

68. *HPRT-deficient* (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells / M. Hooper, K. Hardly, A. Handyside et al. // *Nature*.— 1987.— 326, N 6110.— P. 292—295.
69. *A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice* / M. R. Kuehn, A. Bradley, E. J. Robertson, M. J. Evans // *Ibid.*— P. 295—298.
70. *Generation of transgenic mice producing a human transthyretin variant: a possible mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy* / H. Sasaki, T. Shigenobu, M. Nakazato et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1986.— 139.— P. 794—798.
71. *Получение трансгенных мышей, содержащих гены из семейства mos* / Б. М. Вайсман, Е. Р. Забаровский, М. К. Нурбеков и др. // Структура и функции клеточного ядра: Тез. докл. 9-го Всесоюз. симпози. (Черноголовка, 25—27 мая 1987).— Черногловка, 1987.— С. 103.
72. *Stewart T. A., Pattengale P. K., Leder Ph. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes* // *Cell*.— 1984.— 38, N 3.— P. 627—637.
73. *Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development* / A. Leder, P. K. Pattengale, A. Kuo et al. // *Ibid.*— 1986.— 45, N 4.— P. 485—495.
74. *Transgenic mice harboring SV 40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors* / R. L. Brinster, H. Y. Chen, A. Messing et al. // *Ibid.*— 1984.— 37, N 2.— P. 367—379.
75. *Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice* / C. J. Quatife, C. A. Pinkert, D. M. Ornitz et al. // *Ibid.*— 1987.— 48, N 6.— P. 1023—1034.
76. *Groner B., Schonberger C.-A., Andres A. C. Targeted expression of the ras and myc oncogenes in transgenic mice* // *Trends Genet.*— 1987.— 3, N 11.— P. 306—308.
77. *The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice* / J. Vogel, S. H. Hinrichs, R. K. Reynolds et al. // *Nature*.— 1988.— 335, N 6191.— P. 606—611.
78. *Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA* / J. M. Leonard, J. W. Ambramszuk, D. S. Pezen et al. // *Science*.— 1988.— 242, N 4886.— P. 1665—1670.
79. *Diabetes in transgenic mice resulting from over-expression of class I histocompatibility molecules in pancreatic β -cells* / J. Allison, I. L. Campbell, G. Morahan et al. // *Nature*.— 1988.— 333, N 6173.— P. 529—533.
80. *Neonatal hepatitis induced by α_1 -antitrypsin: a transgenic mouse model* / M. J. Dyaico, S. G. N. Grant, K. Felts et al. // *Science*.— 1988.— 242, N 4882.— P. 1409—1412.
81. *Cuthbertson R. A., Klinthworth G. K. Transgenic mice—a gold mine for furthering knowledge in pathobiology* // *Lab. Invest.*— 1988.— 58, N 5.— P. 484—502.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.1

В. А. Кордюм

ВОЗМОЖНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МАССОВЫХ ПАТОЛОГИЙ

Анализируются возможности генной терапии для лечения основных массовых патологий человека — атеросклероза, злокачественных опухолей, инфекционных болезней и диабета. В своей основе генная терапия делится на два направления: 1) исправление генного дефекта и 2) генная компенсация функции. Первое основано на прецизионном замещении дефектного гена или его фрагмента и требует обязательного знания деталей повреждения. Оно чаще всего подразумевается при упоминании о генной терапии но относится почти исключительно к классическим наследственным болезням, у которых причиной болезни является дефект конкретного структурного гена. Второе направление предусматривает введение гена, призванного компенсировать ослабленную (или в общей форме измененную) функцию под специальной регуляцией. В этом случае необязательно знание конкретного генного дефекта, вызвавшего патологию.

Поскольку в основе массовых патологий чаще всего лежат дефекты вызванные неизвестными нарушениями регуляции экспрессии неповрежденного структурного гена, их можно парировать по принципу генной компенсации функции. Приводится общая схема генной терапии основных массовых патологий и конкретные варианты ее поясняющие. Анализируется состояние работ по генной терапии основных массовых патологий.

Интенсивные работы в области генной терапии позволяют сегодня ставить вопрос о реальном круге задач, который не ограничивается выбрасываемыми в качестве натуральных (т. е. проводимых на человеке), но тем

не менее являющихся модельными (в силу их крайне редкой встречаемости) наследственными болезнями — синдромами врожденного иммунодефицита и Леш-Найяна.

Потенциально для генной терапии доступно лечение практически любых патологий, в том числе с наследственной предрасположенностью, приобретенных, а также возрастных [1]. Сложнее обстоит дело с практической реализацией. Поэтому анализ выбора целей и способов их достижения в разумные сроки становится необходимым для планирования предстоящих работ. И первым возникает вопрос о реальности лечения при помощи генной терапии наиболее массовых патологий, имеющих наибольшее значение и для населения (которое им подвержено), и для здравоохранения (которое должно по мере своих возможностей им противостоять).

До недавнего времени массовые патологии не связывали с генетическими нарушениями. Однако сегодня следует говорить не об отсутствии, а об особенностях такой связи. Даже инфекционные заболевания, включая, казалось бы, совсем «неразборчивые», например, проказа или СПИД, имеют четкую наследственную предрасположенность [2, 3]. А представления о генетической обусловленности практически всех видов патологий в сочетании с определенными внешними условиями приобретают статус некоего всеобщего принципа [4, 5]. В таком контексте событий ситуация с массовыми патологиями приобретает особое звучание. Во всем мире происходит крутое возрастание мутационного давления на геномы всего живого, в том числе и человека. Бесчисленные количества генотоксических продуктов и воздействий, поступающих в окружающую среду, просто не могут не повысить уровень мутирования. И человек в силу своего социального статуса находится здесь в особом положении, радикально отличающемся от остального живого мира.

За последние годы появились целые группы новых, ранее неизвестных болезней, непосредственно связанных с негативными последствиями научно-технического прогресса [6]. Но главная опасность в другом. Серьезные нарушения, т. е. все то, что отсекается за счет гаметной, зиготной и эмбриональной смертности, не будут накапливаться в генофонде популяции. Но нарушения, совместимые с гаметогенезом, оплодотворением и эмбриогенезом, реализуются в живорожденных. Существует самоподдерживающийся фон мутационного груза, определяемый тремя факторами: 1) темпом мутирования; 2) элиминацией мутировавших генотипов на всех пренатальных этапах и в постнатальный период и 3) дифференциальной положительной селекцией мутантных фенотипов в пренатальный период с негативной селекцией в постнатальный [7].

Наше реальное окружение резко увеличивает вклад первого фактора. Повышение общего уровня заботы о населении существенно усиливает влияние второго и особенно третьего факторов. Так, если элиминацию от реализации повреждения генома в фенотипе удастся компенсировать возможностями медицины, а фертильность не будет непреодолимо нарушена, рост мутационного груза, отягощающего человечество, дополнительно увеличится. В этом направлении сделано уже очень многое. Так, еще в начале текущего столетия средняя продолжительность жизни больных синдромом Дауна составляла 9 лет, а в настоящее время — более 50 лет [8]. Таких примеров очень много. И чем выше уровень медицины и грязнее окружающая среда, продукты питания и т. д., тем тяжелее окажется мутационный груз.

Особый вклад при этом должны внести нарушения генома, ведущие к отсроченным наследственно обусловленным патологиям. Отсроченные патологии как с постоянно протекающим, но замедленным развитием и потому проявляемые позже, так и возникающие относительно внезапно в большинстве случаев не блокируют воспроизведение в репродуктивный период. Поэтому изменения генома, их вызывающие, не будут устраиваться из популяции, мутационное давление приведет к накопле-

нию повреждений такого типа, а высокий социальный уровень общества обеспечит их закрепление. Это неизбежно повлечет за собой возрастающую болезненность в популяции, а после исчерпания компенсаторных возможностей медицины — парастающее сокращение средней продолжительности жизни.

Анализ такой ситуации в литературе отсутствует. Однако уже имеющиеся экспериментальные данные дают основание полагать что степень мутационного груза, влияющего на вероятность отсроченных патологий в популяции людей развитых стран, исключительно высока. Так, активность глутатионтрансферазы мю-класса, снижающая риск заболевания некоторыми типами опухолей (например, раком толстой кишки), выявляется у 46 % лиц нормальной популяции, а у 54 % отсутствует [9]. Даже по очень неполным пока подсчетам, около 20 % людей имеют генетические дефекты, снижающие их продолжительность жизни [10]. Вариации в локусе алоВ (во многом определяющем атеросклероз) имеют такие же популяционные частоты, как и антигенные варианты, т. е. почти у всех людей [11]. «Средний» индивид гетерозиготен примерно по 14 % структурных генов [12]. Но сегодня уже хорошо известно, что по крайней мере во многих случаях гетерозиготность, при которой один аллель полноценен, а второй дефектен частично, влечет за собой соответствующую патологию в ослабленной форме. В случае же таких патологий, как опухоли, это приводит к повышению вероятности их возникновения со смещением сроков в более ранние возрастные группы [13]. Количество подобных примеров растет столь быстро, что приходится признавать печальную очевидность — практически нет ни одного человека, у которого бы не было критически ослабленных функций вследствие мутаций в соответствующих генах. Ведь если у любого индивидуума по отношению к любому другому (не родственному) имеются наследуемые изменения в каждом 100—300 нуклотидах из трех миллиардов его генома [14], то говорить о теоретически полноценном функционировании всех генов вообще не приходится. По такому уже существующему фону дальнейшие мутации могут очень круто изменить статус людей. Собственно говоря, иначе просто не может быть. Если для других живых существ увеличение мутационного груза приведет к усилению элиминации особей, отбор уберет все слабое, сохранив прежнюю жизнестойкость популяции, то для человечества этот путь уже закрыт: естественный отбор невозможен в силу социального статуса, а искусственный — в силу абсолютной и безоговорочной морально-этической неприемлемости. Как бы странно это не звучало, но наш мутационный груз находится под незыблемой защитой гуманизма.

И здесь — в общем виде — первый критерий выбора патологий как предпочтительных объектов генной терапии совпадает с распределением заболеваний по критерию массовости и тяжести последствий. В развитых странах вообще, и в нашей в том числе, первые две ступеньки общеизвестны — это сердечно-сосудистые и опухолевые заболевания. По причинам смертности на третьем месте стоят физические причины (несчастные случаи, самоубийства и т. д.), а на четвертом — легочные болезни [15]. Но несчастные случаи не относятся к патологиям. Что же касается болезней легких, то это сборная группа, в которую входят и пневмонии, и последствия курения, и эмфиземы и т. д.

Поэтому, если разбирать патологии с более-менее цельными первопричинами, то на третье место достаточно уверенно можно ставить инфекционные болезни. Наконец, четвертое — можно отдать диабету. И даже если в этих пределах что-то поменять местами, четыре первые приоритетные массовые патологии останутся неизменными.

Второй критерий выбора — это возможности генной терапии применительно к каждой конкретной патологии.

По принципиальным моментам генную терапию можно классифицировать по схеме, представленной на рис. 1. Сегодня для реальной

работы доступны далеко не все варианты. Пока они имеют существенные ограничения. Должны быть соблюдены определенные условия:

— гены, ответственные за данную патологию, известны, продукты, которые они кодируют, охарактеризованы и поддаются определению в тех реальных количествах, которые обуславливают и патологию, и норму;

— за патологию отвечает один или очень небольшое количество генов (2—3, так как с большим числом их пока работать слишком сложно);

— продукт, кодируемый геном, выделяется в кровь или, если не выделяется, то патология обусловлена таким дефектом гена, который

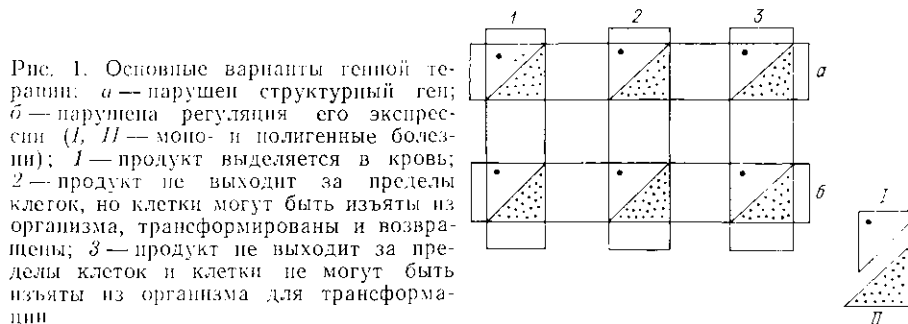


Рис. 1. Основные варианты генной терапии: *a* — нарушен структурный ген; *b* — нарушена регуляция его экспрессии (*I*, *II* — моно- и полигенные болезни); *1* — продукт выделяется в кровь; *2* — продукт не выходит за пределы клеток, но клетки могут быть изъяты из организма, трансформированы и возвращены; *3* — продукт не выходит за пределы клеток и клетки не могут быть изъяты из организма для трансформации.

Fig. 1. Basic variants of gene therapy: *a* — structural gene is disturbed; *b* — control of its expression is disturbed (*I*, *II* — mono- and polygenic diseases); *1* — the product is released into blood; *2* — the product does not leave cells, but cells can be removed from organism, transformed and returned; *3* — the product does not leave cells, and cells cannot be removed from organism for transformation.

проявляется лишь в строго определенной группе клеток, допускающей изъятие из организма, трансформацию и возврат.

Эти условия можно назвать «условиями выполнимости». Рассмотрим с этих позиций ведущие массовые патологии.

Сердечно-сосудистые заболевания. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Европе превышает 50 % общей смертности [16]. По своим первичным механизмам сердечно-сосудистые заболевания имеют множественную этиологию, генетика которой в большинстве случаев не известна. Вместе с тем далеко не все варианты этих заболеваний равномерно распространены, а этиология их равнозначна. Центральное место здесь занимает атеросклероз. Но и атеросклероз вызывается отнюдь не единичным генетическим дефектом. В его развитие у разных индивидуумов могут вносить свой вклад все гены, имеющие отношение к метаболизму липидов, включая гены аполипопротеидов, их рецепторов, ферментов липидного обмена и т. д. [17].

Но особую роль в предотвращении патологии играет белок А1 — основной компонент липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [18]. Повышение его содержания по отношению к другим липопротеидам позволяет организму устранять или ослаблять негативное действие мутаций по различным генам, влияющим на развитие атеросклероза. Таким образом, ключевым является один ген.

Второй по значимости и массовости компонентой в развитии атеросклероза оказывается сумма изменений, приводящих к пролиферации клеток сосудистой стенки (в результате развития вирусов, активации клеточных онкогенов и т. д.). За регуляцию этой компоненты отвечает иммунная система. Ее роль в этих процессах проанализирована ниже. Таким образом, центральное значение в парировании атеросклероза имеет один ген. И в этом плане возможности генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний отвечают условиям выполнимости.

Опухолевые заболевания. Молекулярно-генетические основы злокачественного перерождения и опухолевого роста сегодня в значитель-

ной мере уже известны. Они весьма разнообразны и сложны своей многоступенчатостью. Их можно разделить на две группы. К первой относятся факторы, приводящие к тому, что нормальная клетка становится злокачественной. Такой процесс (малигнизация) сам по себе многофакторный. В одних случаях он связан с активацией клеточных онкогенов или привнесением вирусных [19, 20]. Но и эти процессы как-то генетически детерминированы.

К малигнизации ведет также утрата антионкогенов — особых внутриклеточных регуляторов неконтролируемого роста [21, 22]. Генетически детерминированная предрасположенность к возникновению опухолей обусловлена также дефектами в системе репарации даже в случае ее гетерозиготности аллельностью основного детоксикатора ксенобиотиков р-450-монооксидаз, дефектами цитоскелета и т. д. [23, 24].

Здесь функционируют различные механизмы и единственным общим контролем для них является деятельность иммунной системы. Ее роль в этих контролирующих функциях оказывается намного глубже, чем казалось вначале. Так, например, колониеобразующие факторы, интерфероны и т. д. являются агентами, блокирующими развитие как малигнизации, так и самых первых этапов опухолевого роста [25, 26]. Но если все же малигнизация произошла и начался злокачественный рост, то теперь уже решающее значение для вопроса «кто кого?» играет почти исключительно иммунная система. Такая функция иммунной системы за свою направленность и эффективность получила даже специальное название — иммунологический надзор.

Пептиды и кодирующие их гены, составляющие основу регуляции иммунной системы и способные подавлять начавшийся злокачественный рост (а в определенной мере не допустить малигнизации), в основном известны. Это интерфероны, интерлейкины, колоннестимулирующие факторы, кахектины. Число их приближается к двум десяткам и по мере углубления наших знаний будет расти. Однако здесь имеются два существенных момента. Первый связан с тем, что действие этих факторов в значительной мере взаимообусловленно — активация одного приводит к активации других. И в такой взаимосвязи, с одной стороны, и значимости для круга иммунных ответов — с другой, далеко не все они одинаковы. Второй момент сопряжен со структурой иммунодефицитов. Хотя генов, контролирующих синтез факторов иммунитета много, но далеко не все они в дефиците у больного (некоторые бывают даже в избытке). Поэтому при корректной оценке иммунного статуса оказывается, что в большинстве случаев то, чего не хватает каждому конкретному индивидууму, чтобы справиться с опухолевым ростом (или не допустить его, если тестирование иммунного статуса проводить профилактически), будет исчисляться одним-двумя неполноценными или недостаточно активно функционирующими генами, а перечень ключевых продуктов (исходя из известных на сегодняшний день) окажется небольшим: α - и γ -интерфероны, интерлейкин-2 и кахектин-1 (ФНО) [27—30].

Инфекционные болезни. Развитие инфекционных болезней практически полностью определяется иммунным статусом организма. И для предотвращения их развития (равно как и выздоровления, если болезнь развилась) необходимы по общей номенклатуре те же факторы (и их гены), которые нужны для предотвращения малигнизации и блокирования опухолевого роста. И так же, как в последнем случае, у больного в дефиците окажется в подавляющем большинстве недостаток одного-двух факторов. Так что и здесь условия выполнимости будут соблюдены.

Сахарный диабет. Сахарный диабет широко распространен во всем мире. Но в нашей стране он, похоже, ведет себя по-особому. В СССР насчитывается 10—13 млн больных и ежегодный прирост прогнозируется на 6 % [31]. Здесь сказывается и рост мутационного груза и условия, способствующие его реализации.

Этиология сахарного диабета весьма различна. Само же заболевание делится на инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) и инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНСД). В свою очередь, в основе каждой группы лежат разные причины и механизмы, во многом еще вообще неизвестные. Тем не менее у них имеется некое объединяющее начало — инсулин. В случае ИЗСД с позиций генной терапии не имеет особого значения причина возникновения дефекта. Чаще всего она связана с гибелью β -клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин. В такой гибели решающее значение имеет генетически детерминированное развитие специфической аутоиммунной реакции, пусковым агентом которой обычно является определенная инфекция [32, 33].

И если бы удалось обеспечить продукцию инсулина другими клетками, то оказалось бы возможным восстановление здорового статуса больного ИЗСД независимо от причины гибели его β -клеток.

В случае ИНСД ситуация намного сложнее, а генетические составляющие разнообразнее. По опыту лечения (вернее поддержания) таких больных показывает, что частично последствия патологии устраняются увеличением содержания инсулина в крови. Кроме того, вследствие работы этого компенсаторного механизма происходит перенапряжение и гибель β -клеток. Поэтому синтез инсулина иными клетками мог бы в значительной мере облегчить течение болезни.

Таким образом, в случае сахарного диабета очень многое мог бы сделать один имплантированный ген, если бы он полноценно функционировал в месте введения.

Так обстоит дело при рассмотрении основных патологий по отдельности. Но ситуация оказывается намного существеннее, если попытаться сделать то, что на первый взгляд кажется неправомерным — связать их воедино с точки зрения молекулярных факторов, лежащих в их основе, и, как следствие, возможностей генной терапии для их комплексного лечения и профилактики.

Иммунная система контролирует развитие инфекций — это хорошо известно. Но оказалось, что хронические болезни, связанные с вирусами, и даже просто вирусносительство являются следствием дефицита у таких людей интерферона (в первую очередь α и γ) и интерлейкина-2 [34—37]. Сейчас исследуются конкретные функции иммунной системы, препятствующие развитию опухолей и уничтожающие их. И выяснилось, что в большинстве случаев решающий вклад могут внести α - и γ -интерфероны, интерлейкин-2 и фактор некроза опухолей [38, 39].

Но в то же время развитие определенных вирусов запускает процессы, приводящие к ряду форм диабета [40] и атеросклероза [41]. Следовательно, иммунная система защищает и от развития этих патологий. Существенными для сахарного диабета и атеросклероза являются аутоиммунные реакции [42, 43]. Но фактор некроза опухолей блокирует развитие аутоиммунных процессов [44].

Возникновение и рост опухолей связаны с активацией онкогенов; нечто сходное может лежать, как считают, в основе образования и атеросклеротических бляшек. Но интерфероны (особенно γ) и фактор некроза опухолей контролируют активность многих онкогенов, снижая ее до нормального уровня [45—48]. Более того, уже малигнизированные в результате действия онкогенных вирусов или активации собственных онкогенов клетки под влиянием интерферонов могут возвращаться к нормальному фенотипу [49, 50]. Прикрепляясь к стенкам сосудов, тромбоциты выделяют ростовой фактор и могут вызывать пролиферацию клеток, а γ -интерферон подавляет митогенное действие фактора роста тромбоцитов [51]. Возрастание синтеза коллагена приводит к утолщению артериальной стенки, снижению ее эластичности [52], а фактор некроза опухолей и α - и γ -интерфероны снижают уровень синтеза коллагена и увеличивают синтез коллагеназ [53—55]. Т-лимфодефицит ускоряет развитие атеросклероза [56], а интерлейкин-2 и γ -интерферон препятствуют возникновению этого дефицита, а если он имеется, в значительной мере снижают его [57].

ЛПВП, ведущим компонентом которых является белок А1, контролируют и уровень, и поведение холестерина в крови и парируют развитие как атеросклероза, так и ишемической болезни сердца даже при дефектах других систем [58]. Более того, они контролируют также содержание холестерина в плазматических мембранах клеток, извлекая его при избыточном накоплении [59]. Но одновременно высокий уровень ЛПВП является фактором, противодействующим развитию атеросклероза и ишемии у диабетиков [60]. А поскольку один из распространенных вариантов нарушения иммунной системы связан с нарушением

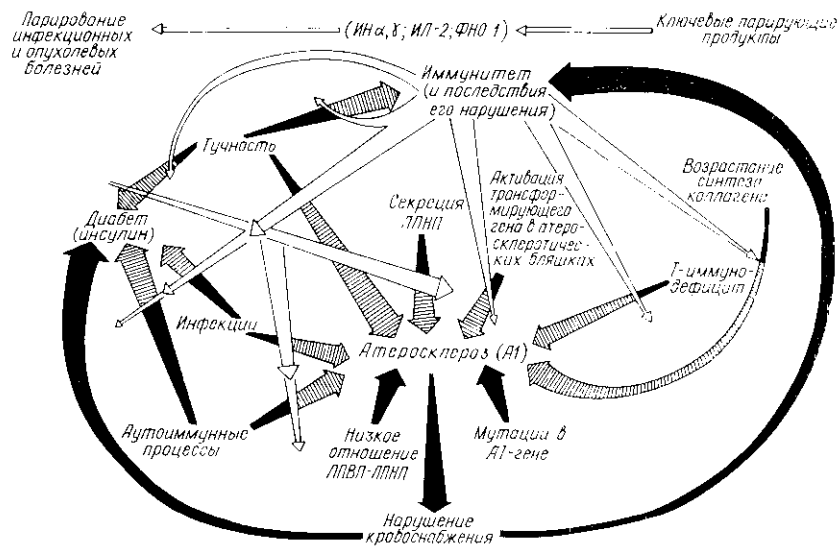


Рис. 2. Взаимосвязь и взаимообусловленность основных патологий через действие продуктов ключевых генов, контролирующих эти патологии
 Fig. 2. Interrelation and interdependence of basic pathologies through the action of the key gene products controlling the pathologies

липидного обмена вообще и поступлением и выводом холестерина из мембран в частности, то ЛПВП улучшают и состояние иммунной системы [61, 62]. В свою очередь, инсулин влияет на секрецию липопротеида В, усиливающего при его избытке проявления атеросклероза [63]. А фактор некроза опухолей контролирует липидный обмен, стимулируя липолиз [64]. Этот процесс происходит настолько эффективно, что его патентуют как метод контроля веса для похудения тучных больных [65, 66].

Наконец, факторы иммунитета — интерфероны α и γ , интерлейкин-2 и фактор некроза опухолей, влияя на процессы, приводящие к развитию атеросклероза и диабета, в свою очередь взаимодействуют между собой, повышая эффективность один другого [67]. Более того, их совместное применение может вызвать эффект, качественно отличный от действия одного продукта. Так, фактор некроза опухолей в чистом виде приводит к стимуляции некоторых опухолей, но в сочетании с α -интерфероном стимуляция исчезает [68].

Таким образом, основные патологии являются тесно связанными между собой и дефект одного гена может обеспечить развитие сразу нескольких болезней (рис. 2). И за все эти нарушения у большинства людей отвечает всего-то, в основном, несколько ключевых генов, а у каждого конкретного индивидуума в дефиците окажутся чаще всего 2—3 продукта. Возникает удивительная ситуация — единый комплекс основных факторов ведущих массовых патологий. Вместе данные патологии обуславливают до 9/10 всех болезней. На уровне молекулярных механизмов они перекрываются. И генная терапия может и должна парировать их комплексно. Какие же для этого есть пути и насколько они реальны?

В своей основе возможны два разных направления генной терапии: 1) исправление генного дефекта и 2) генная компенсация функции. Первое исходит из прецизионного замещения дефектного гена (или его дефектного фрагмента) в клетках, отвечающих за функцию, нарушение которой и приводит к патологии. Так, если человек болен талассемией или серповидноклеточной анемией, то рекомбинационное замещение в стволовых клетках дефектного гена, кодирующего дефектный глобин, на полноценный должно безнадежно больного сделать здоровым. Для этого необходимо знание и конкретного дефекта, и его точной локализации.

Но при массовых патологиях гены, нарушение уровня экспрессии которых обуславливают болезнь (или восприимчивость к возбудителю), чаще всего не несут никаких нарушений. И рекомбинационная замена их бессмысленна. Изменения затрагивают различные уровни регуляции, сложно переплетающиеся между собой и пока почти совершенно неизвестные. Поэтому реально компенсировать функцию можно только введением аналогичного гена, но под иной регуляцией. Знание конкретного дефекта и его локализации в этих случаях необязательно. Продукты всех указанных выше генов, нарушение уровня которых обуславливает массовые патологии, выделяются в кровь и через ее посредство достигают мишеней. И хотя расстояния, на которых в организме общаются таким путем клетка-продуцент и клетка-мишень, могут быть весьма различными, тем не менее практический опыт компенсации функций инъекцией данного препарата показывает, что эффективной может быть организация синтеза заданного продукта в любой группе любых клеток. Здесь имеются только три ограничения. Первое связано с тем, чтобы принятие на себя дополнительной функции клетками не препятствовало осуществлению (или изменению) их основной функции и не отразилось бы отрицательно на всем организме. Второе заключается в том, что новые клетки-продуценты должны обеспечивать синтез и экскрецию функционально полноценного продукта. Согласно третьему — клетки, взявшие на себя синтез нового продукта, не должны погибнуть от этого (вследствие чрезмерного перенапряжения, токсичности для них продукта и т. д.).

Пока не вполне понятна проблема обеспечения регуляции требуемого уровня экспрессии вводимого гена. Как отмечалось выше, естественная регуляция, если она нарушена в масштабах всего организма, при массовых патологиях не даст возможности введеному гену с его собственными регуляторными последовательностями обеспечить компенсаторный эффект. Однако даже в этом случае приходится констатировать неизученность варианта множественности. Непонятно, будет ли во всех случаях такой эффект ограничения функции независим от дозы вводимого гена или при определенной (и реально достижимой) множественности компенсация может все же произойти.

Еще сделаны лишь первые шаги по созданию искусственной регуляции. В чисто утилитарных задачах она может быть разделена с позиций генной терапии на регуляцию «по требованию» и «по желанию». «По требованию» — это регуляция, естественная для данного гена, обеспечивающая в норме требуемый организму уровень продукции.

Регуляция «по желанию» достигается постановкой структурного гена под такие регуляторные последовательности, которые (хотя они и отвечают на естественные в организме воздействия) могут регулироваться в широком диапазоне самим человеком по своему усмотрению. Так, на экспериментальных животных осуществляется регуляция «по желанию» тяжелыми металлами или стероидными гормонами, если структурный ген поставлен под металлотионеиновый или стероидзависимый промотор соответственно. Но для человека такие варианты практически неприспосабливаемы. Из потенциально приемлемых (и известных) остается только хитиновая регуляция. Можно ожидать, что внутрикожное или подкожное локальное введение необходимого гена под хитиновой регуляторной последовательностью позволит мягким до-

кальным нагревом в физиологическом диапазоне обеспечить требуемый уровень синтеза необходимого продукта. Но, как можно ожидать, для компенсации ряда функций окажется приемлемым и конститутивный синтез продукта, что сегодня вполне достижимо.

Остается также непонятным взаимодействие регуляции синтеза под контролем «своего гена» с неконтролируемым организмом синтезом аналогичного продукта на привнесённом гене. Регуляция при этом может уменьшить экспрессию «своего гена», если недостаточный его уровень считать нормой. Но может и не уменьшить, если нарушение имеет иную природу. Изучить это возможно только на организменном уровне. Исходя из общих соображений можно предположить, что у разных индивидуумов могут реализоваться разные варианты, так как при внешне одинаковом проявлении в виде дефицита продукта механизмы, его обуславливающие, далеко не всегда одинаковы. Только эксперимент способен прояснить этот вопрос.

С учетом реального разнообразия проявления патологий компенсация функции может быть необходима либо постоянно, либо временно. В ряде случаев дефект функции может быть временным. Например, какое-то воздействие, ослабив организм, привело к развитию патологии, которая, возникнув, сама подавляет данную функцию. Это очень часто встречается при различных болезнях. В таком случае достаточно вывести организм на исходный уровень, который до этого был нормальным. Тогда норма восстановится и будет сама себя дальше поддерживать (что вообще-то характерно для здорового состояния). В простейших вариантах это может быть достигнуто методами традиционной медицины, и генная терапия тогда вообще не нужна.

Но в тех случаях, когда искусственно создаваемая компенсация требуется длительное время (например месяцы), инъекции недостающего продукта очень часто не могут заменить его постоянного синтеза в организме. Инъекции можно производить лишь периодически. А клиренс всех высокоактивных продуктов (иммунотропные препараты, гормоны и т. д.) очень быстрый. И чем больше их вводится, тем круче активация систем их устранения — организму нужна только норма, а избыток может быть намного опаснее недостатка.

Так, период полураспада интерлейкина-2 в сыворотке крови составляет 2—3 мин, а фактора некроза опухолей — 6 мин. Содержание же этих продуктов в крови для эффективного действия чаще всего колеблется от десятых микрограмма до нескольких десятков микрограммов в 1 мл [69—71]. Это значит, что их общее количество не должно превышать нескольких сотен пикограммов во всей крови человека. Выше этой дозы препараты становятся все более токсичными вплоть до вызывания тяжелых поражений и смерти [72, 73]. Поэтому обычные способы введения неэффективны, а на капельницах нужны для терапевтического действия срок можно выдержать лишь в виде редкого исключения. В таких случаях скорее всего наиболее целесообразной окажется система, обеспечивающая лишь временное функционирование введенного гена, да к тому же по затухающему режиму для того, чтобы обеспечить восстановление в организме своей нормы. Если же функция ослаблена не временно, то тогда компенсация окажется эффективной лишь при введении требуемого гена «на всю жизнь».

По количеству синтезируемых в организме продуктов их можно приближенно разделить на три группы — микрограммы в сутки, миллиграммы в сутки, граммы в сутки. Для компенсации функций разными генами эти уровни методически достижимы неодинаково. Так, иммунотропных пептидов требуются микрограммы. Поэтому обеспечить их необходимое организму количество методами генной терапии наиболее просто. Инсулина же нужны миллиграммы. А белка А1 — в пределах граммы.

Таким образом, наблюдается весьма много разных вариантов. Для их обеспечения нужны различные системы введения и экспрессии гена.

Системы введения очень четко подразделяются на две группы — опосредованно-клеточные и прямые.

Варианты опосредованно-клеточной генной терапии, т. е. обусловливающейся имплантацией клеток, представлены на рис. 3. Стабильная экспрессия может быть достигнута за счет неотторгаемых клеток данного индивидуума, которые извлекаются из него, трансформируются вне организма (если нужно — подвергаются селекции), надежно отделяются от трансформирующего агента и возвращаются обратно. Если

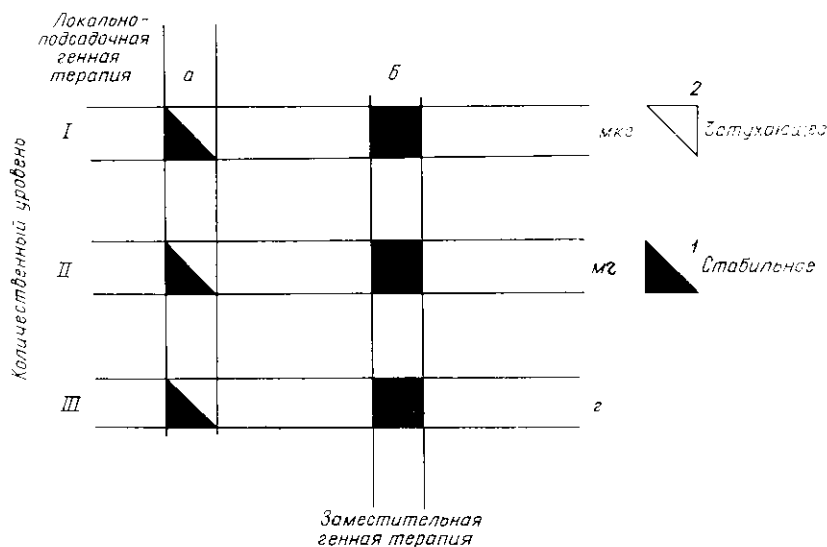


Рис. 3. Опосредованно-клеточная генная терапия (α)

Fig. 3. Cell mediated gene therapy (α)

они при этом колонизируют организм (как, например, клетки костного мозга), то будет иметь место заместительная терапия — нормализованные клетки заместят дефектные (при соответствующих условиях, конечно). Если же клетки остаются локализованными в месте их введения (клетки кожи, печени), то будет иметь место локально-подсадовый вариант опосредованно-клеточной генной терапии.

Именно такие варианты были отработаны на животных: клетки кожи, продуцирующие фактор IX [74]; клетки печени, продуцирующие полноценный рецептор липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [75]; фибробласты, синтезирующие аденозиндезаминазу [76], и т. д.

Для обеспечения затухающей экспрессии могут быть использованы инкапсулированные клетки (чужие или свои), в которые *in vitro* были введены необходимые гены. Может быть использована и прямая подсадка чужих клеток. В первом случае капсулы через некоторое время зарастут межклеточным матриксом и постепенно перестанут функционировать. Во втором — наступит иммунное отторжение с тем же результатом. Наконец, возможна подсадка клеток ограниченного времени существования. Именно так в США начинают работать по лечению опухолей методами генной терапии [77, 78].

Методически более сложен путь генной терапии прямого введения (рис. 4), при котором требуемый ген вводится в клетки непосредственно в организме. При условии его выполнимости этот путь способен решать более широкий круг задач. Здесь возможны следующие варианты.

Стабильная экспрессия может достигаться интеграцией требуемой конструкции в геномы соматических клеток или созданием надежно персистирующих конструкций. Первый путь сегодня уже в известной мере проработан экспериментально, второй же пока находится на ранних этапах исследования. Затухающая экспрессия продемонстрирована

на системах, созданных с использованием поксвирусов. Так же, как в случае вакцин нового поколения, в геном поксвируса (обычно вируса осповакцины) вводят желаемый ген. При попадании такой конструкции (теперь уже вектора) синтезируется требуемый продукт в течение всего времени, пока функционирует вирусный геном. Поскольку поксвирусы не интегрируют в геном клетки (их развитие осуществляется не в ядре, а в цитоплазме) и через определенное время элиминируют, экспрессия

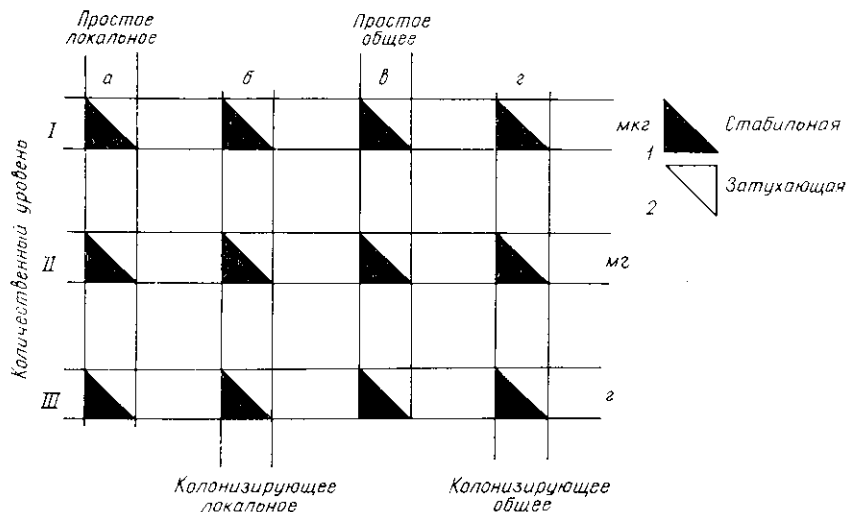


Рис. 4. Генная терапия прямого введения (β)

Fig. 4. Gene therapy of direct injection (β)

носит надежно временный характер. Так, на животных была апробирована система введения интерлейкина-2 для блокирования вирусной инфекции [79].

Само введение может быть локальным, в этом случае материал инъецируют в геном клеток конкретной ткани или органа, а рекомбинантная молекула заключена в материал, быстро разрушающийся в крови, в результате чего его распространение ограничено. Описано введение надежно упакованных рекомбинантных молекул и в кровь. В зависимости от точности адресности они будут в большей или меньшей мере накапливаться в клетках-мишенях, но практически всегда в немалом количестве смогут достигать и иных клеток, в том числе и зародышевых. Поэтому из соображений безопасности (по крайней мере вначале), скорее всего, будет применяться локальное введение.

Возможно создание систем экспрессии в составе дефектных или латентных вирусов конкретной тканеспецифичности. Они обеспечат не просто избирательную доставку требуемого гена в часть клеток-мишеней, но и колонизацию практически всех соответствующих клеток. Можно ожидать, что так будет вести себя система на основе вируса герпеса по отношению к клеткам сенсорных ганглиев, гепатита — по отношению к клеткам печени и т. д. Но эти работы только начинаются. Если же будет найден подходящий вирус (или иная система), способный колонизировать все клетки организма независимо от их тканевой принадлежности, то появится возможность общей колонизации организма. Сегодня, пожалуй, ближе всего к такому вирусу возбудитель СПИДа, но вряд ли кто-либо даже при успешных модельных экспериментах скоро рискнет предлагать подобную систему для генной терапии.

Далеко не все варианты генной терапии нужны и возможны для парирования основных массовых патологий. Те из них, которые реально можно использовать для решения данных задач, представлены в таблице.

Собственно говоря, только комплексное парирование и может обеспечить успех генной терапии основных массовых патологий. Из этого вытекает и стратегия работ в данном направлении. Она заключается в том, что при лечении определяется содержание всех основных компонентов — продуктов указанных выше шести генов (со временем их перечень, очевидно, будет пополнен). Это осуществляется как в стационарном режиме, так и при индукции. При обнаруженном дефиците компенсируется все недостающее, а не только один ген, продукт которого обуславливает уже проявившуюся патологию. А поскольку заранее в большинстве случаев не будет известно, ослаблена функция временно или уже постоянно,

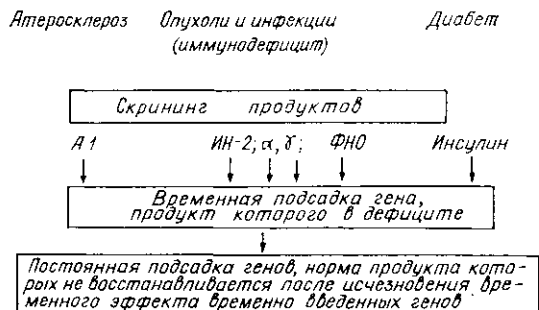


Рис. 5. Принцип комплексной генной терапии основных патологий
Fig. 5. The principle of complex gene therapy of basic pathologies

то подсадка целесообразна во временном исполнении. Если после истощения лимита времени подсадки функция опять окажется на низком уровне — подсадка должна быть произведена в постоянном исполнении (рис. 5).

При профилактике патологий аналогичные процедуры целесообразно осуществлять до того, как разовьется болезнь.

Что же касается компенсации дефектной функции путем имплантации одного единственного гена, то этот путь эффективен, скорее всего, только для классических наследственных болезней, где остальные функции априорно (детальных исследований в этом направлении пока нет) в норме.

На сегодня состояние работ по рассматриваемым патологиям характеризуется следующим образом. Все необходимые для первого этапа работы гены клонированы. Почти для всех показана экспрессия в клетках млекопитающих в составе искусственных молекулярных конструкций и выход продукта в окружающую среду.

Методически, судя по имеющимся данным, легче всего может быть выполнена задача генной компенсации (как временной, так и постоянной) дефицита иммуотропных пептидов. У этой области генной терапии самые разнообразные задачи. Если даже ограничиться перечисленными выше иммуnoreгуляторами — α- и γ-интерферонами, интерлейкином-2

*Варианты генной терапии для лечения основных массовых патологий**
Variants of gene therapy for treatment of basic mass pathologies

Патологии	Парирующие гены (и их продукты)	Требуемое количество продукта в сутки	Возможные системы введения	Код системы
Атеросклероз	А1	г	Прямое локальное стабильное; локально-подсадочное стабильное	βПА1 αПА1
Опухоли и инфекции (иммунная система)	Интерлейкин-2, кахектин-1 (ФНО), интерферон α, γ	мкг	Локально-подсадочное стабильное, затухающее; прямое локальное стабильное, затухающее	αА1-2 βА1-2
Диабет	Инсулин	мг	Прямое локальное стабильное; локально-подсадочное стабильное	βПА1 αПА1

* Для проверки истинного статуса ослабленной функции во всех случаях используются временные затухающие варианты (по крайней мере вначале).

и какектином-1, то и тогда задачи для генной компенсации перекрывают почти весь теоретический диапазон.

Достаточно хорошо представлены врожденные иммунодефициты, которые можно было бы парировать имплантацией генов, кодирующих четыре вышеуказанных пептида. В качестве примеров можно привести хронические гранулематозы, коррегируемые γ -интерфероном [80], синдром Пезеллофа, коррегируемый интерлейкином-2 [81], и др. При различных травматических, вирусных, опухолевых, инфекционных и других поражениях человека резко угнетается способность образовывать интерлейкин-2 и интерфероны [82—84]. Здесь временная подсадка соответствующего гена (или генов) решила бы исход болезни. Паконен, практически у всех с какого-то момента развиваются и прогрессируют возрастные иммунодефициты, которые, как показывают эксперименты, удается компенсировать введением тех или иных иммуотропных пептидов. Наиболее результативным в таких случаях оказывается интерлейкин-2. Так, у человека, начиная с 22-летнего возраста, начинает падать репарация клеток иммунной системы, но даже в весьма солидном возрасте интерлейкин-2, по крайней мере частично, восстанавливает данное нарушение [85]. Объясняется это именно падением с возрастом уровня образования конкретного лимфокина, которое достигает трехкратной величины по сравнению с таковым у молодых людей [86].

Даже при периоде полуинактивации в 2—3 мин благодаря очень низкому содержанию в норме суточный синтез иммуотропных пептидов должен будет составить величину, исчисляемую всего несколькими микрограммами. Инъекциями же парировать такие дефициты невозможно принципиально. Приближенный расчет того, что происходит при инъекциях и в эндогенном синтезе, представлен с помощью сравнения содержания препарата и суточной потребности в нем при периоде полуинактивации 2 мин и норме 1 ед. активности в 1 мл крови (количество крови и лимфы у человека принято за 10 л). Одноразовое введение в дозе 10 млн ед. (в 1 мл крови при перемешивании будет 1 000 ед.):

мин	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
ед.	1000	500	250	125	~62	31	~16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	~0,06	0,03

За полчаса концентрация от величины в тысячу раз превышающей норму, падает до величины, в 30 раз меньшей, чем норма. При постоянном синтезе и норме 1 ед. в 1 мл за каждые 2 мин инактивируется 0,5 ед. Для восполнения надо синтезировать 0,5 ед. За 30 мин — это 7,5 ед. Для организма в целом за сутки восполняющий синтез составит ~3,5 млн ед. Даже при невысоком уровне трансформации такого выхода суммарной продукции можно достигнуть различными (уже апробированными) системами введения.

Принципиально решен вопрос и о регуляции «по желанию» при помощи 5'-области хитшоковых генов. Более того, как показали наши работы, реально можно в одной молекулярной конструкции достигнуть одновременно низкого базового уровня синтеза (постоянная компенсация) и высокого — «по желанию» [87]. Так можно будет держать организм в норме, а при экстремальных ситуациях (инфекция, начало опухолевого роста) повышать уровень иммунитета на требуемую величину в течение времени, необходимого для устранения патологии. А затем опять возвращать ее в норму.

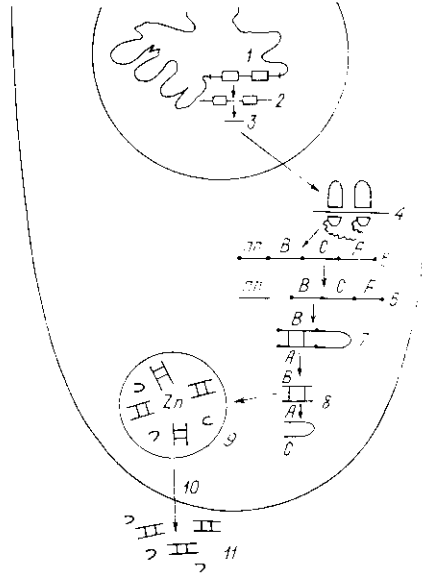
Не удивительно, что именно иммунная система становится предпочтительной областью генной терапии в США. И после «обкатки» общественного мнения на экзотическом синдроме врожденного иммунодефицита, обусловленного дефектом гена, кодирующего аденозиндезаминазу, начинаются практические работы по лечению опухолей путем временной имплантации генов основных иммуотропных регуляторов [77, 78].

В рамках существующих уже разработок вполне доступна и компенсация дефицита инсулина при ИЗСД и его комбинаций с ИНСД. Однако здесь принципиальным моментом является необходимость обеспечения сложной формы процессинга синтезируемого первичного продукта препроинсулина в инсулин и его транспорт из клетки-продуцента.

В организме человека это осуществляют только специализированные клетки, в которых функционируют: собственно экспрессия гена

Рис. 6. Синтез, созревание и транспорт инсулина в β -клетках: 1 — ген инсулина; 2 — РНК-транскрипт; 3 — сплайсинг и процессинг мРНК; 4 — трансляция на рибосомах шероховатого ретикулума; 5 — препроинсулин; 6 — проинсулин; 7 — укладка полипептида в правильную пространственную структуру; 8 — удаление с-пептида и образование инсулина; 9 — упаковка инсулина в гранулы; 10 — выход гранул из клетки; 11 — выход инсулина из гранул во внеклеточную жидкость.

Fig. 6. Synthesis, maturation and transport of insulin in β -cells: 1 — insulin gene; 2 — RNA transcript; 3 — splicing and processing of mRNA; 4 — translation of rough endoplasmic reticulum on ribosomes; 5 — preproinsulin; 6 — proinsulin; 7 — polypeptide folding forming the regular spatial structure; 8 — removal of C-peptide and formation of insulin; 9 — packing of insulin into granules; 10 — release of granules from the cell; 11 — release of insulin from granules into extracellular liquid

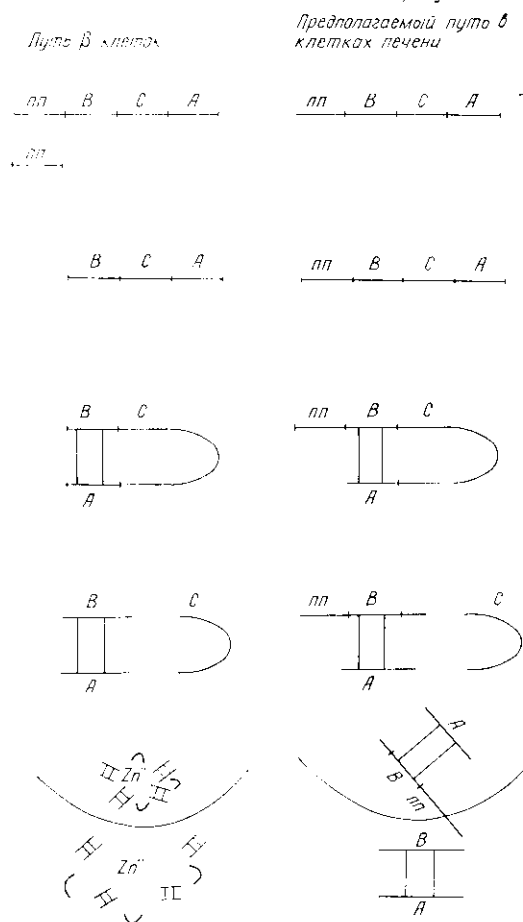


инсулина, все этапы созревания его иРНК, синтез препроинсулина, направленный транспорт препроинсулина в специализированные органеллы, отщепление при таком транспорте внутри клетки препептида, правильная пространственная укладка молекулы, отщепление по строго конкретным аминокислотам с-пептида, упаковка инсулина в специальные гранулы, выведение этих гранул из клеток, освобождение инсулина из гранул вне клеток (рис. 6). Достаточно сбоя на любом этапе — и функционально активный инсулин в крови не появится.

Экспериментальные работы по введению гена инсулина в неспециализированные клетки показали, что в них процесс идет не так. При введении иРНК инсулина в ооциты ксенюса охарактеризовали секретируемый из клетки продукт — им оказался проинсулин [88]. Мы показали, что при введении в фибробласты гена инсулина человека без тканеспецифических регуляторных последовательностей имела место экспрессия гена, и иммунореактивный продукт выделялся в окружающую среду [89]. Более того, он обладал биологической активностью, обеспечивая поглощение клетками глюкозы. Но динамика такого поглощения была характерна для эффекта, вызываемого не инсулином, а проинсулином [90]. Механизмы происходящих здесь процессов не изучены, но можно думать, что в отсутствие специализированных структур и нужных ферментов препептид обеспечивает прохождение молекулы через наружную клеточную мембрану и отщепляется там. Но с-пептид остается не удаленным.

Поскольку в организме человека два совершенно различных типа клеток (β -клетки поджелудочной железы и нервные клетки) образуют полноценный инсулин, очевидно, что правильность процессинга зависит от не столь уж уникальных особенностей ферментных систем клетки. Как показывает опыт, экспрессию гена инсулина можно надежно осу-

ществлять в разных клетках, уйдя от жесткой тканеспецифичности. Остается обеспечить правильный процессинг пептида. Наиболее богаты по набору ферментов клетки печени. Но, как сегодня уже известно, далеко не все процессы идут одинаково в культуре клеток и в клетках, находящихся в составе организма [91]. Поэтому оценка функционирования имплантируемого гена инсулина была проведена в клетках печени интактного животного, у которого предварительно вызывали



стрептозотоциновый диабет. Такой подход необходим, поскольку для гена инсулина человека показано, что даже при внесении его в клетки опухоли островков Лангерганса мыши в культуре экспрессии вообще может не быть, в то время как после внесения этих же клеток с неэкспрессируемым геном животному, в них начинается синтез человеческого инсулина [92].

Вообще в случае исправления генного дефекта и генной компенсации функции требования, предъявляемые к проверкам по их адекватности задачам генной терапии, во многом различаются. Так, при классических наследственных болезнях принципиальная проверка функциональной активности рекомбинантных моле-

Рис. 7. Пути процессинга и транспорта препроинсулина и его производных

Fig. 7. Pathways of processing and transport of preproinsulin and its derivatives

кул в культуре клеток в высокой степени адекватна таковой в организме. Это объясняется самой природой подобных повреждений — нарушен только один конкретный ген в конкретном участке и конкретным образом, а все остальное в норме. В случае же массовых патологий ген, ослабленная функция которого является первопричиной болезни, не нарушен. А регуляция, обуславливающая такой эффект, неизвестна и может затрагивать и внутриклеточный, и организменный уровни. Поэтому экстраполяция результатов, полученных на культуре клеток, на клетки в составе организма куда менее определенная. И в этом — весьма существенное отличие уже первых этапов работ в направлениях генной терапии классических наследственных болезней и массовых патологий. Поэтому адекватная проверка в последнем случае возможна только *in vivo*.

В наших опытах установлено, что прямое введение гена инсулина человека в печень диабетической крысы приводит к весьма быстрому снижению количества глюкозы в крови, которое у некоторых животных возвращалось в норму. По времени наблюдаемое снижение совпадало с таковым при введении чистого инсулина. Это показывает принципиальную возможность парирования с помощью генной терапии диабета. Такой эффект и такая динамика дают основание полагать, что из

клеток печени в кровь поступает инсулин. Мы предполагаем, что здесь изменен порядок этапов созревания инсулина, при котором после синтеза препроинсулина происходит правильная укладка, затем отщепляется с-пептид, а затем уже форма, вообще не образуемая в β -клетках (условно ее можно назвать преинсулин: правильно собранные А- и В-цепи без с-пептида, но с препептидом), выводится благодаря препептиду через наружную клеточную мембрану, где он удаляется, а во внеклеточное пространство поступает функционально активный инсулин (рис. 7). При таком транспорте с-пептид вообще не будет выходить за пределы клетки.

Это — основополагающее решение и теперь следующий этап — достижение такого уровня трансформации клеток печени (или иных с аналогичными возможностями), при котором будет обеспечен требуемый и стабильный уровень продукта для компенсации диабета.

Принципиально решен вопрос и с генной терапией тех форм атеросклероза, при которых повышение уровня А1 может дать лечебный эффект. Ген А1 клонирован. Известна во многом его регуляция. Нами получены молекулярные конструкции, обеспечивающие его синтез в клетках, в которых ген А1 в обычном состоянии неактивен. Показано, что белок А1, синтезируемый в таких клетках, выходит из них в окружающую среду. Технически сложным может оказаться обеспечение необходимого уровня экспрессии. Однако, если повышение уровня А1 в крови больного не приведет к тому, что регуляция понизит уровень его синтеза в специализированных клетках, то компенсировать придется не граммы, а 100—300 мг в сутки, что обеспечить намного проще. Какими будут реальные процессы в организме, покажут специальные эксперименты. Но критический этап — введение гена А1 экспериментальным животным — успешно пройден. Показан не только факт синтеза белка А1 и его поступление в кровь, но и функциональная активность продукта, в результате чего резко изменился уровень холестерина. В дальнейшем планируется работа в направлении перехода от эффекта к терапии.

Таким образом, сегодня имеются хорошие предпосылки для генной терапии основных патологий человека. У нас разработана и апробирована система ведения и проверки молекулярных конструкций непосредственно в клетках заданной ткани или органа интактного животного, что полностью адекватно задачам генной терапии. Эта система отличается от известных опытов тем, что материал, во-первых, инъецируется непосредственно и локально в изучаемую ткань или орган, и, во-вторых, введение осуществляется на лабильных липосомах, быстро разрушающихся в кровяном русле, препятствуя попаданию материала в другие ткани и органы. Для двух массовых патологий — атеросклероза и диабета — показана принципиальная возможность осуществления синтеза на вводимом гене целевого продукта, выходящего из клеток-продуцентов и обеспечивающего расчетный эффект в организме.

В США над практической реализацией генной терапии уже работают фирмы Viagene, Genetics Therapy, Enzo Biochem. и др. [93—95]. И если удастся преодолеть пока очень высокий здесь психологический барьер и привлечь требуемые силы и средства, то уже в ближайшее время можно ожидать интересных и важных решений.

POSSIBILITIES OF GENE THERAPY FOR TREATMENT AND PREVENTION OF MASS PATHOLOGIES

V. A. Kordium

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev, USSR

Summary

The possibilities of gene therapy for treatment of basic mass human pathologies such as atherosclerosis, malignant neoplasms, infectious diseases and diabetes have been analyzed. The gene therapy is subdivided into two basic trends: 1) repair of gene defect;

2) gene compensation of function. The first trend is based on the precision replacement of a defective gene or its fragments and requires obligatory knowledge of lesion details. It is mostly implied in terms of gene therapy but refers almost exclusively to classic hereditary diseases caused by defects in gene structure. The second trend provides for the introduction of gene which should compensate for the reduced or generally altered function under specific regulation. In this case the knowledge of the specific gene defect responsible for the pathology is not obligatory. Since mass pathologies are mostly due to the defects caused by unknown damages in the expression regulation of the intact structural gene, they can be repaired via compensation of gene function. The general scheme of gene therapy of basic mass pathologies and the concrete variants for its elucidation have been proposed. Recent publications on gene therapy of basic mass pathologies have been reviewed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм В. А. Задачи и проблемы геновой терапии // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, 2. — С. 5—16.
2. Diamond J. M. AIDS: infectious, genetic or both? // Nature.— 1987.— 328, N 6127.— P. 199—200.
3. Abel L., Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean Island // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 42, N 2.— P. 255—266.
4. Jared D. Infectious, genetic or both? // Nature.— 1987.— 328, N 6127.— P. 199—200.
5. Goodfellow P., Stewart A. Human genetic disease — a new series in TIG // Trends Genet.— 1988.— 4, N 5.— P. 123—124.
6. Таревцова Р. В. Экологические проблемы развития народонаселения // Мед. география и экология человека.— М., 1987.— С. 39—54.
7. Rotter J. I., Diamond J. M. What maintains the frequencies of human genetic diseases? // Nature.— 1987.— 329, N 6137.— P. 289—290.
8. Mann D. M. The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease // Tech. Ageing and Dev.— 1988.— 43, N 2.— P. 99—136.
9. Seidegard J., Pero R. W. The genetic variation and the expression of human glutathione transferase μ // Klin. Wochenschr.— 1988.— 66, suppl., N 11.— P. 125—126.
10. Brown T. W. Premature aging syndromes // Clin. orient. Int. symp. Eur. soc. dermatol. res. (Oslo, Febr. 7—8, 1986).— Basel, 1987.— P. 152—165.
11. Berg K. Genetic variation in low density lipoprotein. Beginning of a new era? // Immunogenetics.— 1985.— 12, N 6.— P. 263—265.
12. Nei M., Saitou N. Genetic relationship of human populations and ethnic differences in reaction of drugs and food // Ethnic differ. react. drugs and xenobiotics: proc. meet. (Black Forest, Oct. 3—6, 1985).— New York, 1986.— P. 21—37.
13. Human cancer-prone disorders, abnormal carcinogen response, and defective DNA metabolism / M. S. Paterson, M. V. Middlestadt, M. Weinfeld et al. // Radiat. carcinogenesis and DNA alterations: proc. NATO adv. study inst. (Corfu, Oct. 7—20, 1984).— New York, London, 1986.— P. 471—498.
14. Güttler F. Diagnosis of inherited metabolic disorders by DNA analysis // Med. Lab. Sci.— 1985.— 42, N 4.— P. 326—332.
15. Blum A., Monnier A. La mortalité en Union Soviétique // Popul. et soc.— 1988.— N 223.— P. 1—4.
16. Fiolka L. Zu einigen Problemen der Geschlechtsunterschiede in der Sterblichkeit // Z. gesamte Hyg. und Grenzgeb.— 1988.— 34, N 8.— S. 447—449.
17. Which genes cause hyperlipidaemia and atherosclerosis? / S. Humphries, D. Wile, R. Taylor et al. // Biotech. RIA' 88: Mol. probes: technol. and med. appl.: proc. Int. symp. (Florence, Apr. 11—13, 1988).— New York, 1988.— P. 13.
18. Пенюк В. С. Современные молекулярно-клеточные основы липопротеидной теории атеросклероза.— М.: ВНИИМИ, 1987.— 68 с.
19. Croce C. M. Molecular genetics of human leukemias and lymphomas // AIOS Res. and Hum. Retroviruses.— 1987.— 3, Suppl. 1.— P. 229—234.
20. Specificity of proto-oncogene amplification in human malignant diseases / H. Masuda, H. Battifora, J. Yokota et al. // Mol. Biol. and Med.— 1987.— 4, N 4.— P. 213—227.
21. Friend S. H., Dryja T. P., Weinberg R. A. Oncogenes and tumor-suppressing genes // N. Engl. J. Med.— 1988.— 318, N 10.— P. 618—622.
22. Weinberg R. A. Finding the anti-oncogene // Sci. Amer.— 1988.— 259, N 3.— P. 34—41.
23. Nebert D. W., Gonzales F. J. P450 genes: structure, evolution, regulation and relationship to cancer // 621st meet. Biochem. Soc. (London, 17—19 Dec., 1986): Abstr.— London, 1986.— P. 33.
24. Kopelovich L. The transformed (initiated) human cell phenotype: study of cultured skin fibroblasts from individuals predisposed to cancer // Mutat. Res.— 1988.— 199, N 2.— P. 369—385.
25. Assignment of the GM-CSF, CSF-1, and FMS genes to human chromosome provides evidence for linkage of a family of genes regulating hematopoiesis and for their

- involvement in the deletion (5q) in myeloid disorders / M. M. le Beau, M. J. Pette-nati, R. S. Lemons et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1986.—**41**, pt 2.—P. 899—909.
26. Homozygous deletion of the α - and β -interferon genes in human leukemia and derived cell lines / M. O. Diaz, S. Ziemin, M. M. le Beau et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—**85**, N 14.—P. 5259—5263.
 27. International symposium hears promising news on TNF // Pract. Biotechnol.—1986.—**7**, N 12.—P. 3—4.
 28. Interaction fonctionnelle entre le TNF et l'IL-2 au de l'induction de l'activité cyto-toxique LAK / J. Blay, J. Bertoglio, F. Gay et al. // C. r. Acad. Sci. C.—1988.—**307**, N 2.—P. 47—51.
 29. Roche reveals interferon, IL-2 results // Biotechnol. News.—1988.—**8**, N 4.—P. 7.
 30. Recombinant interleukin-2 and antitumor therapy // Drug License Opport.—1988.—**10**, N 10.—P. 419.
 31. *Галюшова В.* Пилуля под ребро // Эконом. газета.—1988.—№ 36.—С. 19.
 32. Mandas R., Torino B., De Maria W. Infezioni virali e malattia diabetica // G. batteriol. virol. ed immunol.—1985.—**73**, N 1—6.—P. 60—69.
 33. A simple strategy to apply the HLA-DQB gene region with genomic DNA as template / F. Gu Xue, J. Elion, M. Quagned et al. // FEBS Lett.—1988.—**236**, N 1.—P. 23—26.
 34. Ikeda T., Lever A. M., Thomas H. C. Evidence for a deficiency of interferon production in patients with chronic hepatitis B virus infection acquired in adult life // Hepatology.—1986.—**6**, N 5.—P. 962—965.
 35. *Блюгер А. Ф., Векслер Х. М.* Новые аспекты вирусно-иммуногенетической концепции патогенеза вирусных гепатитов // Новое в гепатологии: методы, факторы, концепции.—Рига, 1988.—С. 15—40.
 36. Система интерферона при вирусном гепатите В / О. В. Паршина, Г. П. Савицкий, П. Н. Носик и др. // Вопр. вирусологии.—1988.—**33**, № 5.—С. 610—612.
 37. Serum 2',5'-oligoadenylate synthetase activity during interferon treatment of chronic hepatitis B / M. Shindo, T. Okuno, M. Matsumoto et al. // Hepatology.—1988.—**8**, N 2.—P. 366—370.
 38. Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 LI cells / J. S. Patton, H. M. Shepard, H. Wilking et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—**83**, N 21.—P. 8313—8317.
 39. Celus combines two anticancer products in human testing. Three related patents issue // Biotechnol. Law Rept.—1987.—**6**, N 4.—P. 289—290.
 40. *Chicolet Ch., Trepo C.* Virus et diabète insulinodépendant // Pathol. biol.—1988.—**36**, N 2.—P. 182—186.
 41. *Csonka E., Bauer P. I., Varadi G.* Viruses as risk factors in the pathogenesis of atherosclerosis // Pathol. Res. and Pract.—1987.—**182**, N 4.—P. 480.
 42. *Immunogenetik des Typ-1-(insulinpflichtigen) Diabetes mellitus / B. O. Boehm, W. A. Scherbaum, E. F. Pfeiffer, K. Schöfling* // Med. Klin.—1987.—**82**, N 12—13.—P. 439—442.
 43. *Бутенко Г. М., Зайченко А. П.* Роль возрастных изменений иммунитета в патогенезе атеросклероза // Вестн. АМН СССР.—1986.—№ 10.—С. 31—35.
 44. *INF* in murine systemic autoimmune lupus nephritis // Drug License Opport.—1988.—**10**, N 3.—P. 107.
 45. *Samid D., Friedman R. M.* Transcriptional regulation of *ras* by interferon // Interferons cell growth inhibitors and antitumor fact.: Proc. Schering corp. UCLA symp. (Colo, Apr. 6—12, 1986).—New York, 1986.—P. 413—422.
 46. *Verden A., Kimchi A.* Tumor necrosis factor reduces *c-myc* expression and cooperates with interferon- γ in HeLa cells // Science.—1986.—**234**, N 4782.—P. 1419—1421.
 47. *Krönke M., Schüter C., Pfizenmaier K.* Tumor necrosis factor inhibits MYC expression in HL-60 cells at the level of mRNA transcription // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—**84**, N 2.—P. 469—473.
 48. Gamma interferon regulates long terminal repeat-controlled oncogene expression in transformed mouse fibroblasts at the level of mRNA transcription / B. Seliger, G. Kruppa, R. Schafer et al. // J. Virol.—1988.—**62**, N 2.—P. 619—621.
 49. Stable reversion to non malignancy by long term interferon treatment of cells expressing the *c-mos* oncogene / J. Gerfaux, D. Sergiescu, M. Vignal et al. // Interferons cell growth inhibitors and antitumor fact.: Proc. Schering corp. UCLA symp. (Colo, Apr. 6—12, 1986).—New York, 1986.—P. 377—389.
 50. Altered gene expression in oncogene-transformed mouse cells persistently reverted by prolonged interferon treatment / S. Contente, K. Kenyon, D. Samid, R. M. Friedman // J. Cell Biochem.—1988.—Suppl. 12A.—P. 211.
 51. *Hosang M.* Recombinant interferon- γ inhibits the mitogenic effect of PDGF at a level distal to the growth factor receptor // Ibid.—P. 150.
 52. *Rosenthal J.* Aging and the cardiovascular system // Gerontologia.—1987.—**33**, Suppl. N 1.—P. 3—8.
 53. Effects of gamma interferon on collagen gene expression / M. J. Czaja, F. R. Weiner, M. S. Kirwin, M. A. Zern // Hepatology.—1986.—**6**, N 5.—P. 1199.
 54. *Yukagawa H., Kitagawa H., Aikawa Y.* Tumor necrosis factor stimulates gelatinase and collagenase production by granulation tissue in culture // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1987.—**142**, N 3.—P. 791—797.

55. *Interferon- α* and interferon- γ reduce excessive collagen synthesis and procollagen mRNA levels of scleroderma fibroblasts in culture / V. Kähäri, J. Heine, T. Vuoro, E. Vuoro // *Biochim. et biophys. acta.*— 1988.— 968 (C22), N 1.— P. 45—50.
56. Мягкая Н. П., Гюллинг Э. В., Ганджа Н. М. Возрастной Т-иммунодефицит и атеросклероз // Геронтология и гернатрия: иммунитет и старение.— Киев, 1987.— С. 103—110.
57. DNA fragmentation in targets of CTL: an example of programmed cell death in the immune system / J. J. Cohen, R. C. Duke, R. Chervenak et al. // *Mech. cell-mediated cytotoxicity II: Proc. 2 Int. workshop (Annapolis, Md, June 10—13, 1984).*— New York: London, 1985.— P. 493—506.
58. Tracking of high- and low-density lipoprotein cholesterol from childhood to young adulthood in a single large kindred with familial hypercholesterolemia / M. J. Mellies, P. M. Laskarzewski, T. Tracy, C. J. Glueck // *Metabolism.*— 1985.— 34, N 8.— P. 747—753.
59. Romics L. The role of HDL in the pathogenesis of arteriosclerosis // *Fat Sci.*, 1983: Proc. 16th ISF Congr. (Budapest, 4—7 Oct., 1983).— Budapest, 1985.— Pt B.— P. 819—824.
60. High-density lipoprotein cholesterol and its protective role against the development of coronary heart disease in Japanese diabetics / A. Sasaki, K. Matsumiya, M. Arao et al. // *J. Jap. Diabet. Soc.*— 1984.— 27, N 10.— P. 1067—1074.
61. Особенности нарушения иммунологической реактивности у больных ишемической болезнью сердца пожилого и старческого возраста / Г. Д. Горб, И. В. Грушко, Ю. П. Жданюк, Т. Е. Маковская // Эпидемиол., клин. биохим. и соц. аспекты долгожительства в Сибири: Тез. докл. Сиб. конф. (Новосибирск, 23 янв., 1987).— Новосибирск, 1986.— С. 37—38.
62. Paradoxical increase in low density lipoprotein uptake by freshly isolated lymphocytes from the elderly / K. N. Traill, G. Jürgens, G. Böck, G. Wick // *Age.*— 1987.— 10, N 3.— P. 111.
63. Patsch W., Gotto A. M., Patsch J. R. Effects of insulin on lipoprotein secretion in rat hepatocyte cultures // *J. Biol. Chem.*— 1986.— 261, N 21.— P. 9603—9606.
64. Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells / M. Kawakami, T. Murase, H. Ogawa et al. // *J. Biochem.*— 1987.— 101, N 2.— P. 331—338.
65. Use of tumor necrosis factor as a weight regulator / J. W. Larrick, G. M. Ringold, D. F. Mark et al. // *Biotechnol. Adv.*— 1987.— 5, N 1.— P. 191.
66. Le TNF a la chasse aux kilos? // *Biofectur.*— 1987.— N 57.— P. 11—12.
67. Recombinant interferon- γ induces interleukin 2 receptors on human peripheral blood monocytes / W. Holter, R. Crunow, H. Stockinger, W. Knapp // *J. Immunol.*— 1986.— 136, N 6.— P. 2171—2175.
68. TNF stimulates tumor growth // *Drug License Opport.*— 1988.— 10, N 8.— P. 311.
69. Alpha interferon in human pregnancy / T. Chard, P. H. Craig, M. Menabawey, C. Lee // *Brit. J. Obstet. and Gynaecol.*— 1986.— 93, N 11.— P. 1145—1149.
70. A sensitive radioimmunoassay for alpha-interferon: circulating α -interferon-like substance in the plasma of healthy individuals and rheumatoid arthritis patients / S. Shiozawa, K. Chihara, K. Shiozawa et al. // *Clin. and Exp. Immunol.*— 1986.— 66, N 1.— P. 77—87.
71. Serum interferon concentrations and retroviral serology in Kawasaki syndrome / A. H. Rowley, S. T. Shulman, O. T. Preble et al. // *Pediatr. Infect. Disease J.*— 1988.— 7, N 9.— P. 663—666.
72. Gerami A., Beutler B. Cachectin: the dark side of tumor necrosis factor / *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*— 1986.— 51, pt 1.— P. 625—629.
73. A phase I clinical trial of recombinant DNA gamma interferon / T. D. Brown, J. Koeller, K. Beougher et al. // *J. Clin. Oncol.*— 1987.— 5, N 5.— P. 790—798.
74. Retrovirus infected skin cells deliver drugs // *Biotechnol. News.*— 1988.— 8, N 13.— P. 5.
75. Leslie R. New targets for human gene therapy // *Science.*— 1988.— 241, N 4868.— P. 906.
76. Miller A. D., Adam M. A., Osborne W. R. Retrovirus-mediated gene transfer into human skin fibroblasts // *Viral Vectors: Conf. (Cold Spring Harbor, March, 1988).*— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1988.— P. 122—126.
77. Palca J. Gene transfer to humans approved in face of advice // *Nature.*— 1988.— 335, N 6191.— P. 577.
78. Joyce C. Americans plan gene therapy on people // *New Sci.*— 1988.— 119, N 1624.— P. 24.
79. Askonas B. Vector-directed interleukin expression and infection // *Nature.*— 1987.— 330, N 6145.— P. 206.
80. Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma / R. A. Ezekowitz, M. S. Dinauer, H. S. Jafee et al. // *N. Engl. J. Med.*— 1988.— 319, N 3.— P. 146—151.
81. In vivo effects of interleukin 2 on lymphocyte subpopulations in a patient with a combined immunodeficiency / R. Dopfer, D. Niethammer, H. H. Peter et al. // *Immunobiology.*— 1984.— 167, N 5.— P. 452—460.
82. Faist E., Ertel W., Mewes A. Möglichkeiten der Immunmodulation bei chirurgischen Patienten // *Allergologie.*— 1988.— 11, N 9.— S. 344—353.
83. Altered interleukin production during Friend leukemia virus infection / M. Lopez-Ce-

- pero, S. Specker, D. Matteucci et al. // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.—1988.—188, N 3.—P. 353—363.
84. *Antitumor* activity of regional lymph node lymphocytes in patients with lung cancer / H. Yaita, K. Yasumoto, A. Nagashima et al. // J. Surg. Oncol.—1988.—38, N 3.—P. 165—172.
 85. *Hartwig M.* Restauration des Immunstatus durch Interleukin-2 // Alternforsch.—1988.—43, N 3.—S. 133—136.
 86. *Interleukin-2* and aging: decreased interleukin-2 production in healthy older people does not correlate with reduced helper cell numbers or antibody response to influenza vaccine and is not corrected *in vitro* by thymosin α_1 / W. B. Ershler, A. L. Moore, K. Roessner, G. E. Ranges // Immunopharmacology.—1985.—10, N 1.—P. 11—17.
 87. *Изучение* экспрессии экзогенного гена инсулина человека, находящегося под контролем регуляторной зоны *hsp70* гена дрозофилы в фибробластах человека / Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, И. С. Варзанова, В. А. Кордюм // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 1.—С. 88—91.
 88. *Shennan K. I., Docherty K.* Expression of normal and mutant human pre-pro-insulins in *Xenopus* oocytes // Biochimie.—1988.—70, N 1.—P. 99—107.
 89. *Исследование* возможности экспрессии экзогенного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах млекопитающих / Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, Б. М. Трояновский и др. // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 58—61.
 90. *Экспрессия* гена инсулина в культивируемых клетках млекопитающих / Л. Л. Лукаш, Л. Н. Неборачко, Е. М. Сухорада и др. // Там же.—1990.—6, № 1.—С. 82—87.
 91. *Introns* increase transcriptional efficiency in transgenic mice / R. L. Brinster, J. M. Allen, R. R. Behringer et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 3.—P. 834—840.
 92. *Tissue-specific* expression of transfected human insulin genes in pluripotent clonal rat insulinoma lines induced during passage *in vivo* / O. D. Madsen, C. Andersen, B. Michelsen et al. // Ibid.—N 18.—P. 6652—6656.
 93. *Enzo Biochem.* (New York, NY) working on method of gene therapy to inhibit growth of viruses // Appl. Genet. News.—1987.—8, N 1.—P. 8—9.
 94. *Corcoran E.* Gene therapy in gestation. Three companies hope to turn it into medical reality // Sci. Amer.—1988.—259, N 5.—P. 98—98B.
 95. *Two* US companies move into gene therapy // Drug License Opport.—1988.—10, N 3.—P. 104.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 16.05.89

УДК 616-092.612.6.05:575.113.1:577.21

В. С. Гайцхоки

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ПРОБЛЕМЫ ИХ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В работе рассмотрены современные представления о первичных механизмах, лежащих в основе недостаточности белков — генных продуктов при ряде моногенных наследственных заболеваний. Проведен анализ молекулярных основ генетической и фенотипической гетерогенности моногенных болезней, которая может быть обусловлена разнообразными внутри- или внесгенными мутациями, вызывающими полные либо частичные блоки экспрессии генов на различных уровнях этого сложного и многоступенчатого процесса (нарушения информационной специфичности кодирующих последовательностей гена, недостаточность транскрипции, блоки созревания мРНК, трансляционная недостаточность мРНК, генетически детерминированные блоки созревания и внутриклеточного перемещения белков). Проблема генной терапии наследственных болезней обсуждается в связи с их генетической и фенотипической гетерогенностью.

В основе быстрого накопления информации о молекулярной природе генных дефектов, приводящих к фенотипическим проявлениям наследственной патологии, лежит развитие арсенала методических подходов, дающих возможность сравнительного структурного и функционального анализа нуклеотидных последовательностей нормальных и мутантных генов и аномалий их экспрессии в модельных (клеточных и бесклеточных) системах. В литературе имеется ряд обзоров, в которых описана общая стратегия исследования мутантных генов как после их клонирования в бактериальных векторах, так и непосредственно в составе геномной ДНК, а также — ДНК-зондовой диагностики наследственных болезней [1—5]. В задачи нашего сообщения входит, в основном, рассмотрение молекулярных основ, обусловленных недостаточностью экспрессии генов, их гетерогенности на уровнях генных мутаций