

MOGUĆNOSTI I DOMETI TERAPIJE GENIMA

Ana Stanković¹ i Nikola Živković²

Sve je veći broj dokaza da su zapaženi individualizmi u farmakokinetici i farmakodinamici lekova genetski determinisani i da primarno obuhvataju metabolizam lekova i transportne procese. Dosadašnja saznanja, bazirana na sakupljenim dokazima, jasno pokazuju da rano prilagođavanje terapijskog režima genetskim osobinama bolesnika može pomoći da se izbegnu neželjena dejstva. Ovakav pristup znači individualizovanu, optimalnu terapijsku primenu lekova baziranu na doznom režimu koji je prilagođen individualnom genotipu. Genetska terapija predstavlja nameran prenos genetskog materijala u humane somatske ćelije u profilaktičke, terapijske ili dijagnostičke svrhe. Dok je tehnologija za transfer gena vrlo usavršena, etički principi vezani za ovaj postupak i dalje su predmet brojnih rasprava. Cilj genetske terapije je da koriguje genetske defekte i da uspostavi normalnu ćelijsku funkciju. Većina tehnika genetske terapije treba da omogući zamenu defektnih gena onima koji normalno funkcionišu. Idealni vektor bi trebalo da deluje na specifične ciljane ćelije, bez stimulacije inflamatornog odgovora domaćina. Osim toga, trebalo bi da omogući prenos gena različite dužine (dužine kodirajuće sekvencije terapijskih gena se znatno razlikuju i trebalo bi da postoji mogućnost ubacivanja regulatornih sekvencija za transdukciju i ekspresiju) i da se integriše u hromozom ćelije domaćina na tačno određeno mesto ili da ostane u vidu epizoma unutar nukleusa (ne sme se dopustiti da se ugradi nasumice u hromozome domaćina, jer bi to značilo poremećenu kontrolu ekspresije). Postojeći vektorski sistemi mogu se ukratko podeliti na virusne i nevirusne. U radu će biti izloženi osnovni principi primene gena u terapiji ateroskleroze, naslednih plućnih bolesti i malignih oboljenja. *Acta Medica Medianae* 2011;50(3):74-80.

Ključne reči: genetska terapija, geni, ekspresija, ateroskleroza, nasledne plućne bolesti

Klinika za onkologiju, Klinički centar Niš, Srbija¹
Univerzitet u Nišu, Institut za patologiju, Medicinski fakultet
Niš, Srbija²

Kontakt: Ana Stanković
Bul. dr Zorana Đinđića 48, 18000 Niš
E-mail: ana.stankovic@yahoo.com

ostvaruje svoje dejstvo. Poslednjih godina posebnu pažnju privlači veza između dejstva lekova i genetskog polimorfizma transportnih proteina, zatim ciljnih molekula preko kojih lekovi ostvaruju svoja dejstva, kao i receptora, enzima i proteina uključenih u intracelularnu signalnu transdukciju.

Uvod

Individualne razlike u farmakološkom odgovoru bolesnika na primenjene lekove dovode do ozbiljnih kliničkih problema, od kojih su najvažniji otežano lečenje, neželjene reakcije na lekove i interakcije među lekovima. Sve je veći broj dokaza da su zapaženi individualizmi u farmakokinetici i farmakodinamici lekova genetski determinisani i da primarno obuhvataju metabolizam lekova i transportne procese. Dosadašnja saznanja bazirana na sakupljenim dokazima jasno pokazuju da rano prilagođavanje terapijskog režima genetskim osobinama bolesnika može pomoći da se izbegnu neželjena dejstva. Ovakav pristup znači individualizovanu, optimalnu terapijsku primenu lekova baziranu na doznom režimu koji je prilagođen individualnom genotipu. Razlike u odgovoru bolesnika na terapiju određenim lekom primarno se mogu objasniti genetski uslovljenim razlikama u metabolizmu leka, njegovoj distribuciji u organizmu i ciljnim proteinima preko kojih lek

Genetska terapija

Genetska terapija predstavlja nameran prenos genetskog materijala u humane somatske ćelije u profilaktičke, terapijske ili dijagnostičke svrhe. Dok je tehnologija za transfer gena vrlo usavršena, etički principi vezani za ovaj postupak i dalje su predmet brojnih rasprava. Cilj genetske terapije je da koriguje genetske defekte i da uspostavi normalnu ćelijsku funkciju. Većina tehnika genetske terapije treba da omogući zamenu defektnih gena onima koji normalno funkcionišu. Egzogeni geni, nazvani transgeni, mogu biti preneti u somatske (organi) ili germinativne (jajna ćelija, spermatozoidi) ćelije primaoca.

Kod transfera gena u somatske ćelije, genetske promene se ne prenose na potomstvo. Suprotno, transfer gena u germinativne ćelije (što je zabranjeno u mnogim zemljama, uključujući SAD) rezultuje genetskim alteracijama novorođenih (1). Genetska terapija bolesti jedno je od najvažnijih dostignuća medicine, koje pruža velike mogućnosti

za lečenje kako naslednih tako i stečenih bolesti. Ovom terapijom postižu se ciljane promene na nivou ćelija, tkiva i organa, produženo dejstvo i poboljšanje terapijskog indeksa. Najvažnije je da se genetskom terapijom uklanja uzrok bolesti. Izuzetna dostignuća u molekularnoj medicini i genetici poslednje decenije omogućila su kliničku primenu tehnologije genetskog transfera. Inicijalno, u fokusu genetske terapije bile su nasledne bolesti kakve su cistična fibroza, teške imunodeficijencije, hemofilija, anemija srpastih ćelija, deficit adenozin deaminaze. Ispitivanja genetske terapije kasnije su se proširila na stečene bolesti, primarno maligne tumore i koronarnu bolest.

Iako je prva studija na bolesnicima započela 1990. godine, tek je pre nekoliko godina postignut jasan uspeh (2,3,4). Danas se sprovodi preko 600 kliničkih studija genetske terapije, od kojih se većina (63%) odnosi na terapiju karcinoma.

Sistemi za transfer gena

Najveća prepreka za razvoj genetske terapije kao efikasne kliničke metode bilo je pronalaženje pogodnog vektora koji bi preneo genetski materijal u ciljno tkivo. Iako je postignut znatan napredak i razvijeno više sistema za prenos gena, ovaj problem i dalje predstavlja ograničavajući korak u primeni genetske terapije na širi spektar oboljenja. Poželjne karakteristike idealnog vektora su da bude sposoban da:

1. vrši prenos i velikih transgena;
2. omogući in vivo transdukciju aktivnih, kao i ćelija u mirovanju;
3. deluje na ciljno tkivo uz minimalno lokalno oštećenje;
4. bude imunološki inertan;
5. se integriše u genom ćelije ili da perzistira u ćeliji kao epizom unutar nukleusa;
6. obezbedi kontinuiranu ekspresiju;
7. podleže posttransdukcijskoj regulaciji;
8. se može proizvoditi u velikim količinama u komercijalne svrhe (5).

Idealni vektor bi trebalo da deluje na specifične ciljane ćelije, bez stimulacije inflamatornog odgovora domaćina. Osim toga, trebalo bi da omogući prenos gena različite dužine (dužine kodirajuće sekvence terapijskih gena se znatno razlikuju i trebalo bi da postoji mogućnost ubacivanja regulatornih sekvencija za transdukciju i ekspresiju) i da se integriše u hromozom ćelije domaćina na tačno određeno mesto ili da ostane u vidu epizoma unutar nukleusa (ne sme se dopustiti da se ugradi nasumice u hromozome domaćina, jer bi to značilo poremećenu kontrolu ekspresije)(6). Uslovi za široku komercijalnu proizvodnju bi takođe trebalo da postoje. Vektor sa navedenim osobinama još uvek nije proizveden.

Postojeći vektorski sistemi mogu se ukratko podeliti na:

1. Virusne (npr. adenovirusi, retrovirusi)
2. Nevirusne (npr. ogoljena DNK, lipozomi).

Prednosti korišćenja nevirusnih vektora su sledeće: smanjena imunogenost, lakša široka proizvodnja, jednostavnost korišćenja i neograničena veličina gena koje mogu prenositi, a nedostaci neadekvatan genetski transfer i prolazna ekspresija (7,8).

Virusni vektori su trenutno najefikasniji prenosoci gena, koji omogućavaju produženu genetsku ekspresiju, ali su vrlo imunogeni. Postoji ograničenje u pogledu veličine genetskog materijala koji mogu prenositi (zbog veličine virusnog kapsida) i teško je obezbediti sigurnu proizvodnju većeg broja ovih vektora (9,10). Do danas, primena genetske terapije u lečenju nekardiovaskularnih oboljenja oslanjala se pre svega na upotrebu virusnih vektora, dok su se u studijama sprovedenim na kardiovaskularnim bolestima koristili nevirusni vektori, pre svega ogoljena DNK ili lipozomi.

Virusni vektori

Virusi su intracelularni paraziti, najčešće sa specifičnim afinitetom za određeni tip ćelija. Životni ciklus virusa čine dve odvojene faze: infekcija i replikacija. Tokom infekcije, virusni genom se unosi u ćeliju i ubrzo nakon toga stvara se veća količina virusnih regulatornih peptida. Nešto kasnije, sintetišu se i strukturni proteini, što ima za posledicu stvaranje novih virusnih partikula. Virusni vektori koji se koriste za genetsku terapiju imaju izmenjen genom i sadrže terapijske gene, umesto, na primer, sekvencija potrebnih za replikaciju virusa. Pojednostavljeno, aktivne regulatorne virusne sekvencije pripojene za terapijske gene unose se u ćeliju i formira se virusna partikula nesposobna za replikaciju, ali sposobna da prenese željeni genetski materijal u ciljnu ćeliju (10).

Svaki virusni vektor odlikuje se posebnim osobinama koje ga čine pogodnim za terapiju određenih bolesti. Tako na primer, da bi genetska terapija za zaustavljanje rasta tumorskih ćelija uvođenjem gena supresora rasta bila uspešna, neophodan je transfer gena u veliki broj abnormalnih ćelija (11). Druga strategija podrazumeva primenu gena koji nose informaciju za sintezu proteina, koji mogu vršiti konverziju antitumorskih prolekova u toksične hemikalije. Uspešnost terapije u ovom slučaju bila bi omogućena i uvođenjem gena u manji broj ćelija (12,13). Treći pristup terapiji tumora podrazumeva primenu onkolitičkih virusa, genetski izmenjenih virusa koji se mogu replikovati samo u tumorskim ćelijama. Rezultat je liza ćelija(14).

Svi virusni vektori mogu se podeliti u dve grupe u zavisnosti od toga da li se geni koje nose integrišu ili ne u genom ćelije domaćina. Retrovirusni vektori (uključujući lentaviruse) pripadaju prvoj grupi, dok adenovirusni vektori ostaju u vidu epizoma unutar nukleusa ćelije domaćina. Od svih virusnih vektora do danas su se najviše koristili retrovirusi (38%), zatim adenovirusi (25%), ali sve više se koriste i noviji vektori kao sto su herpes simpleks i pox virusi (15). Nerepli-kantni

virusni vektori (virusni vektori koji nisu selektivni za ćelije koje se replikuju) su: retrovirusi, adenovirusi, herpes simpleks virusi, pox virus, vakcinija virus i bakulovirus i ostali.

Nevirusni sistemi

Nevirusni sistemi razvijeni su da bi se izbegli neki bezbednosni problemi vezani za primenu virusnih vektora. Oni su jednostavniji za upotrebu, lakši za proizvodnju i ne generišu specifični imuni odgovor (16). Međutim, dosadašnja ispitivanja nisu dala zadovoljavajući klinički uspeh, ali se nastavlja sa istraživanjima. Nevirusni sistemi su:

1. Ogoljena DNK (plazmidi): 1990. godine otkriveno je da egzogeni geni mogu biti ekspimirani posle direktne injekcije u mišić. To je na primer dovelo do razvoja DNK vakcine koja stimuliše citotoksični odgovor T-limfocita.

Dosadašnja saznanja pokazuju da je dobar genetski transfer *in vivo* sa dugotrajnom ekspresijom u nekim tkivima, ali da je slab u ciljnim tkivima.

2. Katjonski lipidi: to su sintetski geni dobijeni iz komplesa DNK/lipidi (17). Oni daju dobru transfekciju *ex vivo* i korišćeni su za dobijanje CFTR (transmembranski receptor kod cistične fibroze) gena koji je unosen preko nosa i pluća bolesnika sa cističnom fibrozom (18). Međutim, ekspresija gena nije bila dovoljno duga za klinički uspeh. Progres u ovoj oblasti je mali.

3. Molekulski konjugati (kondenzovane DNK partikule) su u razvoju (19).

Genetska terapija prvobitno je razmatrana u sklopu terapije monogenских bolesti, kakva je cistična fibroza. U ovom slučaju bi mutirani gen trebalo zameniti zdravim. Međutim, da bi se to izvelo potrebno je pronaći vektor koji bi izvršio zamenu gena u velikom broju ćelija i to bilo zauvek ili na duži vremenski period. Ovakav vektor do danas nije proizveden. Primena genetske terapije u lečenju kardiovaskularnih bolesti podrazumeva prepoznavanje poremećaja u kojima prolazna genetska ekspresija može biti dovoljna da koriguje poremećaj. Na primer, ekspresija gena tokom svega 2–3 nedelje može biti sve što je potrebno da ubrza neovaskularizaciju ili onemogući restenozu. Osim toga, primenom gena koji kodiraju neki protein, a koji se normalno sekretuje u organizmu, može se iskoristiti njegovo parakrino dejstvo i time prevazići potreba za unošenjem virusnih vektora u veliki broj ćelija.

U nekoliko poslednjih godina postignut je znatan napredak u proizvodnji i obradi virusnih vektora, tako da to više ne predstavlja glavnu prepreku u odabiru vektora za određenu kliničku studiju. Vektori pomenuti u tekstu usavršavaju se i vrlo je verovatno da će se nastaviti sa otkrićima novih agenasa poboljšanih karakteristika. Od posebnog je značaja regulacija ekspresije gena nakon njihovog unošenja putem vektora u ćeliju. To bi omogućilo aktivaciju transgena kada je to potrebno, održavanje njihove ekspresije tokom

tačno definisanog vremena i gašenje. Nije moguće očekivati da se jedan vektor može primeniti u svim vidovima genetske terapije, uzimajući u obzir osobine koje bi trebalo da poseduje. Savremeni koncept primene vektora je sledeći: primena adenovirusa u terapiji tumora unošenjem gena zaduženih za onkolizu; ogoljene DNK za vakcinaciju kao i za isporuku gena za angiogenezu u lečenju kardiovaskularnih poremećaja; primena AAV gena za terapiju hroničnih oboljenja kakva je hemofilija (8,17,19).

Genetska terapija kod ateroskleroze

Genetske intervencije kod aterogeneze se mogu izvesti: direktno (*in vivo*) ili indirektno (*ex vivo*).

Direktni transfer gena obuhvata metode inhibicije ili pojačanja ekspresije ciljnih (target) gena direktnom primenom posredstvom virusa, lipida, oligonukleotida i rekombinantnom DNK. Velike nade se polažu u studije o vaskularnom remodelovanju i angioneogenezi promenom ekspresije faktora rasta genetskim transferom. Terapija genima može dovesti do stabilizacije aktivisanog, komplikovanog plaka i inhibicije sekundarnog stvaranja tromba u zidu. Smanjenje infiltracije makrofaga i inhibicija stvaranja tzv. penastih ćelija trebalo bi da smanji rizik od rupture i hemoragije sa disekcijom vulnerabilnog plaka. Polazeći od činjenice da azot monoksid (NO) inhibiše hemotoksičku aktivnost monocita i njihovo nagomilavanje u intimi tokom aterogeneze, transfer gena koji je odgovoran za transkripciju sintaze NO mogao bi da dovede do stabilizacije plaka (20). S obzirom na to da regrutovanje i infiltracija monocita u aterosklerotski plak uključuje bitnu ulogu proteina-1 koji privlači monocite (MCP-1), razvijena je i nova strategija antiMCP-1 terapije genima, transfekcijom mutiranog gena koji na Nterminalnom kraju ima deleciju (7ND) u skeletne mišiće. Ovaj transfer za posledicu ima smanjenje infiltracije/aktivacije monocita nakon povrede arterije i inhibiciju restenoze kod eksperimentalnih životinja nakon dilatacije balonom i ugrađivanja stenta (21).

Indirektni (*ex vivo*) metod podrazumeva izdvajanje ćelija koje imaju ulogu u ključnim metaboličkim aktivnostima, njihovu genetsku modifikaciju i reimplantaciju izmenjenih ćelija koje su osposobljene da stvaraju novi proteinski i/ili enzimski materijal ili da menjaju ekspresiju određenih gena. Konceptija ovog metoda je proširena i na sprečavanje kasnih komplikacija, kao što je hiperplazija nove intime nakon arterijske rekonstrukcije (endarterektomija, pemošćavanje, implantacija stenta) (22,23). Izdvojene endotelne ćelije bolesnika genetski se modifikuju u *in vitro* uslovima. Ubrzavanje ovih ćelija omogućava prekrivanje (endothelial seeding) arterijskog grafta i/ili stenta genetski modifikovanim endotelnim ćelijama. Kod porodične hiperholesterolemije izdvojenim ćelijama jetre dodaju se geni odgovorni za sintezu enzima koji

aktiviraju LDL receptore, posle čega se one vraćaju u jetru bolesnika. Na taj način se kod istog bolesnika genetskim intervencijama na više nivoa može eliminisati više faktora rizika (hipertenzija, hiperholesterolemija, hiperplazija nove intime) (24).

Genetska terapija naslednih plućnih oboljenja

Dva najčešća nasledna plućna oboljenja u Evropi su cistična fibroza i deficit alfa1 antitripsina. Cistična fibroza je autozomno, recesivno oboljenje izazvano mutacijom gena CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) lociranom na dužem kraku 7. hromozoma. Najčešća mutacija (70% slučajeva) je delecija tri para baza. CFTR gen modulira sekreciju proteina C1 (transmembranski kanal) kao odgovor na elevaciju intracelularnog adenozin monofosfata (AMP). Mutacije ovog gena dovode do gubitka ove funkcije u epitelnim ćelijama, što dovodi do povećane razlike transepitelnog potencijala. Ovaj gen je ekspimiran a nelokalizovan u epitelnim ćelijama respiratornog trakta, pankreasa, intestinuma i znojnih kanala. Bolest se klinički manifestuje primarno na plućima, gastrointestinalnom traktu i pankreasu. Pojednostavljeno objašnjenje nastanka respiratornih poremećaja je da defekt CFTR gena sprečava adekvatnu hidraciju oblažućeg fluida na epitelnim ćelijama, što dovodi do staze mukusa, opstrukcije i posledične infekcije i inflamacije. S obzirom na to da u preko 90% slučajeva smrt nastupa usled respiratornih poremećaja, genetska terapija ove bolesti fokusirana je na genetski defekt pluća. Ekspresija CFTR gena vrlo je niska, i samo oko 10% ćelija bi trebalo korigovati da bi došlo do normalizovanja bolesnikovog stanja (25).

Deficit alfa1 antitripsina je autosomno oboljenje u kojem hepatociti ne luče dovoljnu količinu ovog proteina u serum, mada se izvesna količina sintetiše i u monocitima (makrofagima). Dolazi do akumulacije alfa1 antitripsina u hepatocitima, a niskog serumskog nivoa. Pluća bivaju najviše oštećena ovim deficitom zbog gubitka anti-proteazne zaštite, dok u jetri dolazi do ispoljavanja toksičkih efekata usled nakupljanja alfa1 antitripsina. Najznačajnija klinička manifestacija je panacinarni plućni emfizem, koji se javlja u mlađem uzrastu, zahvatajući i razarajući predominantno donje partije pluća. Genetska terapija naslednih plućnih oboljenja obuhvata ex vivo i in vivo strategiju. Ex vivo strategija genetskog transfera u plućni parenhim do sada nije zadovoljila iz sledećih razloga:

1. vrlo je teško uzgajati epitelne ćelije respiratornog sistema u kulturi ćelija;
2. retrovirusi, koji se najviše koriste kao vektori, zahtevaju ćelije u deobi, dok su epitelne ćelije respiratornog trakta dobro diferentovane;
3. površina pluća je oko 140 m² uz 23 generacije bronhija;

4. s obzirom na to da se alfa1 antitripsin stvara u jetri, ciljani organ bi u ovom slučaju trebalo da bude jetra.

Većina istraživanja sprovodi se u okviru in vivo strategije koja uključuje transfer gena pomoću adenovirusnih vektora i plazmid-lipozom kompleksa, bilo intravenski ili putem aerosola. Adenovirusni vektori imaju prednost zbog efikasnosti genetskog transfera, a nedostatak im je njihova relativna toksičnost, odnosno izazivanje imunog odgovora i simptoma koji su slični prehladi (26). Plazmid-lipozom kompleks ima prednost zbog svoje lake produkcije i male toksičnosti, a nedostatak im je mala efikasnost genetskog transfera. Najnovije studije pokazuju prednost adenoasociranih virusnih vektora i hibridnih vektora plazmid-virus kod kojih se žele iskoristiti prednosti oba vektora (27).

Genetska terapija karcinoma

Za razliku od genetske terapije naslednih nemalignih bolesti, gde je u velikom broju slučajeva dovoljno genetski promeniti samo mali broj ćelija da bi došlo do remisije bolesti, genetska terapija karcinoma mora zahvatiti svaku maligno izmenjenu ćeliju da bi došlo do potpune iradikacije karcinoma. Naime, kod naslednih bolesti koje nastaju usled nedovoljne funkcije nekog gena i nedostatka proteina koje kodira dati gen, uspostavljanjem funkcije gena kod određenog broja ćelija doći će do kodiranja i stvaranja nedostajućeg proteina koji uspostavlja izgubljenu ravnotežu. Često u ovim bolestima nedostajući protein radi po principu "dovoljnosti", odnosno i male količine ovog proteina su u potpunosti dovoljne i sposobne da regulišu dati poremećaj, odnosno nema negativnog efekta u slučaju prekomerne ekspresije gena i pojave veće količine kodiranog proteina od dovoljne. Sa druge strane, ukoliko se genetskom terapijom ne unište sve ćelije karcinoma, preostale ćelije nastavljaju da se razmnožavaju i karcinom dalje evoluira. Genetskom terapijom karcinoma trebalo bi da se ukine funkcija onkogena ili da se restituiše funkcija tumor supresor gena, odnosno, defektan gen bi trebalo zameniti normalnim genom procesom nazvanim homologna rekombinacija. Nažalost, efikasnost i pouzdanost ovog procesa je na veoma niskom nivou. Za sada je in vitro i lokalno in vivo moguće samo insertovanje gena u ćeliju, ali ne i njegova zamena, tj. defektan gen ostaje i dalje na svom mestu. Iz tih razloga sadašnja genetska terapija karcinoma kreće se u 4 pravca:

1. transfer suicidalnog gena koji konvertuje inaktivni netoksični lek u citotoksični agent;
2. transfer gena koji kodiraju određene citokine i stimulišuće faktore u cilju povećanja imunog odgovora protiv tumora;
3. transfer tumor-supresor gena u cilju blokiranja tumorske proliferacije i
4. transfer "drug resistance" gena u hematopoetične matične ćelije u cilju povećanja rezistentnosti prema mijelosupresivnim hemioterapijskim lekovima (27,28).

Tumor supresor genetska terapija

Gubitak ili inaktivacija pojedinih gena može biti važan događaj u patogenezi karcinoma. Ovi geni suprimiraju ćelijsku proliferaciju i nazivaju se tumor supresor geni, antionkogeni ili recesivni onkogeni, s obzirom na to da postoji mutacija ili delecija oba alela u transformisanim ćelijama.

Produkti onkogeni su efektori transformacija. Oni aktiviraju ćeliju ka ispoljavanju transformiranog fenotipa i smatraju se pozitivnim regulatorima rasta. Produkti tumor supresor gena su negativni regulatori rasta i gubitak njihove funkcije vodi ka ekspresiji transformisanog fenotipa.

Jedan od tumor supresor gena je p53 koji je često mutiran u ćelijama karcinoma bronha. On je nuklearni fosfoprotein kodiran od strane gena koji se nalazi na kraćem kraku 17. hromozoma. Jedan je od najčešće izmenjenih gena u humanim malignomima i jasno je da ima ključnu ulogu u regulaciji rasta normalne ćelije. Normalni produkt p53 gena (wild type p53) ima funkciju u regulaciji DNA transkripcije i suprimiranju transformacije ćelije. Gubitak ili mutacija ovog gena vodi ka nenormalnoj genetskoj ekspresiji i konsekvntno ka neregulisanom ćelijskom rastu, iz razloga što mutirani p53 nema sposobnost suprimiranja transformacije ćelije. Wild type p53 ima ulogu u apoptozi ćelija sa oštećenim genetskim materijalom koji se ne može reparirati. Ukoliko postoje šanse za reparaciju oštećenog genetskog materijala wild type p53 zadržava ćeliju u G1 fazi omogućavajući genetsku reparaciju i tek nakon toga "dopušta" prelazak ćeliji u sledeću S fazu (DNA transkripcija) i dalje faze ćelijske deobe. Ukoliko se genetski materijal tokom bitisanja ćelije u G1 fazi ne može reparirati sledi apoptoza. Na taj način, wild type p53 štiti ćeliju od transformacije. Mutirani p53 nema ove sposobnosti tako da ćelija sa oštećenim genetskim materijalom nije zadržana u G1 fazi i nema šanse za reparacijom, nije podvrgnuta apoptozi i ulazi sa tako izmenjenim genetskim materijalom u dalje faze ćelijske deobe što konsekvntno dovodi do maligne alteracije ćelije. Izuzetno je važno da je wild type p53 najvero-

vatnije sposoban da inhibira rast ćelije bez obzira na vrstu genetske abnormalnosti koja je dovela ili će tek dovesti do maligne ekspresije. Ova sposobnost je iskorišćena kao osnova za primenu wild type p53 u genetskoj terapiji malignih bolesti. S obzirom na ulogu koju ima wild type p53 se pokazao kao veoma pogodan i potentan za genetsku terapiju. Njegov transfer se vrši pomoću rekombinovanih retro-virusnih i adenovirusnih vektora. Osnovna poteškoća i u ovoj genetskoj terapiji je nedovoljan broj transduciranih ćelija karcinoma za potpuno izlečenje. Ovde, takođe, igra određenu pozitivnu ulogu "bystander" efekat. Klinička ispitivanja daju nadu u rutinsku primenu tumor supresor genetske terapije in vivo. Tumor supresor genetska terapija daje zapažene rezultate i u kliničkim ispitivanjima u lokalnom tretmanu karcinoma bronha (adeno-virusni vektor se aplikuje bronhoskopski direktno u tumor) u uznapredovanom stadijumu. Terapijske mogućnosti tumor supresor genetske terapije sa p53 genom su u kombinovanju sa radio-terapijom i hemio-terapijom i u sistemskoj aplikaciji pomoću lipozoma (28).

Zaključak

Slično drugim, novim terapijskim konceptima i genetska terapija je puno obećavala, ali za sada je još u razvoju. Glavni izazov ostaje unošenje pravog gena na pravo mesto, u pravu ćeliju i obezbeđenje adekvatne ekspresije, uz minimalna neželjena dejstva. Iako se najviše radi na virusnim vektorima, smatra se da budućnost genetske terapije čine znatno bezbedniji nevirusni sistemi. Bilo je izvesnih promašaja u genetskoj terapiji, što je dovelo do sumnje i zabrinutosti u široj populaciji. Međutim, razvoj genetske terapije je realnost, kao i činjenica da ona ima svoje mesto u medicini. Važno je istaći da genetskoj terapiji treba pristupati sa izuzetno visokim stepenom naučne, stručne i etičke odgovornosti, jer se ne može isključiti mogućnost genetskih manipulacija opasnih za ljudsko zdravlje.

Literatura

1. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998 Mar 31; 97(12):1114-23. [[PubMed](#)]
2. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000 Apr 28; 288(5466): 669-72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*. 2000 ;24(3):257-61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol*. 2006 ;34(3):3370-54. [[CrossRef](#)]
5. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature*. 1998 Apr 30;392(6679 Suppl):25-30. [[PubMed](#)]
6. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther*. 2000 ;7(1):31-4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*. 2007 ;9(1): E92-E104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*. 2001 ;7(1): 33-40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Osten P, Grinevich V, Cetin A. Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handb Exp Pharmacol*. 2007 ;178:177-202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kimball KJ, Numnum TM, Rocconi RP, Alvarez RD. Gene therapy for ovarian cancer. *Curr Oncol Rep*. 2006 Nov;8(6):441-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Aghi M, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med*. 2000 May-Jun;2(3):148-64. [[CrossRef](#)]
12. Cao L, Kulmburg P, Veelken H, Mackensen A, Mezes B, Lindemann A, et al. Cytokine gene transfer in cancer therapy. *Stem Cells*. 1998;16(Suppl 1):251-60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Heise C, Kirn DH. Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest*. 2000 ;105(7): 847-51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boeckle S, Wagner E. Optimizing targeted gene delivery: chemical modification of viral vectors and synthesis of artificial virus vector systems. *AAPS J*. 2006 Dec;8(4):E731-E742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wolff J, Lewis DL, Herweijer H, Hegge J, Hagstrom J. Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol*. 2005 ;24(3):202-8. [[PubMed](#)]
16. Bertin S, Neves S, Pedroso de Lima M, Pierrefite-Carle V. Naked DNA and lipoplexes applications in cancer gene therapy. *Bull Cancer*. 2007 Mar;94(3): 243-52. [[PubMed](#)]
17. Bequet-Romero M, Ayala M, Acevedo BE, Rodriguez EG, Ocejudo OL, Torrens I, et al. Prophylactic naked DNA vaccination with the human vascular endothelial growth factor induces an antitumor response in C57Bl/6 mice. *Angiogenesis*. 2007; 10(1): 23-34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pietersz GA, Tang CK, Apostolopoulos V. Structure and design of polycationic carriers for gene delivery. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Dec;6(12):1285-98. [[PubMed](#)]
19. Eastman SJ, Scheule RK. Cationic lipid:pDNA complexes for the treatment of cystic fibrosis. *Curr Opin Mol Ther*. 1999 Apr;1(2):186-96. [[PubMed](#)]
20. Beasley D, Cooper AL. Constitutive expression of interleukin-1alpha precursor promotes human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 2):H901-12. [[PubMed](#)]
21. Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension*. 2003 Mar;41(3 Pt 2):834-41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2002 Feb;1(1-2):21-7. [[CrossRef](#)]
23. Robbie L, Libby P. Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;947:167-79. [[CrossRef](#)]
24. Radak Dj, Zivkovic M. Gene therapy for atherosclerosis. *Vojnosanit Pregl*. 2005 ;62(4):307-10. [[CrossRef](#)]
25. Zuckerman JB, Robinson CB, McCoy KS, Shell R, Sferra TJ, Chirmule N, et al. A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*. 1999 Dec 10;10(18):2973-85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wang D, Fisher H, Zhang L, Fan P, Ding RX, Dong J. Efficient CFTR expression from AAV vectors packaged with promoters - the second generation. *Gene Ther*. 1999 ;6(4):667-75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Perin B. Genska terapija. *Pneumon*. 2000 ;38(1-2):49-57.
28. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91(9):763-71. [[CrossRef](#)]

POSSIBILITIES AND RANGE OF GENE THERAPY

Ana Stanković and Nikola Živković

There is a growing body of evidence that the observed characteristics in pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs are genetically determined and that they primarily include drug metabolism and transport processes. Current acknowledgements, based on collected evidence, clearly show that an early adjustment of therapy regime to genetic characteristics of patients may help to avoid side effects. Such an approach stands for an individualized, optimal therapeutic use of drugs, based on the dose regime adjusted to an individual genotype. Gene therapy is the intentional transfer of genetic material into human somatic cells in prophylactic, therapeutic or diagnostic purposes. While the gene transfer technology is very advanced, ethical principles related to this procedure are still the subject of discussion. The goal of gene therapy is to correct genetic defects and to establish a normal cell functioning. Most of the techniques of gene therapy should enable the replacement of defective genes by those that function normally. The ideal vector should influence specific target cells, without stimulating the inflammatory response in the host cell. In addition, it should facilitate the transfer of genes of different length (the length of the code gene therapeutic sequences vary considerably and there should be a possibility of inserting regulatory sequences in transduction and expression) and integrate into the host cell chromosome at the exact location or to stay in the form of an episome within the nucleus (it should not be installed randomly in the chromosomes of the host, since it would mean a disturbed control of expression). The existing vector systems can be briefly divided into viral and non-viral. The paper presents the basic principles of the application of genes in the therapy of atherosclerosis, hereditary lung disease and cancer. *Acta Medica Medianae* 2011;50(3):74-80.

Key words: *gene therapy, genes, expression, atherosclerosis, hereditary lung disease*