

Gen Tedavisi

GENE THERAPY

Filiz ŞİMŞEK*

* Araş.Gör.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD, ANKARA

ÖZET

Genetik tedaviye ait kuramsal fikirler 30 yıl önce ortaya atılmasına karşın, invlvo tedavi son zamanlarda gündeme gelmiştir. Son 10 yıl boyunca genetik, moleküler genetik, teknoloji ve hücre biyolojisindeki ilerlemeler, hayvan deneylerinde ve insanlara gen tedavisinin uygulanmasını sağlamıştır. Günümüzde tek gen bozuklukları, kanser, AIDS gibi infeksiyöz hastalıklar ve dejeneratif hastalıklar gen tedavisinin en önemli hedefleridir. Teknoloji geliştikçe gen tedavisi de daha etkili olabilecektir. Bu yazıda gen tedavisinin temel kuralları ve klinikte uygulanan gen tedavi protokolleri gözden geçirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gen tedavisi

T Klin Pediatri 1997, 6:81-86

TARİHÇE

Moleküler biyolojide kaydedilen hızlı ilerlemeler ile 1990'ı yıllarda gen tedavisinde yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Gen tedavisinin genetik defektler yanında kanser, enfeksiyon, kalp, nörodejeneratif, göz ve böbrek hastalıklarında da uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Özellikle hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlar gen tedavisinin insanlarda da kullanılabilirliği tartışılmaya açılmış ve denemelere başlanmıştır.

F.Niescher'ın 1860 yılında hücre çekirdeğinden izole ettiği asit karakterli maddeye 'nükleik asit' ismini vermesi ve daha sonra 1866 yılında G.Mendel'in ilk kez genlerin varlığını bezelyelerde yaptığı çalışmalarla ileri sürmesinden sonra genetik ve moleküler biyoloji hızlı bir ilerleme göstermiş ve 1971 yılında ABD' de gen tedavisi konulu bir "workshop" düzenlenmiştir. M.Cline 1981 yılında beta talasemili bir hastada kalsiyum fosfat aracılığı ile gen aktarımını yapmak istemiş, başarısızlıkla sonuçlanan bu deneyimden sonra M.Blaese ve arkadaşları 1990

Geliş Tarihi: 06.02.1997

Yazışma Adresi: Dr.Filiz ŞİMŞEK
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Pediatri AD, ANKARA

T Klin J Pediatr 1997, 6

SUMMARY

Although in vivo genetic therapy is a relatively new concept, the fundamental ideas were formulated over 30 years ago. Over the last 10 years advances in genetics, molecular genetic technology and cell biology have led to the gene therapy in animal experiments and human disease. At the present time single gene disorders, cancer, infectious disease such as AIDS and degenerative diseases are the most important targets for application of gene therapy. As technology is developed, more efficient and effective gene therapy methods will result. In this article, principles of gene therapy and clinical gene therapy protocols are reviewed.

Key Words: Gene therapy

T Klin J Pediatr 1997, 6:81-86

yılında adenzin deaminaz (ADA) eksikliği olan bir kız çocukta ilk başarılı gen tedavisi uygulamasını gerçekleştirmişlerdir (1,2).

Gen Tedavisi Yöntemleri

Gen tedavisi yöntemleri ex-vivo ve in-vivo gen tedavisi olarak iki gruba ayrılır:

1. *Ex-vivo gen tedavisi:* Hastadan alınan hücreler doku kültürlerinde üretilip rekombinant genlerden oluşan bir vektör ile transdüksiyon yapıldıktan sonra hastaya geri verilir. Bu transfer edilen DNA dizisi hedef hücrelerinin kromozomundaki DNA'ya stabil olarak bağlanır.

2. *In-vivo gen tedavisi:* Genetik materyali oluşturan DNA hastanın hücre veya dokularına doğrudan transfer edilir. Bu yöntemde gen ekspresyonu genellikle yüksek olur, fakat geçicidir (3).

Rekombinant DNA teknolojisi

Gen tedavi protokollerinde rekombinant DNA teknolojisi yöntemleri önemli rol oynamaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi birçok moleküler biyolojik tekniğin kullanıldığı bir teknolojidir. DNA molekülünün özgül bölgelerden kesilmesi, DNA sentezinin yapılması, DNA molekülünün baz dizisinin saptanması, gen klonlanması (yani yabancı bir DNA molekülünün bakteri veya

memeli hücrelerinde çoğaltılması) ve gen ekspresyonu (yani klonlanan DNA molekülünden konak hücrede protein sentezinin gerçekleştirilmesi) bu teknikler arasında sayılır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak istenilen genin memeli hücrelerinde eksprese edilmesi sağlanabilir (4).

Gen Aktarım Teknikleri

Gen tedavisinde etkin bir gen aktarımı en önemli koşuldur. Uygun bir gen aktarımı ile aktarılabilecek olan gen veya polinükleotid hücreye girer. Gen aktarım teknikleri iki gruba ayrılır: 1. Viral vektörler 2. Fiziksel ve kimyasal yöntemler (2-5). Tablo 1 'de başlıca viral vektörler ve fiziksel-kimyasal yöntemler görülmektedir.

Viral yöntemlerde istenmeyen viral gen bölgelerinin virustan çıkarılıp, aktarılması istenen genin viral vektöre konulması amaçlanır(4). Adenovirus vektörleri ve herpes simpleks virüsü epitelyal ve nöral hücrelere tropizm gösterdiklerinden, bu dokulara gen aktarımında özellikle kullanılırlar. Adenoviral vektörler bronşiyal epitelde gen aktarımında kullanılmakta olup, herpes simpleks Tip I ile hepatositlere de gen transferi yapılabilir(2).

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerden lipofeksiyon yöntemi hayvanlarda akciğer epitel hücresine in-vivo gen transferinde kullanılabilir. DHEA dekstran ile gen transferi in-vivo arteriyel gen transferinde de kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat çöktürülmesiyle gen transferinde in-vivo başarılı sonuçlar alınmıştır. Hbs antijeni, insan insülini, kloramfenikol asetiltransferaz bu yöntemle çöktürülüp yenidoğan sıçanlara İntraperitoneal olarak verildiğinde karaciğer ve dalakta bu genlerin geçici ekspresyonu belirlenmiştir (4).

Gen Tedavisi Klinik Uygulamaları

Gen tedavisi hem insanda hem de hayvanların değişik türlerinde denenmiştir. Bu denemelere çeşitli örnekler verilebilir: Adenozin deaminaz (ADA) geni insanlarda periferik kan lenfositlerine ve hepatositlere, hayvanlarda ise periferik kan kök hücrelerine aktarılabilir. Faktör VIII geni hayvanlarda endotelial hücrelere ve periferik lenfositlere aktarılırken, alfa 1 antitripsin geni hayvanlarda hepatositlere aktarılabilir (6). Gen tedavisinde önemli olan aktarılan genin organizmada zarara yol açmaması ve yeterli düzeyde eksprese olmasıdır.

Tek gen mutasyonunun görüldüğü genetik geçişli hastalıklar, gen tedavisinde ilk kez uygulama yapılması düşünülen hastalık gurubudur (7). Ortalama 4000 genetik hastalıktan çok az bir kısmının geni bulunmuştur (2). Bu hastalıklar halen gen tedavisi yapılan ve uygulanması düşünülen genetik hastalıklardır (Tablo 2). Gen tedavisi uygulamalarında resesif hastalıklarda detektif genin değiştirilmesi veya düzeltilmesi şart olmayıp, hedef hücrenin nükleusuna normal genin eklenmesi yeterlidir. Normal gen detektif resesif gen üzerine dominant etki gösterip taşıyıcı durumu oluşturur. Dominant hastalıklarda ise detektif genin düzeltilmesi; anormal dizinin yerine normal dizinin konması gerekmektedir (3).

Tablo 1. Başlıca gen aktarım yöntemleri

Viral vektörler	Fiziksel ve kimyasal yöntemler
Retroviral vektörler	Transferrin reseptörü aracılığı ile
Adenoviral vektörler	Asialoglikoprotein DNA konjugatları
Adenoassosiyasyon virüsü	Lipofeksiyon
Herpes simpleks virüsü	Direkt aktarım
Polio virüsü	Kalsiyum fosfat çöktürmesi
Parvo virüsü	Dietilaminoetil dekstran
Sindbis ve diğer RNA virüsleri	Elektroporasyon

Tablo 2. Detektif genin ayrıştırılarak gen tedavisi yapılan veya yapılması düşünülen genetik hastalıklar

Hastalık	Detektif Gen
Ciddi kombine immün yetmezlik	Adenozin deaminaz
Hemofili A ve B	Faktör VIII, IX
Talasemi	Beta globin
Orak hücreli anemi	Beta globin
Ailevi hiperkolesterolemi	LDL reseptörü
Gaucher hastalığı	Glukoserebrosidaz
Mukopolisakkaridoz	Beta glukuronidaz
Amfizem	Alfa-1 antitripsin
Kistik Fibrozis	CFTR
Fenilketonüri	Fenil alanin hidroksilaz
Hiperamonemi	Ornitin transkarbomilaz
Duchenne tipi musküler distrofi	Distrofin

*Kistik fibrozis transmembran regülatör gen

Bu bölümde gen tedavisinde bazı deneysel ve klinik uygulamalardan bahsedilecektir.

Adenozin deaminaz (ADA) eksikliği

ADA eksikliği otozomal resesif geçişli bir pürin metabolizma bozukluğu olup, genellikle gelişen ciddi kombine immün yetmezlik nedeniyle fatal seyreden bir hastalıktır, insanda ilk gen tedavisine 14 Eylül 1990'da M.Blase ve arkadaşları tarafından National Institute of Health'de (NIH) başlandı. Hasta ADA eksikliği olup kombine ağır immün yetmezlik geliştirmiş 4 yaşında bir kız çocuktur. Bu hastaya kendi lenfositleri ex vivo olarak normal insan ADA geni taşıyan bir retroviral vektör ile transdüksiyon yapılmış ve intravenöz olarak verilmiştir (2,8). Hastaya daha sonra polietilen glikol konjuge edilmiş ADA haftada bir intramüsküler olarak verilmeye devam edilmiştir. T hücreleri normal sellüler ve humoral immün cevaplar oluşturmuşlar ve hasta normal yaşamına dönmüştür. Gen tedavisi kesildikten iki yıl sonra T hücrelerindeki ADA gen ekspresyonu yeterli düzeyde kalmıştır (8). Bu yöntem fare ve maymunlarda yapılan çalışmalarda da denenmiştir (9). Bu olguya benzer olgular bildirilmiştir. Hastalarda deri testlerinin bir kısmına yanıtızlığın devam etmesi nedeniyle hastalardan alınan kemik iliği hücreleri ve periferik kan lenfositlerine ex-vivo olarak ADA geni retroviral bir vektörle aktarılmış ve geri verilmiştir (10). Bu hastalarda tedaviden iki yıl sonra T ve B ve kemik iliği hücrelerinin ve granulositlerin ADA geni-

ni ekspresse ettiği gösterilmiştir (10). Bu sonuçlar progrenitör hücrelerin kullanımının gen aktarımında başarılı sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

Kistik fibrozis

Otozomal resesif geçişli olup, kistik fibrozis transmembran regülatör geninde (CFTR) mutasyonun olduğu bir hastalıktır. Bu gen klor kanalı olarak aktivite gösteren bir membran proteinini kodlar(11).

Kistik fibroziste nazal epitel veya akciğer epiteline viral vektörler ve lipozomlar ile gen transferi yapılır (12-14). Adenoviral vektörler solunum yolu epitelinde in vivo ve in-vitro yüksek oranda gen ekspresyonu sağlar ve bu nedenle en fazla tercih edilirler. Ayrıca adeno-assosiyasyon vektörleri ve retroviruslar da kullanılmaktadır (13). Lipozomlar ile gen transferinde katyonik lipozomların DNA ile kompleksler oluşturup hücreye aktarılması amaçlanmış olup, öncelikle farelerde uygulanan bu yöntemle gen ekspresyonunun, gen aktarımından bir hafta sonraya kadar devam ettiği gösterilmiştir (12). Kistik fibroziste ilk olarak invitro olarak gen mutasyonu taşıyan hücrelere normal bir cDNA verilmesi ile klor sekresyonunun normale döndüğü gösterilmiştir. Hayvan deneylerinde ise adenoviral vektörler kullanılarak CFTR geni verilmesi ile başarılı sonuçlar alınmıştır (12,15).

Kistik fibroziste gen transferinin insan üzerinde uygulaması, NIH'da 1993 yılında 23 yaşındaki bir hastada olmuştur. Hastanın ilk gün burun mukozasına, ertesi gün trakea ve sol akciğer alt lobuna normal CFTR geni taşıyan adenovirus enjekte edilmiş ve bu uygulama sonucu genin verildiği hücrelerde ekspresse olacağı ve klor transportunun düzeleceği umulmuştur (3,15,16).

Alfa-1 antitripsin eksikliği

Alfa-1 antitripsin eksikliği amfizem, hepatit ve siroza neden olabilen bir hastalıktır. Alfa-1 antitripsin molekülü nötrofil elastaz enziminin en önemli inhibitörüdür. Bu hastalıkta gen tedavisi çalışmaları in vitro olarak hayvan fibroblastlarında başlamıştır. Hayvan fibroblastlarına invitro olarak alfa-1 antitripsin cDNA ekspresse eden bir retrovirus konulmuş ve modifiye bu hücreler hayvan peritonuna implante edilmiştir. Çalışmalarda alfa-1 antitripsin düzeyinin implantasyondan bir ay sonra serum ve epitelyal yıkama sıvısında yüksek düzeyde devam ettiği gösterilmiştir (2,14).

Bu hastalıkta invitro olarak hayvanlarda olog T hücreleri, hepatositler ve vasküler endotelde de gen tedavisi yapılabilir (2). Henüz insanlarda çalışmalar yapılmamıştır.

Ailevi hiperkolesterolemi

Otozomal dominant geçişli olup, hepatositlerde düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörünün olmayışına veya detektif oluşuna bağlıdır. Hayvanlarda retroviral vektörler ile gen transferi sonucu genetik olarak düzeltilmiş olog hepatositlerin karaciğere tekrar verilmesi ile serum kolesterol düzeyinde belirgin düşme sağlanmıştır (17). Hayvan deneylerinden alınan bu başarılı

sonuçlardan sonra, ilk defa 1992'de Wilson ve arkadaşları tarafından 29 yaşındaki bir kadına gen tedavisi uygulanmıştır. Parsiyel hepatektomi yapıp, elde edilen hepatositlere ex vivo olarak normal LDL reseptör protein geni taşıyan bir retroviral vektör ile transdüksiyon yapılmıştır. Hücreler daha sonra dalak veya portal ven yoluyla karaciğere direkt olarak infuze edilmiştir ve karaciğerde LDL reseptör ekspresyonu %2-10'a ulaşmıştır (18). Bu tedavinin başarıyla sonuçlanmasından sonra, başka hastalarda da bu tip gen tedavisi için izin verilmiştir.

Müsküler distrofi

Duchenne tipi müsküler distrofi (DMD), distrofin eksikliğine bağlı bir hastalıktır. Bu genetik anormallik X kromozomunun Xp21 lokusundaki distrofin genindeki bir mutasyona bağlıdır. Gen tedavisi normal distrofin proteininin kasta yeterli düzeyde yapımını sağlayabilir. Bu hastalık için çeşitli gen tedavisi stratejileri oluşturulmuştur. Bunlardan biri myoblast transferi olup, hayvan çalışmalarından sonra DMD tanısı almış hastalara normal myoblastlar transplante edilmiş ve transplantasyondan bir ay sonra kas biyopsisinde normal distrofin üretimi görülmüştür (19). Distrofin geni taşıyan virusların kasa enjeksiyonu diğer bir tedavi yaklaşımıdır. Bu çalışmada distrofin cDNA kodlayan vektör hayvanın kasına enjekte edildiğinde kas fibrillerinin yarısında distrofin ekspresyonunun olduğu görülmüştür (2,20).

Beyin ve sinir sistemi hastalıkları

Beyin ve sinir sistemi hastalıklarında gen tedavisi hayvan modellerinde gerçekleştirilmiştir. Gen vektörü olarak adenovirus, rous sarkoma virus ve herpes simpleks virus tip 1 kullanılabilir (3,21). Alzheimer hastalığı için gerçekleştirilen hayvan modellerinde "nerve growth factor" (NGF) ekspresse eden rekombinant fibroblastlar beyine yerleştirilmiş, Parkinsonizm oluşturulmuş hayvan modellerinde ise tirozin hidroksilaz ekspresse eden rekombinant hücreler verilmiş ve hayvanlarda beyinin bazı işlevlerinin geriye döndüğü gösterilmiştir (2). Bu çalışmaların gelecekte insanlarda uygulanabilirliği tartışılmaktadır.

Böbrek hastalıkları

Bu konuda hayvan deneyleri düzeyinde çalışmalar yapılmıştır. Kitamura ve arkadaşları (22) çalışmalarında olog mezanjiyal hücreleri gen transferinde vektör olarak kullanmıştır. Sıçanlardan renal biopsi ile alınan glomerüllerden mezanjiyal hücre kültürleri yapılmış ve daha sonra bakteriyel beta-galaktosidaz gibi bir haberci gen kalsiyum fosfat kopresipitasyon yöntemi kullanılarak bu hücrelere sokulmuştur. Daha sonra beta-galaktosidaz ekspresse eden hücreler aynı hayvanların sol renal arterine enjekte edilmiş ve bir hafta sonra çıkarılan her iki böbrekte aktarılan genin ekspresyonu gösterilmiştir. Bu tip tedavi protokollerinin gelecekte insanlarda potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir.

Bazı metabolik hastalıklarda gen tedavisi

Hereditör tirozinemi tip I (HT I): Otozomal resesif olan bu hastalıkta primer defektin fumaril asetoasetaz yolunda olduğu bulunmuştur. Bazı araştırmalarda retroviral bir vektör ile taşınan fumarilasetoasetaz geni HT I hastalarından alınan fibroblastlara konmuştur ve insanlarda da uygulanabilirliği tartışılmaktadır (23).

Fenil ketonüri: Fenil alanin hidroksilazın hepatik eksikliği ile görülen ve otozomal resesif geçiş gösteren bu hastalıkta gen tedavisinde üç farklı vektör sistemi üzerinde çalışılmaktadır: Rekombinant retroviral vektörler, adenoviral vektörler ve DNA/protein kompleksleri (24). Özellikle adenoviral vektörler ile hayvan deneylerinde başarılı sonuçlar alınmıştır.

HIV enfeksiyonu

HIV kazanılmış immün yetmezlik sendromuna yol açan bir virus olup retrovirüslerin lentivirus alt ailesindedir. HIV, seçici olarak CD4(+) T helper lenfositlerin oluşumunu ve fonksiyonlarını inhibe ederek CD4 düzeyinde düşmeye ve immünolojik anormalliklere neden olur (25). HIV enfeksiyonunun gen tedavisinde 3 yöntem vardır:

- 1) Sadece HIV ile enfekte olan hücrelerde eksprese olan intihar genlerinin transferi
- 2) Viral hücre siklusunun değişik evreleriyle bağlantılı olan genlerin transferi
- 3) Enfekte olan hücrelerin immunojenitesini artırmak yoluyla konak immün sistemi tarafından yok edilmesini sağlama (2).

HIV enfeksiyonunda hematopoetik sistem hücrelerinin primer hedef hücreleri olması nedeniyle, bu enfeksiyonda yabancı bir genin sokulması için özellikle multipotent stem hücreleri kullanılmaktadır. Bu gen stem hücrelerinin proliferasyonu ve differansiasyonu sonucunda matür hematopoetik hücrelerde bulunabilir (26). Bir çalışmada AIDS hastalarında CD4 veya bunun füzyon türevinin verilmesi ile yeterli klinik yanıtın alınmadığı görülmüştür (25).

HIV enfeksiyonuna yönelik gen tedavisi iki düzeyde etki oluşturur:

I. Sellüler düzeyde HIV ile enfekte hücrelerin öldürülmesi. Bu olaya örnek suisid genlerin kullanımınıdır. Bu sitotoksik etki differi toksini, herpes simpleks virus timidin kinaz (HSV-tk) ve immonoterapi ile oluşturulabilir.

II. Moleküler düzeyde HIV ile enfekte hücrelerde yeni virus partiküllerinin oluşumunu önleyerek viral gen ekspresyonunun inhibe edilmesi. Buna örnek antisense RNA, ribozimler, rre RNA, TAR RNA'dır (2,26).

HIV ve hedef hücrelerin karmaşıklığı nedeniyle HIV enfeksiyonunun genetik tedavisinde bütün yaklaşımların kombinasyonu kullanılmalıdır.

Tümörler ve gen tedavisi

Kanserin moleküler temelinde onkogenler ile tümör supresör genler arasındaki dengenin yattığı bilinmekte-

dir; bu bilgiler kanser tedavisinde yeni hedefleri gösterebilir (5,27). Solid tümörlerde ve hematopoetik neoplazmalarda gen tedavisi iki amaca yöneliktir:

- 1) Kan, endotelial hücre, epitelyal hücre, deri, kas, karaciğer gibi elemanlarda bulunan normal progenitor hücrelerin modifikasyonu ile sitotoksitelerinin artırılması,
- 2) Tümör hücrelerinin modifikasyonu ile tümörün çoğalma ve metataz yapma yeteneklerinin azaltılması (6).

Tümör infiltrate eden lenfositler (TIL) ve gen tedavisinde kullanımı: İnsan ve hayvan tümörlerinin mononükleer lökositler tarafından inhibisyonu ilk olarak Ehrlich ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. TIL konakçının aktif bir immün yanıtıdır. Malign melanoma, över kanseri, meme kanseri, akciğer kanserleri, sarkomlar ve beyin tümörlerinde TIL saptanmıştır (28). TIL genellikle CD3 lenfositlerdir (% 60); CD4 ve CD8 T hücreleri de TIL sınıfına girebilir. TIL CD16 ve B hücrelerini de çok düşük oranda içerebilir (28).

TIL gen tedavisinde ilk defa 1988'de Rosenberg ve arkadaşları tarafından malign melanomalı bir hastada kullanılmıştır. Bu hastadan izole edilen TIL interlökin 2 (IL-2) varlığında doku kültürlerinde üretilip hastaya intravenöz olarak ilave yüksek doz IL-2 ile birlikte verilmiş ve hastalarda önceleri cevap alındıysa da daha sonra tümörde ilerleme saptanmıştır (3,6,28). Hayvan deneylerinde IL-2, IL-4, gamma interferon, GM-CSF, TNF-alfa gibi sitokinleri salgılayan TIL gibi hücrelerin antitümör cevabı uyandırdığı saptanmıştır. Gen aktarım teknikleri ile TIL'lere bu sitokinler salgılatılabilir (7,28).

Gen transferi ve tümörler: Bazı tümörlerde invitro gen transferinden sonra malign fenotipte supresyon oluşabilir (Tablo 3). Bu genler tümör supresör genlerdir. Gen tümör hücresine transfer edildiğinde proliferasyon baskılanır ve ayrıca hayvanlarda bu gen kanser hücresine sokulduğunda tümör oluşturma özelliği azaltılır (5,7).

Tümörlerde kemoterapi ve gen tedavisi: Kanser tedavisinde gen tedavisi normal hücrelerde kemoteropodik ajanlara karşı direncin oluşması veya tümör hücresinde bu ajanların aktivasyonunun arttırılması amacıyla kullanılabilir (5). Kemik iliği kök hücresine genlerin sokulması transdüksiyon olan hücrede sitotoksik ajanın etkilerine karşı direnç oluşturur ve böylece birçok yan etki önlenir. Bazı hayvan modellerinde çoklu ilaç direnç

Tablo 3. invitro gen transferinden sonra malign fenotipte baskılama oluşturan gen örnekleri

Gen	Tümör Tipi
P53	Kolon, glioma, adenokanser
RB	Retinoblastom, prostat kanseri, osteosarkom
WT1	Wilms tümörü
E-cadherin	Meme kanseri, renal kanser
GCF	Adenokanser
rap 1A	ras transforme hücreler
nm23	Melanoma
NF1 / GAP	Nörofibromatozis I

geni (MDR 1) kemik iliğinde eksprese edilmiş ve hayvan-da etoposide, doksorubisin gibi antikanser ajanları ile tedavide lökopeni yan etkisi önlenmiştir (6).

Prodrug aktive edici enzimlerin kullanımı:

Tümörlerde gen tedavisinde diğer bir yaklaşım prodrug aktive edici enzimlerin kullanımıdır. Bu yöntem tümör hücrelerine enzim eksprese eden viral partiküllerin konmasına ve bu enzimin daha sonra verilen ilacı sitotoksik metabolitlerine çevirmesine ve böylece hücre ölümünün artırılmasına dayanır. Bu yöntemde yabancı gen sadece tümör hücrelerinde eksprese olduğundan, normal hücreler minimal etkilenir (2,5). Bu tip gen aktarımı hepatosellüler kanser, kolorektal kanser, pankreas tümörleri, teratoma, melanoma, akciğer, meme, prostat, pankreatik ve mide kanserinde kullanılabilir. Bu yöntemde enzim olarak E.Coli sifozin deaminaz, varicella zoster virüs timidin kinaz, herpes simpleks virüs timidin kinaz, linamaraz gibi enzimler kullanılabilir. Bu tip gen aktarımı ilk kez Aralık 1992'de Jenks tarafından sıçanlarda adult glioblastomanın tedavisinde kullanılmıştır. Bu çalışmada bir retrovirusun ürettiği herpes simpleks virüs timidin kinaz taşıyan fibroblastlar beyin tümörlerine enjekte edilmiş ve proliferen olan hücrelere transdüksiyon olmuştur. Hayvanlar gansiklovir ile tedavi edilmiş ve tümörde regresyon görülmüştür (2,21), Araştırmacılar çocuklardaki beyin tümörlerinde de bu yöntemlerin kullanılabileceğini savunmaktadırlar.

Gen Tedavisinde Etik ve Güvenilirlik

Gen tedavisi etik ve bilimsel olarak birçok bilinmeyenleri içermektedir, insan hastalıklarının gen tedavisi çok iyi düzenlenmiş ve uygun kurallar ile gerçekleştirilmelidir. Gen tedavisi yapılacak olan hastalıkta etik olarak bulunması gerekli olan kurallar şunlardır:

I.Gen tedavisi yapılacak olan hastalık monogenik, otozomal resesif bir hastalık olmalı, yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olmalı ve hastalığın diğer tedavileri etkisiz olmalıdır.

II. Hücre kültür modellerinde ve hayvan modellerinde yeterince ve ayrıntılı deneyler yapılmış olmalıdır.

III. Tüm uygulamalar ilgili kurullarda tartışılmalıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 'National Institute of Health' in (NIH) bir alt komitesi olan 'Recombinant DNA Advisory Committee' (RAC) kurulmuştur. Bu komiteye bağlı 'Human Gene Therapy Committee' 'çalışmaktadır ve bütün gen tedavi uygulamaları bu kurullarda tartışılmaktadır (1,29),

Gen tedavisinin klinik kullanımının henüz yeni olması nedeniyle protokollerin ne kadar emin olduğu bilinmemektedir. Halen gen aktarımı yapılan hastalarda önemli bir yan etki gözlenmemiştir. 1992'de gen tedavisi ve kemik iliği transplantasyonu yapılan sekiz maymunun üçünde T hücreli lenfoma gelişmiştir. Halen birçok retroviral vektör "moloney murine lösemi"Virusundan (MLV) derive edilmektedir ve bu maymunlarda T hücreli lenfoma gelişiminin MLV nedeniyle olduğu düşünülmektedir (29).

KAYNAKLAR

1. Friedman T.The maturation of human gene therapy. Acta Paediatr 1996;85:1261-5.
2. Harris J.Sikora K. Human genetic therapy. Mol Aspects Med 1993;14(6):451-546.
3. Berkel AI.Gen tedavisi: Genel İlkeler.son gelişmeler ve klinik uygulamalar. Çocuk Sağ Hast Derg 1994;37:93-109.
4. Akar N.Rekombinant teknolojinin tedavide kullanımı. İn: Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara:Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Serisi, 1995:179-97.
5. Gutierrez AA, Lemoine NR, Sikora K. Gene therapy for cancer. Lancet 1992; 339:715-21.
6. Deisseroth AB, Kavanagh JJ, Hanania EG, Fu S, Kornblau SM, Estey E, et al. Gene therapy: Chemoprotection, immunoenhancement and modification of tumor cells. Cancer Bull 1993; 45:139-45.
7. Davies K, Williamson B. Gene therapy begins. BMJ 1993; 306:1625-6.
8. Blaese RM, Culver KW, Miller DA, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. Science 1995; 270:475-80.
9. Ferrari G, Rossini S, Giavazzi R, Maggioni D, Nobili N, Soldati M, et al. An In vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency. Science 1991; 251:1363-6.
10. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. Science 1995; 270:470-5.
11. Tizzano EF, Buchwald M. Recent advances in cystic fibrosis research. J Pediatr 1993; 122:985-8.
12. Coutelle C, Caplen N, Hart S, Huxley C, Williamson R. Gene therapy for cystic fibrosis. Arch Dis Child 1993; 68:437-43.
13. Flotte TR, Prospects for virus-based gene therapy for cystic fibrosis. J Blomembr 1993;25(1):37-42.
14. Alton E, Caplen N, Geddes D, Williamson R. New treatments for cystic fibrosis. Br Med Bull 1992; 48(4):785-804.
15. Crystal RG. In vivo human gene therapy for the respiratory manifestations of cystic fibrosis. Seventh annual North American cystic fibrosis conference. Dallas,Texas October 113-16 1993, Ped Pulmon 1993;9(suppl):65 (plenory summaries).
16. Turner L, Hasanoğlu A. Kistik fibrozis tedavisinde yeni uygulamalar. T Klin J Pediatr 1995; 4:36-42.
17. Chowdhury JR, Grossman M, Sanjeev G, Chowdhury NR, Baker JR, Wilson JM, Long-term Improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy In LDLR-deficient rabbits. Science 1991; 254(5039):1802-5.
18. Wilson JM.Grossmann M. Therapeutic strategies for familial hypercholesterolemia based on somatic gene transfer. Am J Card 1993; 72:59D-63D.
19. Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L, et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. Nature 1992; 356(6368):435-8.
20. Engel AG. Gene therapy for Duchenne dystrophy. Ann Neuro 1993; 34(1):3-4.

21. Randall T. Gene therapy for brain tumors in trials correction of inherited disorders a hope. *JAMA* 1993; 269(17):2181-82.
22. Kitamura M, Burton S, Yokoo T, Fine LG. Gene delivery into the renal glomerulus by transfer of genetically engineered, autologous mesangial cells. *Exp Nephrol* 1996; 4:56-9.
23. Holme E, Lindstedt S. Diagnosis and management of tyrosinemia type I. *Current Opinion in Pediatrics* 1995; 7:726-32.
24. Eisensmith RC, Woo SLC. Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996; 155(suppl 1): S16-S19.
25. Schooley RT, Merigan TC, Gaut P, Hirsch MS, Holodniy M, Flynn T, et al. Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related-complex. *Ann Int Med* 1990; 112:247-53.
26. Buchsacher GL. Molecular targets of gene transfer therapy for HIV infection. *JAMA* 1993; 269(22):2880-6.
27. Roth JA. Targeting cancer genes: A novel approach to cancer prevention and therapy. *Cancer Bull* 1993; 45:171-7.
28. Platsoucas CD, Freedman RS. Tumor infiltrating lymphocytes in gene therapy. *Cancer Bull* 1993; 45:118-24.
29. Cornetta K. Safety aspects of gene therapy. *British J Haematology* 1992;80:421-6.