные виды сосудистых эндотелиальных факторов роста (vascular endothelial

Gene therapeutic approaches to the restoration of the ischemic tissue perfusion are considered very promising, but to this time the molecular mechanisms which allow the therapeutic gene encoding plasmid to transfect the target cell and underlie the positive clinical effects remain unknown. In this review the possible molecular mechanisms of the angiogenic factor VEGF encoding plasmid penetration into the cytoplasm and the nucleus of the target cell are discussed, and also the methods for better transfection and the gene of interest expression are proposed.

Key words: gene therapy, therapeutic angiogenesis, VEGF.

growth factor — VEGF), в меньшей степени — фибробластические факторы роста (fibroblast growth factor — FGF). Таким образом, перенос генов данных факторов в клетки сосудов ишемизированной ткани может инициировать их рост и развитие [1, 2]. К настоящему времени несколько вариантов этих генов (VEGF165 и VEGF121; FGF1 и FGF4) прошли I и II фазы клинических испытаний в качестве терапевтических агентов [3, 4], причем убедительно показано, что как при ишемии конечностей, так и при ишемии миокарда препараты на основе VEGF165 безусловно лидируют как по критериям безопасности, так и по эффективности [5].

Основная проблема современной генной терапии, препятствующей ее внедрению в клиническую практику, — достижение оптимального баланса между безопасностью гентерапевтического вектора и его эффективностью. Кратко перечислим наиболее перспективные типы векторов с точки зрения безопасности и эффективности их широкого использования в клинической практике.

Все использующиеся на данный момент гентерапевтические векторы можно разделить на вирусные и невирусные. Вирусные векторы — наиболее распространенное средство доставки терапевтической ДНК в клетки. Более чем в 60% одобренных протоколов генной терапии в период с 1989 по 2010 гг. в качестве средства доставки использовались вирусные векторы (по данным Wiley Interscience Gene Therapy Trials Database [6]). Их основные преимущества: высокая эффективность и специфичность переноса трансгена. Общий недостаток вирусных

e-mail: cell_therapy@mail.ru

систем доставки — высокий риск возникновения побочных эффектов, связанный со сравнительно высокой иммуногенностью самого вектора, а также с малой предсказуемостью индивидуальной реакции иммунной системы пациента на вирус. Вследствие этого в последние годы наметилась тенденция к отходу от использования вирусных систем доставки.

Наиболее часто в настоящее время (протоколы клинических испытаний 2007–2010 гг.) в качестве вектора используются следующие типы вирусов: аденовирусы (в 20% протоколов), MVA (модифицированный вирус натуральной оспы, первоначально применявшийся для вакцинации, — 12%), ретровирусы (11%) и аденоассоциированные вирусы (8%) (Wiley Interscience Gene Therapy Trials Worldwide Database [6]).

Основные преимущества аденовирусных векторов: высокая эффективность переноса ДНК в различные типы как делящихся, так и неделящихся клеток, а также сравнительно низкая иммуногенность и невозможность возникновения инсерционного мутагенеза, т.е. данные вирусные конструкции не встраиваются в геном [7]. Вход вируса в клетку осуществляется путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Далее вирусная ДНК высвобождается и выходит из эндосомы и проникает в ядро клетки благодаря собственным инфекционным механизмам. В ядре вирусная ДНК существует в форме эписомы, т.е. не интегрирует в геном клетки-хозяина. Однако, несмотря на высокую эффективность аденовирусов как вектора для доставки генетического материала в клетки, существует высокий риск развития воспалительных реакций и токсического поражения различных органов [4, 8–10].

Применительно к проблемам терапевтического ангиогенеза следует учитывать, что немодифицированные аденовирусы не способны инфицировать мышечные волокна и эндотелиальные клетки [11]. В настоящее время наблюдается постепенное угасание интереса к аденовирусам, как к перспективным векторам для генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Наибольшей эффективностью доставки трансгена обладают ретровирусные векторы, так как они способны встраивать терапевтический ген в геном клетки-хозяина и таким образом обеспечивать его долгосрочную и стабильную экспрессию. Это свойство наиболее востребовано в генной терапии моногенных заболеваний. Однако использование данного типа носителей сопряжено с высоким риском возникновения побочных эффектов, связанных со случайным встраиванием вирусных генов в геном клетки-хозяина и возможной активацией протоонкогенов [12]. Кроме того, ретровирусы способны инфицировать только активно делящиеся клетки, а потому крайне неудобны и небезопасны для генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Основными преимуществами MVA перед остальными вирусными векторами: возможность переноса ДНК большого размера, низкая иммуногенность вируса. Основным недостатком состоит в низкой эффективности трансфекции: время экспрессии трансгена составляет всего 24 ч после введения [13]. По этой причине, в основном MVA используется в качестве носителя при ДНК-вакцинации.

Наиболее безопасной и эффективной стратегией переноса нужного гена в клетки-мишени является

использование невирусных систем, в частности, плазмид.

Плазмиды — небольшие экстрахромосомные кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК, обнаруживаемые в клетках бактерий и давно ставшие одним из самых распространённых инструментов генной инженерии [14]. Плазмидный вектор содержит несколько компонентов: ориджин репликации, необходимый для репликации плазмиды в бактериальной клетке, маркерный ген устойчивости к одному или нескольким антибиотикам (канамицину, ампициллину и проч.), искусственно вносимый в плазмиду для селекции содержащих её клонов бактерий, а также один или более трансгенов, которые должны экспрессироваться в трансфицируемой клетке-мишени (трансгены включают нуклеотидные последовательности интересующих генов, а также все генетические элементы, необходимые для их успешной репликации — энхансеры, промотеры и проч.).

ДНК обладает большим молекулярным весом и несёт отрицательный электрический заряд, а потому не способна спонтанно проникать сквозь фосфолипидные мембраны клеток, и эффективность трансфекции так называемой «голой», ничем не защищенной ДНК, крайне низка. Исследователи постоянно ищут новые методы повышения эффективности трансфекции, разрабатывая различные «катионные» способы доставки ДНК в клетки в комплексе с такими агентами, как фосфат кальция и диэтиламиноэтил целлюлоза, создавая липофильные/гидрофобные комплексы, эндоцитируемые клетками [15–19], а также воздействуя на трансфицируемые клетки различными физическими и химическими факторами, повышающими проницаемость мембран [20, 21]. Большинство этих экспериментальных подходов применимо лишь для трансфекции клеток в культурах *in vitro*, либо они слишком сложны, чтобы войти в рутинную клиническую практику, однако часть из них все же нашла применение и при доставке генов в клетки ишемизированной ткани [2, 22, 23].

В клинической практике в большинстве случаев суспензия плазмиды вводится пациентам либо внутримышечно [24, 25], либо интраартериально [26–28]. В обоих случаях у пациентов отмечается экспрессия трансгена в мышечных волокнах поражённой ткани, повышение концентрации продуцируемого белка, в частности — VEGF, и улучшение перфузии ткани за счёт развития новых капилляров. Внутримышечная инъекция считается более предпочтительной, поскольку не требует катетеризации крупных сосудов [29].

Впервые данный подход был назван «многообещающим» еще в 1981 г. [30], а первые клинические испытания генотерапевтического подхода к восстановлению перфузии мышечной ткани были начаты в 1994 г. [27, 31]. Позднее плазмиды, несущая ген VEGF165, вводилась пациентам с незаживающими трофическими язвами на ногах, не поддающимися хирургическому лечению. Результаты оказались авторам весьма обнадеживающими: у пациентов был отмечен ангиогенез в ишемизированных областях, а также резкое снижение частоты болей в покое [32, 33]. Однако за истекшие два десятилетия ни один ангиогенный генотерапевтический препарат до сих пор не был введён в широкую клиническую практику. Важная причина этого — недостаточная изученность

механизмов действия эффективных плазмидных конструкций*.

Проникновение плазмидных генотерапевтических конструкций в клетки-мишени

Первое препятствие, которое преодолевает плазида с встроенным терапевтическим геном, — плазматическая мембрана трансфецируемой клетки. Считается, что плазмиды проникают в клетки посредством эндоцитоза [34]. Существует несколько разновидностей эндоцитоза: клатрин-опосредованный эндоцитоз (адсорбционный или рецептор-опосредованный), эндоцитоз в области липидных рафтов мембраны (связанный либо не связанный с формированием caveол), фагоцитоз и макропиноцитоз. Однако во всех случаях после поглощения материала из внеклеточного пространства он подвергается последующей деградации в лизосомах (подробный анализ различных механизмов эндоцитоза и методик, направленных на защиту терапевтических генов от лизосомальной деградации, см. в обзоре [34]).

В случае плазмид следует предполагать, что они накапливаются преимущественно в многочисленных клетках мышечного окружения, поскольку сами мышечные волокна, как считается, не способны к эндоцитозу [35]. В некоторых клинических исследованиях суспензия плазмиды вводилась в кровеносное русло, значит можно предположить, что захват плазмид осуществляется клетками эндотелия сосудов, которые способны к трансцитозу: при нём не происходит лизосомальной деградации поглощённого материала, и эндоцитозные пузырьки служат для транспортировки веществ с одной поверхности клетки на другую [36]. Однако при трансцитозе не происходит высвобождения поглощённого материала в цитоплазму клетки, а потому его нельзя рассматривать как возможный механизм трансфекции.

Как альтернативный вариант проникновения плазмиды через плазматическую мембрану клеток можно предположить механизм так называемой гидродинамической трансфекции [37]. В общем случае гидродинамическая трансфекция — это метод доставки интересующих генетических конструкций, а также различных белков и искусственных соединений в клетки тканей живого организма путём контролируемого повышения давления в капиллярах и межклеточной жидкости, что вызывает кратковременное повышение проницаемости клеточных мембран и образование в них временных пор. Этот механизм получил название гидропорации [38].

Впервые гидродинамическая трансфекция была описана в экспериментах по доставке ДНК в ткани животных в 90-х гг. XX в. Исследователи из группы V. Budker et al. (1998) продемонстрировали успешную доставку плазмид в клетки скелетной мускулатуры крыс путём быстрого введения суспензии плазмидной ДНК в бедренную артерию животных

[39]. Позже была разработана гидродинамическая система доставки «голой» ДНК в скелетную мускулатуру мышей [40, 41]. С тех пор гидродинамическая трансфекция применяется в фундаментальных и доклинических исследованиях на животных для доставки в ткани молекул ДНК и РНК, а первое сообщение о клиническом тесте гидродинамической трансфекции появилось в 2006 г. [42].

Гидродинамическая доставка генного материала в клетку — неспецифический процесс, не зависящий от используемого носителя терапевтического гена. С равным успехом в клетку может быть доставлен плазмидный или же, например, аденовирусный вектор [43–45]. Единственное условие, необходимое для успешной гидродинамической трансфекции — быстрое введение суспензии в организм, что необходимо для образования пор в мембранах клеток. Эффективность трансфекции зависит от нескольких физических параметров: от характеристик мембран того или иного типа клеток и от скорости введения суспензии [38]. При медленном введении препарата, осуществлявшемся в проведённых на сегодняшний день клинических испытаниях доставки в мышцы плазмид, содержащих ген фактора VEGF, также могла происходить гидродинамическая трансфекция отдельных клеток, однако с низкой эффективностью, о которой и сообщали авторы исследований [46].

Было проведено несколько экспериментальных работ, в которых была показана эффективная и безопасная доставка плазмидной ДНК в скелетную мускулатуру [39, 46–51] и в миокард [52, 53] путём быстрого введения плазмид в кровоток либо непосредственно в мышечную ткань. При этом эффективность трансфекции мышечных волокон, например, при введении суспензии плазмиды в скелетную мускулатуру крупных животных (свиней), составила от 22 до 60% (т.е. в 22–60% мышечных волокон мышцы, в которую производилась инъекция, была зарегистрирована экспрессия трансгена) [48]. Это очень высокая эффективность в сравнении с обычной инъекцией суспензии плазмид.

Если гипотеза о гидродинамическом проникновении плазмид, несущих ген фактора VEGF в мышечные волокна, верна, то метод гидродинамической трансфекции может стать идеальным для клинической практики. Во всех экспериментальных работах было показано, что он безопасен и пригоден для неоднократного применения.

Проникновение плазмид, несущих терапевтический ген, в ядро клетки

Ядерная мембрана клетки является вторым препятствием, которое должна преодолеть плазида с встроенным в неё терапевтическим геном. В экспериментах *in vitro* было показано, что экспрессия генов, встроенных в плазмиды, происходит гораздо активнее при микроинъекции плазмид непосредственно в ядро клетки, нежели чем при микроинъекции в цитоплазму

* В настоящее время в мире по данным Национальных Институтов Здоровья США (<http://www.ClinicalTrials.gov/>) ведётся небольшое число клинических испытаний с применением генной терапии при помощи фактора VEGF. В исследовании «NOGA angiogenesis revascularization therapy: evaluation by radionuclide imaging — the Northern Trial» (идентификатор на сайте: NCT00143585; II и III фазы), начатом в 2005 г., 120 пациентам с тяжелой ишемической стенокардией производятся интрамиокардиальные инъекции суспензии плазмиды, несущей ген фактора VEGF165. В другом исследовании («Angiogenesis using VEGF-A165/bFGF plasmid delivered percutaneously in no-option CAD patients; a controlled trial (VIF-CAD)», идентификатор на сайте: NCT00620217; фаза II), 52 пациентам с ишемической болезнью сердца и сердечной недостаточностью проводятся интрамиокардиальные инъекции суспензии плазмиды, несущей гены двух ангиогенных факторов — VEGF165 и bFGF. Исследование начато в 2008 г.

му [54]. Слабая экспрессия плазмид, внесённых в цитоплазму клетки, показывает, что часть их проникает в ядро, однако механизм, лежащий в основе этого процесса, остаётся неясным.

Ядерная мембрана, состоящая, как и плазмолемма, из двух фосфолипидных слоёв, содержит большое количество ядерных поровых комплексов, состоящих из белков нуклеопоринов и имеющих диаметр от 60 до 120 нм, в зависимости от типа клеток. Нуклеопорины и ассоциированные с ними белки транспортируют ионы, белки, РНК и рибонуклеопротеины как из ядра в цитоплазму, так и из цитоплазмы в ядро. Небольшие молекулы весом до 30–35 кДа свободно диффундируют через ядерные поры, однако крупные молекулы весом свыше 40 кДа транспортируются с затратами энергии АТФ; также для эффективного транспорта из цитоплазмы в ядро молекула должна нести так называемый сигнал ядерной локализации (или NLS-сигнал, от nuclear localisation sequence) [55].

Молекулярный вес плазмид слишком велик, чтобы они могли свободно диффундировать через ядерные поры [56]. К настоящему времени был проведён ряд экспериментальных работ, в которых была показана эффективная транспортировка экзогенного генетического материала в ядро клетки благодаря присоединению к плазмиде различных NLS-сигналов (подробный обзор работ в данном направлении и механизмов присоединения NLS-сигналов к плазмидной ДНК см. в обзоре 55).

Существует вероятность проникновения плазмиды в ядро при нарушении целостности ядерной мембраны в процессе митотического деления. Относительно терапевтического ангиогенеза подобное объяснение применимо лишь к клеткам эндотелия капилляров, фибробластам, присутствующим в соединительнотканых оболочках мышечных волокон и миоцелллитам [35]. В то же время, в ряде экспериментов было показано проникновение плазмидной ДНК из цитоплазмы в ядра мышечных волокон экспериментальных животных [57], однако механизм этого процесса остаётся неясным.

Экспрессия плазмиды в трансфицированной клетке

Плазмиды, в отличие от ретровирусов, не интегрируются в геном клетки-реципиента и существуют в ядре в виде экстрахромосомной ДНК, а экспрессия терапевтического гена происходит за счёт собственных транскрипционных и трансляционных механизмов клетки. Данный механизм лежит в основе подходов, используемых для регуляции экспрессии

терапевтических трансгенов, в том числе и ангиогенных. Во взрослом организме ангиогенез происходит лишь в редких случаях, и его основным индуктором является нехватка кислорода в тканях. Основной молекулой, задействованной в этом процессе, является транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia inducible factor-1 или индуцируемый при гипоксии фактор-1).

В случае кислородного голодания в клетке происходит накопление фактора HIF-1, который, связываясь с последовательностями HRE (hypoxia response elements), содержащимися в энхансерах генов ангиогенных факторов, индуцирует продукцию соответствующих белков, в том числе и VEGF [58–60].

Существуют экспериментальные работы, в которых для усиления экспрессии терапевтического гена в ишемизированной ткани в плазмидную конструкцию было встроено несколько копий последовательности HRE в комбинации со слабым тканеспецифичным промотором [61–63]. Таким образом были достигнуты две цели: во-первых, терапевтический ген экспрессировался строго в ишемизированной ткани, что исключало его нежелательную экспрессию в неповрежденных гипоксией тканях [64], и, во-вторых, терапевтический ген экспрессировался в ишемизированной ткани достаточно активно.

Заключение

Понимание молекулярных механизмов ангиогенеза при помощи генной терапии необходимо для успешного внедрения этого метода в клиническую практику. Именно с продуктивным синтезом фундаментальных и клинических исследований связан прогресс в развитии генной терапии.

Активная проверка и внедрение высокоэффективной гидродинамической трансфекции позволит отказать от разработки таких систем доставки, как, например, полиплексы и липоплексы, существенно усложняющих процедуру получения препарата и до сих пор не применявшихся в клинических исследованиях [34]. Небезынтересным подходом может стать разработка эффективного метода доставки плазмидной ДНК в ядро клетки, в частности, обеспеченная присоединением к плазмиде сигналов ядерной локализации [55].

Несмотря на имеющиеся пробелы в изучении механизмов действия безопасных плазмидных конструкций, они на сегодняшний день являются наиболее востребованными в генной терапии соматических заболеваний, тем более, что несут существенный потенциал к модификациям и сочетанию с иными методиками, повышающими эффективность патогенетического лечения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003; 9: 669–76.
2. Ferraro B., Cruz Y.L., Baldwin M., Coppola D., Heller R. Increased perfusion and angiogenesis in a hindlimb ischemia model with plasmid FGF-2 delivered by noninvasive electroporation. *Gene Therapy* 2010; 17: 763–9.
3. Nikol S. Viral or non-viral angiogenesis gene transfer – New answers to old questions. *Cardiovasc. Res.* 2007; 73: 443–5.
4. Sylven C. Angiogenic gene therapy. *Drugs of today* 2002; 38: 819–27.
5. Деев Р.В., Григорян А.С., Потапов И.В. и др. Мировой опыт и тенденции генной терапии ишемических заболеваний. *Ангиология и сосуд. хирургия* 2011; 17 (2): 145–54.
6. Wiley Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

7. Douglas J. Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol. Biotechnol.* 2007; 36 (1): 71–80.
8. Yang Y., Wilson J.M. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I restricted CD4⁺ CTLs in vivo. *J. Immunol.* 1995; 155: 2564–9.
9. Melillo G., Scoccianti M., Kovesdi I. et al. Gene therapy for collateral vessel development. *Cardiovasc. Res.* 1997; 35: 480–9.
10. Williams P.D., Ranjzad P., Kakar S.J. Development of viral vectors for use in cardiovascular gene therapy. *Viruses* 2010; 2: 334–71.
11. Harris J.D., Lemoine N.R. Strategies for targeted gene therapy. *Trends Genet.* 1996; 12: 400–5.
12. Sinn P.L., Sauter S.L., McCray P.B. Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Therapy* 2005; 12: 1089–98.

13. Gomez C.E., Najera J.L., Krupa M., Esteban M. The Poxvirus Vectors MVA and NYVAC as Gene Delivery Systems for Vaccination Against Infectious Diseases and Cancer. *Current gene therapy* 2007; 8 (2): 97–120.
14. Klingmüller W. Bacterial resistance factors as vectors for gene manipulation and gene therapy. *MMW Munch Med. Wochenschr.* 1975; 117: 1051–60.
15. Remy J.S., Sirlin C., Vierling P., Behr J.P. Gene transfer with a series of lipophilic DNA binding molecules. *Bioconjug. Chem.* 1994; 5: 647–54.
16. San H., Yang Z.Y., Pompili V.J. et al. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 1993; 4: 781–8.
17. Puyal C., Milhaud P., Bienvenue A., Philippot J.R. A new cationic liposome encapsulating genetic material: A potential delivery system for polynucleotides. *Eur. J. Biochem.* 1995; 228:697–703.
18. Merwin J.R., Noell G.S., Thomas W.L. et al. Targeted delivery of the DNA using YEE (GalNAcAH)3, a synthetic glycopeptide ligand for the glycoprotein receptor. *Bioconjug. Chem.* 1994; 5: 612–20.
19. Huang N., Khan A., Ashrafpour H. et al. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2009; 297: H905–10.
20. Heller L.C., Ugen K., Heller R. Electroporation for targeted gene transfer. *Exp. Opin. on Drug Delivery* 2005; 2: 255–68.
21. Lawrie A. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Therapy* 2000; 7: 2023–7.
22. Khan T.A., Selke F.W., Laham R.J. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Therapy*. 2003; 10: 285–91.
23. Negishi Y., Matsuo K., Endo-Takahashi Y. et al. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm. Res.* 2011; 28 (4): 712–9.
24. Baumgartner I., Rauh G., Pieczek A. et al. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann. Intern. Med.* 2000; 132: 880–4.
25. Rauh G., Gravereaux E., Pieczek A. et al. Assessment of safety and efficiency of intramuscular gene therapy VEGF-2 in patients with critical limb ischemia. *Circul.* 1999; 100: 1–770.
26. Riessen R., Rahimizadeh H., Blessing B. et al. Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon. *Hum. Gene. Ther.* 1993; 4: 749–55.
27. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R. et al. Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370–4.
28. Laitinen M., Hartikainen J., Hiltunen M.O. et al. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum. Gene Ther.* 2000; 11: 263–70.
29. Azrin M. Angiogenesis, protein and gene delivery. *Brit. Med. Bull.* 2001; 59: 211–25.
30. Anderson W.F. Gene therapy. *J. Am. Med. Association* 1981; 246: 2737–9.
31. Isner J.M., Walsh K., Symes J. et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1995; 91: 2687–92
32. Isner J.M. Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 30: 185–97.
33. Isner J.M., Vale P.R., Symes J.F., Losordo D.W. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ. Res.* 2001; 89: 389–400.
34. Morille M., Passirani C., Vonarbourg A. et al. Progress in developing cationic systems for non-viral vector systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008; 29: 3477–96
35. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. М.: СОТИС 2002; с. 402–17.
36. Заварзин А.А., Харазова А.Д., Молитвин М.Н. Биология клетки. СПб: Издательство С.-Петербургского университета 1992; 87–9.
37. Suda T., Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol. Ther.* 2007; 15: 2063–9.
38. Zhang G., Gao X., Song Y.K. et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.* 2004; 11: 675–82.
39. Budker V., Zhang G., Danko I. et al. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther.* 1998; 5: 272–6.
40. Liu F., Song Y., Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999; 6: 1258–66.
41. Zhang G., Budker V., Wolff J.A. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10: 1735–7.
42. Nagy A.H. Clinical Study with Hydrodynamic Gene Delivery into Hepatocytes in Humans. 9th Annual Meeting of American Society Gene Therapy; 2006; Baltimore.
43. Al-Dosari M.S., Knapp J.E., Liu D. Hydrodynamic delivery. *Adv. Genet.* 2005; 54: 65–82.
44. Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y. The hydrodynamics-based procedure for controlling the pharmacokinetics of gene medicines at whole body, organ and cellular levels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 713–31.
45. Herweijer H., Wolff J.A. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.* 2007; 14: 99–107.
46. Zhang G., Budker V., Williams P. et al. Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 2001; 12: 427–38.
47. Hagstrom J.E., Hegge J., Zhang G. et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol. Ther.* 2004; 10: 386–98.
48. Danialou G., Comtois A.S., Matecki S. et al. Optimization of regional intraarterial naked DNA-mediated transgene delivery to skeletal muscles in a large animal model. *Mol. Ther.* 2005; 11: 257–66.
49. Zhang G., Ludtke J.J., Thiouellet C. et al. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15: 770–82.
50. Sato Y., Ajiki T., Inoue S. et al. A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. *Transplantation* 2003; 76: 1294–8.
51. Liang K.W., Nishikawa M., Liu F. et al. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther.* 2004; 11: 901–8.
52. Su L.T., Gopal K., Wang Z. et al. Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circul.* 2005; 112: 1780–8.
53. Mann M.J., Gibbons G.H., Hutchinson H. et al. Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *PNAS USA* 1999; 96: 6411–6.
54. Pollard H., Remy J.S., Loussouarn G et al. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 7507–11.
55. van der Aa M.A.E., Mastrobattista E., Oosting R.S. et al. The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery. *Pharm. Res.* 2006; 23: 447–59.
56. Houck K.A., Ferrara N., Winer J. et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 1991; 5: 1806–14.
57. Dowty M.E., Williams P., Zhang G. et al. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *PNAS USA* 1995; 92: 4572–6.
58. Olenyuk B.Z., Zhang G.-J., Klco J.M., Nickols N.G., Kaelin W. Jr., B. Dervan. Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist. *PNAS USA* 2004; 101 (48): 16828–35.
59. Yang E.Y., Su H. Controlling gene expression in ischemic tissues. *Gene Ther. Rev.* 2009; 1: 40–3.
60. Choi Y.H., Cowan D.B., Nathan M. et al. Myocardial hypertrophy overrides the angiogenic response to hypoxia. *PLoS ONE* 2008; 3: e4042.
61. Ye L., Zhang W., Su L.P. Nanoparticle based delivery of hypoxia-regulated VEGF transgene system combined with myoblast engraftment for myocardial repair. *Biomater.* 2011; 32: 2424–31.
62. Su H. Arakawa-Hoyt J., Kan Y.W. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model. *PNAS USA* 2002; 99: 9480–5.
63. Pachori A.S., Melo L.G., Hart M.L. et al. Hypoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury. *PNAS USA* 2004; 101: 12282–7.
64. Lee R.J., Springer M.L., Blanco-Bose W.E. et al. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circul.* 2000; 102: 898–901.

Поступила 15.08.2011