

57. British Thoracic Society, National Asthma Campaign, Royal College of Physicians of London, et al. The British guidelines on asthma management: 1995 review and position statement. *Thorax* 1997; 52 (suppl.1): S1—S21.
58. Bateman E.D., Bousquet J., Braunstein G.L. Is overall asthma control being achieved? A hypothesis-generating study. *Eur. Respir. J.* 2001; 17: 589—595.

59. Nielsen L.P., Pedersen B., Faurschou P. et al. Salmeterol reduces the need for inhaled corticosteroid in steroid dependent asthmatics. *Respir. Med.* 1999; 93 (12): 863—868.
60. Clark N., Jones P., Keller S., Vermeire P. Patient factors and compliance with asthma therapy. *Ibid.* 856—862.

Поступила 26.06.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК [616.24-003.4-004]-085.234

В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко, П.Б. Глазков

ПРОБЛЕМЫ И ДОСТИЖЕНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ МУКОВИСЦИДОЗА

Институт акушерства и гинекологии им.Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург

Согласно современным представлениям генную терапию (ГТ) понимают как введение нуклеиновых кислот в клетку с целью воздействия на медицинский статус организма и/или лечения болезни (*Kay и соавт.*, 1997). Существенно, что при этом сам ген уже воспринимается как новый фармацевтический препарат для лечения не одного, а многих заболеваний, причем не только моногенных, но и мультифакториальных, и любых других патологических состояний.

Естественно, что подобную перспективу вполне оценивают многие ведущие фармацевтические фирмы, затраты которых на ГТ только в 1997 г. составили около 181 млн долларов, а в 1998 г. — почти 250 млн долларов (*Moelling, 1998*). При этом финансирование исследований, равно как и многие другие показатели, касающиеся состояния ГТ в мире, безусловно, смещены в сторону США. Так, согласно информации на сентябрь 1999 г. английского издательства *Уайли и К⁰* 310 из 396 одобренных для клинических испытаний проектов ГТ выполняются в США и только 68 — в Западной Европе (Франция, Великобритания, Италия, Германия и др.). К сожалению, ни одного сколько-нибудь продвинутого и официально утвержденного генно-терапевтического проекта клинических испытаний в России или в странах СНГ пока не существует. Следует также отметить, что из 396 проектов 261 (65,9%) еще находится на фазе I клинических испытаний (оценка токсичности генной конструкции); 133 — между фазами I/II (ограниченные испытания на небольшом контингенте больных) и только 2 проекта, касающиеся лечения опухоли мозга — глиобластомы, на фазе III (широкомасштабные клинические испытания в нескольких центрах). Вместе с тем по справедливому замечанию одного из пионеров ГТ американского исследователя Фрэнча Андерсона “за исключением нескольких непроверенных случаев, ни один из протоколов ГТ пока не оказался успешным в лечении болезней человека” (*Anderson, 1998*).

Решающие успехи в области биотехнологии и молекулярной биологии, в частности в изучении гена *CFTR*, позволили начать широкомасштабные исследо-

вания по разработке генно-инженерных подходов с целью лечения муковисцидоза (МВ). Исследования в этом направлении ведутся особенно интенсивно в наиболее передовых западных странах (США, Великобритания, Франция). Так, например, в США и Великобритании существуют утвержденные протоколы клинических испытаний по генетической терапии МВ, в которых задействованы более 180 пациентов. При этом только в 1999 г. на клинические испытания по генной терапии МВ затрачено более 50 млн долларов!

Хотя при МВ поражены многие органы, смертельный исход в 90—95% случаев наступает вследствие поражения легких. Поэтому именно они являются главным объектом генной терапии этого заболевания. Очевидно, что если раньше начать лечение МВ, то ожидаемый эффект будет выше. На сегодняшний день существует мнение, что оптимально начинать лечение еще до появления первых симптомов МВ, т.е. возможно еще внутриутробно либо на начальных стадиях проявления заболевания.

Одной из важных стратегий в генной терапии легких при МВ является целенаправленная доставка гена в наиболее пораженные участки дыхательного пути. Наличие пробок слизи в дыхательном эпителии при МВ уменьшает эффективность использования аэрозольного способа доставки гена в дыхательные пути, хотя этот способ введения считается оптимальным при доставке генетических конструкций в легкие.

Как известно, дыхательный эпителий обладает комплексом серьезных естественных барьеров, препятствующих проникновению введенного чужеродного материала, включая как вирусные, так и не вирусные носители. К таким барьерам можно отнести: 1) слой слизи, способный задерживать введенные через дыхательные пути генные комплексы. Следует отметить, что слизь у больных МВ более густая за счет нарушения транспорта ионов Cl^- ; 2) гликокаликс, препятствующий достижению генетическим конструкциям бедной рецепторами апикальной мембраны эпителиальных клеток; 3) “плотные контакты” (*tight junctions*) между клетками дыхательного эпителия, непроницаемые для ком-

плексов, несущих генетические конструкции (Walters и соавт., 1999; Wang и соавт., 1998); 4) эндосома, в которую комплекс ДНК — носитель попадает в результате эндоцитоза и где происходит его разрушение литическими ферментами лизосом; 5) ядерная мембрана (Zabner и соавт., 1995; Turner и соавт., 1996); 6) иммунная система, продуцирующая нейтрализующие антитела к белкам наружной оболочки вирусов (Zabner и соавт., 1996).

Таким образом, для достижения эффективной генной трансфекции эпителиальных клеток легких *in vivo* должны быть преодолены внеклеточные барьеры, осуществлена доставка вектора в цитоплазму и обеспечена последующая транспортировка генетической конструкции в ядро.

Не менее важным является вопрос уровня генетической трансфекции, необходимого для фенотипической коррекции хлорных каналов. На сегодняшний день известно, что 5% уровня экспрессии гена *CFTR* уже достаточно для 50% восстановления нормального транспорта ионов Cl^- (Dorin и соавт., 1996).

Проблема доставки *CFTR*-гена в эпителиальные клетки с целью получения правильной дозы необходимого белкового продукта, дающего терапевтический эффект, до настоящего времени не решена и по сути продолжает оставаться центральной проблемой во всех проектах по генной терапии. Трудность достижения этой цели, по образному выражению Фрэнча Андерсона, определяется тем, что “организм человека затратил много тысяч лет, чтобы защитить себя от нападения факторов внешней среды, в том числе от чужеродной ДНК, пытавшейся проникнуть в его геном” (Anderson, 1998). Естественно, что преодоление этих барьеров является одной из важных проблем на пути к успешной ГТ МВ.

В опытах по генотерапии МВ широко используются как вирусные, так и невирусные векторы, а также комбинированные векторы: аденовирус-полилизин, ДНК-комплексы, аденовирусы, комплексы аденовирусов и поликатионов, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, липосомы и даже “голые” плазмиды.

В настоящее время вирусопосредованный перенос считают наиболее эффективным способом доставки ДНК в клетки млекопитающих *in vivo*. Наиболее часто используют аденовирусы и аденоассоциированные вирусы, однако, несмотря на высокий уровень трансфекции эпителиальных клеток, использование подобных конструкций имеет ряд ограничений, а именно: дозозависимый иммунный ответ и непродолжительная экспрессия введенного в эпителий дыхательных путей гена. Кроме того, существует риск рекомбинации со штаммом “дикого типа”, что может привести к восстановлению способности к репликации вируса, введенного человеку.

Смерть 18-летнего пациента Д.Гельсингера после введения аденовирусной конструкции с целью лечения наследственного метаболического дефекта в октябре 1999 г. в США резко стимулировала интерес к более безопасным невирусным носителям.

Невирусные способы доставки ДНК в клетки млекопитающих являются альтернативой вирусопосредо-

ванному переносу. Отсутствие иммунного ответа на невирусные комплексы ДНК — носитель является одним из преимуществ использования невирусных способов доставки ДНК по сравнению с вирусными. К основным недостаткам этого способа доставки на данный момент остается низкая эффективность трансфекции *in vivo*, что существенно ограничивает применение их в экспериментах по генной терапии. Для решения данной проблемы используют модифицированные липосомные векторы, обладающие признаками вирусных частиц и сохраняющие в то же время положительными свойствами липосом.

В нашей стране эксперименты по разработке научных подходов генной терапии МВ проводятся в Лаборатории пренатальной диагностики НИИ АГ им. Д. О. Отта РАМН в контакте с Отделом генетики и клеточной биологии Университета Эразма Роттердамского (Роттердам, Голландия), с Группой по генной терапии муковисцидоза Brompton Hospital (London), а также с Ассоциацией по муковисцидозу Франции и Лабораторией по генной терапии муковисцидоза в Страсбурге (Франция).

В последнее время в качестве интересных и перспективных носителей ДНК используют синтетические полимеры, образующие при определенных условиях упаковки микросферы, называемые так же полимеросомы. Данные комплексы способны (1) упаковывать плазмидную ДНК любых размеров, (2) биodeградировать, (3) проникать в клетки и ядра, (4) не вызывать иммунного ответа (Discher и соавт., 1999).

Эффективность трансфекции различных носителей исследуют с использованием так называемых маркерных, или репортерных, генов (генетических конструкций), содержащих экспрессирующиеся последовательности таких генов, как *LacZ*, *Green* или гена люциферазы).

В наших опытах *in vivo* с использованием комплекса синтетического полимерного носителя VSST25 и плазмидой pHSA_{Dy}, меченной FITC (внутримышечное введение), было установлено, что уже в течение первых суток комплексы VSST25 — pHSA_{Dy} разносятся кровью и попадают в различные ткани и органы (сердце, легкие и др.), причем значительная часть комплексов включается в ядра клеток и сохраняется там в течение 2 последующих месяцев (Baranov и соавт., 1999).

Учитывая высокую проникающую способность полимерных синтетических комплексов VSST25 — ДНК, нами исследована возможность использования данного носителя в качестве средства доставки генетических конструкций в клетки дыхательного эпителия легких мышей после однократного внутриназального введения. Проведена оценка эффективности экспрессии двух разных плазмид, содержащих маркерный ген *LacZ* под цитомегаловирусным промотором (pCMV-*LacZ* — с цитоплазматической и pCMV-nls*LacZ* — с ядерной локализацией продуктов гена), после внутриназального введения *in vivo* в составе полимерных комплексов.

Как следует из полученных данных, во всех изученных тканях (эпителий носа, трахея, легкие) β-галактозидазная активность через 24 ч после введения комплекса

VSST25 — pCMVLacZ оставалась на уровня фона, т.е. соответствовала таковой у интактных мышей. Максимальная экспрессия LacZ-гена во всех изученных тканях зарегистрирована на 7-й и 14-й день, при этом уровень β -галактозидазной активности на 25—30% превышает контрольный уровень (введение “голой” плазмиды pCMVLacZ). В дальнейшем, однако, экспрессия прогрессивно снижается, но даже на 60-й день остается достоверно выше фона ($p < 0,01$). Наиболее высокие показатели β -галактозидазной активности (до 60 ООЕ) зарегистрированы в легких подопытных мышей на 14-й день после введения.

В экспериментах по введению “голой” плазмиды динамика экспрессии LacZ-гена несколько другая. Уже через 24 ч активность β -галактозидазы достоверно (в среднем на 40%, $p < 0,05$) повышается во всех изученных тканях. В дальнейшем, однако, она быстро снижается, приближаясь к уровню интактного контроля уже к 3-й неделе после введения.

Большой интерес представляет анализ не только количественных характеристик экспрессии LacZ-гена, но и изучение локализации продукта маркерного гена в различных отделах легкого. С этой целью на криостатных срезах легких нами исследована локализация β -галактозидазы — продукта гена LacZ через 14 дней после введения. Ярко-синяя окраска свидетельствовала о высокой концентрации маркерного белка β -галактозидазы в цитоплазме эпителиальных клеток бронхиол и альвеол, что позволяло говорить о высоком уровне экспрессии гена LacZ после внутриназального введения комплекса VSST25 — pCMVLacZ. Наличие специфической синей окраски зарегистрировано и на тотальных препаратах легких подопытных мышей при том же сроке экспозиции (14 дней).

Еще более убедительные результаты гистохимического анализа получены в экспериментах с плазмидой pCMV-nlsLacZ, характеризующейся специфической внутриядерной локализацией β -галактозидазы. На 14-й день после введения комплекса VSST25 — pCMV-nlsLacZ ядра альвеолярных клеток окрашивались интенсивно синим цветом, что доказывало активную экспрессию гена LacZ. При этом доля альвеол, экспрессирующих β -галактозидазу, в среднем составила около 3%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что маркерный ген LacZ в составе различных экспрессирующихся конструкций, доставленный внутриназально с помощью микрофер в дыхательные пути лабораторных мышей, способен к трансфекции эпителиальных клеток носа, трахеи, бронхов и даже бронхиол и альвеол. При этом динамика экспрессии гена LacZ в комплексе с микроферами обнаруживает характерные особенности: она медленно нарастает во всех изученных тканях, достигает максимума к 7—14 дню и, затем постепенно снижается, остается, однако, вполне реальной даже спустя 2 мес после введения. При введении “голой” плазмиды pCMV LacZ максимумы экспрессии гена LacZ приходится уже на 1-е сутки после введения, после чего ее интенсивность быстро падает. Подобный “продолгованный” вариант экспрессии генной конструкции, доставленной

микроферами, ранее нами зарегистрирован в опытах *in vivo* после введения к ДНК гена дистрофина в мышцу (Baranov и соавт., 1999) и, по-видимому, определяется необходимостью по крайней мере частичного внутриядерного растворения микрофер, прежде чем содержащиеся в них конструкции становятся доступными для транскрипции.

Специальные серии опытов были проведены по исследованию возможности трансфекции эмбриональных клеток при внутриамниотическом либо внутрибрюшинном введении маркерного LacZ-гена в составе микрофер мышам на 17—18-й день беременности. Учет результатов проводился на плодах и новорожденных. Активная экспрессия маркерного гена зарегистрирована в легких, кишечнике и других органах после внутриамниотического введения. Наличие в плодных тканях ДНК гена CFTR, определяемое с помощью полимеразной цепной реакции, при внутрибрюшинном введении указывает на способность микрофер, содержащих генетические конструкции, проникать через плацентарный барьер и достигать ткани плода. Этот принципиально новый факт заслуживает серьезного внимания.

Невзирая на обнадеживающие результаты, полученные в результате использования полимерных микрофер, данный носитель оказался нелишенным некоторых недостатков. При доставке генетических конструкций с использованием полимерных микрофер, наблюдалась выраженная вариабельность трансфекции, что отчасти, по-видимому, было связано со значительной деградацией плазмидной ДНК в процессе упаковки генов в полимерный носитель. Возможно, именно повреждением ДНК в микроферах можно объяснить явное несоответствие между высокой эффективностью ядерной доставки генетических конструкций с помощью микрофер и сравнительно невысоким уровнем экспрессии. Излишне плотная упаковка ДНК-конструкций в микроферы также могла оказывать негативное влияние на эффективность транскрипции введенных генов. В 2000 г. были синтезированы несколько новых модификаций полимерного носителя, использовавшегося для сборки полимерных микрофер. Как показывают наши предварительные результаты, значительная часть таких микрофер, несмотря на изменения химической структуры полимера, продолжала обеспечивать эффективную ядерную доставку генов. Испытания данных носителей в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продолжаются.

В настоящее время, помимо полимера VSST25 и его производных, мы проводим исследования новых классов невирусных носителей, таких как “звздообразные” полимерно-белковые конъюгаты, содержащие фрагменты карбоцепных и гетероцепных полимеров, обеспечивающих упаковку ДНК за счет полимерного поликатионного фрагмента и ее целевой транспорт за счет белкового компонента. Уже испытаны “звздообразные” карбоцепные полимерные конъюгаты на основе трансферрина (TF-NBU), в которых карбоцепной поликатионный блок односторонне связан с модифицируемым белком. Предположительно карбоцепной поликатионный фраг-

мент конъюгата отвечает за комплексообразование с ДНК, а белковый компонент конъюгата обеспечивает направленный транспорт комплекса к соответствующим клеткам и его прохождение через клеточную мембрану. В настоящее время проводятся опыты по трансфекции *in vivo* и уже отобраны некоторые перспективные носители.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что первоначальная надежда на эффективное лечение МВ с помощью генной терапии пока не оправдалась. Однако в настоящее время уже хорошо известны все трудности на этом пути, намечены реальные подходы к их устранению, извлечено много полезных уроков. Все это внушает уверенность ученым и специалистам в области МВ в реальность генной терапии этого тяжелого заболевания. Произойдет ли это в ближайшем будущем или несколько позже оценить трудно. Однако гигантские материальные ресурсы и огромные умственные усилия, брошенные на решение данной проблемы, вселяют оптимизм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson W.F. Human gene therapy. Nature 1998; 392: 25—30.
2. Baranov A., Glazkov P., Kiselev A. et al. Local and distant transfection of mdx muscle fibers with dystrophin and LacZ genes delivered in vivo by synthetic microspheres. Gene Ther. 1999; 6: 1406—1414.
3. Discher B.M., Won Y.Y., Ege D.S. et al. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. Science 1999; 284: 1143—1146.
4. Dorin J.R., Dickinson P., Alton E.W. et al. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. Nature 1992; 359: 211—217.
5. Kay M.A., Liu D., Hoogerbrugge P.M. Gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 12744—12746.
6. Moelling K. Naked DNA—the poor man's gene therapy? Gene Ther. 1998; 5: 571—572.
7. Turner G., Dunckley M., Dicson G. Gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. In: Brown S., Lucy J., eds. Dystrophin. Gene, protein and cell biology. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1997. 275—309.
8. Zabner J., Ramsey B.W., Meecker D.P. et al. Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. J. Clin. Invest. 1996; 97: 1504—1511.

Поступила 01.08.01

Лекции

© ЭСТА-ЛИ ТАННЕНБАУМ, 2001

УДК [616.24-003.4-004]-085.852

Эста-Ли Танненбаум

ФИЗИОТЕРАПИЯ (ЛЕЧЕБНАЯ ФИЗКУЛЬТУРА И КИНЕЗИТЕРАПИЯ) У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Детский госпиталь "Great Ormond Street", Лондон

Физиотерапия (западный термин, который в российской медицине соответствует объединению двух понятий — лечебная физкультура и кинезитерапия) является неотъемлемой составляющей комплекса лечебных мероприятий, показанных пациентам с муковисцидозом (МВ). За последние годы было разработано множество различных методик физиотерапии, которые широко применяются в мировой практике:

- Методики активного цикла дыхания (*Active cycle of breathing techniques — ACBT*);
- Аутогенный дренаж (*Autogenic drainage — AD*);
- Конвенциональная физиотерапия в области грудной клетки (*Conventional chest physiotherapy — CCPT*);
- Физические упражнения;
- Высокочастотная осцилляция грудной клетки (*High frequency chest wall oscillation — HFCWO*);
- Внутривентикулярная перкуссионная вентиляция (*Intrapulmonary percussive ventilation — IPV*);

- Устройства для осцилляторного повышения давления на выдохе: флаттер (*Flutter*) корнет (*Cornet*)
- Положительное давление на выдохе (*Positive expiratory pressure — PEP*);
- PEP с высоким давлением (*High pressure PEP — HPEP*).

Конвенциональная кинезитерапия в области грудной клетки

ССРТ — пассивная (в сравнении с постуральным дренажем — PD) мануальная методика (перкуссия/вибрация), которая может включать ряд дыхательных упражнений. PD предусматривает определенное положение тела пациента, при котором сила гравитации способствует дренажу секрета из определенных областей легких. Сообщается, что применение PD в качестве