

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ РАДИАЦИОННЫХ ПОРАЖЕНИЙ

О.А. Власова¹, И.С. Кравцов¹, А.С. Никифоров²

¹ ФГУП «Научный центр «Сигнал», Москва, 107014 Россия

² Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины Министерства обороны Российской Федерации,
195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4
телефон/факс: (812)775-02-41
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Резюме

В обзоре представлены результаты исследовательских работ в области генной терапии лучевых поражений. Поиск литературных источников проводился по базе данных MEDLINE, в поисковых системах PubMed, CyberLeninka, elibrary.ru и Google Scholar. Несмотря на небольшое количество исследовательских работ в области создания средств профилактики и лечения радиационных поражений с использованием молекулярных и геномных технологий, их анализ показал, что генотерапевтический подход является достаточно перспективным. Определенные успехи были достигнуты при использовании генетических конструкций на основе антиоксидантных ферментов (MnSOD), систем репарации ДНК (DSUP), регуляторов апоптоза (SNAI2, MDR1), цитокинов и ростовых факторов (TНPO, HGF и др.). Преимуществами генотерапевтических средств являются: физиологичность действия за счет постоянной выработки трансфицированными клетками организма терапевтического белка, отсутствие необходимости ежедневных введений, а также минимальное количество побочных эффектов. Тем не менее, наличие трудностей, связанных с выбором вектора и рационального способа доставки, а также внедрением таких средств в систему оказания медицинской помощи, существенно тормозит развитие данной области. В связи с этим требуется проведение более детальных исследований, направленных на оценку безопасности, эффективности и продолжительности лечебного действия разрабатываемых генотерапевтических средств.

Ключевые слова: генная терапия, радиационное поражение, вектор доставки, трансген, супероксиддисмутаза, репарация, цитокины, кроветворение

GENE THERAPY FOR RADIATION DAMAGE: CURRENT STATE AND PROSPECTS

O.A. Vlasova¹, I.S. Kravtsov¹, A.S. Nikiforov²

¹ *Federal State Unitary Enterprise «Scientific Center «Signal», Moscow, 107014 Russia*

² *State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of the Russian Federation,*

4, Lesoparkovaja street, St. Petersburg, 195043

tel.: (812)775-02-41

e-mail: gbiiivm_15@mil.ru

Abstract

The review presents the research results in the field of gene therapy for radiation injuries. A search was carried out on the database MEDLINE, in search engines PubMed, CyberLeninka, elibrary.ru and Google Scholar. We found a small number of works in this area. Their analysis showed the promising results of a gene-therapeutic approach for creating medical means for the prevention and treatment of radiation injuries. Gene constructs based on antioxidant enzymes (MnSOD), DNA repair systems (DSUP), apoptosis regulators (SNAI2, MDR1), cytokines and growth factors (THPO, HGF, etc.) have shown some success. The benefits of gene therapy agents are physiological effect due to the constant expression of a small amount of therapeutic protein by transfected body cells, the absence of the need for daily injections and minimal side effects. Nevertheless, the presence of difficulties associated with the choice of a vector and a rational delivery method, as well as with the introduction of such medical products in clinical practice significantly complicates the development of this area. There remains a need for more detailed studies aimed at assessing the safety, efficacy and duration of the healing effect of a gene therapy.

Key words: gene therapy, radiation damage, gene delivery vector, transgene, superoxide dismutase, repair, cytokines, hematopoiesis

Введение

Одной из актуальных проблем обеспечения безопасности при радиационных катастрофах техногенного или военного характера является совершенствование существующих и разработка принципиально новых медицинских средств профилактики и лечения поражений ионизирующим излучением, позволяющих сохранить жизнь и здоровье людей. К настоящему времени для профилактики и лечения лучевых поражений разработан широкий перечень соединений различного механизма действия: радиопротекторы, средства повышения радиорезистентности организма, средства ранней патогенетической терапии, средства профилактики и купирования первичной реакции на облучение, а также средства, предназначенные для профилактики поражений от облучения за счет инкорпорированных радионуклидов. К сожалению, представители указанных групп препаратов не в полной мере соответствуют требованиям по эффективности, а применение, например, цистамин и индралина ограничено их узким терапевтическим диапазоном и, как следствие, низкой переносимостью и потенциальной токсичностью в эффективных радиозащитных дозах [1, 4]. Данные факты сохраняют острую потребность в поиске новых более эффективных, безопасных и приемлемых для клинического применения радиозащитных средств.

Одним из перспективных направлений в современной медицине, связанным с бурным развитием высокотехнологичных методов молекулярной биологии, является создание генотерапевтических препаратов. Исследования в области генной терапии развиваются по разным направлениям: лечение онкологических, сердечно-сосудистых, инфекционных, моногенных наследственных, глазных, неврологических заболеваний, метаболических расстройств и др. [8]. Долгое время генная терапия была лишь многообещающей отраслью медицинских исследований, однако в последние годы наметился существенный прогресс, связанный, в первую очередь, с успехами в области масштабного получения эффективных и безопасных векторов доставки, клиническим успехом и регистрацией генотерапевтических препаратов: Imlygic®, Strimvelis®, Oncorine®, Luxturna®, Gendicine® и др. В России также реализуется программа создания препаратов для генной терапии, но на данный момент в государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения РФ включен лишь один генотерапевтический препарат Неоваскулген® для лечения хронической ишемии нижних конечностей, разработанный ОАО «Институт стволовых клеток человека» [5].

Следует отметить, что на сегодняшний день генотерапевтическое направление в лечении лучевых поражений, несмотря на свой высокий потенциал, недостаточно развито. В данной обзорной статье на основе зарубежной литературы рассмотрены подходы по

созданию инновационных средств профилактики и лечения радиационных поражений, а также проведена оценка их перспективности, исходя из данных об этиопатогенетических механизмах действия.

ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ЛЕЧЕНИИ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ

Все использующиеся на данный момент генотерапевтические векторы можно разделить на вирусные и невирусные. Вирусные векторы оказались самыми распространенными системами доставки генетического материала в протоколах генной терапии (рисунок 1).

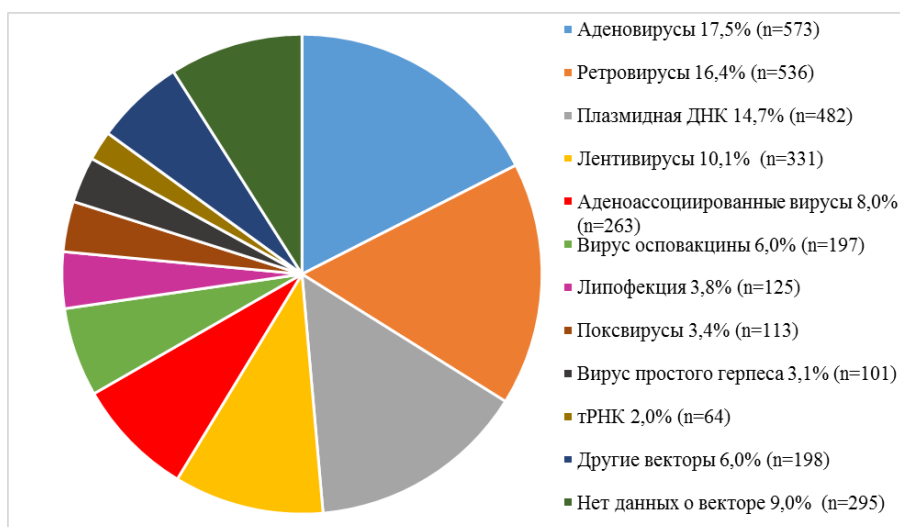


Рисунок 1 – Векторы, используемые для переноса генов в клинических испытаниях генной терапии. Адаптировано с Wiley Interscience Gene Therapy Trials Worldwide Database

Наибольшее применение нашли конструкции на основе [50]: аденовирусов (широкий спектр мишеней, кратковременная экспрессия, сильная иммуногенность); аденоассоциированных вирусов (широкий спектр мишеней, преимущественно не интегрируются в геном, длительная экспрессия, низкая иммуногенность); вируса простого герпеса (широкий спектр мишеней, кратковременная экспрессия, не интегрируются в геном, токсичность для клеток-мишеней, низкая эффективность трансдукции) и ретровирусов (заражают только делящиеся клетки, долговременная экспрессия со случайной интеграцией). Тем не менее, в ходе проведенных исследований было установлено, что вирусные векторы обладают некоторыми ограничениями и недостатками, среди которых самыми серьезными являются цитотоксичность, иммуногенность при повторных введениях и возможность инсерционного мутагенеза, приводящего к нарушению регуляции протоонкогенов и онкосупрессоров [38]. Так, например, в клинических исследованиях генотерапевтических препаратов на основе аденовирусного вектора отмечались серьезные побочные эффекты [12, 60], и даже гибель

пациента, в результате развития сильнейшего иммунного ответа [58]. Случаи инсерционного мутагенеза привели к развитию лейкемии у 4 пациентов после трансдукции клеток костного мозга ретровирусным вектором [34].

Наиболее подробно изученными, безопасными и удобными в применении являются методы доставки генетического материала с помощью невирусных систем, в частности, плазмидных векторов. Плазмиды – небольшие двуцепочечные кольцевые внехромосомные молекулы ДНК бактерий, ставшие самым распространенным инструментом для клонирования генов [54]. Использование плазмидных конструкций имеет ряд преимуществ над другими векторными системами – низкая иммуногенность, низкая токсичность, простота и низкая стоимость производства, невозможность рекомбинации и невозможность онкогенной трансформации вследствие встраивания в геном. Более того, плазмидный препарат может вводиться повторно без риска возникновения иммунной реакции [47].

Значительной проблемой генной терапии с использованием в качестве векторов плазмид является низкая эффективность доставки генетического материала в клетки, что, в свою очередь, определяет низкий уровень экспрессии гена и синтеза целевого белка, недостаточного для достижения терапевтического эффекта. Исследователи постоянно ищут новые методы повышения эффективности трансфекции необходимого гена в клетки-мишени, разрабатывая различные системы доставки, такие как катионные липиды [83], синтетические полимеры [48], а также физические методы, например, «генная пушка» [80], электропорация [19] и некоторые другие [76].

Электропорация один из хорошо зарекомендовавших себя методов невирусного генного переноса. Принцип его работы основан на приложении к плазматической мембране электрического поля, большего, чем ее собственная электрическая емкость, в результате чего происходит перераспределение зарядов на мембране с последующим формированием пор, что позволяет молекулам ДНК диффундировать внутрь клеток. Описана внутрикожная, внутримышечная и внутриопухолевая доставка плазмидной ДНК с помощью электропорации [72, 71]. Показано, что такой метод позволяет в десятки и сотни раз повысить эффективность доставки и экспрессии генов с плазмидных ДНК [36, 78]. Более того, эффективность электропорации можно повысить, например, добавлением к раствору ДНК плуроников (Pluronic) [65, 68], которые представляют собой амфифильные блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида, например, Pluronic PE6400. Различное сродство к воде пропиленовой (гидрофобной) и этиленовых (более гидрофильных) частей молекулы придает Pluronic в водном растворе свойства поверхностно-активных веществ (ПАВ). Полимеры Pluronic находят широкое применение

в медицине и фармакологии. Обладая очень низкой токсичностью по сравнению с другими ПАВ, Pluronic входят в состав композиций искусственных заменителей крови. Кроме того, большой объем экспериментальных и теоретических данных позволяет считать, что Pluronic обеспечивают простой, безопасный и эффективный метод переноса генов, который потенциально применим в протоколах генной терапии, включающих внутримышечную инъекцию плазмидной ДНК с целью синтеза терапевтических белков. К тому же, ряд представителей Pluronic® уже одобрены для использования людьми Фармакопеей США и Европейской фармакопейной комиссией, и демонстрируют благоприятный профиль безопасности при использовании в комплексе с ДНК-вакцинами и терапевтическими средствами [9].

Антиоксидантные защитные системы

Организм человека обладает многоуровневой системой защиты от повреждающего действия факторов химической природы, в том числе окислителей. Эта система поддерживается рядом антиоксидантных ферментов, которые включают глутатионпероксидазу (Glutathione peroxidase, GPX), каталазу и супероксиддисмутазу (Superoxide Dismutase, SOD). Среди этих ферментов значительное внимание уделяется радиозащитным свойствам SOD, изоформы которой (CuZnSOD, MnSOD и внеклеточная SOD) участвуют в детоксикации супероксидных анион-радикалов в цитозоле, митохондриях и внеклеточном пространстве и катализируют образование пероксида водорода. Известно, что все три изоформы обладают радиозащитным потенциалом, снижая острую радиационную токсичность путем нейтрализации радиационно-индуцированных активных форм кислорода и подавления окислительного стресса [46, 59]. Тем не менее, высокий риск аллергических реакций, большая молекулярная масса, неспособность свободно проходить через клеточную мембрану, короткий период полураспада, быстрый метаболизм и узкое временное окно действия ограничивают терапевтическое применение препаратов на основе SOD [23, 42]. Одной из многообещающих стратегий является избыточная экспрессия эндогенных антиоксидантов посредством введения их трансгенов *in vivo*. В последние десятилетия большая часть научных исследований в области генной терапии радиационных поражений сконцентрирована именно на изучении потенциала генов SOD [16, 32, 57].

Генная терапия на основе SOD показала положительные результаты в многочисленных экспериментальных работах [25-28, 33, 57, 77]. Исследователи Питтсбургского университета во главе с доктором Greenberger J.S. изучали использование трансгена SOD2, кодирующего MnSOD человека, в качестве средства для защиты

здоровых тканей от повреждений во время лучевой терапии рака легких. Они показали, что профилактическое интратрахеальное введение гена *SOD2* в составе аденовирусного вектора приводит к значительному снижению степени повреждения легких от облучения, но при этом радиозащитный эффект по отношению к карциноме легких не проявляется, что позволяет повысить эффективность и безопасность противоопухолевой лучевой терапии [16, 26, 57]. Аналогичным образом, интраэзофагальное введение мышам плазмиды с геном *SOD2* в составе липосом (MnSOD-PL) за 24 часа до облучения предотвращает развитие радиационно-индуцированного эзофагита [57, 27]. Также на мышах было показано, что инъекция препарата MnSOD-PL в полость рта уменьшает степень лучевого повреждения слизистой оболочки и снижает риск возникновения мукозита ротовой полости. Стоит отметить, что, как и в случае облучения легких, MnSOD-PL не влияет на радиорезистентность клеток карциномы головы и шеи [25, 28, 33]. Положительные результаты исследований MnSOD-PL на клеточных культурах и на животных послужили основанием для проведения клинических исследований.

В 2005 г. в рамках клинического исследования «Применение MnSOD-PL для профилактики радиационно-индуцированного эзофагита с одновременной химиотерапией немелкоклеточного рака легкого» на 16 пациентах с неоперабельным раком легкого была проведена оценка безопасности генотерапевтического препарата в дозах 0,3–30 мг. В течение 7,5 недель проводилась торакальная лучевая терапия с одновременным применением карбоплатина и таксола. Генотерапевтический препарат пациенты принимали внутрь каждые 1 и 3 сутки недели на протяжении всего срока лечения (всего 14 доз). В результате проведенного клинического исследования только у двух пациентов были выявлены незначительные побочные эффекты: сыпь, расстройство ЖКТ и гипонатриемия. При этом дозолимитирующих токсических эффектов не наблюдалось [75, 77].

Другим антиоксидантным ферментом, который рассматривается в качестве перспективного средства в радиозащитной генной терапии, является каталаза. Она катализирует разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород, таким образом защищая клетку от окислительного воздействия. По данным Erperly M. и соавт. интратрахеальное введение мышам линии C57Bl/6NHsd гена митохондриальной каталазы в составе плазмидного вектора за 24 часа до острого облучения области грудной клетки в дозе 20 Гр обеспечивало повышение выживаемости на 70% по сравнению с контролем, при этом риск развития радиационно-индуцированного альвеолита снижался на 20% [24]. Кроме того, в работе Miao W. и соавт. было показано, что генная терапия каталазой в 7,5

раз ускоряет приживание трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток у мышей после радиационного воздействия в дозе 2 Гр [57].

На данный момент, несмотря на положительные результаты применения генной терапии с использованием антиоксидантных ферментов в качестве радиозащитных агентов, сохраняется необходимость проведения дальнейших исследований по определению эффективности и безопасности такого подхода.

Система репарации ДНК

Энергия ионизирующей радиации вызывает повреждение всех внутриклеточных молекул. Однако большинство молекул (например, воды, РНК, белков и т.д.) представлено многочисленными копиями, многие из них постоянно и быстро обновляются, что ограничивает последствия радиационного воздействия повреждением всего лишь нескольких одинаковых молекул. Напротив, молекулы ДНК находятся в клетке только в двух копиях, являются макромолекулами с ограниченной способностью к обмену и представляют собой большую по размеру мишень, выполняющую в клетке ключевые функции. Поэтому повреждения ДНК играют важную роль в судьбе клетки. При облучении в дозе 1 Гр в каждой клетке возникает примерно 10^5 событий ионизации, около 1000 одонитевых разрывов ДНК и примерно 20-40 двунитевых. Погибает 30% клеток млекопитающих и человека. Такая небольшая цитотоксичность радиации, несмотря на множество возникающих в клетке повреждений, объясняется эффективно протекающими процессами репарации ДНК [6].

В 2016 г. группа ученых из Токийского университета провела исследования по установлению механизма высокой устойчивости к радиационному поражению мелких беспозвоночных – тихоходок [35]. Известно, что некоторые их виды переносят почти полное обезвоживание и проявляют высокую толерантность к различным неблагоприятным физическим факторам [61, 45]. Кроме того, установлено, что устойчивость тихоходок к радиации в 1000 раз выше, чем у любого другого биологического вида, а средняя летальная доза ионизирующего излучения составляет 5000 Гр [40]. В более ранних исследованиях предполагалось, что такую высокую толерантность к ионизирующему излучению обеспечивает низкое содержание воды в организме, но последующие исследования показали, что тихоходки, даже будучи гидратированными, остаются очень устойчивыми к излучению по сравнению с другими животными. На основании этих данных было высказано предположение о том, что тихоходки обладают особыми механизмами репарации, т.е. они способны эффективно восстанавливать повреждения в своей ДНК после радиационного воздействия [40, 39].

Для выявления чужеродных привнесенных генов, оценки экспрессии генов, связанных с устойчивостью к радиационному поражению, и определения уникальных для данного организма белков, участвующих в репарации ДНК, токийские ученые во главе с Hashimoto Т. провели полное секвенирование генома и идентификацию белков одного из наиболее толерантного к негативным условиям представителя тихоокеанских моллюсков – *Ramazzottius varieornatus*. Рассматривая ДНК в качестве главной мишени радиационного поражения, авторы предположили, что уникальные белки *Ramazzottius varieornatus* могут связываться с ДНК для защиты и/или эффективного восстановления ДНК. Для доказательства этого предположения была выделена фракция хроматина и методом тандемной масс-спектрометрии был идентифицирован ко-локализованный с ядерной ДНК белок, названный Damage Suppressor (DSUP). Далее авторы сконструировали вектор экспрессии путем вставки кодирующей последовательности гена *DSUP* в плазмиду pCXN2KS. Полученной конструкцией трансфицировали клетки линии HEK293. Влияние белка DSUP на разрывы ДНК исследовали при облучении *DSUP*-экспрессирующих клеток и нетрансфицированных клеток HEK293 в дозе 10 Гр. В результате проведенного исследования авторы показали, что уникальный ДНК-ассоциированный белок DSUP на 40% подавлял повреждение ДНК, индуцированное радиационным воздействием, а также увеличивал жизнеспособность и пролиферативную активность трансфицированных клеток. Эти результаты указывают на возможность применения уникальных белков некоторых организмов для защиты от радиационных повреждений [35].

Регуляция апоптоза

Радиационное воздействие на организм приводит к p53-зависимому апоптозу радиочувствительных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). При этом известно, что транскрипционной мишенью для p53 является проапоптотический белок PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis). Угнетение экспрессии гена *PUMA* с помощью генной терапии с использованием репрессора транскрипции *SNAI2* (Snail Family Zinc Finger 2) может стать потенциальным подходом для подавления радиационно-индуцированного апоптоза [43]. В экспериментах *in vitro* было показано, что самоинактивирующийся лентивирусный вектор, несущий в себе ген *SNAI2*, повышает выживаемость трансдуцированных лимфобластоидных клеток линии ТК6, облученных в интервале доз 1–3 Гр за счет уменьшения экспрессии *PUMA* и снижения клеточной гибели на 50% [52]. Таким образом, использование гена *SNAI2* может быть перспективным направлением генной терапии, поскольку угнетение апоптоза является немаловажным механизмом защиты клеток и тканей от радиационного повреждения. Однако дальнейшее

использование генетических конструкций на основе *SNAI2* требует проведения дополнительных исследований, так как белок *SNAI2* может усиливать опухолевую инвазию [13].

Еще одним ингибитором апоптоза является мембранный белок Р-гликопротеин, кодируемый геном множественной лекарственной устойчивости *MDR1* (Multidrug Resistance 1), сверхэкспрессия которого представляет собой один из важных механизмов резистентности к химиолучевой терапии. Исследования показали, что продукт экспрессии гена *MDR1* защищает клетки не только путем удаления токсических агентов, но и путем ингибирования апоптоза, при этом дефицит Р-гликопротеина наоборот может привести к усилению апоптоза после облучения [31, 37, 74]. Maier P. и соавт. при анализе экспрессии ряда генов в лимфобластоидных клетках линии ТК6, трансдуцированных ретровирусным вектором, содержащим ген *MDR1*, показали, что у ряда генов, участвующих в детоксикации и экзоцитозе, увеличен уровень транскриптов в 1,4–4,0 раза (например, *ALDH1A*, *UNC13*), в то время как экспрессия генов проапоптоза была снижена в 2 раза для *CASP1* и в 2,5 раза для *NALP7* с сопутствующей повышенной экспрессией гена антиапоптоза *AKT3* [51]. Влияние сверхэкспрессии *MDR1* на передачу сигналов апоптоза дополнительно подтверждено фактом снижения скорости гибели клеток ТК6, трансдуцированных *MDR1*, после облучения. При облучении в дозе 2 Гр ретровирусная трансдукция гена *MDR1* обеспечивала достоверное повышение выживаемости клеток в 1,7 раза по сравнению с нетрансдуцированными клетками [53]. Радиозащитная эффективность *MDR1* показана и по отношению к ГСК, которые были трансдуцированы самоинактивирующимся лентивирусным вектором, содержащим ген *MDR1*. Анализ выживаемости клеток через 12 суток после облучения в диапазоне доз 0–8 Гр показал, что по мере увеличения дозы облучения доля выживших клеток, трансдуцированных *MDR1*, достоверно повышалась по сравнению с контрольными клетками (до 14 раз при 8 Гр) [53]. Таким образом можно заключить, что в *MDR1*-сверхэкспрессирующих клетках происходит дифференциальная экспрессия генов, кодирующих метаболические белки, связанные с апоптозом. Полученные результаты могут иметь важное значение для установления механизмов, с помощью которых генная терапия с использованием *MDR1* способствует сохранению функционального состояния тканей после радиационного или химиотерапевтического повреждения.

Цитокины, их рецепторы и факторы роста

В настоящее время в качестве средств ранней терапии радиационных поражений интенсивно изучаются цитокины, посредством которых осуществляется

скоординированное межклеточное взаимодействие, регуляция кроветворения, иммунного ответа, а также клеточного цикла в различных тканях [2, 7, 44]. К сожалению, низкий уровень эндогенного синтеза цитокинов недостаточен для реализации их защитных эффектов в полной мере, а применение рекомбинантных препаратов может быть связано с проявлением серьёзных побочных эффектов и риском развития аутоиммунных осложнений [73]. В связи с этим использование генотерапевтических препаратов, способных доставить гены целевых цитокинов в клетки-мишени и обеспечить их достаточную экспрессию на протяжении длительного времени, представляется перспективной концепцией в вопросе радиационной защиты человека.

Интерлейкин 3 (Interleukin-3, IL-3) играет важную роль в регуляции дифференцировки и пролиферации ранних кроветворных клеток предшественников, а также стимулирует образование макрофагов, гранулоцитов и дендритных клеток из костномозговых предшественников. Наличие у IL-3 большого спектра функциональной активности позволяет рассматривать его в качестве потенциального химио- и радиозащитного агента. Chapel A. и соавт. [17] провели исследования плазмиды, кодирующей ген человеческого IL-3, которая была ковалентно связана с моноклональными антителами 2B8, специфичными для CD117 (c-Kit). При внутривенном введении генной конструкции мышам линии Balb/C была обнаружена экспрессия IL-3 в костном мозге и селезенке, которая сохранялась в течение 10 суток. Следует отметить, что IL-3 не является идеальным цитокином для создания медицинских средств профилактики и лечения радиационных поражений из-за его способности вызывать воспаление путем стимулирования эозинофилов и тучных клеток, но представленный метод доставки генетического материала может представлять практический интерес для оценки возможности создания радиозащитных средств на основе пДНК, а также определения эффективности наработки целевых белков при направленной трансфекции генетических конструкций с последующим установлением их терапевтической эффективности.

Радиационно-индуцированное поражение мегакариоцитарного ростка кроветворения, приводящее к тромбоцитопении, лежит в основе формирования геморрагического синдрома. Экспериментальные исследования показали, что введение рекомбинантного тромбопоэтина (Thrombopoietin, TPO) животным приводит к увеличению числа тромбоцитов в несколько раз, что позволяет рассматривать TPO в качестве средства лечения тромбоцитопении, развивающейся на фоне химиолучевой терапии [29]. Однако длительное воздействие TPO может оказывать неблагоприятное воздействие на костный мозг и приводить к появлению нейтрализующих антител, что

ограничивает эффективность и длительность его применения, а также затрудняет подбор терапевтической дозы [70].

Ohwada A. et al. получили конструкцию на основе аденовирусного вектора, содержащую в себе ген *THPO* под цитомегаловирусным промотором – AdCMV.TPO [63]. При введении AdCMV.TPO здоровым мышам было показано семикратное увеличение количества тромбоцитов на 7-е сутки эксперимента, с последующим их снижением к 17-м суткам до уровня показателей контрольной группы животных. При исследовании эффективности конструкции на модели тромбоцитопении, индуцированной химиолучевым воздействием (карбоплатин и облучение в дозе 5 Гр) было продемонстрировано, что у животных при однократном внутрибрюшинном введении AdCMV.TPO за 3 дня до поражения количество тромбоцитов поддерживалось на высоком уровне, снижаясь только в два-три раза с 9 до 11 суток. Кроме того, отмечали увеличение скорости восстановления количества тромбоцитов до нормального уровня примерно на одну неделю по сравнению с контрольной группой. Аналогичные результаты были показаны при введении вектора AdCMV.TPO с одновременным воздействием поражающих факторов. При этом наблюдалась тенденция к ускоренному восстановлению уровня лейкоцитов и гематокрита. На основании полученных результатов авторы заключили, что AdCMV.TPO обладает терапевтической активностью при однократном введении до и во время химиолучевого поражения, хорошо переносится животными и может рассматриваться в качестве перспективного средства для терапии радиационных поражений [63].

Известно, что ГСК находятся в специфической микросреде, созданной поддерживающими клетками (фибробласты, остеобласты, эндотелиальные клетки и адипоциты). Эта микросреда регулирует самоподдержание ГСК, их миграцию, пролиферацию, коммитирование в миелоидном и лимфоидном направлениях, и представляет собой сложную радиочувствительную нишу, которая может иметь решающее значение для жизнеспособности стволовых клеток и их восстановления после радиационно-индуцированной миелосупрессии [56, 62]. Одним из регуляторов микроокружения ГСК является сигнальный белок Sonic hedgehog (SHH), который стимулирует увеличение количества ГСК и повышает их репопулирующую способность. В настоящее время местная и краткосрочная экспрессия гена *SHH* на уровне ниши ГСК рассматривается в качестве новой стратегии генной терапии [22]. Были проведены исследования мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, трансфицированных плазмидой pIRES28-SHH, которые вводили обезьянам после облучения в дозе 8 Гр. В контрольной группе (n=4) была зафиксирована гибель двух животных на 19 и 196 сутки,

тогда как в опытной группе (n=4) наблюдалась 100% выживаемость, при этом у опытных животных отмечалась меньшая степень выраженности радиационной нейтропении, тромбоцитопении и анемии. На основании проведенных исследований авторы предполагают, что ген *SHH* может рассматриваться в качестве потенциального радиозащитного агента для восстановления костномозгового кроветворения.

Интересные результаты были получены при исследовании протективной эффективности аденовирусного вектора, экспрессирующего эритропоэтин (AdEpo), в отношении радиационно-индуцированного кератоконъюнктивита [69]. AdEpo вводили мышам путем канюлирования протока поднижнечелюстной железы за сутки до облучения. На 10 и 56 сутки наблюдения у контрольных животных отмечали снижение секреции слезной жидкости, более тонкий слой эпителия роговицы, низкий гематокрит, а также пониженный уровень фактора роста эндотелия сосудов по сравнению с животными, которым профилактически был введен AdEpo.

Фактор роста гепатоцитов (Hepatocyte growth factor, HGF) обладает мощным митогенным, антиапоптотическим и ангиогенным действием, и его активность наиболее выражена в эпителиальных и эндотелиальных клетках [15, 79]. Ну S. и соавт. исследовали радиозащитную эффективность аденовирусного вектора, экспрессирующего *HGF* (AdHGF), на модели радиационно-индуцированного поражения сердца животных. Показано, что AdHGF при прямом введении в миокард крысам через 2 недели после локального воздействия γ -излучения в дозе 20 Гр оказывал лечебный эффект, который проявлялся в увеличении локальной перфузии с сохранением сократительной функции левого желудочка и уменьшением выраженности фиброза по сравнению с контрольной группой животных [41].

В работе Li Q. et al. показан радиозащитный эффект *HGF* в схеме лечения костномозговой формы острого лучевого поражения [49]. Внутривенное введение AdHGF мышам линии C57BL/6 за 48 часов до однократного облучения в дозе 6,5 Гр приводило к увеличению средней продолжительности жизни, скорости восстановления эритроцитов и лейкоцитов, повышению в крови уровней EPO и IL-6 и снижению уровня IFN- γ . Кроме того, в костном мозге животных опытной группы отмечалось достоверное уменьшение количества апоптотических клеток с микроядрами.

Многофункциональность HGF, в том числе его способность стимулировать гемопоэз, позволяет рассматривать данный ростовой фактор в качестве потенциального радиозащитного средства. Тем не менее, известно, что HGF также способствует росту и метастазированию раковых клеток, что ограничивает широкое применение гена *HGF* в терапии радиационных поражений.

Фактор роста кератиноцитов (Keratinocyte Growth Factor, KGF или FGF7), относящийся к семейству факторов роста фибробластов, играет существенную роль в пролиферации эпителиальных клеток. На сегодняшний день, обнаружено его радиозащитное действие на эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта, волосяные фолликулы и альвеолярный эпителий, без стимулирующего влияния на клетки опухолей [14, 20, 21, 66]. Учитывая высокую эффективность фактора при лучевой терапии, рекомбинантный KGF получил одобрение FDA для лечения орального мукозита, вызванного химиотерапией [30]. Zheng и соавт. исследовали эффективность аденовирусного вектора с ретровирусными элементами, экспрессирующего ген *KGF* (AdKGF), который вводили в слюнные железы мышей с радиационно-индуцированным оральным мукозитом [82] и гипопункцией слюнных желез [81]. Введение AdKGF при фракционированном облучении в суммарной дозе 30 Гр снижало степень проявления гипопункции слюнных желез и способствовало повышению количества эндотелиальных клеток и скорости их пролиферации по сравнению с мышами контрольной группы [81]. Кроме того, у опытных животных снижалась тяжесть орального мукозита при однократном облучении (22,5 Гр), а при фракционированном облучении (суммарно 40 Гр) экспрессия *KGF* полностью предотвращала образование язв [82].

Фактор роста фибробластов 2 (Fibroblast Growth Factor 2, FGF2) и фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) являются наиболее важными факторами при ангиогенезе. Оба фактора повышают миграционную активность, пролиферацию и выживаемость эндотелиальных клеток, а также являются мощными митогенами. Поскольку радиационное повреждение эндотелия является важным фактором в развитии нарушений функций органов и тканей [64], гены *FGF2* и *VEGF* могут играть немалую роль в защите микроциркуляторного сосудистого тока. На модели радиационно-индуцированной ксеростомии показано, что введение аденовирусных векторов, экспрессирующих *FGF2* и *VEGF* (AdFGF2 и AdVEGF), в слюнные железы мышей за 48 часов до облучения (15 Гр) приводило к сохранности плотности микрососудов в поднижнечелюстных железах по сравнению с животными контрольной группы. Кроме того, у мышей через 8 недель после облучения регистрировали увеличение уровня секреции слюны на 70% при введении AdFGF2 и на 80% при введении AdVEGF по сравнению с контрольной группой [18]. Таким образом, гены ангиогенных факторов роста *FGF2* и *VEGF* могут рассматриваться в качестве потенциальных средств терапии лучевых поражений, однако следует учитывать, что представленные факторы могут стимулировать опухолевый ангиогенез.

Еще один подход к созданию средств ранней патогенетической терапии радиационных повреждений связан с использованием рецептора фактора некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR). Известно, что одним из последствий воздействия ионизирующего излучения является постлучевой фиброз легких, который может привести к летальному исходу [55]. Патологические воспалительные и фиброзные изменения могут быть ослаблены путем ингибирования активности ключевого медиатора в патогенезе пострadiационного повреждения легких - фактора некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor, TNF) [11]. Группой авторов во главе с Przybyszewska M. экспериментально изучена антифибротическая генная терапия с применением плазмиды pcDNA3.1, кодирующей ген растворимого рецептора *TNFR-I* (psTNFR-I) [67]. За 3 суток до облучения (20 Гр) мышам однократно внутримышечно вводили psTNFR-I или пустой вектор (контрольная группа) в комплексе с полиэтиленимином (Polyetylenimine, PEI). Через неделю после облучения одной группе мышей вводили препарат однократно, другой группе осуществляли курсовое введение в течение 10 недель (1 инъекция/неделя). Результаты исследования продемонстрировали 100% гибель во всех экспериментальных группах в течение 14-39 недель после облучения. При этом курсовое введение psTNFR-I увеличивало продолжительность жизни животных на 7–8 недель по сравнению с контрольной группой и уменьшало видимые признаки фиброза. Несмотря на неоднозначные результаты, авторы пришли к выводу, что внутримышечная доставка гена *TNFR-I* с помощью PEI может быть простым, безопасным и эффективным способом защиты легких при лучевых поражениях, однако требуются дополнительные доклинические исследования.

Заключение

На данный момент накоплен небольшой объем данных в области разработок генотерапевтических средств профилактики и терапии радиационных поражений. Некоторые успехи были достигнуты при использовании препаратов на основе антиоксидантных средств (MnSOD), систем репарации ДНК (DSUP), регуляторов апоптоза (SNAI2, MDR1), однако наибольший прогресс достигнут при применении генно-инженерных конструкций (ГИК), вызывающих экспрессию цитокинов и ростовых факторов (TNPO, HGF и др.), которые играют основную роль в защите/восстановлении костного мозга при радиационных поражениях (табл. 1). При этом средства на основе ГИК лишены ряда недостатков, характерных для рекомбинантных белков, а именно необходимости курсового введения, высокой стоимости получения, особых требований к

условиям хранения, возможности проявления серьезных побочных эффектов и риска развития аутоиммунных осложнений. В качестве систем доставки чаще всего используют вирусные (ленти-, адено-, аденоассоциированные вирусы и др.) и плазмидные вектора. Последние на данный момент остаются наиболее дешевыми и безопасными, тогда как вирусные системы доставки с высокой вероятностью провоцируют иммунный ответ, что не только ограничивает возможность повторных введений препаратов, но и может быть причиной серьезных нежелательных последствий. К тому же вектора на базе плазмид привлекательны простотой своей структуры и удобством получения в больших количествах. Тем не менее сохраняются проблемы, связанные с неспецифическим характером способа доставки, низкой эффективностью трансфицирующей способности пДНК и краткосрочной экспрессией гена с наработкой относительно небольших количеств целевого белка при однократном введении. Для преодоления этих сложностей существует достаточно широкий спектр методов, таких как молекулярная оптимизация последовательностей как самих плазмид, так и клонируемых в них кДНК, использование липосомальных комплексов с пДНК, полимерных носителей и др. Одним из хорошо зарекомендовавших себя методов невирусного генного переноса является электропорация, которая позволяет повысить эффективность доставки и экспрессии генов с пДНК в десятки и сотни раз [10].

Представленные данные свидетельствуют о том, что генотерапевтический подход создания противолучевых средств, несмотря на все имеющиеся сложности, является весьма перспективным. За счет использования современных достижений генной инженерии и проведения фундаментальных радиобиологических исследований можно не только усовершенствовать имеющиеся медицинские средства защиты, но и создать совершенно новые высокоэффективные и безопасные препараты.

В рамках апробации генотерапевтического подхода нами было показано, что ГИК на основе плазмидных векторов, кодирующие гены фактора стволовых клеток (SCF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и лиганда Fms-подобной тирозинкиназы-3 (FLT3L) достоверно стимулируют кроветворение [3]. В настоящий момент проводятся исследования по оценке их эффективности на экспериментальной модели радиационного поражения. Выбор цитокинов был обусловлен их общей точкой приложения – стимуляция пролиферации стволовых клеток костного мозга и образование полипотентных гемопоэтических колоний. При этом SCF и FLT3L участвуют в самообновлении и экспансии пула полипотентных клеток, FLT3L стимулирует их дифференцировку в лимфоидный предшественник, а G-CSF обеспечивает дифференцировку всего миеломоноцитарного звена до стадии зрелых нейтрофильных

гранулоцитов. Таким образом, их комбинированное применение будет способствовать самообновлению пула ГСК, поддержанию звеньев врожденного и адаптивного иммунитета. Успешность такого подхода позволит расширить арсенал медицинских средств противорадиационной защиты и открыть перспективы для дальнейшего развития методов генной терапии радиационных поражений.

Таблица 1 – Основные примеры применения ГИК для профилактики и терапии радиационных поражений

Ген	Вектор	Способ введения	Эффекты	Источник
Супероксиддисмутаза (Superoxide Dismutase, SOD).	Плазмида/липосома	Интратрахеальный, интраэзофагальный, внутривенный, ингаляционный и др.	Повышение выживаемости, снижение степени повреждения легких, снижение риска возникновения радиоиндуцированного эзофагита, мукозита	16, 25-28, 32, 33, 57, 77
Каталаза (Catalase, CAT)	Плазмида/липосома	Интратрахеальный	Повышение выживаемости, снижение степени альвеолита	24
	Ретровирус	<i>Ex vivo</i>	Ускорение приживления трансплантированных ГСК	57
Ген тихоходок, кодирующий белок DSUP (Damage Suppressor)	Плазмида	<i>In vitro</i>	Защита ДНК, увеличение жизнеспособности и пролиферативной активности клеток	35
Ген репрессора транскрипции SNAI2 (Snail Family Zinc Finger 2)	Лентивирус	<i>In vitro</i>	Повышение выживаемости клеток, подавление апоптоза	52
Ген множественной лекарственной устойчивости (Multidrug Resistance 1, MDR1)	Ретровирус	<i>In vitro</i>	Повышение выживаемости клеток, подавление апоптоза	53
	Лентивирус	<i>In vitro</i>	Повышение выживаемости клеток	53
Интерлейкин 3 (Interleukin-3, IL-3)	Плазмида, конъюгированная моноклональными антителами	Внутривенный	Экспрессия IL-3 в костном мозге и селезенке	17
Тромбопоэтин (Thrombopoietin, TPO)	Аденовирус	Внутрибрюшинный	Увеличение числа тромбоцитов	63

Ген	Вектор	Способ введения	Эффекты	Источ- ник
Ген эмбрионального развития <i>SHH</i> (Sonic hedgehog)	Плазмида	Внутрикостный	Увеличение количества ГСК, повышение их репопулирующей способности	22
Эритропоэтин (Erythropoietin, <i>EPO</i>)	Аденовирус	В проток поднижнечелюстной железы	Увеличение продукция слезной жидкости, сохранение эпителия роговицы, повышение экспрессии рецептора VEGF	69
Фактор роста гепатоцитов (Hepatocyte growth factor, <i>HGF</i>)	Аденовирус	Внутрисердечный	Снижение выраженности фиброза	41
	Аденовирус	Внутривенный	Увеличение СПЖ, стимуляция гемопоэза	49
Фактор роста кератиноцитов (Keratinocyte Growth Factor, <i>KGF</i> или <i>FGF7</i>)	Аденовирус	В слюнные железы	Снижение степени мукозита, увеличение пролиферативной активности эндотелиальных клеток	81, 82
Фактор роста фибробластов 2 (Fibroblast Growth Factor 2, <i>FGF2</i>)	Аденовирус	В слюнные железы	Увеличение пролиферативной активности и выживаемости эндотелиальных клеток	18
Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, <i>VEGF</i>)	Аденовирус	В слюнные железы	Увеличение пролиферативной активности и выживаемости эндотелиальных клеток	18
Рецептор фактора некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor Receptor, <i>TNFR</i>)	Плазмида	Внутримышечный	Увеличение СПЖ, снижение степени фиброза	67

Список литературы

1. Васин М.В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии / Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53(5). С. 459–467.
2. Власенко Т.Н., Назаров В.Б., Гребенюк А.Н. Современные подходы к фармакологической профилактике радиационных поражений / Биомедицинский журнал «Medline.Ru». 2010. Т. 11. С. 230–253.
3. Власова О.А., Кравцов И.С., Багнаев И.В, Ковшарь Э.А., Круглова А.А., Никифоров А.С., Свентицкая А.М. Разработка рекомбинантных плазмидных ДНК, кодирующих кроветворные ростовые факторы SCF, G-CSF и FLT-3L и исследование их влияния на гематологические показатели мышей / Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59, № 5. С. 503–515.
4. Гладких В.Д., Баландин Н. В., Башарин В.А., Беловолов А.Ю., Гребенюк А.Н., Дружков А.В., Падалко С.В. Состояние и перспективы развития средств профилактики и лечения радиационных поражений / Под. ред. проф. В. Д. Гладких. М.: «Комментарий», 2017. 304 с.
5. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения 02.02.2020).
6. Джойнер М.С., Дж. ван дер Когель О. Основы клинической радиобиологии. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2020. 600 с.
7. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.
8. Международный реестр клинических исследований Национального института здоровья США [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/> (дата обращения 02.02.2020)
9. Anaïs P. Barry, Nicolas P. E. Barry. Pluronic® block-copolymers in medicine: From chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances / Polymer Chemistry. 2014. Vol. 5. P. 3291-3297. DOI: 10.1039/C4PY00039K.
10. Andre F., Mir L.M. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications / Gene Therapy. 2004. Vol. 11. P. S33–S42.
11. Anscher M.S., Chen L., Rabbani Z., Kang S., Larrier N., Huang H., Samulski T.V., Dewhirst M.W., Brizel D.M., Folz R.J., Vujaskovic Z. Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy / Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005. Vol. 62(1). P. 255–259.
12. Aurisicchio L., Ciliberto G. Genetic cancer vaccines: current status and perspectives / Expert Opin Biol Ther. 2012. Vol. 12(8). P. 1043-1058.

13. Barrallo-Gimeno A., Nieto M.A. The snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer / *Development*. 2005. Vol. 132(14). P. 3151–3161.
14. Booth C., Potten C. Keratinocyte growth factor increases hair follicle survival following cytotoxic insult / *J Invest Dermatol*. 2000. Vol. 114(4). P. 667–673.
15. Bussolino F., Di Renzo M.F., Ziche M., Bocchietto E., Olivero M., Naldini L., Gaudino G., Tamagnone L., Coffe A., Comoglio P.M. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth / *J Cell Biol*. 1992. Vol. 119(3). P. 629–641.
16. Cataldi S., Borrelli A., Ceccarini M.R., Nakashidze I., Codini M., Belov O., Ivanov A., Krasavin E., Ferri I., Conte C., Patria F.F., Traina G., Beccari T., Mancini A., Curcio F., Ambesi-Impiombato F.S., Albi E. Neutral Sphingomyelinase Modulation in the Protective/Preventive Role of rMnSOD from Radiation-Induced Damage in the Brain / *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20(21). P. E5431.
17. Chapel A., Deas O., Bensidhoum M., Francois S., Mouiseddine M., Poncet P., Dürrbach A., Aigueperse J., Gourmelon P., Gorin N.C., Hirsch F., Thierry D. In vivo gene targeting of IL-3 into immature hematopoietic cells through CD117 receptor mediated antibody gene delivery / *Genet Vaccines Ther*. 2004. Vol. 2(1). P. 2-16. DOI: 10.1186/1479-0556-2-16.
18. Cotrim A., Sowers A., Mitchell J., Baum B. Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands / *Mol Ther*. 2007. Vol. 15(12). P. 2101–2106.
19. Dean D.A. Cell-specific targeting strategies for electroporation-mediated gene delivery in cells and animals / *J. Membrane Biol*. 2013. Vol. 246. P. 737-744.
20. Dorr W., Noack R., Spekl K., Farrel C. Modification on oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure / *Int J Radiat Biol*. 2001. Vol. 77(3). P. 341–347.
21. Dorr W., Spekl K., Farrel C. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcer in mouse tongue epithelium / *Cell Prolif*. 2002. Vol. 35. P. 86–92.
22. Drouet M., Garrigou P., Peinnequin A., Hérodin F. Short-term sonic-hedgehog gene therapy to mitigate myelosuppression in highly irradiated monkeys: hype or reality / *Bone Marrow Transplantation*. 2014. Vol. 49. P. 304–309.
23. Edsmyr F, Huber W, Menander K.B. Orgotein efficacy in ameliorating side effects due to radiation therapy. I. Double-blind, placebo-controlled trial in patients with bladder tumors / *Curr. Ther. Res. Clin. Exp*. 1976. Vol. 19(2). P. 198–211.

24. Epperly M., Melendez J., Zhang X., Nie S., Pearce L., Peterson J., Franicola D., Dixon T., Greenberger B.A., Komanduri P., Wang H., Greenberger J.S. Mitochondrial targeting of a catalase transgene product by plasmid liposomes increases radioresistance in vitro and in vivo / *Radiat Res.* 2009. Vol. 171. P. 588–595.
25. Epperly M.W., Carpenter M., Agarwal A., Mitra P., Nie S., Greenberger J.S. Intraoral manganese superoxide dismutase-plasmid/ liposome (MnSOD-PL) radioprotective gene therapy decreases ionizing irradiation-induced murine mucosal cell cycling and apoptosis / *In Vivo.* 2004. Vol. 18. P. 401–410.
26. Epperly M.W., Defilippi S., Sikora C., Gretton J., Kalend A., Greenberger J.S. Intratracheal injection of manganese superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposomes protects normal lung but not orthopedic tumors from irradiation / *Gene Ther.* 2000. Vol. 7. P. 1011–1018.
27. Epperly M.W., Kagan V.E., Sikora C.A., Gretton J.E., Defilippi S.J., Bar-Sagi D., Greenberger J.S. Manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) administration protects mice from esophagitis associated with fractionated radiation / *Int. J. Cancer.* 2001. Vol. 96. P. 221–231.
28. Epperly M.W., Sikora C.A., DeFilippi S.J., Gretton J.A., Zhan Q., Kufe D.W., Greenberger J.S. Manganese superoxide dismutase (SOD2) inhibits radiation-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial membrane / *Radiat Res.* 2002. Vol. 157(5). P. 568–577.
29. Fibbe W.E., Heemskerk D.P., Laterveer L., Pruijt J.F., Foster D., Kaushansky K., Willemze R. Accelerated reconstitution of platelets and erythrocytes after syngeneic transplantation of bone marrow cells derived from thrombopoietin pretreated donor mice / *Blood.* 1995. Vol. 86(9). P. 3308–3313.
30. Finch P.W., Mark Cross L.J., McAuley D.F., Farrell C.L. Palifermin for the protection and regeneration of epithelial tissues following injury: new findings in basic research and pre-clinical models / *J Cell Mol Med.* 2013. Vol. 17(9). P. 1065–1087.
31. Gottesman M.M., Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter / *Annu Rev Biochem.* 1993. Vol. 62. P. 385–427.
32. Greenberger J.S., Epperly M.W., Gretton J., Jefferson M., Nie S., Bernarding M., Kagan V., Guo H.L. Radioprotective gene therapy / *Curr Gene Ther.* 2003. Vol. 3(3). P. 183–195.
33. Guo H., Seixas-Silva J.A., Epperly M.W., Gretton J.E., Shin D.M., Bar-Sagi D., Archer H., Greenberger J.S. Prevention of radiation-induced oral cavity mucositis by plasmid/liposome delivery of the human manganese superoxide dismutase (SOD2) transgene / *Radiat. Res.* 2003. Vol. 159(3). P. 361–370.

34. Hacein-Bey-Abina S., Alexandrine Garrigue, Gary P Wang. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 / *J Clin Invest.* 2008. Vol. 118 (9). P. 3132-3142. DOI: 10.1172/JCI35700.
35. Hashimoto T., Horikawa D.D., Saito Y., Kuwahara H., Kozuka-Hata H., Shin-I T., Minakuchi Y., Ohishi K., Motoyama A., Aizu T., Enomoto A., Kondo K., Tanaka S., Hara Y., Koshikawa S., Sagara H., Miura T., Yokobori S., Miyagawa K., Suzuki Y., Kubo T., Oyama M., Kohara Y., Fujiyama A., Arakawa K., Katayama T., Toyoda A., Kunieda T. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein / *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. Article number: 12808. DOI: 10.1038/ncomms12808.
36. Heller L.C., Heller R. In Vivo Electroporation for Gene Therapy / *Human Gene Therapy.* 2006. Vol. 17. P. 890–897.
37. Hesdorffer C., Ayello J., Ward M., Kaubisch A., Vahdat L., Balmaceda C., Garrett T., Fetell M., Reiss R., Bank A., Antman K. Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation / *J Clin Oncol.* 1998. Vol. 16. P. 165–172.
38. High K.A, Roncarolo M.G. Gene Therapy / *N Engl J Med.* 2019. Vol. 381(5). P. 455-464. DOI: 10.1056/NEJMra1706910.
39. Horikawa D.D., Cumbers J., Sakakibara I., Rogoff D., Leuko S., Harnoto R., Arakawa K., Katayama T., Kunieda T., Toyoda A., Fujiyama A., Rothschild L.J. Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation / *PLoS One.* 2013. Vol. 8(6), e64793. DOI: 10.1371/journal.pone.0064793.
40. Horikawa D.D., Sakashita T., Katagiri C., Watanabe M., Kikawada T., Nakahara Y., Hamada N., Wada S., Funayama T., Higashi S., Kobayashi Y., Okuda T., Kuwabara M. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum* / *Int J Radiat Biol.* 2006. Vol. 82(12), P. 843–848.
41. Hu S., Chen Y., Li L., Chen J., Wu B., Zhou X., Zhi G., Li Q., Wang R., Duan H., Guo Z., Yang Y., Xiao F., Wang H., Wang L. Effects of adenovirus-mediated delivery of the human hepatocyte growth factor gene in experimental radiation-induced heart disease / *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005. Vol. 75(5). P. 1537–1544.
42. Huang X, Song C., Zhong C, Wang F. Research progress in the adioprotective effect of superoxide dismutase / *Drug Discov. Ther.* 2012. Vol. 6(4). P. 169–177.
43. Inoue A., Seidel M.G., Wu W., Kamizono S, Ferrando A.A., Bronson R.T., Iwasaki H., Akashi K., Morimoto A., Hitzler J.K., Pestina T.I., Jackson C.W., Tanaka R., Chong

M.J., McKinnon P.J. Inukai T., Grosveld G.C., Look A.T. Slug, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo / *Cancer Cell*. 2002. Vol. 2(4). P. 279–288.

44. Johnke R.M., Sattler J.A., Allison R.R. Radioprotective agents for radiation therapy: future trends / *Future Oncol*. 2014. Vol. 10(15). P. 2345–2357.

45. Jonsson K. I., Harms-Ringdahl M., Torudd J. Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer* / *Int. J. Radiat. Biol*. 2005. Vol. 81(9). P. 649–656.

46. Kang S.K., Rabbani Z.N., Folz R.J., Golson M.L., Huang H., Yu D., Samulski T.S., Dewhirst M.W., Anscher M.S., Vujaskovic Z. Overexpression of extracellular superoxidodismutase protects mice from radiation-induced lung injury / *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2003. Vol. 57. P. 1056–1066.

47. Kantor B., McCown T., Leone P., and Steven J. Gray / *Adv Genet*. 2014. Vol. 87. P. 71–124. DOI:10.1016/B978-0-12-800149-3.00002-0.

48. Li L., Wei Y., Gong C. Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery / *J. Biomed. nanotechnol*. 2015. Vol. 11. P. 739–770.

49. Li Q., Sun H., Xiao F., Wang X., Yang Y., Liu Y., Zhang Q., Wu C., Wang H., Wang L.S. Protection against radiation-induced hematopoietic damage in bone marrow by hepatocyte growth factor gene transfer / *Int J Radiat Biol*. 2014. Vol. 90(1). P. 36–44.

50. Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy / *Diseases*. 2018. Vol. 6(2). P. 42. DOI: 10.3390/diseases6020042

51. Maier P., Fleckenstein K., Li L., Laufs S., Zeller W.J., Baum C., Fruehauf S., Herskind C., Wenz F. Overexpression of MDR1 using a retroviral vector differentially regulates genes involved in detoxification and apoptosis and confers radioprotection / *Radiat Res*. 2006. Vol. 166(3). P. 463–473.

52. Maier P., Herskind C., Barzan D., Zeller W.J., Wenz F. SNAI2 as a Novel radioprotector of normal tissue by gene transfer using a lentiviral bicistronic SIN vector. *Radiat Res*. 2010. Vol. 173(5). P. 612–619.

53. Maier P., Herskind C., Fleckenstein K., Spier I., Laufs S., Zeller W.J., Fruehauf S., Wenz F. MDR1 gene transfer using a lentiviral SIN vector confers radioprotection to human CD34+ hematopoietic progenitor cells / *Radiat Res*. 2008. Vol. 169(3). P. 301–310.

54. Mammen B, Ramakrishnan T, Sudhakar U; Vijayalakshmi. Principles of gene therapy / *Indian J Dent Res*. 2007. Vol. 18(4). P. 196–200. DOI: 10.4103/0970-9290.35832.

55. Marks L.B., Yu X., Vujaskovic Z., Small W.Jr, Folz R., Anscher M.S. Radiation-induced lung injury / *Semin Radiat Oncol*. 2003. Vol. 13(3). P. 333–345.

56. Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / *Nature*. 2010. Vol. 466(7308). P. 829–834.
57. Miao W., Xufeng R., Park M.R., Gu H., Hu L., Kang J.W., Ma S., Liang P.H., Li Y., Cheng H., Yu H., Epperly M., Greenberger J., Cheng T. Hematopoietic stem cell regeneration enhanced by ectopic expression of ROS-detoxifying enzymes in transplant mice / *Mol Ther*. 2015. Vol. 21(2). P. 423–432.
58. Miller H.I. Gene therapy on trial / *Science*. 2000. Vol. 287, № 5453. P. 591–592.
59. Moding E.J., Kastan M.B., Kirsch D.G. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation / *Nat. Rev. Drug Discov*. 2013. Vol. 12(7). P. 526–542.
60. Nathwani A.C., Tuddenham E.G., Rangarajan S. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B / *N Engl J Med*. 2011. Vol. 365, №25. P. 2357–2365.
61. Nelson D.R. The biology and ecology of lotic Tardigrada / *Freshwater Biology*. 2000. Vol. 44(1). P. 93–108.
62. Oh I.H., Kwon K.R. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulation / *Stem Cells*. 2010. Vol. 28(7). P. 1243–1249.
63. Ohwada A., Rafii S., Moore M., Crystal R.G. In vivo adenovirus vector-mediated transfer of the human thrombopoietin cDNA maintains platelet levels during radiation- and chemotherapy-induced bone marrow suppression / *Blood*. 1996. Vol. 88(3). P. 778–784.
64. Paris F., Fuks Z., Kang A., Capodieci P., Juan G., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman A., Cordon-Cardo C., Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice / *Science*. 2001. Vol. 293(5528). P. 293–297.
65. Pitard B., Pollard H., Agbulut O. et al. A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles / *Human Gene Therapy*. 2002. Vol. 13. P.1767–1775.
66. Potten C., Booth D., Cragg N., Tudor G., O'Shea J.A., Booth C., Meineke F.A., Barthel D., Loeffler M. Cell kinetics studies in the murine ventral tongue epithelium: mucositis induced by radiation and its protection by pretreatment with keratinocyte growth factor (KGF) / *Cell Prolif*. 2002. Vol. 35. P. 32–47.
67. Przybyszewska M., Miloszevska J., Rzonca S., Trembacz H., Pyśniak K., Kotlarz A., Swoboda P., Zalewska M., Malecki M. Soluble TNF- α receptor I encoded on plasmid vector and its application in experimental gene therapy of radiation-induced lung fibrosis / *Immunol. Ther. Exp*. 2011. Vol. 59(4). P. 315–326.

68. Riera M., Chillon M., Aran J.M. et al. Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues / *J. Gene Med.* 2004. Vol. 6. P. 111–118.
69. Rocha E.M., Cotrim A.P., Zheng C., Riveros P., Baum B.J., Chiorini J.A. Recovery of radiation-induced dry eye and corneal damage by pretreatment with adenoviral vector-mediated transfer of erythropoietin to the salivary glands in mice / *Hum Gene Ther.* 2013. Vol. 24(4). P. 417–423.
70. Schiffer C.A., Miller K., Larson R.A., Amrein P.C., Antin J.H., Zani V.J., Stone R.M. A double-blind, placebo-controlled trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor as an adjunct to induction and consolidation therapy for patients with acute myeloid leukemia / *Blood.* 2000. Vol. 95(8). P. 2530–2535.
71. Bloquel C., Fabre E., Bureau M.F., Scherman D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications / *J. Gene Med.* 2004. Vol. 6. P. S11–S23.
72. Shirley S., Heller R., Heller L. Electroporation gene therapy / *Gene therapy of cancer*. 3rd ed. San diego: academic Press; 2013. P. 93-106. DOI:10.1016/B978-0-12-394295-1.00007-X.
73. Singh V.K., Yadav V.S. Role of cytokines and growth factors in radioprotection / *Exp Mol Pathol.* 2005. Vol. 78(2). P. 156–169.
74. Staley E., Yarbrough V., Schoeb T., Daft J., Tanner S.M., Steverson D. Jr., Lorenz R.G. Murine P-glycoprotein deficiency alters intestinal injury repair and blunt lipopolysaccharide-induced radioprotection / *Radiat Res.* 2012. Vol. 178(3). P. 207–216.
75. Stephen T. Sonis. *Genomics, Personalized Medicine and Oral Disease* / Springer. 2015. P. 408. DOI:10.1007/978-3-319-17942-1
76. Sum C.H., Shortall S.M., Wong S., Wettig S.D. Non-viral Gene Delivery / *Exp. Suppl.* 2018. Vol. 110. P. 3-68. DOI:10.1007/978-3-319-78259-1_2.
77. Tarhini A., Belani C., Luketich J. D., Argiris A., Ramalingam S.S., Gooding W., Pennathur A., Petro D., Kane K., Liggitt D., Championsmith T., Zhang X., Epperly M.W., Greenberger J.S. A phase I study of concurrent chemotherapy (paclitaxel and carboplatin) and thoracic radiotherapy with swallowed manganese superoxide dismutase plasmid liposome protection in patients with locally advanced stage III non-small-cell lung cancer / *Hum Gene Ther.* 2011. Vol. 22(3). P. 336–342.
78. Trollet C., Bloquel C., Scherman D., Bigey P. Electrotransfer into Skeletal Muscle for Protein Expression / *Current Gene Therapy.* 2006. Vol. 6. P. 561–578.

79. Zarnegar R., Michalopoulos G.K. The many faces of hepatocyte growth factor: From hepatopoiesis to hematopoiesis / *J Cell Biol.* 1995. Vol. 129. P. 1177–1180.
80. Zhang D., Das D.B., Rielly C.D. Potential of microneedle-assisted micro-particle delivery by gene guns: a review / *Drug Deliv.* 2014. Vol. 21. P. 571-587.
81. Zheng C., Cotrim A.P., Rowzee A., Swaim W., Sowers A., Mitchell J.B., Baum B.J. Prevention of radiation-induced salivary hypofunction following hKGF gene delivery to murine submandibular glands / *Clin Cancer Res.* 2011. Vol. 17(9), P. 2842–2851.
82. Zheng C., Cotrim A.P., Sunshine A.N., Sugito T., Liu L., Sowers A., Mitchell J.B., Baum B.J. Prevention of radiation-induced oral mucositis after adenoviral vector-mediated transfer of the keratinocyte growth factor cDNA to mouse submandibular glands / *Clin Cancer Res.* 2009. Vol. 15(14). P. 4641–4648.
83. Zhi D., Zhang S., Cui S. The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery / *Bioconjug. Chem.* 2013. Vol. 24. P. 487-519.