



В этом году журнал «Биополимеры и клетка» открывает новую рубрику «Дискуссии», в связи с чем редколлегия подготовила материалы, посвященные одной из интереснейших и в то же время дискуссионных проблем — генной терапии. Редколлегия обращается к читателям журнала с предложением высказать свои критические замечания и суждения по поводу публикуемых в этой рубрике статей.

УДК 577.1

ЗАДАЧИ И ПРОБЛЕМЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В. А. Кордюм

Представления о генной терапии формировались в неразрывной связи с представлениями о наследственных болезнях, занимающих среди различных патологий особое место.

Лечение вообще предусматривает хотя бы теоретическую возможность вылечить, устранить тем или иным путем причину болезни. При этом во всех отношениях предпочтительнее ее устранить. В случае же наследственных болезней медицина вылечить их (в истинном понимании этого термина) не может в принципе, так как даже сама возможность устранения дефектного гена и замена его полноценным в рамках арсенала средств и методов здравоохранения до недавнего времени не рассматривалась.

С появлением генной инженерии возникла принципиальная возможность радикального лечения наследственных болезней. И хотя вначале для этого не только отсутствовал необходимый методический аппарат, но и оставались непонятными многие принципиальные вопросы, теперь стало ясно, что их решение лишь дело обозримого будущего. И еще не зная в необходимых деталях, как решить проблему лечения наследственных болезней, для нового направления был предложен и вошел в обиход специальный термин — генная терапия. Общепринятого определения и представления о круге задач, входящих в то, что называют генной терапией, пока нет. Чаще всего под генной терапией подразумевают лечение наследственных болезней человека при помощи генов человека. Но поскольку сам по себе ген ничего организму не дает, то говоря о генах (и в практических решениях ими манипулируя), на выходе задачи имеют в виду фенотип — т. е. в конечном итоге функциональное проявление активного продукта экспрессии заданного гена (а при генной терапии — функциональную коррекцию). Но при этом почти всегда под наследственными болезнями имеют в виду их традиционное толкование. И именно к таким «традиционным» наследственным болезням (да и то далеко не ко всем) привязывают генную терапию и все представления о ней.

В традиционном же понимании наследственные болезни — это такие патологии, которые обусловлены дефектом гена, определяемым даже в пренатальном периоде, и фенотипически проявляющиеся в подавляющем большинстве случаев сразу после рождения или в первые годы жизни. И здесь принципиально все понятно и в плане генной терапии и в плане обоснования ее необходимости. В плане терапии — если известен дефектный ген, то понятно (пусть в общем виде, но по-

нятно), что надо исправлять. В плане обоснования — иного пути лечения не существует.

Но есть еще одно очень серьезное и, пожалуй, всеобъемлющее пояснение необходимости развития генной терапии — это приближающаяся к непереносимости нагрузка на геном. В атмосферу городов выбрасываются огромные количества генотоксических продуктов, вода загрязняется ядовитыми стоками, продукты питания готовят из расти-

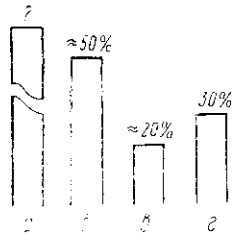
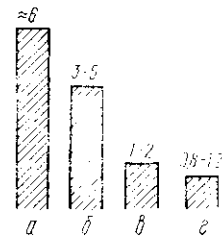


Рис. 1. Мутационный груз в его классическом проявлении: гаметные (а), зиготные (б), эмбриональные летали (в); г — живорожденные, д — из них с наследственными болезнями

Fig. 1. Mutational load in its classic manifestation: gametic lethals (a); zygotic lethals (б); embryonic lethals (в); live-born (г); % of them with hereditary diseases (д)

Рис. 2. Наследственные болезни человека (в процентах по отношению к общему числу живорожденных): а — всего; б — мультифакторные (патологии, природа которых в значительной мере не выяснена); в — моногенные; г — хромосомные

Fig. 2. Hereditary human diseases (% of the total number of live-born): а — total; б — multifactorial; в — monogenic; г — chromosomal



тельного и животного материала, обрабатываемого, фактически, ядохимикатами, и все это круто возрастает во времени.

Сколь велика нагрузка на геном человека, видно из приводимых в литературе цифр [1, 2] (рис. 1). Оценить, где здесь вклад современной деятельности индустриального общества, а где естественный уровень мутирования, пока не представляется возможным, но цифры эти оставляют очень сильное впечатление.

Среди живорожденных наследственные патологии распределены следующим образом (рис. 2). Всего детей с наследственными болезнями рождается до 6%, на мультифакторные заболевания приходится 3—5%, моногенные — 1—2% и хромосомные синдромы — 0,8—1,2% [2, 3].

Общее число известных наследственных болезней быстро увеличивается по мере их изучения, т. е. нашего понимания фактического, реально существующего положения, и уже достигло 3400; примерно 2500 оцениваются как моногенные, а для 300 обнаружен биохимический дефект, их обуславливающий [2, 4].

Моногенные патологии потенциально доступны для генной терапии, а для тех из них, у которых идентифицировано биохимическое нарушение, в принципе, можно было бы разрабатывать частную генную терапию. В определенном смысле это и делается.

В большинстве случаев, когда патология обусловлена рецессивным геном и проявляется из-за недостатка количества данного белка или снижения его функциональной активности, компенсация дефекта может осуществляться как имплантацией полноценного гена в клетки больного с тем, чтобы он кодировал в них нормальный белок в требуемом количестве, так и введением человеку такого полноценного белка, полученного вне данного индивидуума. Таким образом, можно говорить о прямой и непрямой генной терапии (рис. 3). Непрямая генная терапия во многом базируется на генноинженерной биотехнологии. Однако она, в отличие от получения методами биотехнологии других продуктов, используемых для лечения человека, имеет ряд особенностей, сближающих ее с генной терапией (рис. 4). Здесь автор должен сделать некоторую оговорку. Термин «непрямая генная терапия» не принят в литературе и введен им лично. В литературе эту область ча-

ше всего относят либо к новой биотехнологии, либо к «продуктотерапии», и читателю необходимо это учитывать. Но так как термины не существуют изначально, когда-то их вводят, то автор считает, что после сделанной оговорки в силу того, что называется авторским правом, он может ввести то, что до сих пор отсутствовало, на основании приведенной выше аргументации. А приживется термин или нет, воспользуются им как новым понятием или проигнорируют за ненужностью, покажет время.

Кроме препаратов человека, получаемых по генноинженерной биотехнологии, для непрямого генной терапии используются те или иные молекулярные компоненты человека, среди которых по доступности и, как следствие, массовости использования применяются различные составляющие крови. В США, например, индустрия продуктов крови человека имеет оборот около 2 млрд долларов ежегодно [5]. Но возможности получения исходного материала достигли, по-видимому, своего предела. Каждый год в мире перерабатывается 12 млн литров плаз-

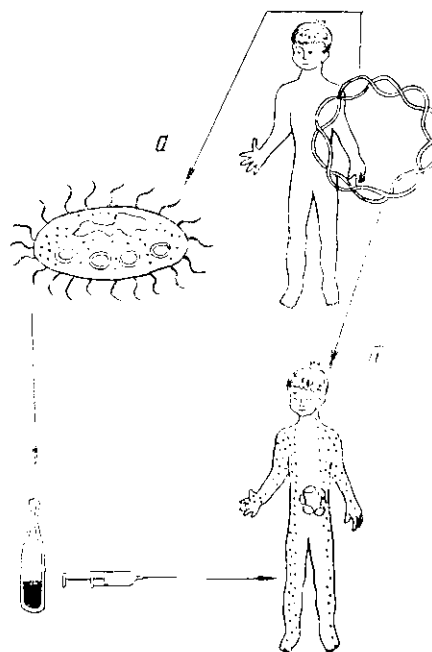


Рис. 3. Прямая (б) и непрямая (а) генная терапия
Fig. 3. Direct (б) and indirect (а) gene therapy

мы человеческой крови [6]. Генная инженерия позволяет сделать доступной в качестве лекарственного препарата любой продукт человека. Некоторые такие препараты уже используются, значительная часть находится на разных этапах разработки. Можно думать, что между 1995 и 2000 гг. все, что у человека может служить для терапии, будет использоваться в клиниках.

Но, несмотря на такие перспективы, непрямого генной терапии при лечении наследственных болезней присущи принципиальные ограничения. Первое из них — необходимость постоянных инъекций. Кроме особенностей самой процедуры, при инъекциях происходит нефизиологический подъем концентрации вводимого (и всегда — биологически активного) продукта, затем какое-то время диапазон физиологической нормы, потом — падение ниже нормы, опять инъекция — и все сначала (рис. 5). Совершенствованием данной процедуры является специально разработанный многоканальный переносной насос на батарейках со специальным компьютером [7].

Вторым ограничением является проблема принятия синтезируемым вне организма человека белком правильной пространственной структуры [8, 9]. Это ограничение, по-видимому, можно обойти, используя для биосинтеза продукта клетки животного или человека. Но в любом случае свой ген лучше. Продукт будет образовываться в организме, и не потребуются инъекции, произойдет оптимальная посттрансляционная модификация и укладка в пространственную структуру и т. д.

Все это потенциально устранимо при прямой генной терапии, предусматривающей имплантацию требуемого гена в клетки человека. Да и сама идея такого лечения наследственных болезней в общей форме кажется абсолютно очевидной. Рассмотрим проблему вначале в рамках этой кажущейся очевидности.

Сразу обращает на себя внимание обширный объем работ по ком-плементации мутантного гена, выполненных на дефектных клетках вне

организма, некоторые примеры которых представлены ниже [10—25]:

Введенный ген	Что комплементировано
β -Глобиновый	β -Талассемия
β^0 -Глобиновый	Серповидноклеточная анемия
Аденозиндезаминазы	СВИД
ГГФРТ	Синдром Лиш Нихена
Аргининосукцинатсинтетазы	Цитрулинемия
α_1 -Антитрипсина	Недостаточность по α_1 -антитрипсину
Глюкоцереброзидазы	Болезнь Гаушера
Гены класса Т главного комплекса гистоннесовместимости	ГКГ-недостаточность
Глюкокортикоидного рецептора	Гормональные нарушения
Аргиназы	Аргининемия
УФ-эндонуклеазы	Пигментная ксеродерма
O ⁶ -метилгуанин-метил-трансферазы	Чувствительность к химическим мутагенам и канцерогенам
<i>T₄denV</i>	УФ-индуцированная репарация
ERCC-1 человека	Чувствительность к УФ и химическим генотоксическим агентам

В дальнейшем при подготовке к переводу работ на человеке ставятся аналогичные эксперименты на лабораторных животных [26, 27]. В тех случаях, когда у животных отсутствует адекватная патология, идут на получение специальных линий с дефектом гена, который предполагают имплантировать человеку [28]. Это — опережающие работы, подготавливающие быстрое увеличение масштабов при переходе к человеку. Принципиальным моментом в его подготовке является постоянно происходящее за рубежом формирование общественного мнения в том плане, что при необходимых предосторожностях вмешательство в генетический аппарат клеток человека на уровне ныне живущих индивидуумов явится безопасным и полезным мероприятием. В этом направлении постепенно снимаются ограничения на эксперименты, которые еще совсем недавно представлялись этически абсолютно недопустимыми. Именно так поступил Консультативный совет по использованию рекомбинантных молекул в США (где работы по генной терапии

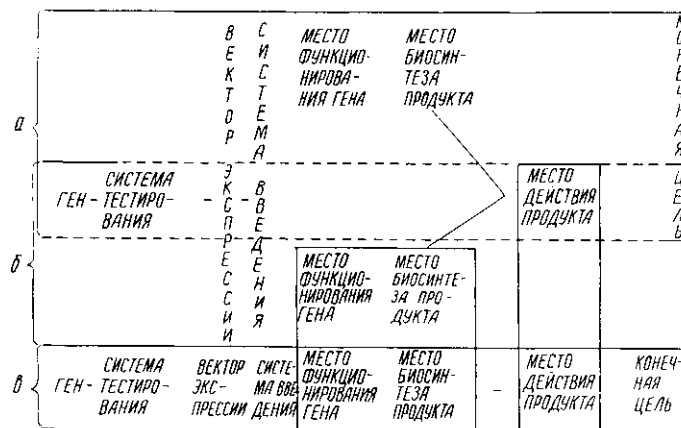


Рис. 4. Общность и различия прямой (а) и непрямой (б) генной терапии; в — биотехнология лекарств

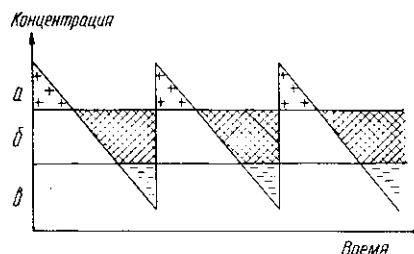
Fig. 4. Common character and differences of direct (a) and indirect (b) gene therapy, в — drug biotechnology

осуществляются наиболее интенсивно), отклонив предлагавшийся запрет на использование генов человека для генноинженерного введения их в репродуктивные клетки человека (но без последующей имплантации) [29]. И теперь вопросы о том, что в них вводить, зачем и как максимально обезопасить поколения людей от возможных отдаленных последствий подобных манипуляций, спокойно обсуждаются в специальной литературе [30]. В отношении человека пока только обсуждаются, а на животных уже эффективно разрабатываются. В случае

β -талассемии введение человеческого гена β -глобина в яйцеклетки мышей с наследственным дефектом в аналогичном гене привело к синтезу полноценного (но химерного — наполовину мышинного, наполовину человеческого) глобина и устранению болезни как фенотипически, так и генетически [31]. В случае серповидноклеточной анемии введением гена β^s -глобина человека получена линия мышей для изучения коррекции в поколениях данной патологии [32]. Проведены успешные работы по переносу мышам гена α_1 -антитрипсина человека и показана его пол-

Рис. 5. Характер изменения концентрации препарата в организме при инъекциях: *a* — выше оптимума; *b* — зона оптимума; *в* — ниже оптимума

Fig. 5. The pattern of changes in preparation concentrations after injections into organism: *a* — above optimum; *b* — optimum zone; *в* — below optimum



ноценная экспрессия в печени мышей такой линии [33] и т. д. Разрабатываются также подходы (пока только на животных) по введению заданных генов в эмбрионы [34].

Но наиболее энергично ведется подготовка к генной терапии человека в постнатальный период. В этом отношении происходит и основное формирование общественного мнения, и концентрация усилий, и практические действия. Формирование общественного мнения за рубежом (особенно в США) происходит путем непрерывно идущих и широко освещаемых как в специальных изданиях, так и в широкой прессе дискуссий о достоинствах и потенциальных опасностях генной терапии и мерах их преодоления. В практическом же плане имеет место быстрый рост числа научных коллективов, готовящихся к работе непосредственно на людях и уже экспериментирующих на них. Так, в 1980 г. прямые эксперименты на человеке (две больные талассемией) проводила только одна группа Клайна, которая для этого должна была выехать из США (где в то время подобные работы не разрешались) в Италию [35]. Эти работы вызвали бурю в прессе. Но уже в 1985 г., теперь уже непосредственно в США, заканчивали подготовку для работы на людях три группы исследователей [36]. А с 1986 г. в США на больных людях готовы начать работы с официального разрешения правительственных инстанций семь центров по генной терапии [37]. Согласно публикациям, в них осуществляют работы в направлении традиционном, т. е. разработку лечения наследственных болезней канонического понимания.

Пожалуй, в наиболее абсолютизированном виде концепцию такой генной терапии сформулировал Т. Фридман. Согласно ей, генная терапия методом последующих приближений будет стремиться к своему идеалу — лечению наследственных болезней путем вырезания пораженного гена и встраивания на его место полноценного [38].

Это, безусловно, корректная задача, но она составляет лишь малую часть проблематики всей генной терапии и далеко не самую главную. Количество больных с моногенными наследственными поражениями даже среди врожденных патологий не является доминирующим. Если же оценивать их по конкретным поврежденным генам, можно видеть, что они распадаются на огромное число типов, в пределе — по числу генов у человека. И неожиданно оказывается, что ведущиеся работы сосредоточены не на основной массе моногенных патологий, а на редчайших случаях, выявленных во всем мире от нескольких индивидуумов до нескольких десятков. Так может быть только в одном случае — если под общие разговоры о гуманизме отрабатывают технологию, для которой, конечно же, выбирают наиболее удобные модели.

Поэтому первое, что надо понять и трезво оценить — это истинные

потенциальные возможности генной терапии в ее полном виде, и уже с этих позиций рассмотреть весь фронт работ, их тенденции и ожидаемые решения.

И поскольку генная терапия в общем виде предусматривает вмешательство в наследственный аппарат человека для изменения индивидуума в заданном направлении, то и начинать анализ необходимо с генома человека и изменений, произошедших в последнее время в представлениях о наследственных дефектах и того, к чему они приводят. В основе таких изменений лежат данные, полученные при переходе от изучения генома как некоего универсального общевидового компонента к изучению индивидуальных генов индивидуальных людей и представлениях о высокой специфичности наследственного аппарата каждого человека:

Общее содержание ДНК на гаплоидный набор	~ 3 млрд п. н.
Число структурных генов	~ 50000
Кодируют белки	~ 60 млн п. н.
С учетом регуляторных последовательностей это	~ 100 млн п. н.
Частота мутаций у человека (по непалиморфным локусам)	~ 10^{-8} на 1 п. н.
Количество мутаций на геном за поколение (или на одно деление соматической клетки)	~ 30
Количество мутаций на гены, кодирующие белки, за поколение (или на одно деление соматической клетки)	~ 1
Количество нуклеотидов (в среднем), на которые приходится одна замена у двух разных людей	$(1-3) \cdot 10^2$
Эволюция человека	~ 4 млрд лет, это ~ $2 \cdot 10^8$ генераций

При довольно значительном размере генома человека, составляющем $3 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов (п. н.) [39], не более 2% их кодируют белки [40]. Роль остальных последовательностей для выполнения геномом своих функций и влияние этого на человека пока только начинают выясняться. Ясно лишь, что они для чего-то нужны. И хотя частота мутаций у человека относительно невелика, составляя 10^{-8} п. н. [39], с учетом времени эволюции и того, что досталось в наследство от вида-предка рода людского, любой (не находящийся в прямом родстве) индивид имеет в среднем одно измененное основание на каждые 100—300 нуклеотидов своего генома, отличающееся от такового другого индивидуума [41]. А это значит, что практически каждый ген каждого данного человека отличается от аналогичного гена другого человека и каждое деление клетки увеличивает различия геномов. Эти данные заставляют коренным образом пересмотреть наши представления о том, что такое наследственная болезнь. Ведь если болезнь — это неблагоприятно сказывающееся на здоровье отклонение от нормы, а норму вывести из структуры генома невозможно, так как почти все гены у индивидуумов хоть немного, но различаются (и межгенные участки тем более), то с чем и что сравнивать?

Явные патологии, проявляющиеся при рождении или в начале постнатального периода, очевидны. Они-то и дали представления о наследственных болезнях. Переломы (за исключением некоторых, явно наследственно детерминированных случаев), ожоги и прочие травмы очевидны как поражения и не связаны с наследственностью. Но как распенить все остальное? Ведь даже заживление переломов и ожогов одинаковой степени и локализации у разных людей идет по-разному. А что касается других воздействий, например отравлений, то одна и та же доза яда у кого-то не вызывает даже расстройства желудка, а другого не удается спасти.

Так реализуются различия в генах человека на практике. А теперь проанализируем, казалось бы, очевидное — представления о мутациях применительно к человеку.

В первом приближении здесь все очевидно. Но по сути мы имеем дело с необходимостью изменения традиционных представлений о мутациях при переносе этого понятия на человека. Мутации изучают на модельных объектах. И оценку ведут по хорошо заметным различиям — растет на данной питательной среде микроорганизм или не рас-

тет (т. е. присутствует данный фермент или нет), изменена форма крыла у дрозофилы или нет и т. д. А мелкие отличия — растет чуть лучше или чуть хуже, летает чуть быстрее или чуть медленнее (т. е. данные белки чуть отличаются по своей функциональной активности) практически никогда не учитывают. Поэтому когда говорят о мутациях, обычно имеют в виду четкий признак. На уровне гена — это изменение, приводящее к кодированию полностью или почти полностью функционально неактивного белка (или наоборот — настолько резко активированного или синтезируемого в столь больших количествах, что функция, им обеспечиваемая, приводит к резко выраженным изменениям). На уровне генома — лишнюю хромосому, транслокацию и т. д.

Для человека же шкала значимости изменений генома, как правило, обратная. То, что вызывает крупные изменения функции, чаще всего приводит к гибели при формировании репродуктивных клеток, гаметной, зиготной или эмбриональной летали. В подавляющем большинстве случаев с крупными мутациями не рождаются — срабатывает механизм элиминации поврежденных клеток или эмбрионов. А вот небольшие изменения в генах чаще всего не препятствуют рождению. И с такими изменениями приходится жить каждому. С возрастом часть этих изменений реализуется в те или иные болезни. Наследственными болезнями в традиционном понимании их не назовешь, а по сути — они все наследственные. В них нет той абсолютной временной детерминации, поэтому обычно предпочитают употреблять более мягкую терминологию — наследственная предрасположенность. Но приходится менять и представления о том, что значит проявление «предрасположенности», т. е. некатастрофического изменения в гене с возрастом. Некоторые представления об этом иллюстрируют следующие данные [42—44]:

Годы жизни

- 12 Появление липидных бляшек на сосудах
- 14 Начало инволюции тимуса
- 25 Начало накопления поврежденной геномной ДНК соматических клеток
- 30 Снижение потребления кислорода, начало атрофии мышц, нарушения функции иммунной и эндокринной систем и т. д.
- 40 Повышение перекисей липидов в крови, заметное повышение общей болезненности, возрастание частоты амбулаторного и стационарного лечения

Да и «обычные» патологии начинают оцениваться совсем по-иному. Так, например, в Великобритании 5 % новорожденных являются носителями цистозифброза (или муковисцидоза в терминах медицинской генетики), что можно диагностировать соответствующими ДНК-зондами [45]. Следовательно, это типичный пример наследственной болезни, вносящей весомый вклад в уровень патологии: 5 % — это 1 человек из 20. Гомозиготное состояние (в силу случайности сочетания) возникает в таком случае у одного из 400 (в усредненном варианте, естественно). И так во всем. Жизнь всех людей — прямое тому подтверждение: у одних уже в раннем возрасте развиваются злокачественные опухоли, без каких бы то ни было явных контактов с канцерогенами, облучением и т. д., а другие живут в зонах вредного действия химических заводов, выходов природных источников радиоизотопов и никаких опухолей у них за всю жизнь так и не появляется; у большинства (особенно мужчин) развивается атеросклероз с самыми нехорошими последствиями, а у других его нет и живут они по сто лет и т. д.

Сегодня очевидно, что все так называемые возрастные патологии наследственно детерминированы (хотя в большинстве случаев конкретные гены, за них отвечающие, еще и не идентифицированы). А раз так — то все они являются в конечном итоге потенциальным объектом геной терапии. И в этом основа той концентрации сил и средств, которую вкладывают за рубежом в данное направление. В таком контексте сй и надо давать определение. В своем полном объеме геной терапия — это идентификация геномов поиндивидуумно, после чего с

помощью коррекции наследственного аппарата клеток всего организма или отдельных тканей — устранение молекулярных первооснов уже имеющихся у данного человека болезней и предотвращение появления любых новых патологий со временем, а при желании (или необходимости) воссоздание в клетках человека новой генетической информации, обеспечивающей появление как у ныне живущих, так и в поколениях потенциально любых фенотипов, вплоть до вообще отсутствующих в природе.

Генная терапия в ее полном объеме состоит из ряда разделов: генная хирургия; собственно генная терапия; генная профилактика; генная диагностика; генная вакцинация; «генный антигуманизм»; генная инженерия гаметогенеза, гамет и зигот; пренатальная генная инженерия. То, что согласно обычно обсуждаемым представлениям о «традиционной» генной терапии (см. выше определение Фридмана) пытаются представить как все направление, является лишь ее частью — генной хирургией. Это наиболее понятный раздел. Имеется дефектный ген в группе клеток или во всех клетках организма. И только он причина болезни. Все остальные гены функционируют нормально, вся регуляция дефектного гена действует безотказно. Заменить испорченный ген (или даже его небольшую часть — в пределе одно единственное основание) на полноценный — и организм здоров. Это действительно классика, но так бывает, к сожалению, не часто.

В большинстве случаев сам структурный ген кодирует в достаточной мере полноценный продукт, но изменена (особенно с возрастом) общая регуляция. Требуется воссоздать фенотип вопреки тому, что происходит в больном организме. И тогда простая замена гена ничего не даст. Примером может служить инсулинозависимый диабет. Если β -клетки поджелудочной железы погибли — инсулин не поступает в кровь, хотя все клетки человека (кроме эритроцитов, конечно) содержат исправный ген инсулина. Простая замена гена здесь ничего не даст — регуляторная система клетки выключит замененный ген точно так же, как и не замененный. Потребуется вводить специальную молекулярную конструкцию, обеспечивающую воспроизведение функции β -клеток. Подобная ситуация в своей основе правомерна и для многих других патологий. Устранение (или молекулярную компенсацию) их возьмет на себя собственно генная терапия.

Но анализ индивидуального генома должен дать картину тех отдаленных патологий, которые пока называют «предрасположенностями». А полная диагностика (например, двухмерный электрофорез высокого разрешения) укажет начало развития конкретных нарушений. И их можно будет компенсировать введением в соответствующие клетки соответствующих рекомбинантных молекул. Болезнь будет лечить до того, как она разовьется, и это обеспечит генная профилактика. Для ее осуществления, кроме анализа генома в исходном состоянии (при рождении или в раннем возрасте), потребуется оценка временных и индуцированных изменений (элиминация определенных участков, засорение попадающими извне ретровирусами и т. д.). Это будет выполнять генная диагностика.

Открытие антисмысловых РНК привело к появлению качественно новой возможности — регуляции активности генома как собственного, так и привнесенного извне (например, вирусного). Это бурно развивающееся направление позволит обеспечить защиту от внешних инфекционных нуклеиновых кислот, а также от опасно активирующихся внутренних последовательностей, и приведет к созданию системы воздействий, которая может быть названа генной вакцинацией.

К сожалению, любое открытие, любое направление человеческой деятельности может быть направлено как во благо, так и во вред. Возможен и «генный антигуманизм».

Можно ожидать, что по мере накопления опыта генноинженерному воздействию будут подвергаться гаметы, зиготы и эмбрионы человека. Сегодня это представляется немислимым в первую очередь по

этическим соображениям. Но относительно недавно не менее этически немыслимо звучала возможность оплодотворения яйцеклетки *in vitro* и ее имплантация женщине. Сегодня же это — стандартная медицинская процедура (естественно, там, где она поставлена на должный методический уровень). В человеческом обществе этика меняется соответственно практическим возможностям. Поскольку любое вмешательство в генетический аппарат чревато непредсказуемыми последствиями, естественно, что при обсуждении проблем генной терапии особое внимание уделяют вопросам безопасности и этике.

В силу пока практически полной неопределенности последствий изменения генома репродуктивных клеток данное направление генной терапии в ближайшем будущем, по крайней мере в гуманных целях, не планируется. Сегодня его считают в основном недопустимым для реализации в измененного человека, хотя и обсуждают случаи целесообразности [46].

Что же касается изменения соматических клеток, то здесь можно выделить несколько аспектов.

Первый из них связан с техникой имплантации гена. На сегодня единственной перспективной системой считают псевдовироны ретровирусов, содержащие вектор на основе ретровируса. Такая уверенность основывается на очень высокой, приближающейся к 100 %, эффективности данной системы. Но ей присущи и очень серьезные недостатки, к которым относятся [47—51]:

— преимущественное (пока вообще исключительное) применение для клеток, допускающих изъятие из организма с последующей реимплантацией;

— ретровирусные остатки вектора загрязняют геном клетки;

— правый *LTR* вектора содержит потенциально опасный для канцерогенеза промотор;

— емкость ретровектора ограничена, и при необходимости введения нескольких генов загрязнение генома увеличивается;

— остающиеся в векторе элементы генома ретровируса могут приводить к нестабильности клеточного генома;

— промотор в составе *LTR* угнетает активность промотора заданного гена, вводимого на ретровекторе.

Ясно, что необходим поиск и более потенциально безопасных систем введения.

Вторая особенность связана с состоянием вектора в клетке. При каждом акте репликации вектора вероятность мутации повышается на несколько порядков по сравнению с таковой при репликации клеточного генома [52—54]. Поэтому целесообразнее использовать вообще не реплицирующиеся в клетках человека системы.

Наконец, с учетом того, что наиболее опасным является потенциальная возможность мутаций репродуктивных клеток под действием вводимых рекомбинантных молекул, система введения должна максимально ограничиваться соматическими клетками.

В отношении же этических проблем имеет место постепенный дрейф от почти полного неприятия к целесообразности с мерами предосторожности. Литература здесь колоссальная. Но наиболее принимаемая в последнее время оценка (которую в какой-то мере можно считать типичной) высказана Французским национальным комитетом по этическим проблемам в науке, согласно которой возможные мутации, связанные с введением в целях генотерапевтических мероприятий рекомбинантной ДНК, предлагается рассматривать как побочный токсический эффект терапевтического средства [46]. Выбирать-то ведь приходится всего лишь из трех возможностей — продолжить бездействием страдания человека до тех пор, пока их прервет милосердная смерть (ведь генная терапия предусматривается только в тех случаях, когда медицина бессильна); убить больного, чтоб не мучился, или помочь, с риском вызвать побочные нежелательные последствия. Так что гуманнее и этичнее?

Пройдет немного времени, и генная терапия войдет в повседневную жизнь развитых стран. Многие из того, что сегодня вызывает острые споры, будет казаться очевидным или наивным, возникнут новые проблемы, откроются новые горизонты. И поскольку, как показывает весь опыт человеческой цивилизации, прогресс остановить невозможно, люди будут хозяевами своего генома, т. е. своей биологической судьбы. Ни одно свершение не сравнится с таким событием и никакие прогнозы не в состоянии даже в самом приближенном виде оценить его последствия.

OBJECTIVES AND PROBLEMS OF GENE THERAPY

V. A. Kordium

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

Summary

A range of problems comprising the notion «gene therapy» in the broad and narrow sense has been analyzed. In the broad sense this field of research includes the following components: gene surgery, gene therapy itself; gene prophylaxis, gene diagnosis, gene vaccination, «gene antihumanism», gene engineering of gametogenesis, gametes and zygotes and prenatal gene engineering.

Taking into account the components and the range of problems solved by them, the full definition of the field of research has been suggested as well. In its full meaning gene therapy signifies genome identification per individuum followed by correction of hereditary cell apparatus of the whole organism or its separate tissues, elimination of diseases inherent in the patient and prevention of appearance of any novel pathologies with time and in accordance with desire (or in case of need) reconstruction (in human cells) of novel genetic information ensuring the emergence of potentially different phenotypes up to those completely absent in nature in the living and future generations.

1. Edwards R. G. Causes of early embryonic loss in human pregnancy // Hum. Reprod.—1986.—1, N 3.—P. 185—198.
2. Galjaard H. Biochemical diagnosis of genetic disease // Experientia.—1986.—42, N 10.—P. 1075—1083.
3. Neri G. Malformazioni fetali da alterazioni dell' assetto genico o cromosomico // Acta med. rom.—1986.—24, N 4.—P. 403—405.
4. Genetic diseases / D. Hollister, S. Krane, J. Myers et al. // Gene families collagen and other proteins.—New York etc., 1980.—P. 191—202.
5. US blood resources: an industry in crisis // Biotechnol. Bull.—1987.—6, N 2.—P. 5.
6. Stoltz J.-F. Transfusion sanguine et biotechnologie // Rev. ing.—1985.—38, N 296.—P. 31—32.
7. Cancer drug delivery deal for Cetus // Pract. Biotechnol.—1986.—7, N 6.—P. 8.
8. Природные и генно-инженерные белки — сходство и отличия / А. Я. Стронгин, С. И. Борухов, В. Г. Боруш и др. // Биотехнология.—1987.—3, № 3.—С. 325—331.
9. Yanchinski S. Boom and bust in the bio business // New Sci.—1987.—113, N 1544.—P. 44—47.
10. Retrovirus-mediated transfer of the human glucocerebrosidase gene to Gaucher fibroblasts / P. V. Choudary, J. A. Barranger, S. Tsuji et al. // Mol. Biol. and Med.—1986.—3, N 3.—P. 293—299.
11. Friedmann T. HPRT gene transfer as a model for gene therapy // Genet. Eng.—1985.—7.—P. 263—282.
12. Production of glycosylated physiologically «normal» human α_1 -antitrypsin by mouse fibroblasts modified by insertion of a human α_1 -antitrypsin cDNA using a retroviral vector / R. I. Garver, A. Chytil, S. Karlsson et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 4.—P. 1050—1054.
13. Transfer of the *E. coli* O⁶-methylguanine methyltransferase gene into repair-deficient human cells and restoration of cellular resistance to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine / K. Ishizaki, T. Tsujimura, H. Yawata et al. // Mutat. Res.—1986.—166, N 2.—P. 135—141.
14. Jolly D. J., Willis R. C., Friedmann T. Variable stability of a selectable provirus after retroviral vector gene transfer into human cells // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 4.—P. 1141—1147.
15. Kataoka H., Hall J., Karran P. Complementation of sensitivity to alkylating agents in *Escherichia coli* and chinese hamster ovary cells by expression of a cloned bacterial DNA repair gene // EMBO J.—1986.—5, N 12.—P. 3195—3200.

16. *Ledley F. D., Woo S. L.* Molecular basis of α_1 -antitrypsin deficiency and its potential therapy by gene transfer // *J. Inher. Metab. Disease.*—1986.—9, N 1.—P. 85—91.
17. *Human adenosine deaminase (ADA) expression in murine hematopoietic progenitors and CFU-S infected with simplified retroviruses* / B. Lim, D. A. Williams, R. Mulligan, S. H. Orkin // *Amer. J. Hum. Genet.*—1986.—39, N 3.—P. A209.
18. *Malissen B.* Transfer and expression of *MHC* genes // *Immunol. Today.*—1986.—7, N 4.—P. 106—112.
19. *Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA* / R. Miesfeld, S. Rusconi, P. J. Godowski et al. // *Cell.*—1986.—46, N 3.—P. 389—399.
20. *Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deaminase deficient human* / T. D. Palmer, R. A. Hock, W. R. Osborne, M. A. Dusty // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 4.—P. 1055—1059.
21. *Transfer of cloned human class I major histocompatibility complex genes into HLA mutant human lymphoblastoid cells* / Y. Shimizu, B. Y. Koller, D. Geraghty et al. // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6, N 4.—P. 1074—1087.
22. *Complete correction of the enzymatic defect of type I Gaucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer* / J. Sorge, W. Kuhl, C. West, E. Beutler // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 4.—P. 906—909.
23. *Valerie K., de Riel J. K., Henderson E. E.* Genetic complementation of UV-induced DNA repair in chinese hamster ovary cells by the *denV* gene of phage *T4* // *Ibid.*—1985.—82, N 22.—P. 7656—7660.
24. *Retrovirus mediated gene transfer of argininosuccinate synthetase (AS) into cultured rodent cells and human fibroblasts from citrullinemic patients* / P. A. Wood, J. C. Chao, A. L. Baudet, W. E. O'Brein // *Amer. J. Hum. Genet.*—1986.—39, N 3.—P. A226.
25. *Biological and biochemical consequences of the human ERCC-1 repair gene after transfection into a repair-deficient CHO cell line* / M. Z. Zdzienicka, L. Roza, A. Westerveld et al. // *Mutat. Res.*—1987.—183, N 1.—P. 69—74.
26. *Towards gene therapy for adenosine deaminase deficiency* / J. W. Belmont, J. Henkel-Tigges, K. Wager-Smith et al. // *Ann. Clin. Res.*—1986.—18, N 5—6.—P. 322—326.
27. *Williams D. A., Orkin S. H., Mulligan R. C.* Retrovirus-mediated transfer of human adenosine deaminase gene sequences into cells in culture and into murine hematopoietic cells *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 8.—P. 2566—2570.
28. *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 // *Nature.*—1987.—326, N 6110.—P. 295—298.
29. *Müller J. A.* Interspecies gene-transfer ban rejected // *Sci. News.*—1984.—126, N 18.—P. 278.
30. *Müller H.* Human gene therapy: possibilities and limitations // *Experientia.*—1987.—43, N 4.—P. 375—378.
31. *Costantini F., Chada K., Magram J.* Correction of murine β -thalassemia by gene transfer into the germ line // *Science.*—1986.—233, N 4769.—P. 1192—1194.
32. *A mouse model for sickle cell anemia* / E. M. Rubin, R. H. Lu, S. L. Cooper, Y. W. Kan // *Amer. J. Hum. Genet.*—1986.—39, N 3.—P. A216.
33. *Tissue specific expression of the human alpha-antitrypsin gene in transgenic mice* / R. N. Sifers, J. A. Carlson, S. Cliff et al. // *Nucl. Acids Res.*—1987.—15, N 4.—P. 1459—1475.
34. *Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector* / E. Robertson, A. Bradley, M. Kuehn, M. Evans // *Nature.*—1986.—323, N 6087.—P. 445—448.
35. *Wade N.* *UCLA* gene therapy raked by friendly fire // *Science.*—1980.—210, N 4469.—P. 509—511.
36. *Joyce C.* US approves gene therapy on humans // *New Sci.*—1985.—108, N 1476.—P. 700.
37. *Milewski E. A.* Discussions on human gene therapy // *Recombinant DNA technol. bull.*—1986.—9, N 2.—P. 88—148.
38. *Friedmann T.* Models for human gene therapy // *Biotechnol. diagn.: proc. Int. symp. impact biotechnol. diagn. (Rome, Apr. 16—18).*—Amsterdam etc., 1985.—P. 309—317.
39. *Delehanty J., White R. L., Mendelsohn M. L.* Approaches to determining mutation rates in human DNA // *Mutat. Res.*—1986.—167, N 3.—P. 215—232.
40. *Gall J. G.* Human genome sequencing // *Science.*—1986.—233, N 4771.—P. 1367—1368.
41. *Güttler F.* Diagnosis of inherited metabolic disorders by DNA analysis // *Med. Lab. Sci.*—1985.—42, N 4.—P. 326—332.
42. *Вилеңчик М. М.* Биологические основы старения и долголетия.— М.: Знание, 1980.—224 с.
43. *Meheus L., Coomans A.* Het probleem van veroudering: een overzicht van de voornaamste theorieën en de stand van het onderzoek // *Acad. analecta.*—1986.—48, N 3.—P. 61—77.
44. *Schwartz F. W.* Lebenswartung — Morbiditat — Mortalitat. Demographische Entwick-

- lungstrends und Konsequenzen für die ärztlichen Aufgaben // München med. Wochenschr.—1986.—128, N 5.—S. 68—72.
45. Three research groups produce DNA probes for cystic fibrosis // Drug Hicence Report.—1985.—N 12.—P. 55.
 46. Atlan H. Biotechnologies, homme et nature // Futuribles.—1987.—N 108.—P. 7—25.
 47. Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией ДНК онкогенных вирусов в полярную плазмиду эмбрионов. Сообщ. 2. Анализ роли инъецируемой ДНК / К. Г. Газарян, С. Д. Набирочкин, Е. Н. Набирочкина и др. // Генетика.—1987.—23, № 2.—С. 214—227.
 48. Набирочкин С. Д., Набирочкина Е. Н., Газарян К. Г. Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией ДНК онкогенных вирусов в полярную плазмиду эмбрионов. Сообщ. 1. Зависимость от генотипа эмбриона // Там же.—С. 202—213.
 49. Emerman M., Temin H. M. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors // Nucl. Acids Res.—1986.—14, N 23.—P. 9381—9396.
 50. Gélinas C., Temin H. M. Nondefective spleen necrosis virus-derived vectors define the upper size limit for packaging reticuloendotheliosis viruses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 23.—P. 9211—9215.
 51. Rhode B. W., Emerman M., Temin H. M. Instability of large direct repeats in retrovirus vectors // J. Virol.—1987.—61, N 3.—P. 925—927.
 52. Plasmid mediated mutagenesis of a cellular gene in transfected eukaryotic cells / C. R. Brandt, F. M. Buonaguro, J. K. McDougall, D. A. Galloway // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 2.—P. 561—573.
 53. Dougherty J. P., Temin H. M. High mutation rate of a spleen necrosis virus-based retrovirus vector // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 12.—P. 4387—4395.
 54. Inactivation of a transfected gene in human fibroblasts can occur by deletion, amplification, phenotypic switching, or methylation / M. M. Gebara, C. Drevon, S. A. Harcourt et al. // Ibid.—1987.—7, N 4.—P. 1459—1464.

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

Получено 12.01.88

УДК 577.113.5+575.113

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА: ПРОЕКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В. М. Кавсан

На страницах научных журналов еще продолжается дискуссия о том, нужно или не нужно расшифровывать первичную структуру всей ДНК наследственного аппарата человека, а уже ряд лабораторий США, Западной Европы и Японии получил гранты для начала работ, связанных с этой грандиозной задачей. Ее решение позволит значительно глубже понять и использовать молекулярные механизмы жизни. С одной стороны, это даст возможность распознать системы координированной регуляции экспрессии генов и локализовать гены, ответственные за длинный список наследственных болезней и, конечно, в первую очередь злокачественных новообразований. С другой стороны, определение последовательностей ДНК предоставит данные, имеющие огромный интерес сами по себе: они дадут основу для сравнения строения многих генов со сходными функциями, сопоставления организации целых семейств генов и последовательностей, ответственных за их активность, подойти к генетическому картированию индивидуальных личностей с наиболее высоким разрешением [1].

В течение последних двух лет в разных городах США прошло более десятка научных совещаний различного характера, посвященных обсуждению перспектив определения полной нуклеотидной последовательности генома человека. Одно из таких совещаний в г. Санта Фе, организованное DOE (Department of Energy), собрало чрезвычайно влиятельных ученых Соединенных Штатов в этой области естествознания. Среди них были У. Гилберт, Д. Балтимор, У. Водмер, М. Син-