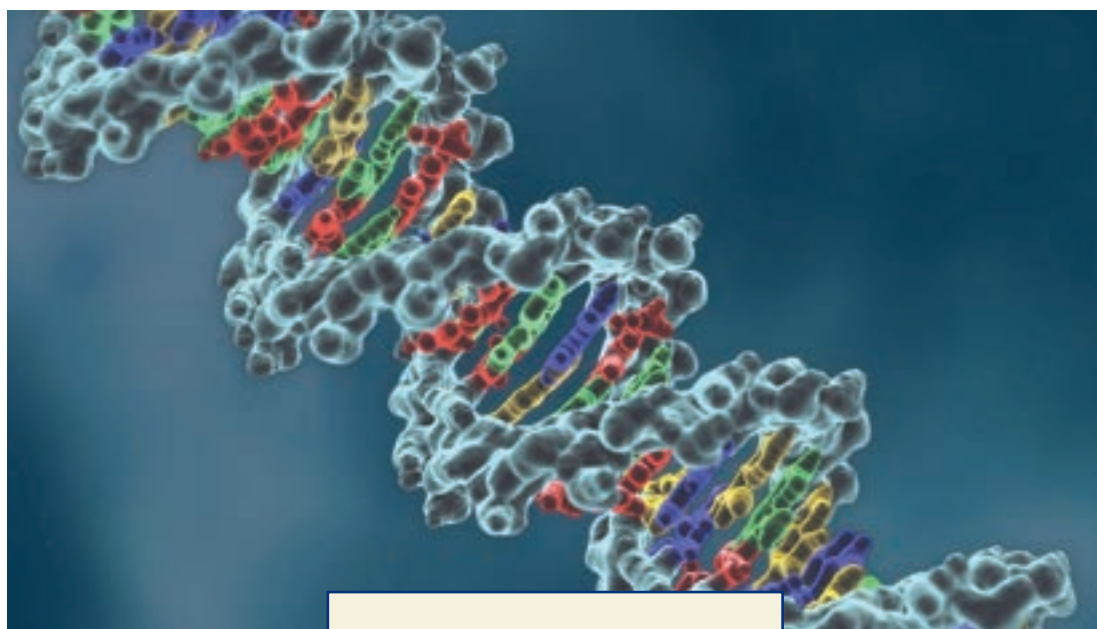


Генна терапия: какво е дала и какво ни обещава

Илия Пашев



Няма съмнение, че осъществяването на подобни очаквания ще революционизира медицината, защото се отстранява непосредствената причина на заболяването, а не се следва класическата практика за борба със симптомите му. По-нататъшният напредък

Същността на генната терапия е въвеждане на функционален ген в клетките на пациент с цел да се коригират вродени грешки на метаболизма, да се променят или поправят придобити патологични промени в ДНК, както и да се придобие нова функция на клетката.

в изясняването на молекулните основи на дадено заболяване, от една страна, и от

друга – увеличаване ефикасността на доставка на гените на желаното място заедно с контрола на експресията им, ще стимулират обособяването на генната терапия в самостоятелна клинична дисциплина. И още нещо – обвързаността на генната терапия с напредъка в

молекулярната биология е гаранция както за самия преход, така и за успешното ѝ бъдещо

развитие. Генното инженерство и техниките за пренос на гени са в основата на много нови идеи за лечение на генетични болести. Голяма част от тях са успешно приложени в клетъчни култури и дори в миши модели на човешки болести. Пренасянето им в клиничната практика обаче е друго ниво и постигането му е изключително трудно.

Най-общо генната терапия е подход за корекция на различни по произход генетични отклонения. Най-често тя се осъществява чрез въвеждане в клетките на организма на здраво копие на дефектния ген. Това предполага изчерпателни изследвания, които с максимална точност да покажат същността на болестното отклонение на ниво ДНК, така че в крайна сметка да се осъществи правилният избор на терапевтичната манипулация.

За да избегна неточни тълкувания и увлечения, още в началото ще отбележа, че **генната терапия не е класическа терапия и никъде в света не се предписва**. Всъщност всички лекувани пациенти са част от клинично изпитване, като включването им в него е строго мотивирано. Генната терапия има за цел да замени болестно изменените изяви на организма с физиологични. Какъв генетичен материал е необходим, в кои клетки се намира и как точно трябва да се ползва зависи от самото заболяване и съответната технология.

Концепцията за генната терапия се ражда през 1972 г. в резултат на солидна база от експериментални резултати и от неудържимата готовност за прехвърляне на проучванията върху хора. Нетърпението от осъществяването на подобно „превключване“ в експерименталния подход и неустойчивото лично желание за първи пробив върви заедно с непрекъснатото покачване на изискванията към него. В резултат, 18 години по-късно Федералната служба на САЩ за продоволствена и лекарствена администрация одобрява първия в света протокол за експеримент по генна терапия в САЩ. Целта е да се узакони приложението на вече разработен протокол за спешно започване на лечение на 4-годишна пациентка, страдаща от остра имунна недостатъчност. Става дума



Акад. Илия Пашев е меник по образование, а научната му дейност е преминала почти изцяло в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ на БАН. Проучва състава и структурата на хроматина по време на транскрипция. Въвежда оригинален метод за фиксиране на белтък-ДНК взаимодействия чрез облъчване с високочестотен УВ лазер. С този метод изследва свойствата на определени белтъчни фактори на хроматина, като показва критичната роля на след-синтезните им промени.

за фамилно наследствено заболяване с неизбежен фатален изход. Няколко сестри от тази фамилия умират много скоро след раждането си и лечението се предприема за последната все още жива. След отстраняване на част от черния гроб пациентката остава на операционната маса, промиват изрязаната част през долната куха вена, изолират хепатоцитите (истинските чернодробни клетки) и ги трансформират по определена процедура с вкарване на липсващия ген. По време на всички тези манипулации пациентката продължава да е на операционната маса. След контролен експеримент, който показва, че трансформацията е успешна, започва една вълнуваща сага с по-нататъшното прилагане на протокола. Крайният резултат е повече от добър и от информацията, която имам, пациентката бе жива и здрава до преди 5 – 6 години.

Най-често прилаганата форма на генна терапия представлява въвеждане в клетките на ДНК-последователност, кодираща функционален терапевтичен ген, който да замести мутантен или липсващ ген (примерът по-горе). Други форми включват пряко поправяне на мутация или използване на ДНК, която кодира интересувания ни белтък. Във втория случай ДНК е пакетирана в структура, наречена вектор, чиято роля е да пренесе ДНК до клетките на пациента. Там тя се „поема“ от клетъчната машина-

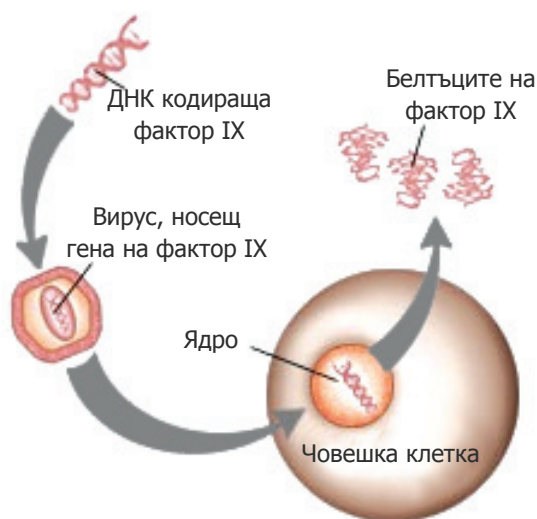


Схема на генна терапия, която използва аденовирус за внасяне в клетката на определен ген. Ако манипулацията е успешна, той ще произвежда съответния функционален белтък (в случая кръвосъсирващия фактор IX)

рия и в резултат се получава терапевтичният белтък, който на свой ред атакува заболяването на пациента.

Въпреки че посочената технология е в съвсем начален етап, тя вече е използвана с известен успех и дава надежда за успешно придвижване напред. Първата стъпка е въвеждането на гена директно в човешки клетки при заболявания, причинени от дефект в единичен ген (хемофилия, мускулна

дистрофия, сърповидно-клетъчна анемия, хронична миелогенна левкемия). Този подход за пряко внасяне на ДНК е далеч по-деликатен и труден от използването на модифицирани бактерии. Причината е в проблемите, произтичащи от пренасянето на големи фрагменти от ДНК и насочването им към коректното място върху сравнително голям геном.

Понастоящем изследванията на генната терапия са насочени основно към раковите заболявания и наследствени болести, дължащи се на генетичен дефект. Въпреки че ранните неуспехи на генната терапия в клиниката внесоха елемент на несигурност и колебание у много учени и лекари, клиничните успехи в периода 2006 – 2011 г. върнаха ентусиазма и оптимизма към обещанията на генната терапия. Конкретният повод бе успешното лечение на пациент с болест на ретината, известна като конгенитална амавроза на Leber, очно заболяване с честота около 1 случай на 80 000 души.

Когато даден ген се внесе директно в клетката, обикновено той не работи. Този момент се преодолява с използването на синтетичен ДНК-носител („вектор“), който пренесе гена до определено място в ДНК. По принцип най-подходящите вектори са определени вируси, поради факта, че те това си знаят и това могат да правят: естественото им предназначение е да инфектират клетките със своя генетичен материал. Вирусите са предварително модифицирани, за да не предизвикат заболяване в човека, където се внасят. Някои типове вируси (например ретровирусите) интегрират новия ген в собствения им генетичен материал, който след това се насочва към хромозома на клетката-реципиент. Други вируси (аденовирусите) въвеждат тяхната ДНК в ядрото на клетката, но тази ДНК не се включва в хромозома. Когато се ползва аденовирус, новият ген се инжектира в аденовирусния вектор и това е пътят за въвеждане на модифицираната ДНК в човешката клетка. При успешна интеграция новият ген ще произвежда съответния функционален белтък. Има и невирусни методи: въвеждане на пречистена плазмидна ДНК, ДНК-липидни

липозоми, електропорация, химическо разрушаване на клетки с калциев фосфат, „бомбардиране на частици“ („gene gun“) – златни микрочастици, покрити с ДНК.

В крайна сметка двете са ограниченията, които трябва да преодолеят стратегиите за генна терапия на човешките болести: въображението на учените и наличните към даден момент технологии.

Ето съвсем накратко основните моменти в развитието на генната терапия.

1970 г. Всичко започва, след като бе показано, че при болни с генетични дефекти екзогенна пречистена ДНК може да замести дефектна ДНК. Оттук нататък отпочва неговото на клиничните изпитания изисква одобрението на значителен брой инстанции, които трябва да покажат, че процедурите са действително безопасни.

1990 г. Първият случай на разрешена генна терапия се осъществява в САЩ на 14 септември 1990 г. в Националния институт по здравето на САЩ (National Institutes of Health, NIH) на пациентка с тежко увреждане на имунната система поради пълна липса на ензима аланиндезаминаза. Ефектът е временен, но успешен. По-нататък, през 1992 г. в Милано, Италия, е извършена първата процедура по генна терапия с използването на хемопоетични стволови клетки като вектори за внасяне на гени за корекция на наследствени болести.

1999 г. бележи първия смъртен изход след генна терапия в САЩ и NIH суспендира няколко разрешения за подобни протоколи.

2003 г. Пренос на гени в мозъка с помощта на липозоми, покрити с полиетилен гликол. Това е изключително постижение, тъй като вирусните вектори са твърде големи, за да преминат през кръвно-мозъчната бариера. Очаква се приложението му в лечението на болестта на Паркинсон.

2006 г. В NIH е осъществено първото лечение на метастази от меланом по специален метод с използването на Т-клетки (тип бели кръвни клетки, известни още като лимфоцити). Те са част от имунната система и отстраняват клетки, инфектирани с вируси и бактерии. Това е първата демонстрация за приложение на генната

терапия при рак. Успешно са излекувани и двамата възрастни пациенти от заболяване, увреждащо миелоидната система. През същата година е отбелязан и още един забележителен успех, свързан с внасянето на гени. Мисълта ми е, че принципно този процес е обречен, тъй като имунната система разпознава внесените гени като чужди и отхвърля клетките, които ги носят. Проблемът се решава с помощта на т.нар. микроРНКи, които избирателно премахват идентичността на техните терапевтични гени в клетките на имунната система и така опазват гена от възможността да бъде намерен и унищожен. Тази работа се очаква да получи широко приложение при лечението на хемофилия.

2007 г. Представена е първата в света генна терапия за наследствено заболяване на ретината (болестта на Leber) с подчертано позитивни резултати и без странични ефекти.

2010 г. Френски пациент е излекуван от бета-таласемия. По специална методика пренасят човешки бета-глобинов ген в пречистена кръв и в мозъчни клетки от пациента. Между 21 и 33 месеца след трансплантацията количеството на вектор-съдържащите клетки в кръвта му постепенно нараства и 18-годишният пациент няма нужда от трансфузия. Нивата на хемоглобина му са стабилни от 9 до 10 г на децилитър и около 1/3 от хемоглобина му съдържа формата, въведена с вирусния вектор. По този начин клиничното лечение е прието за успешно по целия свят.

2011 г. През август при двамата от трима души, подложени на пилотно изследване, се потвърждава излекуване от хронична лимфоидна левкемия. Изследователите са от Университета в Пенсилвания и са използвали генетично модифицирани Т-клетки.

Естествено, генната терапия има своите проблеми, а те са много и от различен характер. На първо място, скъсено действие на терапията. За да започне лечение с генна терапия, внесената ДНК трябва да остане функционална и клетките, които я съдържат, трябва да живеят дълго. Проблеми с интегрирането на ДНК в генома и

наличието на бързодейщи се клетки не позволяват дългосрочен ефект. Има значение и имунният отговор: в някои случаи стимулирането на имунната система намалява терапевтичния ефект. От значение са някои свойства на вирусните вектори: токсичност, имунни и възпалителни прояви. И нещо много важно: при работа с вирусни вектори винаги има опасност от реактивацията им и причиняване на заболяване. Не се изключва и възможността от причинява-

не на тумор (инсерционна мутагенеза).

Съществен момент в оценката на генната терапия е смъртността при приложението ѝ. Досега са известни 3 случая. Първият е през 1999 г., който звучи и като неин основен провал. Обяснение все още няма, но важното е, че не се свързва пряко с терапията. Вторият случай е от 2003 г. – пациент с остър имунодефицит развива много бързо левкемия непосредствено след терапията. Най-вероятното обяснение е, че при инте-



Рик Еванс (в средата) успешно е излекуван на 10-месечна възраст чрез генна терапия (2001 г.)

грацията на внесения ген той е попаднал в онкоген и е последвала активацията му. Третият случай е през 2007 г. – пациент с ревматоиден артрит умира от инфекция след генната терапия, но последващото изследване не намира връзка на причината за смъртта с терапията.

Обсъждайки генната терапия и доброто, което може да донесе на болния човек, си спомних нещо, за което прочетох в *National Geographic* (BG, март 2011), под заглавието „Голямата идея“. Тя няма нищо общо с ген-

ната терапия, но също обещава сериозни лечебни ефекти. Наричат я „възраждане“, „отглеждане“ на органи (бъбрек, ухо, челюст и т.н). Показана е и илюстрация на дейностите, за да се стигне до целта. Всъщност създава се „биоизкуствен“ орган, който се отглежда от клетки на пациента. До 2011 г. вече 30 души са получили лабораторно създаден пикочен мехур (логично е кухите органи да се правят най-лесно), като се очакват и други изкуствено проектирани органи. ■

Калифорнийска змия се засели на Канарските острови

През последните 2 – 3 години няколко испански научни списания потвърдиха окончателно новината, че на Канарските острови и по-специално на Гран Канария трайно се е заселил и добре адаптирал към местните климатични условия нов нежелан нашественик – калифорнийската кралска змия (*Lampropeltis getula californiae*). Предполага се, че тя е внесена неизвестно кога от местни любители на екзотични животни, които са „изпуснали“ или нарочно изхвърлили в природата нежелани екземпляри от този вид. Оказало се обаче, че местните климатични условия, наличието на достатъчно храна и благоприятни условия за размножаване допаднали на калифорнийската кралска змия и тя бързо започнала да увеличава числеността си на острова.

Калифорнийската кралска змия е от семейството на смоците (Colubridae). Нейната родина е Калифорния и част от Северно Мексико и тя доскоро се смяташе за локален ендемит само в този район на американския континент. Не е отровна, а и размерите ѝ са скромни и подобни на европейските представители на семейството, достига средно до 1,20 – 1,50 м, а отделни екземпляри – и до 2 м. В родината си се среща в различни местообитания и не причинява особени неприятности както на хората, така и на биологичното разнообразие и екологичното равновесие, установено от векове. Там тя има естествени врагове и конкуренти, които поддържат сравнително постоянна численост на популацията ѝ. Среща се от морското равнище до около 2100 м в планинските райони на Сиера Невада, Северозападно Ню Мексико, планините Техатчапи, Югозападно Колорадо и други близки райони. Характерно за калифорнийската кралска змия е, че в различни местообитания се срещат различно оцветени екземпляри и популации – от черни индивиди с бели препаски до яркочервени или напълно безцветни, почти албиноси индивиди. Друга важна особеност на калифорнийската змия, която е добавила към името ѝ прилагателното „кралска“, е, че тя е безстрашен ловец и се храни и с различни други по-дребни от нея змии, включително и отровни. Хранителният ѝ спектър е много широк и обхваща главно гризачи, но охотно лови и поема и гущери, земноводни и



птици. Въпреки че е от семейството на смоците, калифорнийската кралска змия лови, силно стяга и задушават жертвите си, подобно на големите змии удушвачи като анакондата и боата. Размножава се един път годишно, като снася на слънчеви и сухи места от 5 – 12 яйца, които се излюпват за 40 – 65 дни в зависимост от температурата на средата.

Именно тези особености и главно хранителните ѝ предпочитания и завиден апетит определят калифорнийската кралска змия като нежелан инвазивен вид за Канарските острови и за южноевропейските средиземноморски страни, ако видът разшири отново ареала си. В подробно изследване, публикувано в Бюлетина за инвазивните видове на Международния съюз за защита на природата (IUCN) Мигел Кабрера-Перез и кол. (Miguel Cabrera-Perez) посочват, че за о-в Гран Канария калифорнийската кралска змия е вече „значителен екологичен проблем“ поради зачестилите социални реакции от местното население и вредите върху биологичното разнообразие на острова. Само за периода от 2007 до 2011 г. на острова са уловени 1064 змии и те вече притесняват в голяма степен както местните жители, така и туристите на острова. От ноември 2011 г. е въведена строга забрана за търговия или пренасяне на живи и умрели змии както на територията на Гран Канария, така и на съседните острови от архипелага, и се насърчава улавянето и намаляването на числеността на вида на острова. Използват се и специално обучени кучета търсачи, както и различни капани, уловки и други средства за борба с новия нашественик, но успехът засега е непрегсказуем.

По Scientific American