دکتر رضا فروغ
بخش جراحی دانشگاه واشنگتن
دکتر کورس معتمد
بخش فارماکولوژی دانشگاه واشنگتن

مروری بر ژن درمانی

قبل از اینکه به صحبت دربارهٔ ژن درمانی (gene therapy) بپردازیم، ضروریست که مروری بر بیولوژی مولکولی (Molecular Biology) و وجه‌های مختلف آن بیاندازیم زیرا، این توسعه و پیشرفت تکنیک بیولوژی مولکولی بود که زمینه را فراهم ساخت تا محققین متقاعد شوند که درمان از طریق دست‌کاری در ساختمان ژنتیک (genetic make up) موجود زنده در اواخر این قرن عملی خواهد بود. ژن درمانی به معنی مداوای موجود زنده از طریق طبیعی ساختن مجدد و یا بعبارتی ترمیم وظیفهٔ (function) ژنی آسیب دیده که پروتئین ناقص و نامطلوب را می‌سازد توسط جایگزینی ژنی مشابه ولی سالم به درون ساختار ژنتیکی فرد بیمار می‌باشد و در چند سال اخیر به شدت مورد توجه محققین قرار گرفته و تعداد فراوانی مقالات و کتب دربارهٔ این موضوع به چاپ رسیده است.

بیولوژی مولکولی چگونه بوجود آمد؟

بیولوژی یا زیست‌شناسی در تعریف بسیار ساده‌اش یعنی مطالعه حیات و شامل سؤالاتی جامع با ابعاد فلسفی از قبیل چگونگی پیدایش حیات بر روی کره زمین و یا سؤالاتی اختصاصی‌تر از قبیل چگونگی ارتباط و هماهنگی سلول‌ها و بافت‌های بدن با یکدیگر می‌باشد، منتهی این ابزارهای علمی و متدهایی که برای رسیدن به اهداف انتخاب می‌شوند به این شاخه از بیولوژی قالب و شکل مشخصی میدهند که مجموعاً به آن بیولوژی مولکولی یا ژنتیک مولکولی و یا مهندسی ژنتیک می‌گویند. اما دو کشف و یا بهتر بگوییم دو پیشرفت تکنولوژیک در اوایل سال ۱۹۷۰ میلادی سبب پاگرفتن و به طور جدی مورد بررسی واقع شدن این شاخه در بین محققین علم بیولوژی

گردید به طوری که در مدت بسیار کوتاهی دانشگاههای کشورهای مختلف جهان اقدام به تأسیس رشته بیولوژی مولکولی برای دوره‌های آموزش عالی نمودند. این دو پیشرفت عبارت از کشف و تخلیص آنزیم‌های بعضی باکتری‌ها بودند که خصلت مهم آنها بریدن ژن در نقاط مشخص و در نتیجه تقسیم آنها به قطعات کوچکتر بود. توجه بفرمایید که تأکید بر بریدن در نقاط مشخص است زیرا که به محقق این اجازه را می‌دهد که مانند یک خیاط که با استفاده از الگوهایش یک طرح مشخص را از پارچه درمی‌آورد وی نیز با قیچی آنزیمش طرح مشخصی را از ژن‌های بی‌قواره بوجود بیاورد و در نتیجه یک قدرت کنترل در بُرش و انتخاب ژن‌ها داشته باشد. این آنزیم‌ها را مجموعاً Restriction enzymes می‌گویند. پیشرفت تکنولوژیک دوم این بود که محققین توانستند قطعات به اصطلاح قیچی شده ژن‌ها را در داخل باکتری‌ها جاسازی کنند (Cloning) و باکتری‌ها ضمن تکثیر خودشان، نسخه‌های متعددی از ژن جاسازی شده و یا به عبارت علمی‌تر مهندسی شده را تولید کنند.

* * *

ژن چیست؟

وقتی که واحدهای ساختمانی کوچکی به اسم نوکلئوتیدها (nucleotides) به هم می‌چسبند تشکیل مولکول‌های بزرگ‌تری را می‌دهند که به آن DNA می‌گویند. صفات ارثی در این مولکول‌های DNA نهفته‌اند و یک ژن معمولاً یک پاره از این مولکول بزرگ DNA است که اطلاعات مربوط به یک پروتئین و یا صفت ارثی را حمل می‌کند و بطور میانگین یک ژن از حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتید ساخته شده است. این تعریفی که از ژن داده شد بسیار ابتدایی است ولی برای بحث در مورد ژن درمانی به همین اندازه کافی است که بدانیم فرضاً وقتی اشاره به ژن انسولین می‌کنیم منظور آن پاره (segment) از DNA موجود زنده است که بخاطر ترتیبی (order) که نوکلئوتیدهای آن کنار هم چسبیده‌اند، پس از فعل و انفعالات مشخص درون سلولی، عاقبت الامر پروتئینی به اسم هورمون انسولین را سنتز خواهد کرد. حال اگر برحسب اتفاق یکی از این نوکلئوتیدهایی که ژن انسولین را تشکیل می‌دهد بعللی معیوب شود که اصطلاحاً به آن جهش (mutation) می‌گویند، منجر به سنتز هورمون انسولین ناقص می‌شود و همانطوریکه می‌دانیم تولید هورمون انسولین ناقص سبب بیماری دیابت قندی می‌شود.

سنتز پروتئین از ژن:

همانطوریکه گفتیم اطلاعات ژنتیکی از پدر و مادر در بسته‌بندی هایی به اسم ژن به فرزند منتقل می‌شوند و در درون سلول‌های فرزند، این اطلاعات ابتدا تبدیل به مولکول‌هایی به اسم RNA میشوند و سپس در ادامه این خط سیر طبیعی RNA تبدیل به پروتئین مشخصی می‌شود که بقای موجود زنده را تضمین می‌کند. بطور خیلی خلاصه اکثر پروتئین‌ها در

دو گروه جای می‌گیرند: ۱- پروتئین‌های ساختمانی (structural proteins) که همانطور که از نام آنها استنباط می‌شود، داربست بدن موجود زنده را می‌سازند، بعنوان مثال پروتئین collagen از این گروه است. ۲- پروتئین‌های از نوع کروی (globular) که معمولاً به حالت محلول هستند و وظایف حیاتی مختلفی را بازی می‌کنند و بعنوان نمونه آنزیم‌ها در این گروه طبقه‌بندی می‌شوند. بررسی تمام فعل و انفعالاتی که برای تحرک و ادامه این خط سیر (DNA(gene)→RNA→Protein) لازم است در این مقاله ذکر و مورد تجزیه و تحلیل قرار نمی‌گیرد بلکه تنها اشاره و توضیح درباره عناصر کلیدی یک ژن داده خواهد شد که تنظیم و کنترل این عناصر در مهندسی ژنتیک و در نهایت در تضمین موفقیت ژن درمانی فوق‌العاده ضروری و اساسی است. این عناصر عبارتند از:

الف) Promoter: به قسمتی از ژن گفته می‌شود که با آنزیم RNA Polymerase شناسایی شده و پس از اتصال به آن، بقول معروف چراغ سبز برای شروع سنتز RNA پیغامبر (RNA_m) از آن ژن بخصوص را روشن می‌کند. بنابراین می‌بینیم که Promoter ژن، یکی از عناصر کلیدی در فعال ساختن یک ژن می‌باشد و در مهندسی ژنتیک انتخاب Promoter مناسب بسیار مهم است. Ptomoterها بطور تخمینی از ۲۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید تشکیل شده‌اند.

ب) Poly A tail: زمانی که سنتز RNA_m شروع شد می‌بایستی در مقطعی که انتهای آن ژن مخصوص است خاتمه یابد و معمولاً عنصری به اسم (transcriptional stop signal) چراغ قرمز را برای توقف سنتز RNA_m روشن می‌کند. در این مقطع معمولاً یک زنجیری از باز آدنوزین به انتهای RNA_m اضافه می‌شود که اصطلاحاً به آن Poly A tail می‌گویند و حضور Poly A tail مثل ردپایی است برای محققین بیولوژی مولکولی که از روی آن انتها و در نتیجه حد و مرز یک ژن را حدس بزنند.

پ) enhancer: عنصر دیگری که در تنظیم سنتز RNA یک ژن نقش کلیدی را دارد و در چند سال اخیر کشف شده است، enhancer یا افزایش دهنده نام دارد. Enhancer را می‌توان به آمپلی‌فایر یک دستگاه ضبط صوت تشبیه کرد. بعبارت دیگر enhancer طبق یک مکانیسم پیچیده مقدار سنتز RNA_m ژن را چندین برابر افزایش می‌دهد. در اینجا بد نیست به عنصر کنترل کننده دیگری نیز که اخیراً کشف شده، اشاره کنیم که وظیفه‌ای کاملاً متضاد با enhancer دارد و این عنصر خاموش کننده (Silencer) نامگذاری شده است.

خاموش کننده طبق مکانیسم پیچیده‌ای سنتز RNA_m را تقلیل می‌دهد. هرچند که باید متذکر شویم این عنصر خاموش کننده در ژن‌های مهندسی شده برای استفاده در ژن درمانی نقش مهمی به اندازه enhancer ندارد. ولی گروه اقلیتی از محققین توجه فراوانی به نقش این عنصر خاموش کننده در تنظیم و تحرک ژن در رابطه با سنتز RNA_m آن ژن معطوف نموده‌اند.

محققین این عناصر کلیدی ذکر شده را به کمک آنزیم‌های restriction از محیط طبیعی‌شان یعنی اسیدهای نوکلئیک فرضاً انسانی و یا ویروس‌های حیوانی جدا نموده و سپس به کمک گروه دیگری از آنزیم‌ها به اسم Ligase آنها را به پلاسمیدها (plasmids) اتصال می‌دهند. پلاسمیدها در تعریف بسیار ساده‌شان متشکل از یک حلقه DNA هستند که بدون اتکا و مستقل از کروموزوم سلولی (بعنوان یک واحد مستقل) تقسیم و تکثیر (replicate) می‌شوند. پلاسمیدها در طبیعت معمولاً در باکتری‌ها وجود دارند و معمولاً ژن‌هایی را حمل می‌کنند که سبب مصونیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند. اتصال عناصر کلیدی مثل Poly A tail, enhancer, promoter به یک پلاسمید که در ماهیت اصلی آن فقط مقاومت به آنتی‌بیوتیک را سبب می‌شد این اجازه را می‌دهد که قابلیت پذیرفتن و بیان (expression) پروتئین‌های جانوری را داشته باشد. معمولاً پس از اینکه ژن حیوانی مورد نظر در چنین پلاسمید دست کاری شده که اصطلاحاً expression vector نامیده می‌شود، قرار داده شد آنگاه مسئله انتخاب بهترین راه معرفی و انتقال این حامل بیان به درون سلول‌های حیوانی که در ظروف آزمایشگاهی کشت شده‌اند و به قصد تکثیر و سنتز پروتئین ازاین ژن مهندسی شده برای مرحله آخر که پیوند به جانور می‌باشد، باید مورد بررسی قرار بگیرد.

وقتیکه واحدهای ساختمانی کوچکی به اسم نوکلئوتیدها به هم می‌چسبند تشکیل مولکول‌های بزرگتری را می‌دهند که به آن DNA می‌گویند. صفات ارثی در این مولکول‌های DNA نهفته‌اند و یک ژن معمولاً یک پاره ازاین مولکول بزرگ DNA است که اطلاعات مربوط به یک پروتئین و یا صفت ارثی را حمل می‌کند و به طور میانگین یک ژن از حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتید ساخته شده است.

طرق انتقال حامل بیان به درون سلول‌های کشت شده:

متدهای مختلفی برای انتقال DNA نوترکیب به درون سلول ابداع شده که هدف اصلی آنها در بهتر انتقال دادن این DNA نوترکیب به درون سلول است. بعنوان مثال متد کلاسیک انتقال DNA به درون سلول با استفاده از کلسیم بوده است (calcium phosphate transfection). معمولاً یک سلول از بین یک

هزار و یا گاهی یک میلیون سلول، از این طریق DNA نوترکیب را پذیرا می‌شوند. مهمتر اینکه نوع سلول نیز در این پذیرایی نقش عمده‌ای را بازی می‌کند. به این معنی که سلول‌های فیبروبلاستی که قابل انعطاف‌تر هستند آسان‌تر DNA نوترکیب را پذیرا می‌شوند، در حالیکه سلول‌های اندوتلیال که دیواره درونی رگ‌های خونی را فرش می‌کنند و یا سلول‌های بنیادین (stem cells) که بالاخره سلول‌های خونی و ایمنی را می‌سازند بعلت ظرافت و آسیب پذیری‌شان قابل استفاده برای تکنیک calcium phospate transfection نیستند.

در چند سال اخیر استفاده از رتروویروس‌ها بعنوان حامل‌های بیان بخاطر **الف** - بازده بهتر در انتقال حامل بیان و **ب** - قابلیت معرفی حامل بیان به انواع مختلف سلول‌ها بعنوان متد مورد علاقه و ایده‌آل طرفداران فراوانی در بین علاقمندان به ژن درمانی پیدا کرده است. در دو سال اخیر علاقمندان به ژن درمانی توجه خود را به ویروس دیگری به اسم آدنوویروس بعنوان ناقل حامل بیان معطوف نموده‌اند ولی از آنجایی که قریب به تمامی اطلاعات حاصله از آزمایشات انجام شده در زمینه ژن درمانی بر روی انسان‌ها با استفاده از حامل بیان از نوع رتروویروسی می‌باشد بحث را با توضیح دربارهٔ این حامل‌های بیان ادامه می‌دهیم.

بیولوژی رتروویروس‌ها:

مطالعه ساختمان و بیولوژی رتروویروس‌ها خود شاخه‌ای مستقل و گسترده از علم ویروس شناسی است و از آنجایی که ویروس سبب بیماری ایدز می‌شود و همچنین اکثر ویروس‌هایی که پتانسیل سرطان‌زایی (oncogenic) دارند به این خانواده از ویروس‌ها تعلق دارند، مقالات فراوانی در زمینه بیولوژی این ویروس‌ها موجود است. بطور خلاصه پس از اینکه ویروس به غشاء سیتوپلاسمی سلول مناسب چسبید و اسید نوکلئیک آن که از نوع RNA است به درون سیتوپلاسم سلول میزبان انتقال یافت، با استفاده از یک آنزیم ویروسی به اسم reverse transcriptase، اسید نوکلئیک خود را به نوع DNA تبدیل می‌کند و این DNA پس از انتقال به هسته سلول طبق یک مکانیسم پیچیده برای همیشه جزیی از اسید نوکلئیک میزبان میشود. این فرم ویروس که به نام پرووویروس هم معروف است سپس دو نوع RNA را می‌سازد. نوع اول که اسیدنوکلئیک‌ها و نوع دوم که پروتئین‌های مختلف از جمله پوشش ویروسی (envelop) آن دسته از رتروویروس‌های جدیدی را که در شرف فرم گرفتن می‌باشند را می‌سازند. از نظر ساختمان فیزیکی رتروویروس‌ها دارای ۳ ژن ضروری به اسامی (env ،pol ،gag) هستند که مابین دو LTR (Long Terminal Repeats) ویروس واقع شده‌اند. LTR ویروس در یک تعریف بسیار ساده کاشانه عنصر کلیدی promoter است. محققین ژن درمانی به کمک آن restriction enzymeهایی که اشاره گردید این ۳ ژن را از ویروس حذف نموده و در ازای آن‌ها محیطی را فراهم کرده‌اند که ژن موردنظرشان رامی‌توانند جایگزین کنند. بنابراین ژن مورد نظر در زیر

کنترل promoter ویروس آماده بهره‌برداری می‌شود. در همین رابطه محققین سلول‌هایی از نوع فیبروبلاستی موش (NIH 3T3) را طوری مهندسی نموده‌اند که دیگر پروتئین‌های لازم برای بسته‌بندی ویروس از قبیل پروتئین env را تولید می‌کند. این سلول‌های مهندسی شده را سلول‌های بسته‌بندی کننده (packaging cell line) می‌نامند زیرا که آن DNA نوترکیب را پس از دریافت تبدیل به ویروس نوترکیب نموده و به خارج از سلول در ظرف کشت آزمایشگاهی ترشح می‌نمایند. محقق سپس تیتر این ویروس‌های نوترکیب را اندازه‌گیری نموده و معمولاً تیتر بین $۱۰^{۵} \times ۵$ تا $۱۰^{۷} \times ۱$ ویروس/ml قابل استفاده برای کشت موفق (infection) و انتقال DNA نوترکیب از طریق ویروس به سلول مورد نظر بیماران که بعنوان مثال می‌توانند لنفوسیتها (lymphocytes)، هپاتوسیت‌ها یا فیبروبلاستهای پوست (skin fibroblast) باشد. به این نکته مهم باید توجه داشت که تمامی این مراحل که تا این مقطع اشاره نموده‌ایم در ظروف آزمایشگاهی و در خارج از بدن انسانها (ex vivo) انجام می‌گیرد. بر همین منوال باید اشاره کنیم که برخی از محققین در دو سال اخیر سعی در ابداع شیوه‌های جدیدی که ویروس نوترکیب و یا DNA نوترکیب را مستقیماً به درون سلول‌های موجود زنده انتقال دهند. البته این متدهای جدید (direct in vivo gene transfer) در حیواناتی مثل موش، خوک، سگ با موفقیت انجام شده ولی از آنجاییکه هنوز بر روی انسان‌ها آزمایش نشده است بیشتر از این بدان نخواهیم پرداخت.

در رابطه با خطرات پزشکی، اساسی‌ترین سئوال، مطرح کردن عواقب حاصله از معرفی یک ویروس آنهم از نوع رتروویروس به داخل سلول انسانی می‌باشد.

خطرات ژن درمانی:

در این بخش خطرات تکنیکی و پزشکی بررسی خواهد شد ولی باید مختصراً اشاره کنیم که مسئله ژن درمانی از دیدگاه فلسفی نیز به شدت مورد بحث قرار گرفته است و کتب و مقالات زیادی در باب ethics of gene therapy نوشته‌شده است. یکی از این قبیل سؤالات این است که آیا روزی قصد در ساختن اَبَرانسان (super man) خواهد شد؟ در این رابطه وجود یک متخصص اخلاق در بین اعضای هیئت تحریریه ژورنال علمی جدیدالتأسیس Human Gene Therapy جالب توجه است. در رابطه با خطرات پزشکی اساسی‌ترین سؤال، مطرح کردن عواقب حاصله از معرفی یک ویروس آن‌هم از نوع رتروویروس به داخل سلول انسان می‌باشد. ساختن سلول‌های بسته‌بندی (Packaging line) در حقیقت یک راه حل به همین سؤال بود. در نتیجه recombinant ویروس‌هایی که در این سلول‌های بسته‌بندی تولید می‌شوند بخاطر اینکه آن ۳ ژن اساسی‌شان حذف گردیده عقیم هستند (replicative defective) بعبارت دیگر این ویروس‌ها فقط قادر هستند تنها یک

بار سلولی را آلوده کنند و ژن خود را برای همیشه در کرموزم آن سلول جاسازی کنند بدون اینکه ویروس جدیدی (progeny virus) تولید شود. در ادامه هنوز سؤال می‌شود که اتصال ژن نوترکیب که دارای استخوان‌بندی

اطلاعات ژنتیکی از پدر و مادر در بسته‌بندی‌هایی به اسم ژن به فرزند منتقل می‌شوند و در درون سلول‌های فرزند، این اطلاعات ابتدا تبدیل به ملکول‌هایی به اسم RNA می‌شوند و سپس در ادامه این خط سیر طبیعی RNA تبدیل به پروتئین‌های مشخصی می‌شوند که بقای موجود زنده را تضمین می‌نمایند.

رتروویروس است به داخل کرموزم انسان با توجه به اطلاعاتی که درباره مکانیسم سرطان‌زایی (oncogenicity) این خانواده از ویروس‌ها در اختیار است، چه مقدار ریسک برای بیمار وجود دارد؟ نظر به اینکه ژن درمانی هنوز دوران طفولیت خود را می‌گذراند جواب به این مشکلات ساده نیست و همینطور که در بخش آینده توجه خواهید فرمود علاقمندان به ژن درمانی این مصائب را در حین مداوای بیماران مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار داده‌اند که در موارد لازم به آنها اشاره خواهیم کرد. در پایان این بخش باید اضافه نمود که طبق قانون در ایالات متحده آمریکاپروتکل‌هرعمل‌ازنوع‌ژن درمانی برروی انسان‌ها باید به تصویب کمیته‌های مختلف از جمله کمیته Committee Recombinant DNA Advisory (RAC) برسد.

ژن‌درمانی برروی انسانها (human trials):

زمانی که صحبت بر سر ژن درمانی در جانداران شروع شد دو مسئله از دیدگاه محققین واطباء همیشه مورد بحث بوده است.
الف - معالجه چه امراضی از طریق ژن درمانی شانس بیشتری برای بهبودی بیماری دارد؟
ب - کدام سلول‌های بدن را باید هدف قرار داد؟
در رابطه باسؤال اول تصمیم بر این شد که امراضی را ابتدا باید هدف قرار داد که مسبب آنها نه تنها کاملاً شناخته شده است بلکه رابطه علت و معلول بسیار ساده و روشن است. بعنوان مثال اگر آنزیم X در بدن شخصی تولید نشده و یا به اندازه کافی تولید نمی‌شود و این سبب بیماری Y می‌شود، با معرفی ژن تولیدکننده آنزیم X از طریق ژن درمانی به بیمار خواهیم توانست بهبودی بیماری Y را

اندازه بگیریم. با چنین برهانی بود که در سال ۱۹۹۰ اولین عمل ژن درمانی بر روی بیماری که کمبود آنزیم آدنوزین دی آمیناز (Adenosine deaminase)، را داشت انجام شد. کمبود آنزیم ADA سبب ازدیاد بیش از اندازهٔ 2-deoxyadenosine در سیستم می‌شود و تجمع این ماده برای لنفوسیتهای از نوع B و T کشنده است و در نهایت سبب بیماری combined immunodeficiency می‌شود که بیمار را از پا درمی‌آورد. راه‌های کلاسیک مداوای این بیماری پیوند مغز استخوان از یک اهداء کننده مناسب که معمولاً دشوار پیدا می‌شود و یا تزریق یک بار در هفته ADA تصفیه شده از گاو است. بهرصورت در این اولین عمل بر روی انسان بیمار که ابتدا ژن ADA از طریق رتروویروس به داخل لنفوسیتهای از نوع T بیمار معرفی شده بود و سپس این سلول‌های مهندسی شده، ۸ بار در طول مدت ۱۰ ماه به بیمار تزریق شد، نتایج بسیار امیدوار کننده‌ای داشت. مقدار ADA این بیمار در مقایسه با مقدار نرمال از زیر ۲٪ تا به مقدار ۲۰٪ نرمال افزایش یافت و جالب اینکه تعدادی از این T لنفوسیتهای مهندسی شده تا حتی ۶ ماه پس از توقف نمودن تزریق در بدن بیمار زنده و فعال بودند. در رابطه با جواب به سؤال دوم باید گفت که تمایل اولیه محققین و اطباء سلول‌های خون‌ساز بعنوان هدف مطلوب برای ژن درمانی بود. از جمله دلایل انعطاف‌پذیری و تکامل یافتن این قبیل سلول‌ها (multi potency) و همچنین سهولت پیوند مغز استخوان برای این انتخاب بود. هرچند که بعداً سلول‌های دیگری مثل میوبلاست‌ها و هپاتوسیت‌های کبدی و فیبروبلاست‌های پوست مورد بررسی واقع شدند. میوبلاست‌ها بخاطر اینکه طبق برنامه‌ریزی ژنتیکی‌شان باهم متصل‌شده و تشکیل myotubes را می‌دهند. در نتیجه میوبلاست‌های مهندسی شده با تبعیت از این خط سیر طبیعی‌شان ژن مهندسی شده را به سلول‌های خواهر انتقال می‌دهند. هپاتوسیت‌های کبد زمانی برای ژن درمانی کاندیدا شدند که محققین متوجه گشتند که ویروس‌های نوترکیب خیلی بهتر به درون سلول‌هایی که در حال رشد و تقسیم هستند وارد می‌شوند تا سلول‌هایی که راکد (Quxiescent) هستند. کبد هم ارگانی است که باز به خاطر برنامه‌ریزی ژنتیکی بعد از یک هپاتوکتومی نسبی، رشد و تقسیم سریع سلولی انجام می‌دهد تا خود را ترمیم کند. فیبروبلاست‌های پوست بیشتر به دلیل سهولت و نصب وصله‌های پوستی (skin patch) مهندسی شده و همچنین متد جراحی مورد بررسی واقع شدند. هرچند که بزرگترین مشکل در رابطه با این سلول‌ها متوقف شدن تولید پروتئین مورد نظر از سلول‌های مهندسی شده در مدت بسیار کوتاه پس از پیوند به بیمار است. مکانیزم چنین توقف ناگهانی تولید پروتئین مهندسی شده در سلول‌های از نوع فیبروبلاست هنوز مشخص نگردیده است.

ژن درمانی و لنفوسیت‌ها

باید متذکر شد که لنفوسیت‌ها را به این دلیل برای این مقاله انتخاب کردیم که آغاز تاریخ

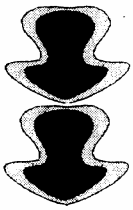
ژن‌درمانی با هدف قرار دادن آنها شروع شد. قبل از تولد ژن‌درمانی، محققین موفق به شناسایی یک گروه از لنفوسیت‌ها در سرطان پوستی مِلانوما (melanoma) به نام تیل (TIL) که مخفف Tumor-Infiltrating Lymphocytes و لنفوسیت‌های رخنه کننده به درون غده سرطانی است شده بودند. این تیل‌ها همانطور که از نامشان می‌توان حدس زد دارای خصوصیت مهم رخنه نمودن به درون تومور (autologous solid tumor) بیمار با سرطان ملانوما می‌باشند. لازم به یادآوری است که این تیل‌ها از خودغده سرطانی سرچشمه می‌گیرند. مضافاً این گروه شامل درصد قابل توجهی از سلول‌های مصونیتی (T helper) و (T cytolytic)، بسیار antigen-specific ، می‌باشند و همچنین حامل پروتئین مشخصه (marker) از نوع CD3 می‌باشند.

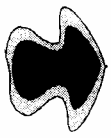
محققین در آن زمان چنین نظر دادند که پدید آمدن تیل‌ها در حقیقت تشکّل یک سیستم دفاعی علیه غده سرطانی است و از آنجاییکه رشد غده سرطانی چندین برابر سریع‌تر از تکثیر تیل‌ها می‌باشد، این سیستم دفاعی در دراز مدت مؤثر نیست. اما محققین از خاصیت لنفوسیت بودن تیل‌ها و در نتیجه تقسیم و تکثیر آن‌ها پس از تزریق انترلوکین (IL-2) برای تقویت سیستم دفاعی علیه ملانوما استفاده کردند که خود یک شاخه‌ای بنام Immunotherapy را شامل می‌شود. با تولد ژن درمانی، روزنبرگ (Rosenberg) و همکارانش پس از استخراج TIL از بدن بیمار سرطانی و کشت آن‌ها در آزمایشگاه و معرفی نمودن ژن‌های مختلف از طریق ویروس‌های نوترکیب این سلول‌های دستکاری شده (modified autologous TIL) را دوباره به بدن بیمار تزریق نمودند. بر اساس یک حدس علمی این محققین ژن IL-2 را در درون TILها جاسازی نموده و سپس چنین TIL تولیدکننده IL-2 را به بدن بیمار سرطانی تزریق می‌کردند. فرضیه روزنبرگ و همکارانش برای چنین مداوایی برطبق شواهد زیر طرح ریزی شده بود. الف - تزریق TIL که با ^{111}In علامت گذاری شده بود بعد از چند روز گردش در جریان خون فرد بیمار بطور محسوسی در محل تومور تجمع پیدا کرد. ب - ۹ بیمار از ۱۵ بیمار مبتلا به metastatic melanoma که مخلوطی از autologous TIL و پروتئین IL-2 را دریافت کرده بودند علائم بهبود تومور (tumor regression) را نشان دادند. بنابراین قصد از معرفی TIL دستکاری شده که حامل ژن IL-2 است در حقیقت سعی در بوجود آوردن یک سیستم درمانی است که هدف آن بالابردن بازدهی TIL بعنوان یک آنتی تومور در جلوگیری از عارضه‌های فرعی ناخوشایند ناشی از تزریق مستقیم پروتئین IL-2 به بدن بیمار است. لیست ژن‌هایی را که محققین به TILها معرفی نموده و می‌نمایند روز به روز افزایش می‌یابد. (TNF) مخفف Tumor necrosis factor (پروتئینی که خاصیت آنتی توموری دارد و تزریق آن در رگ‌های موش‌های آزمایشگاهی حامل تومور نتایج امیدوار کننده‌ای از قبیل کوچک کردن اندازه تومورها در این حیوانات داشته است)، از این ژن‌هایی

است که از طریق رتروویروس به درون TILهای بیمار ملانوما بصورت ex vivo معرفی شد و سپس این TILهای مهندسی شده به بدن بیمار تزریق گردید. نتایج حاصله از TNF درمانی هنوز یک جا منتشر نشده است. اما بطور اجمالی میتوان گرفت که عارضه‌های فرعی ناخوشایندی را که انتظار می‌رفت بیمار پس از تولید اضافی TNF نشان بدهد هیچگان نمایان نشد. این نکته امیدوار کننده است زیرا که مطالعات دیگر نشان داده است که تزریق پروتئین TNF به مقدار $\frac{\text{۸ میکروگرم}}{\text{کیلوگرم وزن انسان}}$ قادر به تولید عارضه‌های فرعی ناخوشایند در انسان‌ها می‌باشد. دیگر نکته امیدوارکننده برای توسعه و ادامه این نوع درمان شناسایی ژن مهندسی شده TNF در خون بیمار با استفاده از متد PCR در حدود ۶ ماه پس از متوقف نمودن تزریق این سلول‌های مهندسی شده به بیمار مبتلا به سرطان ملانوما بود. این امر نشان‌گر آن است که محققین با استفاده از تلفیق سه متد مدرن برای مداوا یعنی مهندسی ژنتیک، immunotherapy و ژن درمانی در آینده قادر خواهند بود ترشح یک ماده آنتی توموری مانند TNF را در بدن بیمار به طریقی کنترل نمایند که کشنده نباشد و ثانیاً TNF را به هدف مشخصی یعنی فقط جایگاه تومور هدایت کنند. در حال حاضر یکی از اساسی‌ترین دشواری‌هایی که ژن تراپیست ها با آن مواجه هستند حل مسئله target specificity است.

دیدگاه کلی

شواهد حاصله از تحقیقات در زمینه ژن درمانی از بدو تولید این دانش تاکنون یعنی قریب به دو دهه اخیر نمایانگر آن است که تعمیر کردن و بازسازی وظیفه ژن های معیوب با معرفی انواع نرمال آن‌ها به درون ساختمان ژنتیکی شخص جهت معالجه (cure) بعضی از بیماری‌ها تا شروع قرن ۲۱ میلادی عملی خواهد بود هرچند که در این رابطه باید متذکر شد که هنوز محققین با دشواری‌های تکنیکی مختلفی روبرو هستند. از جمله این دشواری‌ها عبارتند از انتخاب حامل مناسب برای تحویل (delivery) حامل بیان مورد نظر، انتخاب نوع بافت و اعضای بدن بعنوان هدف برای ژن درمانی و بالاخره چگونگی کم کردن ریسک پرتکل‌های مورد استفاده مخصوصاً استفاده از رتروویروسها که بخاطر شناخت دیرینه از خاصیت سرطان‌زایی‌شان هنوز جای شک را در رابطه با آینده ژن‌درمانی بعنوان یک روش مداوا در پزشکی در بین تعداد زیادی از محققین و اطباء باقی گذاشته است. علیرغم این دشواری‌ها، ژن درمانی نقش عظیمی در آینده مداوای پزشکی خواهد داشت. امروزه پیشرفت‌های علمی مخصوصاً در زمینه بیولوژی مولکولی که یکی از اساس لازم برای ژن درمانی است اطلاعات وسیعی در رابطه با نقص‌های ژنتیکی در پدیدآمدن بیماری‌هایی مثل فراموشی حافظه ،ADA deficiency ، تالاسمی از نوع β فراهم کرده است. در این رابطه باید گفت بیولوژی مولکولی زیربنای ژن درمانی را پایه‌گذاری نمود و در ادامه این مسیر ترقی علم ژن درمانی بنیان گذار شیوه جدید درمانی در پزشکی خواهد بود.





منابع:

1. Anderson, W. Prospects for human gene therapy. Science 226: 401-409 (1984).
2. Hammer, R., Palmiter. R., Brinster, R. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. Nature. 311:65-67 (1984)
3. Roberts,R. Restriction and modification enzmes and their recognition sequences. Nucleic Acid Res. 11: r135-r167 (1983)
4. Watson,J., Tooze, J., Kurtz, D.Recombinant DNA: a short course. San Francisco: Freeman 1983
5. McClure, W. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Biochem. 54: 171-204 (1985).
6. Youderian, P., Bouvier, S., Susskind, M. Sequence determinants of promoter activity. Cell. 30: 843-853 (1982).
7. Shenk, T. Transcriptional control regions: nucleotide sequence requirments for initiation by RNA polymerase II and III. Current Topics in Microbiology and Immunology. 93:25-46 (1981).
8. Mclaughlin, C., Warner, J., Edmonds, M., Nakazato, H., Vaughn, M. Polyadenylic acid sequences in yeast messenger ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 248: 1466-1471 (1973).
9. Khoury,G., Gruss, P. Enhancer elements, Cell. 33: 313-314 (1983).
10. Leiden,J. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. Annu. Rev. Immunol. 11: 539-570 (1993).
11. Stelow, J., Hollaender, A. Genetic engineering-Principles and Methods Vol. 4 NY: Plenum.
12. Graham. F., Van der Eb, A. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology. 52: 456-467.
13. Gilboa, E., Eglitis, M., Kantoff, P., Anderson, W. Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors, Bio Techniques. 4: 504-512 (1986).
14. Cristiano, R., Smith, L., Woo, S. Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126 (1993).
15. Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J. RNA tumor viruses. NY: Cold Spring Harbor Laboratory. (1982).
16. Miller, A. Rosman, G. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Bio Technology. 7:980-990 (1990).
17. Miller, A. Buttimore, C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902 (1986).
18. Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetts, K., Culver, K., Freeman, S., Director, E., Lotze, M., Blaese, M., Anderson, W., Rosenberg, S. Human gene transfer: Characterization of human tumor infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 473-477 (1990).
19. Miller, A., Stotzko, N., Rhoades, K., Belldegrun. A., Tso, C., Kaboo, R., McBride, W., Jacobs, E., Kohn, D., Moen, R., Economou, J. Simultaneous use of two retroviral vectors in human gene marking trials: feasibility and potential applications. Hum. Gene Ther. 3:619-624 (1992).

20. Chowdhury. J., Grossman, M., Gupta, S., Chowdhury, N., Baker, J., Wilson, J. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits, Science. 254: 1802-1805. (1991).
21. Palmer. T.,Rosman,G., Osborne, W., Miller, A. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1330-1334 (1991).
22. Nabel, E., Yang,Z., Plautz, G., Forough, R., Zhan, X., Haudenschild, C., Maciag, T., Nabel, G. Recombinant fibroblast growth factor-1 gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplastia and angiogenesis in vivo. Nature 362: 844-846 (1993).
23. Fletcher, J. Ethical issues in and beyond prospective clinical trials of human gene therapy. J. Med.Philos. 10:293-309 (1985).
24. Anderson, W.Human gene therapy. Science. 256: 808-813 (1992).
25. Blaese, R. Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency. Pediatr. Res. 33: S49-53 (1993).
26. Hirschhorn,R. Overview of biochemical abnormalities and molecular genetics of adenosine deaminase deficiency. Pediatr. Res. 33:S35-41 (1993).
27. Schuening, F.,Kawahara, K., Miller, A., To,R.,Goehle, S., Stewart, Retrovirus-mediated gene transduction into long-term repopulating marrow cells of dogs. Blood, 78:2568-2576 (1991).
28. Barr, E., Leiden, J. systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. Science. 254: 1507-1509 (1991).
29. Dhawan, J., Pan, L., Pavlath, G., Travis, M., Lanctot, A., Blau, H. Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts, Science. 254: 1509-1512 (1991).
30. Miller, D., Adam, M., Miller, A. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mol. Cell. Biol. 10: 4239-4242 (1990).
31. Rosenberg, S., Packard, B., Aebersold, P., Topalian, S., Toy, S., Simon, S., Lotze, M.,Yang ,J., Seippe, C., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei. J., SWhite, D. Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. 319: 1676-1680 (1988).
32. Topalian, S., Solomon, D., Rosenberg, S. Tumor - specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. J. Immunol. 142: 3714-3725 (1989).
33. Rosenberg, S. The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2 : a review. Ann. Surg. 208: 121-135 (1988).
34. Reoenberg, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R., Moen, R., Karson, E., Lotz e, M, Yang, J., Topalian, S., Merino, M., Culver, K., Miller, A., Vlaese, M., Anderson, W. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N. Eng. J. Med. 323: 570-578 (1990).
35. Fisher, B., Packward, B., Read, E., Carrasquillo, J., Carter, C., Topalian, S., Yang, J., Yolles, P., Larson, S., Rosenberg, S. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. 7: 250-261 (1989).
36. Haranaka, K.,Satomi, N., Sakurai, A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors in nude mice. Int. J. Cancer. 34: 263-267 (1984).
37. Creasey, A., Reynolds, M., Laird, W. Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor, Cancer Res. 46: 5687-5690 (1986).-