

Н.Я. Спивак, Г.Т. Сухих, И.М. Богданова, В.В. Малайцев, В.А. Шевчук

Генно-инженерные технологии и стволовые клетки

В огляді представлений концептуальний аналіз сучасного стану проблеми використання стовбурових клітин (СК) у генній терапії ex vivo. Викладено принципи конструювання векторних систем, призначених для трансфекції СК. Наведено експериментальні та клінічні результати з вивчення трансплантації генетично модифікованих СК при різних моногенних і мультифакторіальних захворюваннях. Особливу увагу приділено біобезпеці.

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные и клинические исследования последних лет в области биологии стволовых клеток (СК) из различных источников (ткани эмбрионов и плодов, амниотика, пуповинная кровь, ткани взрослых людей) определили новое революционное направление регенеративной медицины и онкотерапии. Использование СК дает возможность генерирования разнообразных клеточных популяций, способных обеспечивать терапевтический эффект в организме реципиента. СК могут быть использованы для лечения многочисленных генетических и дегенеративных заболеваний. С помощью этих клеток можно восполнять функциональные дефекты, связанные со старением организма, лечить заболевания гемопоэтической и иммунной систем, сердечно-сосудистую недостаточность, хронические заболевания печени, диабет, нейродегенеративные заболевания, артриты, болезни легких, кожи и др. Терапия, основанная на использовании СК также может быть эффективна при лечении онкологических заболеваний [3].

Генетическая модификация СК придает новый импульс развитию клеточных технологий и их внедрению в клиническую практику. Благодаря возможности преодоления

генетического дефекта через ex vivo встраивание полноценного гена или коррекцию поврежденного гена в СК пациента, решается ряд проблем, в том числе и такая, как необходимость преодоления барьера HLA-гистонесовместимости при аллогенных трансплантациях. Одна из основных задач на пути развития клеточной СК-терапии состоит в гарантированном обеспечении условий для выживаемости трансплантируемых клеток. Путем генетической модификации возможно добиться не только повышения жизнеспособности, но и скорректировать метаболические процессы, усилить пролиферативный и дифференцировочный потенциал СК, направить их дифференцировку в нужное русло. Способность некоторых типов СК к направленной миграции (хоумингу) в очаги тканевой деструкции и опухолевого роста позволяет использовать генетически модифицированные СК в качестве средств адресной доставки продуктов терапевтических и суицидальных генов. Встраиванием дополнительных генетических конструкций, обеспечивающих резистентность клеток к химиотерапевтическим агентам возможно достижение избирательной цитопротекции гемопоэтических СК (ГСК) при химиотерапии солидных опухолей.

© Н.Я. Спивак, Г.Т. Сухих, И.М. Богданова, В.В. Малайцев, В.А. Шевчук

В работе приведены данные о новейших достижениях в области генной клеточной терапии с использованием СК.

Генетическая модификация клеток

Разработке программы генной терапии предшествует тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса [1].

Стандартная схема генокоррекции включает серию последовательных этапов. На первом этапе создается полноценно работающая (экспрессирующаяся) генетическая конструкция, содержащая смысловую (кодирующую белок) и регуляторную часть гена, которую размножают клонированием в бактериях. Далее осуществляют подбор вектора, который должен обеспечить эффективную доставку гена в клетки-мишени, встраивание гена в векторную систему с последующим переносом полученной конструкции (трансфекцией) в эти клетки.

Анализ эффективности трансфекции проводят на клеточных культурах *in vitro* и на экспериментальных животных *in vivo*.

Перенос гена в ядро клетки-мишени с дальнейшей его экспрессией приводит к изменению ее функционального статуса, стабильность поддержания которого зависит от способа доставки экзогенного генетического материала. В зависимости от типа выбранного вектора ген может быть интегрирован в геном клетки-мишени, локализован в ядре в качестве искусственной мини-хромосомы или, как эписомальный элемент, в ядре или вне его.

Функцию доставки гена в клетку выполняют вирусные и невирусные векторы. Выбор вирусов в качестве векторов обусловлен их естественной способностью специфически связываться с клеткой и проникать в нее.

Векторные системы

Вирусные векторы. Наиболее часто в качестве векторов используют ретровирусы (онкоретровирусы и лентивирусы), аденовирусы и аденоассоциированные вирусы. Ретровирусы (РНК-вирусы) располагают геном обратной транскриптазы, которая транскрибирует вирусный генетический материал в двуспиральную промежуточную ДНК, инкорпорирующуюся в ДНК хозяина. Для конструирования векторов используют ретровирусы С типа (онкоретровирусы – вирус лейкоза мышей Молони – MuLV и вирус лейкоза птиц – ALV), лентивирусы (вирус иммунодефицита человека – HIV) и спумавирусы. Модификация генома клетки с помощью ретровируса стабильна и переносится во все дочерние клетки, происходящие от трансфицированной клетки (вертикальный перенос). Горизонтальный перенос генетической информации исключают, используя упаковывающие (хелперные) клеточные линии. Эти клетки экспрессируют вирусные белки, необходимые для размножения вируса, но не располагают сигналом упаковки генетического материала в вирусные частицы. В результате получают репликационно некомпетентный вирус, несущий терапевтический ген.

Объем генетической информации, переносимой с помощью ретровирусных векторов невелик и составляет не более 10–12 тыс. нуклеотидов. С учетом доли цис-элементов генома, размер кДНК в составе вектора не может превышать 7 тыс. нуклеотидов. Наиболее часто используемый ретровирус для конструирования векторных систем – вирус MuLV. Он непатогенен для человека и благодаря низкому уровню гомологии с его ретровирусами, риск рекомбинации между данным вектором и любыми человеческими вирусами исключительно низок.

Уникальное свойство ретровирусов – способность инкорпорировать гликопро-

теины оболочки различных вирусов в свою липидную оболочку. Это свойство используют в том случае, когда клетка-мишень не располагает рецепторной структурой для предназначенного к встраиванию вектора. Упаковка вектора в чужую вирусную оболочку позволяет расширить панель клеток-мишеней для вирусного вектора (феномен псевдотипирования). Кроме того, ретровирусные векторы менее иммуногенны, чем другие вирусные векторы [16].

Аденовирусы – двухцепочечные ДНК-вирусы, инфицирующие покоящиеся и делящиеся клетки. В отличие от ретровирусов, они не интегрируются в геном хозяина и их ДНК сохраняется в ядре как эписомальный элемент после инфицирования клеток хозяина. Во время деления клеток введенная генетическая информация элиминируется, что не позволяет использовать аденовирусные векторы для переноса генов в клетки с высокой митотической активностью. Общее для всех аденовирусных векторов преимущество состоит в легкости очистки и высокой эффективности инфицирования различных типов клеток хозяина, делящихся и неделящихся. Для повышения пакующей способности аденовирусных векторов из вирусного генома вырезают почти все гены, сохраняя фланкирующие геном инвертированные концевые повторы и пакующий сигнал. Такие векторы могут нести трансгенную кассету вместимостью до 30 тыс. нуклеотидов. Для сборки вектора необходима транскомплементация всех вирусных генов, которая обеспечивается введением вспомогательного вируса в упаковывающие клетки. К недостаткам аденовирусных векторов относятся кратковременная экспрессия трансгена в большинстве тканей (от нескольких дней до недели) и относительно высокая иммуногенность.

Парвовирусы, к числу которых принадлежат аденоассоциированные вирусы, единственная группа ДНК-содержащих

вирусов не ассоциированная с каким-либо онкологическим заболеванием. Эти вирусы непатогенны для человека. Аденоассоциированные вирусы способны инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки. Они проявляют тропизм к специфическому сайту на хромосоме 19, характеризуются длительной экспрессией и относительно высокой эффективностью трансфекции. Доказаны безопасность и высокая эффективность трансдукции ГСК и гемопоэтических прогениторных клеток векторами, сконструированными на основе аденоассоциированных вирусов.

Способность генно-инженерных конструкций на основе вирусных векторов проникать в клетки-мишени (тропизм) определяется белками оболочки вируса, взаимодействующими с рецепторными структурами, экспрессированными на клеточной поверхности.

Невирусные векторы. При конструировании невирусных векторов используют терапевтический ген, встроенный в плазмиду, представляющую собой протяженную нестабильную молекулу ДНК. Для успешной доставки плазмиды в клетку-мишень через плазматическую и ядерную мембраны необходима защита ДНК от механической и энзиматической деградаци с обеспечением долговременной экспрессии трансгена в клетках-мишенях.

Наиболее распространенными невирусными векторами для переноса гена являются катионные липидсвязанные комплексы с ДНК в составе липосом. Катионные липиды способны к высокоэффективному связыванию ДНК с образованием нуклеолипидных частиц – липоплексов. Катионные липосомы – липидные везикулы, поверхность которых несет положительный заряд. В результате электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью плазматической мембраны положительно заряженные липосомы связываются с клеткой-мишенью. Далее,

гидрофобные липосомы сливаются с плазматической мембраной и плазида попадает в клетку (процесс липофекции). Однако большая часть генного материала, проникшего в клетку, связывается с плазматическими органеллами, подвергаясь деструкции и лишь небольшая часть достигает ядра [42].

Также для трансфекции ДНК в клетки-мишени используют полиплексы, т.е. ее комплексы с катионным полипептидом (например, полилизин), лигандом, обеспечивающим связывание с клеткой и эндоцитоз (трансферрин или антитело к одному из поверхностных белков клетки), а также специальным агентом, облегчающим диссоциацию ДНК из этого комплекса и эндосом в цитоплазме (эндосомолитические агенты). Использование эндосомолитических агентов обеспечивает защиту трансгена в цитоплазме клетки-мишени. Наиболее широко используемый полиплекс, FuGene 6 – конъюгат трансферрина с полиэтиленимином.

Недостатками большинства систем невирусной доставки генетического материала является их малая эффективность.

Физический метод трансфекции, электропорация основан на обратимом повышении электропроводимости и проницаемости плазматической мембраны клетки под воздействием внешнего электрического поля. При достаточных напряженности приложенного электрического поля и продолжительности экспозиции, в плазматической мембране временно формируются поры через которые вектор проникает в клетку. Разработан высокоэффективный вариант электропорации, – нуклеопорация, позволяющая перенос генно-инженерных конструкций непосредственно в ядра даже неделящихся клеток. Нуклеофтор фирмы «Атаха», оснащенный пакетом специальных программ, адаптированных к конкретным типам клеток, уже успешно используют для доставки транс-

генов в мезенхимальные и нейральные СК [10,45].

Существует также возможность переноса и обеспечения функционирования генов в составе искусственных хромосом. Такие хромосомы могут нести большие фрагменты ДНК, содержащие каскады генов со всеми регуляторными последовательностями. В настоящее время большое внимание уделяется созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих – МАС (от англ. Mammalian artificial chromosomes). Они содержат три функциональных элемента: последовательности, обеспечивающие репликацию, митотическую стабильность (центромеру) и резистентность к нуклеазам (теломеры). Наличие основных структурных элементов обычных хромосом позволяет мини-хромосомам персистировать в клетках. Они несут полноразмерные гены и их естественные регуляторные элементы, что обеспечивает долговременное поддержание гена в функциональном состоянии в соответствующем тканевом микроокружении [41].

Новые методические разработки в генной терапии

Недавно предложен оригинальный способ генной клеточной терапии с использованием мобильных генетических элементов – транспозонов. Эти элементы генома способны перемещаться в пределах хромосомы и, случайным образом, встраиваться в различные участки ДНК с участием комплекса белков, обеспечивающего активность фермента транспозазы, которая узнает мобильный элемент и обеспечивает перенос его на новое место. Вырезанный транспозон внедряется в район осуществляемого транспозазой разрыва в молекуле-мишени и сшивается с ДНК в новом месте.

В системе покоя транспозон опосредует невирусную инсерцию лечебного гена и

стабильную его экспрессию в клетках-мишенях. В клетки трансфицируют невирусный плазмидный вектор, содержащий трансген, фланкируемый IR/DR последовательностями транспозона, которые являются сайтами связывания транспозазы. Каталитически активная транспозаза может быть экспрессирована как продукт соответствующего гена, встроенного в эту же или другую плазмиду. Специфически связывая фланкирующие последовательности транспозазы пространственно сближает их и вырезает трансген с обоих концов. Она же разрывает обе цепи мишеневой ДНК и встраивает переносимую генетическую конструкцию с восстановлением целостности ДНК-мишени [18].

Принципиально новый подход в генной клеточной терапии состоит в коррекции повреждений ДНК в клетках больного. Один из вариантов – исправление точковых мутаций *in vitro* путем высокоэффективной генной конверсии. При добавлении в культуру делящихся клеток фрагментов геномной ДНК возможна гомологичная рекомбинация между нативной геномной ДНК и гомологичным ей фрагментом с частотой 1/1000. На этой основе разработана новая технология – химеропластика. К культивируемым клеткам добавляют синтетические ДНК/РНК гибридные молекулы (химеропласты), состоящие из короткой (25 нуклеотидов) цепочки ДНК и комплементарной ей нити РНК. В последовательность ДНК/РНК шпильки встраивают основание, по которому планируется замещение. Обе нуклеотидные последовательности шпильки комплементарны фрагменту двухцепочечной геномной ДНК, несущей мутацию. Высокая концентрация олигонуклеотидов в ядре, наряду с наличием рекомбинационного бактериального RecA-белка, позволяет резко повысить частоту гомологичной рекомбинации. Клетки с восстановленной структурой генома могут быть возвращены в организм больного [13].

Технику направленной утраты экзона используют для коррекции нуклеотидной последовательности самого гена. Для многих генов отсутствие целого экзона менее катастрофично для поддержания функции белка, чем сайтовые мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания или к нарушению конформации белкового продукта, например консенс-мутации.

Суть метода *exon – skipping* (перескок, сброс экзона) сводится к введению в культуру мутантных клеток *in vitro* коротких антисмысловых последовательностей РНК, комплементарных местам сплайсинга первичного РНК-транскрипта. Их гибридизация в ядре приводит к проскальзыванию петли сплайсинга с захватом и удалением из транскрипта экзона, несущего мутацию [2].

Обеспечение биобезопасности при проведении генной клеточной терапии

Случайный характер встраивания (инсерции) генетической конструкции в геном репулирующих СК может изменить их состояние *in vivo*. Большинство инсерционных мутаций не отражается на жизнеспособности клеток, но клональное доминирование, обусловленное локализацией трансгенов непосредственно в протоонкогенах и других сигнальных генах, либо вблизи от них, может привести к развитию онкологического процесса. Впервые острая обеспокоенность в связи с инсерционным мутагенезом возникла после регистрации нескольких случаев развития инсерционных лейкозов у детей с X-сцепленным тяжелым комбинированным иммунодефицитом при *ex vivo* генной терапии с использованием гемопоэтических СК с терапевтическим геном, встроенным с помощью ретровирусного вектора. В результате переноса гена формируются множественные клоны модифицированных клеток, различающихся по сайтам встраивания трансгена и числу инсерций, а также по собственному потенциалу развития. С позиций дарвиновской

теории естественного отбора, каждого пациента, которому ввели генетически модифицированные клетки можно рассматривать как изолированную территорию (“остров”), на которой осуществляется селекция изначально неидентифицированных мутантов. В этих условиях конкурентоспособность и дальнейшая судьба модифицированных клеток определяются множественными факторами. Последствия инсерционного мутагенеза зависят от природы трансгена, числа его копий на клетку, типа и количества трансфицированных клеток, эффективности их приживления и уровня пролиферации в неблагоприятном окружении в организме больного.

Основные усилия для снижения риска инсерционного мутагенеза направлены на совершенствование дизайна векторных систем. Возможные модификации состоят в замещении конститутивно активных касет энхансер-промотор более физиологичными промоторами (оптимально – собственным промотором трансгена), встраивании последовательностей, экранирующих энхансер (инсуляторов) для предотвращения его взаимодействия с граничащими с ним клеточными промоторами, а также совершенствовании транскрипционной терминации трансгенных касет (встраивание терминационных энхансеров) [8].

Клетки-мишени и трансфицируемые генетические конструкции

Выбор клеток-мишеней, предназначенных для *ex vivo* генной терапии определяется характером дефекта, подлежащего коррекции. Практически клетки всех тканевых компартментов могут служить мишенями для трансфекции генетических конструкций *ex vivo*.

Для коррекции наследственных заболеваний необходимо обеспечение функционирования нового гена в течение длительного времени, в идеале – на протяжении жизни, а модифицированные клетки должны

располагать пролиферативным и дифференцировочным потенциалом, гарантирующим передачу гена будущим поколениям клеток. Этим условиям удовлетворяет использование СК или их ранних потомков (прогениторных клеток), поскольку они обеспечивают поддержание модифицированного статуса во всех клетках дифференцировочного ряда. Важно, чтобы вводимая генетическая конструкция была интегрирована в геном клетки-мишени.

Приобретенные заболевания не связаны с врожденным дефектом структуры и функции одного определенного гена и для их коррекции не всегда возникает необходимость в длительной персистенции клеток с модифицированным геномом. При этих заболеваниях конечная цель генотерапии состоит в обеспечении синтеза белка, оказывающего терапевтический эффект.

Гемопоэтические стволовые клетки. На экспериментальных моделях и в клинике показана перспективность использования генетически модифицированных гемопоэтических стволовых клеток для устранения наследственных дефектов в системе кроветворения [28, 36]. Одной из главных причин выбора ГСК в качестве клеток-мишеней для генной терапии является их способность к самообновлению и дифференцировке в специфические типы клеток на протяжении всей жизни. Это клетки костномозгового происхождения, экспрессирующие поверхностный гликопротеин CD34. Способные к долговременной репопуляции ГСК локализованы в CD34⁺/CD38⁻-фракции костного мозга. Они пролиферируют в клеточной культуре в бессывороточной среде, содержащей факторы роста и цитокины, такие, как фактор стволовых клеток, SCF, лиганд *fms*-подобной тирозинкиназы-3β, Flt-3, тромбopoэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и интерлейкины ИЛ-6 и ИЛ-3 [17]. Источниками ГСК служат костный мозг, периферическая и пуповинная кровь.

Ограничением для использования ГСК в генной терапии является низкое содержание их в костном мозгу (1–2 % CD34⁺-клеток, из которых только 1 % составляют CD34⁺/CD38⁺ ГСК). CD34⁺/CD38⁺-клетки пребывают с G₀ фазе клеточного цикла. Это обстоятельство препятствует их трансфекции через перенос онкоретровирусных генов, требующий разрушения ядерной мембраны в митозе для интеграции векторной ДНК в геном клетки хозяина. Трансдукция возможна только после *in vitro* культивирования ГСК с цитокинами, которые обеспечивают индукцию клеточного деления и поддерживают способность к репопуляции. Однако в результате экспозиции ГСК с цитокинами для онкоретровирусной трансдукции снижается способность этих клеток к приживлению. Усиление экспансии трансплантируемых CD34⁺/CD38⁺ ГСК в организме реципиента возможно на фоне введения *in vivo* ингибитора компонента Wnt-сигнального пути, гликоген-синтазы-киназы-3, GSK-3. Активация Wnt-сигнального пути через экспрессию гена НохВ4 способствует экспансии ГСК [39].

В 25 % случаев тяжелого комбинированного иммунодефицита больные дети гомозиготны по дефектному гену, кодирующему аденозиндезаминазу, что приводит к дефициту этого фермента и нарушению нормального катаболизма пуринов с накоплением промежуточных продуктов обмена, токсичных для Т- и В-клеток. Трансфекция в ГСК гена аденозиндезаминазы в составе ретровирусного вектора с возвратом трансфицированных клеток этому же больному после мягкой миелооблативной терапии восстанавливает пул Т-, В-лимфоцитов и естественных киллерных клеток с полным возобновлением иммунной функции. В случае успешного лечения дети в дальнейшем не нуждаются в медикаментозной терапии [7].

При X-сцепленном тяжелом комбини-

рованном иммунодефиците, поражающим исключительно мальчиков (рецессивная мутация) иммунопатологический процесс обусловлен мутацией в гене, локализованном в X-хромосоме и кодирующем γ с-субъединицу рецептора некоторых интерлейкинов (ИЛ), в том числе ИЛ-7. ИЛ-7 опосредует конверсию ГСК в предшественники Т-лимфоцитов. Нарушение взаимодействия рецептор–лиганд в этой системе приводит к подавлению раннего этапа генерирования Т-клеток. Вследствие мутации гена γ с-цепи также нарушается аутокринная активация хелперных Т-клеток, осуществляемая через взаимодействие ИЛ-2 с рецептором. Поскольку γ с-цепь является также компонентом рецептора ИЛ-4, несущие этот рецептор В-клетки не могут вступать в кооперативные взаимодействия с хелперными Т-лимфоцитами. У мальчиков с X-сцепленным тяжелым комбинированным иммунодефицитом функция иммунной системы полностью подавлена. При этом генетически модифицированные ГСК заболевания конкурентно вытесняют дефектные ГСК, что позволяет исключить проведение превентивной миелооблативной терапии. Для лечения этой формы врожденного иммунодефицита в аутологичные ГСК встраивают ретровирусный вектор с нормальным геном γ с-субъединицы, универсальной для рецепторов ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-7. В результате лечения у большинства детей восстанавливаются уровень и функциональная активность Т-лимфоцитов [35].

Для лечения серповидно-клеточной анемии перспективно использование метода трансгенеза в сочетании с РНК-интерференцией. Генетический дефект при серповидно-клеточной анемии обусловлен заменой урацила на аденин в гене глобина, что приводит к экспрессии глутамина вместо валина в молекуле глобина и к нарушению функциональных свойств гемоглобина, а именно: понижению раствори-

мости и возрастанию полимеризации. Дефектный гемоглобин не в состоянии выступать в роли акцептора кислорода, а эритроциты приобретают серповидную форму и агглютинируют.

Дефект может быть устранен встраиванием генно-инженерной конструкции, включающей полноценный ген фетального γ -глобина и последовательность, кодирующую малую интерферирующую РНК (siRNA), комплементарную транскрипту дефектного гена в ГСК гомо- (β_s/β_s) или гетерозиготного (β/β_s) больного. Трансдукция этой трансгенной кассеты в составе лентивирусного вектора приводит к специфической экспрессии трансгена γ -глобина и опосредуемому siRNA сопутствующему подавлению транскрипции эндогенного β_s -глобина в клетках эритроидного ряда. Таким образом в клетках осуществляется синхронная замена транскриптов β_s на мРНК γ -глобина [34].

Мезенхимальные стволовые клетки. Использование СК в качестве клеточных мишеней для встраивания генных конструкций не ограничивается только ГСК. Возможности коррекции значительного числа заболеваний могут быть резко расширены при использовании других типов СК с широким диапазоном таких свойств, как тропизм к определенным тканевым компартаментам, участие некоторых из них в регуляции иммунного ответа, способность к хоумингу в очаги тканевой деструкции и др. [4].

В этом ряду особое место занимают мезенхимальные СК (МСК) и их ранние потомки. МСК обладают уникальной способностью оказывать иммуносупрессорное действие через модуляцию функции дендритных клеток и индукцию регуляторных Т-лимфоцитов. Это их свойство позволяет решить проблему HLA-несовместимости донора и реципиента. При системном введении в циркуляцию МСК избирательно репопулируют очаги ткане-

вого повреждения, независимо от типа ткани. МСК также обладают выраженным тропизмом к опухолям и способностью к длительной персистенции в организме реципиента. МСК проявляют высокий уровень метаболической активности и способность к экспрессии терапевтического белка в секретируемой форме. Простота выделения, неприхотливость в условиях культуры, возможность масштабного наращивания *in vitro* – еще одна из весомых причин их использования в качестве носителей лечебных генов. МСК превосходят все другие типы СК по эффективности трансдукции вирусных векторов [33].

В экспериментах на животных эффективность регенерации костной ткани трансплантируемыми МСК существенно возрастает после модификации этих клеток встраиванием морфогенов BMP2, BMP4, BMP6 и BMP7, кодирующих белки-индукторы остеоиндуктивных сигналов [9, 14, 21, 40]. МСК с трансгеном коллагена типа I активно участвуют в восстановлении костной ткани при наследственном заболевании, несовершенном остеогенезе [11].

В экспериментальных модельных системах на животных достигнут прогресс в лечении таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона и наследуемых заболеваний липидного обмена, включая болезни Тей-Сакса и Нимана-Пика, а также мукополисахаридоза типа VII [33]. На экспериментальной модели с использованием МСК, несущих ген нейротрофного фактора BDNF достигнуто функциональное восстановление функций ЦНС при инсультах [24]. На модели церебральной ишемии у крыс показано, что внутривенное введение МСК человека, трансфицированных геном нейротрофного фактора GDNF в составе аденовирусного вектора приводит к восстановлению функции головного мозга [15]. МСК в качестве носителей терапевтического гена использовали для лечения гемофилии

А и В. В этом случае в МСК встраивали ген эритропоэтина [33].

Генетически модифицированные МСК находят применение в экспериментальной клеточной кардиомиопластике. Введение МСК, трансдуцированных геном гемоксигеназы-1 в очаг повреждения при экспериментальном инфаркте миокарда приводит к усилению регенерации сердечной мышцы за счет мобилизации эндогенных предшественников кардиомиоцитов. Подобный эффект достигнут при интракардиальной трансплантации МСК со сверхэкспрессией антиапоптотического гена Akt1 [12].

В экспериментальной системе на собаках получены предварительные результаты при использовании МСК человека для коррекции дисфункции синоатриального узла. В МСК человека встраивали ген HCN2, который отвечает за трансляцию синтеза белков, формирующих и переносящих пейсмекерный ток, I_r . При введении МСК субэпикардиально *in situ* восстанавливается функция HCN2 ионных каналов. Пересаженные МСК формируют между собой и с миоцитами щелевые контакты – канальные белки, переносящие электрический импульс между сопряженными клетками [32].

МСК избирательно мигрируют к опухолям, где они влияют на формирование опухолеассоциированной стромы. Благодаря этому свойству МСК могут служить идеальным средством для адресной доставки гена в микроокружение опухоли или ее метастазы [30, 31, 38].

В МСК встраивали аденовирусный вектор, несущий ген тимидинкиназы вируса простого герпеса. Тимидинкиназа избирательно фосфорилирует синтетический нуклеозидный аналог, ганцикловир, подавляющий синтез ДНК в опухолевых клетках, находящихся в контакте с МСК (эффект присутствия). В экспериментальной модели на мышах достигнута эрадикация карциномы яичника после введения ганцик-

ловира. МСК, нагруженные онколитической репликационно компетентной вирусной конструкцией – аденовирусом 5/3 вызывают тотальный лизис опухолевых линий *in vitro* [23].

Модифицированные геном ИЛ-2 МСК стимулируют эффективный иммунный ответ против низкоиммуногенной меланомы B16 у мышей. МСК с встроенной подобной генетической конструкцией мощно подавляют пролиферацию клеток глиомы у крыс. МСК человека, трансдуцированные аденовирусным вектором, кодирующим интерферон- γ , который обладает антипролиферативным действием, при введении животным задерживают рост клеток рака молочной железы [37].

Для усиления миграции МСК, несущих ген интерферона- γ в зону опухолевого роста и повышения их терапевтического потенциала в эти клетки дополнительно встраивают ген рецептора эпидермального фактора роста, ERF. Оснащенные ERF-рецепторами МСК мигрируют к опухоли, благодаря интенсивной выработке ERF малигнизированными клетками и блокируют ее рост через секрецию антипролиферативного цитокина, интерферона- γ .

Встраивание в МСК аденовирусного вектора, несущего ген хемокина CX3CL1 (фракталкин) позволяет использовать их для эрадикации легочных метастазов. Системно введенные МСК избирательно локализуются вокруг опухолевых очагов, а продуцируемый ими фракталкин, в свою очередь, привлекает эффекторные клетки систем врожденного и приобретенного иммунитета (естественные киллерные клетки и CD8⁺ Т-лимфоциты) в зону опухолевого роста [43].

Нейральные стволовые клетки. В отличие от ГСК и МСК, нейральные СК (НСК) используют в целях клеточной и генной клеточной терапии достаточно ограниченно из-за сложностей с клеточными источниками. Большую часть исследований

проводят на иммортализованных линиях НСК плодов человека. В единичных исследованиях используют НСК, изолированные из биоптатов обонятельной области слизистой оболочки носа.

Клонированную клеточную линию фетальных НСК человека, иммортализованную с помощью ретровирусного вектора, кодирующего *v-myc* онкоген, успешно использовали для коррекции неврологических нарушений в экспериментальных моделях ряда наследственных заболеваний, таких как болезни Паркинсона и Хантингтона, мукополисахаридоз VII. Так, в экспериментальной модели болезни Паркинсона показано, что трансплантация иммортализованных НСК человека, трансдуцированных генами тирозингидроксилазы и ГТФ-циклогидролазы 1 в мозг больных мышей приводит к улучшению их функционального состояния.

На модели интрацеребральной геморагии у мышей при введении иммортализованных НСК человека со сверхэкспрессией встроенного гена фактора роста сосудистого эндотелия, VEGF достигнут положительный результат. Секретируемый трансплантированными НСК VEGF обеспечивает нейропротекцию клеток (через индукцию антиапоптотических факторов) и стимулирует ангиогенез в очаге геморрагического повреждения и в граничащей с ним ткани [25, 27].

На модельной системе индуцированного гипоксией ишемического повреждения головного мозга доказана целесообразность использования НСК человека, несущих трансген нейротрофного фактора, NT-3. Поскольку НСК экспрессируют рецептор для NT-3, донорские клетки отвечают на вырабатываемый ими же фактор (аутокринная стимуляция) преимущественной нейрональной дифференцировкой. Эндогенные НСК реципиента получают то же направление дифференцировки в результате паракринной стимуляции. Таким образом,

утеря различных типов специализированных нейронов восполняется за счет дифференцировки как трансплантированных, так и эндогенных НСК. Благодаря преимущественно нейрональной дифференцировке НСК в зоне повреждения не формируются астроглиальные рубцы [29].

НСК, модифицированные геном GDNF, использовали для лечения ишемического повреждения головного мозга крыс. Генетически модифицированные клетки мигрируют в зону ишемического повреждения и экспрессируют маркер незрелых нейронов. У животных зарегистрировано эффективное подавление микроглиальной инвазии и апоптоза нервных клеток, а также резкое сокращение зоны инфаркта. Под воздействием клеточной генотерапии происходит функциональная реабилитация с восстановлением когнитивной способности [20].

НСК проявляют тропизм к различным типам опухолей нервной системы. Даже системно введенные НСК способны преодолевать гемато-энцефалический барьер, мигрировать к опухоли и инкапсулировать ее. В экспериментальной онкологии НСК используют для адресной доставки продуктов суицидальных генов в опухолевую ткань. Ипсилатеральное (по отношению к опухоли) введение мышам с интракраниальной медуллобластомой генетически модифицированных НСК человека, секретирующих цитозиндезаминазу с последующей инъекцией 5-фторцитозина, приводит к резкому уменьшению размера опухоли.

Достигнуто излечение метастатической нейробластомы через опосредуемую НСК доставку трансгена карбоксиэстеразы, конвертирующей препарат СРТ-11 (иринотекан) в активный цитотоксический метаболит SN-38 за счет специфического повышения его концентрации в метастатическом очаге. Модифицированные геном тимидинкиназы НСК успешно использовали для эрадикации глиомы у крыс. Установлена также тропность НСК к опу-

хоям ненейрального происхождения (меланома, рак простаты), что существенно расширяет возможности их использования в генотерапии онкозаболеваний [5, 6, 22, 26].

Эндотелиальные прогениторные клетки. Представленные в костном мозге и в периферической крови эндотелиальные клетки-предшественники мигрируют в зоны активного ангиогенеза и вовлекаются в неоваскуляризацию опухолей [44]. Такие прогениторные клетки можно нагружать терапевтическими генами (суицидальными и антиангиогенными – для деструкции опухоли и ее сосудистой сети, а также генами цитокинов, активирующих клетки иммунной системы и привлекающих их в очаги опухолевого роста. Трансдуцированные аденовирусным вектором, кодирующим VEGF эндотелиальные прогениторы успешно использовали для неоваскуляризации ишемизированных конечностей у мышей [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая результаты многочисленных экспериментальных исследований и данные по клиническому использованию генетически модифицированных СК и прогениторных клеток, можно заключить, что, к настоящему времени, созданы необходимые предпосылки для плодотворного развития этого перспективного направления современной медицины. По-прежнему одной из кардинальных задач остается совершенствование подходов к преодолению генетических дефектов при моногенных наследственных заболеваниях, которые должны обеспечивать гарантированную биобезопасность. Большие надежды возлагают на возможность вовлечения эндогенных СК реципиента в регенеративный процесс под воздействием донорских СК, несущих трансгены, продукты которых (трофические, ростовые, дифференцировочные и антиапоптотические факторы) обес-

печивают необходимые для этого условия. Представляется перспективным лечение онкозаболеваний с использованием СК-трансфектантов в качестве средств адресной доставки терапевтических генов в зоны опухолевого роста.

N. Ya. Spivak, G.T. Sukhikh, I.M. Bogdanova, V.V. Malaytsev

GENE-ENGINEERING TECHNOLOGIES AND STEM CELLS

In the review it has been presented the conceptional analysis of modern state of stem cells use problem (SC) in gene therapy *ex vivo*. Principles of vectorial systems construction have been expounded, designed for SC transfection. It has been displayed results of experimental investigations and clinical data on transplantation of genetically modifiable SC at different monogenous and multifactorial diseases. Special attention is focused on the problem of biosecurity ensuring.

Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine; SRC DiaprophMed, Kiev; Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of RAMS, Moscow; SR I of Human Morphology of RAMS, Moscow

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С. Молекулярная медицина, молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия // Мол. биология. – 2000. – 34. – №4. – С.684–695.
2. Долгих М.С. Возможности генной терапии, ее методы, объекты и перспективы // Успехи соврем. биологии. – 2004. – 124. – №.2. – С.123–143.
3. Спивак Н.Я., Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М. Стволовые клетки. Биология и потенциальное клиническое использование // Трансплантология. – 2005. – Т.8. – С. 6–14.
4. Сухих Г.Т., Спивак Н.Я., Малайцев В.В. и др. Мезенхимальные стволовые и прогениторные клетки. Биологические свойства и перспективы использования // Физиол. журн. – 2007. – 53. – № 1. – С.62–76.
5. Aboody K.S., Najbauer J., Schmidt N.O. et al. Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells // Neurooncol. – 2006. – 8. – P.119–126.
6. Aboody K.S., Rush R.A., Garcia E. et al. Development of a tumor-selective approach to treat metastatic cancer // PloS ONE. – 2007. – №1. – P.23.
7. Aiuti A., Cassani B., Andolfi G. et al. Multilineage he-

- matopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy // *J.Clin. Invest.* – 2007. – **117**. – P.2233–2240.
8. Baum C., Kustikova O., Modlich U. et al. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vector // *Human Gene Therap.* – 2006. – **17**. – P.253–263.
 9. Bertone A.L., Pittman D.D., Bouxsein M.L. et al. Adenoviral-mediated transfer of human BMP6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model // *J. Orthopaedic Res.* – 2006. – **22**. – P.1261–1270.
 10. Censulevicus K., Timmer M., Wesemann M. et al. Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate // *Stem Cells.* – 2006. – **24**. – P.2776–2791.
 11. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta // *Science.* – 2004. – **303**. – P.1198–1201.
 12. Dzau V.J., Gnechhi M., Pachori A.S. Enhancing stem cell therapy through genetic modification // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2005. – **46**. – P.1351–1353.
 13. Graham I.R., Dickson G. Gene repair and mutagenesis mediated by chimeric RNA-DNA oligonucleotides: chimera-plasty for gene therapy and conversion of single nucleotide polymorphisms (SNP) // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2002. – **1587** – P.1–6.
 14. Gysin R., Wergedal J.E., Sheng M.H. Ex vivo gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats // *Gene Therap.* – 2002. – **9**. – P.991–999.
 15. Horita Y., Honmou O., Harada K. et al. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat // *J. Neurosci. Res.* – 2006. – **84**. – P. 1495–1504.
 16. Hu W.S., Pathak V.K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – **52**. – P.493–512.
 17. Hossle J.P., Seger R.A., Steinhoff D. Gene therapy of hematopoietic stem cells: strategies for improvement // *News Physiol. Sci.* – 2002. – **17**. – P.8–92.
 18. Ivics Z., Katzer A., Stuwe E.E. et al. Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells // *Mol. Therap.* – 2007. – **15**. – P.113–1144.
 19. Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C. et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration // *Circulation.* – 2002. – **105**. – P.732–738.
 20. Kameda M., Shingo T., Takahashi K. et al. Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia // *Eur. J. Neurosci.* – 2007. – **26**. – P.1462–1478.
 21. Kang Y., Liao W.M., Yuan Z.H. et al. In vitro and in vivo induction of bone formation based on adeno-associated virus-mediated BMP-7 gene therapy using human adipose-derived mesenchymal stem cells // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2007. – **28**. – P.839–849.
 22. Kim S.-K., Kim S.U., Park I.H. et al. Human neural stem cells target experimental intracranial medulloblastoma and deliver a therapeutic gene leading to tumor regression // *Clin. Cancer Res.* 2006. – **12**. – P.5550–5556.
 23. Komarova S., Kawakami Y., Stoff-Khalili M.A. et al. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses // *Mol. Cancer Therap.* – 2006. – **5**. – P.755–766.
 24. Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T. et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model // *Mol. Therap.* – 2004. – **9**. – P.189–197.
 25. Lee H.J., Kim K.S., Park I.H. et al. Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model // *PLoS ONE.* – 2007. – **2**. – P.156.
 26. Li S., Tokuyama T., Yamamoto J. et al. Potent bystander effect in suicide gene therapy using neural stem cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene // *Oncology.* – 2005. – **69**. – P.503–508.
 27. Noble M. Can neural stem cells be used to track down and destroy migratory brain by providing a means of repairing tumor-associated damage? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P.12393–12395.
 28. Paz H., Wong C.A., Li W. et al. Quiescent subpopulations of human CD34-positive hematopoietic stem cells are preferred target for stable recombinant adeno-associated virus type 2 transduction // *Human Gene Therap.* 2007. – **18**, №7. – P.614–625.
 29. Park K.I., Himes B.T., Stieg P.E. et al. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: evidence from engraftment of neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury // *Exp. Neurol.* – 2006. – **199**. – P.179–190.
 30. Pereboeva L., Curriel D.T. Cellular vehicles for cancer gene therapy. Current status and future potential // *Biodrugs.* – 2004. – **18**. – P.361–385.
 31. Pereboeva L., Komarova S., Mikheeva G. et al. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles // *Stem Cells.* – 2003. – **21**. – P.389–404.
 32. Potapova I., Plotnikov A., Lu Z. et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers // *Circulat. Res.* – 2004. – **94**. – P.952–957.
 33. Reiser J., Zhang X.Y., Hemenway C.S. et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases // *Exp. Opin. Biol. Therap.* – 2005. – **5**. – P.1571–1578.

34. Samakoglu S., Lisowsky L., Budak-Alpdogan T. et al. A genetic strategy to treat sickle cell anemia byco-regulating globin transgene expression and RNA interference // Nat. Biotechnol. – 2006. – **24**. – P.89–94.
35. Schmidt S., Hacein-Bey-Abina S., Wissler M. et al. Clonal evidence for the transduction of CD34⁺ cells with lymphomyeloid differentiation potential and self-renewal capacity in the SCID-X1 gene therapy trial // Blood. – 2005. – **105**. – P.2699–2706.
36. Srivastava A. Hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus vectors: problems and solutions // Human Gene Therap. 2005. – **16**, №7. – P.792–798.
37. Stagg J., Lejeune L., Paquin A. et al. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy // Ibid. – 2004. – **15**. – P.597–608.
38. Studeny M., Marini F.C., Dembinski J.L. et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents // J. Natl. Cancer Inst. – 2004. – **96**. – P.1593–1603.
39. Trowbridge J.J., Xenocostas A., Moon R.T. et al. Glycogen synthase kinase-3 is an in vivo regulator of hematopoietic stem cell repopulation // Nature Med. – 2005. – **12**. – P.89–98.
40. Tsuda H., Wada T., Yamashita T. et al. Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene // J. Gene Med. – 2005. – **7**. – P.1322–1334.
41. Vanderbyl S., Macdonald G.N., Sidhu S. et al. Transfer and stable transgene expression of a mammalian artificial chromosome into bone marrow-derived human mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2004. – **22**. – P.324–333.
42. Wasungu L., Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes // J.Control Release. – 2006. – **116**. – P.255–264.
43. Xin H., Kanehira M., Mizuguchi H. et al. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2007. – **25**. – P.1618–1626.
44. Young P.P., Vaughn D.E., Hatzopoulos A.K. Biological properties of endothelial progenitor cells (EPCS) and their potential for cell therapy // Prog. Cardiovascular. Dis. – 2007. – **49**. – P.421–429.
45. Zaragosi L.-E., Billon N., Ailhaud G. et al. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells // Stem Cells. – 2006. – **25**. – P.790–797.

*Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины;
НПК ДИАПРОФМЕД, Киев;
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Москва;
НИИ морфологии человека РАМН, Москва
e-mail: N.Spivak@rambler.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 29.11.2007*