

Možnosti a perspektivy genové terapie

Genovou terapií rozumíme vnesení, odstranění nebo úpravu defektního genu buněk za účelem léčby geneticky dědičných chorob. Úprava genu může vést např. k tvorbě určitého léku nebo funkčního enzymu apod. V počátcích léčby se terapie osvědčila zejména u imunodeficientních stavů. První pacientkou byla čtyřletá dívka se vzácnou poruchou imunity (SCID). Její léčba spočívala v genetické úpravě jejích vlastních nefunkčních bílých krvinek, doplněním genu zajišťujícím jejich správnou funkci. Výsledkem bylo pouze částečné zlepšení, ale i tak se jednalo o úspěch. Stalo se tak 14. září 1990.

Užití genové terapie

Nejčastějším principem genové terapie je záměna funkčního genu za gen mutovaný. Odhaduje se, že největší potenciál užití má metoda u monogenně podmíněných nemocí – cystická fibróza, hemofilie, Duchennova muskulární dystrofie apod. S jejím použitím se však počítá i v léčbě nádorových onemocnění.

Podmínky použití genové terapie

- Znalost přesné sekvence zkoumaného genu.
- Znalost příčiny a patologického procesu vzniku onemocnění (nedostatečné množství produktu, tvorba patologicky působícího produktu mutovaného genu apod.).
- Výběr vhodného vektoru – nosiče (retroviry, adenoviry).
- Souhlas pacienta.

Metody vkládání genu do lidských chromozomů

Ex vivo techniky

Buňky postižené oblasti jsou chirurgicky odstraněny. Do získané tkáně vložíme zdravou formu genu a a kultivujeme ve vhodném prostředí. Po namnožení dostatečného množství buněk jde pacient znovu na operaci, během které se tkáň aplikuje na původní místo excize.

Velice často odebíranou tkání na kultivaci je vzorek kostní dřeně. Ta jakožto producent krevních buněk poté zajišťuje roznašení geneticky upravených buněk krví po těle. Výhoda snazší distribuce je často utlačována nevýhodami této techniky – zákrok je pro pacienta velmi bolestivý a musí probíhat ve dvou fázích (odběr kostní dřeně a následná reimplantace), protože sama **kultivace** vyžaduje mnoho hodin.

In vivo techniky

Tato metoda nevyžaduje operační řešení ani anestezii. Dochází k aplikaci upraveného genu přímo do buněk těla. Musí však docházet k využívání virů jako nosičů informace.

Užívají se 2 hlavní skupiny virů:

- **Jednoduché retroviry**
 - Jejich výhodou je kompletní potlačení virové DNA. Přenášená je pouze informace geneticky upravené DNA. Jejich výsledky jsou dlouhodobé a nedochází k napadání pacienty virem.
 - Působí pouze na dělící se buňky. Na již existující defektní buňky vliv nemají. Toho lze využít v genové terapii nádorů.
- **Adenoviry**
 - Působí rychleji než retroviry, ale doba trvání účinku je kratší – v rámci týdnů. Adenoviry svou genetickou informaci nezačleňují do genomu buňky. Z toho důvodu je exprese genu pouze přechodná a vektor musí být aplikován opakovaně. Imunitní systém pacientů má tendence s těmito virem interferovat a vytvářet reakci. Pacienti proto trpí příznaky nachlazení a rýmy. Jsou však známy i případy vážnějších interakcí (viz níže).

K dosažení stejného výsledku je potřeba několikanásobně menšího množství roztoku adenovirů (v rámci mililitrů) než u retrovirů (v rámci litrů).

Dále se užívají:

- **Adeno-asociované virové vektory**
 - Podobně jako adenoviry mohou infikovat i nedělící se buňky. Na rozdíl od adenovirů však nevyvolávají imunitní reakci organismu. Jejich nevýhodou však je, že pojmou pouze malý inzert.
- **Lentivirové vektory**
 - Jedná se o retroviry, které jsou schopné, na rozdíl od jednoduchých retrovirů, infikovat i nedělící se buňky.

Typy genové terapie

Somatická genová terapie (somatic gene therapy)

- opravuje geny pacienta, aniž by došlo k dědičnému předávání opravených genů na další generace

Zárodečná genová terapie (germline gene therapy)

- měnila by geny už v zárodečných buňkách (spermie, vajíčko) a změna genu by byla přenosná na další generace. Tento typ terapie zatím není povolen.

Strategie genové terapie

Přímá genová terapie

- oprava chyby, tzn. změny sekvence DNA, která je odpovědná za maligní transformaci. Např. odstranění mutace v protoonkogenu nebo vnesení chybějících tumorsupresorových genů
- nelze opravit všechny buňky, protože genotyp má multifaktoriální charakter

Nepřímá genová terapie

- vnesení nové genetické informace do buňky (nádorové nebo jiného typu), která vede k likvidaci nádorových buněk. Př. vnesení sekvencí DNA, které kódují např. stimulaci antitumorové imunitní odpovědi nebo mění nádorovou angiogenezi a nebo aktivují neaktivní molekulu antimetabolitu k její cytotoxické aktivitě
- přísná etická kritéria, přísný výběr pacientů, je zvažována bezpečnost zákroku jak pro pacienta, tak pro ošetřující personál, účelnost terapie

Vlastní genová manipulace

Probíhá ex vivo (mimo celý organismus). Existují různé techniky pro vnesení genu do izolovaných buněk:

1. Fyzikální metody
 - umožňují přímé vpravení nukleové kyseliny do cílových buněk (mikroinjekce, mikroprojektily nebo elektroporace – zavedení slabého el. proudu k buněčné suspenzi za přítomnosti genu, který má být do buňky inkorporován)
 - účinnost < 1%
2. Chemické metody
 - využívají pro inkorporaci genů do buněk např. fosforečnan vápenatý, liposomy (zlepšují průchod přes buněčnou membránu)
3. Biologické metody
 - využít virů jako vektorů DNA, nejč. DNA viry (papovaviry, adenoviry, herpes simplex virus) a retroviry
 - účinnost přenosu požadované sekvence – téměř 100%
 - další vektory: plazmidy – obsahují multiplikované kopie vybraného genu, jsou injikovány do krevního řečiště nebo přímo do oblasti nádorového bujení
 - monoklonální protilátky
 - *in vitro* pomnožené tumor infiltrující lymfocyty (TIL)

TIL po i.v. podání selektivně infiltrují pooperační rezidua nádoru, ze kterého byly izolovány. Ex vivo může být do genomu TIL integrován např. gen pro TNF (tumor necrosis factor). Gen TNF (je součástí genomu TIL) je přepisován a syntetizovaný protein je secernován přímo do nádorové tkáně, kterou nekrotickým procesem likviduje. Geneticky řízené zvýšení imunobiologické aktivity.

Př. retrovirus: Nejprve je in vitro geneticky modifikován. Sekvence kódující virové proteiny jsou odstraněny a ponechány jsou pouze sekvence kontrolující jejich expresi (LTR). Následuje vystřížení sekvencí kódujících tvorbu produktu zvoleného pro příslušnou genovou terapii. Tyto rekombinantní retroviry mají schopnost infikovat buňky a začlenit do jejich genomu exogenní geny, ale nemohou se replikovat. Příkladem genové terapie tohoto typu je léčba maligního gliomu (nádor s vysokou mitotickou aktivitou) – nemetastazuje a je obklopen nervovou tkání, která se nereplikuje.

Př. Herpes simplex virus (HSV): Jeho gen pro enzym thymidinkinasu byl integrován do genomu cílové buňky a v ní přeměňuje jinak neaktivní lékovou formu (prodrug) v aktivní látku s cytostatickým účinkem.

Přístupy k léčbě

Jestliže je příčinou onemocnění nedostatečná produkce určitého proteinu kódovaného defektním genem, volíme aplikaci upraveného genu kamkoliv do lidského genomu. Pokud je však patologickým činitelem produkt vznikající přepisem mutovaného genu, je nutné tento gen cíleně vyřadit z překladu.

Současné využití

V současné době je však genová terapie stále užívána spíše vzácně. Důvodem jsou přetrvávající obavy o její bezpečnosti. Jedná se stále o manipulaci s lidskou DNA, což může vyvolávat i **etické problémy**.

V minulosti se objevilo několik případů, kdy došlo k vážnému zdravotnímu poškození pacientů genové terapie. Evidováno bylo i několik úmrtí. Jednalo se pravděpodobně (ačkoliv příčiny se dlouhodobě zkoumají) o masivní imunitní reakci organismu na opakovanou aplikaci adenovirů.

Genová terapie je dnes užívána spíše u velice **závažných chorob**, které nemůžeme léčit jiným způsobem, a které většinou končí letálně. Značnou nevýhodou metody je její finanční a technická náročnost. V neposlední řadě panují také obavy o vlivu terapie na **nádorové bujení**. Vnášené virové vektory mohou interferovat s jinými oblastmi DNA a pozměňovat například tumor supresorové geny nebo protoonkogeny.

Odkazy

Související články

- Kmenové buňky
- Klonování
- Monogenně dědičné choroby
- Možnosti genové terapie nádorů
- Mutace
- Adenoviry

Externí odkazy

- Genová terapie (<http://www.genetika-biologie.cz/genova-terapie>)
- Krize genové terapie (<http://www.gate2biotech.cz/krize-genove-terapie/>)
- ORACLE GENE Schol - Gene Therapy (http://library.thinkquest.org/28599/gene_therapy.htm)
- Gene therapy, přehledový článek (NEJM, 1.8.2019) (<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1706910>)

Použitá literatura

- ALBERTS, Bruce, et al. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- KOHOUTOVÁ, Milada, et al. *Lékařská biologie a genetika 2*. Praha, 2012. ISBN 978-80-246-1873-9.