

уровень в слюне, тем более кислотное повреждение твёрдых тканей зубов, воспаление периодонтального комплекса, вследствие этого разрушается связочный аппарат зуба и костные структуры [4,5].

Выводы

Результаты исследования, полученные путём анализа медицинских карт, выявляют отличия в структуре КПУ в зависимости от величины этого показателя. Персональный подход указывает на особенности развития патологии твёрдых тканей зубов и соматическими заболеваниями, наличием вредных привычек и неудовлетворительной гигиеной полости рта.

Список литературы:

1. Горбачёва И.А., Сычёва Ю.А., Орехова Л.Ю. Использование метаболической терапии в лечении больных с сочетанной патологией внутренних органов и пародонта // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. - 2017. - С. 55 – 63

2. Еремин О.В., Лепилин А.В., Козлова И.В. Коморбидность болезней пародонта и желудочно-кишечного тракта. // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2009. - том 5. - № 3. - С. 393–398

3. Каминская Л.А., Иноземцева И.А., Стрижакова М.В. Стоматологический анамнез и соматические заболевания // Теоретические и прикладные вопросы образования и науки Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции в 13 частях. ч 2. Тамбов. - 2014. - С. 74 -76

4. Мандра Ю. В. Динамика изменения биохимического состава слюны под влиянием углеводов содержащих продуктов «легкого питания» / Ю. В. Мандра, Л. А. Каминская, Е. Н. Светлакова, И. В. Гаврилов и др. // Проблемы стоматологии. – 2016. - том 12. - № 4. – С. 10-15

5. Михальченко Д.В. Взаимосвязь сахарного диабета с заболеваниями полости рта: что знают об этом врачи –стоматологи и их пациенты/ Д.В. Михальченко Е.Е. Маслак, В.Н. Наумова, Т.Ф. Данилина и др. // Волгоградский научно медицинский журнал. 2013- № 2 URL: <https://www.volgmed.ru/uploads/journals/articles/1418904663-bulletin-2013-22173.pdf> (дата обращения 03.03.2020)

6. Сычева Ю.А. Метаболическая терапия полиморбидных больных с гипертонической болезнью и воспалительными заболеваниями пародонта/ Ю.А. Сычева, И.А. Горбачева, Л.Ю., Орехова, П.С. Шабак-Спасский и др. // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. - 2015. - №22(4). – С. 55-58.

УДК 577.21

Намиот Е.Д., Кузнецова В.С.

CRISPR/CAS9 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.
Сеченова
Москва, Российская Федерация

Namiot E.D., Kuznetsova V.S.
**CRISPR / CAS9 AND ITS APPLICATION IN TREATMENT AND
PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASES**

Department of histology, cytology and embryology
First Moscow I.M. Sechenov State Medical University
Moscow, Russian Federation

Email:enamiot@gmail.com

Аннотация. В статье рассмотрены существующие способы лечения и моделирования сердечно-сосудистых заболеваний с помощью технологий редактирования генома CRISPR/Cas9. В ходе работы выделены наиболее перспективные направления применения редактирования генома в ССЗ, а также приведены все достоинства и недостатки возможного применения CRISPR/Cas9 в клинической практике.

Annotation. This article deals with the existing methods of treatment and modeling of cardiovascular diseases using CRISPR/Cas9 genome editing technologies. The most promising areas of application of genome editing in CVD were identified, as well as all the advantages and disadvantages of the possible use of CRISPR / Cas9 in clinical practice.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, сердечно-сосудистые заболевания

Key words: genome editing, CRISPR/Cas9, cardiovascular diseases.

Введение

Способность реконструировать генетическую информацию и управлять ей позволила добиться прогресса в медицине, в частности, в процессе лечения и профилактики заболеваний, которые ранее не могли быть изучены до конца. CRISPR/CAS9 - это технология, которая позволяет медицинским исследователям и биоинженерам редактировать части генома путем отделения, изменения или добавления фрагментов последовательности ДНК. CRISPR - это аббревиатура, обозначающая ряд последовательностей ДНК бактерий и других прокариотических организмов, тогда как Cas9 является ферментом, который с помощью последовательностей CRISPR может распознавать определенные части молекул ДНК. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из ведущих причин смерти во всем мире. Известно, что многие сердечно-сосудистые заболевания, например, синдром Бругада или дилатационная кардиомиопатия, являются наследственными. Этот фактор позволяет технологиям CRISPR/Cas9 находить и реконструировать гены таким образом, чтобы облегчать клиническую картину заболеваний. В данной статье

рассмотрены различные варианты проведения профилактических процедур, а также моделирования сердечно-сосудистых заболеваний, с использованием CRISPR/Cas9 технологий. На основе полученной информации был сделан вывод о том, какой из методов является наиболее оптимальным и выгодным для дальнейшего использования.

Цель исследования - на основании обзора литературных данных оценить применимость технологий CRISPR/Cas9 в лечении и моделировании ССЗ.

Материалы и методы исследования

Были проанализированы статьи баз данных Medline (Pubmed) и Embase. Поиск проводился по словам “CRISPR/Cas9 and CVD”, “CVD models”.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы, мы выделили наиболее распространенные моногенные ССЗ, а также гены, ответственные за их развитие. В таблице 1 приведены моногенные сердечно-сосудистые заболевания с указанием генов и локусов, ответственных за развитие патологий.

Таблица 1

Наследственные моногенные ССЗ

Сердечно-сосудистые заболевания	Ген/локус
Гемофилия А	F8/Xq28
Синдром Бругада	SCN5A/3p21-24, 3p22-25
Синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта	PRAKG2/7q3
Синдром слабости синусового узла	SCN5A/3p21-24
Дилатационная кардиомиопатия	>20 генов
Гипертрофическая кардиомиопатия	MYHCB/14q12 TNNT2/1q32 TPM1/15q22.1 MYBPC3/11p11.2 PRKAG2/7q36 TNNI3/19q13.4 MYL3/3p
Синдром удлиненного интервала QT	KCNQ1/11p15.5 KCNH2/7q3 SCN5A/3p21-24 CALM1/14q32.11 KCNE1/21q22 KCNE2/21q22 KCNJ2/17q23
Синдром укороченного интервала QT	KCNQ1/11p15.5 KCNH2/7q3

При анализе статей было найдено достаточно большое количество лабораторных исследований, в которых проводилась терапия различных ССЗ. Однако наиболее целесообразным представляется анализ не отдельных заболеваний, а тех генов, мутации в которых были успешно исправлены. Таким образом, составив общий список генов, мы определили наиболее перспективные направления в терапии ССЗ, а также те заболевания, в которых

редактирование приведенных генов способно значительно облегчить клиническую картину.

За счёт того, что в патогенезе многих наследственных ССЗ зачастую участвуют одни и те же гены (табл.1), использование редактирования генома может иметь больший масштаб применения, чем ожидалось ранее. На сегодняшний момент уже описаны несколько удачных случаев применения редактирования генома с помощью эндонуклеаз в кардиологии, например, в лечении различных кардиомиопатий, в том числе гипертрофической.

В одной из статей была продемонстрирована успешная коррекция мутации MYBPC3 в клетках человека с использованием CRISPR/Cas9. В результате было получено 66,7% гомозиготных форм, то есть не имевших мутации в гене MYBPC3, отвечающей за развитие гипертрофической кардиомиопатии. Тем не менее, в 24% случаев проявлялся мозаицизм, а 9,3% полученных форм имели гетерозиготный мутантный генотип [1]. Мозаицизм может быть объяснен неспособностью CRISPR корректировать все мутантные гены после деления клеток. Несмотря на некоторые затруднения, метод, описанный выше, является одним из самых перспективных для профилактики гипертрофической кардиомиопатии и других моногенных нарушений, за развитие которых отвечают мутации в гене MYBPC3 [2, 3].

Также при анализе литературы были найдены сообщения об успешной коррекции мутации в гене кальмодулина 2 (CALM2) в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, дифференцированных в кардиомиоциты. Кальмодулинопатии обусловлены мутацией, происходящей в одном из 3 генов кальмодулина, CALM1, CALM2 и CALM3. Таким образом, успешно разработав технику коррекции мутации в генах CALM возможно, как и в случае кардиомиопатий, провести лечение сразу же целого спектра ССЗ. В исследовании была использована стратегия CRISPR-интерференции для выборочной коррекции только мутированного аллеля [4].

Переходя к моделированию, стоит упомянуть, что для создания моделей ССЗ используют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. ИПСК являются уникальными в использовании при моделировании заболеваний, благодаря их способности дифференцироваться в любые интересующие нас клетки, в том числе и в кардиомиоциты. Прогресс в редактировании генома и технологии ИПСК в настоящее время дает возможность исследовать патофизиологические механизмы наследственных заболеваний сердца и сосудов непосредственно на клеточных моделях [5-7].

Например, моделирование синдрома удлиненного QT интервала включает в себя забор клеток при помощи биопсии (моноклеарных клеток крови или фибробластов), репрограммирование этих клеток и получение пациент-специфичных ИПСК, их направленную дифференцировку в кардиомиоциты и введение в них целевых мутаций при помощи CRISPR/Cas9. Данный способ моделирования необходим для изучения механизмов развития синдрома удлиненного QT интервала, а также для его терапии [7].

Также для моделирования ССЗ с помощью CRISPR/Cas9 в качестве биологической модели достаточно часто используются рыбы вида *Danio rerio*.

Данный вид является выгодным в моделировании ССЗ главным образом из-за схожести биохимических и биофизических процессов, происходящих в их сердце, по сравнению с сердцем человека, например, сердце *Danio rerio* обладает электрическими характеристиками, напоминающими человеческое сердце. В частности, оно имеет синоатриальную узлоподобную область, а вентрикулярные кардиомиоциты демонстрируют особенности потенциала действия, напоминающие таковые у человеческого сердца [8].

На данный момент сообщается о нескольких системах на основе CRISPR / Cas9 для моделирования ССЗ с помощью вида *Danio rerio*. Так, в одном случае группа исследователей ввела мутацию С.А2987Т (N996I) в ген *KCNH2*, который отвечает за развитие синдрома удлиненного QT интервала. Данная мутация была исправлена в индуцированных плюрипотентных клетках пациента с синдромом удлиненного интервала QT второго типа. Исследование кардиомиоцитов, полученных путем дифференциации изогенных плюрипотентных стволовых клеток, установило роль этой мутации в развитии патогенеза и электрофизиологических аномалий, а также показало, что такая модель может быть использована для производства и тестирования лекарств. Значительное число мутаций в генах, участвующих в развитии ССЗ, приводит к большой вариативности момента начала заболевания и его тяжести [9]. Кроме того, описанная выше вариативность мутаций делает практически невозможным полное исследование вклада некоторых генов в патогенез заболевания. Поэтому необходимо создание моделей не просто заболеваний, а именно функционирования пораженных генов в целом. Также разнообразие патологических проявлений на клеточном и организменном уровне у пациентов с одним и тем же диагнозом является причиной неэффективности лекарственной терапии наследственных ССЗ. Неэффективность лекарственной терапии приводит к выводу, что наиболее перспективным средством терапии наследственных ССЗ является редактирование генома.

В ходе анализа литературы, мы разделили процесс моделирования ССЗ на несколько основных направлений. Это изучение функций гена в норме и патологии, которая включает в себя нокаут или сверхактивацию работы гена и изучение функционирования нескольких пораженных генов без вмешательств.

Выводы:

1. CRISPR/Cas9 редактирование является перспективным направлением регенеративной и персонализированной медицины. Более того, в сравнении с другими способами редактирования генетической информации именно CRISPR системы обладают наибольшим количеством положительных результатов при терапии ССЗ. Тем не менее, редактирование генома на основе эндонуклеазы и рекомбинантной РНК является не до конца изученным, что не позволяет полностью интегрировать данную методику в клиническую практику.

2. Редактирование генома является наиболее выгодным в отношении заболеваний, у которых симптомы и клинические признаки развиваются постепенно. В особенности выгодно применение редактирования генома на ранних стадиях сердечно-сосудистых заболеваний.

3. Наиболее перспективной биологической моделью являются рыбы вида *Danio rerio*. Сердце *Danio rerio* обладает высоким регенераторным потенциалом, которого нет у грызунов, которые являются общепринятыми биологическими моделями. Модели *Danio rerio* могут быть использованы для более глубокого понимания патофизиологических процессов при сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как наследственные кардиомиопатии. Примечательно, что модели нокдауна, генерируемые стандартным морфолиновым методом, показывают значительное различие по сравнению с подходом, основанным на редактировании генома с помощью CRISPR/Cas9. Именно поэтому моделирование сердечно-сосудистых заболеваний с помощью CRISPR/Cas9 является перспективным направлением генной инженерии.

4. Также стоит отметить, что патогенез и молекулярные основы развития различных сердечно-сосудистых заболеваний являются не до конца изученными, что заметно тормозит дальнейшую терапию и ставит акцент на необходимости подробного исследования заболеваний с помощью создания моделей.

Список литературы:

1. Garneau J. E. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature*. – 2010. – Т. 468. – №. 7320. – С. 67
2. Kaur B., Perea-Gil I., Karakikes I. Recent Progress in Genome Editing Approaches for Inherited Cardiovascular Diseases // *Current cardiology reports*. – 2018. – Т. 20. – №. 7. – С. 58
3. Kim J. G. et al. CRISPR DNA elements controlling site-specific spacer integration and proper repeat length by a Type II CRISPR–Cas system // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Т. 47. – №. 16. – С. 8632-8648
4. Klompe S. E. et al. Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration // *Nature*. – 2019. – Т. 571. – №. 7764. – С. 219-225
5. Ledford H. CRISPR fixes disease gene in viable human embryos // *Nature News*. – 2017. – Т. 548. – №. 7665. – С. 13
6. McGinn J., Marraffini L. A. Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – Т. 17. – №. 1. – С. 7-12
7. Rezaei H. et al. Harnessing CRISPR/Cas9 technology in cardiovascular disease // *Trends in cardiovascular medicine*. – 2019
8. Simeonov D. R., Marson A. CRISPR-Based Tools in Immunity // *Annual review of immunology*. – 2019. – Т. 37. – С. 571-597
9. Zhang L. et al. Triple-Targeting Delivery of CRISPR/Cas9 To Reduce the Risk of Cardiovascular Diseases // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2019. – Т. 58. – №. 36. – С. 12404-12408