

## ژن‌درمانی، مفاهیم اساسی و کاربردهای آن در بیماری‌های کوارش

ترجمه از: دکتر سیدمؤید علویان\* - دکتر ناصر بلیغ\*\*

### خلاصه

از نظر ژنتیک، بیماری‌های انسانی را می‌توان در سه گروه عمده دسته‌بندی کرد: (۱) بیماری‌های تک‌ژنی، که علت آنها یک نقص ژنی واحد است و انتقال آنها به نسل بعد از قوانین مندل پیروی می‌کند، (۲) بیماری‌های پیچیده ژنتیکی که با تجمع بی‌درپی چند اشکال ژنتیک همراهند، که تا امروز تنها برخی از آنها شناخته شده‌اند. چند بیماری شایع در این دسته جای دارند. مانند بدخیمی‌ها، بیماری‌های سیستم قلبی عروقی، فشار خون بالا، آرتریت، دیابت شیرین و بیماری‌های دیگر، (۳) بیماری‌های ژنتیک اکتسابی که از جمله آنها عفونت‌ها و برخی از انواع بدخیمی‌هاست (که با اکتساب تغییرات ژنتیک در طول زندگی همراهند). برپایه این دسته‌بندی ژنتیک بیماری‌ها، چهار مفهوم در ژن‌درمانی وجود دارد: جایگزینی ژن برای درمان بیماری‌های تک‌ژنی، تشدید اثر ژن برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده، ممانعت از بروز اثر ژن یا کارکرد آن برای بیماری‌های ژنتیک اکتسابی و واکسیناسیون با انتقال ژن سوماتیک برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده اکتسابی.

به رغم چشم‌اندازهای جالب در زمینه درمان بیماری‌های انسانی با روش مولکولی مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک (هسته‌ای)، از آن جمله بیماری‌های گوارشی ارثی، بدخیم و عفونی، جنبه‌های متنوع ارسال (Delivery)، هدفگیری و بی‌گزندی (Safe بودن)، باید پیش از ورود این مفاهیم به کار بالینی مورد بررسی قرار گیرند. روشن است که پزشکی مولکولی و ژن‌درمانی به شکل فزاینده‌ای تبدیل به بخشی از شیوه‌های درمانی بیمار می‌شوند و می‌توانند استراتژی‌های موجود را در زمینه تشخیص، درمان و پیشگیری تکمیل کنند.

به بخشی از شیوه‌های درمانی می‌شوند و استراتژی‌های موجود را در زمینه تشخیص، درمان و پیشگیری تکمیل می‌کنند.

### مفاهیم اساسی:

بررسی‌های مولکولی در چند سال اخیر به یک جنبه محوری از پژوهش‌های زیست‌پزشکی بالینی تبدیل شده‌اند. مشخص شدن بنای مولکولی و ژنتیکی بسیاری از بیماری‌های انسانی باعث درک بهتر پاتوژنز این بیماری‌ها و نیز ایجاد چشم‌اندازهای تازه برای تشخیص، درمان و پیشگیری آنها شده است.

از نظر ژنتیک بیماری‌های انسانی را می‌توان در سه گروه عمده دسته‌بندی کرد.

(۱) بیماری‌های تک‌ژنی که علت آنها یک نقص واحد ژنی است و انتقال آنها به نسل بعد از قوانین کلاسیک مندل پیروی می‌کند. بیش از ۴۰۰۰ بیماری تک‌ژنی شرح داده شده است. برای برخی از این بیماری‌ها، مبنای مولکولی هم تعریف شده است.

(۲) بیماری‌های ژنتیک پیچیده که با جهش‌های چندین ژن همراهند، که تا امروز تنها برخی از آنها شناسایی شده‌اند. چندین بیماری شایع انسانی در این دسته جای دارند، مانند بدخیمی‌ها، بیماری‌های سیستم قلبی عروقی، فشار خون بالا، آرتریت، دیابت شیرین و بیماری‌های دیگر.

(۳) بیماری‌های ژنتیک اکتسابی که عفونت‌ها و بدخیمی‌های همراه با

از نظر ژنتیک، بیماری‌های انسانی را می‌توان در سه گروه عمده دسته‌بندی کرد:

(۱) بیماری‌های تک‌ژنی که علت آنها یک نقص ژنی واحد است و انتقال آنها به نسل بعد از قوانین مندل پیروی می‌کند،

(۲) بیماری‌های پیچیده ژنتیک که با تغییرات ژنتیک متعدد و معمولاً بی‌درپی همراهند که تا امروز تنها برخی از آنها شناخته شده‌اند،

(۳) بیماری‌های ژنتیک اکتسابی که شامل عفونت‌ها و برخی از انواع بدخیمی‌ها، که با اکتساب تغییرات ژنتیک در طول زندگی همراه می‌شوند، مانند اغلب موارد سرطان کولورکتال (CRC).

بر مبنای این دسته‌بندی ژنتیک بیماری‌ها، چهار مفهوم در ژن‌درمانی وجود دارد:

(۱) جایگزینی ژن برای درمان بیماری‌های تک‌ژنی، (۲) تشدید اثر ژن برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده، (۳) ممانعت از بروز اثر ژن یا کارکرد آن برای بیماری‌های ژنتیک اکتسابی، و (۴) واکسیناسیون با انتقال ژن سوماتیک برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده و اکتسابی. با آن که مفاهیم درمان بیماری‌های انسانی با روش مولکولی مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک (هسته‌ای)، از آن جمله بیماری‌های دستگاه گوارش، به خوبی تعریف شده‌اند، جنبه‌های متنوع ارائه، هدفگیری و بی‌خطر بودن باید پیش از ورود ژن‌درمانی به کار بالینی مورد بررسی قرار گیرند.

روشن است که پزشکی مولکولی و ژن‌درمانی به شکل فزاینده‌ای تبدیل

تغییرات ژنتیک اکتسابی در طول زندگی، از آن جمله‌اند.

ژن‌درمانی در اینجا به صورت وارد کردن ماده ژنتیک به درون سلول‌های انسانی که برای فرد دریافت‌کننده از نظر درمان یا پیشگیری مزیتی دارد، تعریف شده است. در ادامه مطلب ما در باره مفاهیم اساسی ژن‌درمانی، سیستم‌های ارسال و هدفگیری ژنی و نیز برخی از کاربردهای درمانی بالقوه در زمینه بیماری‌های گوارشی بحث خواهیم کرد. بر مبنای دسته‌بندی ژنتیک بیماری‌ها که در بالا توصیف شد، اصل ژن‌درمانی شامل چهار مفهوم است (جدول ۱): جایگزینی ژنی برای درمان بیماری‌های تک‌ژنی، تشدید اثر ژن برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده، ممانعت از بروز اثر ژن یا کارکرد آن برای بیماری‌های ژنتیک اکتسابی و واکسیناسیون با انتقال ژن سوماتیک برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده و اکتسابی.

جدول ۱: مفاهیم ژن‌درمانی

Diseases	Gene Therapy
Monogenetic diseases	Gene replacement Mutant RNA repair
Complex genetic diseases	Gene augmentation Somatic transgene vaccination
Acquired genetic diseases	Block of gene expression Somatic transgene vaccination

#### جایگزینی ژنی:

تعداد فزاینده‌ای از بیماری‌های ارثی که در آنها تغییرات مولکولی موجب بیماری ناشی از یک ژن است شناخته شده‌اند (جدول ۲). در اصل، هدف ژن‌درمانی برای این بیماری‌های تک‌ژنی جایگزینی هدفگیری شده ژن معیوب سلولی به وسیله هومولوگ (همتای) طبیعی آن با تولید محصول فیزیولوژیکی ژن است. باتوجه به پیچیدگی تنظیم ژن‌ها در سلول‌های طبیعی، جایگزینی ژنی را بایستی کاری بسیار دشوار دانست که به سادگی نمی‌توان آن را در کارهای تجربی و بالینی مورد استفاده قرار داد. اخیراً، نشان داده شده است که گونه‌های RNA سلولی را می‌توان با پیوند متقابل ریبوزایم‌های گروه I تغییر داد. چنین ریبوزایم‌هایی را ممکن است بتوان برای درمان انواعی از بیماری‌های ارثی در سطح RNA به کار برد.

#### تشدید اثر ژن

بیماری‌های ژنتیک پیچیده در میان شایع‌ترین مشکلات بالینی قرار دارند. در این موقعیت، تشدید اثر ژن با هدف تأثیرگذاری بر بروز منطقه‌ای یک محصول ژنی درمان‌کننده که از نظر فیزیولوژیکی بروز پیدا نکرده یا در سطوح ناکافی برای درمان بروز کرده است، صورت می‌گیرد. این استراتژی را دیگران برای درمان بیماری‌های بدخیم مورد مطالعه قرار داده‌اند. در اینجا محصول ژنی درمان‌کننده اغلب یک سایتوتوکسین است که نهایتاً به از میان رفتن سلول‌های هدف منجر می‌شود. همچنین وارد کردن یک «ژن خودکشی»، مثل کدبندی کردن یک ژن برای تیمیدین‌کیناز و ویروس هرپس ساده (HSV-tk)، و به دنبال آن مصرف آسیکلوویر یا گانسیکلوویر، ممکن است به صورت غیرمستقیم منجر به کشته شدن سلول‌های هدف بشود.

#### ممانعت از بروز اثر یا کارکرد ژن

برای بیماری‌های ناشی از بروز یک ژن اکتسابی یا بروز بیش از حد یک ژن درون‌زاد، ممانعت از بروز اثر ژن می‌تواند یک شیوه درمانی مؤثر باشد. استراتژی‌های متعددی را می‌توان به کار گرفت (شکل ۱): مداخله در نسخه‌برداری (Transcription) ژن‌ها با متصل کردن عوامل نسخه‌برداری به اسیدهای نوکلئیک وارد شده به سلول‌های یا ساخته شده در سلول‌ها (استراتژی فریب)، با متصل کردن اسیدهای نوکلئیک تک‌رشته‌ای به DNA ی دو رشته‌ای، تشکیل یک ساختار سه‌گانه مارپیچی، هیبرید کردن مولکول‌های RNA ی دارای فعالیت اندونوکلئازی (ریبوزایم‌ها Ribozymes) به RNA، که منجر به شکافته شدن آن در سکانس‌های خاص می‌شود، ممانعت از تبدیل به وسیله اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس و سنتز داخل سلولی پپتیدها یا پروتئین‌هایی که با همتاهای طبیعی خود تداخل می‌کنند (استراتژی موتانت منفی غالب).

جدول ۲: تعدادی از بیماری‌های تک‌ژنی

Genes	Diseases
Adenomatous polyposis coli	Familial adenomatous polyposis
Adenosine deaminase	Severe combined immune deficiency
Alpha-1-antitrypsin	Emphysema, liver cirrhosis
CF transmembrane regulator	Cystic fibrosis
Factor VIII	Hemophilia A
Factor IX	Hemophilia B
Alpha-L-fucosidase	Fucosidosis
Glucocerebrosidase	Gaucher's disease
Beta-glucuronidase	Mucopolysaccharidosis type VII
Beta-globin	Thalassemia
Beta-globin	Sickle cell anemia
Alpha-L-glucuronidase	Mucopolysaccharidosis type I
LDL-receptor	Familial hypercholesterolemia
Ornithine transcarbamylase	Hyperammonemia
Purine nucleoside phosphorylase	Severe combined immune deficiency
Sphingomyelinase	Niemann-Pick's disease

## واکسیناسیون با انتقال ژن سوماتیک

انتقال مستقیم ژن به درون عضله نشانگر یک تحول جدید و مهیج و کاربرد جالب ژن درمانی است. واکسن DNA ی درمان کننده از طریق سنتز داخل سلولی پلاسمیدی یک پروتئین ویروسی که وارد مسیر کلاس I در MHC سلول می شود، عمل می کند. تنها پروتئین هایی که از درون سلول سرچشمه می گیرند به وسیله مولکول های MHC ی کلاس I پرورده (Processed) می شوند، بعد از این پرورده شدن، این پروتئین ها می توانند به سطح سلول برسند (توسط مولکول های MHC کلاس I). آنها در سطح سلول باعث تحریک سلول های T سایتوتوکسیک CD8+ می شوند، که نتیجه آن ایجاد ایمنی با واسطه سلولی است. در اصل، این استراتژی در درمان بیماری های ژنتیک اکتسابی، همراه با بروز آنتی ژن های خاص بیماری به عنوان هدف برای سلول های T سایتوتوکسیک CD8+، کاربرد دارد.

## ارسال و هدفگیری ژن

در ژن درمانی (چه در مسائل تجربی و پژوهشی و چه در کاربردهای بالینی جهت درمان) مهمترین مسائل عبارتند از:

- ۱ - ارسال موفق اسیدهای نوکلئیک به سلول های مورد نظر (هدفگیری)
- ۲ - رسیدن این اسیدهای نوکلئیک در درون سلول ها به محل صحیح (هدفگیری داخل سلولی).
- ۳ - کنترل فیزیولوژیکی بروز اثر ژن پس از انتقال.

## انتقال ژن

مرحله اول ژن درمانی انتقال تکراریذیر اسیدهای نوکلئیک به سلول های هدف است. دو استراتژی اساسی برای این کار وجود دارد: ۱ - سیستم های ویروسی ۲ - سیستم های غیرویروسی انتقال ژن (جدول ۳). اصل سیستم های ویروسی انتقال ژن کاربرد ویروس های از نظر ژنتیکی

جدول ۳: روش های انتقال ژن برای درمان

Methods	Applications		
	Viral	Ex vivo	In vivo
Retrovirus	+	?	S
Adenovirus	+/-	+	T
Adeno-associated virus (AAV)	+	?	S
Herpesvirus	+/-	+	?
Vacciniavirus	+/-	+	T
Poliovirus	+/-	+	T
Sindbis and other RNA viruses	+/-	+	T
HIV-derived vector	+/-	?	S
Non-viral	Ex vivo	In vivo	Expression
Ligand DNA conjugate	-	+	T
Adenovirus-ligand DNA conjugate	-	+	T
Lipofection	+/-	+	T
Direct DNA injection	-	+	T
Ca-phosphate precipitation	+/-	-	S

Use: +=frequent, +/- = occasional, - = rare, Expression: S = stable; T= transient

تغییریافته (ناقل های ویروسی) است. ژن موردنظر به درون یک ژنوم ویروسی تلقیح می شود (که این ژنوم با حذف ژن های اساسی که برای ادامه فعالیت های چرخه حیات ویروس ضروری اند، ناقص شده است). ژنوم ویروسی ترکیبی ناقص، به درون سلول هایی منتقل می شود که تولیدکننده پروتئین های ویروسی مفقوده هستند (سلول های بسته بندی کننده Packaging Cells)، و به این ترتیب امکان پوشش دار شدن و صدور ژنوم ویروسی ترکیبی ناقص (بسته بندی) فراهم می آید. ژنوم های حاصل این فرایند می توانند سلول های هدف را آلوده کنند، و به دنبال آن اثر ژن درمان کننده در درون سلول بروز می کند. این ژنوم ها، به دلیل ماهیت ناقص خود، قادر به تکثیر خودبه خودی نیستند. اگر ژنوم ویروسی ترکیبی ناقص به درون ژنوم سلول هدف وارد و با آن ترکیب شود، بروز اثر ژن درمان کننده ممکن است پایدار باشد. اما اگر چنین نشود، بروز اثر ژن درمان کننده موقتی و گذراست. چند ناقل ویروسی برای ژن درمانی مورد مطالعه قرار گرفته اند (جدول ۳)، بیشترین مطالعات در مورد رتروویروس ها، آدنوویروس ها و ویروس های همراه آدنوویروس ها (AAV) صورت گرفته است.

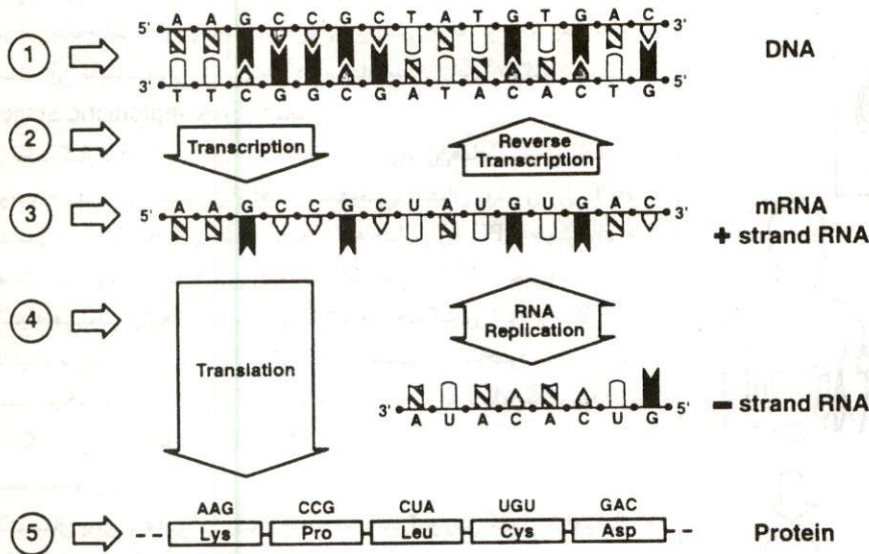
رتروویروس ها در واقع RNA ویروس هایی هستند که ژنوم خود را به طور معکوس به DNA منتقل می کنند. این DNA ی ویروسی و RNA ی پیامبر (mRNA) کاملاً به ژنوم سلول میزبان به طور پایدار متصل شده و برای انتقال به داخل به کار می رود. برخی از رتروویروس ها نزدیک به ۱۰۰ درصد سلول های هدف خود را آلوده می کنند، و این منجر به کارایی فوق العاده فرایند انتقال ژن می شود. اما آنها فقط سلول های در حال تقسیم را آلوده می کنند و یک ژنوم نسبتاً متغیر دارند که باعث محدودیت کاربرد آنها در موجود زنده (In vivo) می شود. آدنوویروس ها، برخلاف رتروویروس ها ژنوم پایدار دارند و سلول هایی که در حال تقسیم نیستند را هم آلوده می کنند. آنها نوعاً با ژنوم سلول میزبان ترکیب نمی شوند و بنابراین فقط می توانند اثر موقتی یا گذرا داشته باشند. از طرف دیگر، AAV می تواند سلول هایی را که در حال تقسیم نیستند آلوده کند و با ژنوم سلول میزبان هم ترکیب شود، و این به معنای پایداربودن اثر آن است. همچنین، یک ناقل مشتق از HIV که اخیراً توصیف شده است ظاهراً می تواند اثراتی مشابه AAV داشته باشد.

جدا از ناقل های ویروسی، چندین سیستم انتقال ژن غیرویروسی هم مورد مطالعه قرار گرفته اند (جدول ۳) که اثر آنها هم گذرا و موقتی بوده است.

## هدفگیری سلولی

انتقال چندین نوع سلول به طور موفقیت آمیز

شکل ۱ - روش‌های ممانعت از بروز ژن: ۱ - روش فریب ۲ - روش ضد ژنی (ساختار سه‌گانه ماریچی) ۳ - ریبوزایم‌ها ۴ - روش آنتی‌سنس ۵ - تداخل پپتید با پروتئین‌ها



در خارج از بدن موجود زنده (Ex. Vivo) صورت گرفته است: هیپاتوسیت‌ها، سلول‌های اپی‌تلیال، کراتینوسیت‌ها، میوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و تعداد زیادی سلول‌های توموری مختلف. انتخاب نوع سلول عمدتاً به هدف ژن درمانی بستگی دارد. مثلاً، برای ژن درمانی سلول‌های فیبروز کیستیک (سلول‌های با منشأ برونکوپاپی‌تلیال)، برای ژن درمانی بیماری‌های کبدی هیپاتوسیت‌ها انتخاب اول هستند.

#### هدفگیری داخل سلولی

جدا از هدفگیری سلولی، هدفگیری داخل سلولی و تنظیم بروز اثر ژن جنبه‌های عمده ژن‌درمانی هستند، به ویژه اگر ترکیب پایدار

ژن‌درمان‌کننده با ژنوم سلول هدف صورت گیرد. تنظیم بروز اثر ژن یک فرایند بسیار پیچیده و کنترل شده است که به درست بودن محل ترکیب با ژنوم سلولی نیز بستگی دارد. مثلاً بروز اثر بتاگلوبین باید با بروز اثر آلفاگلوبین هماهنگ باشد تا باعث تولید تترامرهموگلوبینی شود که از نظر بیولوژیکی فعال باشد. بنابراین، تلاش‌ها در این مورد، هدفگیری دقیق ژن مورد نظر به سوی جایگاه طبیعی آن در ژنوم سلولی از طریق ترکیب مجدد همولوگ (هدفگیری داخل سلولی) خواهد بود.

#### جنبه‌های بی‌گزند بودن (Safety)

برای کاربردهای تجربی و بالینی ژن‌درمانی، چند موضوع مربوط به بی‌گزند بودن را باید ملحوظ داشت. خطرهای بالقوه عبارتند از: (۱) فعال شدن انکوژن‌ها (سرطان‌زاهای) سلولی، غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و تداخل در سیستم ترمیم ناهماهنگی‌های DNA در سلول از طریق ترکیب تصادفی ژن درمان‌کننده با ژنوم سلول هدف، (۲) فعال شدن ناقل ویروسی معیوب از طریق پیوست آلوده با یک ویروس وحشی، (۳) تداخل فرآورده‌های ژن‌ویروسی با کارکردهای طبیعی سلول‌های هدف، (۴) تحریک یک پاسخ ایمنی علیه سلول‌های هدف که از نظر ژنتیکی تغییر کرده‌اند، (۵) سایتوتوکسیسیته مستقیم ناخواسته فرآورده‌های ژن درمان‌کننده، (۶) آلودگی رده سلول بسته‌بندی کننده با ویروس‌های وحشی که منجر به آلودگی مولد و بالقوه کشنده می‌شود، (۷) جهش یافتن (Mutation) ناقل ویروسی معیوب در بدن موجود زنده که بالقوه برای میزبان بیمارزا است.

داده‌های موجود تا این تاریخ نشان می‌دهند که این وقایع ناخواسته ظاهراً فوق‌العاده نادرند، با وجود این، کنترل مؤثر و عملاً قابل اجرا و اقدامات احتیاطی برای کاربردهای تجربی و بالینی ژن‌درمانی اجباری

#### ژن‌درمانی برای بیماری‌های گوارشی

بر مبنای دسته‌بندی ژنتیک بیماری‌ها که قبلاً توصیف شد، اصل ژن‌درمانی بیماری‌های گوارشی با سه مفهوم ارتباط دارد که عبارتند از: جایگزینی ژن برای درمان بیماری‌های تک‌ژنی، تشدید اثر ژن، و واکسیناسیون با انتقال ژن سوماتیک (STV) برای بیماری‌های ژنتیک پیچیده و نیز بلوک کردن (سد کردن) بروز ژن و یا کار آن و نیز استفاده از STV جهت پیشگیری از بیماری‌های ژنتیک اکتسابی.

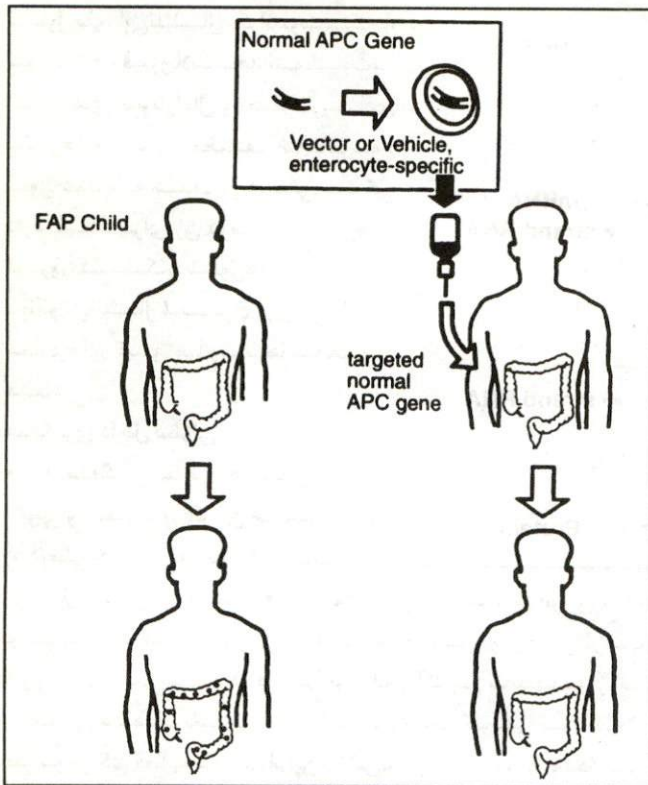
هدفی که ژن‌درمانی در کاربردهای بالینی دارد عبارتست از: استراتژی‌های تازه برای درمان بیماری‌های لاعلاج، و یا جایگزینی برخی شیوه‌ها و در مواردی تکمیل برخی شیوه‌های درمان موجود، تا، کارایی درمانی آنها افزایش یابد و یا عوارض نامطلوب آنها کم شود.

#### جایگزینی ژن

یک مثال برای بیماری گوارشی تک‌ژنی اغلب ارثی، عبارت از پولیپوز آدنوماتوی خانوادگی (FAP) است که با ایجاد صدها پولیپ کولورکتال به صورت پیشرونده، که برخی از آنها ناگزیر به سرطان کولورکتال (CRC) منتهی می‌شوند، مشخص می‌شود. مبنای ژنتیک این سندرم در اغلب موارد یک موتاسیون (جهش) در ژن آدنوماتوس پولیپوزیس مربوط به کولون (APC) بوده است. ژن APC دربرگیرنده بیش از ۸۵۰۰ جفت باز است و روی کروموزوم 5q21 قرار دارد. جهش‌های ژن APC در مبتلایان به FAP به صورت جهش‌های نقطه‌ای

۱ - STV = Somatic Transgene Vaccination  
۲ - APC = Adenomatous polyposis coli gene

شکل ۲: روش انتقال ژن APC در داخل سلول‌های مخاط کولون انسان برای جلوگیری از پلیپوز آدنوماتوز فامیلی (جایگزینی ژن)



استراتژی‌های مولکولی برای درمان هیپاتیت ویروسی به دو بخش عمده تقسیم می‌شوند: استراتژی‌های ضد ویروسی و از میان بردن سلول‌های آلوده.

برای از میان بردن سلول‌های آلوده می‌توان از مکانیسم‌های ایمنی مانند سلول‌های T سایتوتوکسیک، وارد کردن «ژن خودکشی»، مانند ژن کدبندی شده برای تیمیدین کیناز ویروس هرپس ساده (HSV-tk) و به دنبال آن مصرف آسیکلوویر یا گانسیکلوویر، یا وارد کردن ژن‌های کدبندی شده برای عوامل سایتوتوکسیک مانند ریسین یا توکسین دیفتری A، که تنها از طریق فعال‌کننده‌های متقابل کدبندی شده در ویروس فعال خواهند شد، استفاده کرد. همه این استراتژی‌ها ممکن است منجر به یک اثر سایتوتوکسیک با از میان رفتن سلول‌های آلوده بشوند. تا امروز، رایج‌ترین و موفق‌ترین استراتژی‌های درمانی اینترفرون آلفا یا بتا هستند که تا حدی از طریق مدولاسیون ایمنی عمل می‌کنند، و نتیجه آن از میان رفتن هیپاتوسیت‌های آلوده با واسطه ایمنی است. استراتژی‌های ضد ویروسی در اصل تلاش برای تداخل در یک یا چند وجه از چرخه حیات ویروسی هستند که عبارتند از: چسبیدن ویروس به غشاء سلول، وارد شدن و حذف پوشش، تکثیر ویروسی و بروز اثر ژن، ساخت‌گیری ویروس (Assembly) و سرانجام صدور ویروس. راهبندی (بلوک کردن) بروز یا ممانعت از بروز یا کارکرد (فونکسیون) ژن ویروسی

و نیز حذف و اضافه‌های کوچک است که اغلب منجر به ناقص شدن فرآورده ژن APC می‌شود. علت این امر (علت ناقص شدن فرآورده ژن) در اثر جابه‌جایی چارچوب‌ها، جهش‌های بی‌معنی یا تغییر محل پیوندها است. این تغییرات ژنی را می‌توان در مرحله پیش از بروز علائم بیماری (Presymptomatic Stage) شناسایی کرد.

از نظر کارکرد، ژن APC را می‌توان در گروه ژن‌های سرکوب‌کننده تومور جای داد. بنابراین از لحاظ مفهومی، انتقال زودرس ژن APC طبیعی به سلول‌های اپی‌تلیال کولون که حامل ژن APC جهش‌یافته هستند می‌تواند باعث جبران نقص عملکرد ژن APC شود، و به این وسیله می‌توان از ایجاد پولیپ‌ها و CRC‌ها جلوگیری کرد (شکل ۲). قابلیت کاربرد بالینی این استراتژی به روشنی به موجود بودن یک سیستم هدفگیری و انتقال کارآمد و اختصاصی برای سلول‌های روده‌ای بستگی دارد (به سطرهای بالاتر نگاه کنید).

### تشدید اثر ژن

یک مثال برای بیماری ژنتیک پیچیده دستگاه گوارش کانسر کولورکتال (CRC) است. ایجاد CRC یک فرایند چند مرحله‌ای است. در سرطانزایی (کارسینوزن)، تغییرات فنوتیپیک از آدنوم به CRC به موازات تغییرات ژنتیک، از جمله جهش در: انکوژن‌ها، ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و نیز ژن‌های ترمیم‌کننده ناهماهنگی‌های DNA، صورت می‌گیرد. با توجه به پیچیدگی تغییرات ژنتیک موجود در CRC‌ها، استراتژی درمان مولکولی عمدتاً تشدید اثر ژنی است که با بروز در تومور، اثر خود را به صورت یک سایتوکاین، مانند انترلوکین ۲ (IL-2) و فاکتور نکروزکننده تومور (TNF) اعمال می‌کند و منجر به اثرات سایتوتوکسیک موضعی<sup>۲</sup> می‌شود. ارسال یک ژن سایتوکاین (مانند IL-2 یا TNF) به لنفوسیت‌هایی که آنها را از تومور بیمار جدا کرده‌اند و فرستادن مجدد این لنفوسیت‌ها که توان بخش شدن (انفیلتراسیون)<sup>۳</sup> در تومور را دارند،<sup>۴</sup> به داخل بدن بیماری یکی از روش‌هاست. لنفوسیت‌های آماده شده در خارج از بدن بیمار، بعد از تزریق مجدد راه خود را به سوی تومور می‌یابند و هنگامی که در درون تومور پخش شدند، ژن سایتوکاینی خود را بروز می‌دهند و باعث یاخته‌کشی موضعی<sup>۵</sup> می‌شوند که نتیجه آن پسرفت (Regression) تومور با حداقل اثرات سوء عمومی است (شکل ۳).

### جلوگیری از بروز اثر ژن یا کارکرد (فونکسیون) آن

این استراتژی در مورد تعدادی از بیماری‌های بدخیم و عفونی به کار رفته است. مثال‌های بیماری‌های ژنتیک اکتسابی دستگاه گوارش عبارتند از هیپاتیت‌ها و اغلب موارد تک‌گیر (Sporadic) CRC.

۱ - CRC = Colorectal Cancer

۲ - Local - Cytotoxic - Effect

۳ - به جای واژه Infiltration واژه «درون‌بخشی» پیشنهاد می‌شود که هم فارسی است و هم رساننده‌تر از «ارتشاح» - (ویراستاری مجله)

۴ - Tumor Infiltration Lymphocytes

۵ - Local Cytotoxicity

ممکن است در سرکوب عفونت‌های ویروسی کارایی داشته باشد. از لحاظ مفهومی، مداخلات مولکولی یا ژنتیک می‌توانند در پنج سطح مانع بروز اثر ژن ویروسی شوند (شکل ۱) و این کار را مکانیزم‌های جدید ضد ویروسی با واسطه سایتوکاین هم می‌کنند.

#### استراتژی فریب

استراتژی فریب عبارتست از وارد کردن اولیگونوکلیوتیدها یا ناقل‌هایی (وکتورهایی) به درون سلول برای ساختن مولکول‌های کوتاه RNA که برای اتصال اختصاصی به فاکتورهای ویروسی یا سلولی، مانند فاکتورهای نسخه‌برداری یا ترجمه، طراحی شده‌اند. مثلاً اتصال این مولکول‌های قلبی به فاکتورهای نسخه‌برداری منجر به ممانعت از نسخه‌برداری (ویروسی) می‌شود. اما تداخل عمل (Interaction) این مولکول‌ها با فاکتورهای سلولی، کنترل کننده بروز اثر ژن‌های سلول و ویروس، ممکن است این شیوه درمانی را محدود کند.

#### استراتژی ضد ژن

استراتژی ضد ژن شامل وارد کردن اولیگونوکلیوتیدهایی به درون سلول است که برای اتصال به DNA ی دو رشته‌ای طراحی شده‌اند و منجر به تشکیل ماریچ سه رشته‌ای، و در نتیجه کاهش سنتز mRNA می‌شوند.

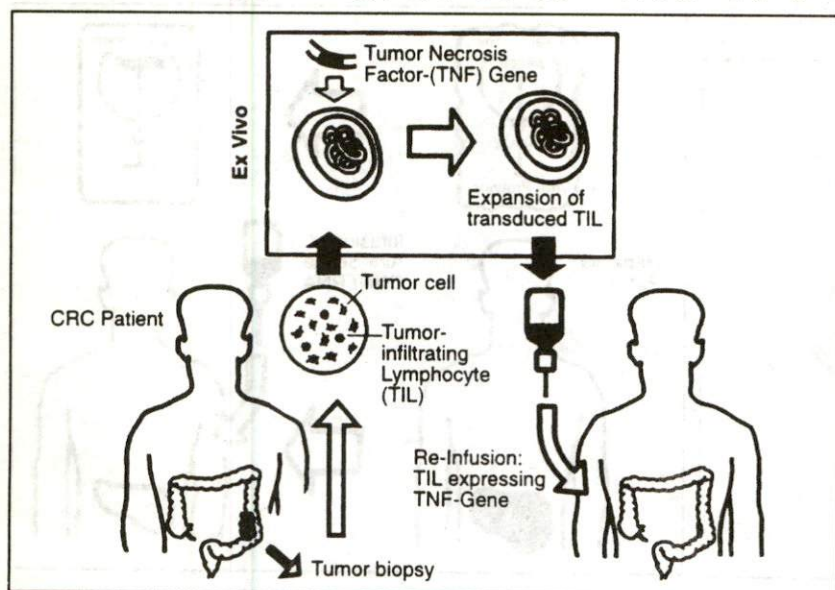
#### ریبوزایم‌ها (Ribozymes)

ریبوزایم‌های مولکول‌های RNA هستند که ایجاد شکاف و یا پیوند در محل‌های اختصاصی مولکول‌های RNA را کاتالیز می‌کنند. ریبوزایم‌هایی که RNA را می‌شکنند به عنوان مهارکننده‌های بروز اثر ژن و تکثیر ویروسی در دست تولید هستند. مطالعات آزمایشگاهی (In vitro) در واقع نشان داده‌اند که ریبوزایم‌ها می‌توانند به شکل اختصاصی باعث شکسته شدن RNA HBV شوند. اما در مورد ویروس‌های هپاتیت کاربرد این استراتژی در موجودات زنده (In vivo) تاکنون موفق نبوده است.

#### اولیگونوکلیوتیدهای آنتی‌سنس (Antisense)

اولیگونوکلیوتیدهای آنتی‌سنس برای اتصال اختصاصی به RNA یا mRNA طراحی شده‌اند، و منجر به توقف تکثیر RNA یا ترجمه

شکل ۳: روش انتقال خارج از بدن ژن فاکتور تومور نکروزیس (tumor necrosis factor) به داخل لنفوسیت‌های مهاجم‌کننده برای درمان سرطان کولون (تشدید اثر ژن)



mRNA می‌شوند (شکل ۴). این استراتژی با موفقیت در آزمایشگاه در

مورد چند بیماری بدخیم و ویروسی، از آن جمله عفونت HBV (شکل ۵) و عفونت HCV، به کار برده شده است. علاوه بر این، مطالعات در مورد مدل ویروس هپاتیت B اردک (DHBV) عفونت HBV نشان داده است که این شیوه قابلیت کاربرد در موجودات زنده را دارد.

#### پپتیدها یا پروتئین‌های تعارض‌کننده (Interfering)

سنتز درون سلولی پپتیدها یا پروتئین‌های تعارض‌کننده، مانند آنتی‌بادی‌ها، با هدف تعارض اختصاصی در تجمع یا کارکرد پروتئین‌های ساختاری یا غیرساختاری (ویروسی) صورت می‌گیرد و نشان‌دهنده نوعی ایمن‌سازی درون سلولی است. این شیوه برای مهار تولید ذرات اصلی HBV با استفاده از پروتئین‌های تغییر یافته نیز در دست مطالعه است.

#### مکانیزم‌های ضد ویروسی با واسطه سایتوکاین

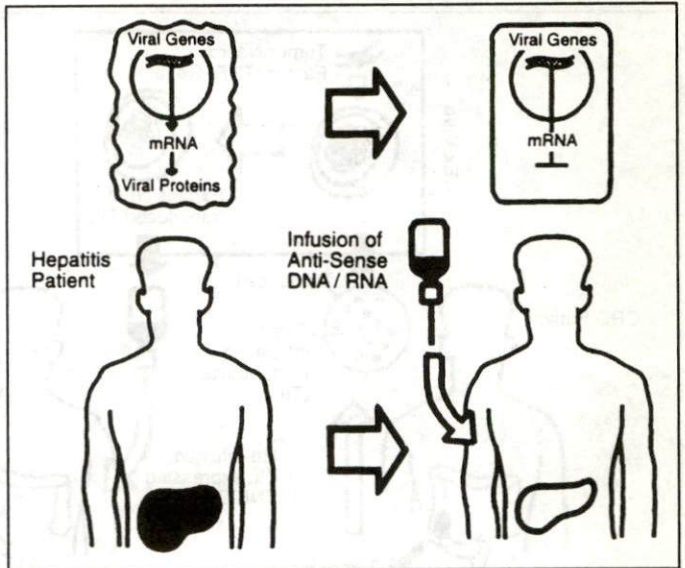
شواهد اخیر در یک مدل موش ترانس ژنیک نشان می‌دهد که سلول‌های T سایتوتوکسیک خاص ویروس (CTL) می‌توانند بروز اثر ژن HBV و تکثیر آن را در سلول‌های کبدی بدون کشتن هپاتوسیت‌ها، از میان ببرند. واسطه اثر ضد ویروسی، اینترفرون گاما (IFN - gamma) و عامل نکروز تومور آلفا (TNF - alpha) ترشح شده به وسیله CTL ها یا ماکروفاژهای غیر اختصاصی برای آنتی‌ژن و سلول‌های T بوده‌اند که به دنبال تشخیص آنتی‌ژن فعال می‌شوند. به نظر می‌رسد این سایتوکاین‌ها از طریق از میان بردن ذرات نوکلئوکاپسید و ژنوم‌های ویروسی در حال تکثیر و نیز از طریق ناپایدار کردن RNA ی ویروسی عمل می‌کنند. IFN آلفا و بتا و همین طور IL-2 به نظر می‌آید، حداقل تا اندازه‌ای، از

۳ - Interfering (اینجا معنای تعارض را می‌دهد - ویراستاری مجله)

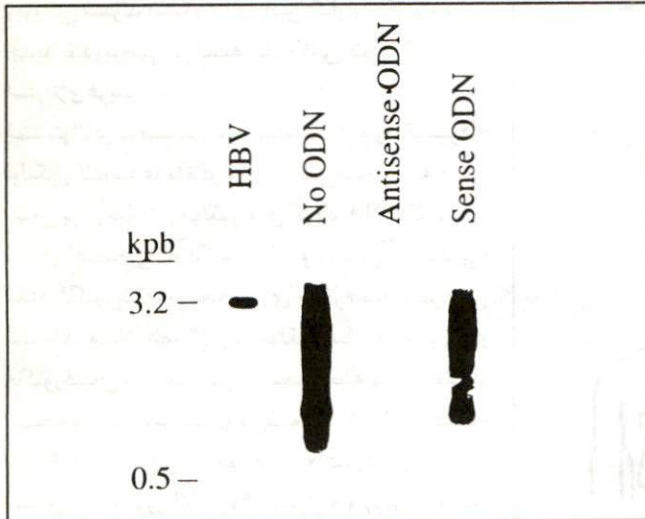
#### ۱ - Translation

۲ - یکی از مسائل در شناخت تکامل موجودات ابتدایی این بود که چگونه مولکول‌های اسیدنوکلئیک در ابتدای حیات می‌توانستند بدون وجود آنزیم تکثیر پیدا کنند. در ۱۹۸۳ تحقیقات روی جانوران ابتدایی این نتیجه را به دست داد که برخی مولکول‌های RNA همانند آنزیم عمل می‌کنند یعنی باعث شکاف و یا اتصال در محل‌های اختصاصی مولکول‌های RNA می‌شوند، این RNA ها را از این نظر ریبوزایم نامیدند، زیرا در حقیقت آنزیم‌های واقعی هستند. (ویراستاری مجله)

شکل ۴: روش درمان هپاتیت ویروسی در انسان از راه اولیگونوکلوئیدهای آنتی‌سنس (مسدود کردن اثر بروز ژن)



شکل ۵: ممانعت از تکثیر ویروس هپاتیت B در خارج از بدن از راه اولیگونوکلوئیدهای آنتی‌سنس (مسدود کردن اثر بروز ژن) آنالیز Southern blot مولکول DNA از سلول‌های هپاتوما که با DNA متعلق به ویروس هپاتیت B آلوده شده‌اند.



MHC کلاس II فرآوری می‌کنند<sup>۲</sup> و این فرآورده باعث تحریک یک پاسخ آنتی‌بادی با استفاده از سلول‌های T یاریگر CD4+ و تولید anti-HBs می‌شود.

اما بعکس، واکسن DNA ی درمان‌کننده با سنتز درون سلولی یک پروتئین ویروسی مشتق از پلاسמיד که وارد مسیر MHC کلاس I می‌شود، عمل می‌کند. واکسن‌های DNA با صورت تجربی در مورد عفونت HBV و نیز HCV بررسی شده است، و امیدهای زیادی برای درمان مولکولی مؤثر این بیماری‌های ویروسی به وجود آورده است. علاوه بر این، اخیراً نشان داده شده است که واکسن‌های سرکوب‌کننده با DNA ی کبدی شده برای یک منطقه ژنی متغیر در سلول‌های T گیرنده از انسفالومیلیت خودایمنی پیشگیری می‌کند، و این نتیجه باعث افزایش جذابیت این روش برای درمان بیماری‌های ناشی از عمل Th1، مانند اسکروز متعدد، دیابت مخصوص جوانان یا آرتریت روماتوئید، شده است.

طریق همین مسیرها عمل می‌کنند. بنابراین، ژن درمانی با هدف تکثیر موضعی IFN - gamma یا TNF - alpha ممکن است یک استراتژی ضدویروسی مؤثر باشد. واکسن‌های DNA (به سطرهای پایین‌تر نگاه کنید) هم احتمالاً از طریق غیرفعال کردن درون سلولی تکثیر ویروس و بروز اثر ژن با واسطه سائتوکاین، عمل می‌کند.

استراتژی‌های مولکولی مورد مطالعه برای ممانعت از بروز ژن ویروسی در سطوح مختلف هنوز با مشکلاتی روبرو هستند. جدا از طراحی بهینه این اولیگونوکلوئیدها یا سازه‌های DNA، یک مشکل عمده پایداری این اسیدهای نوکلئیک درمان‌کننده در بدن موجود زنده و نیز هدفگیری سلولی و درون سلولی آنهاست (به سطرهای بالاتر نگاه کنید) ناقل‌های (وکتورهای) ویروسی و غیرویروسی، از آن جمله لیپوزوم‌ها یا ایمونولیپوزوم‌ها و شیلومیکرون‌های نوترکیبی<sup>۱</sup>، در دست مطالعه‌اند و باید امکان انتقال اختصاصی مولکول‌های ضدویروسی به سلول‌آماده را فراهم کنند و به این وسیله کارایی درمانی را افزایش دهند و از اثرات ناخواسته خارج کبدی بکاهند.

#### واکسن‌های با انتقال ژن سوماتیک

یک کاربرد جالب و ابتکاری ژن درمانی دستکاری سیستم ایمنی با وارد کردن ناقل‌های بروز اثر ژن به درون سلول‌های عضلانی است، که منجر به پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال دیرپا می‌شود. مثلاً واکسن‌های پیشگیرانه مبتنی بر DNA علیه عفونت HBV با تزریق عضلانی یک آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B پلاسמידی امکان‌پذیر است. HBsAg را سلول‌ها از راه فاگوسیتوز یا اندوسیتوز می‌گیرند، از طریق سیستم

\* - استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله / بیمارستان بقیه‌الله‌الاعظم

\*\* - استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله / بیمارستان بقیه‌الله‌الاعظم

#### منبع:

Blum H.E., Wieland S. and Von Weizsaecker F. "Gene Therapy: Basis concepts and applications in gastroenterointestinal diseases" in "Update Gastroenterology 1996; Editor Galmiche J.P., Eurotext Paris 1996; pp 33-47

۲ - Processing (فرآوری کردن) - و یا عمل آوردن، معادل دیگر آن «پروردن» است - ویراستاری مجله) Multiple sclerosis - ۳