ژن درمانی
دیروز. امروز. فردا

هدا رحیمی، رامین زند، هدیه مرادی تبریز، نوشین هاشمی صدرایی
مرکز پژوهش‌های علمی دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه
امروزه با پیشرفتهای اخیر می‌توان ادعا کرد که اگر کسی با ژنهای صحیح به دنیا نیامده باشد، ممکن است روزی قادر به خریداری آنها باشد.

ژن درمانی چیست؟

به‌طور خلاصه می‌توان گفت که ژن درمانی درمان بیماری‌های ژنتیکی و گاهی غیر ژنتیکی توسط معرفی ژنهای سالم به فرد بیمار است (۱).

از این تکنیک علاوه بر مقاصد درمانی در تهیه هورمونها یا داروها نیز استفاده می‌شود (۲). اصولاً ژن درمانی علاوه بر این‌که توانایی تولید پروتئین طبیعی را به فرد می‌دهد، امکان تولید پروتئین‌های مصنوعی که ساخته مهندسی پروتئین می‌باشد (پروتئین‌های تنظیم کننده ایمنی، رسپتورها یا لیگاندهایشان) را نیز فراهم می‌آورد.

ژن درمانی می‌تواند سلولها را به آثار سوی شیمی‌درمانی، عفونت یا پس‌زدن پیوند مقاوم سازد، سلولها را به پرتودرمانی حساس کند، پروتئین تقلبی متصل شونده به ویروس بسازد تا از عفونت ویروسی جلوگیری کند (نظیر کارهایی که در مورد HIV1 انجام شده است) و بیماران را از طریق ژنها ایمن سازد (۴، ۳).

تاریخچه ژن درمانی

ژن درمانی علم جوانی است و تاریخچه کوتاهی دارد. در سال ۱۹۸۸ کمیته مشاوران نوترکیبی DNA یا (Recombinant DNA RAC Advisory Committee) وابسته به NIH، نخستین رهنمون‌ها را برای انجام کارآزمایی بالینی در این زمینه ارایه داد. در ژانویهٔ ۱۹۸۹ پس از بررسی‌های طولانی انجام اولین مطالعه بالینی بر روی بیماران مبتلا به ملانوم بدخیم تصویب شد. البته قبل از این نیز مطالعاتی در این زمینه روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده بود اما این آزمایش، اولین مطالعه در این زمینه بر روی انسان به شمار می‌رفت. این آزمایش در سال ۱۹۸۹ با تزریق شاخص‌های ژنی بر روی این بیماران انجام گرفت (۷، ۶، ۵، ۳). با این آزمایش محققان در صدد برآمدند تا پروتکل مناسبی برای ژن درمانی آماده سازند و بدین ترتیب اولین پروتکل ژن درمانی برای

درمان بیماری نقص ایمنی مختلط شدید Severe Combined immunodeficiency (SCID، یک بیماری نقص ایمنی ناشی از کمبود آنزیم آدنوزین دآمیناز (ADA)، توسط محققین NIH طراحی شد اما از آنجایی که این پروتکل اولین پروتکل ژن درمانی محسوب می‌گردد، لازم بود از نظر اصول اخلاقی مورد بررسی دقیق قرار گیرد و خصوصیات زیر را دارا باشد:

۱ ـ روش درمانی دیگری برای درمان بیماری مذکور وجود نداشته باشد.

۲ ـ مطالعات و آزمایشات کارآیی لازم و ایمن بودن این روش را تأیید کرده باشند.

آنچه در آن زمان علیه ژن درمانی SCID مطرح شد، این بود که برای درمان کمبود ADA می‌توان از پیوند مغز استخوان استفاده کرد. میزان موفقیت در صورت تطابق نسبی HLA، ۵۶٪ تا ۷۴٪ است (۱۱، ۱۰، ۹، ۸) اما متأسفانه یافتن شخصی که از نظر HLA دارای تطابق مناسبی با بیمار باشد، کار دشوار و وقت‌گیری است و بیمار باید مدتها در انتظار یافتن یک دهنده مناسب به سر برد.

درمان دیگری نیز در سال ۱۹۹۰ توسط FDA (Food and Drug Administration) برای این بیماری مطرح گردید که آن نیز می‌توانست پذیرش پروتکل ژن درمانی این بیماری را دچار مشکل کند. این درمان عبارت بود از یک داروی جدید به نام PEG - ADA، که در حقیقت همان آنزیم ADA بود که آن را با (poly Ethylen Glycol)PEG کنژوگه می‌کردند (۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۶) اما این روش یک درمان قطعی و کامل نبود زیرا تزریق هفتگی این دارو الزامی بود و علاوه بر آن هزینه بالایی (۶۰ هزار دلار در سال) نیز دربرداشت (۱۵، ۱۲، ۱).

با این حال، در نهایت تصمیم بر این شد که به کودکانی که تحت ژن درمانی قرار می‌گیرند به‌طور همزمان PEG - ADA نیز داده شود (۱۲).

بعد از حل این مشکل، اذهان به سوی میزان خطر ژن درمانی معطوف گشت. مشکلی که بارها از طرف مقامات مختلف مطرح می‌گردید این بود که: « در نظر بگیرید یک ناقل ویروسی (حامل ژن) به‌طور تصادفی به ژنوم سلول میزبان وارد شود و در مجاورت یک انکوژن قرار گیرد و منجر به فعالیت آن انکوژن و در نهایت ایجاد تومور شود ». (ولی تمام اطلاعات موجود نشان می‌داد که رتروویروسهایی که توانایی همانندسازی خود را از دست داده‌اند، از این نظر بی‌خطر هستند و قرار بود برای ژن درمانی نیز با تغییراتی در ساختمان ژنی رتروویروسهای ناقل ژن، خاصیت همانندسازی آنها از بین برود.) (۱۲).

از سوی دیگر، یک محقق ایتالیایی به نام Bordignon نشان داد موشهایی که ژن ADA انسانی را دریافت می‌کنند، تا مدت ۳ ماه مقدار ADA آنها طبیعی می‌باشد و با این گزارش کارایی ژن درمانی نیز تا حدودی تأیید شد(۱۲).

سرانجام در ۱۴ سپتامبر ۱۹۹۰ انجمن FDA با پروتکل ژن درمانی موافقت کرد و در همان روز اولین ژن درمانی با تزریق داخل وریدی لنفوسیتهای T اصلاح شده (حاوی ژن ADA) به یک دختربچه چهار ساله آغاز گردید و پس از ششمین تزریق داخل وریدی تعداد لنفوسیتهای او به حد طبیعی بازگشت (۲۱،۲۰،۱۹،۱۸). این آزمایش از جذابیت و اهمیت خاصی برخوردار بود و این نه به دلیل موفقیت آزمایش در درمان

بیماری می‌باشد، بلکه به این خاطر است که در راه تحقق عملی ژن درمانی اولین گام برداشته شد.

از زمانی که پیوند مغز استخوان و سایر اعضا که امروزه یک درمان قابل قبول برای بسیاری از بیماری‌های تهدید کننده حیات به شمار می‌رود، برای اولین بار مطرح شد تا زمان گسترش و جاافتادن این روشها حدود ۲ دهه طول کشید. امروزه ژن درمانی نیز همین راه را می‌پیماید و تنها پس از گذشت ۷ سال این روش جای خود را به خوبی باز کرده است به طوری که NIH که روزی درباره تصویب اولین پروتکل ژن درمانی مردد بود، در حال حاضر سالی ۲۰۰ میلیون دلار برای تحقیقات وابسته به ژن درمانی هزینه می‌کند. این مبلغ معادل بودجه صنایع این منطقه است (۲۲).

فن ژن درمانی

پیش از انجام هرگونه ژن درمانی روی انسانها، عوامل متعددی باید در نظر گرفته شود:

۱ ـ ژن بیماری مربوط (ژن درمان کننده) باید کلون گردیده و بنابراین مترادف نوکلئوتیدهای این ژن باید شناخته شده باشد.

۲ ـ اعمال محصول ژن باید شناسایی گردیده باشد.

۳ ـ با انجام آزمایش و تزریق ژن به مدل‌های آزمایشگاهی باید از کارآیی و بی‌خطر بودن فن‌آوری به کار رفته اطمینان حاصل شود. بنابراین، سیستم انتقالی نباید هیچگونه اثر پاتولوژیک داشته باشد و نباید سبب برانگیختگی ایمنی ناخواسته گردد (۴،۱۳).

امروزه با روشهایی مثل؛

(Polymerase chain reaction) PCR

(Restricted Fragment Length Polymorphism) RFLP

clonning و western blotting

به راحتی می‌توان به ترادف نوکلئوتیدهای ژن مورد نظر پی برد. همچنین به ماهیت پروتئین ساخته شده توسط این ژن نیز می‌توان دست یافت اما آنچه در انجام یک عمل ژن درمانی مهم است، ایجاد تغییرات پایدار توسط انتقال ماده ژنتیکی به داخل سلول و در نهایت داخل ژنوم است. در واقع مشکل عمده ژن درمانی عدم انتقال کارآمد ژن و بیان دایمی آن در سلولهای سوماتیک می‌باشد.

اما قبل از این که به بحث درباره روشهای مختلف انتقال ژن به سلول پرداخته شود، ذکر چند نکته ضروری است:

۱ ـ ژن درمانی در یک بیماری که از نقص در یک ژن ایجاد شده باشد و آن ژن هم شناخته و کلون شده باشد، نسبت به بیماری دیگری که ناشی از نقص یا کمبود چند ژن یا قسمتی از یک کروموزوم باشد، آسانتر است (۱).

۲ ـ درمان یک بیماری مغلوب به شیوه ژن درمانی آسانتر است. زیرا در یک بیماری مغلوب تنها ورود ژن طبیعی برای درمان کافی است، در حالی که در بیماری‌های غالب معمولاً لازم است کپی جهش یافته ژن را نیز خارج کنیم، چرا که در اغلب بیمای‌های ارثی غالب، محصول ژن معیوب برای بدن مضر است و جایگزینی یک ژن معیوب با یک ژن سالم ضروری است. در چنین بیماری‌هایی لازم است که ژن تصحیح کننده به مکان اصلی خود در کروموزوم وارد شود تا بتواند توسط مکانسیم‌های کنترل تنظیم گردد، در حالی که در بیماری‌های مغلوب فقط حضور یک کپی تصحیح کننده ـ در هر جای ژنوم ـ

می‌تواند مفید و مؤثر باشد (۲۳، ۲).

در ژن درمانی لازم نیست تمام سلولهای بدن مورد درمان و انتقال ژن گیرند، زیرا اگرچه اطلاعات ژنتیکی همه سلولهای بدن مشابه است، یک ژن در گروه محدودی از سلولهای بدن بیان می‌شود و در ضمن بسیاری از سلولها می‌توانند نقص حاصل از یک کمبود یا جهش ژنتیکی را به نحوی جبران کنند (مانند کمبود ADA که تنها بعضی از اجزای سیستم ایمنی را دچار مشکل می‌کند در حالی که در اکثر سلولهای دیگر هم به همان میزان درگیر هستند) (۱).

روشهای انتقال ژن

انتقال ژن سالم به سلولهای بدن به دو صورت عمده قابل انجام است (شکل ۱) :

الف ـ انتقال هدفدار (targeted insertion)

ب ـ انتقال غیر هدفدار (nontargeted insertion)

الف ـ انتقال هدفدار

منظور از انتقال هدفدار جایگزینی ژن سالم، دقیقاً به جای کپی آسیب دیده آن است. این نوع انتقال:

۱ ـ احتمال عملکرد صحیح ژن سالم را می‌افزاید.

۲ ـ محصول ژن به مقدار لازم و کافی تولید می‌شود.

۳ ـ از احتمال قرارگیری ژن در محلهای نامناسب که باعث غیرفعال شدن یک ژن دیگر یا فعال گردیدن یک انکوژن می‌شود، می‌کاهد (۱).

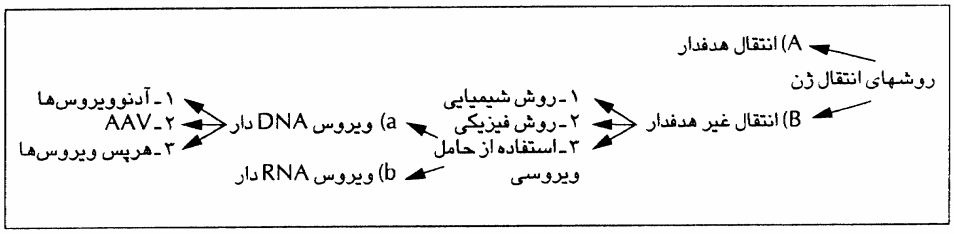
امروزه با به کارگیری روش نوترکیبی هـمولوگ (homologous recombination) احتمال این‌که ژن به جای واقعی خودش وارد شود، بیشتر است اما جالب توجه است که بارها مشاهده گردیده ژن وارد شده به ژنوم بدون توجه به محل ورودش به خوبی کار می‌کند.

ورود ژن تصحیح کننده در وسط یک ژن دیگر، عملکرد آن ژن را مختل خواهد کرد که این نیز یکی دیگر از معایب انتقال غیر هدفدار است ولی این موضوع نیز در سلول‌های سوماتیک اهمیت چندانی ندارد؛ چرا که بیشتر سلول‌ها دیپلوئید بوده و از هر ژن دو نسخه دارند و در ضمن هر عضو دارای تعداد بیشماری سلول است. البته باید به خاطر داشت که ژن‌های سرکوبگر رشد و نواحی کنترل فعال سازی انکوژن‌ها در این میان استثناهای مهمی هستند (۲۳).

در حال حاضر انتقال ژن به صورت هدفدار هنوز جامهٔ عمل به خود نگرفته و در حال مطالعه است.

ب ـ انتقال غیر هدفدار

انتقال غیر هدفدار به ۳ طریق قابل انجام است:



شکل ۱ ـ روشهای انتقال ژن

ب ـ ۱ ـ روش شیمیایی

در این روش باید نسخه‌های فراوانی از DNA حاوی ژن سالم را به تنهایی و بدون پوشش (naked DNA) و یا همراه با مادهٔ بارداری (مثل فسفات کلسیم، لیپیدهای مخصوص، کاتیونها یا ذرات طلا) روی سلول‌های دریافت کننده رها کرد. مواد شیمیایی مزبور غشای سلولی را تحریک کرده، باعث ورود DNA به درون سلول می‌شوند (۲۴، ۳، ۱).

در این روش اگر ژن مورد نظر شانس ورود به سلول را بیابد، برای مدت کوتاهی به خوبی بیان می‌شود اما به علت کارآیی پایین این نوع انتقال، معمولاً از هر هزار و گاهی صد هزار سلول فقط یک سلول شانس ورود ژن به داخل ژنوم خود را پیدا می‌کند.

بنابراین باید تعداد بی‌شماری از سلول‌های بیمار استخراج شده و به صورت in vitro مورد درمان قرار بگیرند تا تغییر مناسب جهت درمان میلیون‌ها سلول بیمار حاصل گردد (۲۶، ۲۵).

البته در این روش لازم نیست ژن مورد نظر حتماً وارد ژنوم شود ولی ژنی که وارد ژنوم گردد، از آنجایی که در تقسیمات سلول شرکت می‌کند، از پایداری بیشتری برخوردار خواهد بود. بعضی از محققین با تزریق مستقیم DNA به سلول‌های بافت عضلانی به نتایج مطلوبی رسیده‌اند (۱۸).

ب ـ ۲ ـ روش فیزیکی

این روش با استفاده از microinjection، پیپتهای شیشه‌ای و یا از راه قرار دادن سلول در معرض شوک الکتریکی انجام می‌پذیرد. روش microinjection می‌تواند خیلی سودمند باشد. در این روش تقریباً از هر ۵ سلول، یکی ژن بیگانه را دریافت می‌کند اما در هر بار فقط می‌توان یک سلول منفرد را مورد تزریق قرار داد؛ پس با توجه به وقت گیر بودن آن نمی‌توان از این روش در درمان بیماری‌ها کمک گرفت (۱). مزیت شوک الکتریکی در این است که سلول‌ها را به DNA نفوذپذیر می‌سازد اما در عین حال می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند (۱).

ب ـ ۳ ـ استفاده از حامل‌های ویروسی

سیستم انتقال ایده‌آل، سیستمی است که تعداد دلخواه ژن مورد نظر را به حداکثر سلول‌های هدف انتقال دهد و حامل ویروسی تا حدودی از چنین خاصیتی برخوردارند. از این رو اغلب پروتکل‌های جاری ژن درمانی بر پایهٔ انتقال ویروسی ژن استوار است. در ژن درمانی از هر دو نوع حامل ویروسی DNA دار و RNA دار می‌توان بهره جست که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند.

ب ـ ۳ ـ ۱ ـ ویروس‌های DNA دار

بسیاری از این ویروس‌ها با وجود امکان دریافت مادهٔ ژنتیکی بیگانه، از نظر تعداد نوکلئوتیدهایی که می‌توانند بپذیرند و نوع سلول‌هایی که می‌توانند مورد حمله قرار دهند، بسیار محدود عمل می‌کنند و در بسیاری از موارد ویروس‌های DNA دار نمی‌توانند مادهٔ ژنتیکی خود را به ژنوم سلول میزبان ملحق کنند (۲۶، ۲۵،) از میان ویروس‌های DNA دار آدنوویروس‌ها، ویروس‌های وابسته به آدنوویروس‌ها (Adeno Associated Viruses) یا AAV و هرپس ویروس‌ها (HSV) مورد مطالعهٔ بیشتری قرار گرفته‌اند و از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند.

A ـ آدنوویروس‌ها

آدنوویروس‌ها از دستهٔ ویروس‌های DNA داری هستند که سلول میزبان آنها الزاماً سلولی نیست که قابلیت تقسیم را داشته باشد و این از نکات قوت این ویروس‌ها در مقایسه با رتروویروس‌ها به شمار می‌رود. آنها می‌توانند ژن‌های بزرگ را حمل کنند و دیگر این‌که می‌توان تیترهای بالایی از این ویروس‌ها را به دست آورد. در ضمن، تاکنون هیچ ارتباطی بین عفونت آدنوویروسی و بدخیمی‌ها شناخته نشده است (۲۴ ، ۳) اما آدنوویروس‌ها معایبی نیز دارند که به قرار زیر است:

۱ ـ DNA آدنوویروس‌ها نمی‌توانند به ژنوم سلول میزبان ملحق شوند. بنابراین با تقسیم سلول، ژن انتقال نمی‌یابد و با مرگ سلول ژن انتقال یافته نیز نابود می‌شود.

۲ ـ آدنوویروس‌ها پاسخ ایمنی را بر می‌انگیزاند و آنتی‌بادی تولید شده توانایی ذرات ویروسی را در آلودگی سلول‌ها کاهش می‌دهد. همچنین امکان دارد در برابر سلولی که میزبان ویروس می‌باشد پاسخ ایمنی ایجاد شود.

۳ ـ هر چند که اقداماتی برای از بین بردن بیماری‌زایی ویروس انجام می‌گیرد ولی احتمال پاتوژن باقی ماندن ویروس و تخریب سلول همچنان وجود دارد.

۴ ـ ممکن است ژن در سلول میزبان روشن نشود و بیان نگردد (۲۴ ، ۱۳).

B ـ ویروس‌های وابسته به آدنوویروس‌ها AAV

این ویروس‌ها به خوبی قادر هستند مادهٔ ژنتیکی خود را به ژنوم سلول میزبان ملحق کنند و لزوماً هم احتیاجی به تکثیر سلول‌های هدف ندارند (۱۳،۲۴). تنها اشکالی که در کار با آنها مشاهده شده است، تنوعی می‌باشد که در پروتوتیپ‌های ویروس‌های تولید شده وجود دارد و کار با یک پروتوتیپ خاص را مشکل می‌سازد (۹،۱۳،۲۴).

C ـ هرپس ویروس‌ها

این ویروس‌ها با تمایلی که به سلول‌های عصبی دارند می‌توانند در آلوده کردن سیستم اعصاب مرکزی استفاده شوند (۳،۲۴).

ب ـ ۳ ـ ۲ ـ ویروس‌های RNA دار

همان‌طور که در مورد ویروس‌های DNA دار گفته شد، اکثر ویروس‌های RNA دار نیز از کارآیی لازم برای ژن درمانی برخوردار نیستند. یکی از علل آن را می‌توان عدم تلفیق RNA ویروس با DNA ژنوم سلول میزبان دانست. در این میان رتروویروس‌ها استثنا هستند. این ویروس‌ها با داشتن آنزیم رونویسی کنندهٔ معکوس (Reverse Transcriptase) قدرت تبدیل RNA خود به DNA و تلفیق آن با ژنوم میزبان را دارا می‌باشند؛ در نتیجه هنگامی که سلول تقسیم می‌شود، ژن وارد گردیده به ژنوم سلول میزبان نیز کپی می‌گردد و هر سلول دختری یک کپی ژن مورد نظر را خواهد داشت (۱۳).

در ضمن رتروویروس‌ها نسبت به ویروس‌های DNA دار می‌توانند مقادیر بیشتری از مادهٔ ژنتیکی بیگانه را حمل کنند (رتروویروس‌ها ظرفیتی بالغ بر V Kilo base دارند) و علاوه بر آن قدرت آلوده سازی گروه وسیعی از انواع سلول‌های بدن را دارا می‌باشند (۲۷،۲۸).

به دلایل مذکور رتروویروس‌ها در میان سیستم‌های انتقال ژنی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، از کارآیی بالاتری برخوردار می‌باشند اما رتروویروس‌ها معایبی هم دارند که به شرح زیر است:

۱ ـ این ویروس‌ها قادرند DNA خود را فقط به درون ژنوم سلول‌هایی که توانایی تقسیم را حفظ کرده‌اند وارد نمایند (۳). از این رو استفاده از رتروویروس‌ها بیشتر برای سلول‌هایی مانند سلول‌های بنیادین (Stem cells)، که دایم تقسیم می‌شوند، می‌توانند مفید و مؤثر باشند و به این ترتیب بسیاری از سلول‌ها که به طور طبیعی تقسیم نمی‌گردند ـ مثل نورون‌های بالغ ـ را نمی‌توان توسط حامل‌های رتروویروسی مورد ژن درمانی قرار داد (۱).

۲ ـ از آنجایی که رتروویروس‌ها به صورت ذاتی از نظر فیزیکی بسیار حساس و شکننده هستند، نمی‌توان تیترهای بالای رتروویروس‌ها را به دست آورد (۳).

۳ ـ باید یادآور شد که ویروس به طور سنتتیک و از اجزای خالص ساخته نشده و چون از سلول‌های زنده تولید می‌شود، بنابراین همیشه خطر ایجاد آلودگی با اجزای ناخواسته مثل خطر انتقال ویروس کمکی وجود دارد (۲۷).

۴ ـ مشکل بزرگتری که وجود دارد، احتمال سرطان‌زا بودن رتروویروس‌ها است. البته خطر سرطان‌زایی در مورد خود حامل‌ها بسیار ضعیف است اما اگر آنها اقدام به تکثیر در سلول‌ها کنند و به سلول‌های دیگر نیز سرایت نمایند، این میزان خطر افزایش می‌یابد (۱). البته امروزه با ایجاد تغییراتی در ساختمان رتروویروس‌ها استعداد تکثیر آنها را تا حد زیادی محدود می‌کنند، به طوری که تنها پوشش خارجی ویروس و پروتئین‌های ضروری مانند بعضی آنزیم‌ها باقی می‌مانند و اطلاعات لازم برای سنتز پروتئین‌های ویروسی از ژنوم رتروویروس حذف شده و ژن مورد نظر برای ژن درمانی جایگزین آن می‌گردد (۲۸، ۲۷).

لزوم وجود پوشش خارجی این است که ویروس بتواند داخل سلول شود و محتویاتش را به سیتوپلاسم سلول داخل کند و آنزیم‌های ویروسی نیز باعث تبدیل RNA به DNA شده و آن را در ژنوم سلول میزبان جایگزین می‌کنند که این نقطهٔ پایانی سرنوشت ویروس خواهد بود (۱۵).

مسأله‌ای که در نهایت در مورد حامل‌های ویروسی مطرح است، اختصاصی بودن آنها برای دسته‌های خاصی از سلول‌ها می‌باشد. این خصوصیت گاهی بسیار مفید واقع می‌شود؛ به‌عنوان مثال آدنوویروس‌ها تمایل به آلوده کردن سلول‌های اپیتلیال برونشی دارند و در نتیجه به‌عنوان یک سیستم ناقل برای ژن α_1 آنتی‌تریپسین (α_1 AT) در افرادی که به بیماری شدید ریوی بر اثر نقص این پروتئین (آمفیزم) مبتلا هستند، مطرح است (۲۳).

به منظور در تماس قراردادن سلول‌های هدف با حامل‌های حاوی ژن دلخواه، به ندرت می‌توان حامل‌ها را مستقیماً به داخل بافت مورد نظر وارد کرد، بدون این‌که سلول‌هایی از بافت را از بدن خارج نمود. در نتیجه سلولی که برای ژن درمانی انتخاب می‌شود باید:

اولاً ـ تحمل استخراج و بازگشت به بدن را داشته باشد.

ثانیاً ـ عمر طولانی داشته تا بتواند چند ماه یا

چند سال و ترجیحاً برای تمام عمر در بدن دوام بیاورد.

از آنجایی که سلول‌های مغز استخوان، پوست و کبد بیش از سایر سلول‌ها شرایط فوق را دارا هستند، انتقال ژن با استفاده از این سلول‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۲۶، ۲۵).

ژن درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادین مغز استخوان

همان‌طور که اشاره شد، اولین تجربهٔ انتقال ژن به انسان، انتقال ژن به لنفوسیت‌های T بود که با استفاده از یک ناقل رتروویروسی صورت گرفت (۲۶،۲۹) اما باید این نکته را در نظر داشت که عمر لنفوسیت‌ها در بدن کوتاه بوده و درمان با آنها باید به طور ممتد و مداوم انجام گیرد، به همین علت در درمان دایمی بیماری‌های خونی، باید ژن دلخواه را به سلول‌های اجدادی خونساز (HPC) وارد نمود تا ژن مورد نظر در تمام نسل‌های حاصل از این سلول‌های اجدادی بیان شود (۲۹). البته باید به این نکته نیز توجه داشت که جدا کردن HPC کاری دشوار بوده و یکی از مشکلات ژن درمانی به شمار می‌رود.

با این حال تلاش‌های زیادی جهت درمان بیماری‌هایی مانند SCID، تالاسمی و ... از این طریق صورت گرفته است. در زیر به تلاش‌هایی که در این زمینه به عمل آمده، اشارهٔ مختصری خواهیم کرد.

SCID

SCID بیماری است که بر اثر کمبود آنزیم ADA (Adenosine DeAminase) ایجاد می‌شود. این آنزیم در تمام سلول‌های بدن یافت می‌گردد ولی mRNA آن با غلظت بالاتری در تیموس و لنفوبلاست‌های T پیدا شده است. در نتیجه فقدان آن بیشترین اثر را روی عملکرد سیستم ایمنی دارد (۳۱،۳۰).

NIM جزو اولین مراکزی بود که در سال ۱۹۹۰ بر روی ژن درمانی SCID کار کرد (۳۳ ، ۳۲). کودک ۴ ساله‌ای که در سال ۱۹۹۰ تحت عمل ژن درمانی SCID قرار گرفت، امروز بدون هیچ مشکلی به مدرسه می‌رود.

تالاسمی

به لحاظ نظری، ژن درمانی سلول‌های مغز استخوان در درمان تالاسمی که ناشی از یک نقص ژنتیکی در ساختمان هموگلوبین می‌باشد، مفید است. در این میان βتالاسمی بهترین نامزد برای انجام ژن درمانی تصور می‌شود اما ژن درمانی این بیماران با مشکلاتی رو به رو است. از آن جمله می‌توان به این نکته اشاره کرد که جدا کردن سلول‌های بنیادین مغز استخوان تقریباً غیر ممکن می‌باشد و در نتیجه کارآیی ژن درمانی کاهش می‌یابد. البته راه حلی برای این مشکل پیشنهاد شده است و آن استفاده از تقویت کننده‌های ژن βگلوبین می‌باشد تا میزان بیان آن افزایش یابد.

علاوه بر بیان کافی این ژن، فعالیت طولانی مدت آن هم مهم است و در آخر مهمترین مشکلی که ژن درمانی βتالاسمی را دشوار می‌سازد، این است که بیان ژن βگلوبین باید دقیقاً تنظیم شود و با بیان ژن αگلوبین مساوی باشد، چرا که افزایش هر یک از زنجیره‌های α و βگلوبین می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند (۲۶ ، ۲۳).

تا سال ۱۹۹۶ آزمایشاتی که دربارهٔ ژن درمانی تالاسمی صورت گرفت فقط بر روی موش‌ها بود، ولی در سال ۱۹۹۶ موفقیت Beusechem و همکارانش در به دست آوردن نتایج مشابه در میمون‌ها که پریمات‌هایی شبیه انسان هستند، چشم‌انداز کاربرد این روش درمانی را در انسان روشن‌تر ساخت (۳۴).

در نقص چسبندگی گلبول‌های سفید، (Leukocyte Adhesion Deficiency) تحرک گلبول‌های سفید کاهش یافته است و در نتیجه فرد به عفونت‌های مکرر عودکننده مبتلا می‌شود. در هر صورت دانشمندان امیدوار هستند که بتوانند این نقص را به کمک ژن درمانی برطرف کنند (۱،۲۵).

ژن درمانی با استفاده از سلول‌های پوست

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، هدف از تغییرات ژنتیکی روی لنفوسیت‌ها یا سلول‌های مغز استخوان، اصلاح نقص‌های خود سلول‌ها یا نسل‌های تولید شده از آنها است ولی در مورد سلول‌های پوست وضع متفاوت می‌باشد.

سلول‌های پوست (کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها) برای تأمین هدف کاملاً متفاوتی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و آن عبارت است از سنتز و ترشح پروتئین‌هایی که در حالت عادی توسط یک نوع سلول خاص تولید می‌شوند ولی برای استفاده سایر سلول‌ها به درون خون می‌ریزند (۳۵،۳۶).

بنابراین، امید است بتوان با تغییر ژنتیکی سلول‌های پوست، گروهی از بیماری‌ها مانند هموفیلی، موکوپلی ساکاریدوز، آلزایمر و پارکینسون را درمان کرد که توضیح بیشتر دربارهٔ ژن درمانی این بیماری‌ها در ادامه خواهد آمد.

هموفیلی

تحقیقات نشان می‌دهد که فیبروبلاست‌های درم را می‌توان به خوبی وادار به تولید و ترشح فاکتور IX نمود. در یکی از آزمایش‌ها، ژن فاکتور IX انسان را توسط رتروویروس به فیبروبلاست‌های موش وارد کردند و مشاهده نمودند که سلول‌های حیوان فاکتور مزبور را به داخل خون رها می‌کنند. در این آزمایش، حدود ۱۵ روز بعد از پیوند زدن سلول‌ها، فاکتور انسانی از خون موش ناپدید گردید. علت این امر پاسخ دفاعی موش علیه این پروتئین بیگانه (فاکتور IX انسانی) است (۱).

بنابراین، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که ژن درمانی این بیماری احتمالاً در بیمارانی موفقیت‌آمیز است که مقادیری - هر چند ناچیز - از پروتئین مورد نیاز را بسازند وگرنه پاسخ ایمنی علیه محصول ژن تزریقی به کار می‌افتد (۱).

در ضمن، همان‌طور که پیش از این نیز ذکر شد، در درمان هموفیلی از کراتینوسیت‌های پوست نیز می‌توان استفاده کرد (۲۷،۳۷).

بیماری‌های ذخیره لیزوزومی

از جمله بیماری‌های که ژن درمانی آن با استفاده از فیبروبلاست‌های پوست مطرح شده است، بیماری‌های ذخیرهٔ لیزوزومی و در رأس آنها موکوپلی ساکاریدوزها می‌باشد. ژن درمانی موکوپلی ساکارویدوز تیپ I (سندرم هورلر Hurler) (۳۸) و تیپ II (سندرم هانتر Hunter) (۴۰ ، ۳۹) هر دو مورد آزمایش قرار

گرفته‌اند. در این آزمایش‌ها فیبروبلاست‌های حاوی ژن مورد نظر، به طور زیر جلدی به بیماران پیوند زده شد ولی متأسفانه بهبودی گذرا و موقتی مشاهده گردید، که دلیل آن را می‌توان پس زدن پیوند توسط بدن گیرنده دانست (۴۰، ۲۷).

از دیگر بیماری‌های ذخیرهٔ لیزوزومی که ژن درمانی آن توسط فیبروبلاست‌ها مورد توجه قرار گرفته است، بیماری گوشه (Gaucher) می‌باشد (۲).

آلزایمر

درمان بیماری‌های مغزی بسیار مشکل است، زیرا بسیاری از داروهای موجود در جریان خون نمی‌توانند از سد خونی ـ مغزی عبور نمایند. از طرفی نورون‌ها را هم نمی‌توان استخراج کرد و پس از تغییر ژنتیکی دلخواه به مغز برگرداند.

مسایل فوق سبب شد تا دانشمندان به این فکر بیفتند که شاید با تغییر ژنتیکی فیبروبلاست‌ها و پیوند آنها به مغز بتوان اختلالات نورون‌ها را تصحیح کرد.

نتایج اولیه امیدوار کننده بود و یک محقق از دانشگاه کالیفرنیا در San Diego، با پیوند فیبروبلاست‌های حاوی ژن NGF (Nerve Growth Factor) به مغز موش، نشان داد که این سلول‌ها قادر به ترشح NGF و ترمیم و تحریک رشد نورون‌ها در مغز جانوری می‌باشند.

این امر در نورون‌هایی روی داد که تخریب آن‌ها با از دست دادن حافظه در بیماری آلزایمر همراه است (۱).

پارکینسون

همان طور که می‌دانیم کاهش دوپامین در ایجاد بیماری پارکینسون نقش مهمی دارد. پیوندهایی که قادر به ترشح ال ـ دوپا هستند، در درمان بیماری پارکینسون مورد توجه قرار گرفته‌اند. این نکته نیز قابل ذکر است که طول عمر دقیق فیبروبلاست‌ها در پوست یا مغز هنوز مشخص نشده است (۱).

ژن درمانی با استفاده از سلول‌های کبد

به منظور انتقال ژن به سلول‌های کبدی از حامل‌های ویروسی استفاده می‌شود (۴۲،۴۱). با روشهای خاصی، سلول‌های کبدی توانسته‌اند حتی تا مدت ۴ ماه در بدن موش باقی بمانند و این نتایج نشانگر عملکرد مناسب سلول‌های کبدی اصلاح شده از نظر ژنتیکی در محل‌های اکتوپیک است به خصوص این‌که سلول‌های تغییر یافته بعد از کاشته شدن در زیر پوست یا داخل صفاق، پروتئین مورد نظر را به طور دایمی سنتز می‌کنند (۴۳، ۲۷).

علاوه بر انتقال به صورت in vitro ژن به سلول‌های کبدی و با استفاده از رتروویروس‌ها، روش‌هایی هم جهت انتقال به صورت in vivo ژن به سلولهای کبدی تحت مطالعه است که از آن جمله می‌توان به تزریق وزیکول‌های حاوی DNA همراه با پروتئین‌هایی که در هسته یافت می‌شوند (به منظور تسهیل حرکت DNA به سمت هسته)، به ورید باب موش اشاره کرد (۴۵، ۴۴).

امروزه دانشمندان در پی آن هستند که با ژن درمانی سلولهای کبدی بیماری‌های ناشی از نقص ژنتیکی این سلول‌ها را درمان کنند که از آن

جمله می‌توان به هیپرکلسترولمی فامیلی اشاره کرد.

هیپرکلسترولمی فامیلی

این بیماری که از شیوع بالایی نیز برخوردار است (۱ نفر در هر ۵۰۰ نفر)، دارای عواقب و عوارض زیاد قلبی ـ عروقی می‌باشد. در آزمایشی دانشمندان موفق شدند ژن LDL را به هپاتوسیت‌های خرگوش‌هایی که فاقد ژن بودند، وارد نمایند و آن‌ها را به‌صورت in vitro وادار به تولید رسپتورهای فعال از نظر بیولوژیک کنند (۱).

پروتکلی که برای ژن درمانی بیماران مبتلا به این نقص ژنتیکی در نظر گرفته شده است، بدین ترتیب است که یک لوبول از کبد بیمار را خارج کرده، سپس سوسپانسیونی از سلول‌های کبدی را فراهم می‌آورند و ژن رسپتور LDL را به این سلول‌ها وارد می‌کنند. آن گاه سلول‌های تصحیح شده را به ورید باب وارد می‌نمایند تا به پارانشیم کبدی اضافه شده و گسترش یابند (۷،۲۹).

ژن درمانی با استفاده از سلول‌های اندوتلیال

رتروویروس‌ها می‌توانند ژن‌های لازم برای محصولات ترشحی را به درون سلول‌های اندوتلیال سرخرگها حمل کنند. از آنجایی که این سلول‌ها خیلی بیشتر از فیبروبلاست‌ها در تماس با خون هستند، می‌توانند محصولات دلخواه را سریعتر وارد خون کنند (۴۶،۱۷).

در حال حاضر تحقیقات زیادی روی سلول‌های اندوتلیال عروق جهت ترشح فاکتور ضد انعقادی برای مهار تشکیل لخته‌های موضعی در جریان می‌باشد (۴۸).

همچنین از این سلول‌ها در ژن درمانی بیماری‌هایی مثل ایدز و آترواسکلروز استفاده می‌شود که در زیر به آن اشاره می‌گردد.

ایدز

آنچه که سبب می‌شود که ویروس مولد ایدز (HIV - 1) به لنفوسیت‌ها حمله کند، مولکول CD_4 است که در سطح لنفوسیت‌ها وجود دارد. HIV به این مولکول چسبیده، سپس وارد لنفوسیت‌ها می‌شود. در ژن درمانی ایدز دانشمندان سعی کرده‌اند ژن CD_4 را به سلول‌های اندوتلیال وارد کنند.

سپس این سلول‌ها، این مولکول را ساخته و به داخل خون ترشح می‌کنند. بنابراین HIV با این CD_4های آزاد متصل می‌شود و بدین ترتیب به دام می‌افتد و دیگر نمی‌تواند به لنفوسیت‌ها حمله کند (۴۹). البته در ژن درمانی ایدز، روش‌های دیگر مثل تداخل در تکثیر ژن HIV نیز به کار می‌رود (۱).

آترواسکلروز

ژن درمانی می‌تواند به منظور جلوگیری و درمان تنگی مجدد عروق پس از آنژیوپلاستی به کار رود. این تنگی مجدد به علت تکثیر سلول‌های اندوتلیال و یا عضلات صاف جدار عروق ایجاد می‌شود (۵۰).

تاکنون چندین پروتکل مختلف جهت ژن درمانی آترواسکلروز مطرح شده است که به شرح زیر می‌باشد:

۱ ـ انتقال فرم فعال ژن رتینوبلاستوم به

سلول‌های اندوتلیال ـ محصول این ژن از ورود سلول به مرحلهٔ S تقسیم سلولی جلوگیری می‌کند.

در نتیجه بیان این ژن می‌تواند تشکیل و گسترش انتیمای جدید را مهار کند (۵۱).

۲ ـ انتقال ژن نیتریک اکسید (NO) سنتاز به سلول‌های اندوتلیال ـ NO سنتاز تکثیر سلول‌های عضلهٔ صاف جدار عروق را مهار می‌کند؛ به علاوه مانع تجمع پلاکت‌ها و چسبیدن لکوسیت‌ها نیز می‌شود و وازودیلاتور هم است (۵۲،۵۳).

۳ ـ انتقال ژن تیمیدین کیناز هرپس ویروس (HSV - tk) به سلول‌های عضلهٔ صاف جدار عروق و سپس استفاده از گان سیکلوویر علیه سلول‌های آلوده (۵۳،۵۴).

۴ ـ افزایش بیان ژن gax در سلول‌های عضلهٔ صاف عروق ـ این ژن باعث مهار تکثیر سلول‌های عضلهٔ صاف جدار عروق می‌شود (۵۵).

ژن درمانی با استفاده از سلول‌های عضله مخطط

ژن درمانی سلول‌های عضلانی از آن جهت مورد توجه قرار گرفته است که آزمایشات متعدد نشان می‌دهد که با تزریق مستقیم DNA به عضلات مخطط موش و امکان انتقال به صورت in vivo ژن به عضله وجود دارد. در صورتی که در مورد سایر سلول‌ها چنین پتانسیلی به هیچ وجه وجود ندارد (۱).

بنابراین، امید زیادی در درمان دیستروفی عضلانی دوشن توسط ژن درمانی وجود دارد.

دیستروفی عضلانی دوشن (Duchenne's muscular dystrophy)

بیماران مبتلا به این بیماری به علت نقص در ژن دیستروفین با عدم ساخت این پروتئین مواجه هستند. در آزمایش‌های به عمل آمده، ژن دیستروفین را مستقیماً به عضلات موش‌های مبتلا به این بیماری تزریق کردند. با وجود این‌که DNA حاوی ژن مزبور به داخل ژنوم میزبان وارد نشده بود ولی برای چندین ماه پروتئین سازی می‌کرد. بنابراین محققین، به درمان این بیماری توسط ژن درمانی بسیار امیدوار هستند (۵۶،۵۷).

ژن درمانی با استفاده از اپی‌تلیوم دستگاه تنفس

نکته‌ای که درباره ژن درمانی اپی‌تلیوم دستگاه تنفس قابل توجه است این می‌باشد که در ژن درمانی این سلول‌ها از رتروویروس‌ها کمتر می‌توان بهره جست. چرا که همان طور که قبلاً نیز ذکر شد، این ویروس‌ها فقط می‌توانند DNA خود را به ژنوم سلول‌هایی که در حال تقسیم هستند، وارد کنند. حال آن که اکثر سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی بالغ هستند و دیگر تقسیم نمی‌شوند. به علاوه به منظور آلوده کردن تعداد کافی از سلول‌های اپی‌تلیال با رتروویروس‌ها باید تعداد قابل توجهی از این سلول‌ها را از ریه خارج و in vitro تحت اثر رتروویروس‌ها قرار داد. همین مشکلات باعث شد تا دانشمندان تصمیم بگیرند در ژن درمانی اپی‌تلیوم دستگاه تنفس از آدنوویروس‌ها کمک بگیرند، چرا که سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه تنفس، میزبان طبیعی این ویروس‌ها هستند (۵۸).

سیستیک فیبروزی

ژنی که در این بیماری ژنتیکی دچار جهش شده است ژن پروتئین تنظیم کنندهٔ داخل غشایی Cystic Fibrosis Transmembrane) Conductive Regulator (CFTR) است.

به علت نقص در این ژن تبادل یون‌ها از خلال غشای سلول‌ها مختل می‌شود. مطالعات به عمل آمده نشان می‌دهد که استفاده از اسپری‌های حاوی آدنوویروس حامل ژن CFTR می‌تواند منجر به بیان این ژن در اپی‌تلیوم تنفسی و درمان تظاهرات تنفسی سیستیک فیبروزی گردد (۵۹،۶۰).

آمفیزم ارثی

علت این بیماری نقص در تولید پروتئینی به نام α_1 آنتی‌تریپسین (α_1AT) (α_1Antitrypsin) است. این پروتئین آنزیم الاستاز را که سبب تخریب آلوئل‌های ریوی می‌شود، مهار می‌کند. بنابراین نقص در این پروتئین سبب تخریب آلوئل‌ها می‌شود و آمفیزم ایجاد می‌گردد.

تزریق داخل وریدی، α_1AT به طور هفتگی می‌تواند سبب بهبود وضعیت بیماران شود ولی این روش وقت‌گیر، گران و مشکل است. بنابراین، امید می‌رود که بتوان با استفاده از اسپری‌هایی که حاوی حامل ژن α_1AT هستند، بتوان به راحتی این ژن را به سلول‌های اپی‌تلیال تنفسی انتقال داد و به تولید طولانی مدت این پروتئین در بیماران دست یافت (۵۸،۶۱).

عفونت پنوموککی

انترلوکین ۱۲ (IL - 12) یک ترکیب مهم در دفاع ضد باکتری می‌باشد و در نتیجه ارسال ژن آن به ریه در موارد عفونت‌های پنوموککی می‌تواند دفاع میزبان را تقویت کند.

در آزمایشی که Greenberger و همکارانش با استفاده از اسپری CMV حاوی ژن IL - 12 (Cytomegalo virus) بر روی موش‌های مبتلا به پنومونی کلبسیلایی انجام دادند، بقای طولانی‌مدت حاصل شد (۶۲).

همان طور که دیدیم ژن درمانی تنها محدود به ترمیم نقص‌های ناشی از عملکرد نادرست ژنها نیست بلکه می‌تواند صفات مفیدی را نیز به سلول‌ها بیفزاید تا توانایی سلول‌ها را در مبارزه با بیماری‌ها افزایش دهد. از این خاصیت در ژن درمانی سرطان استفادهٔ زیادی می‌کنند.

سرطان‌ها

Rosenberg و همکارانش در انستیتو ملی سرطان نشان دادند که می‌توان ژن‌های خاصی را به لنفوسیت‌های ارتشاح یابنده در تومور (Tumor Infiltrating Lymphocytes) (TIL) وارد نمود تا آنها مبادرت به تولید فاکتور نکروز توموری (TNF) (Tumor Necrosis Factor) یا سایر سیتوکین‌ها نمایند. بدین ترتیب این سلول‌ها می‌توانند سبب تخریب تومور شوند و در متاستاز هم وقفه ایجاد کنند (۶۳،۶۴).

در یک مطالعهٔ دیگر ژن سیتوکین‌ها را به خود سلول‌های توموری وارد کردند، این مطالعه نشان داد که وقتی این سلول‌ها به بدن جانور برگردانده شوند، با ترشح این سیتوکین‌ها سیگنال‌هایی را به سیستم ایمنی می‌فرستند و یک پاسخ ایمنی علیه سلول‌های توموری بر می‌انگیزند (۶۵).

همچنین می‌توان در ایمونوژنیسیتهٔ سلول‌های

توموری تغییر ایجاد کرد (۲۹). به‌عنوان مثال یک محقق در سال ۱۹۹۲ موفق شد با وارد کردن ژنی به سلول‌های توموری که تولید یک آنتی ژن را در سطح این سلول‌ها سبب می‌شد، باعث برانگیختن سیستم ایمنی علیه این سلول‌ها شود (۱۸).

پیشنهاد دیگر این است که با وارد کردن ژن‌های خاص به سلول‌ها، از درمان‌های رایج تومورها (پرتودرمانی و شیمی درمانی) استفاده بیشتر و بهتری بکنیم. از آنجایی که پرتودرمانی بهترین درمان برای بیشتر تومورهای اولیه غیر قابل جراحی به شمار می‌رود، افزایش کارآیی پرتودرمانی می‌تواند روی کل آمارهای درمان سرطان اثر بگذارد. اخیراً با وارد کردن فن‌آوری ژن درمانی به حیطهٔ پرتودرمانی روش‌هایی برای افزایش کارآیی پرنودرمانی پیشنهاد شده است (۶۶).

یکی از اثرات تشعشعی که منجر به مرگ سلول‌های توموری می‌گردد این است که سبب شکسته شدن DNA می‌گردد. در حالت عادی بعضی از آنزیم‌ها سبب ترمیم DNA شکسته شده و در نتیجه بی‌فایده شدن پرتودرمانی می‌شوند. پیشنهاد گردیده که ژنی (antisense) را به این سلول‌ها وارد کنیم که با ژن آنزیم‌های ترمیم کننده اتصال یابد و مانع رونویسی از آن و در نتیجه مانع تولید این آنزیم‌ها شود. یک مزیت این روش این است که لازم نیست antisense برای مدت طولانی فعال باقی بماند چرا که اگر ترمیم DNA در ظرف ۴-۳ ساعت پس از پرتودرمانی صورت بگیرد، آسیب دایمی و پایدار در آن ایجاد می‌شود و بدین ترتیب سلول توموری از بین خواهد رفت (۶۷).

در درمان سرطان پستان و تخمدان، توانستند با وارد کردن ژنی به داخل سلول‌های مغز استخوان، مقاومت آنها را در برابر عوارض شیمی درمانی افزایش دهند و بدین ترتیب بیماران را با دوز بالاتری مورد شیمی درمانی قرار دهد (۱۸).

دو محقق دیگر را بر روی ژن درمانی تومورهای مغز انجام دادند. آنها نیز ژن HSV - tk را به سلول‌های توموری وارد کردند و سپس با همان مکانیسمی که دربارهٔ آترواسکلروز گفته شد از گان سیکلوویر سود جستند (۱۸).

سخن آخر

با بررسی مطالعات به عمل آمده می‌توان به دو نتیجهٔ مهم دست یافت:

اول این‌که اصلاح تنها تعداد کمی از سلول‌های بیمار هم می‌تواند آثار مشخصی روی سیر بالینی بیماری بگذارد.

دوم این‌که تعداد سلول‌هایی که ژن طبیعی را در آزمایشگاه پس از تزریقات ژنی حمل می‌کنند متفاوت است. بنابراین، شاید بهتر باشد این سلول‌ها را پیش از تزریق به بیماران به دقت بررسی و انتخاب نمود.

به هر صورت برای درمان بیماری‌ها دانشمندان باید نشان بدهند که ژن‌های درمانی آنها به خوبی بیان می‌شوند و برای مدت طولانی در بدن فعال باقی می‌مانند.

مسایل دیگر نظیر اهمیت تقویت کننده‌های خاص، همراه با بعضی از ژن‌ها در حامل‌های رتروویروسی مطرح است. به علاوه لازم است تا روش‌های بهتری برای بازگرداندن سلول‌های تغییر یافته به بدن کشف شود. همچنین روش‌های مناسب‌تری برای افزایش طول عمر

سلول‌های پیوندی و جهت جداسازی (ایزوله کردن) سلول‌های اجدادی مورد نیاز است.

تلاش‌هایی که برای جلوگیری از سرطان‌زایی حامل‌های رتروویروسی انجام می‌گیرد، بسیار مهم بوده و باید گسترش یابد. در کنار همه این موارد تحقیقات جهت انتقال ژن به مکان خاص (Site specific) نیز از اهمیت بالایی برخوردار است.

به هر حال این سوال همواره باقی است که آیا این ویروس‌ها که در شکل غیر تغییر یافته‌شان بیماری‌های ساده‌ای مثل سرماخوردگی تا بیماری‌های خطرناکی مثل سرطان را تولید می‌کنند بی‌خطر می‌باشند. جواب احتمالی مثبت است. تدارکات بسیار دقیق و ایجاد ویروس‌های غیر قابل تکثیر و کم کردن شانس آلودگی، خطر را به حداقل می‌رساند.

به این مسأله نیز باید توجه داشت که هدف درمان بی‌خطر، مادام‌العمر و ترجیحاً یک باره (و نه مکرر) می‌باشد.

و آنچه که در پایان از تمامی مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت این است که ژن درمانی علمی پویا و در حال رشد است. در سال ۱۹۹۰ وقتی Inder Verma ـ یکی از طرفداران سرسخت ژن درمانی ـ بهترین مقاله خود دربارهٔ ژن درمانی را ارایه داد، در پایان مقالهٔ خود این طور نوشت: « نباید فراموش کرد که ژن درمانی هرگز نمی‌تواند همهٔ بیماری‌های انسان را درمان کند. بیشتر بیماری‌های انسان غیر ژنتیکی هستند. بیماری‌های محیطی که ناشی از عوامل عفونی می‌باشند و به علت سطح پایین بهداشت، آلودگی آب‌های آشامیدنی و بدی تغذیه گسترش می‌یابند. خارج از حیطهٔ مهندسی ژنتیک می‌باشند. » (۱) ولی همان طور که اشاره شد امروزه پس از گذشت تنها حدود ۸ سال می‌بینیم که حتی بیماری‌های عفونی نظیر ایدز و پنومونی نیز با ژن درمانی قابل درمان هستند و بی‌شک دیری نمی‌پاید که ژن درمانی به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی رایج به کار خواهد رفت.

منابع:

1. Verma IM. Gene therapy. Sci Am. 1990; 263: 68 - 84.
2. Williamson B. Gene therapy. Gut. 1992; 33: 1585 - 86.
3. Dickler HB, Collier E, Bethesda. Gene therapy in the treatment of disease. J Allergy Clin Immunol. 1994; 96: 942 - 51.
4. Wivel NA, Walters L. Germ-line gene modification and disease prevention some medical and ethical prospectives. Science. 1993; 262: 533 - 38.
5. Culliton BJ. Gene therapy proposed. Science. 1990, 247: 1181.
6. Gershon D. Transfer study expands. Nature. 1990; 344: 483.
7. Anderson WF. Human gene therapy. Science. 1992; 256: 808 - 13.
8. Hilman BC, Sorensen RU. Management options: SCIDS with adensine deaminase deficiency. Ann Allergy. 1994; 72: 395 - 403.
9. Fischer A, Landais P, Friedrich W. Clinical practice: European experience of bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. Lancet. 1990; 336: 850 - 54.
10. Levinsky RJ. Mismatched bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. The great ormand street experience. In : Griscelli C, Vossen J (Eds). Progress in immunodeficiency research and therapy . Vol 1. Amsterdam; Elseiver Science publishers; 1989: 393.
11. Dror Y, Gallagher R, Wara DW. Immune

reconstitution in severe combined immunodeficiency disease after lectin - treated, T cell depleted haplocompatible bone marrow transplantation. Blood. 1993; 81: 2021 - 30.

12. Culliton BJ. ADA gene therapy enters the competetion. Science. 1990; 249: 975.

13. Pickler RH, Munro C. Gene therapy for inherited disorders. J Pediatr Nurs. 1995; 10: 40 - 47.

14. Hershfield MS, Chaffee S, Sorensen RV. Enzyme replacement therapy with polyethylene glycol - adenosine deaminase in adenosine deaminase deficiency: Overview and case reports of three patients, including two now recieving gene therapy. Pediatr Res. 1993; 33 (Suppl): S42 - S47.

15. Moen RC. Directions in gene therapy. Blood Cells. 1991; 17: 407 - 16.

16. Anderson WF. Profile: Gene doctor. Sci Am. 1990; 263: 33 - 33B.

17. Dlane G. Approval next time round? Nature. 1990; 345: 468.

18. Erickson D.Genes to order. Sci Am. 1992; 266: 112 - 14.

19. Culliton BJ. Gene therapy begins. Science. 1990; 249: 1372.

20. Ferrari g, Rossini S, Nobili N. Transfer of the ADA gene into human ADA - deficient T lymphocytes reconstitutes specific immune functions. Blood. 1992; 80: 1120 - 24.

21. Marwick Ch. Two, more cell infusions on schedule for gene replacement therapy patient. JAMA. 1991; 265: 2311 - 12.

22. Greenberg DS. Gene therapy: caution and hope. Lancet 1995; 346: 161.7.

23. Danks DM. Doctors and genetic manipulation. Med J Aust. 1919; 155: 732 - 35.

24. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. Science. 1993; 260: 929 - 32.

25. Louis D, Verma IM. An alternative approach to somatic cell gene therapy. Proc Nati Acad Sci USA. 1988; 85: 3150 - 53.

26. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. Science. 1989; 244: 1275 - 81.

27. Miller AD. Progress toward human gene therapy. Blood. 1990; 76: 271 - 78.

28. Miller AD. Retrovirus packaging cells. Hum Gene Ther. 1990; 1: 5.

29. Klein HG. Cellular gene therapy: an overview. J Clin Apheresis. 1994; 9: 139 - 41.

30. Hershfield MS, Mitchell BS. Immunodeficiency disease caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: Scriver CR (Ed). The molecular and metabolic basis of inherited disease. 7th ed New yourk: McGraw - Hill.

31. Hirschhorn R. Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deficiency. Pediatr Res. 1993; 33 (Suppl): S 35 - S41.

32. Moen RC. Human gene therapy: the future is now, the promise yet to come. Blood cells. 1991; 17: 417 - 24.

33. Thompson L. Stem cell gene therapy moves toward approval. Science. 1992; 255: 1072.

34. Victor W, Beusechem v, Valerio D. Gene transfer into hematopoietic stem cells of non human primates. Hum Gene Ther. 1996; 7: 1649 - 68.

35. Palmer TD. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 1330 - 34.

36. Morgan JR, Barrandon Y, Green H. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. Science. 1987; 237: 1476.

37. Fenjves ES, Gordon DA, Pershing LK. Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: Implications for epidermal function and gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86: 8803.

38. Palmer TD, Hock RA, Osborne WR. Efficient retrovirus mediated transfer expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deaminase - deficient human. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 1055.

39. Adinolfi M, McColl I, Chase D. Transplantation of fetal and correction of enzymatic deficiencies in patients with Hunter's or Hurler's disorders. Transplantation. 1986; 42: 271.

40. Dean MF, Muir H, Benson PF. Enzyme replacement therapy for fibroblast transplantation in a case of Hunter syndrome. Nature. 1976; 261: 323.

41. Wolff JG, Yee JK, skelly HF. Expression of retrovirally transduced genes in primary cultures of rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 3344.

42. Wilson JM, Johnston DE, Jefferson DM. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the wantanable heritable hyperlipidemic rabbit. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85: 4421.

43. Anderson KD, Thompson JA, Dipietro JM. Gene expression in implanted rat hepatocytes following retroviral - mediated gene transfer. Somatic Cell Mol Genet. 1989; 15: 215.

44. Wu GY, Wilson JM, Wu Ch. Targeting genes: Delivery and expression of a foreign gene driven by an albumin promoter in vivo. Hepatology. 1988 (abstr); 8: 1251.

45. Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Increased expression of DNA cointroduced the nuclear protein in adult rat liver. Science. 1989; 243: 375.

46. Nabel GE, Plautz G, Boyce FM. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. Science. 1989; 244: 1342.

47. Wilson JM, Birinyi LK, Salomon RN. Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. Science. 1989; 244: 1344.

48. Dickek DA, Neville RF, Zwiebel JA. Seeding of intravascular stents with genetically engineered endothelial cells. Circulation. 1989; 80: 1347.

49. Roember K, Friedman T. Concepts and strategies for human gene therapy. Eur J Biochem. 1992; 208: 211 - 25.

50. Lafont A, Geurot C, Lemarchand P. Which gene for which restenosis? Lancet. 1995; 346: 1442 - 43.

51. Chang MW, Barr E. Seltzer J, et al. Cytotoxic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. Science. 1995; 267: 518 - 22.

52. Von Der leyen HE, Gibbons GH, Morishita R. Genetherapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 1137 - 41.

53. Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular disease. Science. 1996; 272: 689 - 92.

54. Guzman RJ, Hirschowitz EA, Bordy SL. In vivo suppression of injury - induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex timidine kinase gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91: 10732 - 36.

55. Huehus TY. New ideas for restenosis research aired in Ohio. Lancet. 1996; 347: 1824.

56. Karpati G, Ascadi G. The potential for gene therpay in Duchenne muscular dystrophy and the genetic muscle disease. Muscle Nerve. 1993; 16: 1141 - 53.

57. Levitin C. Russia approves gene therapy research grants. Nature. 1996; 379: 384.

58. Hoffman M.New vector delivers gene to lung cell. Science. 1991; 252: 374.

59. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Tarpnell BC. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. Cell. 1992; 68: 143 - 55.

60. Rosenfeld MA, Chin - Shyan C, Seth P. Gene transfer to freshly isolated human respiratory epithelial cells in vivo using a replication deficient edenovirus containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulalor cDNA. Hum Gene Ther. 1994; 5: 331 - 42.

61. Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K. Adenovirus mediated transfer of recombinant α 1AT gene to the lung of epithelium in vivo. Science.1991; 252: 431 - 34.

62. Greenberger MJ, Kunkel SL, strieter RM. IL - 12 gene therapy protects mice in lethal klebsiella pneumonia. J Immunol. 1996; 157: 3006 - 12.

63. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K. Gene transfer into humans: Immunotherapy of patients with advanced melanoma using tumor infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N Engl J Med. 1990; 30: 570 - 78.

64. Gershon D. Transfer study expands. Nature. 1990; 344: 483.

65. Williams N. An immune boost to the war on cancer. Science. 1996; 272: 28 - 30.

66. McMillan TJ. Gene manipulation in radiotherapy. Lancet. 1996; 347: 632.

67. Suresh A, Tung F, Moreb J. Role of manganese superoxide dismutase in radioprotection using gene transfer studies. Cancer Gene Ther. 1994; 1: 85 - 90.