

ІННОВАЦІЇ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ В ОНКОЛОГІЇ

Чи можна побороти смертельні клешні?



Інна Буркова
графічний дизайнер
ФОП “Фотопрес”,
м. Біла Церква

Автор статті —
переможець конкурсу
науково-популярних статей
Державного фонду
фундаментальних
досліджень України

Завдяки стрімкому розвитку медицини створюються нові інноваційні техніки, ліки та обладнання, спрямовані на лікування складних захворювань, таких, як рак. Останнім часом велика увага приділяється генній терапії як перспективному методу лікування онкозахворювань, який у майбутньому стане особливо важливим інструментом для запобігання захворювань на рак та зниження смертності. Розглянемо коротко шляхи розвитку хвороби, а також застосування інноваційних технік генної терапії в онкології.

Людство зіткнулося з цією загадковою хворобою ще до нашої ери. Її намагалися зрозуміти і лікувати вчені мужі в різних куточках світу: в Стародавньому Єгипті — *Еберса*, в Індії — *Сушрута*, Греції — *Гіппократ*. Усі вони вели боротьбу з небезпечним і серйозним супротивником — раком. І хоча ця битва триває й досі, складно визначити, чи є шанси на повну і остаточну перемогу. Адже чим більше ми вивчаємо хворобу, тим частіше виникають запитання — чи можна повністювилікувати рак? Як уникнути хвороби? Чи можна зробити лікування швидким, доступним і недорогим?

Завдяки Гіппократові і його спостережливості (саме він побачив схожість пухлини з клешнями раку) в стародавніх лікарських трактатах з’явився термін *карцинома* (грец. *carcinos*), або *рак* (лат. *cancer*). У медичній практиці по-різному класифікують злоякісні новоутворення: карциноми (в епітеліальних тканинах), саркоми (в сполучних та м’язових тканинах), лейкемія (в крові та кістковому мозку), лімфоми (в лімфатичній системі) та інші (в інших типах клітин, наприклад, гліома — рак головного мозку). Але в побуті більш популярний термін “рак”, який означає будь-яку злоякісну пухлину.

Мутації: загинути або жити вічно?

Численні генетичні дослідження показали, що виникнення ракових клітин — це результат генетичних змін. Помилки в реплікації (копіюванні) і репарації (виправленні помилок) ДНК можуть призвести до модифікації генів, що контролюють поділ клітини. Основними чинниками, які сприяють утворенню мутацій, є *ендогенні* (атака вільних радикалів, що утворюються в процесі обміну речовин, хімічна нестабільність деяких основ ДНК) і *екзогенні* (іонізуюче і ультрафіолетове випромінювання, хімічні канцерогени) фактори. Коли мутації закріплюються в геномі, вони сприяють трансформації нормальних клітин

у пухлині. Такі мутації, в основному, трапляються в протоонкогенах, які в нормі стимулюють поділ клітини. При цьому ген постійно перебуває в активному стані (мітоз не припиняється) і призводить до злоякісного переродження. Якщо ж інактивуючі мутації відбуваються в генах, які в нормі інгібують проліферацію (гени-супресори пухлин), контроль над поділом втрачається, і клітина стає “безсмертною” (рис. 1).

Очевидно, що розвиток певних видів раку містить у собі зміну більшості або навіть усіх цих генів і може проходити різними шляхами. З цього випливає, що кожен пухлину слід розглядати як біологічно унікальний об’єкт. На сьогодні існують спеціальні генетичні інформаційні бази з ракових захворювань, які містять дані про 1,2 млн мутацій з 8207 зразків тканин, що відносяться до 20 видів пухлин: Атлас ракового генома та Каталог соматичних мутацій [2].

Результатом збою роботи генів неконтрольований поділ клітин, а на наступних стадіях — метастазування в різні органи і частини тіла по кровоносних і лімфатичних судинах.

Це досить складний і активний процес, який проходить в кілька етапів. Окремі ракові клітини відокремлюються від первинного вогнища і розносяться з кров’ю по організму. Потім за допомогою спеціальних рецепторів вони прикріплюються до ендотеліальних клітин і експресують протеїнази, які розщеплюють білки матриксу і утворюють пори у базальній мембрані. Зруйнувавши позаклітинний матрикс, ракові клітини мігрують вглиб здорової тканини. За рахунок аутокринної стимуляції вони діляться, утворюючи вузол (1—2 мм в діаметрі). При відсутності сприятливих чинників частина клітин у вузлі гине, і такі “дрімаючі” мікрометастази можуть досить довго залишатися в тканинах органу в латентному стані. У комфортних умовах вузол розростається, в клітинах активуються гени фактора росту ендотелію судин (VEGF) і фактора росту фібробластів (FGFb), а також ініціюються ангиогенез (формування кровоносних судин) (рис. 2).

Однак клітини озброєні спеціальними механізмами, що захищають від розвитку пухлини:

імпринтинг — механізм епігенетичних модифікацій, який контролює нормальний ріст і правильний розвиток організму. Будь-які порушення при метилюванні певних генів можуть посприяти виникненню раку [3];

репарація ДНК (напр., одонуклеотидна ексцизійна репарація захищає ДНК від мутацій, викликаних канцерогенними агентами) [4];

контрольні точки клітинного циклу — використовують специфічні білки-месенжери, такі, як АТМ, АТР і комплекс RAD17-RFC, для пошуку пошкоджень в молекулах ДНК [5];

запрограмована клітинна смерть — апоптоз і пов’язані з даним процесом регуляторні гени мають величезний вплив на виникнення злоякісного фенотипу [6];

імунна система — активація природних кілерів, макрофагів, нейтрофілів, еозинофілів і специфічних Т-цитотоксичних клітин; синтез цитокінів і специфічних антитіл [7].

Традиційні методи та їхні недоліки

Якщо захисні системи організму не впоралися, і пухлина все-таки почала розвиватися, врятувати хворого може тільки втручання лікарів. Протягом тривалого періоду в медицині використовуються три основні “класичні” терапії:

1) **хірургічна** (повне видалення пухлини). Використовується, коли пухлина має невеликі розміри і добре локалізована в чітко визначеному місці. При цьому видаляють частину тканин, які контактують зі злоякісним новоутворенням. Метод не застосовується при наявності метастаз;

2) **променева** — опромінення пухлини радіоактивними частинками для зупинення та запобігання поділу ракових клітин. Здорові клітини теж чутливі до цього випромінювання і часто гинуть;

3) **хіміотерапія** — використовуються ліки, які гальмують ріст клітин, що швидко діляться. Ліки чинять негативний вплив і на нормальні клітини.

Описані вище методи не завжди можуть позбавити хворого від раку. Часто при хірургічному лікуванні залишаються поодинокі ракові клітини, і пухлина



Рис. 1. Генетична модель раку: рак товстої кишки [1]

Первинна пухлина

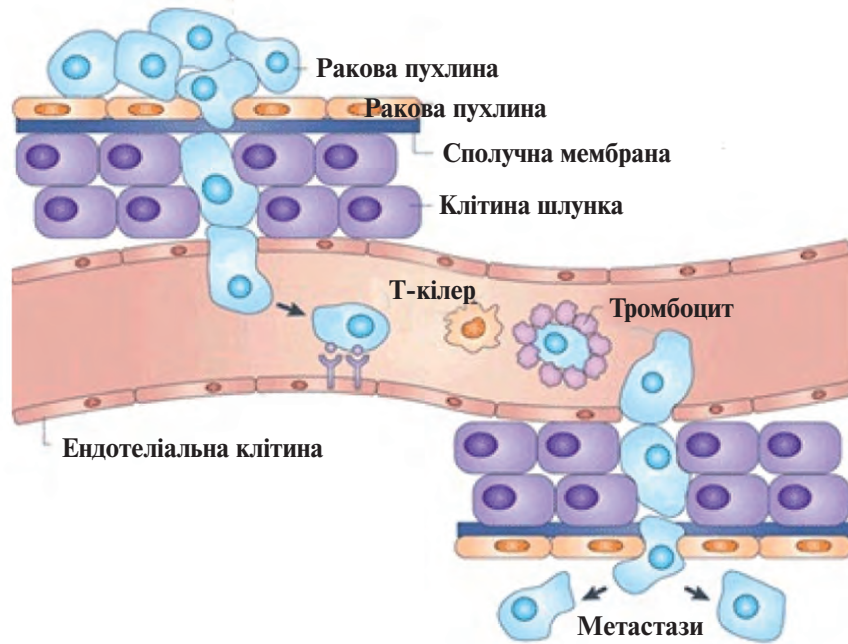


Рис. 2. Поширення метастаз

може дати рецидив, а при хіміотерапії та променевої терапії виникають побічні ефекти (зниження імунітету, анемія, випадання волосся та ін.), які призводять до серйозних наслідків, а часто і до смерті пацієнта.

Однак з кожним роком вдосконалюються традиційні і з'являються нові методи лікування, які можуть перемогти рак, такі, як *біологічна терапія, гормональна терапія, використання стовбурових клітин, трансплантація кісткового мозку*, а також різні підтримувальні методики. Найбільш перспективною вважається *генна терапія*, оскільки вона спрямована на першопричину раку — компенсацію неправильної роботи певних генів.

Генна терапія як перспектива

За даними PubMed, інтерес до генної терапії (ГТ) ракових захворювань стрімко зростає, і на сьогодні ГТ об'єднує ряд методик, які оперують з раковими клітинами і в організмі (*in vivo*), і поза ним (*ex vivo*) (рис. 3).

При *генній терапії in vivo* використовується перенесення генів — введення генетичних конструкцій в ракові клітини або в тканини, які оточують пухлину [9]. *Генна терапія ex vivo* базується на виділенні ракових клітин з пацієнта, на вбудовуванні терапевтичного “здорового” гена в раковий геном і введенні трансдукованих клітин назад в організм пацієнта. Для таких цілей використовуються спеціальні вектори, створені методами генної інженерії. Як правило, це *віруси*, які виявляють і знищують ракові клітини, при цьому залишаючись безпечними для здорових тканин організму, або *невірусні вектори*.

Вірусні вектори. Як вірусні вектори використовують ретровіруси, аденовіруси, аденоасоційовані віруси, лентівіруси, віруси герпесу та інші. Ці віруси відрізняються залежно від ефективності трансдукції, взаємодії з клітинами (розпізнавання і зараження) і ДНК. Головним критерієм є безпека і відсутність ризику неконтрольованого розповсюдження вірусної ДНК. Також важливо враховувати рівень експресії перенесених генів, щоб запобігти запаленню або імунній реакції організму при гіперсинтезі цільових білків.

Невірусні вектори. Для перенесення трансгенних ДНК також застосовують невірусні вектори. Полімерні переносники лікарських засобів — конструкції з наночастинок — використовуються для доставки препаратів з низькою молекулярною масою (напр., олігонуклеотидів, пептидів, міРНК (малі інтерферуючі РНК)). Завдяки невеликим розмірам, наночастинки поглинаються клітинами і можуть проникати в капіляри, що дуже зручно для доставки “лікувальних” молекул у важкодоступні місця в організмі. Дана техніка часто використовується для інгібування ангіогенезу пухлини. Але існує ризик накопичення частинок в інших органах (напр., кістковому мозку), що може призвести до непередбачуваних наслідків [11]. Найпопулярнішими невірусними методами доставки ДНК є ліпосоми і електропорація.

На даний час синтетичні катіонні ліпосоми визнані перспективним способом доставки функціональних генів. Позитивний заряд на поверхні частинок забезпечує злиття з негативно зарядженими клітинними мембранами. Катіонні ліпосоми нейтралізують негативний заряд ланцюга ДНК, роблять

Генна терапія *in vivo*



Генна терапія *ex vivo*



Рис. 3. Дві основні стратегії генної терапії.

Ex vivo — генетичний матеріал за допомогою векторів переноситься в клітини, які вирощуються в культурі (трансдукція), а потім трансгенні клітини вводять реципієнту; *in vivo* — введення вектора з потрібним геном в певну тканину або орган [8]

більш компактною її просторову структуру і сприяють ефективній конденсації. Плазмідно-ліпосомний комплекс має низку важливих переваг: може вміщувати генетичні конструкції практично необмежених розмірів; відсутній ризик реплікації або рекомбінації; практично не викликає імунної відповіді в організмі господаря. Недолік цієї системи полягає в низькій тривалості терапевтичного ефекту, а при повторному введенні можуть з'являтися побічні ефекти [12].

Електропорація — досить поширений метод невірусної доставки ДНК, простий і не викликає імунної відповіді. За допомогою індукованих електричних імпульсів на поверхні клітин утворюються пори, і плазмідні ДНК легко проникають у внутрішньоклітинний простір [13].

Генна терапія *in vivo* з використанням електропорації довела свою ефективність у ряді експериментів на пухлинах у мишей. При цьому можна переносити будь-які гени (напр., гени цитокинів (IL-12) і цитотоксичні гени (TRAIL)), це, в свою чергу, сприяє розвитку широкого спектру терапевтичних стратегій. Крім того, цей підхід може бути ефективним для лікування і метастаз, і первинних пухлин [14].

Вибір техніки

Залежно від типу пухлини та її прогресії для пацієнта підбирається найбільш ефективна методика лікування. На сьогодні розроблені нові перспективні техніки генної терапії проти раку, серед яких

онколітична вірусна ГТ, імунотерапія, ГТ з використанням стовбурових клітин та інші.

Онколітична вірусна генна терапія. Для цієї методики використовують віруси, які за допомогою спеціальних генетичних маніпуляцій стають онколітичними — перестають розмножуватися в здорових клітинах і впливають тільки на ракові. Хорошим прикладом такої терапії є ONYX-015 — модифікований аденовірус, який не експресує білок E1B. При відсутності цього білка вірус не може реплікуватися в клітинах з нормальним геном p53 [15].

Два вектори, сконструйовані на базі вірусу простого герпесу (HSV-1) — G207 і NV1020, також несуть в собі мутації декількох генів, щоб реплікуватися тільки в ракових клітинах [16]. Великою перевагою техніки є те, що при проведенні внутрішньовенних ін'єкцій онколітичні віруси розносяться з кров'ю по всьому організму і можуть боротися з метастазами. Основні проблеми, які виникають при роботі з вірусами, — це можливий ризик виникнення імунної відповіді в організмі реципієнта, а також неконтрольоване вбудовування генетичних конструкцій в геном здорових клітин і, як наслідок, виникнення ракової пухлини.

Геноопосередкована ферментативна терапія. Базується на введенні в пухлинну тканину "суїцидних" генів, в результаті роботи яких ракові клітини гинуть. Дані трансгени кодуєть ферменти, що активують внутрішньоклітинні цитостатики, ФНП-рецептори та інші важливі компоненти для активації апоптозу. Суїцидна комбінація генів в ідеалі повинна відпо-

відати таким вимогам [17]: контрольована експресія гена; активна протиракова дія; відсутність додаткових ендogenous ферментів. Недоліком терапії є те, що в пухлинах присутні всі захисні механізми, властиві здоровим клітинам, і вони поступово адаптуються до “проліків”.

Імуноterapia. Завдяки генній терапії останнім часом почала активно розвиватися імуноterapia — новий підхід до лікування раку за допомогою протиракових вакцин. Основна стратегія методу — активна імунізація організму проти ракових антигенів (ТАА) за допомогою технології перенесення генів [18]. Головною відмінністю рекомбінантних вакцин від інших препаратів є те, що вони допомагають імунній системі пацієнта розпізнавати ракові клітини і знищувати їх. На першому етапі ракові клітини вилучають з організму реципієнта (аутологічні клітини) або зі спеціальних клітинних ліній (алогенні клітини), а потім їх вирощують у пробірці. Для того щоб ці клітини могли упізнаватися імунною системою, вводять один або кілька генів, які виробляють імуностимулюючі молекули (цитокіни) або білки з підвищеною кількістю антигенів. Після цих модифікацій клітини продовжують культивувати, потім проводять лізис і отримують готову вакцину.

Коли було доведено, що більшість видів раку мають специфічні антигени і здатні індукувати свої захисні механізми [19], була висунута гіпотеза, що блокування імунної системи ракових клітин полегшить відторгнення пухлини. Тому для виробництва більшості протиракових вакцин як джерело антигенів використовують пухлинні клітини пацієнта або спеціальні алогенні клітини. Основні проблеми імунотерапии пухлин — ймовірність виникнення аутоімунних реакцій в організмі хворого, відсутність протиракової відповіді, імуностимуляція росту пухлини та інші.

Стовбурові клітини. Потужним інструментом генної терапії є використання стовбурових клітин як векторів для передачі терапевтичних агентів — імуностимулюючих цитокінів, “суїцидних” генів,

наночастинок і антиангіогенних білків [20]. Стовбурові клітини (СК), крім здатності до самооновлення і диференціювання, мають величезну перевагу в порівнянні з іншими транспортними системами (нанополімерами, вірусами): активація “проліків” відбувається безпосередньо в пухлинних тканинах, що дозволяє уникнути системної токсичності (експресія трансгенів сприяє руйнуванню тільки ракових клітин). Додатковим позитивним фактором є “привілейований” стан аутологічних СК — використання власних клітин гарантує 100 %-у сумісність і підвищує рівень безпеки процедури. Але все ж ефективність терапії залежить від правильної *ex vivo* передачі модифікованого гена в СК і подальшого перенесення трансдукованих клітин в організм пацієнта.

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи вищесказане, можна з упевненістю говорити, що настає епоха персоналізованої медицини, коли для лікування кожного онкохворого буде підбиратися персональна ефективна терапия. Уже розробляються індивідуальні програми лікування, які забезпечують своєчасний і правильний догляд і призводять до значного поліпшення стану пацієнтів. Еволюційні підходи для персоналізованої онкології, такі, як геномний аналіз, виробництво таргетних препаратів, генна терапия раку і молекулярна діагностика з використанням біомаркерів, уже приносять свої плоди [17].

Особливо перспективним методом лікування онкозахворювань є генна терапия.

На даний момент активно проводяться клінічні випробування, які часто підтверджують ефективність ГТ в тих випадках, коли стандартне протиракове лікування — хірургія, променева терапия і хімотерапія — не допомагає. Розвиток інноваційних методик ГТ (імунотерапии, онколітичної віротерапії та ін.) зможе вирішити проблему високої смертності від раку, і, можливо, в майбутньому діагноз “рак” не звучатиме широко. ■

Література

1. Уильямс С. Клаг, Майкл Р. Каммингс. Мир биологии и медицины. Основы генетики. М.: Техносфера. 2007. 726 с.
2. Биомолекула: “Большие БД против “большого Р””.
3. Cui H., Cruz-Correa M. et al. *Science*. 2003, 14. 1753—1735.
4. Friedberg E.C. *Nat. Rev. Cancer*. 2001. 1. 22—33.
5. Sancar A. et al. *Annu. Rev. Biochem.* 2004. 73, 39—85.
6. Lowe S.W. *Carcinogenesis*. 2000., 21, 485-495.
7. Jakobsiak M., Lasek W., Gox J. *Immunol. Lett.* 2004. 91. 255.
8. Compte M. *Biomatter*. 2013. 3. e23897.
9. Dachs G.U., Dougherty G.J. et al. *Oncol. Res.* 1997. 9. 313—325.
10. Liu C.-C., Shen Z. et al. *World J. Gastroenterol.* 2006. 12. 6941—6948.
11. Schiffelers R.M., Ansari A. et al. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32. 149.
12. Kwang Y.L. *HKMJ*. 1997. 3. 163—172.
13. Muramatsu T., Nakamura A., Park H.M. *Int. J. Mol. Med.* 1998. 1. 55-62.
14. Tamura T., Sakata T. *Curr. Gene Ther.* 2003. 3. 59—64.
15. Bischoff J.R., Kirn D.H. et al. *Science*. 1996. 274. 373—376.
16. Cozzi P.J., Malhotra S., et al. *FASEB J.* 2001. 15. 1306—1308.
17. Biasco L., Baricordi C., Aiuti A. *Mol. Ther.* 2012. 20. 709—716.
18. Lindauer M., Stanislawski T. et al. *J. Mol. Med.* 1998. 76. 32—47.
19. Van Pel A., Boon T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982. 79. 4718—4722.
20. Cihova M., Altanerova V., Altaner C. *Mol. Pharm.* 2011. 8. 1480—1487.