

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИСМЫСЛОВОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ

Резник О.Н., Скворцов А.Е., Кузьмин Д.О., Тутин А.П., Резник А.О.

ГБОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург

Главной проблемой трансплантологии остается дефицит донорских органов. Использование для трансплантации органов, полученных от доноров с расширенными критериями, позволяет расширить донорский пул, увеличивая доступность трансплантации нуждающимся в ней пациентам с терминальными стадиями болезней внутренних органов. Основным препятствием к широкому использованию доноров с расширенными критериями является ишемическое повреждение, следующая за ним ишемически-реперфузионная травма органов, активация сценариев программируемой клеточной гибели, приводящие к снижению функционального резерва трансплантатов, а зачастую к развитию тяжелых осложнений в послеоперационном периоде. Применение антисмысловой генной терапии при трансплантации может послужить терапевтическим инструментом, позволяющим влиять на трансплантат на всех этапах работы с ним, улучшая его качество, и следовательно, результат трансплантации.

Ключевые слова: антисмысловая генная терапия, трансплантация органов.

PERSPECTIVES OF ANTISENSE GENE THERAPY IN ORGAN TRANSPLANTATION

Reznik O.N., Skvortsov A.E., Kuzmin D.O., Tutin A.P., Reznik A.O.

St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov

Global organ shortage is the crucial point of transplantation nowadays. Usage of expanded criteria donors represents reliable source of donor organs, making transplantation more accessible for patients with end stage organs failure. Ischemia-reperfusion injury followed by the activation of programmed cell death scenarios remains the main obstacle in utilization of marginal grafts. Programmed cell death often leads to life threatening complications in posttransplant period. Antisense gene therapy could provide a therapeutic tool, capable to improve quality of grafts and, consequently, transplantation outcomes.

Key words: antisense gene therapy, organ transplantation.

ВВЕДЕНИЕ

Главной проблемой трансплантологии остается дефицит донорских органов, носящий транснациональный характер [24]. Так, например, по данным ежегодного отчета Eurotransplant за 2011 год в листе ожидания пересадки почки находились 10 622 человека, и только 4924 из них выполнена трансплантация донорского органа [www.eurotransplant.org accessed 10.08.12]. В Соединенных Штатах Америки в листе ожидания трансплантации находят-

ся 115 949 человек, но в период с января по июль 2012 года выполнено лишь 16 585 пересадок [www.unos.org accessed 09.10.12]. До настоящего времени основным источником трансплантатов были доноры со смертью мозга, считающиеся идеальными, однако растущий дефицит донорских органов послужил причиной использования для трансплантации органов, полученных от доноров с расширенными критериями, или маргинальных доноров. К ним относятся доноры со смертью мозга старшей возрастной группы, с сопутствующими заболева-

Статья поступила в редакцию 31.10.12 г.

Контакты: Резник Олег Николаевич, д. м. н., руководитель отдела трансплантологии и органного донорства.

Тел. 812 774 88 97, **e-mail:** onreznik@yahoo.com

ниями, в том числе артериальной гипертензией и сахарным диабетом, а также погибшие в результате внезапной необратимой остановки кровообращения [82, 104]. Данная категория доноров представляется перспективным ресурсом трансплантации, по сообщению Института Медицины (Institute of Medicine, IOM) за 2006 год, число погибших, относящихся к донорам с расширенными критериями, в среднем составляет 22 000 человек ежегодно [53]. Результаты трансплантаций от доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения (асистолических доноров) не уступают результатам пересадок органов от доноров со смертью мозга, однако отсроченная функция или первичное отсутствие функции у реципиентов маргинальных трансплантатов развиваются чаще [46, 93]. Основным фактором, определяющим жизнеспособность и качество органов, полученных от доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения, является продолжительность времени первичной тепловой ишемии и следующая за ней реперфузия в теле реципиента [46].

РОЛЬ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ В ПОВРЕЖДЕНИИ ДОНОРСКИХ ОРГАНОВ

Ишемически-реперфузионная травма представляет собой сложный процесс повреждения донорского органа в результате оксидативного стресса, нарушения целостности митохондрий [86], запуска каскадов тромбообразования [31] и адгезии [12, 22], активации врожденного иммунитета [43]. Ишемически-реперфузионное повреждение, развивающееся как на тканевом, так и молекулярном уровнях, с формированием патологических биохимических реакций, составляет патогенетическую основу развития отсроченной функции, кризов отторжения и первичного отсутствия функции трансплантатов [44].

Рассмотрим основные этапы ишемически-реперфузионного повреждения органов.

При снижении скорости кровотока в теле донора в агональном периоде, а затем и при его прекращении в результате необратимой остановки кровообращения, прекращается доставка кислорода в ткани, угнетается нормальный метаболизм в тканях, инициируется анаэробный гликолиз, сопровождающийся истощением запасов АТФ с образованием в качестве конечного продукта ксантин-оксидазы, фермента, обладающего провоспалительным эффектом [27]. Останавливается работа энергозависимых калий-натриевых насосов, рассеивается мембранный потенциал, по градиенту концентрации в клетку устремляются ионы натрия и кальция. Развиваются отек клеток, дезинтеграция мембран, цитоскелета и органелл, что особенно важно, митохондрий – главных источников энергии клетки,

содержащих ферменты и коферменты дыхательной цепи [1, 86, 92]. По мере прогрессирования ишемического повреждения цитоплазма клеток насыщается железосодержащими цитохромами, покидающими митохондрии через поры в поврежденных мембранах, это приводит к быстрому истощению пула гемоксигеназы-1, фермента, катаболизирующего данные соединения в условиях анаэробного метаболизма, в результате в клетке стремительно накапливаются свободные радикалы. При реперфузии содержание свободных радикалов лавинообразно увеличивается, происходит денатурация белков, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов, запускаются механизмы апоптоза, стимулируется иммунный ответ и фиброгенез [26, 52, 66, 69, 79, 99].

КАСКАД АДГЕЗИИ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Следует отметить, что в физиологических условиях явления адгезии не оказывают влияния на микроциркуляцию [2]. Феномен адгезии представляется сформировавшимся в ходе эволюции физиологическим приспособительным механизмом, направленным на ограничение кровообращения в «неперспективных», нежизнеспособных тканях, имеющих целью сохранение жизни организма в целом, однако при ишемии-реперфузии так называемый каскад адгезии приобретает патологический характер и ведет к развитию зачастую необратимого повреждения органов. При снижении скорости кровотока вследствие ослабления сердечной деятельности, по мере нарастания гипоксии и развития ишемии, происходит «активация» эндотелия, на поверхности клеток которого экспрессируются молекулы адгезии различных классов: ICAM-1, VCAM, PECAM-1, L-, E- и P-селектины, лиганды этих молекул, белки из семейства интегринов, находятся на поверхности форменных элементов крови, лейкоцитах (CD11/CD18) и тромбоцитах (CD62P). Взаимодействие молекул адгезии со своими лигандами ложится в основу каскада адгезии, развивающегося в несколько этапов. При участии селектинов (CD62L, CD62E) лейкоциты сначала прочно фиксируются к эндотелию (tethering), затем начинают катиться по нему, что получило название rolling, количество связей с селектинами увеличивается, скорость движения замедляется, после чего лейкоциты останавливаются, рецепторы на их поверхности LFA-1 (CD11), VLA-4 (CD29) связываются с молекулами адгезии ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), наступает прочная адгезия (firm adhesion), за которой следует миграция в ткани [65]. Отек тканей, каскад адгезии лейкоцитов и тромбообразования при ишемии развиваются параллельно, приводя к блокаде микроциркуляторного русла лейкоцитар-

но-тромбоцитарными конгломератами [12, 22, 44, 68]. Лейкоцитарно-тромбоцитарные конгломераты представляют собой не только механическое препятствие току крови, обтурируя просвет сосудов, оказываясь в тканях, они становятся источниками реактивных форм кислорода, перекиси водорода, супероксида, цитокинов (IL-1, 2, 6, 8, 12), фактора некроза опухолей альфа и других вазоактивных соединений [33, 96].

Другим механизмом лейкоцитарной агрессии, имеющим критическое значение, является презентация антигенной информации, а также выработка хемоаттрактантов, приводящие к активации систем адаптивного и врожденного иммунитета после реперфузии, о чем подробнее будет сказано ниже.

АКТИВАЦИЯ ПРОГРАММ АПОПТОЗА И НЕКРОПТОЗА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Выработка ишемизированными тканями и мигрировавшими в них лейкоцитами провоспалительных соединений (реактивные формы кислорода, перекись водорода, цито- и хемокины, интерлейкины 1, 2, 6, 8, фактор некроза опухолей альфа), наравне с нарушением структурно-функциональной целостности клеток вследствие рассеивания мембранного потенциала, дезинтеграции клеточных мембран, повреждения внутренней и наружной мембран митохондрий, являются пусковыми механизмами развития программируемой клеточной гибели: апоптоза и некроптоза, принимающих непосредственное участие в развитии ишемически-реперфузионной травмы [4, 29, 37, 42].

Впервые предположение о том, что для поддержания нормальной жизнедеятельности организма необходимым условием является регулируемая гибель клеток, выдвинул немецкий анатом Ludwig Grager в начале XX века [45]. Программируемая клеточная гибель впервые была описана в середине 60-х годов XX столетия, с тех пор ее несколько раз пытались классифицировать на основе морфологических проявлений, пока в 1973 году Schweichel и Merker в качестве результата своей экспериментальной работы не представили классификацию 3 типов клеточной гибели: 1) гетерофагия, 2) аутофагия, 3) не относящаяся к первым двум типам форма клеточной гибели. В настоящее время эти разновидности гибели клеток известны как апоптоз, аутофагия и некроптоз соответственно [38]. Позднее Kerr, Wyllie и Currie в серии экспериментов идентифицировали апоптоз как отдельную форму клеточной гибели [60]. В 2011 году группой ученых во главе с L. Galuzzi были опубликованы рекомендации Комиссии по номенклатуре клеточной гибели (Nomenclature Committee on Cell Death), в которых обобщается накопленный за последние годы опыт

изучения разновидностей программируемой клеточной гибели, определяется необходимость применения генетического и биохимического подхода к пониманию причин и механизмов ее развития, делается акцент на молекулярную составляющую, а изучение морфологических проявлений признается в некоторой степени устаревшим [39]. Взяв за основу современные представления о программируемой клеточной гибели, сформулируем понятие о ней, определим фундаментальные механизмы ее развития.

Апоптоз представляет собой энергозависимую, строго регулируемую и эффективную форму клеточной гибели, результатом которой является сморщивание клетки, конденсация хроматина, фрагментация ядра и образование в цитоплазме крупных вакуолей, явление, получившее название «blebbing» [19]. Данная разновидность программируемой клеточной гибели развивается по двум сценариям, вследствие активации внешнего или внутреннего сигнальных путей инициации апоптоза [19, 39, 47]. Для реализации внешнего сигнального пути необходимым условием является взаимодействие так называемых «лигандов смерти» со своими рецепторами на поверхности клеточных мембран. Одними из наиболее распространенных «лигандов смерти» являются белки суперсемейства Fas и TNF 10, хорошо известным представителем которого является фактор некроза опухолей альфа (TNF- α). Взаимодействие «лиганд-рецептор» приводит к активации в цитоплазме клетки аспартат-зависимых протеаз, больше известных как прокаспазы (прокаспазы-8, -10, -2), при их непосредственном участии происходит сборка «смерть-индуцирующего сигнального комплекса» (death inducing signaling complex, DISC), который является платформой активации эффекторных каспаз (каспазы-3, -8, -9) – главных белков, участвующих в развитии апоптоза, результатом их активности является крупномасштабная фрагментация молекул ДНК и нарушение целостности мембран митохондрий [19]. Начальным звеном внутреннего сигнального пути развития апоптоза выступают поврежденные митохондрии. Наружная и внутренняя мембраны этих органелл становятся проницаемыми вследствие перегрузки цитоплазмы ионами кальция, угнетения мембранного потенциала, нарастающего отека [39], активности каспазы-8 [7], в результате содержащийся в норме внутри митохондрий цитохром С «перетекает» в цитоплазму клетки и связывается с цитоплазматическим адаптерным белком Araf-1 (apoptotic protease activation factor-1, фактор активации протеаз апоптоза-1), повышая сродство последнего к dATP (дезоксиаденозинтрифосфат) [49]. Формирующийся супрамолекулярный комплекс – апотосома – активирует прокаспазу-9 и запускает тем

самым протеолитический каскад каспаза-9 – каспаза-3. Описанные реакции приводят к генерализованному рассеиванию мембранного потенциала, высвобождению токсичных молекул из внутренней мембраны митохондрий, необратимому угнетению дыхательной цепи, развиваются биоэнергетическая и метаболическая катастрофы, ускоряющие реализацию программ клеточной гибели [39, 19]. Схема развития сценариев апоптоза представлена на рис. 1. Необходимо отметить, что наравне с проапоптозными, в клетках запускаются и антиапоптозные механизмы, поддерживающие функциональную целостность клетки в период стрессового воздействия, однако они быстро истощаются, тогда как проапоптозный сигнал, как правило, носит избыточный характер [20]. Отсутствие кровотока в донорском органе и, как следствие, нарастающая ишемия, являются непосредственной причиной запуска сценариев программируемой клеточной гибели. Как было отмечено ранее, апоптоз – это энергозависимая форма программируемой клеточной гибели. В физиологических условиях при повреждении клетки в ядре немедленно активируются репаративные процессы АТФ-зависимым ферментом PARP (poly-ADP-ribose polymerase), восстанавливающим целостность ДНК. При апоптозе происходит быстрая инактивация данного соединения, так как весь имеющийся в клетке запас АТФ необходим для реализации клеточной гибели. Как только запасы АТФ истощаются, на смену апоптозу приходит некроз [50]. Патогномичным признаком апоптоза является набор стереотипных морфологических изменений (конденсация хроматина, фрагментация ядра, сморщивание клетки, формирование апоптоз-

ных телец и др.) Некроз, в свою очередь, лишен характерных проявлений, поэтому в течение долгого времени существовало исторически сложившееся мнение, что это нерегулируемая форма клеточной гибели, развивающаяся в результате неспецифического стрессорного воздействия. В работе Hitomi et al. освещаются сложные молекулярные механизмы, регулирующие некроз [47]. Он может развиваться в результате взаимодействия лигандов со специфическими рецепторами на поверхности мембран, выделяются также генетические, эпигенетические и фармакологические механизмы регуляции некроза [41]. В 2008 году G. Kroemer et al. впервые определили некроптоз как серин/треонин киназа RIP1-зависимую форму программируемой клеточной гибели [57], которая развивается при условиях, когда выполнение программ апоптоза невозможно по какой-либо причине.

АКТИВАЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ИШЕМИЧЕСКУЮ ФАЗУ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОЙ ТРАВМЫ

Повышение проницаемости мембран в конечной фазе каждого из описанных сценариев клеточной гибели приводит к высвобождению из клеток эндогенных молекул, известных под общим названием «особо опасные соединения» (danger-associated molecular patterns, DAMPs), способных через систему TLR-рецепторов стимулировать иммунный ответ, вызывая прямую активацию цитотоксических Т-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток (АПК). Данные соединения, например мочевая кислота или белок высокоподвижной группы-1 (high

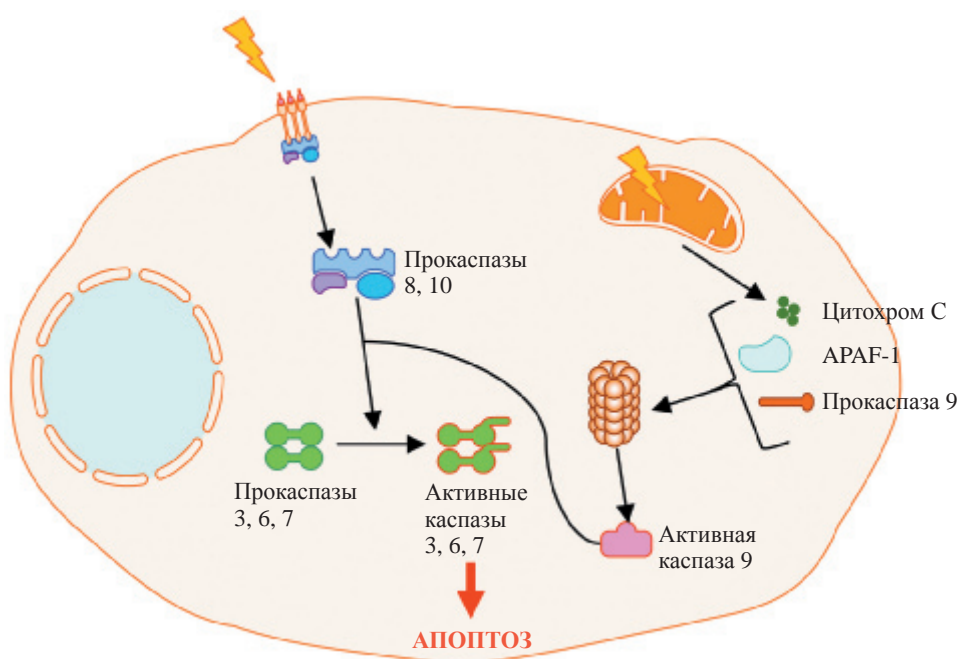


Рис. 1. Схема развития апоптоза по внешнему и внутреннему сигнальному пути

mobility group protein-1, HMGP-1), активируют АПК и макрофаги, стимулируя тем самым воспалительную реакцию [44, 48].

Обобщив изложенный выше материал, выделим следующие этапы ишемической фазы ишемически-реперфузионных повреждений: 1) угнетение нормального метаболизма и нарушение функционально-морфологической организации органа; 2) активация механизмов лейкоцитарной агрессии, с вовлечением форменных элементов крови (эритроциты, тромбоциты), каскад адгезии; 3) тотальный блок микроциркуляторного русла и сосудов более крупного диаметра лейкоцитарными конгломератами, а также вследствие нарастающего отека; 4) презентация антигенной информации; 5) активация системы комплемента; 6) гиперпродукция свободных радикалов и других провоспалительных соединений; 7) запуск и реализация программируемой клеточной гибели (апоптоза и некроптоза). На данном этапе закладываются основы иммунологического и свободнорадикального повреждения органов, предопределяющего исход последующей трансплантации еще до реперфузии.

АКТИВАЦИЯ СИСТЕМ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА В РЕПЕРФУЗИОННУЮ ФАЗУ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОЙ ТРАВМЫ

Возобновление кровотока в трансплантате после пересадки приводит к лавинообразному увеличению количества свободных радикалов, оказывающих повреждающее действие на все органические структуры, от биологических молекул до клеточных мембран [53], активированные клетки поврежденного эндотелия повторно начинают вырабатывать цито- и хемокины, экспрессировать молекулы адгезии, усиливая тем самым воспалительную реакцию [63]. В течение нескольких часов после реперфузии в трансплантат устремляются нейтрофилы и макрофаги реципиента, уже сами по себе они становятся источниками хемокинов, приводя к активации Т-лимфоцитов, миграции которых способствует выработка поврежденным эндотелием хемотаксических сигналов, таких, например, как macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) [51, 36]. Восстановление кровотока в пересаженном органе приводит к миграции лейкоцитов донора во вторичные лимфоидные органы (селезенка, лимфатические узлы), где они представляют антигенную информацию наивным Т-лимфоцитам реципиента, приводя к их трансформации в компетентные клетки иммунной системы [67]. Активированные Т-лимфоциты с током крови попадают в орган, накапливаются в просвете сосудов, приводя к их повторной обтурации, запуску системы комплемента и каскада тромбооб-

разования [108]. Происходит мобилизация как врожденной, так и адаптивной иммунной системы [63]. Основная роль в развитии ишемии-реперфузии и активации иммунитета многими авторами отводится активации TLR-рецепторов (TLR2, TLR4, TLR9), представленных на поверхности эндотелия, эпителия, лейкоцитов и дендритных клеток. Их основным свойством является способность распознавать «особо опасные» и «патологические» молекулярные «паттерны» (danger associated molecular pattern, DAMP и pathogen associated molecular pattern, PAMP) и немедленно стимулировать иммунный ответ [59, 61, 71, 80]. Восстановление после реперфузии доставки кислорода и глюкозы в ткани запускает как процессы репарации, так и приостановленный, вследствие энергетического дефицита апоптоз [26]. Апоптоз клеток эндотелия сам по себе является основным предрасполагающим фактором развития трансплантационной васкулопатии [15, 64]. Клетки эндотелия, подвергающиеся апоптозу, вырабатывают сигналы (фракталькин, лизофосфатидилхолин, фосфатидилсерин, эпидермальный ростовой фактор-8), стимулирующие миграцию макрофагов, моноцитов и Т-лимфоцитов в поврежденные участки органа. Происходит фагоцитоз нежизнеспособных апоптозных клеток, инициируются репаративные процессы, но зачастую они носят патологический характер, под воздействием ростовых факторов соединительной ткани (CTGF) в трансплантате развиваются фиброз и неадекватный ангиогенез [45].

Повреждение донорских органов, таким образом, имеет мультифакториальную природу, реципиенту выполняется трансплантация «неполноценного» органа, в котором продолжают процессы иммунной агрессии (хроническое отторжение), программируемой клеточной гибели, фиброгенеза, степень выраженности которых зависит от источника донорского материала, времени первичной тепловой ишемии, срока и вида консервации, продолжительности вторичной тепловой ишемии, длительности нахождения в отделении реанимации и др.

Существуют ли способы терапевтического воздействия на поврежденные донорские органы с целью восстановления их функционального состояния, продления срока эффективной работы, снижения частоты развития острых и хронических реакций отторжения, проявлений трансплантационной васкулопатии? Развитие генной терапии на современном этапе открывает многообещающие перспективы в поиске ответа на эти вопросы.

АНТИСМЫСЛОВАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Антисмысловая генная терапия является перспективным методом лечения, в основе которого

лежит направленное подавление экспрессии генетического материала. В настоящее время в мировой практике применяются три метода подавления экспрессии генов – это антисмысловые олигонуклеотиды (АСОН), рибозимы и малые интерферирующие РНК (миРНК) [88]. АСОН представляют собой короткие участки ДНК или РНК, комплементарные матричной РНК (мРНК), которые, попадая в клетку, образуют двухцепочечные последовательности с мРНК, последние распознаются ферментом РНКазой и уничтожаются. АСОН весьма успешно применяются в экспериментальных условиях, однако отсутствие надлежащих систем доставки ограничивает их широкое применение в клинической практике [81]. К рибозимам относятся каталитически активные РНК, состоящие из трех спиралей, механизм действия которых заключается в направленной деградации комплементарных одноцепочечных последовательностей РНК в результате реакций трансэтерификации или гидролиза. Вследствие крайней нестабильности этих соединений в сыворотке крови, от нескольких секунд до минут, возможность терапевтического применения данных соединений не исследовалась [104, 109]. Открытие в 1998 году РНК-интерференции произвело революцию в мире генной терапии (рис. 2). За описание этого феномена и перспектив его применения в клинической практике американские ученые Craig Mello и Andrew Fire в октябре 2006 были удостоены Нобелевской премии по медицине [89]. В естественных условиях РНК-интерференция представляет собой защитный механизм, оберегающий геном от инвазии чужеродного мобильного генетического материала вирусов или транспозонов, приводящий

к продукции абберантных РНК [29]. Оказавшись в клетке, двухцепочечные РНК «разрезаются» ферментом Dicer с формированием коротких, состоящих из 19–21 нуклеотидов участков – собственно миРНК. Далее в цитоплазме происходит сборка RISC-комплекса (RNA-induced silencing complex), в результате активности которого антисмысловая последовательность миРНК связывается с комплементарной мРНК, что приводит к деградации последней и, как следствие, блоку трансляции [98, 104]. Использование для подавления экспрессии генов миРНК и феномена РНК-интерференции оказалось, по сообщению ряда авторов, в 1000 раз эффективнее применения для тех же целей антисмысловых олигонуклеотидов, что позволяет считать данный метод «золотым стандартом» антисмысловой генной терапии [88]. Основными преимуществами применения миРНК перед другими методами генонаправленной терапии являются: 1) эффективность подавления экспрессии генов; 2) высокая специфичность действия [13]; 3) сохранение подавления экспрессии генов на протяжении нескольких клеточных циклов [68]; 5) возможность ингибировать экспрессию нескольких генов одновременно [17].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований в различных областях медицины, на данный момент существует только один официально разрешенный к применению медицинский препарат на основе миРНК – Витравен® (Фомивирсен), используемый для лечения цитомегаловирусного поражения сетчатки у больных СПИДом. В основе его действия лежит подавление экспрессии информации вирусной мРНК посредством РНК-интерференции [30]. Главными препят-

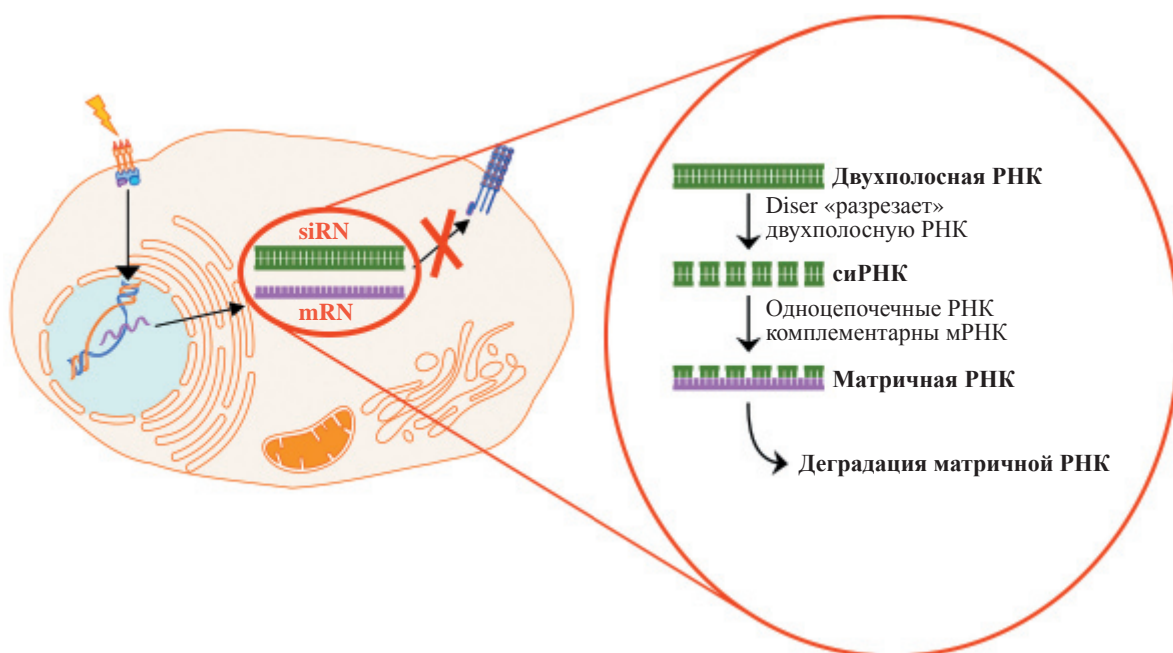


Рис. 2. Схема феномена РНК-интерференции

ствиями к широкому применению терапевтических миРНК в повседневной клинической практике стало отсутствие эффективных систем доставки [5] и, как следствие, развитие ряда нежелательных эффектов. К основным побочным эффектам относятся: 1) неспецифическая аккумуляция миРНК [9]; 2) быстрая деградация под воздействием нуклеаз; 3) токсичность; 4) потенциальная онкогенность; 5) способность активировать систему врожденного иммунитета, запуская интерфероновый ответ и активируя сигнальные пути TLR-рецепторов [25, 33]. Подробное описание разрабатываемых в настоящее время методов доставки миРНК, позволяющих минимизировать негативные эффекты их применения и добиться оптимального терапевтического действия, выходит за рамки данной статьи, этой проблеме посвящены исчерпывающие обзоры [6, 60, 71, 88, 99, 105].

Особенности получения донорских органов, связанные с их транспортировкой и хранением до пересадки, создают оптимальные условия для применения генной терапии трансплантатов *ex vivo*, сводя к минимуму риск эктопической экспрессии генов [92]. Прямое введение синтетических миРНК обеспечивает кратковременное подавление экспрессии целевых генов, тогда как использование векторных средств доставки позволяет добиться длительного эффекта. Существующие в настоящее время средства доставки миРНК в донорский орган делятся на невирусные и вирусные векторы. Наиболее распространенные невирусные векторы описаны в обзоре Van der Woude et al. [103], их достоинством является низкая иммуногенность, к недостаткам можно отнести очень низкую терапевтическую активность и нацеленность, в основном, на клетки почечных клубочков. Основные невирусные средства доставки миРНК и их свойства приведены в табл. 1. Вирусные векторы более эффективны, чем средства первой группы. Выделяют аденовирусные, адено-ассоциированные, ретровирусные и лентовирусные векторы, отличающиеся по степени выраженности терапевтического эффекта и иммуногенности [97]. Аденовирусные системы доставки активны при низких температурах, могут быть нацелены на различные клетки, однако обладают непродолжительным действием и крайней иммуногенностью. В двух исследованиях на грызунах описаны положительные эффекты применения аденовирусных векторов на этапе трансплантации [8] и холодного хранения [96, 102]. Основные разновидности систем доставки, их достоинства и недостатки указаны в табл. 1.

Достигнуты, пока в эксперименте, впечатляющие результаты использования миРНК в трансплантации. Так, например, группой Wu из Медицинского университета Чунцин (Китай) [106]

продемонстрированы положительные эффекты применения миРНК, подавляющей экспрессию ростового фактора соединительной ткани $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), для предупреждения развития фиброза почечных трансплантатов. Min et al. в своей работе описывают снижение выраженности повреждения почечных трансплантатов с 75% у экспериментальных животных контрольной группы, до 10% у мышей, получавших миРНК, направленные на подавление каспазы-3 и компонента комплемента C3 [72]. Той же группой ученых опубликованы обнадеживающие экспериментальные данные об использовании миРНК в консервирующем растворе для подавления экспрессии молекул Fas, TNF α и TLR4 с целью подавления апоптоза, воспалительной реакции и активации врожденного иммунитета при ишемии-реперфузии миокарда и печени [70, 71].

Очевидно, что антисмысловая генная терапия – одна из самых перспективных и бурно развивающихся областей медицины на сегодняшний день, а феномен РНК-интерференции наиболее мощный ее инструмент. Успешное применение миРНК в клинической практике, в том числе и в трансплантации, ограничивается отсутствием надежного средства целевой доставки препаратов в органы и ткани, позволяющего избежать или свести к минимуму проявление побочных явлений, сохраняя при этом стойкий терапевтический эффект.

НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ АППАРАТНАЯ ПЕРФУЗИЯ – ОПТИМАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ДОСТАВКИ

Преимущества нормотермической аппаратной перфузии перед другими методами консервации донорских органов (статическое холодное хранение и гипотермическая аппаратная перфузия) в настоящее время не вызывают сомнений [34, 35, 47].

Нормотермическая аппаратная перфузия является единственным способом восстановления и поддержания жизнеспособности ишемически поврежденных органов, получаемых от доноров с расширенными критериями [87]. Возобновление и поддержание постоянного кровообращения в трансплантате, обеспечение органа энергетически субстратами и кислородом создает условия для восстановления аэробного метаболизма, способствует редукции ишемически-реперфузионных повреждений [34, 47]. Аппаратная перфузия позволяет проводить непрерывный мониторинг состояния трансплантатов на основе лабораторных показателей, управлять параметрами перфузии и проводить терапевтическую коррекцию патологических сдвигов, что позволяет говорить не столько о перфузионной консервации, сколько о перфузионной реабилитации донорских органов, восстановлении

Таблица 1

Достоинства и недостатки известных органических оболочек невирусных систем доставки миРНК

Тип носителя	Достоинства	Недостатки
Катионные липосомы	<ul style="list-style-type: none"> – Биodeградируемость – Повышенная эффективность взаимодействия с отрицательно заряженными мембранами клеток <i>in vitro</i> – Возможность модификации поверхности липосом полимерами и нацеливающими агентами 	<ul style="list-style-type: none"> – Адсорбция на поверхности липосом отрицательно заряженных сывороточных белков – Способность к агрегации – Способность индуцировать иммунный ответ у хозяина – Цитотоксичность – Способность к индукции экспрессии случайных генов
Нейтральные липосомы	<ul style="list-style-type: none"> – Биodeградируемость – Сниженная сорбция сывороточных белков – Возможность модификации поверхности липосом полимерами и нацеливающими агентами 	<ul style="list-style-type: none"> – Способность к агрегации – Способность индуцировать иммунный ответ у хозяина
Экзосомы	<ul style="list-style-type: none"> – Биосовместимость и биodeградируемость – Возможность нацеливания 	<ul style="list-style-type: none"> – Вряд затратный способ получения носителей – Высокая стоимость получения носителей – Невозможность автоматизации процесса производства
Полиплексы из ателоколлагена	<ul style="list-style-type: none"> – Биосовместимость и биodeградируемость – Низкая иммуногенность – Низкая токсичность – Способность к биodeградации 	Нет данных
Полиплексы из циклодекстринов	<ul style="list-style-type: none"> – Низкая иммуногенность – Возможность модификации полимерами и нацеливающими агентами 	Нет данных
Хитозан	<ul style="list-style-type: none"> – Биodeградируемость – Мукоадгезивные свойства и способность проникать через слизистые оболочки – Повышенная эффективность взаимодействия с отрицательно заряженными мембранами клеток <i>in vitro</i> 	Нет данных
Пептиды и белки	<ul style="list-style-type: none"> – Возможность модификации нацеливающими агентами 	Нет данных
Полиэтиленимин	<ul style="list-style-type: none"> – Возможность модификации поверхности полимерами и нацеливающими агентами 	<ul style="list-style-type: none"> – Цитотоксичность – Способность индуцировать иммунный ответ у хозяина
Полилизин	<ul style="list-style-type: none"> – Возможность модификации поверхности полимерами 	<ul style="list-style-type: none"> – Цитотоксичность

и поддержания в них, если так можно выразиться, искусственной жизни как в теле донора, так и *ex vivo*. Повреждающая роль лейкоцитарной агрессии хорошо изучена, реализация ее основных этапов описана в данной статье. Постоянное удаление лейкоцитов из перфузионного контура как на этапе перфузии в теле донора *in situ*, так и изолированных органов *ex vivo* позволяет существенно снизить степень выраженности ишемически-реперфузионного повреждения на всех этапах – от эксплантации до реперфузии в теле реципиента. В этом смысле единственной проблемой, требующей решения, остается реализация программируемой клеточной гибели после пересадки, развитие которой влечет за собой активацию систем врожденного и адаптивного иммунитета, патологических компен-

саторных механизмов, исходом которых является хроническая трансплантационная нефропатия, приводящая в конечном счете к утрате трансплантатов. Перспективным ключом к решению данной проблемы представляется генонаправленная антисмысловая терапия донорских органов на этапе изолированной нормотермической гемоперфузии [75, 76]. Особенности данной методики состоят в возможности использовать для терапевтических целей безоболочечные миРНК, «мишени» которых определены, доставляя их непосредственно в донорский орган, что позволит избежать развития побочных эффектов, сопутствующих системному назначению, а также поддерживать необходимые терапевтические концентрации, восполняя уровень миРНК в перфузионном контуре, добываясь стой-

кого подавления экспрессии нежелательных генов. Таким образом, изолированная нормотермическая гемоперфузия органов может рассматриваться как оптимальное средство таргетной доставки миРНК. Использование в качестве средств доставки целевых миРНК перфузионных систем создает терапевтический инструмент, позволяющий непрерывно воздействовать на донорские органы на всех этапах трансплантации, изменяя их свойства, регулируя внутриклеточные механизмы поддержания гомеостаза, процессы физиологической репарации, определяя положительные исходы пересадок органов от любых категорий доноров, в том числе и в долгосрочной перспективе, что способно привести к радикальному расширению пула донорских органов, повышая тем самым доступность трансплантации нуждающимся в ней категориям пациентов, позволяя преодолеть главную проблему трансплантации – дефицит донорских органов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачев В.П. Явление запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. № 6. С. 1–10.
2. Иванов К.П. Роль лейкоцитов в динамике микроциркуляции в норме и при патологии // Вестник Российской Академии медицинских наук. 2004. № 4. С. 3–13.
3. Allen B., Ilbawi M. Hypoxia, reoxygenation and the role of systemic leukodepletion in pediatric heart surgery // *Perfusion*. 2001. Vol. 16. P. 19–29.
4. Anversa P., Cheng W., Liu Y., Leri A. et al. Apoptosis and myocardial infarction // *Basic. Res. Cardiol.* 1998. Vol. 93 (3). P. 8–12.
5. Baranova A.V., Marakhonov A.V., Skoblov M.Yu. siRNA characteristics and properties of its nonviral delivery systems // *Molecular Biology*. 2012. Vol. 46 (3). P. 371–386.
6. Baranova A.V., Marakhonov A.V., Skoblov M.Yu. Types of non-viral delivery systems of small interfering RNA // *Molecular Biology*. 2012. Vol. 46 (3). P. 387–401.
7. Barnhart B.C., Lee J.C., Alappat E.C. et al. The death effector domain protein family // *Oncogene*. 2003. Vol. 22 (53). P. 8634–8644.
8. Blydt-Hansen T.D. et al. Gene transfer-induced local HO-1 overexpression protects rat kidney transplants from IRI // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003. Vol. 14. P. 745–754.
9. Braasch D.A., Paroo Z., Constantinescu A. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004. Vol. 14 (5). P. 1139–1143.
10. Cantarovich F., Heguilén R., Filho M.A. et al. An international opinion poll of well-educated people regarding awareness and feelings about organ donation for transplantation // *Transpl. Int.* 2007. Vol. 20 (6). P. 512–518.
11. Cecka J.M. Donors without a heartbeat // *N. Engl. J. Med.* 2002. Vol. 347 (4). P. 281–283.
12. Celi A., Pellegrini G., Lorenzet R., De Blasi A., et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1994. Vol. 91 (19). P. 8767–8771.
13. Celotto A.M., Graveley B.R. Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing // *RNA*. 2002. Vol. 8 (6). P. 718–724.
14. Cho W.Y., Terasaki P.I., Cecka J.I. Transplantation of kidneys from donors whose hearts stopped beating // *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol. 338. P. 221–225.
15. Choy J.C., Cruz R.P., Kerjner A. et al. Granzyme B induces endothelial cell apoptosis and contributes to the development of transplant vascular disease // *Am. J. Transplant.* 2005. Vol. 5 (3). P. 494–499.
16. Clark P.A., Drain M., Malone M.P. Addressing patients' emotional and spiritual needs // *Jt Comm. J. Qual. Saf.* 2003. Vol. 29 (12). P. 659–670.
17. Contreras J.L., Vilatoba M., Eckstein C. et al. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice // *Surgery*. 2004. Vol. 136 (2). P. 390–400.
18. Cypel M., de Perrot M., Keshavjee S. et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9 (10). P. 2262–2269.
19. Darwish R.S. Regulatory mechanisms of apoptosis in regularly dividing cells // *Cell Health and Cytoskeleton*. 2010. Vol. 2. P. 59–68.
20. David K.K., Sasaki M., Yu S.W. et al. EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis // *Cell. Death. Differ.* 2006. Vol. 13 (7). P. 1147–1155.
21. De Vries A.J., Gu Y.J., Post W.J. et al. Leucocyte depletion during cardiac surgery: a comparison of different filtration strategies // *Perfusion*. 2003. Vol. 18. P. 31–38.
22. de Vries D.K., Lindeman J.H., Tsikas D. et al. Early renal ischemia-reperfusion injury in humans is dominated by IL-6 release from the allograft // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9 (7). P. 1574–1584.
23. Delmonico F.L., Harmon W.E. Use of expanded criteria donors in solid organ transplantation // *Curr. Opin. Organ Transpl.* 2000. Vol. 5 (3). P. 227–231.
24. Delmonico F.L., Dominguez-Gil B., Matesanz R., Noel L. A call for government accountability to achieve national self-sufficiency in organ donation and transplantation // *Lancet*. 2011. Vol. 378. P. 1414–1418.
25. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA // *Science*. 2004. Vol. 303 (5663). P. 1529–1531.
26. Djamali A., Vidyasagar A., Adulla M. et al. Nox-2 is a modulator of fibrogenesis in kidney allografts // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9. P. 74–82.
27. Doevendans P.A., Cramer M.J., Lips D.J. et al. Role of apoptosis in reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* 2004. Vol. 61 (3). P. 414–426.
28. Dolegowska B., Blogowski W., Domanski L. Clinical evidence of the association between serum perioperative

- changes in xanthine metabolizing enzymes activity and early post-transplant kidney allograft function // *J. Am. Coll Surg.* 2010. Vol. № 211 (5). P. 587–595.
29. *Dumont E.A., Hofstra L., Liem I.H., Boersma H.H.* Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction // *Lancet.* 2000. Vol. 356 (9225). P. 209–212.
 30. *Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T. et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs // *J. Cell Sci.* 2001. Vol. 114 (24). P. 4557–4565.
 31. *Favreau F., Thuillier R., Cau J. et al.* Antithrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model // *Am. J. Transplant.* 2010. Vol. 10. P. 30–39.
 32. *Fattal E., Bochot A.* Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58 (11). P. 1203–1223.
 33. *Fernandes E.S., Courade J.P., Keeble J.E. et al.* Tumour necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling // *Pain.* 2009. Vol. 142 (3). P. 264–274.
 34. *Flavell R.A., Alexopoulou L., Holt A.C. et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 // *Nature.* 2001. Vol. 413 (6857). P. 732–738.
 35. *Fondevila C. et al.* In vivo normothermic recirculation: an update // *Curr. Op. Organ Transplant.* 2010. Vol. 15. P. 173–176.
 36. *Friend P.J. et al.* Ex vivo normothermic liver perfusion: an update // *Curr. Op. Organ. Transplant.* 2010. Vol. 15. P. 167–172.
 37. *Furuichi K., Yokoyama H., Wada T.* Chemokines in renal fibrosis // *Contrib. Nephrol.* 2003. Vol. 139. P. 66–89.
 38. *Galluzzi L., Kroemer G., Vandenabeele P. et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell. Death. Differ.* 2009. Vol. 16 (1). P. 3–11.
 39. *Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I. et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications // *Cell. Death. Differ.* 2007. Vol. 14 (7). P. 1237–1243.
 40. *Galluzzi L., Vitale L., Abrams J.M. et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012 // *Cell. Death. and Differentiation.* 2011. Vol. 19. P. 107–120.
 41. *Garcia C.E., Bramhall S., Mirza D.F.* Use of marginal donors // *Curr. Opinion in Organ Transpl.* 2000. Vol. 5. P. 50–56.
 42. *Goldstein P., Kroemer G.* Cell death by necrosis: towards a molecular definition // *Trends. Biochem. Sci.* 2007. Vol. 32 (1). P. 37–43.
 43. *Gottlieb R.A., Burlison K.O., Kloner R.A. et al.* Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 94 (4). P. 1621–1628.
 44. *Granger D.N., Senchenkova E.* Leukocyte-Endothelial cell adhesion // *Inflammation and the Microcirculation / San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.* 2010. P. 29–38.
 45. *Graper L.* Eine neue Anschauung uber physiologische-Zellausschaltung // *Arch. Zelforsch.* 1914. № 12. P. 373–394.
 46. *Hebert M., Pallet N., Dieude M. et al.* The Molecular Legacy of Apoptosis in Transplantation // *Am. J. Transplant.* 2012. Vol. 12. P. 1378–1384.
 47. *Hitomi J., Christofferson D.E. et al.* Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway // *Cell.* 2008. Vol. 135 (7). P. 1311–1323.
 48. *Hoogland E.R., van Heurn L.W., Snoeijns M.G.* DCD kidney transplantation results and measures to improve outcome // *Curr. Op. Organ Transplant.* 2010. Vol. 15. P. 177–182.
 49. *Hosgood S.A. et al.* Normothermic kidney preservation // *Curr. Op. Organ Transplant.* 2011. Vol. 16. P. 169–173.
 50. *Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E.* Cell Death // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 361 (16). P. 1570–1583.
 51. *Huang D.C., Adams J.M., Cory S.* The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4 // *EMBO J.* 1998. Vol. 17 (4). P. 1029–1039.
 52. *Jagtap P., Degterev A., Huang Z. et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury // *Nat. Chem. Biol.* 2005. Vol. 1 (2). P. 112–119.
 53. *Childress J.F., Liverman C.T.* Organ Donation: Opportunities for Action // *Institute of Medicine (U.S.). Committee on Increasing Rates of Organ Donation.* 2006. P. 6–7.
 54. *Jang H.R., Ko G.J., Wasowska B.A. et al.* The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney // *J. Mol. Med.* 2009. Vol. 87 (9). P. 859–864.
 55. *Kauffman M.H., Bennett L.E., McBride M.A. et al.* The expanded donor // *Transplant. Rev.* 1997. Vol. 11. P. 165–190.
 56. *Kim J., Seok Y.M., Jung K.J., Park K.M.* Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice // *Am. J. Physiol.* 2009. Vol. 297. P. F461–F470.
 57. *Koo D.H., Fuggle S.V.* Impact of ischemia/reperfusion injury and early inflammatory responses in kidney transplantation // *Transplantation Reviews.* 2000. Vol. 14 (2). P. 210–224.
 58. *Koo D.H., Fuggle S.V.* The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury // *Transplantation.* 2002. Vol. 27. Vol. 73 (4). P. 493–499.
 59. *Kootstra G.* Asystolic or non-heartbeating donor // *Transplantation.* 1997. Vol. 63 (7). P. 917–921.
 60. *Kroemer G., Galluzzi L.* Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis // *Cell.* 2008. Vol. 135 (7). P. 1161–1163.
 61. *Kroemer G., Green D.R., Ferguson T. et al.* Immunogenic and tolerogenic cell death // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 9 (5). P. 353–363.
 62. *Kupiec-Weglinski J.W., Zhai Y., Busuttill R.W.* Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11 (8). P. 11563–11569.

63. Kwon Y.J. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo // *FEBS J.* 2010. Vol. 277. P. 4814–4827.
64. Land W.G. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation // *Transplantation.* 2005. Vol. 79. P. 505–514.
65. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated // *Nature.* 2007. Vol. 7. P. 678–689.
66. Linfert D., Chowdhry T., Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury // *Transplant Rev.* 2009. Vol. 23 (1). P. 1–10.
67. Lipták P., Kemény E., Morvay Z. et al. Peritubular capillary damage in acute humoral rejection: an ultrastructural study on human renal allografts // *Am. J. Transplant.* 2005. Vol. 5 (12). P. 2870–2876.
68. Lisman T. Activation of coagulation by living donor kidney transplant early after reperfusion // *Am. J. Transplant.* 2010. Vol. 10. P. 434.
69. Luque Gálvez P., Álvarez-Vijande R. Study of cell energy charge in experimental kidney transplant with different warm ischemia periods // *Actas. Urol. Esp.* 2008. Vol. 32 (1). P. 41–58.
70. Maltzman J.S., Haase V.H. Low oxygen stimulates the immune system // *Kidney Int.* 2008. Vol. 73 (7). P. 797–799.
71. Mello C.C., Grishok A., Tabara H. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans* // *Science.* 2000. Vol. 287 (5462). P. 2494–2497.
72. Metzger R.A., Delmonico F.L., Feng S. et al. Expanded criteria donors for kidney transplantation // *Am. J. Transplant.* 2003. Vol. 3 (4). P. 114–125.
73. Min W., Jevnikar A.M., Chen G. et al. Targeted Gene Silencing of TLR4 Using Liposomal Nanoparticles for Preventing Liver Ischemia Reperfusion Injury // *Am. J. of Transplant.* 2011. Vol. 11. P. 1835–1844.
74. Min W.P. et al. Novel Small Interfering RNA-Containing Solution Protecting Donor Organs in Heart Transplantation // *Circulation.* 2009. Vol. 120. P. 1099–1107.
75. Min W.P. et al. Protection of Renal Ischemia Injury using Combination Gene Silencing of Complement 3 and Caspase 3 Genes // *Transplantation.* 2006. Vol. 82. P. 1781–1786.
76. Moers C., Leuvenink H.G.D., Ploeg R.J. Non-heart beating organ donation: overview and future perspectives // *Transplant. International.* 2007. Vol. 20 (7). P. 567–575.
77. Mone T.D. The business of organ procurement // *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2002. Vol. 7. P. 60–64.
78. Nicholson M.L. et al. Naked small interfering RNA of caspase-3 in preservation solution and autologous blood perfusate protects isolated ischemic porcine kidneys // *Transplantation.* 2011. Vol. 91 (5). P. 501–507.
79. Nicholson M.L., Yates P.J., Hosgood S.A. Leukocyte and platelet depletion improves blood flow and function in a renal transplant model // *J. Surg. Res.* 2012. Vol. № 172 (1). P. 159–164.
80. Novitzky D. Donor management: state of the art // *Transplant Proc.* 1997. Vol. 29 (8). P. 3773–3775.
81. Ollinger R., Pratschke J. Role of heme oxygenase-1 in transplantation // *Transpl. Int.* 2010. Vol. 23 (11). P. 1071–1081.
82. Ploeg R.J., Bouma H.R., Schuurts T.A. Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9 (5). P. 989–997.
83. Leuvenink H.G., Ploeg R.J., Damman J. et al. Crosstalk between complement and Toll-like receptor activation in relation to donor brain death and renal ischemia-reperfusion injury // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11 (4). P. 660–669.
84. Leuvenink H.G., Ploeg R.J., Welmoet H. et al. Brain death induced injury // *Curr. Op.* 2011. Vol. 16 (2).
85. Reischl D., Zimmer A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2009. Vol. 5 (1). P. 8–20.
86. Rosengard B.R., Delmonico F.L., Kauffman H.M. et al. Increased transplanted organs from the use of a standardized donor management protocol // *Am. J. Transplant.* 2002. Vol. 2 (8). P. 761–768.
87. Reznik O., Skvortsov A., Moysyuk Y. et al. Kidney from uncontrolled donors after cardiac death with one H warm ischemic time: resuscitation by extracorporeal normothermic abdominal perfusion «in situ» by leukocytes-free oxygenated blood // *Clin. Transplant.* 2010. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2010.01333.x
88. Rosental R. Organ Donors: Deceased or alive? Quo Vadis? // *Annals of Transplantation.* 2006. Vol. 11 (3). P. 49–51.
89. Rowinski W., Kosieradzki M. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention // *Transplant. Proc.* 2008. Vol. 40 (10). P. 3279–3288.
90. Samankatiwat P., Samartzis I., Lertsithichai P. et al. Leucocyte depletion in cardiopulmonary bypass: a comparison of four strategies // *Perfusion.* 2003. Vol. 18. P. 95–105.
91. Sanchez-Fructuoso A.I., Prats D. et al. Non-heart beating donors: experience from the Hospital Clinico of Madrid // *J. Nephrol.* 2003. Vol. 16 (3). P. 387–392.
92. Segura T., Tokatlian T. siRNA applications in nanomedicine // *Nanomed. Nanobiotechnol.* 2010. Vol. 2. P. 305–315.
93. Sharpe C.C., Wang J.H., Hendry B.M. Silencing genes in the kidney: antisense or RNA interference? // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008. Vol. 23 (7). P. 2115–2118.
94. Simmons M.N., Schreiber M.J., Gill I.S. Surgical renal ischemia: a contemporary overview // *J. Urol.* 2008. Vol. 180 (1). P. 19–30.
95. Snoeijs M.G., Winkens B., Heemskerk M.B. et al. Kidney transplantation from donors after cardiac death: a 25-year experience // *Transplantation.* 2010. Vol. 90. P. 1106–1112
96. Sprague A.H., Khalil R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease // *Biochem Pharmacol.* 2009. Vol. 78 (6). P. 539–552.
97. Steen S., Ingemansson R., Lindstedt S. et al. Comparative outcome of double lung transplantation using conventional donor lungs and non-acceptable donor lungs reconditioned ex vivo // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2011. Vol. 12 (2). P. 162–165.
98. Stokman G., Qin Y., Racz Z. et al. Application of siRNA in targeting protein expression in kidney disease // *Adv. Drug Deliv Rev.* 2010. Vol. 62. P. 1378–1389.

99. *Stubenitsky B.M., Booster M.H., Nidersting A.P.* Kidney preservation in the next millennium // *Transpl. Int.* 1999. Vol. 12. P. 83–91.
100. *Tessmer C.S., da Silva A.R., Barcellos F.C. et al.* Do people accept brain death as death? A study in Brazil // *Prog Transplant.* 2007. Vol. 17 (1). P. 63–67.
101. *Thuillier R., Tillement J.P., Hauet T.* Renal protective effect of metabolic therapy in patients with coronary artery disease and diabetes: from bench to bed side // *Curr. Pharm. Des.* 2009. Vol. 15. P. 863–882.
102. *Tomasoni S. et al.* CTLA4Ig gene transfer prolongs survival and induces donor-specific tolerance in rat renal allograft // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000. Vol. 11. P. 747–752.
103. *Van der Wouden E.A., Sandovici M., Henning R.H. et al.* Approaches and methods in gene therapy for kidney disease // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2004. Vol. 50. P. 13–24.
104. *Wacheck V., Cejka D., Losert D.* Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? // *Clinical Science.* 2006. Vol. 110. P. 47–58.
105. *Walton S.P. et al.* Designing Highly Active siRNAs for Therapeutic Applications // *FEBS J.* 2010. Vol. 277 (23). P. 4806–4813.
106. *Wu Xiao-hou et al.* Transforming growth factor- β 1 short hairpin RNA inhibits renal allograft fibrosis // *Chinese Medical Journal.* 2011. Vol. 124 (5). P. 655–663.
107. *Yan S.F., Lawson C.A., Stern D.M., Pinsky D.J.* Hypoxia-mediated modulation of vascular function – implications for organ preservation and thrombogenesis: Roger S. Mitchell lecture. *Chest.* 1998. Vol. 114 (1). P. 46S–50S.
108. *Yao Y., Wang C., Varshney R.R., Wang D.A.* Antisense makes sense in engineered regenerative medicine // *Pharm. Res.* 2009. Vol. 26. P. 263–275.