

GENSKA TERAPIJA

Marija Roguljić

Zahvaljujući tehnološkom razvoju, molekulska nam je biologija rasvijetlila glavne stanične mehanizme, što je uvelike promijenilo medicinska shvaćanja fizioloških i patoloških procesa. Danas znamo da su geni sadržani u DNA, zapravo šifre kojima se kodira sinteza proteina, a oni su građevne i funkcijske jedinice stanica, tkiva, organa i organizma. Ta su saznanja bila ključna u otkrivanju etiologije nekih bolesti, poput cistične fibroze (nasljedna sklonost bakterijskim infekcijama), Gaucherove bolesti (deficijencija adenozeaminaze) i nekih drugih metabolitičkih bolesti, za koje se pokazalo da su posljedica izostanka gena ili postojanja defektnog gena odgovornog za sintezu određenog proteina. Dakako da je sljedeći korak bio nastojanje da se simptomatska terapija zamijeni etiološkom, tj. genskom terapijom. To znači da bi se te bolesti mogle liječiti umetanjem i ekspresijom zdrave kopije umjesto mutiranog ili nedostajućeg gena u stanice domaćina. Razvoj genske terapije krenuo je, međutim, drugim, neočekivanim smjerom – k pokušajima genske terapije zloćudnih tumora. Naime, prema današnjim saznanjima, oko 5-15 % zloćudnih tumora ima nasljednu podlogu, a preostali su posljedica stečenih genskih mutacija koje pogađaju brojne gene i koje su toliko brojne da njihovo ispravljanje predstavlja zadaću koja nadilazi današnje mogućnosti genske terapije. Stoga su pokušaji genske terapije zloćudnih tumora usmjereni k poboljšanju postojećih oblika imunološke terapije tumora, što se često naziva i transgenskom imunoterapijom.

TRANSGENSKA IMUNOTERAPIJA

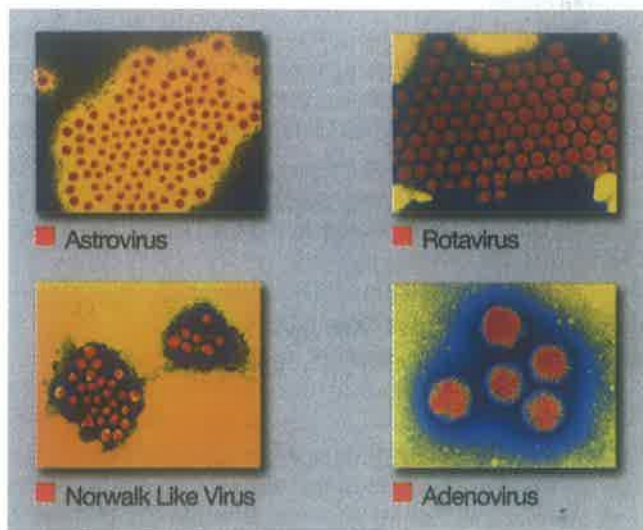
Zna se da je moguć imunološki odgovor domaćina na tumor, no on često nije dostatan za djelotvorno uništavanje tumorskih stanica ni potpuno iskorjenjivanje bolesti. Stoga se imunološka reakcija na tumor nastoji na različite načine potaknuti i pojačati, što nazivamo imunološkom terapijom. Jedan od oblika imunoterapije tumora je i terapija citokinima za koje se znade da mogu djelovati protutumorski, poput npr. imunoterapije interleukinom 2 (IL2). No ona se dosad pokazala djelotvornijom samo u liječenju melanoma i karcinoma bubrega. Stoga se djelotvornost imunoterapije pokušava pospješiti genskom terapijom i to na dva načina: (i) ugradbom gena za protutumorske citokine (npr. IL-2, interferon gama, faktor tumorske nekroze) u limfocite ili fibroblaste, koji bi se nakon ponovnog injiciranja u krvni optok nakupljali u tumorskom tkivu i djelovali protutumorski pojačanim lučenjem citokina, te (ii) ugradbom gena za molekule HLA ili tumorske antigene u tumorske stanice, pojačati njihovu antigeničnost i tako pospješiti imunološku reakciju na njih. Svaka od tih metoda ima svojih prednosti ali i nedostataka. Na primjer, rad s limfocitima infiltriranim u tumor (TIL od engl. "tumor infiltrating lymphocytes") pokazao je da se TIL nakon ugradbe gena za IL-2 i vraćanja u krvni optok bolesnika nisu dostatno selektivno nakupljali u tumorskom tkivu.

Drugi se pristup zasniva na pokušajima pojačavanja imunogeničnosti tumorskih stanica. Limfociti T prepoznaju pro-

teinske antigene putem svojih specifičnih receptora, a prepoznaju ih nakon njihove prerade i stvaranja kompleksa s vlastitim molekulama glavnog sustava tkivne podudarnosti - molekule razreda MHC-I i MHC-II (predočavanje antigena). To znači da je za imunološko prepoznavanje, a onda i za djelotvornu imunološku reakciju protiv tumorske stanice, uz tumorski antigen nužna i ekspresija vlastitih molekula MHC na površini tumorskih stanica. Određenje, citotoksični CD8+ limfociti prepoznaju antigene u kombinaciji s molekulama MHC-I, inače nazočnih na površini svih tjelesnih stanica te je njihova ekspresija nužna za citotoksično/protutumorsko djelovanje ovih limfocita. Često se događa da je ekspresija molekula MHC-I u tumorskih stanica nedostatna te se nastoji pojačati ugradbom gena za takve tzv. kostimulacijske molekule. Poteškoća pri ovakvom pristupu je heterogenost tumorskih stanica i nemogućnost predviđanja koje će kostimulacijske molekule u kojih tumorskih stanica nedostajati. Npr. jedno je istraživanje u bolesnika s rakom prostate pokazalo da su se tumorske stanice međusobno znatno razlikovale u stupnju gubitka histokompatibilnih i transportnih molekula. Stoga bi taj pristup mogao zahtijevati zamjenu više gena na tumorskoj stanici, da bi se postigao djelotvoran imunološki odgovor.

Ugradba gena za sintezu antigena za odbacivanje tumora također je oblik genske terapije koji se nadopunjava s imunološkom. Ta je metoda pokazala dobre rezultate u melanoma, ali također ima nedostataka. Imunološki odgovor potaknut na ovakav način je klonalan (usmjeren na jedan antigen), a antigenska ekspresija u tumorskih stanica je heterogena. Tumori, nadalje, proizvode neke faktore za supresiju imunološkog odgovora.

Nije posve sigurno da će imunološki odgovor izazvan stanicama koje posjeduju tumorske antigene i mehanizme za njihovo djelotvorno predočavanje, biti djelotvoran i protiv stanica koje, doduše, posjeduju tumorske antigene, ali im je mehanizam predočavanja antigena imunokompetentnim stanicama defektan.



Slika 2: Mikroskopska snimka nekih virusa koji se rabe kao vektori, kako se vide nakon imunoenzimskog bojenja

TERAPIJA TRANSFEKCIJOM GENA ZA AKTIVACIJU LIJEKOVA I ZA OTPORNOST NA LIJEKOVE

Jedna od najranijih strategija za uporabu rekombinantne DNA u onkoloških bolesnika bili su pokušaji selektivne ugradbe u tumorske stanice gena, čiji produkt može razmjerno netoksičan, sustavno primijenjeni lijek (u "pro"-obliku) u tumorskim stanicama prevesti u toksični metabolit. Na primjer, s pomoću retrovirtusa kao nosača (vektora), u tumorske se stanice ugrađuje gen za timidinkinazu virusa herpes simpleks (HSV-TK). Potencijalna prednost ove tehnike je selektivnost ugradbe i ekspresije u stanicama koje intenzivno proliferiraju, dakle tumorskim stanicama. Na taj način npr. protutumorski lijek ganciklovir, koji se daje sustavno, u tumorskim stanicama s HSV-TK prelazi u citotoksični ganciklovir-trifosfat i uništava ih. Citotoksično se djelovanje prenosi i na obližnje stanice, koje ne sadrže HSV-TK, što se naziva "bystander" učinkom. Istraživanja u pokusnih životinja pokazala su npr. regresiju glioma u štakora nakon, što je u samo jednu frakciju tumorskih stanica ugrađen gen za HSV-TK.

Istražuju se, nadalje, i mogućnosti transfera gena u zdrave stanice, da se poboljšaju učinci konvencionalnog liječenja zloćudnih tumora. Ugrađbom gena za otpornost na lijekove ("multiple-drug resistance" geni, MDR) u stanice zdrave koštane srži ili matične stanice u perifernoj krvi, nastoji se povećati zaštita koštane srži tijekom kemoterapije. Potencijalna prednost ovog pristupa bila bi u mogućnosti davanja većih doza kemoterapeutika, a time i postizanju veće terapijske učinkovitosti, uz manje nuspojave. Nedostatak ovog pristupa bio bi moguća pojava nehematoloških toksičnih učinaka kemoterapije, veće doze kemoterapeutika možda neće biti terapijski djelotvornije, a moguće je da se i u tumorske stanice u koštanoj srži ugradi MDR te i one steknu otpornost na kemoterapeutik.

VEKTORI

Unatoč napretku i poboljšanjima kliničkih protokola za primjenu genske terapije, još je mnogo problema koje treba riješiti da bi taj oblik liječenja postao rutinskom kliničkom praksom. Jedno od najširih područja u budućim istraživanjima je dizajn vektora. Vektori su ključni za prijenos i ekspresiju gena, a postojeći vektori imaju svoja ograničenja, koja se nastoji što više smaniti.

Virusni vektori

Retrovirusi. Većina se protokola za genski transfer koristi retrovirusnim vektorima. Za primjenu u onkologiji, sposobnost retrovirusa da se integrira u stanice koje se dijele, pokazuje se kao prednost. Pokušaji prijenosa ex vivo pokazali su se vrlo uspješnim. Ipak, postoji i nekoliko nedostataka. Retrovirusi imaju mali genski kapacitet od svega osam kilobaza. Serumski komplement ih može inaktivirati. Trenutno postignuti titar je nizak u usporedbi s onim kojeg bi trebalo postići u liječenju velikih tumora. Pacijent može primiti ograničnu količinu retrovirusa.

Adenovirusi. Ograničenja pri radu s retrovirusima nametnula su potrebu nalaženja drugih vektora koji bi se s više uspjeha rabili u genskoj terapiji. Pozornost je usmjerena na adenoviruse, kad se otkrilo da posjeduju dvostruku DNA te je moguća djelotvornija transdukcija u različite vrste stanica bez obzira na mitotski stadij stanice. Ti se vektori mogu proizvesti i u većem titru od retrovirusa. Istraživanja su pokazala da se s minimalnom količinom virusa može

postići dostatan stupanj ekspresije u većini tkiva, osim u hematopoetskim stanicama. Primjena adenovirusnih vektora najprije je provjerena u liječenju netumorskih poremećaja, kao što je cistična fibroza, ali se radi i na primjeni u liječenju raka. Istražuje se, na primjer, mogućnost njihove uporabe pri ugradbi gena za HSV-TK u bolesnika s tumorima mozga i jetre te tumor-supresijskog gena p53 u bolesnika s tumorima pluća, glave i vrata. Premda su adenovirusi pokazali dobra svojstva za korištenje u genskoj terapiji, ni oni nisu bez nedostataka. Nazočnost nepromijenjenih virusnih gena u rekombiniranom virusu može izazvati imunološki odgovor na te antigene, a time i protiv stanice koja ga nosi. Dosad je istražen velik broj virusa s jedinstvenim svojstvima korisnima za primjenu u genskoj terapiji. Neki od njih su Herpes simplex virus, Avipox virus, Vaccinia virus i Baculovirus.



Slika 1: Elektronskomikroskopska snimka epitelnih stanica bronha u bolesnika s cističnom fibrozom, u kojih se transfekcijom gena nastoji se sprječiti pogubna adhezija bakterija na respiracijski epitel.

Neivirusni vektori i "gola" DNA

Jedno od područja istraživanja koja najviše obećavaju su istraživanja neivirusnih vektora. Oni omogućavaju prijenos terapijskih gena u stanice bez pomoći virusa. U tu se skupinu prvenstveno ubrajaju liposomi, molekularni konjugati i "gola" DNA. Liposomi se kombiniraju s DNA bilo koje veličine i tvore kompleks lipid-DNA, koji se može unijeti u različite vrste stanica. Taj sustav, međutim, ne posjeduje tkivnu specifičnost i terapijska učinkovitost pri njegovoj primjeni još nije na zadovoljavajućoj razini. Zbog potrebe za većom specifičnošću za određene vrste stanica, radi se i s molekulskim konjugatima koji se proizvode se kao proteinske ili sintetske molekule sa sposobnošću vezanja na staničnu DNA ili RNA, na koje se veže željeni gen, pa nastaje kompleks protein-DNA. Proizvodnjom konjugata povećava se željena specifičnost za određene stanice, a nedostatak ovog sustava je suviše kratak životni vijek konjugata. Primjena "gole" DNA najjednostavniji je način njene ugradbe u ciljnu stanicu, bez uporabe virusnih ili neivirusnih vektora. U stanicu se unosi mehaničkim metodama kao što su izravna injekcija u tkivo ili bombardiranje tkiva velikom brzinom s DNA vezanom na čestice zlata. Ta je metoda metoda dosad iskušana u transgenu imunoterapiji u terapiji karcinoma kolona i melanoma. Nedostatak te metode također je izostanak tkivne specifičnosti i potreba za kirurškim pristupom tumorskom tkivu ako se ono ne nalazi na dostupnom mjestu.

Genska terapija neće zamijeniti konvencionalne oblike liječenja zloćudnih tumora, ali će, u kombinaciji s konvencionalnim liječenjem, zasigurno poboljšati njihove domete i što je još važnije, imat će svoju primjenu u suzbijanju ostatne (rezidualne) bolesti, koja zauzima visoko drugo mjesto na ljestvici uzroka smrtnosti u ljudi.

LITERATURA:

Roth J.A., Christiano R.J.: Gene Therapy For Cancer (What have we done and where are we going?)