بیوتکنولوژی (زیست‌فناوری) پزشکی

Medical Biotechnology

(بسته آموزشی و راهنمای یادگیری بیوتکنولوژی پزشکی)

مولف: زهرا السادات هاشمی

دکترای بیوتکنولوژی پزشکی ، هیات علمی پژوهشکده سرطان معتمد جهاد دانشگاهی

فهرست مطالب

Contents

مقدمه ۷

فصل اول: بیماری ها ۱۵

۱) اختلالات ژنتیکی ۱۶

۱-۱) ناهنجاری های کروموزومی ۳۲

۱-۱-۱) ناهنجاری های عددی کروموزوم ها ۳۷

۱-۱-۲) ناهنجاری های ساختاری کروموزوم ها ۴۱

۱-۱-۳) ناهنجاریهای میکسوپلوئیدی ۵۳

۱-۲) اختلالات تک ژنی ۵۴

جهش در DNA چیست؟ ۵۴

انواع جهش ها ۵۸

علل ایجاد جهش ها ۶۱

مکانیسم های ترمیم DNA ۶۲

تنظیم کنترل آسیب ۶۶

۱-۳) اختلالات چندژنی و چند عاملی ۷۹

۱-۴) اختلالات میتوکندریایی ۸۵

۲) اختلالات بیوشیمیایی یا متابولیکی ۸۸

۳) اختلالات ایمنی ۸۹

۳-۱) بیماری های خودایمنی ۹۰

۳-۲) نقص ایمنی ۹۳
۳-۳) آلرژی ۹۵
۴) بیماری های انگلی یا عفونی ۹۷
فصل دوم: تشخیص بیماری ۱۰۲
۱) تشخیص بیماری مبتنی بر اسید نوکلئیک ۱۰۸
۱-۱) هیبریداسیون مختص به DNA ۱۱۰
۱-۲) هیبریداسیون مختص به آلل ۱۱۱
۱-۳) PCR مختص به آلل ۱۱۱
۱-۴) فناوری های توالی یابی (سکوئنسینگ) DNA ۱۱۴
فرآیند دی دئوکسی نوکلئوتید ۱۱۶
تفاوت های بین ژنتیک و ژنومیکس ۱۲۳
۱-۵) ریزآرایه های DNA ۱۲۶
توالی یابی RNA ۱۲۹
کاربردهای آزمایش ژنتیکی ۱۳۱
۲) تشخیص بیماری مبتنی بر پروتئین ۱۳۴
۲-۱) الکتروفورز ژل ۱۴۰
۲-۲) طیف سنجی جرمی ۱۴۴
۲-۳) ریزآرایه های پروتئینی ۱۴۵
۲-۴) تکنیک های ایمونولوژیکی ۱۴۷
تست الایزا (ELISA) ۱۴۸
وسترن بلات ۱۵۳

فلوسایتومتری ۱۵۴
کیت های تشخیصی ۱۵۸
تست تشخیصی سریع ۱۵۹
بیوسنسورها ۱۶۳
فصل سوم: کاربردهای درمانی بیوتکنولوژی پزشکی ۱۷۲
۱) تولید بیوفارماسوتیکال ۱۷۲
۱-۱) آنتی بیوتیک ۱۸۷
۱-۲) آنتی‌بادی ها ۱۸۹
ساختار آنتی‌بادی ۱۹۳
برهمکنش های آنتی بادی- آنتی ژن ۱۹۷
تفاوت پلی کلونال و مونوکلونال آنتی بادی چیست؟ ۲۰۰
مهندسی نسل بعدی درمان‌های مبتنی بر آنتی بادی ها ۲۰۶
۱-۳) هورمون ها ۲۱۳
۱-۴) واکسن ۲۱۹
انواع واکسن ها ۲۲۱
۱. واکسن زنده ی ضعیف شده ۲۲۱
۲. واکسن های کاملاً کشته شده ۲۲۲
۳. واکسن های توکسوئید ۲۲۳
۴. واکسن های زیرواحد ۲۲۳
۵. واکسن وکتور ویروسی ۲۲۴
۶. آنتی‌بادی های ضد ایدیوتیپ ۲۲۴

۷. DNA واکسن ۲۲۶
۸. RNA واکسن ها ۲۳۲
۲) ژن درمانی و سلول درمانی ۲۴۰
۲-۱) ژن‌درمانی ۲۴۰
تاریخچه ژن‌درمانی ۲۴۱
ژن‌درمانی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPS) ۲۵۱
درمان با سلول‌های T دارای گیرنده آنتی ژن کایمریک (CAR-T cell) ۲۵۲
ویرایش ژنومی توسط روش CRISPR-Cas9 ..... ۲۵۵
مباحث اخلاقی اصلاح ژنتیکی ۲۵۸
وضعیت حال حاضر ایران در ژن درمانی ۲۶۰
۲-۲) سلول درمانی ۲۶۱
سلول های بنیادی ۲۶۲
انواع سلول‌های بنیادی ۲۶۸
۱. سلول‌های بنیادی همه توان ۲۶۸
۲. سلول‌های بنیادی پرتوان ۲۶۹
۳. سلول‌های بنیادی چند توان ۲۷۹
۴. سلول‌های بنیادی تک توان ۲۸۳
جایگاه سلول‌های بنیادی در پزشکی ۲۸۳
ایران؛ یکی از معدود کشورهای تولیدکننده‌ی سلول‌های بنیادی جنینی ۲۸۸
سلول‌های بنیادی سرطانی چه سلول‌هایی هستند؟ ۲۹۰
۱. مدل سلول بنیادی سرطانی ۲۹۱

۲. مدل تصادفی ۲۹۳

۳) مهندسی بافت و پیوند عضو ۲۹۵

تاریخچه‌ی مهندسی بافت و پیوند عضو ۲۹۶

یک بافت از چه اجزایی تشکیل شده است ۳۰۲

ویژگی های اختصاصی داربست های مهندسی بافت ۳۱۳

آینده‌ی مهندسی بافت و پزشکی بازساختی در ایران ۳۳۰

منابع ۳۳۳

واژه نامه ۳۳۵

مقدمه

بیوتکنولوژی پزشکی یا زیست‌فناوری پزشکی چیست؟

واژه‌ی "بیوتکنولوژی" برای نخستین بار در سال ۱۹۱۹ توسط کارل ارکی[1]، مهندسی مجارستانی، ابداع شد و به روش‌ها و تکنیک‌هایی اطلاق می‌شود که به کمک موجودات زنده می‌توان ترکیباتی را از ماده‌ی خام تولید کرد. در معاهده تنوع زیستی در سال۱۹۹۲، برای بیوتکنولوژی تعریفی استاندارد تدوین شد: "هرگونه استفاده و کاربرد فناورانه از سیستم‌های زیستی، موجودات زنده یا مشتقات آن‌ها برای تولید یا اصلاح محصولات و فرآیندها به منظور کاربری خاص" (به زبان ساده تر: زیست‌فناوری، دانش استفاده از موجودات زنده یا بخشی از آن‌ها (مانند DNA (دئوکسی ریبونوکلئیک اسید) یا پروتئین) برای تولید محصولات مفید است). این تعریف مورد توافق ۱۶۸ کشور عضو، همچنین مورد پذیرش سازمان غذا و کشاورزی ایالات متحده آمریکا (FAO)[2] و سازمان جهانی بهداشت (WHO)[3] قرار گرفت. زیست‌فناوری دانش جدیدی نیست و در واقع یکی از قدیمی ترین فناوری هاست. به‌طورمثال، این دانش از هزاران سال پیش برای تولید نان و پنیر مورد استفاده قرار گرفته است. زیست‌فناوری از دهه ۱۹۷۰ رشد چشمگیری داشته است و از آن زمان تاکنون اکتشافات زیستی در کنار فناوری منجر به پیشرفت‌های عظیمی شده‌اند.

زیست فناوری (بیوتکنولوژی) شامل مجموعه‌ای از تکنیک‌ها یا فرآیندهایی است که موجودات زنده یا واحدهای تشکیل-دهنده‌ی آن‌ها را برای ابداع محصولات و خدمات دارای ارزش افزوده به کار می‌گیرد. تکنولوژی‌های زیستی در سطوح صنعتی و تجاری به صنایع زیستی تبدیل می‌شوند. روش‌های معمول و سنتی استفاده از زیست فناوری شامل آمیزش

[1] Karl Ereky
[2] The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
[3] World Health Organization (WHO)

حیوانات و گیاهان و به کارگیری میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها در فرآیند تخمیر، آماده‌سازی و ذخیره‌سازی محصولات همچنین کنترل آفات (مثلاً کنترل یکپارچه‌ی آفت) است. با وجود اهمیت بسیار زیاد زیست‌فناوری و توجه به این حوزه به ویژه در ۲۵ سال اخیر، هنوز هم بسیای از مردم، حتی افراد تحصیل کرده و متخصص جامعه، از اهمیت آن چیزی نمی دانند. یکی از اهداف ما برای آموزش این حوزه، رسیدن به روزی است که هیچکس در جامعه‌ی ما نپرسد «زیست‌فناوری چیست؟».

شکل-۱ زیست فناوری پزشکی با به‌کارگیری روش‌های نوین و روبه‌رشد، پزشکان را در پیشگیری، تشخیص و درمان انواع بیماری‌ها یاری می‌دهد.

طیف وسیعی از فناوری‌های زیستی از ساده‌ترین تا پیچیده‌ترین آن‌ها به کشورها و سرزمین‌های مختلف این امکان را می‌دهد تا فناوری‌هایی را که متناسب با نیازها و اولویت‌های توسعه‌ی آن‌ها است انتخاب کرده و با این کار حتی به یک

درجه برتری برسند (برای مثال کشورهای در حال توسعه، ریزازدیادی[1] و کشت بافت گیاهی را به کار گرفته‌اند تا در صادرات گیاهان و سایر اجناس به صادرکنندگان برجسته جهانی تبدیل شوند.)

در دستورکار کنفرانس سازمان ملل در سال ۱۹۹۲ با موضوع محیط زیست و توسعه در ریودوژانیرو[2]، پتانسیل زیست فناوری در توسعه‌ی کشاورزی، محصولات غذایی و خوراک دام و طیور با هدف بهبودی سلامت انسان و حیوانات، کاهش آلودگی و حفاظت از محیط زیست تأیید شد.

گزارش توسعه‌ی انسانی[3] در سال ۲۰۰۱، زیست فناوری را وسیله‌ای برای مبارزه با چالش‌های اصلی بهداشتی مانند بیماری‌های عفونی (سل[4])، مالاریا و ایدز (اچ آی وی) در کشورهای فقیر معرفی کرد؛ همچنین زیست فناوری ابزاری مناسب برای کمک به توسعه‌ی مناطقی است که بیش از نیمی از فقیرترین جمعیت‌های جهان را در خود جای داده است که به واسطه‌ی انقلاب سبز عقب افتاده‌اند و به کشاورزی، جنگل‌داری و دام‌داری متکی هستند. واکسن‌ها، داروها و ابزار تشخیصی کارآمدتر و جدید، همچنین غذاها و خوراک دام و طیور با ارزش غذایی بالا برای برآورده کردن نیازهای در حال گسترش جمعیت جهانی مورد نیاز خواهند بود.

زیست فناوری و صنایع زیستی در حال تبدیل شدن به بخش جداناپذیری از اقتصاد دانش‌بنیان است؛ زیرا رابطه‌ی نزدیکی با پیشرفت در علوم زیستی و علوم کاربردی و فناوری‌های مرتبط با آن دارند. یک مدل جدید از فعالیت‌های اقتصادی، اقتصاد زیستی است که در آن، انواع جدیدی از شرکت‌ها ایجاد می‌شوند و صنایع قدیمی نیز احیا می‌شوند.

[1] micro-propagation
[2] Rio de Janeiro
[3] Human Development Report
[4] tuberclosis

اقتصاد زیستی تمام صنایع، کلیه فعالیت‌های اقتصادی و نیز سود و بهره‌ای تعریف می‌شود که حول سیستم‌های زنده سامان یافته است.

اقتصاد زیستی را می‌توان به دو بخش صنعتی اصلی تقسیم کرد: ۱- صنایع منابع زیستی[1] که به طور مستقیم از منابع زیستی بهره‌برداری می‌کنند- محصولات زراعی، باغداری، جنگل‌داری، دام و طیور، ماهی‌گیری و آبزی‌پروری. ۲- صنایع وابسته که سهم عمده‌ای به عنوان تأمین‌کننده یا مشتری بخش منابع زیستی دارند- بذرها و مواد شیمیایی کشاورزی، تکنولوژی‌های زیستی و صنایع زیستی، انرژی، فرآوری و خرده‌فروشی فیبر و غذا، داروسازی و مراقبت‌های بهداشتی، بانک‌داری و بیمه. همه‌ی این صنایع ارتباط نزدیکی با تأثیر اقتصادی ناشی از تغییرات ایجاد شده توسط انسان در سیستم‌های زیستی دارند.

پتانسیل اقتصاد زیستی برای تحریک رشد اقتصادی و خلق ثروت از طریق افزایش بهره‌وری صنعتی بی‌سابقه است. بنابراین جای تعجب نیست که کشورهایی پردرآمد که از نظر فناوری‌های نوین پیشرفته هستند، سرمایه‌گذاری‌های کلانی در تحقیق و توسعه (R&D) در حوزه‌های علوم زیستی، زیست فناوری و صنایع زیستی انجام داده‌اند.

در سال ۱۹۹۲ تخمین زده شده بود که صنایع زیستی ۸/۱ میلیارد دلار درآمد داشته باشد و کمتر از ۱۰۰هزار نفر را به کار مشغول کند اما در سال ۲۰۰۱، تخمین زده شد که صنایع زیستی در جهان درآمدی معادل ۳۴/۸ میلیارد دلار تولید کرده و حدوداً ۱۹۰ هزار نفر را استخدام کرده است و این نتایج بسیار شگفت انگیز بوده است.

ذی‌نفعان اصلی "انقلاب زیست فناوری" کنونی و صنایع زیستی ناشی از آن عمدتاً کشورهای پیشرفته‌ی صنعتی و فناوری هستند، یعنی آن‌هایی که از سرمایه‌گذاری کلان در زمینه‌ی تحقیق و توسعه و نوآوری در فناوری در محصولات

[1] bio-resource industries

داخلی خود بهره‌مند هستند. بنابراین ایالات متحده‌ی آمریکا، کانادا و اروپا بیشترین درصد از درآمد جهانی زیست فناوری، افراد شاغل در معاملات زیست فناوری و کل شرکت‌های زیست فناوری را به خود اختصاص داده‌اند.

اطمینان از این که کشورها و مردمی که به بیوتکنولوژی نیاز دارند به آن دسترسی نیز دارند، هنوز به عنوان چالشی اساسی باقی مانده است. به همین ترتیب ایجاد یک محیط مناسب برای دستیابی، سازگاری و گسترش زیست فناوری درکشورهای درحال توسعه یکی دیگر از چالش‌های بزرگ است. با این وجود تعداد زیادی از کشورهای در حال توسعه که به طور فزاینده‌ای از بیوتکنولوژی استفاده می‌کنند، صنعت زیستی موفقی را ایجاد کرده‌اند و هم‌زمان سرمایه‌گذاری-های خود را در زمینه‌ی تحقیق و توسعه‌ی علوم زیستی افزایش می‌دهند.

براساس آمارهای گرفته شده از ۴۳۰۰ شرکت بیوتکنولوژی فعال در جهان در سال ۲۰۰۳، ۱۸۵۰ شرکت (۴۳٪) در آمریکای‌شمالی؛ ۱۸۷۵ (۴۳٪) در اروپا؛ ۳۸۰ (۹٪) در آسیا و ۲۰۰ (۵٪) در استرالیا بودند. این شرکت‌ها دامنه‌ای از مشارکت‌کنندگان خالص در زمینه تحقیق و توسعه (R&D) تا تولیدکنندگان یکپارچه و سازمان‌های تولید کننده‌ی قراردادی (CMO)[1] را پوشش می‌دهند. ایالات متحده بیشترین تعداد شرکت‌های ثبت‌شده‌ی بیوتکنولوژی در جهان را دارد بعد از آن اروپا قرار دارد. در سال ۲۰۰۲ گردش مالی سالانه‌ی این شرکت‌ها ۳۳ میلیارد دلار در ایالات متحده و تنها ۱۲/۸ میلیارد دلار در اروپا بود. حدود ۲۰/۵ میلیارد دلار در آمریکا و در اروپا ۷/۶ میلیارد دلار به تحقیقات اختصاص یافت.

همانطور که اشاره شد با توجه به گستردگی حوزه های پژوهشی و کاربردی زیست فناوری، فرایندهای زیست‌فناوری در حوزه‌های بسیار متعددی مورد استفاده قرار می گیرد و بنابراین این فناوری به زیر مجموعه هایی تقسیم شده است:

[1] contract manufacturing organizations

مانند بیوتکنولوژی کشاورزی، بیوتکنولوژی صنعتی، بیوتکنولوژی پزشکی، بیوتکنولوژی دریا، بیوتکنولوژی میکروبی و غیره. درواقع این حوزه ها به خصوص بیوتکنولوژی پزشکی از روش‌های زیست فناورانه پیشرفته استفاده می کنند تا به هدف فناورانه خود دست پیدا کنند.

این روش‌های زیست فناورانه پیشرفته‌تر، عمدتاً مرتبط با استفاده از DNA نوترکیب هستند (برای مثال شناسایی، برش و انتقال ژن‌ها از یک موجود به موجود دیگر)، که در حال حاضر با تحقیقات در حوزه‌ی اطلاعات ژنتیکی (ژنومیکس) پشتیبانی می‌شود. این تمایز صرفاً به دلیل سهولت است؛ زیرا از تکنیک‌های امروزی برای بهبود روش‌های قدیمی استفاده می‌شود؛ برای مثال از آنزیم‌های نوترکیب و نشانگرهای (مارکر) ژنتیکی برای بهبود فرآیند تخمیر و آمیزش گیاهان و حیوانات استفاده می‌شود.. این روش‌های زیست فناورانه پیشرفته‌تر نه تنها در بخش "بیوتکنولوژی پزشکی" در پیشرفت‌های عظیم حوزه‌ی سلامت، شامل تولید داروها، واکسن‌ها و کیت‌های تشخیصی جدید نقش به‌سزایی داشته است، بلکه در حوزه‌های دیگری نظیر کشاورزی، پیدایش سوخت‌های جایگزین، کشف الیاف نوین برای صنعت پوشاک و حوزه‌ی جرم‌شناسی قضایی نیز تاثیرگذار بوده است.

زیست فناوری قرمز یا زیست فناوری پزشکی شاخه مهم و پر کاربرد از زیست فناوری است که با حوزه پزشکی مرتبط است. درواقع بیوتکنولوژی پزشکی یا بیوتکنولوژی قرمز، دربرگیرنده‌ی پژوهش‌ها و فناوری هایی است که در حیطه‌ی پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. زیست‌فناوری پزشکی به عبارتی، شامل استفاده از سلول‌های زنده و یا محصولات سلولی به منظور مطالعات پزشکی، تولید محصولات دارویی و تشخیصی است که به "پیش‌گیری از بیماری‌ها"، "تشخیص بیماری ها"، و در نهایت "درمان بیماری ها" کمک می‌کند. قطعا جوامع بشری بر این باور هستند که پیش گیری بهتر از درمان است ولی این بدین معنی نیست که در جستجوی روش های درمانی جدید با کمک بیوتکنولوژی پزشکی

نباشند. ابزارهای پیش گیری به تولید واکسن ها اشاره دارد البته امروزه واکسن های مدرن برای مبحث درمان نیز ساخته شده است از آنجاییکه مرز باریکی بین انواع این واکسن ها وجود دارد و نیز برای پرهیز از مطرح نمودن مباحث تکراری، مبحث واکسن ها در بخش کاربردهای درمانی در این محتوا قرار گرفته است. بالطبع نیاز به تشخیص دقیق یک بیماری قبل از درمان آن بیماری وجود دارد، بنابراین بیوتکنولوژی پزشکی از این حیطه نیز غافل نبوده است و همچنان در حال تولید کیت های تشخیصی برای انواع بیماری ها با دقت بالا است.

البته زیست فناوری پزشکی مشکلات و دردسرهای خود را نیز دارد؛ اما اکثر مردم در سراسر دنیا از ابداع روش‌های درمانی و تشخیصی جدید و ابزارهای پیش گیری طرفداری می‌کنند. درواقع کاربردهای سنتی زیست‌فناوری در قرون گذشته، تولید محصولات غذایی نظیر نان، سرکه، ماست و پنیر بوده‌است اما زیست فناوران با پیشرفت در حوزه‌ی پزشکی اقدام به تولید مولکول های حیاتی کردند. در اواخردهه‌ی ۱۹۷۰، زمانی که عصر طلایی زیست فناوری پزشکی آغاز شد، ژن‌های مربوط به پروتئین‌ها یا پلی‌پپتیدهایی که دارویی بودند، یا قابلیت استفاده به عنوان دارو را داشتند در سلول‌های میکروبی و یا جانوری کلون شدند و پروتئین‌ها در رِاکتورهای زیستی تولید شدند. به طوریکه با پیدایش فناوری DNA نوترکیب، دستکاری ژن‌ها و انتقال ژن از یک موجود زنده به دیگری یا به عبارت دیگر مهندسی ژنتیک، ظرفیت بهره‌گیری از این فناوری به گونه‌ی فزاینده‌ای افزایش یافته‌است. انسولین انسانی، هورمون رشد گاوی و انسانی، فاکتور رشد اپیدرمی، اریتروپوئیتین، اینترفرون، فاکتور ضد هموفیلی، عوامل ضد انعقاد خون (استرپتوکیناز نوترکیب و فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی)، واکسن ضد هپاتیت A و B و ... نیز از این طریق تولید شده و با موفقیت تجاری شدند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نیز که برای تشخیص عوامل بیماری‌زا استفاده می‌شوند، به همین طریق تولید شدند.

با توجه به پیشرفت های گسترده در زمینه بیوتکنولوژی پزشکی و بالطع سرعت رو به رشد این فناوری در زمینه های مختلف پیش گیری، تشخیص و درمان، تاثیر زیست‌فناوری بر دانش آموزان نسل جدید چشمگیر خواهد بود. درواقع مشاغل فوق‌العاده‌ای در زیست‌فناوری منتظر این عزیزان خواهد بود و با این سرعت پیشرفت در سراسر دنیا، تعداد مشاغل در بعضی از بخش‌ها مانند مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، از تعداد کاربران بسیار بیشتر است. آموزش پایه‌ای و ریشه‌ای بهترین راه برای شکوفایی استعداد ها، تثبیت یادگیری و تصمیم‌گیری بهتر و عاقلانه تر دانش آموزان برای ورود به رشته‌های دانشگاهی است. در این قبیل آموزش ها، ابعاد مختلف زیست فناوری به دانش آموزان ارائه شده و برای ادامه‌ی راه مورد تشویق و حمایت مدرسین و مشاورین قرار می‌گیرند.

به کاربردهای زیست فناوری در حوزه پزشکی اشاره شد. برای اینکه بخواهیم بطور جزئی تر به این موارد بپردازیم لازم است ابتدا ماهیت بیماری‌ها را بشناسیم.

فصل اول: بیماری ها

هر نوع ناهنجاری در بدن یا روان را بیماری می‌گویند که به علت ناراحتی، اختلال عملکرد یا تنش در فرد ایجاد می‌گردد. بیماری ها می توانند علت ژنتیکی و غیر ژنتیکی داشته باشند. بیوتکنولوژی برای هر دو نوع (چه از لحاظ درمان، چه از لحاظ تشخیص و غیره) می تواند مفید باشد.

طی دهه‌ی گذشته فناوری‌های مبتنی بر DNA به طور چشم‌گیری توسعه یافته‌اند. تحقیقات اولیه در این زمینه با کاریوتایپینگ[1] کروموزومی (تجزیه و تحلیل کروموزوم ها) آغاز شد که بعدها به آنالیزهای مربوط به ناهنجاری‌های ساختاری و تعدادی کروموزومی تغییر یافت. این آنالیزها با استفاده از پروژه‌های مطالعاتی مبتنی بر ریزآرایه (میکرواری[2]) و مطالعات هم‌خوانی سراسری ژنوم (GWAS[3]) (بررسی سراسری ژنوم بر روی مجموعه ای از تنوّع های ژنتیکی فردی در افراد مختلف) درمورد تنوعات ساختاری (SVs)[4] پرتکرار یا نادر در ژن‌ها انجام می‌گرفت و اخیراً به سرعت به انواعی از مطالعات تعیین نقشه‌ی ژنتیکی انسان گسترش یافته است.

مطالعات اخیر شامل پروژه‌های متعددی همانند پروژه‌ی ژنوم انسان (تعیین توالی ژنوم انسان)، پروژه‌ی HapMap (تعیین الگوهای مشترک تنوع توالی DNA در ژنوم انسان) و پروژه‌ی ۱۰۰۰ ژنوم (ایجاد یک منبع جامع تنوع ژنتیکی انسان در تمام جمعیت های سراسر جهان) بوده است. این مطالعات و سایر مطالعات به طور قابل توجهی اطلاعات درباره‌ی ساختار کروموزوم و ژن، تنوع ژنی در حالت بیماری و سلامتی را گسترش داده است. درنتیجه نقشه‌یابی ژنتیکی به طور چشمگیری اطلاعات درباره‌ی زیست‌شناسی عمومی و میزان بیماری‌زایی بیماری‌ها را بهبود بخشیده است.

[1] Karyotyping
[2] microarray
[3] genome-wide association study (GWAS)
[4] structural variants (SVs)

مشاهدات اخیر تقریباً نشان داده که مطالعات مبتنی بر ژنتیک می‌تواند جایگاه کروموزومی را که مرتبط با بیماری است، مشخص کند. چنین مطالعاتی ما را قادر ساخته است تا به هدف نهایی خود نزدیکتر شویم؛ به عنوان مثال، مسیرهای اصلی سلولی را که در آن‌ها تغییر ژنتیکی در حساسیت و وراثت بیماری‌های مشترک مؤثر است، شناسایی کنیم.

در اینجا مباحثی درمورد پیشرفت سریع از دانش محدود اولیه‌ی ما درباره‌ی ناهنجاری‌های کروموزومی تا پیشرفت‌های اخیر درشناخت میزان و مکانیسم‌های تنوع ژنتیکی و نقش مهم آن در کنترل ژنتیکی حساسیت‌های بیماری بیان می شود.

بیماری ها و اختلالات انواع مختلفی دارند:

۱) اختلالات ژنتیکی

۲) اختلالات بیوشیمیایی یا متابولیکی

۳) اختلالات ایمنی

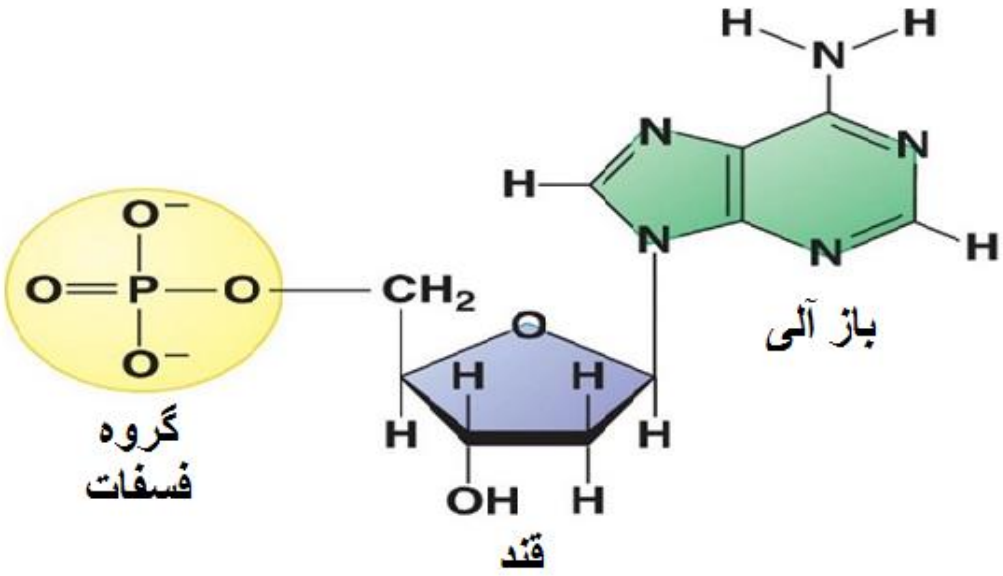
۴) بیماری های انگلی یا عفونی

۱) اختلالات ژنتیکی

ماده ژنتیک چیست که اختلال در آن منجر به بیماری می شود؟ حیات همه‌ی موجودات زنده با مولکول DNA گره خورده است. مولکول DNA (و همچنین RNA) از نظر ساختار شیمیایی از گروه مولکول‌هایی به نام اسیدهای نوکلئیک محسوب می‌شود. اسیدهای نوکلئیک زنجیره‌های طویل مولکولی دو یا یک رشته ای هستند که از به هم پیوستن تعداد زیادی نوکلئوتید تشکیل شده‌اند. به این ترتیب اسیدهای نوکلئیک پلیمرهای خطی هستند که منومرهای (واحد سازنده)

آن ها نوکلئوتیدها هستند (شکل-۲). اسیدهای نوکلئیک نخستین بار در سال ۱۸۶۸ توسط فردریک میچر[1] زیست‌شناس سوئیسی کشف شدند. وی در آن زمان توانست مولکول DNA را از پانسمان یک زخم چرکی جداسازی کند. ساختار مولکول DNA به صورت یک معما برای دانشمندان باقی مانده بود؛ تا اینکه واتسون و کریک در سال ۱۹۵۳ با همکاری چند نفر دیگر در نهایت به الگوی «مارپیچ دو رشته ای» دست یافتند.

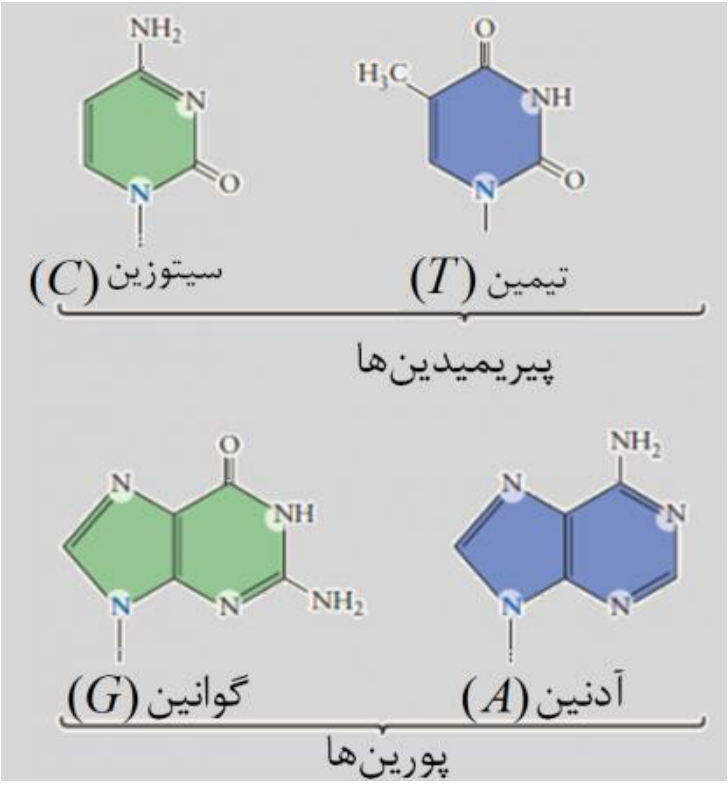
همه‌ی اطلاعات مربوط به یک سلول، اعم از اطلاعات مربوط به ویژگی‌های ساختاری و عملکردی، در ماده‌ی وراثتی آن سلول یا همان مولکول‌های DNA قرار دارد. این مولکول از نسلی به نسل دیگر منتقل می شود و تولید مثل و بقای سلول با همین انتقال امکان پذیر شده است.



شکل-۲ در این تصویر، ساختار شماتیک یک نوکلئوتید A در مولکول DNA را می‌بینید. قند پنتوز آن از نوع دئوکسی‌ریبوز و باز آلی آن دوحلقه ای (پورین) می باشد.

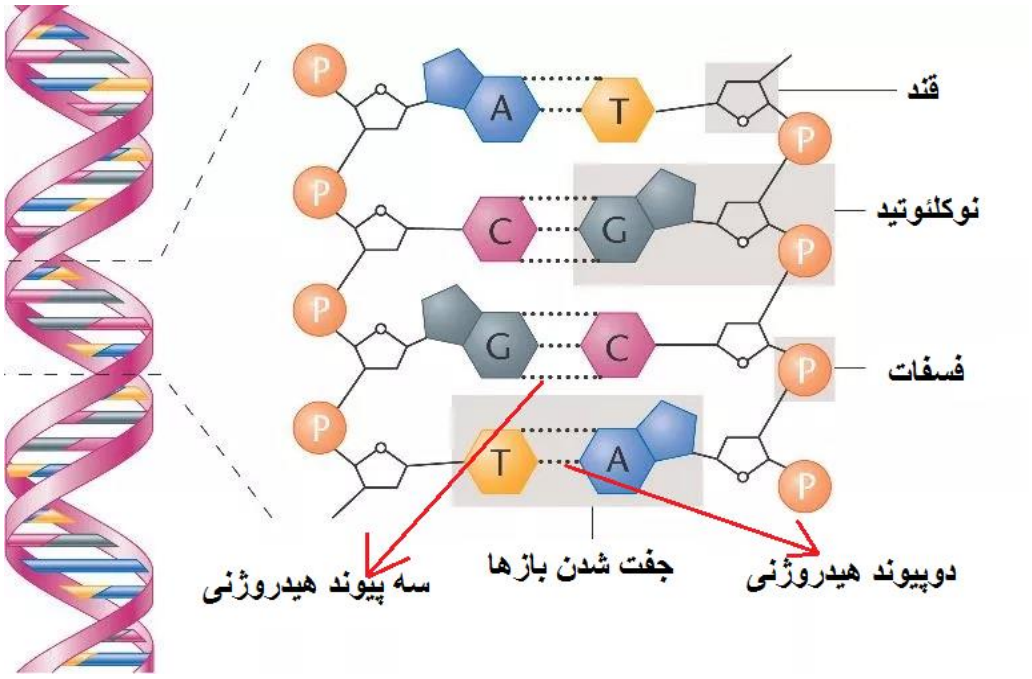
[1] Friedrich Meischer

هر نوکلئوتید شامل نوعی قند پنتوز (۵ کربنه) به نام دئوکسی‌ریبوز در DNA (دئوکسی ریبونوکلئیک اسید) و ریبوز در RNA (ریبونوکلئیک اسید) است. این قند در یک طرف محدود به یک گروه فسفات و در سوی دیگر نیز محدود به یک باز نیتروژنی است. چهار نوع باز آلی در ساختار DNA وجود دارد. در حقیقت تنوع نوکلئوتیدها تنها وابسته به نوع باز آلی به کار رفته در ساختار آن‌هاست. در کل چهار نوع نوکلئوتید در ساختار زنجیره‌ی DNA به چشم می خورند. چهار باز موجود در الفبای DNA عبارتند از: آدنین (A) و گوانین (G) که هر دو از نوع بازهای نیتروژنی پورینی هستند (ساختار دوحلقه ای دارند) و سیتوزین (C) و تیمین (T) که هر دو از نوع بازهای نیتروژنی پیریمیدینی هستند (ساختار تک حلقه ای دارند) (شکل-۳). از آن جایی که تنها تفاوت نوکلئوتیدها در بازهای آن ها است؛ ما نوکلئوتیدها را به نام باز آلی به کار رفته در ساختار آن‌ها می شناسیم؛ به‌طور مثال به نوکلئوتیدی که در آن باز A وجود داشته باشد، به اختصار A می گوییم.



شکل-۳ بازهای نیتروژنی پورینی و پیریمیدینی

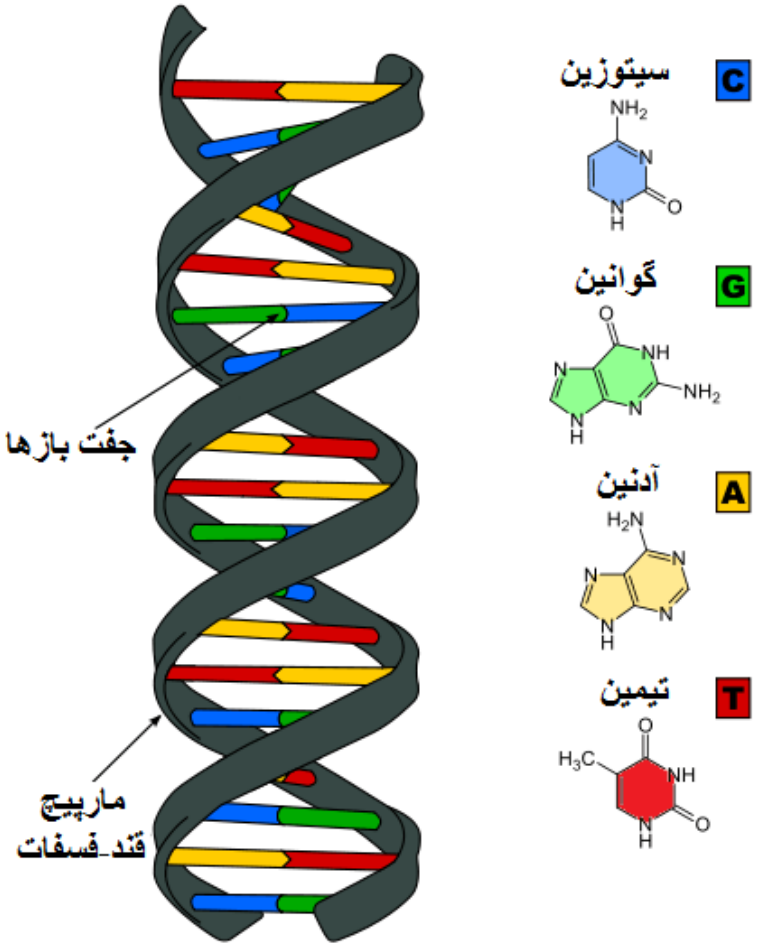
فسفات متعلق به یک نوکلئوتید با ایجاد پیوند کووالانسی (پیوندی که در آن یک یا چند جفت الکترون توسط دو اتم به اشتراک گذاشته می‌شوند) به قندِ نوکلئوتید دیگری متصل می شود. این پیوند فسفودی اِستر (قند-فسفات) باعث می‌شود تا رشته‌ی مولکول DNA پیچ و تاب بگیرد. بازهای نیتروژنی به سمت داخل نردبان گرایش پیدا می‌کنند و جفت‌هایی را با بازهای موجود در طرف دیگر (همانند یک پله برای نردبان پیچ خورده) شکل می‌دهند. هر یک از جفت بازها در واقع از اتصال دو نوکلئوتید مکمل (پورین با پیریمیدین) است که رو به روی هم قرار گرفته‌اند و با کمک پیوند هیدروژنی شکل می‌گیرد. جفت G-C سه پیوند هیدروژنی و جفت A-T دو پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد (شکل-۴). این مدل مارپیچ دو رشته ای یا دابل هلیکس[1] در واقع همان مدل معروف واتسون و کریک برای ساختار DNA است.



شکل-۴ مارپیچ دو رشته ای DNA مانند نردبان است که پله های آن جفت بازها هستند. همانطور که در این شکل مشاهده می کنید، باز C با باز G و باز A با باز T جفت می شوند.

[1] double-helix

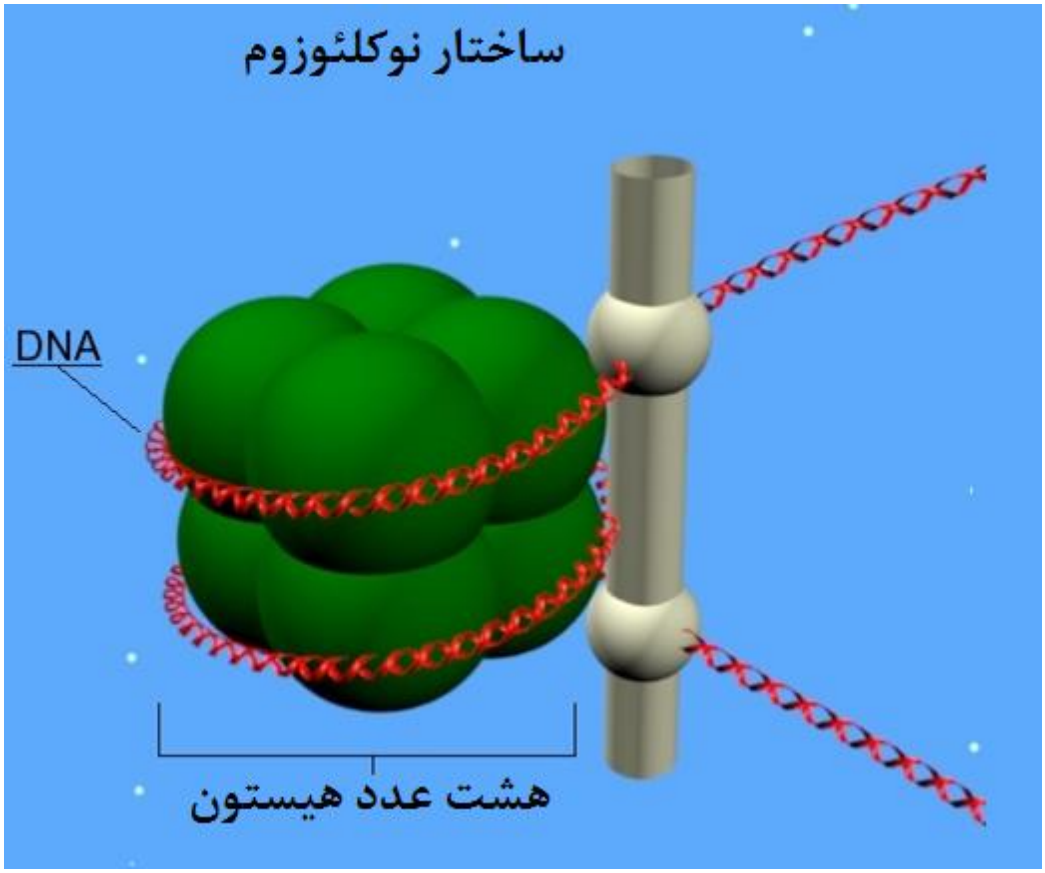
این مولکول‌های مارپیچی دو رشته در هسته‌ی سلول به صورت فشرده قرار گرفته‌اند (به جز باکتری‌ها که هسته ندارند و DNAشان در سیتوپلاسم در فضایی شبه هسته قرار دارد). مولکول DNA در مراحل بعد دچار فشردگی و تراکم بسیار بیشتری می شود بطوری که اگر این DNA را به شکل یک نخ در آوریم، طول آن به یک میلی متر می رسد در حالی که یک باکتری ایشرشیا کلای[1]، در حالت عادی فقط ۳ میکرون (۳ هزارم یک میلی متر) طول دارد. بنابراین مولکول DNA برای جای گرفتن در سلول، به شدت پیچ و تاب خورده و به شکل یک کروموزوم پیچ در پیچ در آمده است.



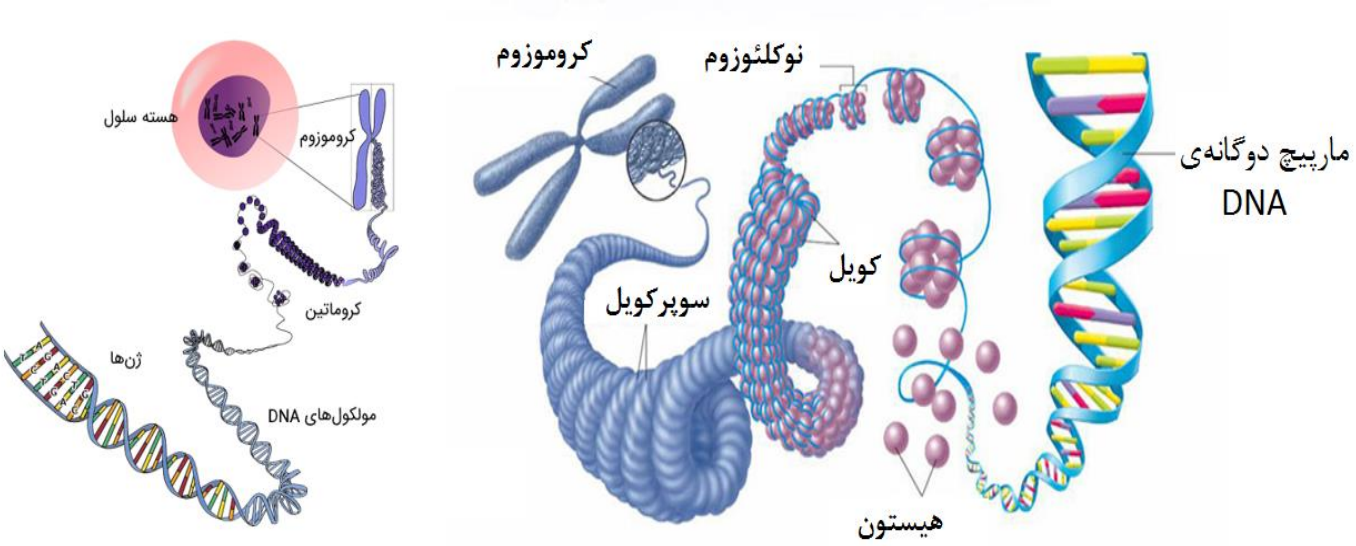
شکل-۵ در این تصویر مارپیچ دوگانه‌ی DNA به خوبی قابل تصور است. مولکول DNA حول محوری فرضی پیچ خورده‌است.

[1] E. coli

در تعریف کروموزوم باید گفت: همه‌ی سلول‌های هسته‌دار دارای کروموزوم‌ها هستند. کروموزوم شکل فشرده و متراکم مولکول DNA است. این رشته‌های DNA به شدت متراکم در قسمت‌هایی به دور پروتئین‌هایی به نام هیستون‌ها پیچیده شده‌اند. زیرا برای ایجاد این فشردگی در وهله‌ی اول، سلول از این پروتئین های هیستون کمک می‌گیرد. تصور کنید این پروتئین‌ها مهره‌های یک تسبیح اند و DNA به جای این که از وسط مهره‌ها عبور کند، دور آن‌ها پیچیده شده‌است. در نتیجه با ایجاد نوکلئوزوم ها (قطعه ای از DNA که به دور ۸ عدد پروتئین هیستون پیچیده شده است) DNA کوتاهتر و فشرده‌تر می‌شود. در ابتدا تجمع این نوکلئوزوم‌ها (DNA به همراه پروتئین‌های بسته‌بندی کننده‌ی آن) کروماتین نامیده می‌شود (شکل-۶). در نزدیک تقسیم سلولی کروماتین‌ها فشرده‌تر شده و با پروتئین‌های جدیدی وارد واکنش می شوند تا بر اثر این فشرده‌تر شدن طول کمتری بدست آورند و بتوانند تقسیم شوند. در این حالت کروموزوم ها را به وجود می آورند (شکل ۷).



شکل-۶ مولکول DNA حدود دو دور در اطراف ۸ مولکول پروتئینی هیستون می‌پیچد و ساختاری مستحکم به نام نوکلئوزوم را می‌سازد.



شکل-۷ ایجاد کویل(مارپیچ) و سوپرکویل (فرامارپیچ) از جمله مراحل بعدی فشردگی DNA برای رسیدن به ساختار کروموزوم هستند.

درواقع کروموزوم فشرده ترین حالت مولکول DNA است.

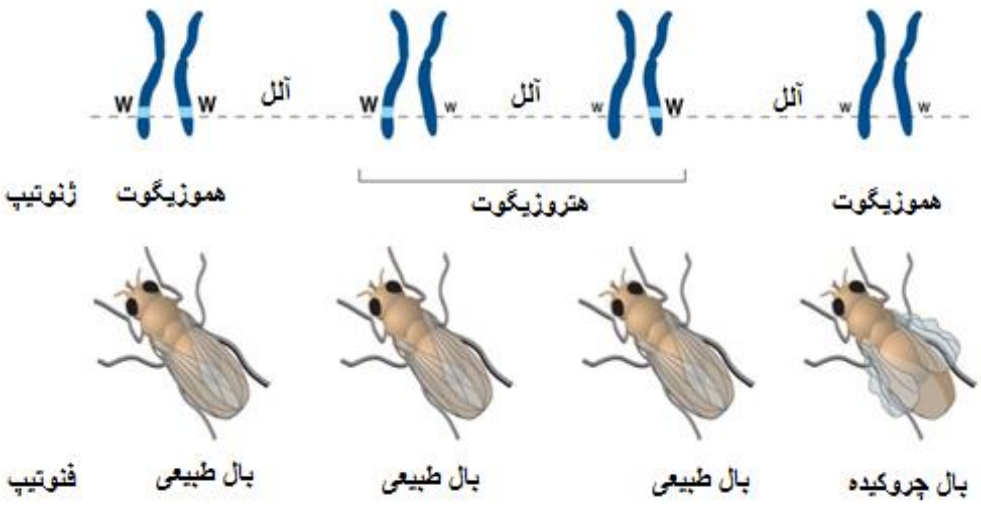
یاخته‌های یک گیاه یا یک جانور دارای تعداد معینی کروموزوم است و تعداد این کروموزوم‌ها در همه یاخته‌های آن فرد پایدار و یکسان است (به استثنای سلول‌های جنسی که دارای کروموزوم‌های همتا نیستند). بنابراین همه یاخته‌های یک موجود دارای مجموعه‌های ژنی یکسانی می‌باشند، مثلا در مگس سرکه در حدود ۱۰ هزار ژن شناخته شده است.

کروموزوم‌ها حامل تمام ژن‌های ما درنتیجه تمام اطلاعات ژنتیکی ما هستند. برخی از نواحی کروموزوم‌ها شدیداً فشرده هستند و هتروکروماتین نام دارند؛ در حالی که سایر نواحی آن‌ها تراکم کمتری داشته و یوکروماتین نام دارند.

ژن‌ها بخشی از ماده‌ی وراثتی هستند که توانایی انتقال رمزها را از نسلی به نسل بعد دارند. ژن‌ها عبارتند از هر بخشی از اطلاعات ژنتیکی فرد که بتواند صفت خاصی را بیان کرده یا عملکرد خاصی داشته باشد. باید بدانیم که همه‌ی کدهای موجود در مولکول DNA ژن نیستند و بیان نمی‌شوند، یا به عبارتی دیگر پروتئین تولید نمی کنند. ماده‌ی وراثتی در همه‌ی موجودات به استثنای انواعی از ویروس‌ها همان مولکول‌های DNA است. RNA مولکولی شبیه به DNA و با ساختاری بسیار نزدیک به آن است که در ویروس‌ها نقش ماده‌ی وراثتی را ایفا می‌کند. در واقع جنس ژن در این نوع ویروس‌ها با جنس ژن‌های ما متفاوت است.

ژنوتیپ هر شخص، شامل مجموعه‌ای از ژن‌های اوست. این واژه در واقع بازتابی از آرایش ژنتیکی فرد یا سلول است که منحصر به‌فرد است؛ به این معنا که ژنوتیپ هیچ دو انسانی یکسان نیست. (به استثنای دوقلوهای هم‌سان یک تخمکی[1] که کاملاً محتوای ژنتیکی‌شان یکسان است). هر ژنوتیپ به فنوتیپ خاصی منتهی می‌شود. فنوتیپ شامل ویژگی‌ها و مشخصات ظاهری فرد است؛ مانند ویژگی‌های ساختاری، تکاملی، رفتاری و غیره (شکل-۸).

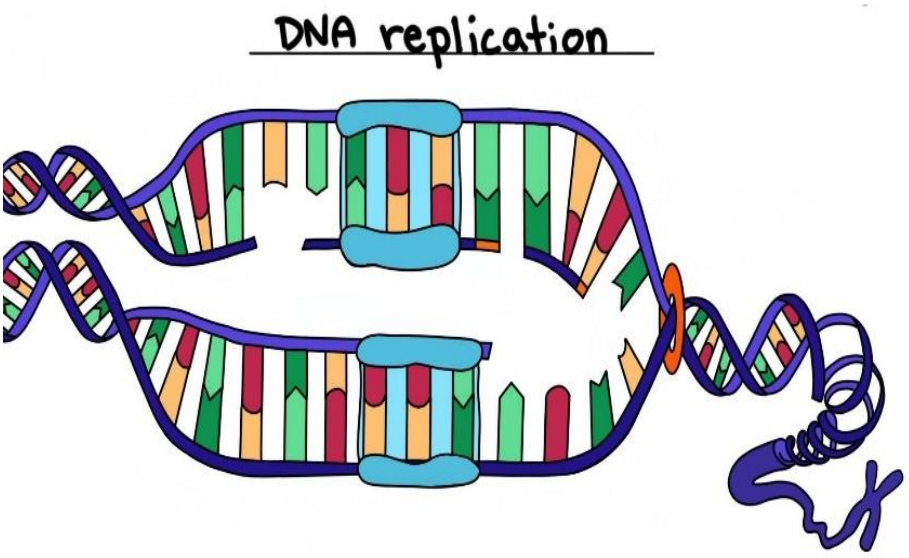
[1] monozygotic



شکل-۸ مگس سرکه با بال‌های معمولی، و بال‌های چروکیده. علت این تفاوت، ژنوتیپ‌های متفاوتی است که به فنوتیپ‌های متفاوت منتهی می‌شود.

فرآیند همانندسازی:

برای این که مولکول DNA بتواند به نسل بعد منتقل شود لازم است دو برابر شود تا بتواند در هر دو سلول حاصل تقسیم قرار بگیرد. طی این تقسیم مارپیچ DNA باز می‌شود و از روی هر رشته یک رشته‌ی دیگر ساخته می‌شود. به این ترتیب پس از پایان همانندسازی (دوبرابر شدن) DNA دو نسخه‌ی کاملا مشابه خواهیم داشت.



شکل-۹ همانندسازی DNA مقدمه‌ی حیات است. اگر DNA به هر دلیلی همانندسازی نشود و یا به اشتباه همانندسازی شود، ممکن است سلول از بین برود.

مطابق تصویر فوق، برای انجام همانند سازی اولین قدم باز شدن دو رشته است که به کمک آنزیم هلیکاز و با از بین بردن پیوند بین بازهای آلی صورت می گیرد. سپس آنزیم DNA پلی‌مراز یکی یکی نوکلئوتیدها را رو به روی رشته‌ی قدیمی (مادر) قرار می دهد. بدین ترتیب رشته‌ی جدید (دختری) کاملا مکمل رشته‌ی قدیمی ساخته می‌شود. اصطلاحا به این نوع همانندسازی، همانندسازی «نیمه حفاظت شده» گفته می‌شود. چراکه یکی از رشته‌ها قدیمی و یکی جدید است. یکی از راه‌های بقای مولکول DNA داشتن این نوع از همانندسازی است که درصد خطا را بسیار پایین می آورد. همچنین نوعی از آنزیم DNA پلی‌مراز نیز مسئول کنترل قرارگیری نوکلئوتید صحیح است. به طوری که اگر اشتباهی صورت گیرد، به طور مثال نوکلئوتید A مقابل C قرار گیرد، این نوع از آنزیم DNA پلی‌مراز، پیوندها را باز کرده، نوکلئوتید اشتباه را بر میدارد و با نوکلئوتید صحیح جایگزین می کند.

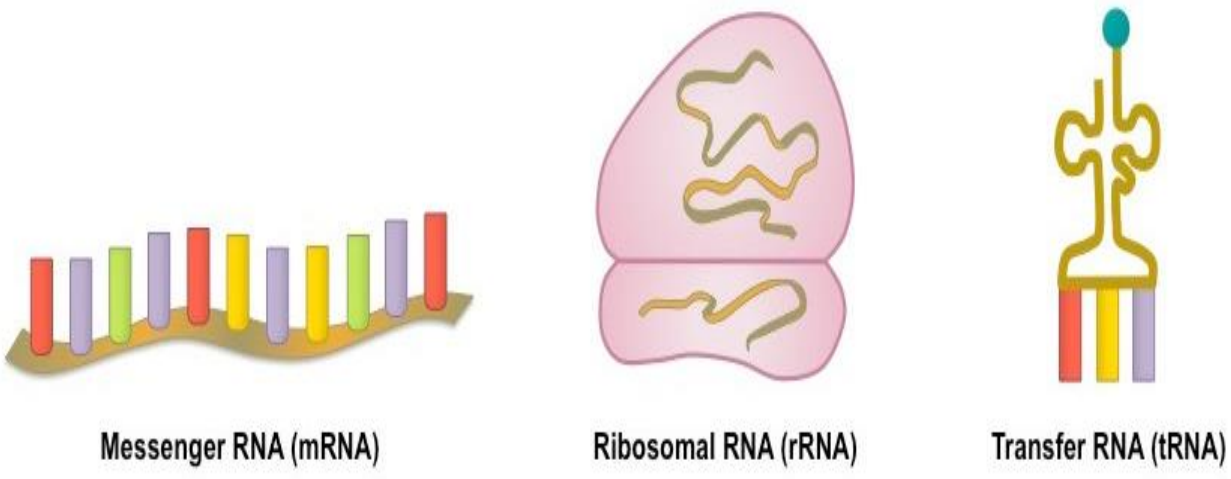
فرآیند رونویسی[1] و درنهایت بیان یک ژن:

درواقع محصولِ بیانِ ژن، همان پروتئین است. انواع و اقسام مولکول‌های پروتئینی غالبا در واکنش‌ها و ساختارهای بدن نقش اساسی را ایفا می‌کنند. توالی بازها در طول یک رشته از مولکول DNA تعیین کننده‌ی کدهای ژنتیکی است. کدهای ژنتیکی سه حرفی هستند و این قالب سه حرفی در هیچ کجای محتوای ژنتیکی ما نقض نمی شود (مثلاً TAC). مولکولی که ژن و پروتئین را بهم پیوند می‌دهد، RNA نام دارد. مولکول RNA نوع دیگری از اسیدهای نوکلئیک است که ماهیت آن شبیه DNA است اما چندین تفاوت مهم بین این دو گروه وجود دارد: همانطور که پیش تر نیز اشاره شد مولکول RNA به جای قند دئوکسی ریبوز، در ساختارش قند ریبوز دارد. تفاوت بعدی در ساختار اصلی این دو مولکول است که DNA غالباً دو رشته و RNA غالباً تک رشته است (به استثنای ماده‌ی ژنتیکی بعضی ویروس ها). همچنین در ساختار RNA، به جای باز T، باز U (یوراسیل) قرار دارد و در طول یک رشته‌ی RNA هیچگاه باز T را نخواهیم دید. بنابراین در هنگام رونویسی RNA، که RNA با DNA دو رشته مکمل تشکیل می دهد، در مقابل باز A، باز U قرار می‌گیرد.

به‌طور کلی چه در سلول‌های پروکاریوتی (مانند باکتری ها) و چه سلول‌های یوکاریوتی (مانند گیاهان و جانوارن) سه نوع مولکول RNA وجود دارد که هر یک وظایف و ساختار مخصوصی دارند. برخلاف پروکاریوت‌ها که تنها یک آنزیم برای ساخت انواع RNAها دارند، سلول‌های یوکاریوتی دارای سه نوع آنزیم RNA پلی‌مراز هستند؛ RNA پلی‌مراز I

[1] transcription

سازنده‌ی RNA ریبوزومی (rRNA[1])، RNA پلی‌مراز II سازنده‌ی RNAی پیام رسان (mRNA)[2] و RNA پلی‌مراز III سازنده‌ی RNAی ناقل (tRNA)[3] (شکل-۱۰).

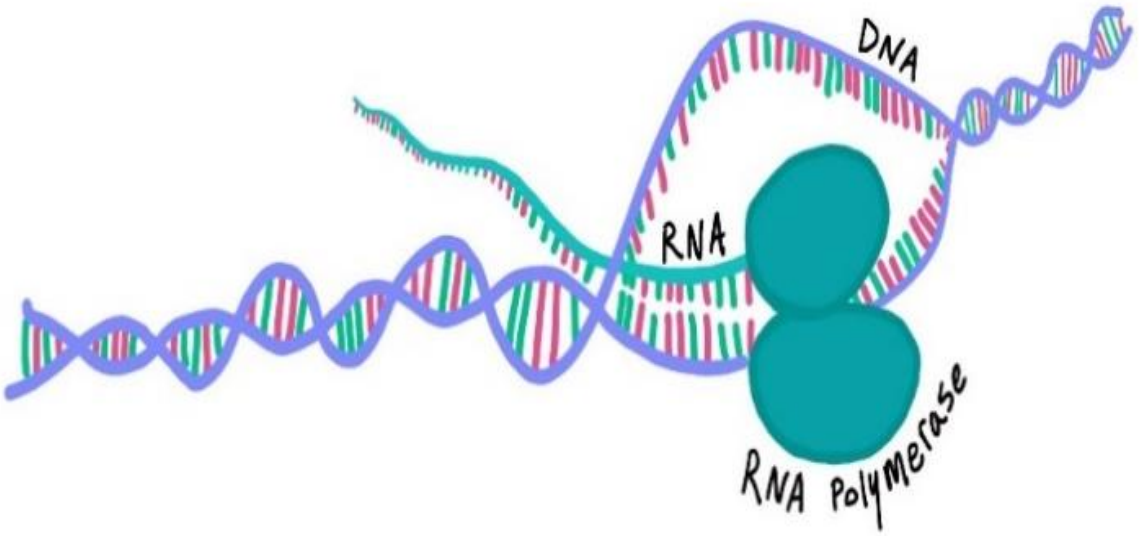


شکل-۱۰ ساختمان انواع RNAها

RNA ناقل یا tRNA با ساختار برگ شبدری که حمل کننده‌ی آمینواسیدهاست و دارای جایگاه اختصاصی برای اتصال به آمینواسید است. RNA ریبوزومی یا rRNA که در ساختار ریبوزوم به کار می‌رود. RNA پیام‌رسان یا mRNA که ساختاری رشته‌ای دارد، دارای کدون هایی مکمل کدهای DNA است و به پروتئین ترجمه می‌شود. در ادامه با وظایف هر یک آشنا می شویم.

[1] ribosomal RNA
[2] messenger RNA
[3] transporter

هرگاه سلول به محصول یک ژن خاص نیاز پیدا کند، بخشی از مولکول DNA که حاوی آن ژن خاص است، دچار یک شکاف می شود و بدین ترتیب فرایند رونویسی که مقدمه‌ی بیان ژن و تولید پروتئین است آغاز می شود. راه انداز[1] محلی از DNA است که توسط آنزیم سازنده‌ی RNA شناسایی می شود. در واقع آنزیم RNA پلی‌مراز، مولکولی بسیار بزرگ و چندبخشی است که بر روی توالی خاصی از DNA قرار می‌گیرد و به‌طور همزمان چندین عملکرد (مانند شناسایی نقطه‌ی آغاز رونویسی، باز کردن دو رشته DNA، ایجاد پیوند قند-فسفات در RNA و ...) را در فرایند رونویسی به اجرا در می آورد. نقطه‌ی آغاز رونویسی، محلی از DNA است که رونویسی از آن‌جا شروع می‌شود (شکل-۱۱).



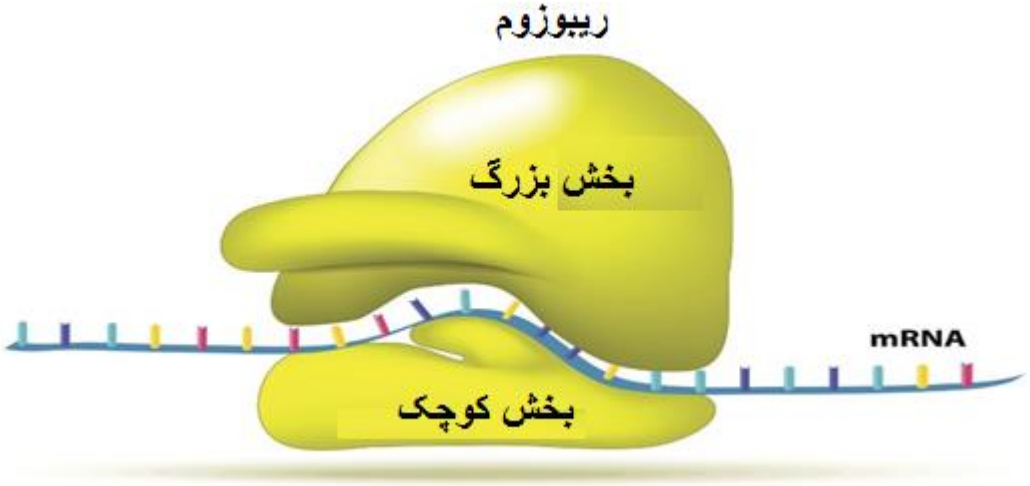
شکل-۱۱ تصویری شماتیک از آنزیم RNA پلی‌مراز

[1] promotor

طی فرایند رونویسی، یک رشته از جنس RNA دقیقا مطابق نوکلئوتیدهای رشته‌ی شکاف خورده‌ی DNA ولی مکمل آن، ساخته می شود. به این RNA ساخته شده، RNA پیام رسان (mRNA)[1] می گوییم؛ چرا که در واقع حمل کننده‌ی کدهای ژنتیکی مشابه توالی DNA الگوی ماست. این مولکول واسطه‌ی بین مولکول DNA و مولکول پروتئین است. در کل، فرایند رونویسی با حضور آنزیم‌ها و درون هسته‌ی سلول رخ میدهد به جز باکتری‌ها که فاقد هسته‌اند. با جدا شدن مولکول RNA از DNA الگو و آنزیم سازنده‌ی RNA (RNA پلی‌مراز)، فرایند رونویسی پایان می یابد.

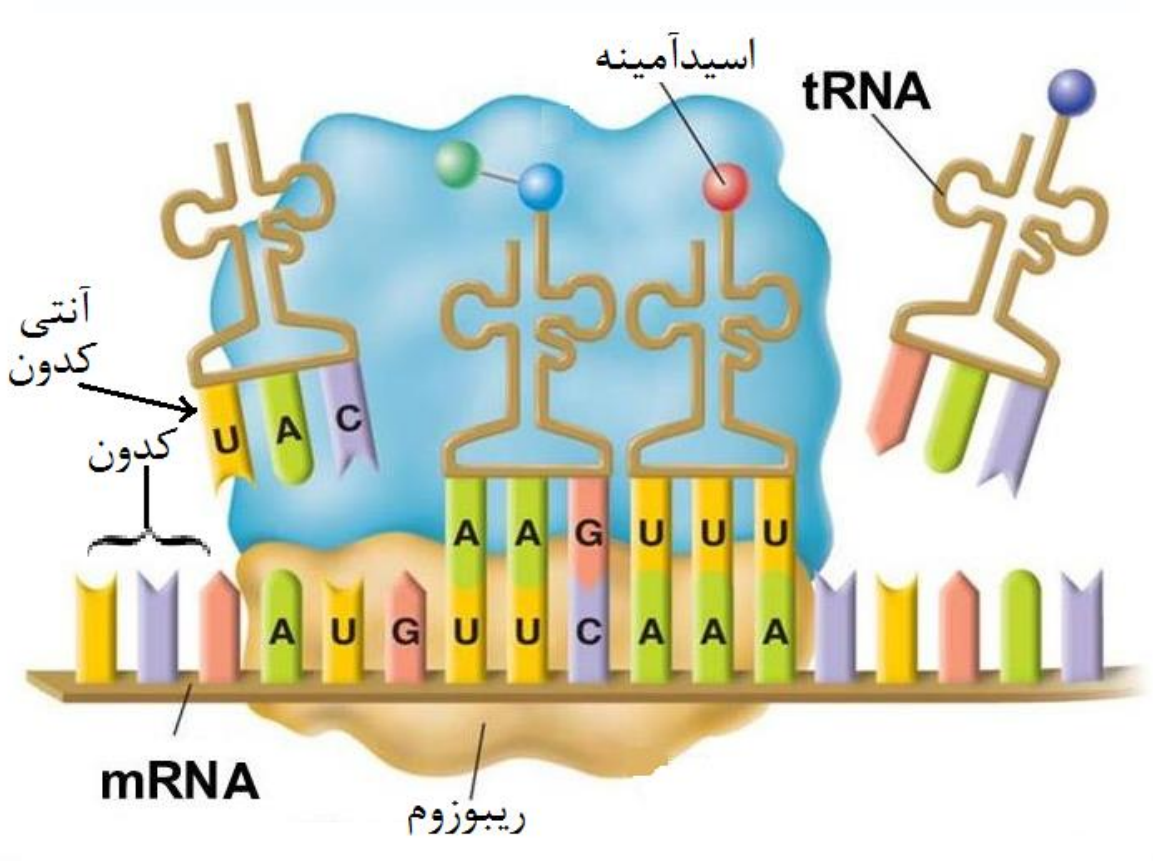
سازوکار فرآیند ترجمه[2]: به فرآیند ساخت پروتئین از روی RNA الگو ترجمه گفته می شود. مولکول RNA طول عمر بسیار کوتاهتری نسبت به DNA دارد و تا جایی که در سلول‌های پروکاریوتی شاهد انجام همزمان دو فرایند رونویسی و ترجمه هستیم (دقت کنید که در سلولی‌های پروکاریوتی به خاطر عدم وجود هسته، هر دو فرایند در فضای سیتوپلاسمی صورت می‌گیرند.). در این مرحله RNA پیام رسان (در سلول‌های دارای هسته) از هسته خارج شده و در فضای سیتوپلاسمی قرار می‌گیرند، جایی که جزء سلولی ریزی به نام ریبوزوم روی رشته‌ی RNA قرار می‌گیرد و اقدام به ساخت مولکول پروتئین می‌کند. ریبوزوم ساختاری بدون غشا و دو قسمتی بوده و از تجمع rRNA و پروتئین‌ها ساخته شده است (شکل-۱۲).

[1] messenger RNA
[2] translation



شکل-۱۲ محل ساخت اندامک ریبوزوم در سلول‌های یوکاریوتی، هسته است. ریبوزوم از دو بخش کوچک و بزرگ ساخته شده‌است

ریبوزوم دارای جایگاه‌های مخصوصی است و هر سه نوکلئوتید از RNA در یک جایگاه جای می‌گیرند. به عبارت دیگر، هر کد سه حرفی DNA، یک کدون سه حرفی روی RNA می دهد که این کدون به یک اسیدآمینه ترجمه می شود. طی فرایند ترجمه، نوع دیگری از مولکول‌های RNA به نام RNAی ناقل (tRNA) مطابق با کدون ژنتیکی mRNA، دارای آنتی کدون بوده و به اسیدآمینه‌ی خاصی متصل شده است و آن را به سمت ریبوزوم می آورد. عملکرد ریبوزوم ساخت زنجیره‌ی‌های طویل پلی پپتید از اتصال اسیدهای آمینه به یکدیگر است. در پایان، ریبوزوم، زنجیره‌ی پلی پپتیدی ساخته شده، mRNA و tRNAی آخر از یکدیگر جدا شده و فرایند ترجمه پایان می یابد (شکل-۱۳).



شکل-۱۳ در این شکل فرآیند ترجمه به طور شماتیک به تصویر کشیده شده‌است. tRNA ناقل از یک سمت به اسیدآمینه و از سمت دیگر به mRNA متصل می‌شود. در واقع tRNA با توجه به کدون‌های سه حرفی، اسیدآمینه خاصی را به ریبوزوم می‌آورد. در ریبوزوم اسیدهای آمینه به یکدیگر متصل شده و یک رشته‌ی پلی‌پپتیدی ساخته می‌شود.

حال که از ارتباط مستقیم و بسیار نزدیک کدهای ژنتیکی با ساخت پروتئین‌ها آگاه شدیم، می توان به این نتیجه رسید که هر گونه تغییر در توالی کدهای یک ژن، بر توالی اسید آمینه‌ها و پروتئین محصول آن ژن تاثیر گذار خواهد بود. در واقع همانطور که گفته شد ژنوتیپ به فنوتیپ منتهی می‌شود و فنوتیپ چیزی نیست جز بیان ژن و ساخت پروتئین که در نهایت ویژگی‌های مارا می‌سازد. بنابراین ریشه‌ی بسیاری از بیماری‌ها را باید در همین کدهای ژنتیکی جستجو کرد. همانطور که در ابتدای مباحث ذکر شد، بیماری ها و اختلالات انواع مختلفی دارند که علت ایجاد آنها می تواند ژنتیکی

و یا غیر ژنتیکی باشد. از اینرو می توان گفت دلیل برخی از بیماری ها می تواند اختلالات ژنتیکی باشد، که اختلالات ژنتیکی خود به ۴ زیر مجموعه تقسیم می شوند:

۱-۱) ناهنجاری‌های کروموزومی

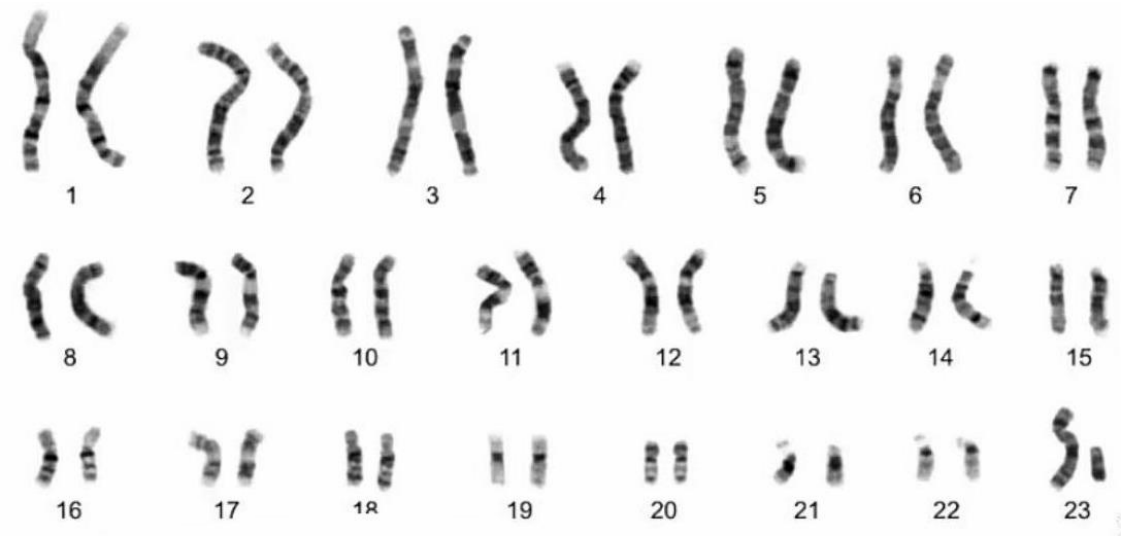
۱-۲) اختلالات تک ژنی

۱-۳) اختلالات چند عاملی

۱-۴) اختلالات میتوکندریایی

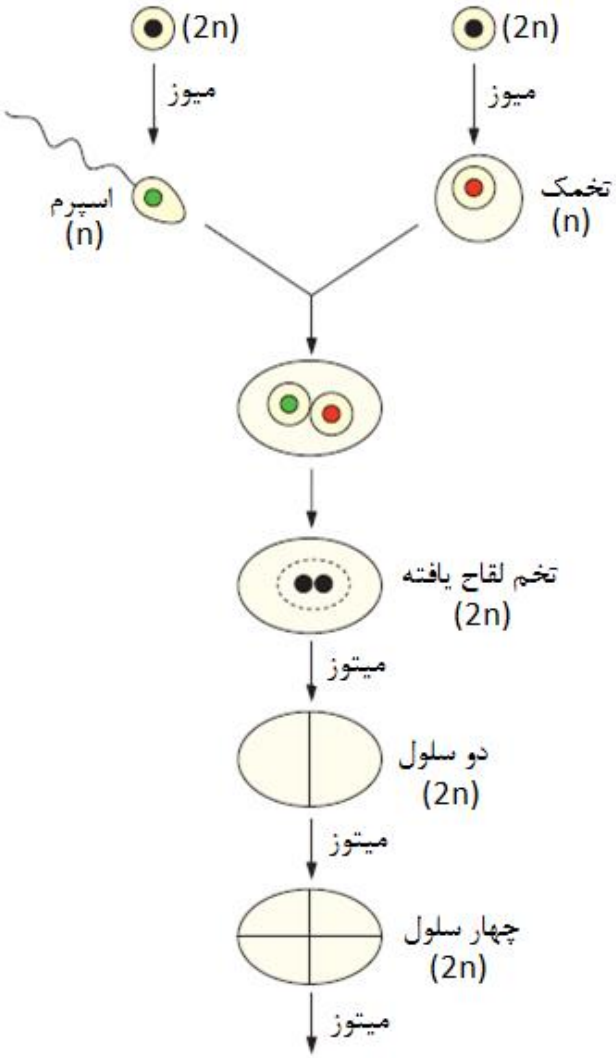
۱-۱) ناهنجاری‌های کروموزومی

هر گونه از موجودات، شکل و تعداد کروموزوم مختص خود را دارد که "کاریوتایپ" نام دارد. در واقع کاریوتایپ فرایندی است که در آن مجموعه‌ای از کروموزوم‌های یک گونه با توجه به تعداد، شکل، اندازه، موقعیت سانترومرها، الگوی اتصال، و تفاوت‌های ظاهری و فیزیکی مرتب‌سازی و به تصویر کشیده می‌شوند (شکل-۱۴). هر کروموزوم با کروموزوم هومولوگ خود جفت می‌شود. کروموزوم‌های همولوگ (جفت شده) از نظر اندازه و ساختار یکسان هستند اما ممکن است نسخه‌های متفاوتی از یک ژن (به نام آلل) را حمل کنند.



شکل-۱۴ کاریوتایپ یک انسان مذکر پس از رنگ آمیزی با روش گیمسا. نوارهای تیره روشن کروموزوم‌هامشخص است.

انسان ۴۶ کروموزوم یا ۲۳ جفت کروموزوم دارد و این کروموزوم‌ها تقریباً ۲۵ هزار ژن را روی خود حمل می‌کنند. سلول‌های پیکری انسان دیپلوئید هستند یعنی ۲۳ کروموزوم از سلول تخمک مادر و ۲۳ کروموزوم دیگر از اسپرم پدر مشتق شده است. هریک از سلول‌های تخمک و اسپرماتوزوآ فقط ۲۳ کروموزوم دارند؛ بنابراین هاپلوئید هستند. در سلول‌های دیپلوئید ۲۲ جفت کروموزوم اتوزوم (کروموزوم‌های غیرجنسی) و یک جفت کروموزوم جنسی (XX در زنان و XY در مردان) وجود دارد (شکل-۱۵).



شکل-۱۵ تشکیل یک سلول تخم دیپلوئید از لقاح دو سلول جنسی هاپلوئید

کروموزوم‌های انسانی را معمولاً در سلول‌هایی که رشد سریعی دارند مانند لنفوسیت‌های خون محیطی، مورد مطالعه قرار می‌دهند. میتوز سلولی (تقسیم سلولی) را می‌توان در مرحله‌ی متافاز چرخه‌ی سلولی متوقف کرد و با رنگ‌آمیزی متفاوت کروموزوم‌ها، می‌توان آن‌ها را زیر میکروسکوپ تشخیص داد.

دو نوع تقسیم سلولی وجود دارد:

۱- تقسیم میوز که نتیجه‌ی این تقسیم سلول‌هایی با نیمی از تعداد کل کروموزوم‌های طبیعی است (۲۳کروموزوم). این سلول‌ها همان تخمک و اسپرم هستند. میوز در دو مرحله میوز I و میوز II انجام می شود.

۲- تقسیم میتوز نیز دو سلول مشابه سلول اولیه را که هرکدام ۴۶ کروموزوم دارند، ایجاد می‌کند. این نوع تقسیم سلولی به جز اندام‌های تولیدمثلی در تمام بدن انجام می‌شود.

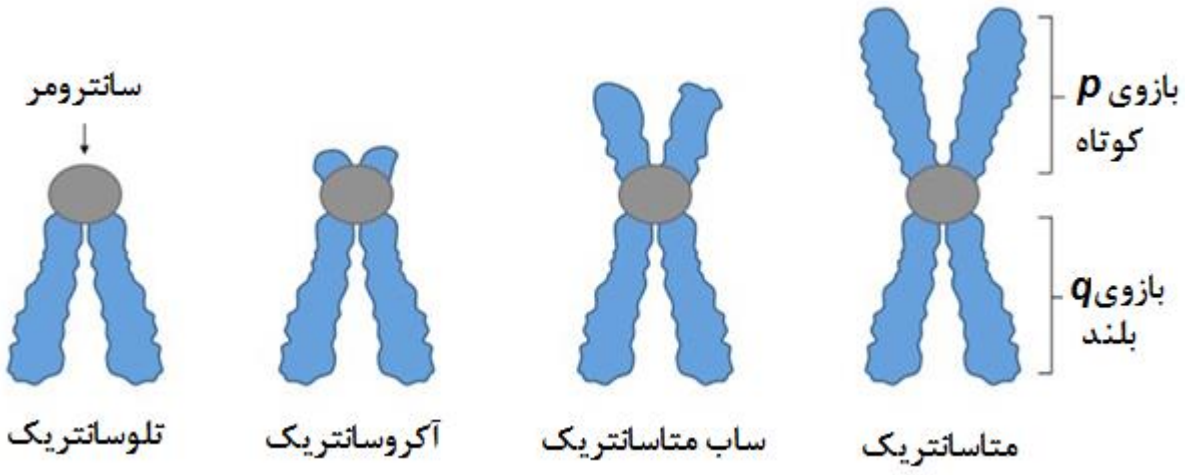
به آنالیز میکروسکوپی کروموزوم‌ها، سیتوژنتیک گفته می‌شود. برای رنگ آمیزی کاریوتایپ معمولی از رنگ گیمسا استفاده می‌شود؛ زیرا طی این فرآیند باند/نوارهای پشت سرهم تیره و روشن تشکیل می‌شود (G banding) که ساختارهای متمایز جفت کروموزوم‌ها را بازتاب می‌کند. این نوارهای تیره و روشن به دلیل اتصال اختصاصی رنگ گیمسا به گروه‌های فسفات در DNA است؛ زیرا رنگ به نواحی از DNA که غنی از جفت باز A-T است (نواحی هِتروکروماتین) متصل می‌شود. در واقع مناطق یوکروماتین (نواحی غنی از ژن می باشند و معمولا غنی از بازهای C و G نیز هستند و بالطبع رونویسی (بیان ژن ها) در این مناطق بیشتر است)، در نواربندی رنگ روشن تری می گیرند. ترتیب این نواربندی در طول یک شماره کروموزوم ثابت است زیراکه جایگاه های ژن ها روی هر شماره کروموزوم مشخص و ثابت است. بنابراین رنگ‌آمیزی گیمسا می‌تواند انواع مختلفی از تغییرات ساختاری کروموزومی را به شکل بازآرایی ژنتیکی مشخص کند.

آزمایش‌های ژنتیکی کاهش یا افزایش تعداد کروموزوم یا تغییر در ساختار کروموزوم را تشخیص می‌دهد. هر کروموزوم یک نقطه انقباضی دارد که سانترومر گفته می‌شود. سانترومر هر کروموزوم، بازوی کوتاه (p) آن را از بازوی بلند (q) جدا می‌کند. یک کروموزوم طبیعی دارای بازوی کوتاه، بازوی بلند، ناحیه انتهایی تلومر و ناحیه سانترومر است. از نظر محل سانترومر، کروموزوم ها انواع مختلفی دارند.

کروموزم های متاسانتریک: سانترومر آنها در وسط کروموزوم قرار گرفته و در نتیجه بازوهای کروموزم هم اندازه هستند.

کروموزوم های آکروسانتریک: سانترومر آنها نزدیک به یکی از دو انتهای کروموزوم قرار گرفته در نتیجه یکی از بازوها نسبت به دیگری بسیار کوچک است.

کروموزم های تلوسانتریک: سانترومر در یکی از دو انتهای کروموزوم ها قرار گرفته است (شکل-۱۶).



شکل-۱۶ انواع کروموزوم‌ها از لحاظ محل قرارگیری سانترومر

بیشتر بازوها به وسیله‌ی نوارهای خاصی به دو یا تعداد بیشتری ناحیه تقسیم می‌شوند و هر ناحیه تقسیمات کوچک‌تری به نام نوارهای زیرین[1] پیدا می‌کند. برای مثال نوار Xp21.2 در بازوی کوتاه (p) کروموزوم X در ناحیه‌ی ۲، نوار ۱ و نوار زیرین ۲ قرار دارد.

گفتیم خصوصیات فیزیکی افراد، فنوتیپ نام دارد که ترکیبی از تمام صفات بیانی فرد شامل مورفولوژی، تکوین، رفتار و ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است. فنوتیپ، حاصل بیان ژن‌ها و عوامل محیطی‌ای است که در ارتباط متقابل

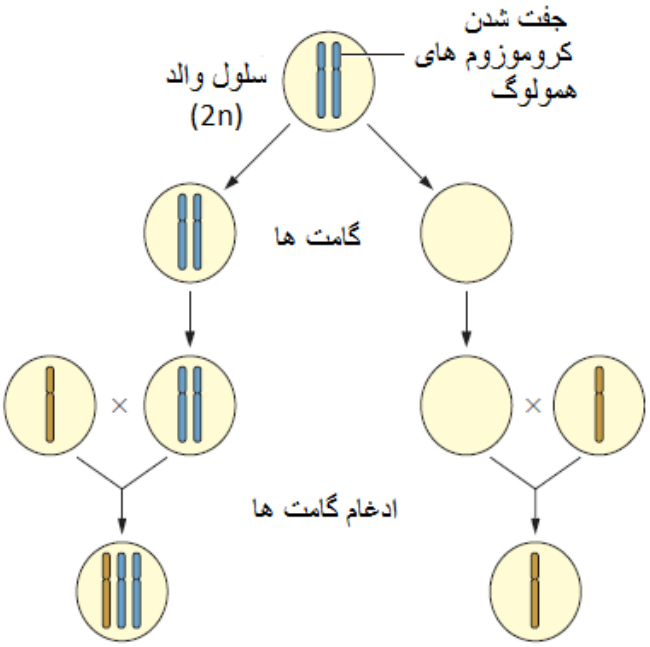
[1] subbands

با این ژن‌ها هستند. بنابراین فنوتیپ فرد مبتلا به اختلال کروموزومی ممکن است با توجه به نوع نقص کروموزومی متفاوت باشد.

اما چگونه ناهنجاری‌های کروموزومی رخ می‌دهند؟ معمولاً ناهنجاری‌های کروموزومی هنگامی که خطایی در تقسیم سلولی رخ دهد، ایجاد می‌شود. در هر دو نوع تقسیم (میوز و میتوز)، تعداد صحیح کروموزوم‌ها در سلول‌های دختری نمایان می‌شود. با این حال خطاهایی که در تقسیم سلولی رخ می‌دهد، منجر به ایجاد کپی‌های کمتر یا بیشتر از کروموزوم‌ها می‌شوند. عوامل دیگری نیز می‌توانند خطر ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی را افزایش دهند. یکی از این عوامل سن مادر است. زنان با تمام تخمک‌هایی که در طول عمر خواهند داشت به دنیا می‌آیند. بنابراین وقتی خانمی به سن ۳۰ سالگی می‌رسد، سن تخمک‌هایش هم ۳۰ ساله هستند. وقتی سن تخمک‌ها بالا می‌رود، خطاهای کروموزومی با افزایش سن در تخمک‌ها ظاهر می‌شوند. بنابراین در بانوان مسن‌تر نسبت به بانوان جوان، خطر تولد نوزادی با ناهنجاری های کروموزومی بالاتر است. از آنجایی که مردان در طول زندگی اسپرم تازه تولید می‌کنند، سن پدر خطر ایجاد ناهنجاری کروموزومی را بالا نمی‌برد. عامل دوم ممکن است محیط باشد، اگرچه درحال حاضر شواهد قطعی بر تأثیرات عوامل محیطی وجود ندارد. بنابراین بیماری‌ها و ناهنجاری های کروموزومی به دلیل تغییرات غیرطبیعی در تعداد (افزایش یا کاهش ژن‌ها) یا ساختار کروموزوم‌ها رخ می‌دهند، که در ادامه به بررسی آنها پرداخته می شود.

۱-۱-۱) ناهنجاری‌های عددی کروموزوم‌ها

آنیوپلوئیدی[1] زمانی رخ می‌دهد که تفاوت در تعداد یک کروموزوم باشد. هم در کروموزوم های اتوزومی یا غیر جنسی (۲۲ جفت کروموزوم) و هم جنسی (کروموزوم X و Y) می تواند رخ دهد. بنابراین تعداد کروموزوم های فرد ضریب دقیقی از عدد هاپلوئید (n=23) نیست. این حالت می تواند ناشی از جدا نشدنِ کروموزوم‌های جفت شده، در مراحل تقسیم باشد. بنابراین دو سلول ایجاد می‌شوند که یکی از آن‌ها فاقد یک کپی از کروموزوم (مُنوزومی) و سلول دیگر یک کپی اضافه از کروموزوم (تِریزومی) دارد (شکل-۱۷). در بیشتر موارد جنین هایی با نقص آنیوپلوئیدی یک کروموزوم دچار سقط های خودبخودی در سه ماهه اول می شوند. در معدود مواردی که این سلول تخم زنده می ماند و با نقص ژنتیکی آنیوپلوئیدی به دنیا می آیند در همان سال اول زندگی فوت می کنند.

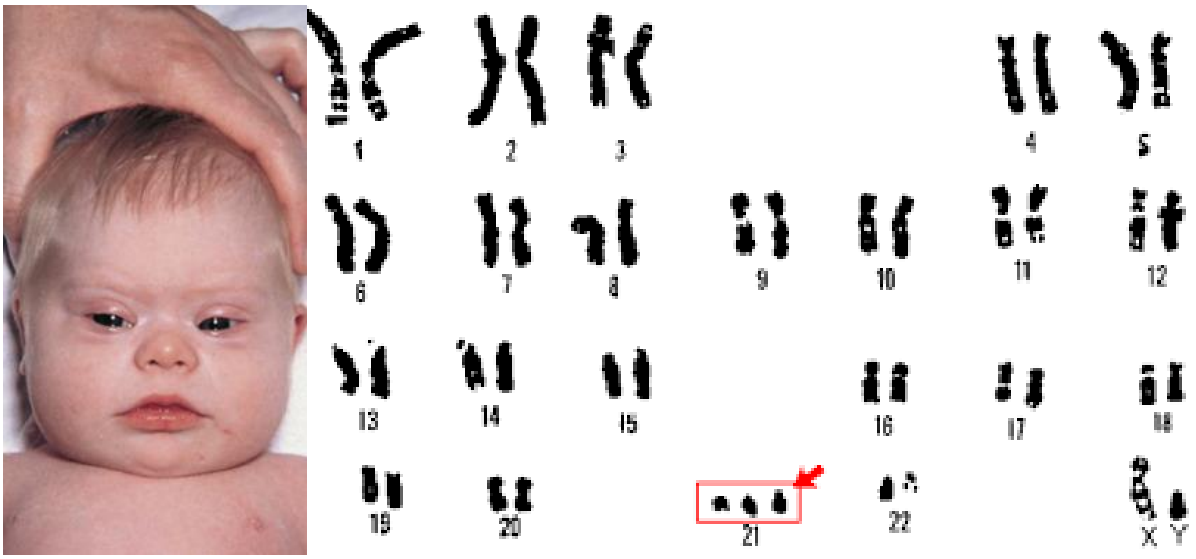


شکل-۱۷ ناتوانی در جداشدن کروموزوم‌های جفت شده در تقسیم میوز و تشکیل سلول هایی با نقص مُنوزومی و تِریزومی

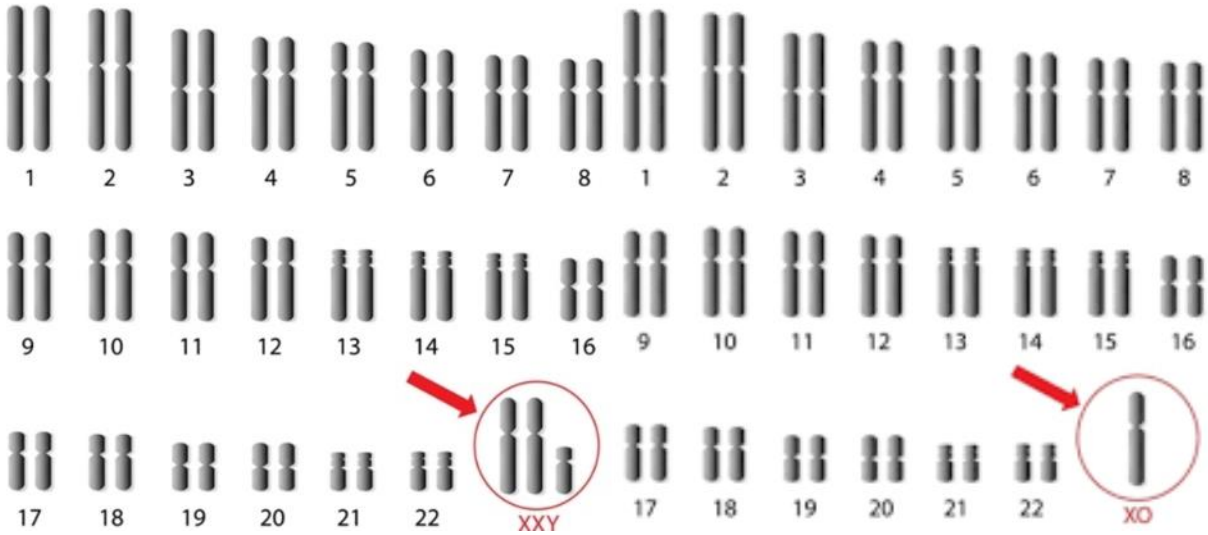
[1] Aneuploidy

تریزومی ۲۱ یا سندروم داون:

فردی که ۳ عدد کروموزوم شماره ۲۱ دارد دارای تِریزومی (سه تایی) ۲۱ یا سندروم داون است. احتمال ابتلا به سندروم داون از مادر انتقال پیدا می کند و وابسته به سن مادر است. وقتی سن مادر زیر ۲۵ سال باشد احتمال ابتلا به بیماری ۱ در هر ۱۶۰۰ تولد است. وقتی سن مادر بالای ۴۰ سال باشد احتمال ابتلا به بیماری ۱ در هر ۸۰ تولد است. ۲٪ حالت های موزائیسم دارند (شکل-۱۸).



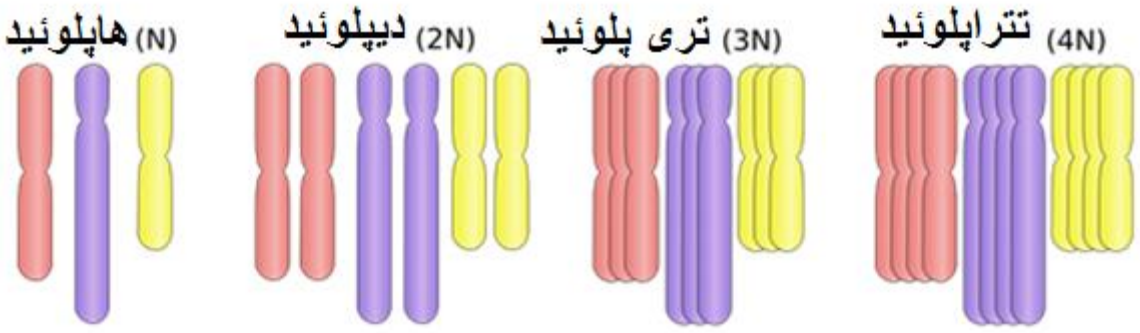
شکل-۱۸ کاریوتایپ و ظاهر فردی با تریزومی ۲۱ یا سندروم داون



شکل-۱۹ کاریوتایپ های فردی با سندرم ترنر و فردی با سندرم کلاین فلتر

سندرم ترنر[1] که تنها دارای یک کروموزوم X است (XO) و سندرم کلاین فلتر[2] (XXY) که بیش از یک کروموزوم X دارد (شکل-۱۹). ناهنجاری‌ای که در آن تعداد کروموزوم (n)، ضریبی کامل از عدد هاپلوئید (n=23) و بیش از عدد دیپلوئید (2n=46)، است پلی‌پلوئیدی[3] (تری‌پلوئیدی 3n 69 chr، تتراپلوئیدی 4n 92 chr و...) نام دارد. برای مثال تری‌پلوئید حاصل از لقاح تخمک با دو اسپرم (تعداد کل کروموروم‌ها به ۶۹ عدد افزایش می‌یابد) یا ناتوانی در تقسیم تخمک یا اسپرم است که سبب تولید گامت دیپلوئید می‌شود. زنده ماندن جنین تا انتهای بارداری در موارد پلی‌پلوئیدی، نادر است. در شکل-۲۱ ناهنجاری های کروموزومی (نام ناهنجاری و تعداد کروموزوم‌های آن) بطور خلاصه ذکر شده است.

[1] Turner syndrome
[2] Klinefelter syndrome
[3] polyploidy



شکل-۲۰ ناهنجاری پلی‌پلوئیدی

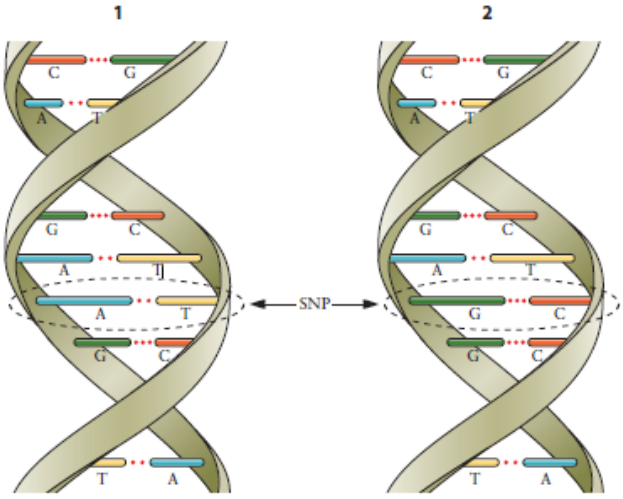
آنیوپلوئیدی	تعداد کروموزوم	کاریوتایپ
Tetraploidy	92	XXYY
Triploidy	69	XXY
Trisomy 21 (Down syndrome)	47	XX+21
Trisomy 18 (Edward syndrome)	47	XY+18
Trisomy 13 (Patau syndrome)	47	XX+13
Klinefelter syndrome	47	XXY
Trisomy X	47	XXX
Turner syndrome	45	X

شکل-۲۱ ناهنجاری های کروموزومی

۱-۱-۲) ناهنجاری‌های ساختاری کروموزوم‌ها

دسته دیگر از ناهنجاری های کروموزومی تغییر در ساختار کروموزوم ها می باشد. بازآرایی ژنومی ممکن است معماری ژنوم را تغییر داده و عواقب بالینی به همراه داشته باشد. چندین اختلال متعدد ژنومی که در اثر تغییر ساختار کروموزوم‌ها به وجود می‌آید به وسیله‌ی سیتوژنتیک (علم مطالعه ساختمان کروموزوم ها) کشف شده است. پیشرفت‌های اخیر در

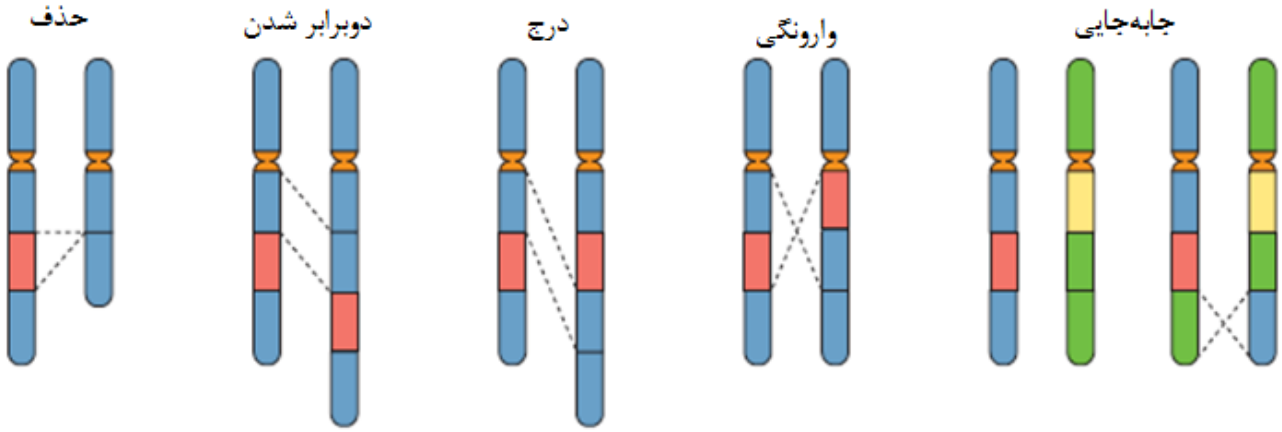
تکنیک‌های سیتوژنتیک مولکولی، امکان شناسایی سریع و دقیق بازآرایی‌های ساختاری را در مقیاس کل ژنوم فراهم کرده است. این وضوح بالا، نقش تنوعات ساختاری و چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP[1]) را در تنوع ژنتیکی طبیعی نشان می‌دهد. در یک جمعیت، در حدود ۹۹/۵ درصد توالی DNA هر دو فرد غیر مرتبط یکسان است. در یک نقطه از کروموزوم ممکن است یک فرد، نوکلئوتید A و فرد دیگر نوکلئوتید G داشته باشد. به این نقطه از DNA، SNP می‌گویند. هر یک از دو توالی DNA در این نقطه (روی ژن) آلل نام دارد (شکل-۲۲). تکنیک‌های مولکولی مانند هیبریداسیون ژنومی مقایسه‌ای مبتنی بر آرایه (CGH)[2]، آرایه‌های SNP[3]، نقاشی آرایه‌ای[4] و توالی‌یابی نسل جدید[5]، تشخیص بازآرایی-های کروموزومی در ژنوم‌های انسانی را تسهیل و تسریع کرده است.



شکل-۲۲ DNA دو فرد که تنها در یک نوکلئوتید تفاوت دارند و چند شکلی تک نوکلئوتیدی دارند

[1] single-nucleotide polymorphisms
[2] array-based comparative genomic hybridization (CGH)
[3] SNP arrays
[4] array painting
[5] next-generation sequencing

مکانیسم های متعددی از جمله حذف[1]، افزایش[2]/ دوبرابر شدن[3]/ درج[4]، جابه‌جایی[5]، وارونگی[6]، کروموزوم حلقوی[7] و ایزوکروموزوم[8] می‌توانند بازآرایی‌های ژنومی متعددی در قطعات DNA را ایجاد کنند (شکل-۲۳).



شکل-۲۳ انواع بازآرایی‌های ژنومی در قطعات DNA

حذف: حذف زمانی رخ می‌دهد که بخشی از کروموزوم از بین رفته یا حذف شده باشد. برای مثال زمانیکه بازوی کوتاه کروموزوم ۴ (p4) و ۵ (p5) حذف شده باشد به ترتیب سندرم های ولف هیرشهورن[9] و فریاد گربه نامیده می شوند. گاهی این حذف قطعات DNA، ناحیه جزئی (micro-deletion) از ساختار کروموزوم است مانند حذف جزئی از بازوی بلند کروموزوم ۱۵ در ناحیه 15q11-13. اگر این حذف بر روی کروموزوم ۱۵ پدری باشد (کروموزومی که از پدر به ارث

[1] deletions
[2] amplifications
[3] duplication
[4] Insertion
[5] translocations
[6] inversions
[7] circular chromosome
[8] Isochromosome
[9] wolf-Hirschhon

رسیده است) به آن سندرم پرادر ویلی[1] گفته می شود و اگر این حذف بر روی کروموزوم ۱۵ مادری باشد به آن سندرم آنجلمن[2] گفته می شود. این تفاوت به دلیل پدیده حک گذاری ژنی[3] رخ می دهد.

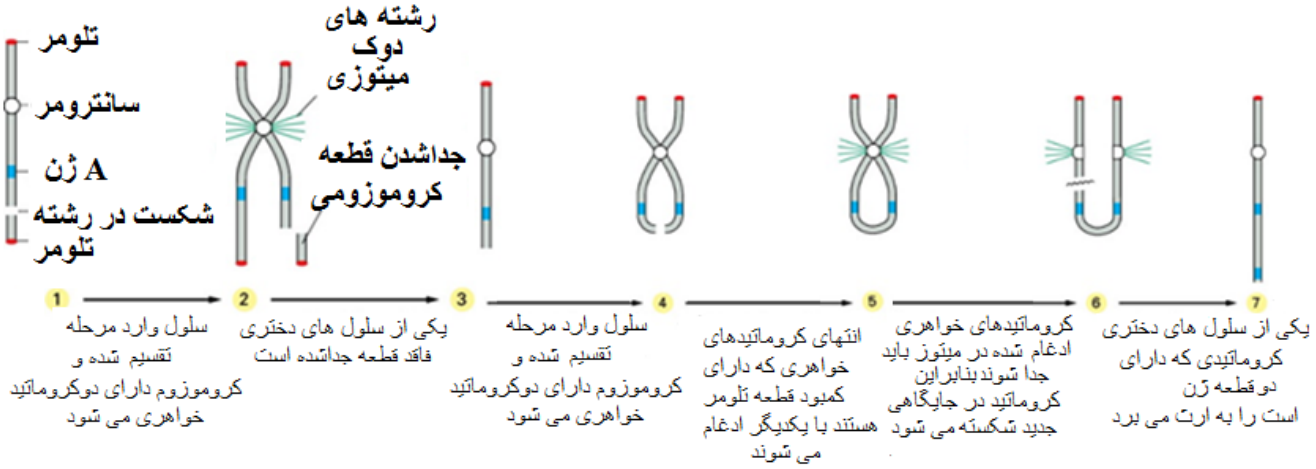
حک گذاری ژنی یک فرآیند ارثی مستقل از وراثت مندلی کلاسیک است. این یک فرآیند اپی ژنتیکی (وَرا ژن‌شناسی) است که شامل متیلاسیون DNA و متیلاسیون هیستون بدون تغییر توالی ژنتیکی است. درواقع اپی ژنتیک روی بیان ژن ها تاثیر می گذارد بدون اینکه باعث تغییر در توالی DNA شود. حک گذاری ژنی در سلول های زایشی (سلول‌های اسپرم یا تخمک) والدین ایجاد یا "حک" می‌شوند و از طریق تقسیم‌های سلولی میتوزی در سلول‌های بدنی یک ارگانیسم حفظ می‌شوند. برای مطالعه بیشتر در مورد اپی ژنتیک به "کتاب مقدمه زیست فناوری" رجوع شود.

می دانیم که تمام افراد بصورت طبیعی دو کروموزوم ۱۵ دارند و یکی از پدر و دیگری از مادر به ارث می رسد. برای اکثر ژن ها هر دو نسخه ژن فعال هستند در تعداد کمی از ژن ها یکی از نسخه ها بسته به منشاء والدین خود خاموش (با کمک متیلاسیون DNA) می شوند. بنابراین در سندرم پرادر ویلی ژن های ضروری و مهم در ناحیه ای روی کروموزم ۱۵ با منشا پدری حذف شدند و در کروموزوم مادری نیز به علت پدیده حک گذاری ژنی خاموش هستند.

افزایش: افزایش یا درج در اثر اضافه شدن بخشی در کروموزوم است که منجر به تولید ماده‌ی ژنتیکی مازاد می‌شود (شکل-۲۴). زمانی که سلول وارد مرحله تقسیم می شود، کروموزوم های آن (که بصورت تک کروماتیدی هستند) دوکروماتیدی می شوند که به آنها کروماتیدهای خواهری می گویند زیرا از محل سانترومر بهم متصل بوده و از نظر

[1] Prader-willi syndrome
[2] Angelman syndrome
[3] Genomic imprinting

محتوای ژنتیکی یکسان هستند. با این کار هر یک از سلول های دختری پس از تقسیم، از هر شماره کروموزوم، یک کروموزوم تک کروماتیدی خواهند داشت.



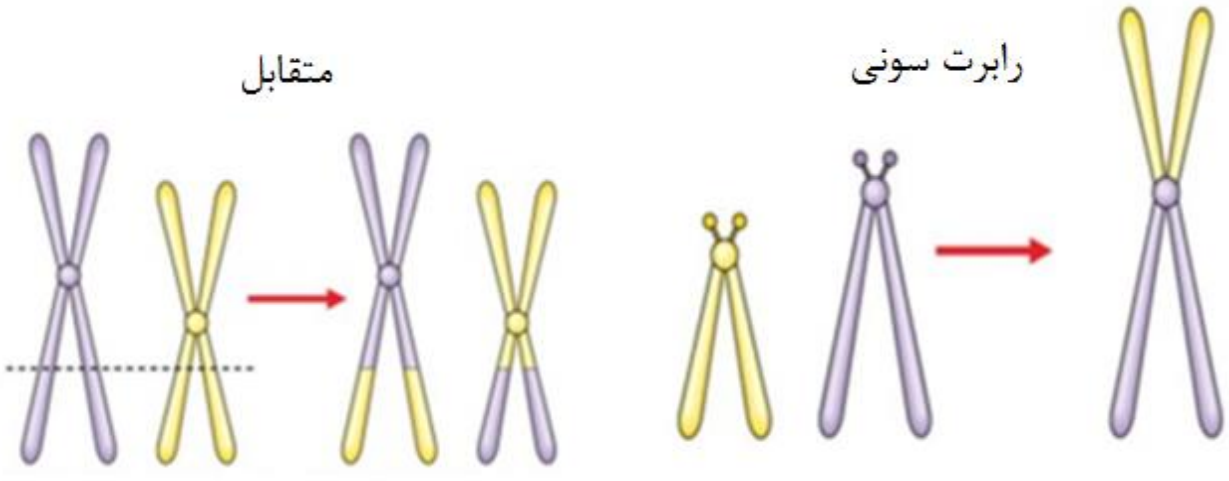
شکل-۲۴ نحوه درج قطعه ای در کروموزوم که در نتیجه مراحل شکست، ادغام و برش کروموزوم رخ داده است

جابه‌جایی: جابه‌جایی یعنی قطعات DNA بین کروموزوم ها جابه جا شوند که بصورت متقابل[1] و رابرت سونی[2] وجود دارند (شکل-۲۵). در جابجایی متقابل بخشی از یک کروموزوم (الف) به کروموزوم دیگر (ب) منتقل و از کروموزوم ب نیز بطور متقابل به کروموزم الف قطعه ای منتقل می شود. مانند جابجایی متقابل بین بازوهای بلند دو کروموزوم ۱۱ و ۲۲ که بسیار شایع است و همچنین جابجایی بین دو کروموزوم ۹ و۲۲ که منجر به ایجاد کروموزوم فیلادلفیا می شود[3].

ژن ABL1 از کروموزوم ۹ جابجا شده و در کروموزوم ۲۲ ناحیه ژن BCR قرار می گیرد. این حالت باعث ایجاد ژن

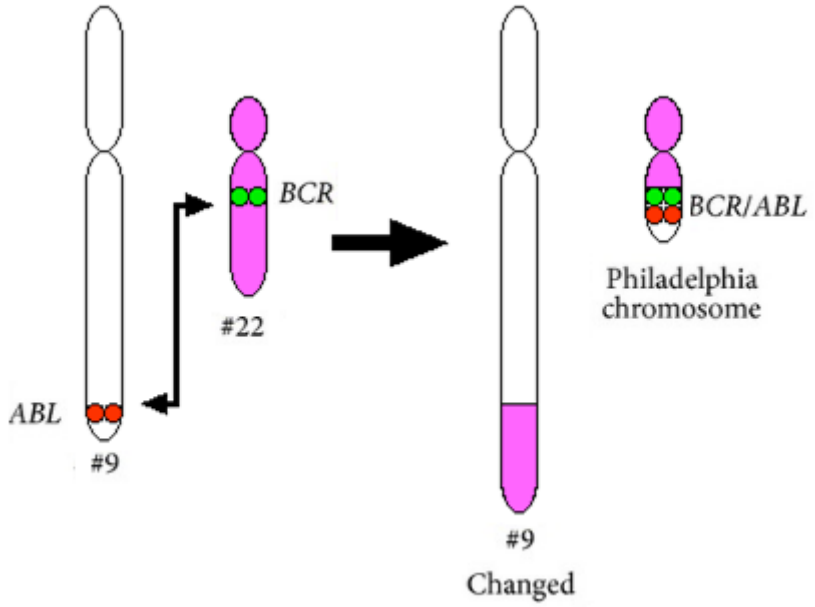
[1] Reciprocal
[2] Robertsonian
[3] Philadelphia chromosome

تلفیقی[1] به نام BCR-ABL1 بر روی کروموزوم ۲۲ ناقص شده (که اکنون دیگر کروموزومی کوچک به نام کروموزوم فیلادلفیا خوانده می شود) می گردد. پروتئین تلفیقی حاصل ازین ژن، نوعی پروتئین تیروزین کینازی است که بصورت غیر قابل کنترلی خاصیت کینازی دارد و کلید مراحل تقسیم سلولی است. درنتیجه منجر به تقسیم سلولی به‌طور غیرقابل‌کنترلی می شود. این حالت در نوعی سرطان خون یعنی لوسمی مزمن میلوئیدی یا همان مغز استخوان[2] (CML)دیده شده است (شکل-۲۶).



شکل-۲۵ دو نوع جابجایی بین کروموزوم ها: متقابل و رابرت سونی (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه کنید)

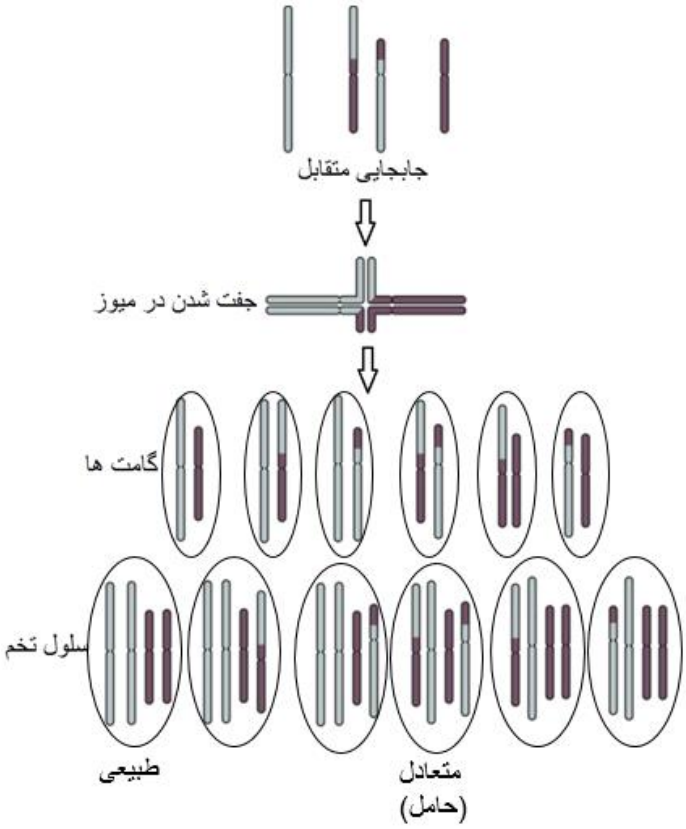
[1] Fusion gene
[2] Chronic myelogenous leukemia



شکل-۲۶ نحوه شکل گیری کروموزوم فیلادلفیا

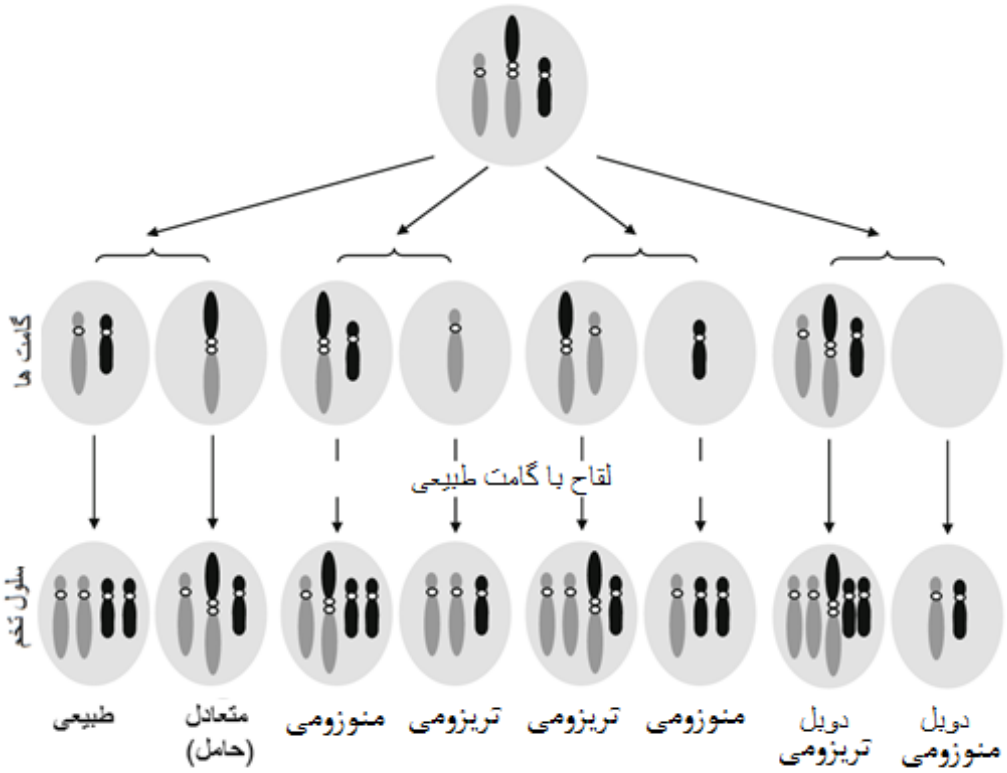
پس از وقوع جابجایی متقابل، چه حالت هایی برای نسل بعد سلول ها رخ خواهد داد؟ در تقسیم سلولی که منجر به تولید گامت ها می شود (تقسیم میوز) نیاز است نواحی مشابه در کنار یکدیگر ردیف شوند. در حالتی که جابجایی متقابل رخ داده باشد به منظور حفظ آن حالت همولوگی (ردیف شدن نواحی مشابه)، شکلی چهارظرفیتی در مرحله میوز I تشکیل می شود (شکل -۲۷). پس از جدا شدن این کروموزوم ها از یکدیگر احتمال وقوع انواع مختلفی از گامت ها است. پس از لقاح این گامت ها با گامت طبیعی، سلول تخم حاصل می تواند حالت های مختلفی باشد: طبیعی، حامل متعادل[1] (دارای کلیه ژن ها است ولی خود نیز دارای این جابجایی است و به نوعی حامل یا ناقل است)، تریزومی یا منوزومی جزئی برای یکسری از ژن ها (شکل-۲۷).

[1] Balanced carrier



شکل-۲۷ نحوه تاثیر جابجایی متقابل بر روی نسل بعدی

جابجایی رابرت سونی بین دوکروموزوم آکروسانتریک اتفاق می افتد بطوریکه یک کروموزوم تشکیل می شود که این حالت بین کروموزوم ۱۴ و ۲۱ دیده شده است. نسل بعدی این جابجایی نیز می تواند سلول تخم طبیعی، حامل و تریزومی یا منوزومی یاشد (شکل-۲۸).

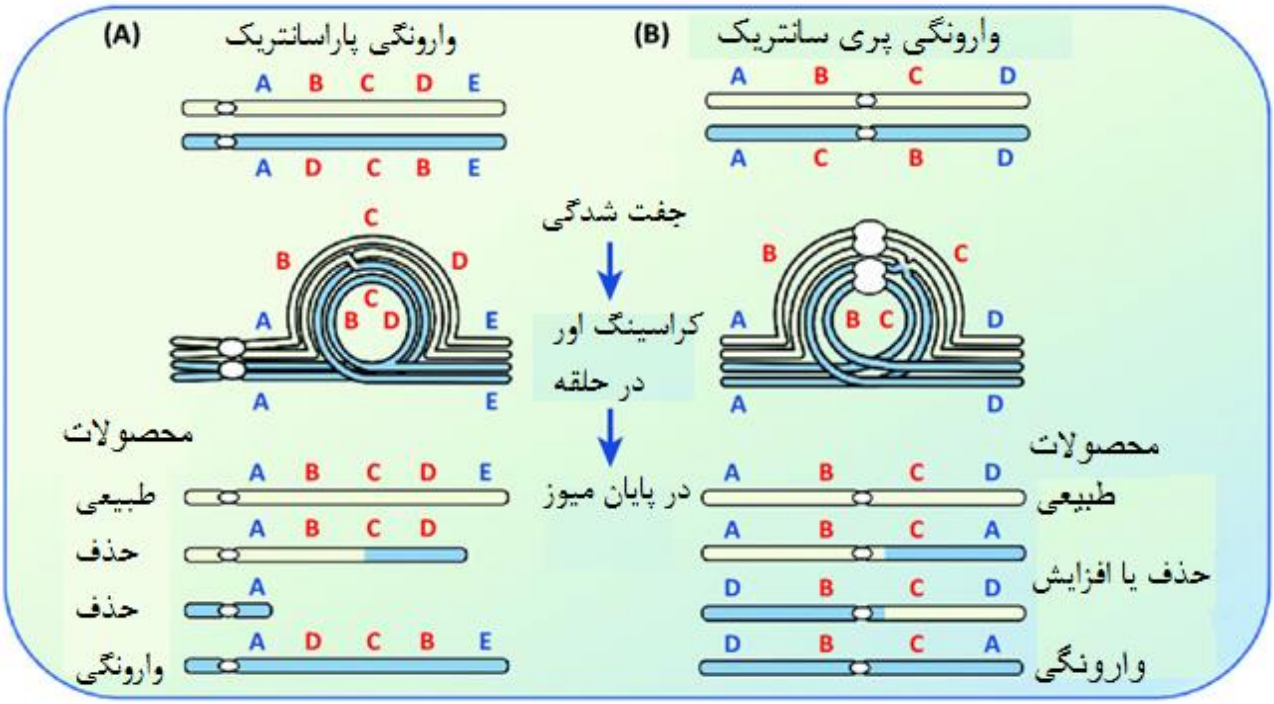


شکل-۲۸ نحوه تاثیر جابجایی رابرت سونی بر روی نسل بعدی

وارونگی: وارونگی DNA زمانی ایجاد می‌شود که قسمتی از یک کروموزوم شکسته شده، برعکس شده و دوباره به کروموزوم متصل می‌شود. ترتیب ژن ها بهم ریخته ولی محتوای آن ها ثابت باقی می ماند. به دو صورت پاراسانتریک[1] و پری سانتریک[2] ایجاد می شود. در پاراسانتریک وارونگی در ناحیه ای خارج از ناحیه سانترومری رخ می دهد. وقتی کروموزوم ها با یکدیگر جفت می شوند به دلیل اینکه در آن ها واژگونی اتفاق افتاده، تشکیل حلقه ای در میوز می دهند که ناحیه های مشترک روبه روی هم قرار بگیرند. در پری سانتریک ناحیه واژگونی شامل سانترومر است بنابراین سانترومر نیز در لوپ یا حلقه قرار می گیرد. کراسینگ اور (تبادل مواد ژنتیکی در طی میوز بین دو کروموزوم همولوگ (دو

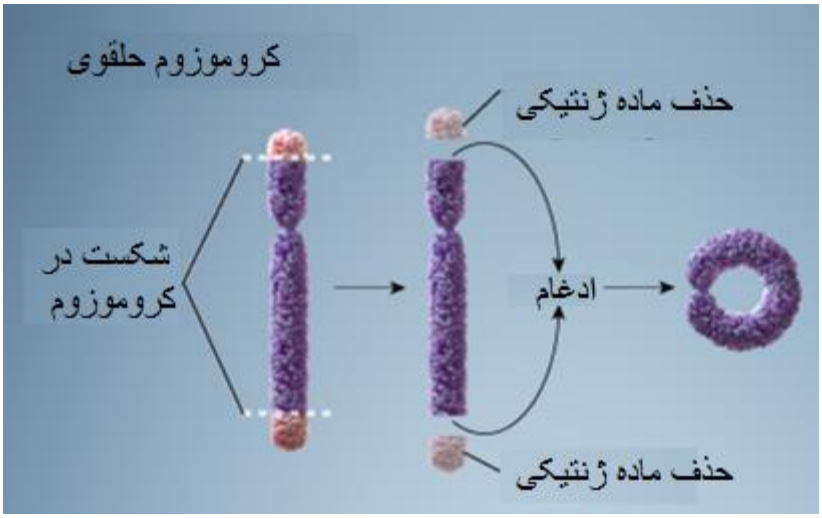
[1] paracentric
[2] pericentric

کروماتید غیرخواهری) که منجر به تولید کروموزوم های نوترکیب می شود) در لوپ ها انجام شده و گامت هایی با حذف، افزایش، وارونگی به وجود می آید. این گامت ها در نسل بعد در اثر لقاح با گامت های طبیعی منجر به تریزومی یا منوزومی جزئی برای یکسری از ژن ها می شوند (شکل-۲۹).



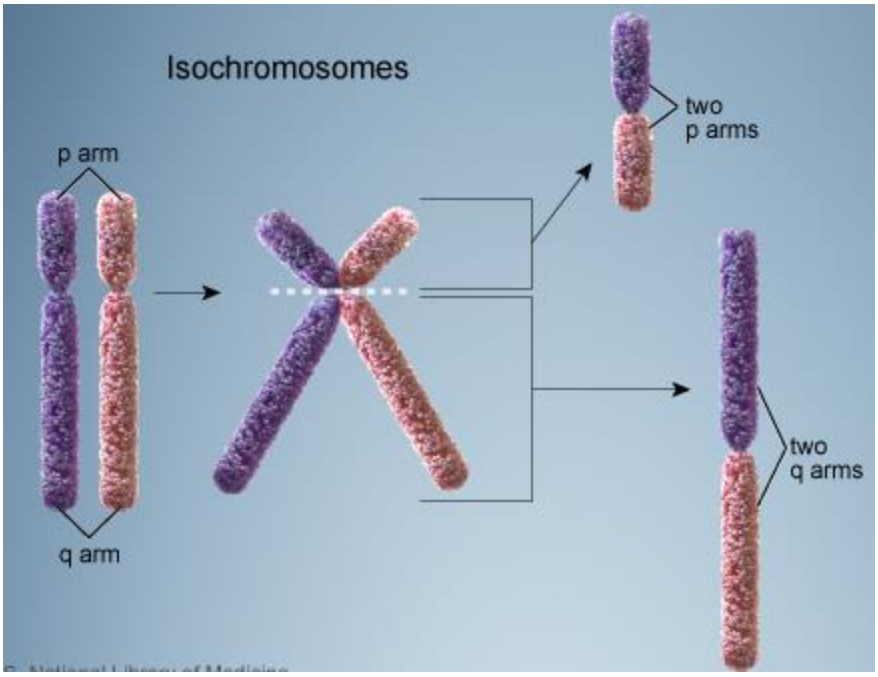
شکل-۲۹ وارونگی پاراسانتریک و پری سانتریک

کروموزوم حلقوی: زمانی که بخشی (غالبا نواحی تلومر) از یک کروموزوم بریده شود، دو انتهای کروموزوم ممکن است به شکل دایره یا حلقه بهم متصل شوند (شکل-۳۰).



شکل-۳۰ نحوه شکل گیری کروموزوم حلقوی

ایزوکروموزوم: ایزوکروموزوم یک اختلال ساختاری نامتعادل است که در آن بازوهای کروموزوم تصاویر آینه از یکدیگر هستند. به عبارتی دیگر، می توان گفت ایزوکروموزوم، کروموزومی است که یکی از بازو های خود را از دست داده است و یک کپی از بازوی دیگر همان کروموزوم، جایگزین بازوی از دست رفته شده است. در اثر یک تکثیر و حذف همزمان مواد ژنتیکی، ایزوکروموزوم شکل می گیرد به این صورت که شامل دو نسخه از بازوی بلند یا بازوی کوتاه است. در نتیجه تریزومی جزئی از ژن های موجود در ایزوکروموزوم و مونوزومی جزئی ژن ها در بازوی حذف شده به وجود می آید (شکل-۳۱).

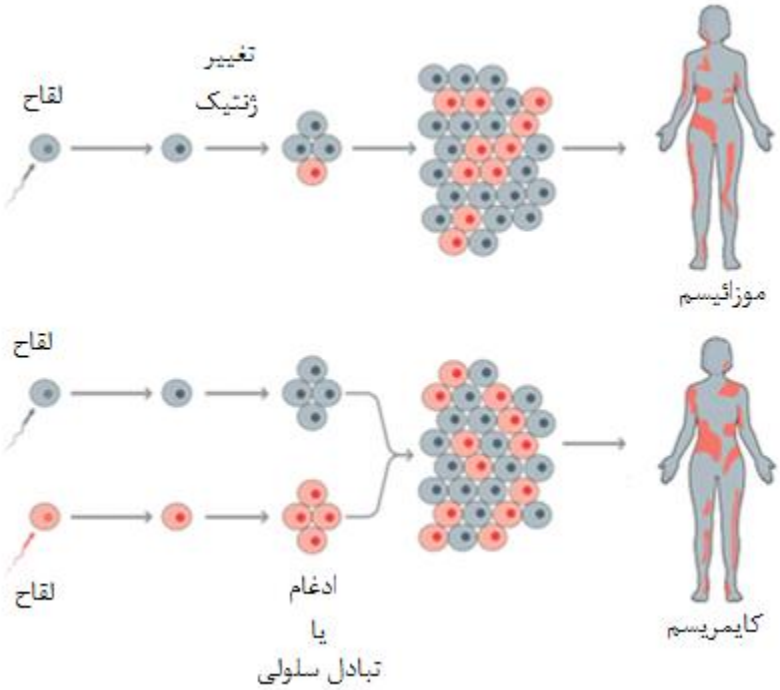


شکل-۳۱ نحوه شکل گیری ایزوکروموزوم

اکثر ناهنجاری های کروموزوم به طور تصادفی در تخمک یا اسپرم اتفاق می افتد، بنابراین اختلال در هر سلول بدن وجود دارد. با این حال، برخی از ناهنجاری ها پس از تولد بوجود می آیند، که منجر به شرایطی می شود که چند سلول دارای اختلال بوده و بقیه نیستند. ناهنجاری‌های کروموزومی یا از والدین به ارث می‌رسند (همانند جابه‌جایی) یا به صورت خود به خودی برای اولین بار ایجاد می‌شوند. به همین دلیل هنگامی که مشخص می‌شود کودکی دچار ناهنجاری است، مطالعات کروموزومی روی والدین وی انجام می‌گیرد.

۱-۱-۳) ناهنجاری‌های میکسوپلوئیدی[1]

نوع دیگری از اختلالات کروموزومی است که درآن جمعیت های متخلف سلولی در بدن فرد وجود دارد. این ناهنجاری می تواند حالت موزائیسم یا کایمریسم باشد. در موزائیسم، سلول تخم (تخمک لقاح یافته با اسپرم را گویند) به وجود آمده در مرحله ای از تقسیم سوماتیک دچار جهش می شود. دو یا چند جمعیت سلول با ژنتیک های مختلف در فردی که از یک تخم بارور شده رشد پیدا می کنند. اما کایمریسم از بیش از یک سلول تخم منشا می گیرد. به این صورت که دو سلول تخم با همدیگر ادغام شده و یک فرد را به وجود می آورند. در این حالت رده های سلولی با ژنوتیپ های متفاوت در فرد مشاهده می شود (شکل-۳۲).



شکل-۳۲ ناهنجاری‌های موزائیسم و کایمریسم

[1] Mixoploidy

۱-۲) اختلالات تک‌ژنی[1]

گفتیم اختلالات ژنتیکی چند دسته هستند. حال پس از اختلالات کروموزومی، دسته دوم اختلالات تک ژنی هستند. اختلالات تک‌ژنی یا بیماری‌های تک‌ژنی[2]، حاصل جهش یا جهش‌هایی در یک ژن از تمام سلول‌های بدن هستند.

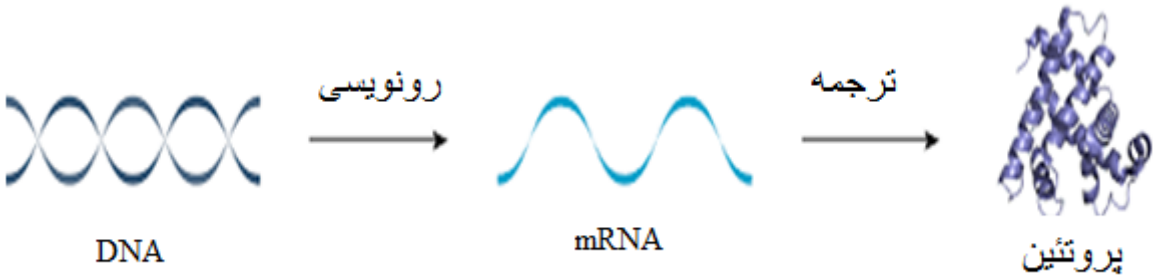
جهش در DNA چیست؟

گفتیم که یکی از انواع بیماری ها اختلالات مبتنی بر نقص ژنتیکی است. حال باید به این نکته توجه کرد که چگونه این بیماری ها ایجاد شده است. درواقع این نقص ژنتیکی چطور به وجود آمده است؟ اگر سازوکار اصلی آن را بشناسیم می توانیم با کمک بیوتکنولوژی پزشکی در جهت تشخیص و درمان آن کوشا باشیم. مهمترین عامل ایجاد نقص ژنتیکی، جهش در DNA و عدم توانایی بدن در ترمیم آن است. جهش که ممکن است در طول همانندسازی و یا نوترکیبی اتفاق بیفتد یک تغییردائم در توالی نوکلئوتیدی DNA است. این حالت همانطور که در پیش از این نیز اشاره شد (در مبحث ناهنجاری‌های ساختاری کروموزوم‌ها) می تواند در اندازه بزرگ به اندازه قطعات کروموزومی، انجام شود و یا در اندازه ای بسیار کوچک و درحد یک نوکلئوتید باشد. بنابراین DNA به صورت جایگزینی، حذف، یا اضافه شدن جفت‌بازها می‌تواند جهش یابد و آسیب ببیند. بیشتر جهش‌ها به جز جهش‌هایی که منجر به مرگ سلولی یا تشکیل تومور می‌شوند، بی‌خطر

[1] Single-Gene Disorders
[2] monogenic diseases

هستند. به دلیل پتانسیل کشنده‌ی جهش‌های DNA، سلول‌ها مکانیسم‌هایی برای ترمیم DNA آسیب‌دیده ایجاد کرده-اند.

درواقع جهش مقدمه‌ی پیدایش یک بیماری ژنتیکی است. همانطور که مطرح کردیم، DNA متشکل از کدهایی است که مطابق الگوی آن ها، ابتدا مولکول‌های RNA و سپس از روی کدهای RNA، پروتئین‌ها ساخته می شوند. می توان گفت تمام عملکردها و ویژگی‌های سلول‌های بدن توسط پروتئین‌ها انجام می‌شود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که رمزهای DNA در نهایت عملکردها و ساختارهای بدن را شکل می دهند.

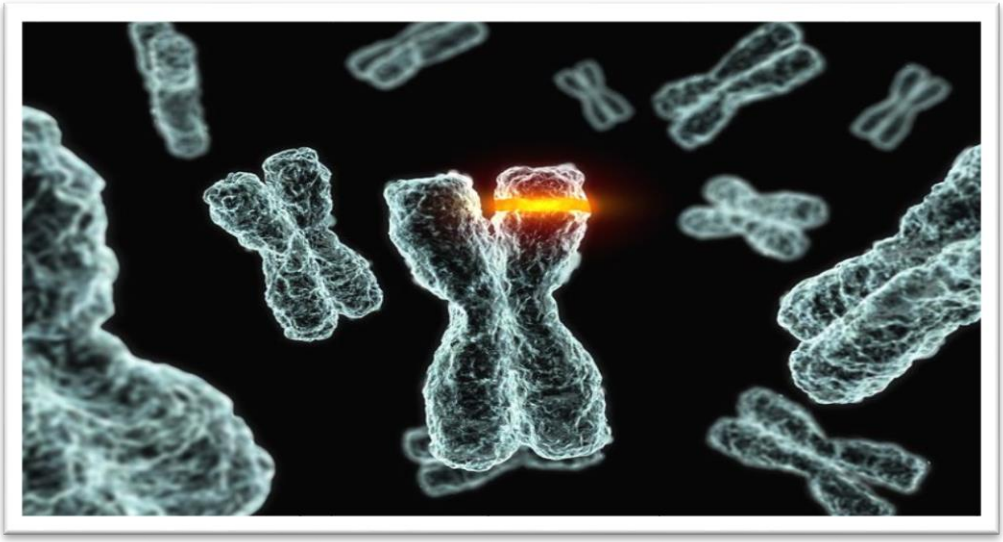


شکل-۳۳ برای تولید یک پروتئین سه فرایند اصلی مورد نیاز اند. اول؛ همانندسازی که در سطح DNA صورت می گیرد. دوم؛ ساخت مولکول تک رشته‌ی RNA پیام رسان از روی یکی از رشته‌های DNA که به این مرحله رونویسی می گویند. سوم؛ ساخت پروتئین از روی الگوی RNA که به آن ترجمه می گوییم.

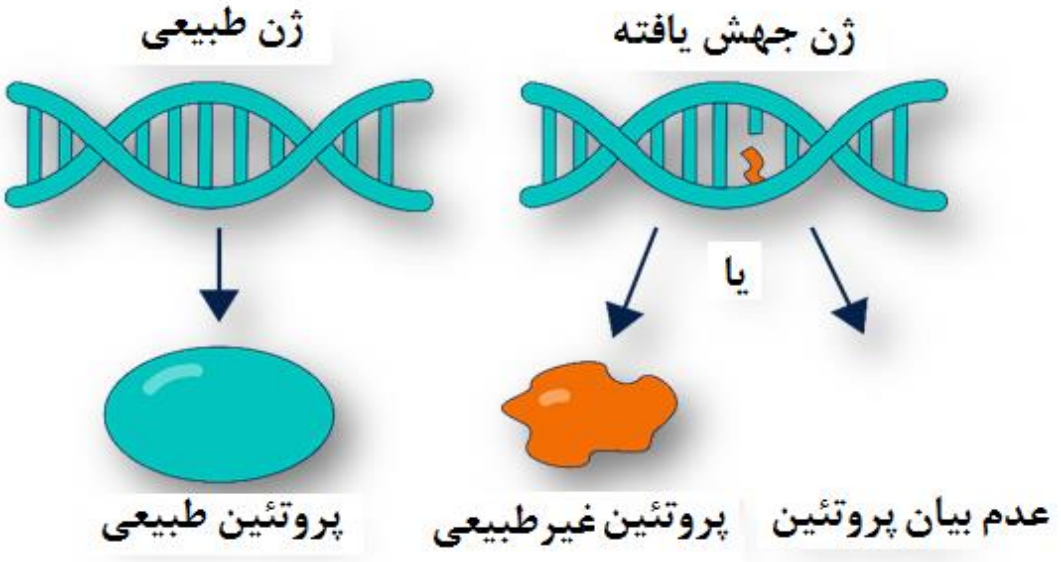
مولکول DNA به طور طبیعی اقدام به خودهمانندسازی می‌کند و فاکتورهای مختلفی کنترل‌کننده‌ی این فرایند هستند. اما گاهی اوقات در حین همانندسازی و یا در شرایط دیگر ممکن است در بخشی از مولکول ژنتیکی تغییری خودبه خودی و یا غیر خودبه‌خودی (مانند قرارگیری در معرض اشعه‌ی UV) روی دهد. همانطور که گفته شد DNA نه تنها باعث تنظیم روند ساخت خود می‌شود، بلکه به ساخت مولکول‌های دیگر (پروتئین) نیز جهت می‌بخشد. پس در صورتی

که مولکول DNA دستخوش تغییر اندکی شود، این امکان وجود دارد که عواقب جدی برای سلول در پی داشته باشد. اگر این تغییرات فراتر از حدی باشند که دیگر امکان بازیابی یا بازسازی نقص به وجود آمده نباشد، در آن صورت سلول کارآیی خود را از دست خواهد داد و یا در شرایط خاصی خواهد مرد. این تغییرات را به طور کلی جهش می نامیم. جهش می تواند به صورت حذف یا افزوده شدن یک نوکلئوتید و یا تغییر در یک نوکلئوتید بروز پیدا کند.

جهش‌ها ممکن است با تغییر در رمز DNA منجر به تولید پروتئینی ناکارآمد و یا عدم تولید پروتئین شوند. در این صورت بیماری‌های ژنتیکی ایجاد می شوند.



شکل- ۳۴ عوامل بسیار متعددی موجب ایجاد جهش در یک ژن می شوند. این عوامل مختلف فیزیکی از جمله تابش اشعه‌ی UV و X ، مواد رادیواکتیو و نیز عوامل شیمیایی مانند آلکالوئید و بنزن را موتاژن می نامیم.

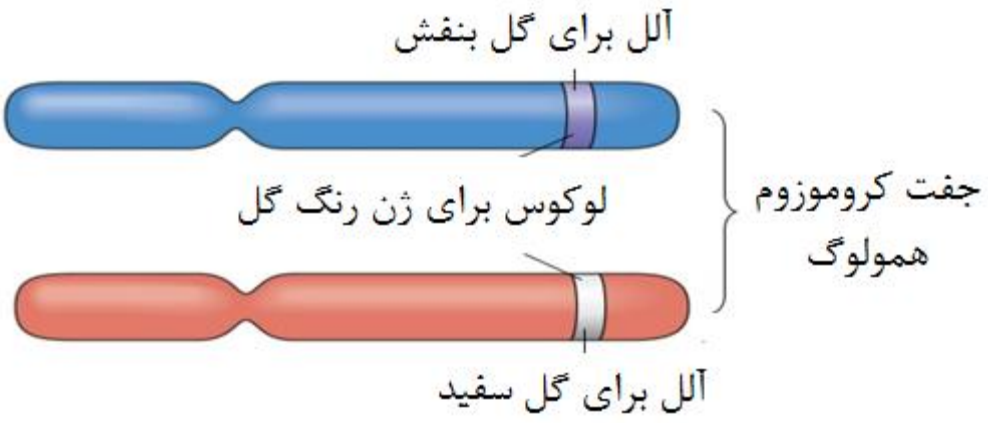


شکل-۳۵ گاهی اوقات با تغییر در توالی DNA پروتئین ایجاد شده در نهایت ناکارآمد خواهد بود. حتی ممکن است این تغییر در جایگاهی از DNA صورت گیرد که هیچ گونه پروتئینی ساخته نشود.

شکل-۳۶ هر گونه تغییر دائمی در توالی DNA جهش نامیده می‌شود. جهش‌ها می توانند مفید، مضر و یا بی تاثیر باشند.

شاید فکر کنید جهش‌ها همیشه مخرب اند. اما بهتر است بدانید تنوع موجود بین افراد مختلف یک گونه مدیون جهش هاست؛ مانند انواع رنگ چشم در مگس سرکه، انواع رنگ گلبرگ در گیاه ذرت، بلندی یا کوتاهی ساقه‌ی گیاه و ... در

طول تکامل هر ژن متحمل جهش‌های بی‌شماری شده است که این امر باعث شده هر ژن به شکل‌های مختلفی وجود داشته باشد. به این شکل‌های متفاوت از یک ژن، آلل[1] می گویند. ژن‌ها جایگاه مشخصی از کروموزوم را به خود اختصاص می دهند. به جایگاه مشخص هر ژن بر روی کروموزوم لوکوس[2] می گویند.



شکل-۳۷ دو کروموزوم را زمانی همتا یا هومولوگ می نامیم که کاملا از لحاظ اندازه، شکل و محتوای ژنتیکی مشابه هم باشند. در این تصویر، به خوبی جایگاه آلل‌ها نسبت به هم قابل مشاهده است.

انواع جهش‌ها

همانطور که گفته شد ساختار DNA از درکنار هم قرار گرفتن چهار نوع باز نیتروژنی آدنین A، گوانین G (بازهای پورین)، تیمین T و سیتوزین C (بازهای پیریمیدین) تشکیل شده است. یک کدون کد کننده یک اسیدآمینه از ترتیب سه باز تشکیل شده است برای مثال ATG اسید آمینه متیونین را مشخص می کند. هرنوع تغییر در ترتیب توالی منجر به جهش می شود که سه نوع جهش در DNA مطرح می شود: جایگزینی، حذف و اضافه بازها.

[1] allele
[2] locus

۱. جایگزینی بازها: به جایگزینی یک باز جهش نقطه‌ای می‌گویند. جهش‌های نقطه‌ای رایج‌ترین نوع جهش هستند و دو نوع دارند: ترانزیشن[۱] و ترانسوِرژن[۲].

ترانزیشن زمانی رخ می دهد که یک باز پورین با یک باز پورین دیگر جایگزین شود یا یک باز پیریمیدین با یک باز پیریمیدینی دیگر جایگزین شود. **ترانسورژن نیز** زمانی رخ می دهد که یک باز پورین با یک باز یریمیدین و یا یک باز پیریمیدین با یک باز پورین جایگزین شود. مثال معروف آن جایگزینی باز آدنین در کدون GAG (کد کننده اسید آمینه اسیدگلوتامیک Glu) با باز تیمین در کدون GTG (کد کننده اسیدآمینه والین Val) می باشد که جهش نقطه ای Glu⟶Val (یعنی تبدیل اسید آمینه اسیدگلوتامیک به والین) نامیده شده و منجر به بیماری کم خونی داسی شکل می شود. جهش‌های نقطه‌ای که در توالی‌های DNA کدکننده‌ی پروتئین اتفاق میفتد، یا خاموش[۳] هستند یا بدمعنی[۴] و یا بی‌معنی[۵].

جهش خاموش: اگر جایگزینی یک باز در سومین جایگاه یک کدون اتفاق بیفتد، شانس ایجاد کدون مشابه بالا است. بنابراین توالی اسیدآمینه کدشده توسط ژن تغییر نکرده و جهش به اصطلاح خاموش است. برای مثال TTT و TTC هردو اسیدآمینه فنیل آلانین را کد می کنند.

جهش بدمعنی: این جهش زمانی رخ می‌دهد که جایگزینی باز منجر به ایجاد کدونی متفاوت شود که مربوط به اسیدآمینه دیگری است و منجر به توالی پلی‌پپتیدی متفاوتی می‌شود. براساس نوع اسیدآمینه جایگزین‌شده،

[1] Transition
[2] Transversion
[3] silent
[4] missense
[5] nonsense

جهش بدمعنی می‌تواند برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر باشد. به طور مثال اگر ساختار و ویژگی‌های اسیدآمینه جایگزین‌شده بسیار شبیه به اسیدآمینه اصلی باشد، جهش برگشت‌پذیر است و به احتمال قوی اثر ناچیزی روی ساختار/ عملکرد پروتئین حاصل می‌گذارد. اگر جایگزینی منجر به اسیدآمینه ای شود که ساختار و خصوصیات خیلی متفاوتی دارد، جهش برگشت‌ناپذیر است و برای ساختار و عملکرد پروتئین مخرب (برای مثال جهش نقطه‌ای کم‌خونی داسی‌شکل) است.

جهش بی‌معنی: زمانی که جایگزینی باز منجر به ایجاد کدون پایان شود. (کدونی که اسیدآمینه ای کد نمی کند و معنی پایان ترجمه را می دهد. سه کدون به عنوان کدون پایان وجود دارد: TAA، TAG و TGA). نهایتاً ترجمه را کوتاه می‌کند و به احتمال قوی منجر به پروتئین غیرعملکردی می‌شود.

	خاموش	بی معنی	بدمعنی
سطح DNA	TTT	ATC	TGC
سطح mRNA	AAA	UAG	ACG
سطح پروتئین	Lys	STOP	Thr

شکل-۳۸ انواع جهش جایگزینی بازها

۲. حذف: جهش حذفی زمانی که یک یا چند جفت باز از DNA حذف می‌شوند رخ می دهد. از آنجایی که هر کدون متشکل از سه باز است بنابراین چهارچوب خوانش برای بیان پروتئین مضربی از سه است. اگر یک یا دو یا چهار یا پنج و.. باز حذف شده باشد، منجر به تغییر چهارچوب خوانش و بیان پروتئین می‌شود. با تغییر چهارچوب بیانی، پیامی مبهم و محصولی بدون عملکرد تولید می‌شود. حذف سه یا شش یا نه و.. باز، چهارچوب خوانش را تغییر نمی‌دهد ولی منجر به حذف یک یا چند کدون و بالطبع یک یا چند اسیدآمینه می‌شود. این پدیده ممکن است مخرب باشد یا نباشد.

۳. اضافه: اضافه شدن جفت‌باز اضافی نیز ممکن است منجر به تغییر چهارچوب شود که وابسته به این است که آیا ضریب سه تایی ازجفت‌بازها اضافه شده است یا خیر. ترکیب حذف شدن‌ها و اضافه شدن‌ها هم ممکن است اتفاق بیفتد که منجر به نتایج متنوعی می‌شود.

علل ایجاد جهش‌ها

خطاها در همانندسازی DNA: در شرایطی بسیار نادر، DNA پلیمراز یک باز غیرمکمل را در رشته‌ی درحال سنتز شده (دختری) وارد می‌کند. طی دور بعدی همانندسازی، باز اشتباه واردشده منجر به ایجاد جهش می‌شود. با این وجود این اتفاق بسیار نادر است؛ زیرا اگزونوکلئاز به عنوان مکانیسم تصحیح عمل می‌کند، جفت باز غیرمکمل را شناسایی کرده و آن را برش می‌دهد.

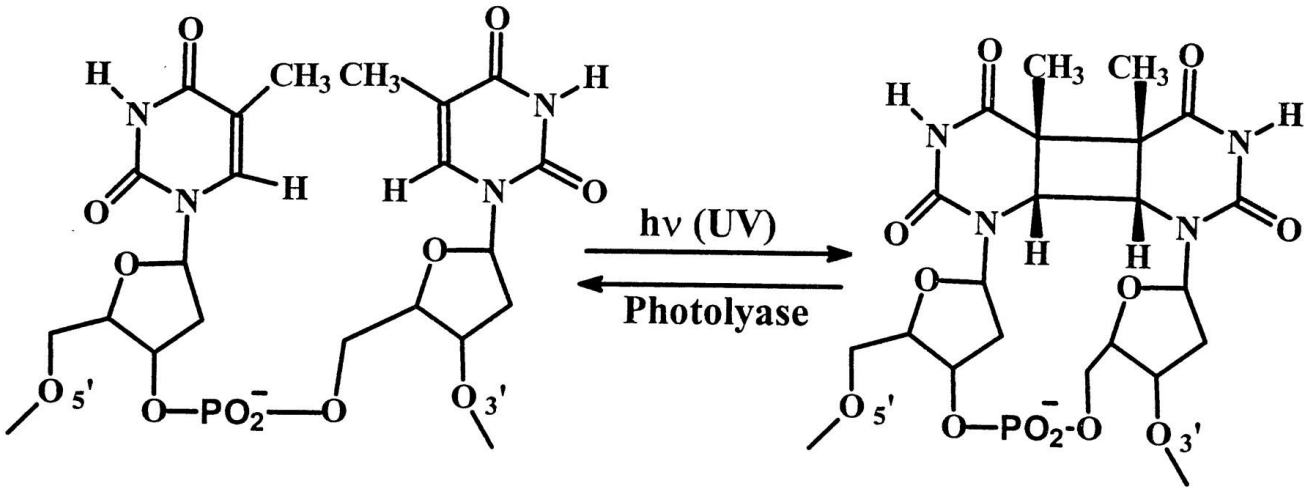
خطاها در نوترکیبی DNA: غالباً DNA با فرآیندی به نام نوترکیبی خود را بازآرایی می‌کند که این فرآیند از طریق مکانیسم‌های متنوعی حاصل می‌شود. گاهی قطعه ای از DNA در زمان نوترکیبی از بین می‌رود که منجر به جهش می‌شود.

آسیب شیمیایی DNA: بسیاری از عوامل جهش‌زای شیمیایی، بعضی مواد ساخته‌شده توسط بشر، بعضی دیگر از محیط‌زیست اطراف و عوامل خارجی، قادر به آسیب زدن به DNA هستند. بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی و عوامل تداخلی دارویی[1] با آسیب زدن به DNA عمل می‌کنند. تابش اشعه‌های گاما، اشعه‌های ایکس، حتی نور UV می‌توانند با ترکیبات موجود در سلول برهمکنش کرده و رادیکال‌های آزادی تولید کنند که به DNA آسیب شیمیایی می‌زنند.

مکانیسم های ترمیم DNA

ترمیم مستقیم DNA آسیب‌دیده: بعضی اوقات آسیب در باز می‌تواند به طور مستقیم و بدون نیاز به برش نوکلئوتیدی، توسط آنزیم‌های ویژه‌ای ترمیم شود. برای مثال بازهای پیریمیدین توسط پرتو فرابنفش طی فرایند به اصطلاح "فعال سازی مجدد نوری[2]" به هم متصل می شوند. سپس این بازهای به هم متصل شده در حضور نور مرئی، توسط آنزیم DNA فوتولیاز، مجدد از یکدیگر جدا می‌شوند. درواقع این آنزیم با تابش نور، فعال می‌شود.

[1] intercalating agent drugs
[2] Photoreactivation

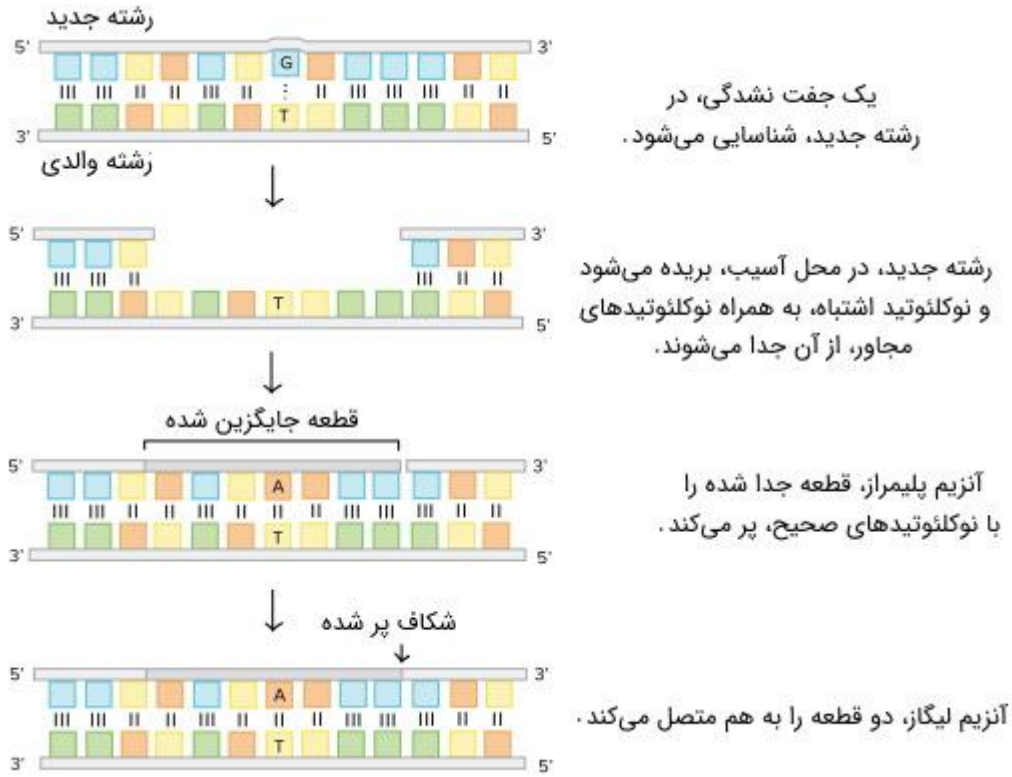


شکل-۳۹ ترمیم مستقیم با کمک آنزیم فوتولیاز

ترمیم عدم تطابق[1](MMR): گاهی اوقات DNA پلیمراز یک نوکلئوتید اشتباه را هنگام سنتز رشته، وارد رشته‌ی DNA می‌کند و سیستم اگزونوکلئاز اصلاح‌کننده‌ی ’3 به ’5 آن را تصحیح نمی‌کند. این عدم تطابق‌های پیش آمده همراه با حذف و اضافه شدن‌های تک بازی با فرایند "ترمیم عدم تطابق" ترمیم می‌شوند. ترمیم عدم تطابق متکی به یک پیام ثانویه در DNA است که بین رشته‌ی مادری با رشته‌ی دختری که دارای خطای همانندسازی است تفاوت قائل می‌شود. سلول‌های انسانی دارای سیستم ترمیم عدم تطابق هستند که مشابه آن در باکتری ایشرشیا کلای موجود است که در این‌جا توضیح داده می‌شود. همانند سازی ملکول DNA بصورت نیمه حفظ شده است. به این صورت که هر مولکول DNA از دو رشته ساخته شده است و در طی همانند سازی دو رشته باز شده و هر رشته به عنوان الگویی برای سنتز رشته مکمل استفاده می‌شود. بنابراین مولکولDNA تازه سنتز شده که دارای دو رشته است یک رشته آن مولکول جدید به تازگی ساخته شده و رشته دیگر از مولکول DNA اولیه انتقال پیدا کرده است. حال چگونه سیستم ترمیم عدم

[1] Mismatch Repair

تطابق رشته تازه سنتز شده که حاوی خطا است را از رشته قدیمی تشخیص می دهد؟ باید گفت که رشته های DNA در نواحی خاصی متیله هستند و چون همانندسازی DNA نیمه حفظ‌شده است بنابراین متیله شدن رشته‌ی دختری نیز پس از همانندسازی DNA انجام می‌گیرد. اما نکته قابل توجه این است که رشته‌ی دختری جدید برای مدت زمان بسیار کوتاهی در ادامه‌ی همانندسازی غیرمتیله باقی می‌ماند. این تفاوت به سیستم ترمیم عدم تطابق کمک می‌کند تا رشته‌ی خطادار (رشته دختری) را شناسایی کند. پروتئینی خاص، جفت باز ناسازگار را شناسایی کرده و به آن متصل می‌شود. درادامه توسط اندونوکلئاز خاصی شناسایی شده و رشته DNA متیله‌نشده را برش می‌دهد. هلیکاز رشته‌ی DNA را در جهت عدم تطابق، باز می‌کند و یک اگزونوکلئاز رشته را تخریب می‌کند. سپس DNA پلیمراز حفره را پر می‌کند و لیگاز، شکاف را می‌بندد. به نظر می‌رسد نقص درترمیم عدم تطابق ژن‌ها در انسان‌ها، با پیشرفت سرطان روده‌ی بزرگ ارثی مرتبط باشد.

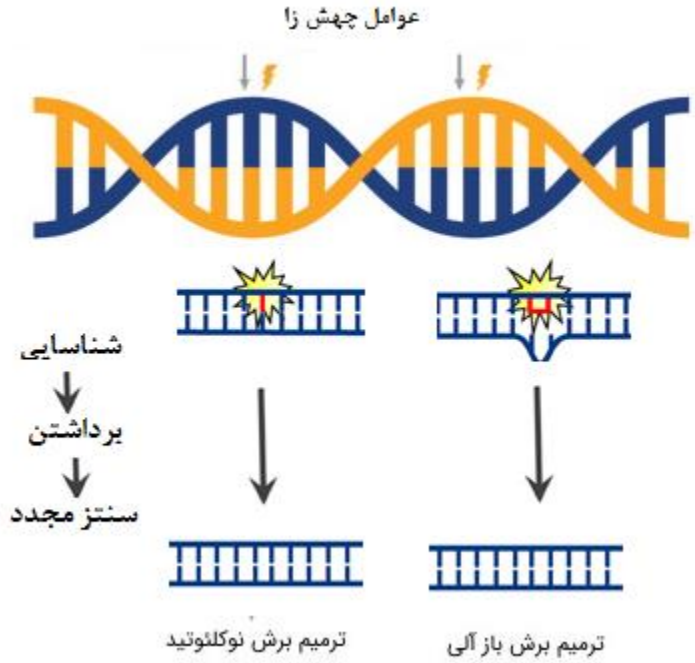


شکل-۴۰ مکانیسم ترمیم عدم تطابق

ترمیم برش[1] (ER): می تواند بصورت های ترمیم برش باز آلی[2] (BER) و ترمیم برش نوکلئوتیدی[3] (NER) انجام شود.

در ترمیم برش باز آلی، گلیکوزیلازهای DNA به طور اختصاصی، باز نامناسب را شناسایی و آن را از رشته جدا می‌کنند.

در ترمیم برش نوکلئوتیدی، در سلول‌های انسانی با تشکیل کمپلکس پروتئینی خاص در ناحیه DNA خسارت دیده، NER آغاز می‌شود. سپس عامل رونویسی (بنام TFIIH) که شامل چندین پروتئین است در یک واکنش وابسته به ATP به این کمپلکس متصل می‌شود و یک برش ایجاد می‌کند. قطعه چند نوکلئوتیدی از DNA آسیب‌دیده، باز شده و حفره حاصل پر می‌شود (با کمک آنزیم DNA پلیمراز) و شکاف بسته می‌شود (با کمک آنزیم لیگاز).



شکل-۴۱ مکانیسم های ترمیم برش به دو صورت NER و BER

[1] Excision Repair
[2] Base Excision Repair
[3] Nucleotide Excision Repair

ترمیم شکستگی دو رشته ای: برخی از انواع عوامل محیطی ، مانند تابش پرانرژی ، می تواند باعث شکستگی دو رشته ای DNA شود (تقسیم کروموزوم به دو قسمت). شکستگی های دو رشته ای خطرناک هستند، زیرا بخش های زیادی از کروموزوم‌ها و صدها ژن موجود در آن‌ها در صورت عدم ترمیم شکاف ممکن است از بین بروند. دو مسیر دخیل در ترمیم شکاف‌های DNA دو رشته ای، پیوستن انتهای غیر همولوگ[1] (NHEJ) و نوترکیبی همولوگ[2] (HR) هستند. ترمیم نوترکیبی همولوگ مکانیسمی در سلول برای ترمیم شکست دو رشته ای DNA است و تنها زمانی می تواند توسط سلول استفاده شود که یک قطعه همولوگ DNA در هسته وجود داشته باشد (بیشتر در فازهای G2 و S چرخه سلولی). وقتی DNA همولوگ وجود ندارد، این کار توسط مکانیسم پیوستن انتهای غیر همولوگ که همراه با اتصال کمپلکس پروتئینی ویژه ای به انتهاهای شکسته دو رشته است، انجام می شود.

تنظیم کنترل آسیب

ترمیم DNA در سلول‌های پستاندار با مکانیسم حسگری تنظیم می‌شود که آسیب DNA را تشخیص داده و پروتئینی به نام p53 را فعال می‌کند. p53 عامل تنظیم‌کننده‌ی رونویسی است که بیان برخی محصولات ژنی را کنترل می‌کند که بر چرخه‌ی سلولی، همانندسازی DNA و ترمیم DNA اثر می‌گذارد. برخی از عملکردهای p53 که به تازگی شناسایی شده‌اند: تحریک بیان ژن‌های کدکننده‌ی p21 است. فقدان عملکرد p53 می‌تواند مخرب باشد. حدود ۵۰٪ سرطان‌های

[1] non-homologous end joining
[2] homologous recombination

انسانی دارای ژن جهش‌یافته‌ی p53 هستند. پروتئین p21 نیز خود به نوعی آنزیم کیناز (آنزیم کیناز به عنوان کلید کنترلی برای انجام بسیاری از فعالیت‌های سلولی از زمان رشد تا هنگام مرگ عمل می‌کند. این آنزیم گروه فسفات را از مولکول‌هایی مانند ATP (آدنوزین تری فسفات) به سوبستراهای خود منتقل می‌کند.) در مسیر تقسیم سلولی متصل شده و آن را غیرفعال می‌کند که منجر به گیرافتادن سلول در چرخه‌ی سلولی عدم ورود به مرحله سنتز و همانندسازی DNA (S phase) می‌شود. p21 همچنین منجر به غیرفعال‌سازی چنگال‌های همانندسازی می‌شود.

پس از توضیح مبحث جهش، مجدد به اختلالات تک ژنی بپردازیم. اختلالات تک ژنی، دسته دوم از اختلالات ژنتیکی هستند. وراثت این نوع از اختلالات از الگوی تفکیک مندلی (برای توضیحات بیشتر به "کتاب مقدمه زیست فناوری" مراجعه شود) تبعیت می‌کند. این اختلالات در عین نادر بودن میلیون‌ها نفر را در جهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. در حال حاضر پیش‌بینی می‌شود که بیش از ده هزار بیماری انسانی از نوع تک‌ژنی است که در سایت OMIM[1] (وراثت مندلی آنلاین در انسان) دسته بندی شدند. این بیماری‌ها از هر ۱۰۰ تولد در یک نفر ایجاد می‌شود، بنابراین می‌تواند مرگ‌ومیر قابل توجهی را ایجاد کند. بیماری‌های ژنتیکی تک ژنی در اثر یک تغییر نوکلئوتیدی در یک ژن در DNA انسان ایجاد می‌شوند. طبیعت بیماری به عملکردهایی که ژن تغییریافته داشته، بستگی دارد. بیماری‌های تک‌ژنی را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم کرد: نقص ژن روی کروموزوم های اتوزومی قرار دارد و می تواند دو صورت غالب و مغلوب باشد، نقص ژن روی کروموزوم های جنسی X و Y قرار دارد: وابسته به X (غالب و مغلوب) و وابسته به Y.

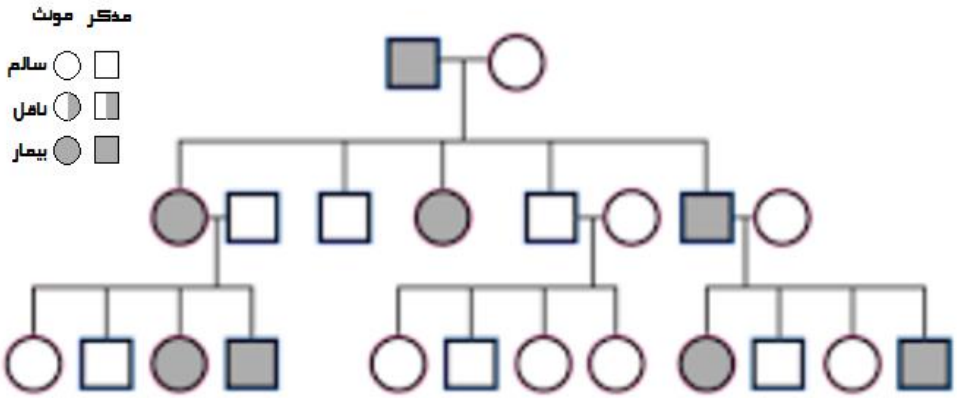
همانطور که پیش از این اشاره شد کروموزوم‌های همولوگ، درواقع دو کروموزوم هستند که کاملا از لحاظ اندازه، شکل و محتوای ژنتیکی مشابه هستند. روی دو کروموزوم همولوگ نواحی مشخصی بنام لوکوس یا جایگاه ژن وجود دارد.

[1] Online Mendelian Inheritance in Man

بنابراین برای هر ژن دو کپی (آلل) وجود دارد که هر یک ازین آلل ها روی یکی از کروموزوم های همولوگ قرار دارد. چون یکی از این کروموزوم ها از پدر و دیگری از مادر به ارث می رسد، درنتیجه یک فرد می تواند دارای نسخه‌های متفاوتی از یک ژن (آلل) باشد. اختلالات تک‌ژنی غالب شامل جهش در یک آلل از ژن مسئول بیماری هستند.

-الگوی وراثت اتوزوم غالب:

در وراثت اتوزوم غالب، فردی که بیمار است حداقل یکی از والدینش نیز مبتلا هستند و افراد مبتلا ۵۰٪ احتمال انتقال این اختلال را به فرزندان خود دارند (شکل-۴۲). در ادامه به توضیح برخی از بیماری ها که وراثت اتوزوم غالب دارند، پرداخته خواهد شد.



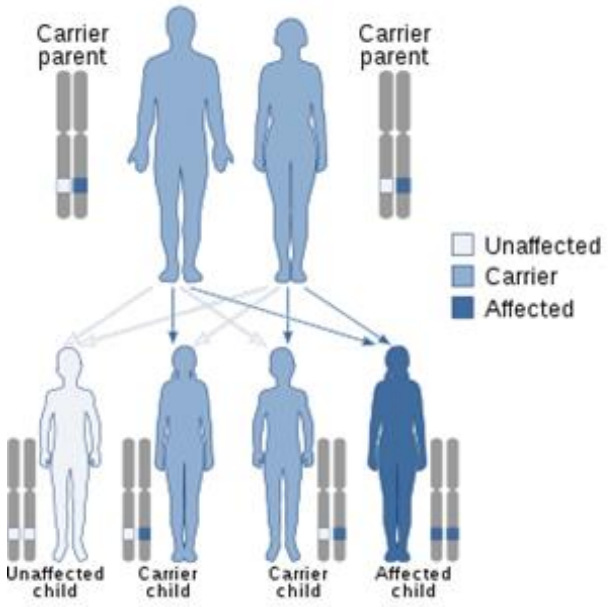
شکل-۴۲ نحوه توارث در بیماری اتوزومال غالب. فرد ناقل در شجره نامه وجود ندارد.

- پورفیریای واریگیت[1]: پورفیریا گروهی از اختلالات خونی نادر ارثی است. افراد مبتلا به این اختلالات در ساختن ماده ای به نام هِم[2] در بدن خود مشکل دارند. هِم یک کوفاکتور شامل یک اتم آهن در مرکز یک حلقه بزرگ ارگانیک بنام پورفیرین است. هموگلوبین شناخته شده ترین پروتئین دارای گروه هِم در بدن است. بیماران پورفیریای واریگیت نقص در ژن PPOX دارند. این ژن آنزیم پروتوپورفیرینوژن اکسیداز را کد می کند. این آنزیم به غشای میتوکندری متصل بوده و نقش اساسی در فرایند بیوشیمیایی تولید هِم دارد. بنابراین همراه با تجمع پورفیرین در بافت ها و خون است و افراد مبتلا به این بیماری علائم پوستی (حساسیت به نور و احتمال تاول زدن پوست در آنها زیاد است) و علائم عصبی دارند. ادرار این افراد به دلیل وجود پورفیرین، شرابی رنگ می شود.
- هانتینگتون: در این بیماری، در توالی ژن هانتینگتون (که پروتئین هانتینگتون را کد می کند) توالی سه نوکلئوتیدی CAG به صورت تکرارهای سه تایی افزایش می یابد. این ژن پروتئین های غیر طبیعی تولید می کند که دارای توالی پلی گلوتامین است. این توالی باعث اتصال پروتئین‌های هانتینگتون و پروتئین‌های دیگر به یکدیگر می‌شود که منجربه تجمع اجسامی رشته مانند در سلول‌های عصبی مغز می‌شود. هنوز به طور کامل مکانیسم این پروتئین ها شناسایی نشده اما اطلاعات تاکنون نشان می دهد که این پروتئین ها در مغز تجمع پیدا می کنند و سبب تخریب و آسیب آن می شوند.

[1] variegate porphyria (VP)
[2] heme

-الگوی وراثت اتوزوم مغلوب

اختلالات تک‌ژنی مغلوب در اثر جهش در هردو آلل ژن مسئول بیماری ایجاد می‌شوند. در وراثت اتوزوم مغلوب، فرزندان مبتلا، معمولاً از والدینی متولد می‌شوند که مبتلا نیستند. والدین کودکان مبتلا علائم بیماری را ندارند اما یک نسخه از ژن جهش‌یافته را حمل می‌کنند و در واقع ناقل هستند. شیوع اختلالات اتوزوم مغلوب در خانواده‌هایی که در آن، والدین خویشاوند هستند افزایش یافته است. کودکان والدینی که هردو از نظر ژن جهش‌یافته هتروزیگوس (دارای یک آلل طبیعی و یک آلل جهش یافته) هستند، به احتمال ۲۵٪ اختلال را به ارث می‌برند و این اختلال هر دو جنس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل-۴۳).



شکل-۴۳ نحوه توارث در بیماری اتوزومال مغلوب. فرد ناقل در شجره نامه وجود دارد و از پدر و مادر ناقل فرزندان به احتمال ۲۵٪ سالم، ۵۰٪ ناقل و ۲۵٪ بیمار خواهند بود

بیماری های زیر مثال‌هایی از اختلالات اتوزوم مغلوب هستند:

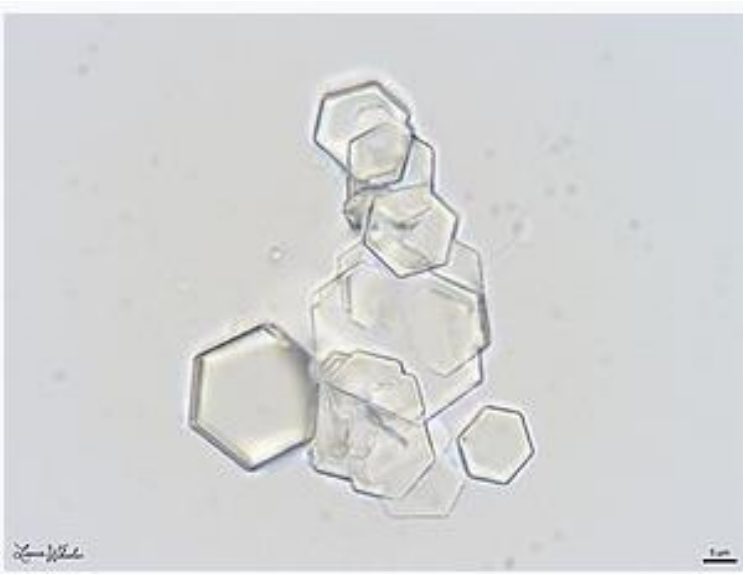
- آلبینیسم[1] (زالی): به دلیل نقص در آنزیم تیروزیناز به وجود می آید، این آنزیم دارای فلز مس می باشد و قادر است تیروزین را به ملانین تبدیل کند. بنابراین این افراد مشکل تولید رنگدانه دارند (شکل-۴۴).

شکل-۴۴ کودکی مبتلا به آلبینیسم

- آلکاپتونوریا[2]: بیماری نادری است که به آن ادرار سیاه نیز گفته می شود. نوعی اختلال بدن در فرایند تجزیه‌ی اسیدآمینه‌های فنیل آلانین و تیروزین است. در این مسیر اسید هموجنتیسیک (آلکاپتون) باید به اسید مالیل استواستیک تبدیل شود. ولی ژن آنزیم تجزیه کننده آن (هموجنتیسیک اسید اکسیداز) بر روی کروموزوم شماره ۳ دچار نقص شده است. بنابراین اسید هموجنتیسیک در بدن تجمع پیدا می کند و از راه ادرار دفع می شود. ادرار این افراد در اثر ماندن و تماس با اکسیژن هوا تیره می شود.

- سیستینوریا[3]: این بیماری در اثر تجمع اسید آمینه سیستئین در نواحی مختلف بدن به خصوص در ادرار ایجاد می شود؛ کریستال های سیستئین برای سلول های کلیوی مزاحمت ایجاد کرده و در نتیجه بیمار دچار اختلالات کلیوی می شود (شکل-۴۵).

[1] Albinism
[2] Alkaptonuria
[3] Cystinuria



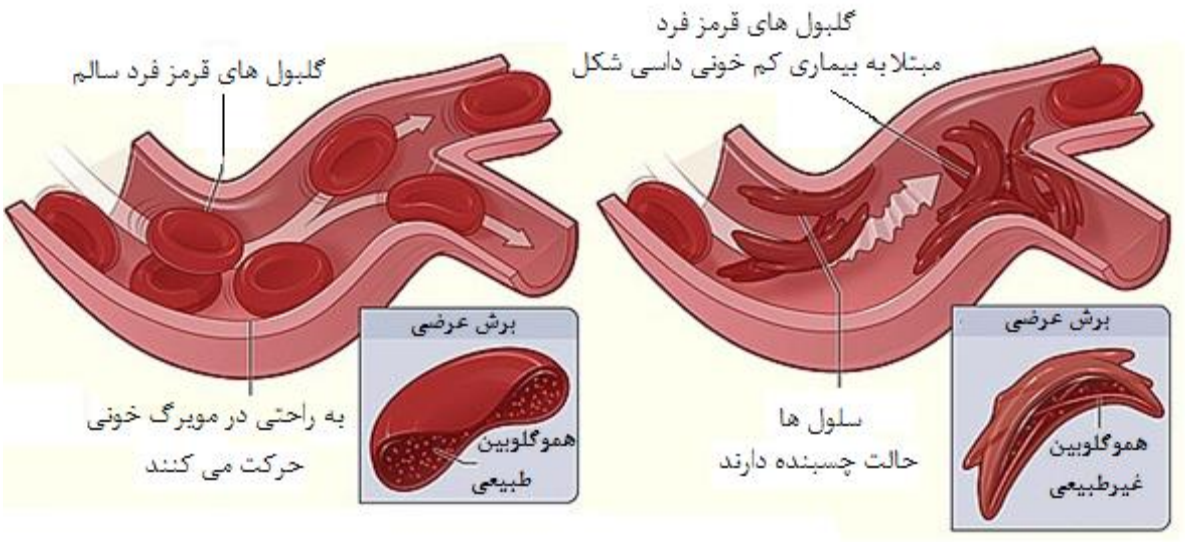
شکل-۴۵ کریستال های سیستئین موجود در ادرار افراد مبتلا به سیستینوریا

- سیستیک فیبروزیس[1]: این بیماری بیشتر ریه را تحت تأثیر قرار می دهد و در اثر جهش بر روی ژن CFTR (ژن تنظیم کننده انتقال تراغشایی[2] که روی کروموزوم ۷ قرار دارد) رخ می دهد. این ژن کد کننده پروتئینی است که مسئول ساخت کانالی برای انتقال یون های کلر از خلالِ غشاءِ سلول‌های بافت پوششی است. جریان یون های کلر به کنترل حرکت آب در بافت ها کمک می کند که برای تولید موکوز نازک و روان بافت ها ضروری است. با جهش در ژن CFTR، مجرای یونیِ کلریدی دچار ناکارآمدی شده و جریان مایع در سلول‌های بافت پوششی ریه، لوزالمعده و سایر اندام ها مختل می شود. به طوری که موکوز و ترشحات اندام ها غلیظ و چسبنده می‌شود. همچنین میزان نمک موجود در ترشحات غدد عرق نیز افزایش می‌یابد. عملکرد طبیعی ضد میکروبی

[1] Cystic fibrosis
[2] Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

راه های هوایی مهار شده و این ترشحات و باکتری‌های جای گرفته در آن‌ها نوعی واکنش التهابی را آغاز و منجر به عفونت، تخریب بافتی، نارسایی تنفسی و سرفه های مکرر می‌شود.

- کم خونی داسی شکل: در این بیماری هموگلوبین (پروتئین حامل اکسیژن) معیوب تولید می شود. در این بیماری ژن تولید کننده هموگلوبین که بر روی کروموزوم شماره ۱۱ است، دچار جهش می شود و درنتیجه هموگلوبین طبیعی ایجاد نمی شود و شکل آن داسی شکل می شود. تشخیص این بیماری با غربالگری و آزمایش خون بر روی نوزاد انجام می شود (شکل-۴۶).



شکل-۴۶ برش عرضی از گلبول های قرمز فرد سالم و فردی که مبتلا به بیماری کم خونی داسی شکل است

- فنیل کتونوریا: فنیل آلانین توسط آنزیمی به نام فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) تبدیل به تیروزین می شود. ژن این آنزیم روی کروموزوم شماره ۱۲ قرار دارد که جهش در آن منجر به این بیماری می شود. در این بیماری

تجمع فنیل آلانین در بافت های مختلف به خصوص مغز رخ می دهد که به مرور زمان دچار عقب ماندگی ذهنی می شوند. در کشورهای پیشرفته در بدو تولد با چند قطره خون که از پاشنه پای کودک گرفته می‌شود، می‌توانند در حدود ۳۰ بیماری ژنتیکی از جمله فنیل کتونوریا را تشخیص دهند که اکثر این بیماری‌ها قابل درمان هستند.

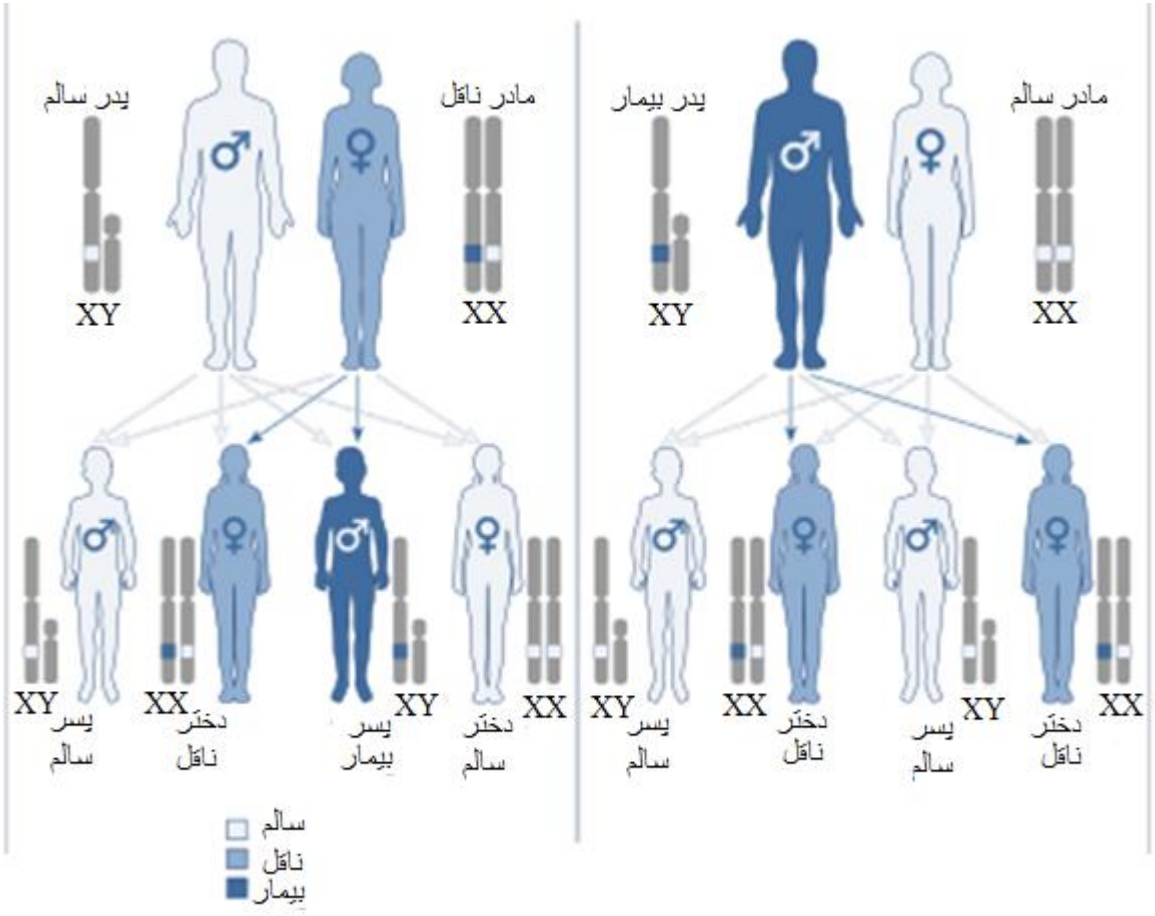
- تالاسمی: در بیماری تالاسمی نقص در تولید هموگلوبین وجود دارد. از آنجایی که هموگلوبین شامل دو پروتئین مختلف به نام آلفا و بتا می باشد بنابراین تالاسمی نیز دو نوع آلفا و بتا دارد. نوع بتا خود شامل تالاسمی ماژور (تالاسمی شدید) و تالاسمی مینور یا تالاسمی خفیف می‌باشد. در افراد مبتلا به تالاسمی، تعداد هموگلوبین ها و گلبول های قرمز نسبت به حالت عادی کم می شود و در نتیجه آن حمل اکسیژن در آنها کم می شود و فرد به مرور زمان دچار خستگی می شود و کم خونی دارد.

الگوی وراثت وابسته به X

اختلالات تک‌ژنی وابسته به X وابسته به جهش‌هایی است که در ژن‌های موجود روی کروموزوم X ایجاد می‌شود. آلل‌های وابسته به X همچنین ممکن است غالب یا مغلوب باشند. این آلل‌ها در مرد و زن بیان می‌شوند و در مردان چون فقط یک نسخه از کروموزوم X (XY) را دارند بیشتر رخ می‌دهد. درحالی که زنان دو نسخه از این کروموزوم (XX) را دارند. در ادامه برخی از بیماری های مرتبط با الگوی وراثت وابسته بهX معرفی می شوند:

- هموفیلی: توان بدن برای ایجاد لخته و انعقاد خون (به جهت جلوگیری از خونریزی در صورت پاره شدن رگ) مختل شده‌است. حالت های مختلفی دارد؛ هموفیلی A,B,C. نوع A و B به ترتیب در اثر جهش در ژن F8C و F9 که هر دو روی کروموزوم X قرار دارند رخ می دهد. هر دوی این بیماری ها، اختلال وابسته به X مغلوب

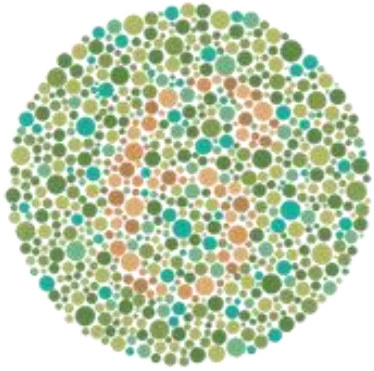
هستند (شکل-۴۷). در نوع A، فاکتور ۸ (VIII) و در هموفیلی B، فاکتور انعقادی ۹ دچار اختلال شده است. فرد دارای هموفیلی C در فاکتور ۱۱ دچار اختلال است از آنجا که ژن آن روی کروموزوم اتوزومی است بنابراین هموفیلی C نوعی اختلال اتوزومال است.



شکل-۴۷ نحوه توارث اختلال وابسته به X مغلوب. در این شجره نامه فقط زنان ناقل وجود دارد

- کوررنگی: بیماری وابسته به X مغلوب و شایعی است که در آن سلول‌های مخروطی در شبکیه که مسئول درک رنگ هستند دچار اختلال می شوند و به همین دلیل بیمار یک یا برخی رنگ ها را درست تشخیص نمی‌دهد. اولین بار جان دالتون، شیمی دان، که خود مبتلا به کوررنگی بود، این بیماری را مطرح نمود و اولین مقاله درباره

کوررنگی را چاپ کرد. در بعضی منابع از کوررنگی تحت عنوان بیماری دالتونیسم یاد می کنند. این افراد نمی توانند بین رنگ ها ارتباط درستی برقرار کنند. یک استاد دانشگاه توکیو به نام شینوبو ایشیهارا، آزمون ادراک رنگ برای تشخیص کوررنگی سرخ-سبز را در سال ۱۹۱۷ مطرح نمود. دایره ای که در شکل-۴۸ مشاهده می کنید آزمون ایشیهارا[1] برای تشخیص کوررنگی است. فرد کوررنگ قادر به تشخیص عدد ۶ نمی باشد.

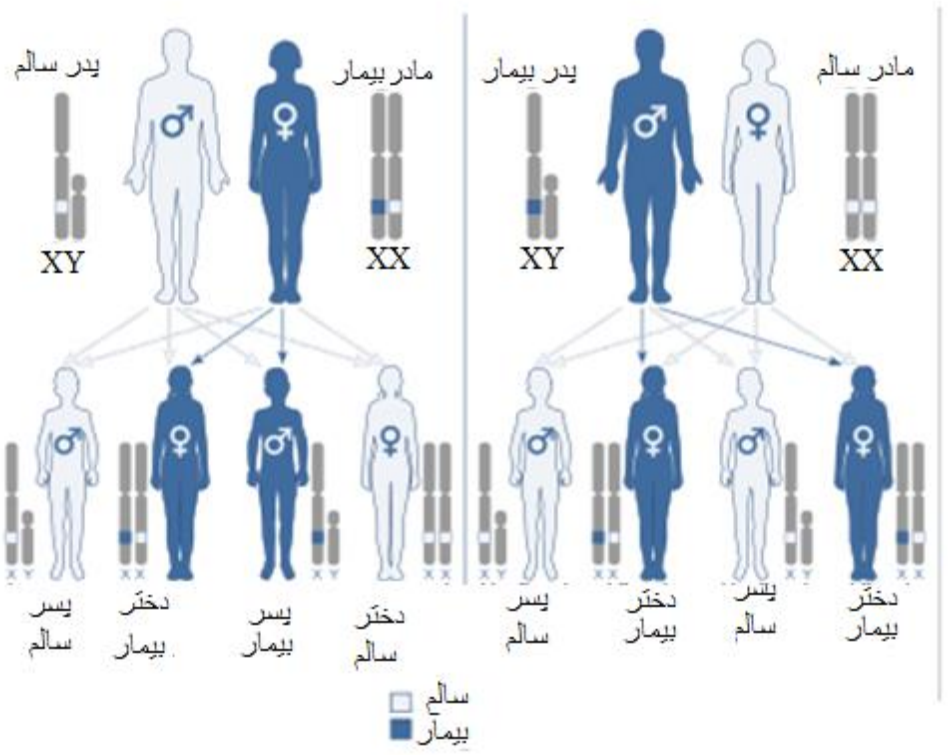


شکل-۴۸ آزمون ایشیهارا. فرد کوررنگ قادر به تشخیص عدد شش نخواهد بود

- سندرم x شکننده[2]: اختلال وابسته به X غالب است (شکل-۴۹) و می تواند سبب عقب ماندگی ذهنی متوسط تا شدید باشد. عقب ماندگی به این دلیل ایجاد می شود که در ژن FMR1 توالی های سه نوکلئوتیدی CGG (جزایر CpG[3] : نواحی از DNA که دارای فراوانی بازهای سیستئین و گوانین هستند) افزایش می یابد. این جهش منجر به تولید ناکافی پروتئین FMRP حاصله می شود. در حالت طبیعی این پروتئین باعث توسعه در ارتباط بین نورون ها می شود. بنابراین از عوارض این بیماری می توان به تأخیر گفتار و دیر صحبت کردن، دیر عکس العمل نشان دادن، توجه کم و کوتاه، جامعه پذیری ضعیف، ضعف مزاج، ضعف هماهنگی حرکتی و

[1] Ishihara test
[2] Fragile X syndrome
[3] CpG islands

همچنین اختلال خلقی، دو قطبی بودن و اسکیزوفرنی اشاره کرد و در حالتی که بیماری خیلی شدید باشد این افراد اوتیسم را نشان می دهند. فراوانی برخی بیماری های تک ژنی در جمعیت، در شکل-۵۰ آورده شده است.



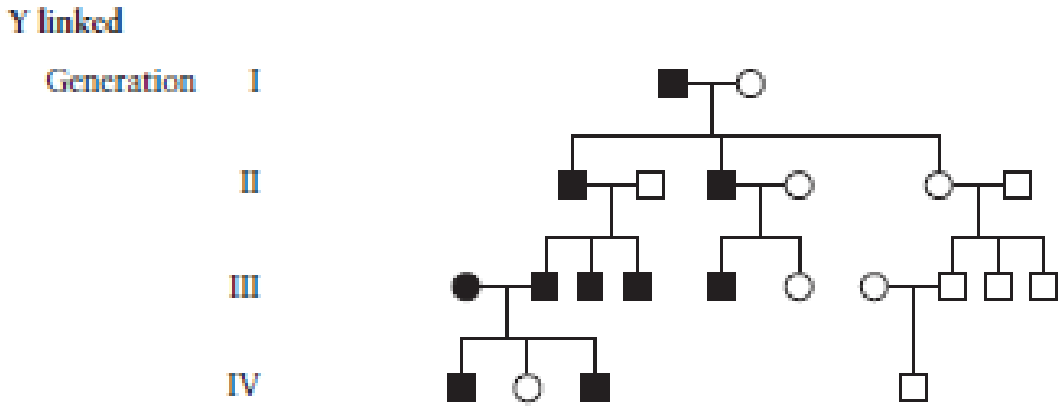
شکل-۴۹ نحوه توارث اختلال وابسته به X غالب. فرد ناقل در این شجره نامه وجود ندارد

بیماری	احتمال وقوع در جمعیت
اتوزومی غالب	
Familial hypercholesterolemia	1 in 500
Polycystic kidney disease	1 in 1,250
Neurofibromatosis type I	1 in 2,500
Hereditary spherocytosis	1 in 5,000
Marfan syndrome	1 in 4,000
Huntington disease	1 in 15,000
اتوزومی مغلوب	
Sickle-cell anemia	1 in 625
Cystic fibrosis	1 in 2,000
Lysosomal acid lipase deficiency	1 in 40,000
Tay–Sachs disease	1 in 3,000
Phenylketonuria	1 in 12,000
Mucopolysaccharidoses	1 in 25,000
Glycogen storage diseases	1 in 50,000
Galactosemia	1 in 57,000
وابسته به X	
Duchenne muscular dystrophy	1 in 7,000
Hemophilia	1 in 10,000

شکل-۵۰ فراوانی بیماری های تک ژنی در جمعیت

الگوی وراثت وابسته به Y

وراثت وابسته به Y نیز فقط مردان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مردان مبتلا همواره پدرشان هم مبتلا بوده است و همه‌ی پسران این پدر بیمار نیز بیماری را خواهند داشت. برای مثال اختلالات ناباروری که مربوط به ژن هایی است که فقط روی کروموزوم Y قرار دارند که نقص در این ژن ها منجر به اختلال می شود. مانند ژن های TSPY (پروتئین اختصاصی بیضه)، AZF1 (فاکتور آزواسپرمی ۱)، AZF2 (فاکتور آزواسپرمی ۲) و غیره.



شکل-۵۱ نحوه توارث در بیماری وابسته به Y. فرد ناقل در شجره نامه وجود ندارد و همواره از پدر به پسر انتقال یافته است.

۱-۳) اختلالات چندژنی و چند عاملی

اگر علت وقوع اختلالات ژنتیکی مرتبط با اثرات چند ژن باشد، چندژنی یا چند عاملی خواهند بود. این نوع از اختلالات همچنین ممکن است اگر تحت تأثیرشیوه‌های زندگی و عوامل محیطی مختلف قرار بگیرند، چندعاملی باشند. در بیشتر اختلالات چندژنی، زمانی که پیشینه‌ی ژنتیکی فرد برای ابتلای فرد کافی نباشد، این عوامل ممکن است فرد را مستعد ابتلا به این اختلال کنند. سرطان، بیماری قلبی و دیابت مثال‌هایی از اختلالت چندعاملی هستند. با این که این نوع اختلالات اغلب در خانواده‌های ژنی مرتبط با هم رخ می‌دهند، از الگوی وراثت مندلی معمول تبعیت ندارند. در واقع الگوی ساده‌ای برای وراثت بیماری چندژنی در یک خانواده وجود ندارد. به علاوه چون بسیاری از عوامل ایجادکننده‌ی این اختلالات هنوز مشخص نشده‌اند، تشخیص خطر انتقال این اختلالات و به ارث رسیدن آن‌ها دشوار است. برخی از این بیماری‌ها (به عنوان مثال سکته‌ی قلبی، نقص‌های شناختی مادرزادی، سرطان، دیابت، بیماری‌های روحی و بیماری آلزایمر) هم باعث عوارض و هم مرگ زودرس می‌شوند. دسته بندی این بیماری‌ها در خانواده‌های ژنی ممکن است از شباهت‌های موجود در توالی ژنوم، ساختار چیدمان و معماری ژنوم و نیز محرک‌های محیطی (که برهمکنش‌های بین

ژن-ژن و برهمکنش‌های بین ژن-محیط را ارتقا می‌بخشند) نشأت بگیرد. خطر عودکردن بیماری چندژنی در فامیل و بستگان زمانی که بیش از یک عضو از خانواده دچار بیماری شده باشند، بیشتر است. هرچه ناهنجاری مرتبط با بیماری چندژنی شدیدتر باشد، خطر عود کردن بیماری نیز بیشتر است.

استعداد ژنتیکی یا حساسیت ژنتیکی شرایطی است که ممکن است فرد با بیماری به دنیا نیاید، اما خطر ابتلا به بیماری در وی بالاست. در مورد سرطان، نیز ممکن است افراد با ژن‌هایی متولد شوند که خود به خود سبب سرطان نشوند، اما در صورت تغییر با عادت‌های شیوه‌ی زندگی یا قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی، ممکن است منجر به سرطان شوند. حساسیت به سرطان همچنین ممکن است شامل ژن‌هایی باشد که تشکیل تومورها را سرکوب می‌کنند. اگر ژن‌های سرکوبگر/مهارکننده‌ی تومور عملکرد خود را از دست بدهند، باعث پیشروی سرطان می‌شوند. بیماری قلبی عروقی به طور کلی در جوامع مختلف اشکال منحصر به فردی دارد (به عنوان مثال سکته در جوامع آفریقایی و حملات قلبی در آسیای جنوبی). درک بیشتر از استعداد ژنتیکی به بیماری، دانستن شیوه‌ی زندگی که شرایط بروز بیماری را تشدید می‌کند یا پتانسیل ایجاد بیماری را کاهش می‌دهد، برای عموم مردم لازم است تا انتخاب‌های آگاهانه انجام دهند. چند مثال برای این نوع اختلالات در ادامه آورده شده است.

سرطان سینه

اختلال

به طور معمول سرطان نتیجه‌ی تجمع متوالی جهش در ژن‌هایی است که تقسیم سلولی و ترمیم سلولی را تنظیم می‌کنند. این فرآیند چند مرحله‌ای یک گذر ناگهانی از حالت طبیعی به بدخیم نیست و ممکن است ۲۰ سال یا بیشتر

به طول انجامد. جهش در ژن‌های حساس از جمله ژن‌های سرکوبگر، ژن‌های عامل ایجاد سرطان (اونکوژن‌ها[1]) و ژن‌های دخیل در ترمیم DNA منجر به ناپایداری ژنتیکی و فقدان تدریجی تمایز می‌شوند. تومورها به دو دلیل بزرگ می‌شوند:

الف) سلول‌های سرطانی توانایی ایجاد تعادل در تقسیم سلولی را با استفاده از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز[2]) ندارند.

ب) سیستم عروق خونی مختص به خود را شکل می‌دهند (آنژیوژنز[3]).

سلول‌های تغییریافته توانایی خود را در اتصال سلولی از دست می‌دهند، رشد غیرقابل کنترل دارند که بافت‌های مجاور را مورد تهاجم قرار می‌دهد و درنهایت از طریق جریان خون یا سیستم لنفی به اندام‌های دور منتشر می‌شوند (متاستاز[4]).

این بدخیمی یکی از رایج‌ترین سرطان‌های ارثی است که طبق شواهد:

الف) ۲۰ تا ۳۰٪ از کل بیماران مبتلا به سرطان سینه سابقه‌ی خانوادگی این بیماری را داشته‌اند.

ب) مطالعه بر روی دوقلوها نشان داده است که ۲۵٪ از موارد سرطان سینه قابل توارث است.

شیوع

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. بر اساس نتایج آخرین برآوردهای حاصل از «ثبت سرطان در جهان» آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان در سال ۲۰۲۰، میزان مرگ بر اثر سرطان بیش از ۱۰ میلیون نفر در جهان است. سرطان‌های ریه، معده، کبد، روده و سینه بیشترین آمار مرگ ناشی از سرطان را سالانه به خود اختصاص داده‌اند. این نوع سرطان‌ها درمجموع سالانه ۴/۲ میلیون مرگ و میر را ایجاد می‌کنند. پیش‌بینی می‌شود که مرگ و میر

[1] oncogenes
[2] apoptosis
[3] angiogenesis
[4] metastasis

ناشی از سرطان به افزایش خود ادامه می‌دهد و در سال ۲۰۳۰ به ۱۳/۱ میلیون مرگ و میر می‌رسد. شواهد کنونی پیش بینی می‌کند که از هر ۸ خانم ۱ نفر در طول عمر خود دچار سرطان سینه می‌شود. در سال ۲۰۱۲ پیش‌بینی شده بود که حدودا ۲۲۷ هزار مورد جدید و ۳۹۵۱۰ مرگ ومیر ناشی از سرطان سینه در زنان در ایالات متحده رخ خواهد داد. سرطان سینه دومین بدخیمی رایج بین زنان و دومین عامل مرگ و میر از میان مرگ‌های ناشی ازسرطان است.

تشخیص و پیشگیری

نقش ژن‌ها در ایجاد این بیماری کاملاً متفاوت است؛ ممکن است ژن‌ها تعیین کننده‌ی نهایی بیماری باشند یا این که با سایر ژن‌ها و عوامل محیطی در ایجاد سرطان (ژن‌های مستعد) رابطه‌ی متقابل داشته باشند. علاوه بر عوامل ژنتیکی و ارثی، شیوه‌ی زندگی نیز به عنوان مثال سیگارکشیدن، رژیم غذایی و عادت‌های ورزشی، عوامل سرطان‌زای محیطی و عوامل عفونی از عوامل اولیه‌ی تعیین‌کننده‌ی بسیاری از سرطان‌ها است.

بیماری آلزایمر

اختلال

بیماری آلزایمر نوعی اختلال تحلیل برنده‌ی عصبی ویرانگر است که بی وقفه پیشرفت می‌کند. محرک ایجاد این بیماری تجمع پپتید آمیلوئید بتا (Aβ) به دلیل تولید بیش از حد Aβ و ناتوانی مکانیسم‌های حذف این پپتید است. Aβ در قالب اولیگومرهایی (اولیگومر: مولکولی است که از چند واحد تکرار مشابه یا یکسان کوچکتر بنام مونومر تشکیل شده است و تعداد واحدهای آن در یک زنجیر نسبت به پلیمر کمتر است) با اندازه‌ها و در اشکال متفاوت به صورت خود به خودی تجمع می‌یابد و درپارانشیم و رگ‌های خونی منتشر شده و پلاک‌های عصبی ایجاد می‌کند. اولیگومرها و پلاک‌های Aβ

پتانسیل آغاز سمیت Aβ را با انسداد عملکرد پروتئازوم (کمپلکسی که باعث حذف پروتئین های غیر ضروری و یا آسیب دیده می شود)، جلوگیری از فعالیت میتوکندریایی، تغییر سطوح Ca^{2+} درون‌سلولی و تحریک فرایندهای التهابی دارند. فقدان عملکرد طبیعی Aβ همچنین در اختلال عملکرد عصبی نقش دارد. Aβ با مسیرهای پیام رسان تنظیم‌کننده‌ی فسفریلاسیون پروتئین تائو[1] وابسته به میکروتوبول، ارتباط متقابل دارد. در حالت عادی تائو به حفظ سلامت نورون‌های طبیعی کمک می‌کند. فسفریلاسیون بیش از حد تائو، عملکرد طبیعی آن را در تنظیم انتقالات آکسونی مختل می‌کند و منجر به تجمع گره‌های عصبی الیافی یا نوروفیبریلار [2] و گونه‌های سمی تائو محلول می‌شود. فعالیت‌های Aβ از تخریب تائوی که بیش از حد فسفریله شده توسط پروتئازوم‌ها جلوگیری می‌کند. بنابراین، این دو پروتئین و مسیرهای پیام رسان مرتبط با آن‌ها اهداف درمانی مهمی برای بیماری آلزایمر هستند.

شیوع

بیماری آلزایمر علت عمده‌ی زوال عقل در آمریکای شمالی و اروپا است؛ شیوع بیماری آلزایمر با افزایش سن بالا می‌رود؛ حدود۱۰٪ افراد بالای ۷۰ سال به طور قابل توجهی حافظه خود را از دست داده‌اند و بیش از نیمی از این افراد دچار بیماری آلزایمر هستند. تخمین زده شده است که ۲۵ تا ۴۵درصد افراد بالای ۸۵ سال، دچار زوال عقل هستند.

[1] microtubule-associated protein tau
[2] neurofibrillary tangles

تشخیص و پیشگیری

تشخیص مناسب آلزایمر متکی به ارزیابی‌های عصب‌شناسی بالینی است. تصور می‌شود که تشکیل پلاک‌های Aβ و گره‌های عصبی الیافی در تخریب نورون‌ها در مغز و علائم متعاقب آن یعنی بیماری آلزایمر دخالت دارد. شاخصه‌ی بیماری آلزایمر تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی بین نورون‌ها در مغز است.

دیابت نوع یک

اختلال

دیابت بیماری‌ای است که انسولین در بدن تولید نمی‌شود یا به قدر کافی تولید نمی‌شود. انسولین هورمونی است که برای تبدیل قند، نشاسته و سایر غذاها به انرژی مورد نیاز برای زندگی روزانه مورد نیاز است. با وجود این که ژنتیک و عوامل محیطی مانند چاقی و ورزش نکردن در ایجاد دیابت نقش دارند، اما علت اصلی آن همچنان رازآلود است. ۳ گروه عمده‌ی دیابت وجود دارد: دیابت نوع یک (بیماری خودایمنی چندژنی)، دیابت نوع دو و دیابت بارداری.

دیابت نوع یک، نوعی بیماری خودایمنی است که از نظر بالینی با هایپرگلیسمیا (قند خون بالا) نمود می‌یابد ،که نتیجه‌ی تخریب پیشرونده‌ی سلول‌های بتای (β) جزایر پانکراس به واسطه‌ی سیستم ایمنی و عملکرد نادرست متابولیکی مرتبط با آن است. درنتیجه به خاطر فقدان انسولین، فرد در طول عمر نیاز به انسولین خارجی دارد تا زنده بماند و پیچیدگی‌های طولانی مدت ممکن است ناتوانی‌های قابل توجهی ایجاد کند و عمر فرد را کوتاه کند. حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد توده‌ی سلولی β زمانی که دیابت نوع یک برای اولین بار بروز می‌کند، تخریب شده است که نشان می‌دهد پیش‌بینی و پیشگیری،

اولویت‌های مهمی هستند. این نوع دیابت حدود ۱ نفر از هر ۳۰۰ نفر را در آمریکای شمالی تحت تأثیر قرار می‌دهد. تخمین زده می‌شود که بیش از ۲۰ میلیون نفر در جهان (بیشتر کودکان و نوجوانان) دیابت نوع یک دارند.

ژنتیک

علت شناسی و بیماری زایی یا پاتوژنز دیابت نوع یک با استعداد ژنتیکی مرتبط است. در خانواده‌ای که یک کودک مبتلا به دیابت نوع یک حضور دارد، خواهر و برادر این کودک نسبت به بچه‌های خانواده‌ای که بیماری را ندارند، ۱۵ برابر ریسک ابتلای بیشتری دارند.

در دوقلوهای منوزیگوت یا همسان اگر یکی از دوقلوها دیابت نوع یک داشته باشد، به احتمال ۴۰ تا ۵۰٪ قل دیگر دیابت نوع یک می‌گیرد. در دوقلوهای دی زیگوت یا غیر همسان اگر یکی از آن‌ها مبتلا به دیابت نوع یک باشد، احتمال ابتلای قل دیگر تنها در حدود ۵ تا ۶٪ می باشد. این احتمال پایین برای مستعد بودن به ابتلا به دیابت نوع یک، شبیه به احتمال ابتلا به دیابت نوع یک در دو کودک غریبه (غیر فامیل) در جمعیت عمومی است. این یافته‌ها با افزایش جهانی ابتلا به دیابت نوع یک طی ۲۰ تا ۳۰ سال گذشته سازگار است و از این ایده که عوامل محیطی نیز در کنترل استعداد ابتلا به دیابت نوع یک مهم هستند، پشتیبانی می‌کند.

۱-۴) اختلالات میتوکندریایی

دسته چهارم از اختلالات ژنتیکی، اختلالات مینوکندریایی است. برای عملکرد طبیعی سلول‌ها، آن‌ها باید انرژی (به شکل ATP) تولید کنند. در انواع بسیاری از سلول‌ها، فعالیت میتوکندریایی منبع اصلی تولید ATP است. همچنین میتوکندری فرآیندهای سلولی دیگری مانند: تولید گرما در پاسخ به تغییرات دما و رژیم غذایی، هومئوستاز یونی (تنظیم حالت پایای

داخلی یون‌ها)، پاسخ‌های ایمنی درون‌زا، تولید گونه‌های اکسیژن فعال و مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی (آپوپتوز) را تنظیم می‌کند. میتوکندری اندامک کوچک گرد میله مانندی است که در تنفس سلولی نقش دارد و در سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی و جانوری یافت می‌شود. اگر عملکرد میتوکندری دچار اختلال شود، منجر به تولید انرژی ناکارآمد و اختلال در سایر عملکردهای سلولی می‌شود که ممکن است به بیماری‌های میتوکندریایی ختم شود.

درواقع این اختلال ژنتیکی، به‌دلیل جهش در DNA غیرهسته‌ای میتوکندریایی اتفاق می‌افتد. میتوکندری، DNA مختص به خود را با ۳۷ ژن، ۱۳ پروتئین میتوکندریایی، ۲ rRNA و ۲۲ tRNA دارد. سلول‌های تخمک (و نه اسپرم) میتوکندری را در حین لقاح حفظ می‌کنند و بنابراین، DNA میتوکندری تنها از مادر به ارث می‌رسد. دانش این که اختلال میتوکندریایی ممکن است در بیماری‌ها دخالت داشته باشد، تقریباً جدید است. اولین بار در اواخر سال ۱۹۶۰ در یک فرد بالغ و سپس در اواخر سال ۱۹۸۰ در کودکی شناسایی شد. اختلال در عملکرد میتوکندری می‌تواند در سلول‌های بسیاری از اندام‌ها و دستگاه‌های بدن رخ دهد؛ بیش از ۲۰۰ بیماری متابولیسمی ارثی می‌تواند میتوکندری را تحت تأثیر قرار داده و بیش از ۴۰ نوع از اختلالات میتوکندریایی گزارش شده است.

مغز، قلب، ماهیچه‌ها و ریه اندام‌هایی هستند که بیشترین نیاز را به انرژی دارند و زمانی که خالی از انرژی شوند، عملکردشان دچار اختلال می‌شود. بیشترین اثرات حاد ناشی از بیماری میتوکندریایی در مغز و ماهیچه‌ها نمایان می‌شود؛ زیرا آن‌ها قوی‌ترین مصرف‌کنندگان انرژی هستند. سایر اندام‌هایی که معمولاً تحت تأثیر قرار می‌گیرند شامل کبد، دستگاه عصبی، چشم‌ها، گوش‌ها و کلیه‌ها هستند. عملکرد نادرست میتوکندریایی در اختلالات میتوکندریایی تک‌ژنی مشاهده می‌شود و همچنین ممکن است مرتبط با ایجاد بیماری‌های چندژنی مانند بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون،

سرطان، بیماری قلبی، دیابت، بیماری صرع[1]، بیماری هانتینگتون و چاقی باشد. علاوه بر این، از آن‌جا که کاهش تدریجی بیان ژن‌های میتوکندریایی یکی از ویژگی‌های اصلی پیرشدن انسان‌ها است، این احتمال را افزایش می‌دهد که درک بیشتر از روند پیری ممکن است بینش بیشتری درباره‌ی یک یا چند بیماری چندژنی اشاره شده را فراهم کند.

علاوه بر بیماری های میتوکندریایی، عملکرد نامناسب میتوکندری در بعضی بیماری ها نقش دارد مانند بیماری پارکینسون. پس از بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون دومین بیماری شایع تحلیل‌برنده‌ی عصبی است. پارکینسون حدود ۱٪ از جمعیت افراد ۶۰ سال به بالا را تحت تأثیر قرار می‌دهد که با کاهش تدریجی توانایی شروع حرکات ارادی شناسایی می‌شود که عمدتاً ناشی از بین رفتن نورون‌های تولیدکننده‌ی انتقال‌دهنده‌های عصبیِ[2] دوپامین است. از میان عوامل متعددی که سبب شروع پیشروی بیماری پارکینسون می‌شوند، اختلالات میتوکندریایی به نظر می‌رسد عامل اصلی در علت‌شناسی[3] و بیماری‌زایی یا پاتوژنز[4] آن باشند. اختلال عملکردی میتوکندریایی در بیماران مبتلا به پارکینسون ممکن است ناشی از یک یا تعداد بیشتری از این موارد باشد: حذف DNA میتوکندریایی، تجمع جهش‌ها در DNA میتوکندریایی، افزایش استرس اکسیداتیو حاصل از گونه‌های اکسیژن فعال، عملکرد و بیان ناقص زنجیره‌ی تنفسی میتوکندریایی و مورفولوژی غیرطبیعی میتوکندری. از هر ۴۰۰۰ کودک در ایالات متحده، سالانه یک نفر درسن ۱۰ سالگی دچار این بیماری می‌شوند و از آن‌جایی که بیماری‌های میتوکندریایی به خوبی شناخته نشده‌اند، فراوانی دقیق‌تر ممکن است از هر ۲۰۰۰ کودک، یک کودک در سال باشد. به همین دلیل تعداد افراد بزرگسال مبتلا مشخص نیستند. در حال حاضر برای تمام بیماری‌های میتوکندریایی یک درمان ویژه وجود ندارد. علاوه بر آن، درمان برای هر بیمار،

[1] epilepsy
[2] neurotransmitter
[3] etiology
[4] pathogenesis

شخصی‌سازی شده و هدف آن کاهش علائم یا به تاخیر انداختن یا جلوگیری از پیشروی بیماری است. درمان‌های خاص مبتنی بر ویتامین و آنزیم همراه با کاردرمانی[1] و فیزیوتراپی[2] ممکن است به بعضی از بیماران در بهبود سطوح انرژی و خستگی کمک کند. با توجه به نقش مرکزی هومئوستاز نامتعادل میتوکندریایی در پاتولوژی بیماری پارکینسون، مولکول‌هایی که به ترمیم تعادل هومئوستاز میتوکندریایی کمک می‌کنند ممکن است اهداف مناسبی برای دارودرمانی در بیماری پارکینسون باشند.

۲) اختلالات بیوشیمیایی یا متابولیکی

در بعضی مقالات این دسته از اختلالات نیز در گروه بیماری های ژنتیکی دسته بندی شده است. بنا براین می توان آنها را به عنوان دومین گروه از عواملی که در بروز بیماری های ژنتیکی نقش دارند، در نظر گرفت. باید به این نکته اشاره کرد که خطاهای متابولیسم هم می تواند مادر زادی باشد و هم می تواند در اثر اختلال فعالیت اندام‌های عملگر رخ دهد. به همین منظور ناهنجاری های متابولیسم متولد شده دسته بزرگی از بیماری های ژنتیکی را شامل می شود که شامل اختلالات مادرزادی متابولیسم است. بیشتر این بیماری‌ها از نوع اختلال تک ژنی هستند که یک آنزیم در مسیرهای متابولیسمی را کد می کنند. درنتیجه منجر به اختلال در عملکرد طبیعی مسیر بیوشیمیایی می شوند. این حالت زیر مجموعه ای از اختلالات تک ژنی خواهد بود مانند بیماری آلکاپتونوریا و آنزیم هموجنتیسیک اسید اکسیداز که پیش تر اشاره شد. این بیماری ها غالبا با کمک غربالگری نوزادان[3] تشخیص داده می شوند. اما گاهی عوامل اکتسابی منجر به

[1] Occupational therapy
[2] physical therapy
[3] Newborn screening (NBS)

اختلال عملکرد اندام های عملگر مانند کبد شده اند. مانند مصرف درازمدت الکل، انباشت چربی در کبد، عفونت های ثانویه و... در اختلالات کبدی مانند بیماری های کبدی الکلی[1]، هپاتیت الکلی[2]، کبد چرب[3]، سیروز[4] میکروندولار، سیروز متعاقب نکروز، هپاتیت مزمن شدید کبدی. کبد اعمال حیاتی بسیاری انجام می دهد که این اعمال با واسطه آنزیم‌ها و در مسیرهای بیوشیمیایی رخ می دهد. اعمال متابولیسمی کبد عبارتنداز:

۱-ساخت و تخریب پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها،

۲- متابولیسم و تخریب داروها و هورمون‌ها،

۳- متابولیسم واسطه‌ای اسیدآمینه‌ها و کربوهیدرات‌ها،

۴- تنظیم متابولیسم چربی و کلسترول

۳) اختلالات ایمنی

دسته سوم از عوامل دخیل در بروز بیماری ها و ناهنجاری ها، اختلالات ایمنی هستند. اختلال ایمنی، اختلال عملکردی سیستم ایمنی است. این اختلالات را با توجه به نکات مختلفی می‌توان شناسایی کرد:

- با توجه به اینکه کدام جزء از سیستم ایمنی تحت تأثیر قرارگرفته است
- با توجه به اینکه عملکرد سیستم ایمنی کاهش یافته یا افزایش یافته است
- با توجه به اینکه وضعیت ایجاد شده مادرزادی بوده یا اکتسابی

[1] alcoholic liver diseases
[2] alcoholic hepatitis
[3] fatty liver
[4] cirrhosis

خود ایمنی،

۳-۱) بیماری‌های خودایمنی

بیماری خودایمنی وضعیتی است که از "پاسخ ایمنی غیرطبیعی" به "یک بخش عملکردی در بدن" ناشی می‌شود. به عبارت ساده تر می توان گفت، بیماری خودایمنی به دسته ای از بیماری ها اطلاق می شود که در آن سیستم ایمنی فرد به اشتباه به سلول های خود فرد حمله می کند. حداقل ۸۰ نوع بیماری خودایمنی وجود دارد. تقریباً هر بخشی از بدن می‌تواند درگیر شود. علائم رایج آن شامل تب پایین و احساس خستگی است. اغلب این علائم رفت و برگشتی هستند و علت آن به طور کلی مشخص نیست. بعضی از بیماری‌های خودایمنی مانند لوپوس، بین خانواده‌ها شایع می‌شود و ممکن است موارد خاصی به علت عفونت یا سایر عوامل محیطی ایجاد شود. برخی بیماری‌های رایج که به طور کلی بیماری خودایمنی شناخته می‌شوندعبارتند از: بیماری سلیاک[۱]، دیابت ملیتوس نوع یک[۲]، بیماری گریوز[۳]، بیماری التهابی روده[۴]، مالتیپل اسکلروزیس[۵]، پسوریازیس[۶]، آرتریت روماتوئید[۷] و لوپوس اریتماتوز سیستمیک[۸]. حدود ۲۴ میلیون نفر در ایالات متحده (۷٪) دچار بیماری خودایمنی هستند. بیماری‌های خودایمنی در زنان بیشتر از مردان شایع است و غالباً طی دوران بزرگسالی آغاز می‌شود. نخستین بیماری‌های خودایمنی در اوایل دهه‌ی ۱۹۰۰ توصیف شدند. تشخیص این بیماری‌ها می‌تواند سخت باشد.

[1] celiac disease
[2] diabetes mellitus type 1
[3] Graves' disease
[4] inflammatory bowel disease
[5] multiple sclerosis
[6] psoriasis
[7] rheumatoid arthritis
[8] systemic lupus erythematosus

علائم و نشانگان

بیماری‌های خودایمنی علائم مشابهی را در بیش از ۸۰ نوع مختلف نشان می‌دهند. شدت و بروز این علائم و نشانه‌ها به محل و نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده بستگی دارد. همچنین ممکن است یک فرد به طور همزمان بیش از یک بیماری خودایمنی داشته باشد و علائم چند بیماری را بروز دهد. بیماری می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر سن، هورمون‌ها و عوامل محیطی قرار بگیرد. به طور کلی نشانگان رایج شامل موارد زیر است:

- خستگی
- تب با درجه‌ی پایین
- حال عمومی بد (ناخوشی)[1]
- درد مفاصل و دردهای عضلانی
- خارش در نقاط مختلف پوست

ظهور این علائم و نشانگان می‌تواند در نوسان باشد و هنگام بازگشت دوباره بیشتر تشدید شوند. چنین علائم و نشانگانی ممکن است با توجه به نتایج حاصل از نشانگرهای زیستی (بیومارکرها) بیماری‌های خودایمنی، به شناسایی بیماری کمک کنند. نواحی متعددی در بدن وجود دارد که بیماری‌های خودایمنی در آن نواحی شایع است. این نواحی شامل موارد زیر است: عروق خونی، بافت‌های پیوندی، ماهیچه‌ها و مفاصل، سلول‌های قرمز خون، پوست و غدد درون‌ریز مانند غدد تیروئید و پانکراس.

[1] General feeling of unwell (malaise)

این بیماری‌ها به طور معمول دارای اثرات آسیب‌شناختی مشخصی هستند که آن‌ها را به عنوان یک بیماری خودایمنی توصیف می‌کند. این خصوصیات شامل موارد زیر هستند: ایجاد آسیب یا تخریب بافتی در جایی که پاسخ غیرطبیعی ایمنی ایجاد می‌شود، تغییر رشد اندام و تغییر عملکرد اندام با توجه به محل ایجاد بیماری. بعضی بیماری‌ها مختص به عضوی خاص و اثرگذاری آنها محدود به بافت مشخصی است؛ درحالی که برخی دیگر از آنها از نوع بیماری‌های سیستمیک هستند و بسیاری از بافت‌های درون بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علائم و نشانگان با توجه به این که فرد مبتلا به کدام گروه از این بیماری‌ها باشد، متغیر است.

درمان

درمان بیماری های خودایمنی، به نوع و شدت وضعیت پیش آمده بستگی دارد. اکثر بیماری‌های خودایمنی مزمن هستند و درمان مشخصی برای آن‌ها وجود ندارد، اما می‌توان علائم و تاثیرات بیماری را با درمان کنترل کرده و کاهش داد. به طور کلی هدف از روش‌های متعدد درمانی، کاهش علائم ظاهرشده برای تسکین، سرکوب سیستم ایمنی و تغییر پاسخ سیستم ایمنی است درحالی که هنوز توانایی بیمار را برای مبارزه با بیماری‌هایی که ممکن است با آن‌ها مواجه شود حفظ کند. گزینه‌های درمانی سنتی ممکن است شامل داروهای سرکوبگر ایمنی برای تضعیف پاسخ ایمنی باشند به طوری که علائم را بهبود بخشند و بیماری را به طور معمول درمان نکنند. مانند:

- داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs)[1] برای کاهش التهاب،
- گلوکوکورتیکوئیدها برای کاهش التهاب،

[1] Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

- داروهای ضد روماتیسمی اصلاح‌کننده‌ی بیماری (DMARDs) برای کاهش اثرات آسیب بافتی و اندامی در پاسخ خودایمنی التهابی.
- ایمونوگلوبولین‌های درون وریدی

برای مثال در کشورعزیزمون ایران نیز با کمک بیوتکنولوژی پزشکی، داروی ضد مولکول TNF تولید شده است. این دارو در برخی بیماری‌های خود ایمنی مانند آرتریت روماتوئید به کار برده می شود و از فعالیت مولکول TNF در بدن جلوگیری می‌کند و التهاب را کاهش می‌دهد. تولید پروتئین های نوترکیب مانند ایمونوگلوبولین ها با کمک تکنیک های مهندسی ژنتیک در بیوتکنولوژی پزشکی، برای درمان بیماری های خود ایمنی استفاده شده است.

سایر روش‌های درمانی استاندارد:

- مکمل‌های ویتامینی و هورمونی برای هرآنچه که بدن به دلیل بیماری کمبود دارد (انسولین، ویتامین B12، هورمون تیروئید و ...)،
- در مان از طریق انتقال خون در مورد بیماری هایی که با خون مرتبط هستند،
- انجام فیزیوتراپی در درمان بیماری هایی که بر روی استخوان‌ها، مفاصل یا ماهیچه‌ها اثر می‌گذارند.

۳-۲) نقص ایمنی

نقص ایمنی یکی دیگر از عواملی است که در ایجاد اختلالات ایمنی نقش دارد. نقص ایمنی[1] حالتی است که در آن توانایی سیستم ایمنی برای جنگیدن با بیماری‌های عفونی و سرطان دچار مشکل شده یا کاملا از بین می‌رود. موارد

[1] immunocompromisation

متعددی وجود دارند که به دلیل عوامل خارجی که سیستم ایمنی بیمار را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این عوامل، اکتسابی (ثانویه) هستند. نمونه‌های این عوامل خارجی شامل عفونت HIV و عوامل محیطی مانند تغذیه است. تضعیف سیستم ایمنی ممکن است همچنین به دلیل بیماری‌ها یا نقص‌های ژنتیکی (اولیه) باشد. بنابراین بعضی افراد با نقص‌های ذاتی در سیستم ایمنی خود یا نقص ایمنی اولیه متولد می‌شوند. با توجه به اتحاد جهانی جوامع ایمونولوژیکی، بیش از ۱۵۰ بیماری نقص ایمنی اولیه (PIDs)[1] شناخته شده است. با این حال تعداد نقص‌های ایمنی اکتسابی از تعداد PIDها نیز تجاوز کرده است. گفته شده است که بیشتر افراد حداقل یک نقص ایمنی اولیه دارند. اگرچه به دلیل گستردگی سیستم ایمنی بدن، بسیاری از این‌ها هرگز شناسایی نمی‌شوند.

بیماری SCID[2] یا نقص ایمنی شدید ترکیبی، نوعی بیماری نقص ایمنی اولیه است. فرد دچار نقص ایمنی دربرابر عفونت‌های مختلف آسیب‌پذیر است. این امر همچنین نظارت ایمنی[3] در برابر سرطان را کاهش می‌دهد. نظارت ایمنی فرآیندی است که در آن سیستم ایمنی سلول‌های بدن را پایش و بررسی می‌کند و آن‌هایی را که نئوپلاستیک[4] (دارای رشد غیرطبیعی) هستند، می‌کشد.

در شرایط بالینی سرکوب ایمنی توسط برخی داروها مانند استروئیدها می‌تواند درعین این که هدف درمانی دارند، اثرات نامطلوب نیز داشته باشند. مثال‌های کاربردی آن‌ها شامل استفاده در جراحی‌های پیوند عضو به عنوان اقدام علیه ردپیوند، استفاده برای بیمارانی که از سیستم ایمنی بیش‌فعال رنج می‌برند و استفاده در بیماری‌های خودایمنی است.

[1] primary immunodeficiency diseases (PIDs)
[2] Severe combined immunodeficiency
[3] immunosurveillance
[4] neoplastic

۳-۳) آلرژی

کلمه‌ی "آلرژی" اولین بار توسط کِلِمِنز وان پیرکوئت[1] در سال ۱۹۰۶ استفاده شد. بیماری‌های آلرژیک ناشی از حساسیت بیش از حد سیستم ایمنی بدن به مواد معمولاً بی خطر در محیط هستند. این بیماری‌ها شامل تب یونجه[2]، آلرژی‌های غذایی[3]، درماتیت آتوپیک[4]، آسم آلرژیک[5] و آنافیلاکسی[6] است. نشانگان ممکن است شامل قرمزی چشم‌ها، جوش خارش‌دار، عطسه، آبریزش بینی و تنگی نفس باشد. عدم تحمل غذا و مسمومیت‌های غذایی دو شرایط مجزا هستند. غذاهایی خاص و گرده، آلرژن‌هایی رایج هستند. غذا، نیش حشرات و داروها دلایل عمده‌ی واکنش‌های شدید هستند. پیشرفت بیماری‌های آلرژیک به دلایل ژنتیکی و عوامل محیطی است. مکانیسم اساسی آن شامل آنتی‌بادی‌های ایمونوگلوبولین E است که به آلرژن و سپس به گیرنده‌های سطح ماست‌سل‌ها[7] یا بازوفیل‌ها متصل می‌شوند و آزادسازی مواد شیمیایی التهابی همانند هیستامین را تحریک می‌کنند. تشخیص معمولاً مبتنی بر تاریخچه‌ی پزشکی هر فرد است. آزمایش بیشتر برای پوست یا خون ممکن است در مواردی خاص مفید باشد. با این وجود، آزمایشات مثبت ممکن است به معنای حساسیت قابل توجه به ماده‌ی مورد نظر نباشد. قرارگیری زودرس در معرض یک آلرژن ممکن است محافظت کننده باشد. درمان‌های مورد استفاده برای آلرژی شامل اجتناب از آلرژن‌های شناخته شده و کاربرد داروهایی نظیر استروئیدها و آنتی‌هیستامین‌ها است. در واکنش‌های حاد، آدرنالین (اپی‌نفرین) تزریقی پیشنهاد می‌شود. ایمنی‌درمانی آلرژن که طی آن به مرور زمان افراد را با مقادیر بیشتری از آلرژن مواجه می‌کنند، برای بعضی از انواع آلرژی‌ها مانند تب

[1] Clemens von Pirquet
[2] hay fever
[3] food allergies
[4] atopic dermatitis
[5] allergic asthma
[6] anaphylaxis
[7] mast cells

یونجه و واکنش دربرابر گزیدگی حشرات کارآمد است. اما کاربرد آن در آلرژی‌های غذایی مشخص نیست. بیماری های آلرژیک رایج هستند. در جهان حدود ۲۰٪ مردم دچار رینیت آلرژیک[1]، ۶٪ مردم دچار حداقل یک آلرژی غذایی و حدود۲۰٪ دچار درماتیت آتوپیک هستند. بسته به کشور، حدود ۱۸-۱ درصد از مردم دچار آسم هستند. آنافیلاکسی در بین ۲-۰/۰۵درصد افراد اتفاق می افتد. همین طور، به نظر می‌رسد نرخ بسیاری از بیماری‌های آلرژیک در حال افزایش است.

علائم و نشانگان

بسیاری از آلرژن‌ها مانند غبار یا گرده، ذرات معلق در هوا هستند. در این موارد رینیت آلرژیک معادل تب یونجه سبب تحریک بینی، عطسه، خارش و قرمزی چشم‌ها می‌شود. آلرژن‌های بلعیده‌شده همچنین می‌توانند منجر به تولید بالای موکوز در ریه ها، تنگی نفس، سرفه و خس‌خس سینه شوند. جدا از این آلرژن‌های محیطی، واکنش‌های آلرژن می‌توانند از غذاها، نیش حشرات و واکنش‌های دارویی مانند آسپرین و آنتی‌بیوتیک‌ها مانند پنی‌سیلین نشأت بگیرند. نشانگان آلرژی غذایی شامل درد شکم، نفخ، استفراغ، اسهال، خارش پوست و تورم پوست در هنگام کهیر است. آلرژی‌های غذایی به ندرت واکنش‌های تنفسی (آسمی) یا رینیت ایجاد می‌کنند. نیش حشرات، غذا، آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای خاصی ممکن است پاسخ آلرژیک سیستمیک ایجاد کنند که آنافیلاکسی نیز نامیده می‌شود که در آن چندین دستگاه شامل دستگاه گوارش، دستگاه تنفسی و دستگاه گردش خون تحت تأثیر قرار می‌گیرند. آنافیلاکسی، برحسب شدت آن، می‌تواند شامل واکنش‌های پوستی، انقباض برونش[2]، تورم، فشار خون پایین، کُما و مرگ باشد. این نوع واکنش می‌تواند به طور

[1] allergic rhinitis
[2] bronchoconstriction

ناگهانی ایجاد شود یا آغاز آن به تأخیر بیفتد. به عبارت دیگر، ماهیت آنافیلاکسی این‌گونه است که واکنش فروکش می‌کند اما ممکن است در طول یک دوره‌ی زمانی عود کند.

علت

عوامل خطرناک برای آلرژی را می‌توان در دو گروه عمده‌ی عوامل میزبان و محیطی قرار داد. "عوامل میزبان" شامل ۱. وراثت، ۲. جنس، ۳. نژاد و ۴. سن می باشد که وراثت شاخص‌ترین آن‌ها است. با این وجود اخیراً وقوع اختلالات آلرژیک به حدی افزایش یافته است که تنها با عوامل ژنتیکی قابل توضیح نیست. چهار کاندید اصلی برای "عوامل محیطی" شامل ۱. تغییراتی است که در مواجهه با بیماری‌های عفونی حین دوران اولیه‌ی کودکی رخ داده است، ۲. آلودگی های محیطی، ۳. سطوح آلرژن و ۴. تغییرات رژیم غذایی هستند.

۴) بیماری های انگلی یا عفونی

علاوه بر اختلالات ژنتیکی، متابولیکی و ایمنی، بیماری های انگلی و یا عفونی از جمله مواردی می باشند که در بروز بیماری ها می توانند نقش داشته باشند. همانطور که گفته شد بیوتکنولوژی پزشکی پیشرفت بسیاری در مراحل مختلف بیماری از جمله پیش گیری، تشخیص و درمان داشته است. در این میان بیماری هایی که با واسطه حضور یک موجود خارجی در بدن فرد ایجاد شده نیز ازین قاعده مستثنی نمی باشند. بیماری هایی که به علت عفونت یا انگل در بدن به وجود می آیند و غالبا روش تشخیص آنها Real time PCR[1] (روشی که در آن قطعات DNA تکثیر می شوند) می باشد

[1] Polymerase chain reaction

از جمله این بیماری ها می باشند، مانند بیماری کرونا یا Coronavirus disease 2019 (COVID-19) که عامل آن ویروس SARS-CoV-2 است. راه درمان اکثر این گونه بیماری ها، غالبا واکسیناسیون علیه بیماری است. بیماری هایی که به علت پارازیت (انگل) باشد پارازیتوسیس گفته می شوند. این بیماری ها به علت انتقال انگل به بدن اتفاق می افتند. انگل ها غالبا باعث مرگ فرد می شوند. چندین نوع انگل وجود دارد که سم آنها عامل اصلی کشندگی آنها است مثل توکسوپلاسما یا پلاسمودیوم ها.

راه های انتقال عوامل بیماری زا می تواند از طرق مختلفی باشد:

- ✓ از طریق خون: هپاتیت، ایدز
- ✓ از طریق تنفس: مثل سل، سرخک
- ✓ از طریق رابطه جنسی: هپاتیت، سفلیس، سوزاک، ایدز
- ✓ از طریق ارتباط مستقیم: آنفولانزا
- ✓ از طریق آب و مواد غذایی: تیفوئید، اسهال خونی
- ✓ از طریق حیوانات مثل هاری
- ✓ از طریق ناقل آلوده مثل کنه و پشه: بیماری مالاریا، تب کنگو کریمه

دستاوردهای کنونی و پیش‌بینی‌ها برای چند بیماری انگلی یا عفونی در ادامه آورده شده است.

هپاتیت C

ویروس هپاتیت C (HCV) که به طور عمده با خون آلوده منتشر می‌شود تا سال ۱۹۸۹ جداسازی و شناسایی نشده بود. در سال ۱۹۹۹ باور بر این بود که HCV حدود ۱۷۰ میلیون نفر را در سراسر جهان آلوده کرده است و هر سال ۳ میلیون نفر دیگر به این آمار اضافه می‌شوند. در بیشتر موارد، ویروس در کبد، عفونت مزمن ایجاد می‌کند و طی چندین دهه می‌تواند منجر به اشکال متنوعی از آسیب کبدی مانند سیروز و فیبروز[1] و همچنین سرطان شود. با توجه به آمار سازمان جهانی بهداشت (WHO) هپاتیت C سالیانه حدود ۵۰۰ هزار نفر را می‌کشد. کشندگی این ویروس کمتر از ویروس ایدز است که سالیانه از میان ۴۲ میلیون فرد مبتلا، زندگی بیش از ۳ میلیون نفر را می‌گیرد. با این وجود، شیوع بیشتر HCV و بازه‌ی زمانی انکوباسیون (ماندگاری) بالاتر آن و عدم وجود داروهای کارآمد به این معنی است که این بیماری اپیدمی بالقوه کشنده‌تری دارد.

ایجاد درمان‌های جدید و کارآمد برای هپاتیت C آسان نیست و به خاطر این واقعیت است که رشد HCV در آزمایشگاه سخت است و تنها مدل حیوانی این بیماری انسانی، شامپانزه بوده است که گونه‌ای غیرقابل استفاده (و به نظر خیلی از افراد، غیراخلاقی است) برای کاربرد در مطالعات در سطوح صنعتی است. با این وجود سیستم‌های کشت سلولی جدید و مدل‌های موشی، مسیری برای توسعه‌ی ابداع دارو گشوده‌اند. پروتئاز NS3 نقشی کلیدی در چرخه زندگی ویروس هپاتیت C ایفا می‌کند. بنابراین NS3 برای هپاتیت HCV یک هدف است و محققان در موسسه‌ی تحقیقاتی Schering-Plough در نیوجرسی[2] کارآزمایی‌های بالینی را با یکی از بازدارنده‌های این پروتئاز آغاز کرده‌اند. شرکت داروسازی

[1] cirrhosis and fibrosis
[2] New Jersey

وِرتِکس[1] داروی ضدNS3 دیگری به نام VX-950 تولید کرده است که تاکنون این دارو در مدل موشی پروتئاز NS3 را مهار کرده است و ممکن است در انسان نیز امید بخش باشد و باید مورد آزمایش قرار گیرد.

تب ابولا

این بیماری اولین بار در سال ۱۹۷۶ در روستای یامبوکا در استان مونگالا (در شمال جمهوری دموکراتیک کنگو) دیده شد. این روستا در نزدیکی رودخانه ابولا قرار داشت به همین خاطر به این شهرت یافت. در این سال حین اپیدمی ۳۱۸ نفر درگیر شدند که ۲۸۰ نفر آن‌ها را کشته شدند. ویروسِ عامل این بیماری به فرم رشته ای بوده و تا ۱۴۰۰۰ نانومتر طول دارد و درواقع یکی از بلندترین ویروس‌هایی است که تا به حال کشف شده و از یک رشته اسید نوکلئیک درون کپسید لیپیدی تشکیل شده است. زمان ماندگاری بیماری از چند روز تا ۳ هفته متغیر است و علائم آن شامل تب، درد شکمی حاد و اسهال خونریزی‌دهنده[2] همراه با اختلال عملکردی کبد و کلیه است. ویروس از طریق تماس مستقیم با خون آلوده، بزاق، استفراغ، مدفوع یا اسپرم منتقل می‌شود و افراد آلوده باید قرنطینه شوند. تب اسهالی حاصل از عفونت ویروسی، منجر به مرگ ۸۰ درصد از بیماران طی چند روز می‌شود. طی چند سال گذشته چندین اپیدمی ناگهانی به طور هم‌زمان در جمهوری دموکراتیک کونگو (DRC)[3] وگابن[4] اتفاق افتاد بنابراین این عفونت را به اولویت اصلی بهداشت عمومی برای این کشورها تبدیل کرد.

[1] Vertex Pharmaceuticals
[2] haemorrhagic diarrhoea
[3] the Democratic Republic of Congo (DRC)
[4] Gabon

ویروس SARS

اپیدمی SARS (سندرم حاد تنفسی)[1] احتمالاً در اوایل سال ۲۰۰۲ در استان گوئانگ‌دونگ[2] ایجاد شده و در ۲۸ کشور منتشر شده است. این بیماری ناشی از ویروس کرونا است که ژنوم آن از ۲۹۷۳۶ جفت نوکلئوتید (توالی آن در ۱۳ آوریل سال ۲۰۰۳ منتشر شد که دستاوردی تأثیرگذار بود) تشکیل شده است. ادیسون لیو[3] و همکارانش در موسسه‌ی ژنومیکس در سنگاپور توالی‌های ژنوم کروناویروس‌های جداشده از ۵ بیمار را با توالی‌های ویروسی که در کانادا، ایالات متحده و چین مطالعه شده بود مقایسه کردند. محققان نتیجه گرفتند که در مقایسه با سایر RNA ویروس‌ها، این ویروس تقریباً پایدار بود. بین توالی‌های ژنوم ویروس‌های جداشده از بیماران در هونگ کونگ و ویروس‌های جداشده از بیماران در بیژینگ[4] و گوئانگ‌دونگ تفاوت‌هایی وجود داشت. چنین تغییراتی در مطالعه‌ی انتشار ویروس و پیش‌گیری اپیدمیولوژیک آن مفید است.

[1] SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)
[2] Guangdong
[3] Edison Liu
[4] Beijing

فصل دوم: تشخیص بیماری

همانطور که در ابتدای محتوای پیش رو نیز اشاره شد، یکی از مهمترین کاربردهای بیوتکنولوژی پزشکی در حوزه تشخیص بیماری است. در تشخیص‌های رایج پزشکی، پزشکان عمدتاً علائم آشکار بیماران را مشاهده می‌کنند. برای هزاران سال پزشکان با تجربه، اطلاعات مهمی در مورد سلامت بیماران خود از زخم‌های قابل مشاهده، ساختار استخوان، وضعیت بدن، رنگ پوست، چشم، خون و فضولات جمع آوری کرده‌اند. روش‌های دیگر تشخیص سنتی شامل لمس کردن، به عنوان مثال برای تشنج‌های عضلانی یا توده‌ها، و تبادل عمیق اطلاعات بین پزشک و بیمار است. علوم پزشکی مدرن این روش‌ها را با تکنیک‌های تصویربرداری، مانند اشعه ایکس، توموگرافی کامپیوتری و تصویربرداری رزونانس مغناطیسی، ادغام کرده است. این روش‌های معمول هنوز هم اساس هر درمان موفقیت آمیز هستند - حتی اگر اغلب برای تشخیص بسیاری از بیماری‌ها ناکافی باشند. سطح بعدی تشخیص پزشکی مربوط به بررسی ساختار داخلی بدن است و به طور خاص بر عملکردها و فعل و انفعالات اندام‌ها و بافت‌ها متمرکز است. در این زمینه نیز، تکنیک‌های مدرن تشخیصی مانند سونوگرافی، توموگرافی کامپیوتری، آندوسکوپی روده و آرتروسکوپی به روش‌های معاینه رایج افزوده شده است. با این وجود، روش‌های مبتنی بر آزمون و خطا مانند بیوپسی (نمونه گیری) همچنان مهم هستند. به عنوان مثال آزمایش بیوپسی کبد که شامل برداشتن سلول‌های کبدی از طریق یک سوزن بلند فرو رفته به داخل دیواره شکم است، همچنان توسط پزشکان تجویز می شود. بطوریکه همچنان مهم‌ترین راه برای شناسایی بیماری‌های کبدی، بررسی این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ است. با این حال، در بیشتر موارد نمونه برداری از آخرین حلقه یک زنجیره تشخیصی است که با آزمایشات آزمایشگاهی آغاز می‌شود. در اوایل سال ۱۹۷۰ آزمایش گاما GT- ایجاد شد. این آزمایش برای اندازه‌گیری آنزیم متابولیکی که سطح آن در بیماران مبتلا به التهاب کبد افزایش می‌یابد، استفاده می‌شود. این روش دقیق و

غیرتهاجمی اکنون یک آزمایش آزمایشگاهی مهم برای تشخیص زودهنگام عفونت‌های کبدی است: تنها در مواردی که غلظت گاماGT- به شکل قابل توجه و یا به شکل اندک اما در طول بازه زمانی طولانی افزایش یابد، پزشکان آزمایشات بیشتری مانند سونوگرافی یا نمونه‌برداری از کبد را نیز تجویز می‌کنند. چنین آزمایش‌هایی فقط با ابداع آنزیم‌های تولید شده توسط ابزارهای زیست‌فناورانه امکان پذیر شد.

به لطف وجود چنین آزمایش‌های غربالگری، که نیازی به مداخله جراحی ندارند و به سرعت و به آسانی نتایج قابل اطمینانی تولید می‌کنند، اکنون پزشکان قادر به تشخیص و درمان بسیاری از اختلالات عملکردی اندام‌ها و بافت‌ها هستند. یکی از مزایای مهم این روش‌ها این است که اگر یافته‌های آزمایش غربالگری منفی باشد، بیماران از یک مداخله غیرضروری و نسبتاً خطرناک در امان می‌مانند.

مورد بعدی مربوط به بیماری دیابت است که در این بیماری مزایای آزمایش‌های سریع حتی از این هم فراتر می‌رود. چنین آزمایشاتی در واقع تبدیل به بخش جدایی ناپذیر از درمان دیابت شده‌اند. دیابت یا به دلیل کمبود تولید انسولین توسط سلول‌های لوزالمعده یا به دلیل عدم حساسیت اکتسابی سلول‌های خاص بدن به انسولین رخ می‌دهد. در هر صورت، تشخیص و درمان بیماری نیاز به نظارت منظم سطح گلوکز خون با کمک آنزیم‌های تولید شده توسط روش‌های زیست‌فناورانه دارد. بر مبنای این اندازه‌گیری‌ها، بیماران دیابتی قادر به تعیین زمان و میزان انسولین مورد نیاز برای تزریق هستند. تا همین چند دهه پیش بیماران دیابتی مجبور بودند برای انجام چنین آزمایشاتی به پزشک خود مراجعه کنند، و تعیین دوز انسولین تزریقی به صورت جداگانه امری غیرممکن بود. در واقع بیماران دیابتی مجبور بودند رژیم و سبک زندگی خود را با یک درمان استاندارد و مرسوم تطبیق دهند. اما امروزه دستگاه‌های تشخیصی مدرن به بیماران دیابتی این امکان را می‌دهد که هر زمان بخواهند سطح گلوکز خون خود را بررسی کنند و بنابراین درمان خود را با

نیازهای فردی خود تطبیق دهند. این پیشرفت علاوه بر افزایش کیفیت زندگی بیماران دیابتی، منجر به کاهش قابل توجه عوارض جانبی ناشی از دیابت شده است.

آنزیم‌های مورد نیاز برای اندازه‌گیری چنین پارامترهایی که در خون و یا ادرار هستند در اوایل سال ۱۹۵۴ توسط بوئرینگر مانهایم[1] و با استفاده از روش‌های معمول زیست‌فناوری تولید شد. برای این هدف، میکروارگانیسم‌ها در دسته‌های ۵۰ هزار لیتری کشت شدند. سپس از زیست توده به ترتیب آنزیم‌هایی مانند گلوکز اکسیداز و کلسترول اکسیداز برای اندازه‌گیری سطح گلوکز و کلسترول خون استخراج شد.

زیست‌فناوری مدرن اخیراً چشم انداز کاملاً جدیدی را در حوزه تشخیص به وجود آورده است درواقع به جستجوی علل مولکولی بیماری‌ها می پردازد. این حوزه تحقیقاتی عمدتاً مبتنی بر علوم ژنومیک که با مواد وراثتی ما سروکار دارد و پروتئومیکس که با تظاهرات آن در افراد در سطح پروتئین سروکار دارد، است. این مسئله در دهه‌های اخیر منجر به توسعه نگرش‌های جدیدی در حوزه درمان شده است و ما اکنون در مورد توسعه، پیشرفت و درمان بسیاری از بیماری‌ها اطلاعات به مراتب بیشتری نسبت به یک نسل قبل داریم. در حقیقت، این بینش عمیق در مورد روابط مولکولی درون بدن ما باعث شد که برای اولین بار اصطلاح "بیماری" به صورت کلی به عنوان یک وضعیت ناشی از تغییر جریان اطلاعات در یک سیستم بیولوژیکی تعریف شود.

بیماری چیست؟ بیماری همانطور که بیان شد نتیجه تغییر جریان اطلاعات در یک سیستم زیستی است. پروتئین‌ها یک نوع حامل اطلاعاتی بدن هستد. اگر بدانیم که چه پروتئین‌هایی در چه غلظت‌هایی در یک سیستم زیستی طبیعی وجود

[1] Boehringer Mannheim

دارد، بوسیله آن می‌توان تعادل بین سلامتی و بیماری را توصیف کرد. این تعریف جامع از بیماری، اساس تشخیص مولکولی را می‌سازد و می‌توان آن را به دو گروه تقسیم کرد:

تشخیص بر اساس ژنوتیپ: DNA، که ماده وراثتی ما را تشکیل می‌دهد، به عنوان ذخیره اصلی اطلاعات در سیستم‌های زیستی عمل می‌کند. عوامل ژنتیکی نه تنها باعث بوجود آمدن بیماری‌های ارثی می‌شوند، بلکه در توسعه و پیشرفت بیماری‌های غیر ارثی نیز دخیل هستند. ژنوتیپ می‌تواند فرد را نسبت به برخی اختلالات حساس یا مقاوم کند، سیستم ایمنی قوی یا ضعیفی برای او فراهم کند و نحوه واکنش او به داروها را تعیین کند. محققانِ زیست فناوری در سراسر جهان در حال جستجوی ژن‌ها و بخش‌های ژنی مسئول این پدیده‌ها با هدف ایجاد آزمایشاتی هستند که به پزشکان امکان می‌دهد مستعد بودن یا احتمال ابتلای افراد به بیماری های مختلف را تشخیص دهند. چنین آزمایشاتی امکان به تأخیر انداختن یا حتی جلوگیری از شروع بیماری و انتخاب بهترین روش درمانی برای یک بیماری خاص را ممکن می سازد.

تشخیص بر اساس فنوتیپ: همیشه نمی‌توان نتیجه‌گیری مستقیمی از روی ژنوم در مورد نحوه بیان ژنوتیپ، یعنی فنوتیپ انجام داد. پیام‌های متنوع و متغیری به چگونگی خوانش و بیان ژن‌های فردی، کمک می‌کند. فقط در سطح محصولات ژنی، یعنی پروتئین‌ها، می توان وضعیت سلامتی بیمار را به طور دقیق تعیین کرد. تفاوت‌های بزرگ و کوچک در ژنوم، هر یک از ما را به یک فرد منحصر به فرد، نه تنها از نظر شکل ظاهری و رفتاری، بلکه از نظر خطرات سلامتی و پاسخ به درمان‌ها تبدیل می‌کند. چون دلایل این اختلافات به خوبی درک نشده بود، علوم پزشکی قادر به پاسخگویی به آن‌ها نبود. یافتن روش درمانی مناسب برای یک بیماری خاص طی سال‌ها اغلب شامل آزمایش و خطای روش‌های مختلف بود. با این حال، اگر مبنای ژنتیک فردی از نظر بیماری و درمان مشخص باشد، پزشکان بهتر می‌توانند درمان را متناسب

با نیازهای بیماران تنظیم کنند. اما ژن ما بر خلاف آن‌چیزی که دهه‌ها گمان می‌رفت، چندان تغییر ناپذیر نیست، با اصلاح DNA، سلول‌ها می‌توانند ژن‌های خاص را غیرفعال یا فعال کنند یا حتی نحوه خواندن آن‌ها را تغییر دهند، بنابراین ژنوتیپ یک شخص جزء تغییرناپذیری از زنجیره اطلاعات سیستم‌های زیستی نیست. این واقعیت باعث می‌شود عناصری که به ارث می‌رسند برای تشخیص مولکولی بیماری‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار باشند. اگر بتوان وضعیت سلامت فرد را در سطح DNA وی مطالعه کرد، احتمالاً بتوان درمان‌های مناسب‌تری نیز برای او تجویز کرد. علاوه بر این، اصلاحات ژنی که در زیست فناوری پزشکی انجام می شود ممکن است فضای مناسبی برای عمل داروها فراهم کند.

پروتئین‌ها (محصولات ژنی) به عنوان مهم‌ترین گروه مواد زیستی، اهداف اصلی تشخیص مولکولی هستند.

پروتئین‌های متابولیکی مختلف به عنوان اهداف آزمایش‌های تشخیصی عمل می‌کنند؛ زیرا تغییر در فعالیت آن‌ها ممکن است وجود برخی از بیماری‌ها را نشان دهد. آنزیم‌های محدودکننده (که برای برش دقیق رشته‌های DNA به طول‌های کوتاه‌تر استفاده می‌شود) و پروتئازها (که محل‌های خاصی از پروتئین‌ها را می‌برند) از ابزارهای اصلی مورد استفاده توسط مؤسسات زیست شناسی مولکولی و زیست فناوری هستند. در تشخیص مولکولی، از این ابزارها، برای شناسایی ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌ها استفاده می‌شود. آنتی‌بادی‌ها ابزار قدرتمند دیگری هستند که در زیست شناسی مدرن و زیست فناوری پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این‌ها اساس تکنیک الایزا (در مباحث بعدی توضیح داده خواهد)، مهم‌ترین روش شناسایی نشانگرهای زیستی در محلول‌ها و مایعات بدن هستند. به عنوان مواد فعال، پروتئین‌ها توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند. در مقایسه با اکثر داروهای معمولی، می‌توان از پروتئین‌های درمانی برای تعیین علل مولکولی بسیاری از بیماری‌ها با اختصاصیت بالا استفاده کرد و علت اساسی بیماری را به شکل دقیق تشخیص داد. به طور ویژه در زیست‌فناوری، درمان و تشخیص دست در دست هم هستند.

امروزه تست های تشخیصی برای انواع بیماری ها بر پایه تکنیک های زیست فناوری ساخته شده است. هدف اصلی یک تست تشخیصی، شناسایی وجود یک بیماری در سریع‌ترین زمان ممکن، پیش از پیشروی قابل توجه آن و کاهش کارایی درمان است. تست‌های تشخیصی همچنین برای پیش‌بینی حساسیت به یک بیماری یا پاسخ به یک درمان، مشخص کردن پیش‌آگاهی بیماری و نظارت برکارایی درمان نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک تست تشخیصی باید برای مولکول هدف یا عامل بیماری‌زا اختصاصی باشد، حساسیت بالایی در تشخیص سطوح پایین هدف داشته باشد و به قدر کافی سریع باشد و برای آنالیزهای معمول و احتمالاً پربازده، گران نباشد. تست‌های غیرتهاجمی که می‌توانند مولکول یا عامل‌بیماری‌زای هدف را در مایعات بدن مانند خون، ادرار، خلط یا چرک حاصل از زخم تشخیص دهند در اولویت هستند. با این وجود تکنیک‌های متعددی برای تشخیص اهداف مولکولی در بافت‌های به دست‌آمده از راه بیوپسی (تکه برداری از بافت) در دسترس است. زیست فناوری پزشکی با رویکردهای تشخیصی مولکولی، نشانگرهای زیستی (بیومارکر) برای هر بیماری را تشخیص می‌دهند. در این زمینه، بیومارکر یک بیماری، مولکولی ویژه است که مشخص شده است در بافت‌های بیمار در مقایسه با بافت طبیعی حضور دارد یا در سطوح پایین‌تر یا بالاتر از سطح طبیعی خود قرار دارد یا نشانگری برای پیش‌آگاهی بیماری یا پاسخ به درمان است. بیومارکر می‌تواند یک پروتئین، یک توالی ویژه‌ی DNA یا RNA و یا یک متابولیت کوچک باشد. ممکن است مولکول‌های ویژه‌ای در نمونه‌های بافتی، سرم خون یا ادرار به صورت کمی یا کیفی آنالیز شوند. نمونه‌هایی که مقادیر کمی از مولکول هدف را دارند (مثل نمونه‌ای از یک بیوپسی کوچک در اندازه نوک سوزن یا نمونه‌ی خون) برای تشخیص دقیق و کمّی، نیاز به تکثیر دارند. ناهمگنی پیچیده‌ی نمونه‌های بالینی

برای تشخیص مولکولی می تواند یک چالش باشد و با استفاده از روش‌هایی مانند برش میکرونی بافت[1] می‌توان خلوص نمونه را بالا برد.

تست‌های تشخیص مولکولی برای تشخیص عوامل ایجاد کننده بیماری‌های ژنتیکی و نیز بیماری‌های عفونی در دسترس هستند. بیماری‌های ژنتیکی ممکن است اختلالات تک‌ژنی مانند سیستیک فیبروزیس یا اختلالات چندژنی پیچیده مانند بیماری آلزایمر باشند. با این که خیلی از بیومارکرها شناسایی شده‌اند، بیومارکرهای مربوط به بسیاری از بیماری‌های انسانی به طور کامل شناخته نشده‌اند.

با توجه به اینکه سطوح ژنوتیپ و فنوتیپ را برای تشخیص بیماری ها توضیح دادیم می توانیم بصورت جزئی تر تکنیک های تشخیص بیماری در زیست فناوری پزشکی را بیان کنیم این تکنیک ها مبتنی بر دو محور هستند:

۱) تشخیص بیماری مبتنی بر اسید نوکلئیک

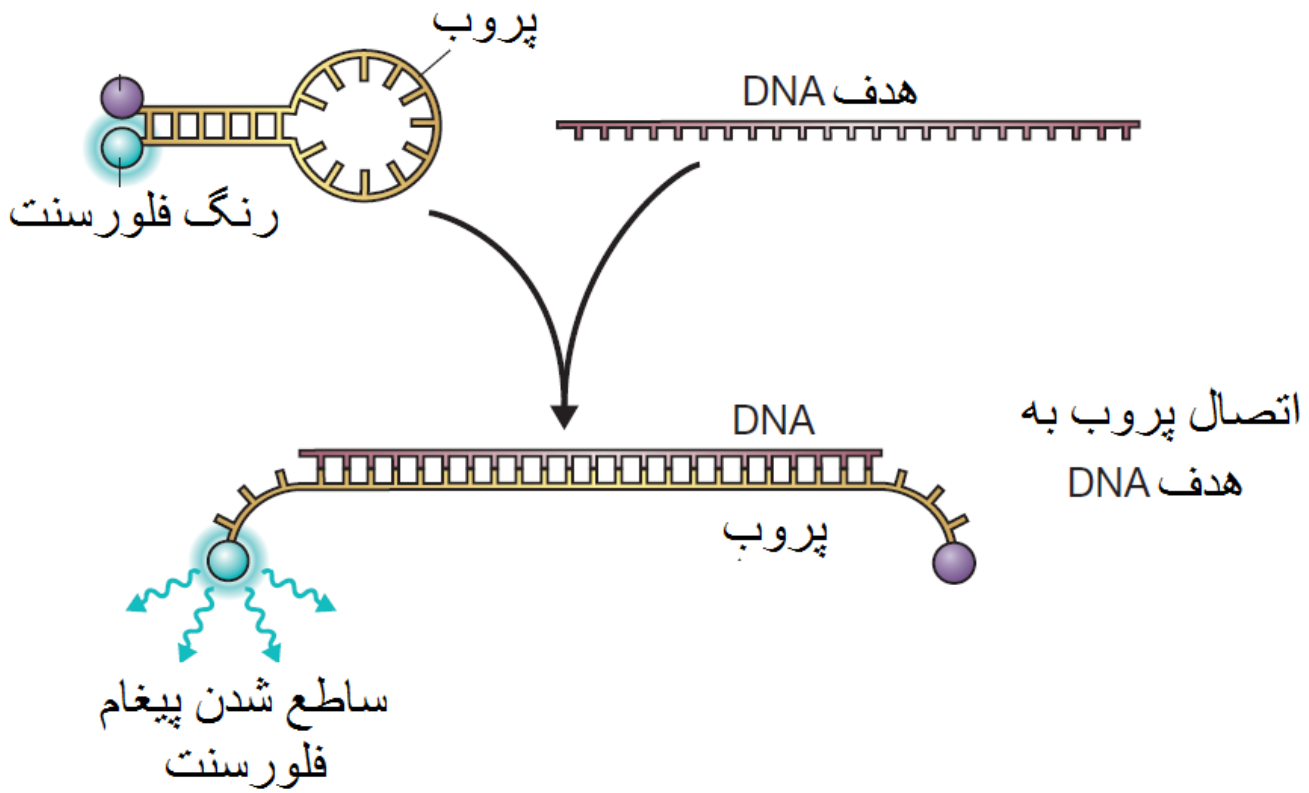
۲) تشخیص بیماری مبتنی بر پروتئین

۱) تشخیص بیماری مبتنی بر اسید نوکلئیک

تست‌های تشخیصی مبتنی بر DNA وجود یک توالی DNA خاص را تشخیص می‌دهد که شامل موارد زیر است: تشخیص وجود جهش ژنتیکی خاص در توالی DNA انسانی و یا تشخیص حضور توالی‌های DNA عوامل بیماری‌زای خارجی در بدن انسان. این روش‌ها حساسیت بالایی دارند، اختصاصی هستند و می‌توانند جهش‌های تک نوکلئوتیدی یا

[1] microdissection

تغییرات تعدادکپی از یک ژن را تشخیص دهند. توانایی تشخیص بیماری در سطح ژنتیکی در انسان‌ها امکان تشخیص علت بیماری و پیش‌بینی این که افراد یا فرزندانشان مستعد ابتلا به این بیماری هستند را فراهم می‌کند. از آنجایی که تست مبتنی بر DNA برخلاف تست تشخیصی پروتئین نیازی به بیان ژن ندارد، آنالیز DNA را می‌توان برای تشخیص افراد ناقل بدون علامت اختلالات ارثی، برای تشخیص قبل از تولد با اختلالات ژنتیکی حاد و نیز برای تشخیص زودهنگام پیش از شروع علائم استفاده کرد. رویکردهای تشخیصی توالی‌های DNA خاص شامل موارد زیر هستند: هیبریداسیون پروب (اولیگونوکلئوتیدی علامت‌گذاری شده است که توالی DNA منحصر به فرد دارد که مکمل توالی هدف است)، تکثیر توالی هدف با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR، آنالیز ریزآرایه[1] برای تشخیص چندین توالی در یک نمونه و طیف‌سنجی جرمی برای تشخیص چندشکلی تک نوکلئوتیدی یا SNP.



[1] microarray analysis

شکل-۵۲ هیبریداسیون پروب

۱-۱) هیبریداسیون مختص به DNA

منظور از هیبریداسیون در واقع همان تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته‌ی مکمل اسیدهای نوکلئیک است. در یک آزمایش تشخیصی شامل هیبریداسیون DNA، از یک پروب DNA برای شناسایی توالی DNA هدف مکمل که شناساگر بیماری است، استفاده می‌کند. پروب را با یک مولکول گزارشگر (رنگ فلوروسنت) که هیبریداسیون بین توالی هدف و پروب DNA را مشخص می‌کند، علامت‌گذاری می‌کنند. عموماً سلول‌های موجود در نمونه‌ی بالینی مانند بافت حاصل از بیوپسی یا بافت آلوده لیز[1] شده و DNA ژنومی موجود در سلول‌های لیزشده با تیمار قلیایی قوی دناتوره می‌شود تا DNA هدف تک رشته ایجاد کند. سپس شرایط مناسب دمایی و نیز قدرت یونی مناسب فراهم می شود و درنهایت پروب به محیط اضافه می‌شود تا اتصال مکملی بین پروب و DNA هدف در این شرایط مناسب ایجاد شود. پروب DNA متصل نشده با شست‌وشو حذف شده و هیبریداسیون با اندازه‌گیری فعالیت مولکول گزارشگر متصل به پروب شناسایی می‌شود. پروب هیبریداسیون مورد استفاده در تست تشخیصی باید به طور اختصاصی با توالی اسید نوکلئیک هدف هیبرید شود. جواب های مثبت کاذب (مانند تشخیص سیگنال در جایی که توالی هدف وجود ندارد) و منفی‌های کاذب (مانند نگرفتن سیگنال جایی که توالی هدف وجود دارد) به شدت کارآیی تست تشخیصی را پایین می‌آورند و می‌توانند عواقب جدی برای بیمار داشته باشند. پروب‌های اولیگونوکلئوتیدی معمولا طولی کمتر از ۱۰۰ نوکلئوتید دارند با این حال ممکن است بلندتر باشند و با آنزیمی علامت‌گذاری شوند که وقتی روی مواد خاصی اثر

[1] lysed

می‌کند، تغییر رنگ ایجاد می‌کند، یا با رنگ فلوئورسنت علامت‌گذاری شوند. پروب‌های هیبریداسیون اغلب برای تشخیص وجود پاتوژن‌های میکروبی به کار گرفته می‌شوند. مالاریا که توسط انگل پلاسمودیم فالسیپاروم[1] ایجاد می‌شود یکی از رایج‌ترین بیماری‌های عفونی است که به ویژه در نوجوانان مرگ‌آور است، که با این روش تشخیص داده می شود.

۱-۲) هیبریداسیون مختص به آلل[2]

علاوه بر بیماری‌های عفونی، پروب‌های هیبریداسیون به طور گسترده‌ای برای شناسایی آلل‌های خاص مرتبط با بیماری استفاده می‌شوند. بیماری‌های تک‌ژنی در اثر جهش در یک ژن ایجاد می‌شوند، با این وجود هر یک از تغییرات متعدد درتوالی نوکلئوتیدی طبیعی یک ژن ممکن است مسئول باشد. این مطلب را می‌توان با سیستیک فیبروزیس مثال زد که یک اختلال اتوزوم مغلوب کشنده و متداول است که تقریبا از هر ۲۵۰۰ تولد یک نفر را تحت تاثیر قرار می‌دهد. جهش‌هایی که در یک ژن به نام ژن CFTR[3] ایجاد می‌شوند، سبب نقص در انتقال یون کلر می‌شوند. در نتیجه موکوز ریه و سایر بافت‌های موکوزی ضخیم و چسبناک است و مانع عملکرد سیستم تنفسی، گوارشی و تولیدمثل می‌شود. اکنون در هر ایالت از ایالات متحده، به طور معمول نوزادان را از نظر سیستیک فیبروزیس غربال می‌کنند.

۱-۳) PCR مختص به آلل[4]

[1] Plasmodium falciparum
[2] Allele-Specific Hybridization
[3] cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)
[4] Allele-Specific PCR

اکثر تست‌های اسید نوکلئیکی مبتنی بر PCR هستند. مزایای تست‌های مبتنی بر PCR به شرح زیر است:

۱. اختصاصی بودن که تشخیص یک توالی نوکلئوتیدی خاص را در نمونه‌های پیچیده ممکن می‌کند.

۲. حساسیت بالا که تشخیص توالی های هدفی که فراوانی کمی دارند را ممکن می‌کند.

۳. وجود مرحله‌ی تکثیر که مقادیر بیشتری از توالی هدف را برای آنالیزهای اضافی مانند هیبریداسیون و توالی‌یابی تولید می‌کند.

۴. آنالیز سریع (که معمولا طی ۱ یا ۲ ساعت و یا کمتر انجام می‌گیرد)

۵. امکان انجام PCRهای چندگانه که شناسایی چندین توالی هدف در یک نمونه را ممکن می‌کند.

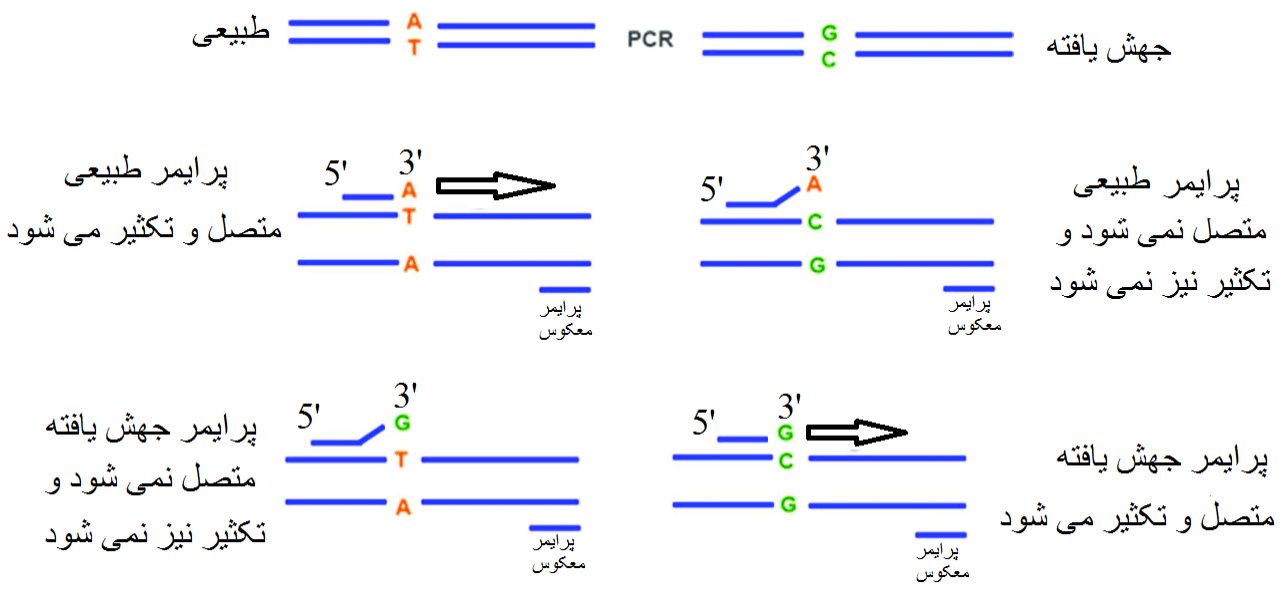
۶. هزینه‌ی پایین

PCR مرسوم بیش از چند دهه است که به طور گسترده در آزمایش‌های تشخیصی مورد استفاده قرارگرفته است. با این حال اخیراً علاوه بر تشخیص، کمّی‌سازی عامل بیماری‌زا نیز در نمونه‌ی بالینی به کمک PCR کمّی در زمان واقعی[1] ممکن شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روشی برای تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص به تعداد هزار یا میلیون‌ها نسخه است. برای انجام این واکنش از دو پرایمر (آغازگر) به نام پیشرو یا Forward و معکوس یا Reverse استفاده می شود. آغازگرها قطعات کوتاه DNA ای هستند که توالی آنها مکمل ناحیه ای کوچک در DNA هدف می باشند. اساس تکنیک PCR چرخه‌های حرارتی است که با کمک این چرخه های دمایی (گرمایی و سرمایی) آنزیم DNAپلیمراز از DNA هدف به عنوان الگویی برای همانندسازی استفاده کرده و با کمک آغازگرها آن را تکثیر می کند.

[1] quantitative real-time PCR

PCR مختص به آلل (همان PCR سیستم تقویت‌کننده‌ی مقاوم جهش[1]) چند شکلی های تک نوکلئوتیدی یا همان SNPهای شناخته شده را غربال می‌کند. در این تکنیک، پرایمرهای پیشرو متفاوت PCR برای تمایز بین آلل‌هایی که از نظر یک نوکلئوتید متفاوت هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. درواقع یک پرایمر پیشرو دقیقاً مکمل توالی DNA طبیعی است و پرایمر پیشرو دیگر به توالی متغیر حاوی SNP مربوط به بیماری، متصل می‌شود (شکل-۵۳). پرایمرهای پیشرو معمولاً طوری طراحی می‌شوند که آن نوکلئوتید دارای SNP دقیقا در انتهای ’3 پرایمر قرار گیرد (به شکل-۵۳ مراجعه شود)، از آنجاییکه اکثر پلیمرازهای مورد استفاده در PCR پرایمرهایی را که در انتهای ’3 آنها جفت‌شدگی کامل رخ نداده باشد، تکثیر نمی کنند. سومین پرایمر، پرایمر معکوس است که مکمل رشته‌ی مخالف است. هر واکنش حاوی یکی از پرایمرهای پیشرو (یا پرایمر مختص به آلل طبیعی یا پرایمر مختص به آلل حاوی SNP)، پرایمر معکوس مرسوم، نمونه‌ی DNA بیمار، DNA پلیمراز مقاوم به دما و هر ۴ دئوکسی‌ریبونوکلئیک‌اسید است. با این توصیف، تکثیر PCR تنها در حضور پرایمر پیشرویی که دقیقاً مکمل توالی هدف در نمونه‌ی بیمار است، انجام می‌شود. عدم تطابق بین پرایمر و DNA الگو از اتصال پرایمر جلوگیری کرده و از این رو از گسترش پرایمر حین سنتز DNA جلوگیری می‌کند. مزیت این روش در مقایسه با هیبریداسیون مختص به آلل که در بالا توصیف شد، این است که مراحل تکثیر و تشخیص یکی شده‌اند.

[1] PCR amplification refractory mutation system



شکل-۵۳ تصویر شماتیک از PCR مختص به آلل. برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود.

۱-۴) فناوری‌های توالی‌یابی (سکوئنسینگ) DNA

تعیین توالی، ترکیب و نظم نوکلئوتیدی در ژن و ژنوم، فناوری پایه‌ای در زیست‌فناوری پزشکی مدرن است. ژن‌های کلون‌شده یا تکثیرشده با PCR و درواقع ژنوم‌های کامل به طور معمول توالی‌یابی می‌شوند. توالی‌های DNA اغلب می‌توانند اطلاعاتی درباره‌ی عملکرد مولکول پروتئین یا RNA کدشده در اختیار محققان قرار دهند. به طور مثال اطلاعاتی پیش‌بینی‌شده از محل‌های اتصال کوفاکتور، نواحی تراغشایی، نواحی شناسایی گیرنده یا نواحی اتصالی DNA آشکار کنند. توالی‌های نوکلئوتیدی در نواحی غیرکدکننده که مولکول RNA یا پروتئینی را کد نمی‌کنند، ممکن است اطلاعاتی درباره‌ی تنظیم ژن فراهم کنند. مقایسه‌ی توالی‌های یک ژن بین افراد می‌تواند جهش‌های مرتبط با بیماری‌های ژنتیکی یا روابط بین افراد را آشکار سازد. مقایسه‌ی توالی‌های ژنی بین موجودات مختلف می‌تواند به ابداع فرضیاتی

درباره‌ی روابط تکوینی بین موجودات منجر شود. فرآیند دی دِئوکسی نوکلئوتید[1] ابداع‌شده توسط بیوشیمی‌دان انگلیسی به نام فردریک سنگر[2] یا توالی یابی سنگر بیش از چند دهه است که برای توالی‌یابی DNA مورد استفاده قرار گرفته است. این نوع توالی‌یابی شامل توالی‌یابی قطعات DNA حاوی یک یا چند ژن، همچنین ژنوم کامل بسیاری از موجودات مختلف شامل ژنوم انسان می‌شود. با این حال، علاقه به توالی‌یابی تعداد زیادی از مولکول‌های DNA در زمان کمتر و با هزینه‌ی کمتر سبب توسعه‌ی اخیر فناوری‌های جدید توالی‌یابی شده است که می‌توانند هزاران تا میلیون‌ها توالی را به طور هم‌زمان پردازش کنند. بسیاری از فناوری‌های مختلف توالی‌یابی شامل پایروسکوئنسینگ[3]، توالی‌یابی با استفاده از پایان‌دهنده‌های برگشت‌پذیر زنجیره[4] و توالی‌یابی با اتصال (لایگِیشِن)[5] ابداع شده‌اند. به طور کلی، همه‌ی این روش‌ها دو مورد زیر را دارا هستند:

- افزودن آنزیمی نوکلئوتیدها به پرایمر، براساس رابطه‌ی مکملی با قطعه‌ی DNA الگو
- تشخیص و شناسایی تک به تک آن نوکلئوتیدهای افزوده‌شده

در واقع اساس تکنیک‌های توالی‌یابی که امروزه بکار برده می شوند یکسان است و تفاوت آنها تنها در "روش" افزودن آنزیمی نوکلئوتیدها و نیز در "روش" تشخیص و شناسایی نوکلئوتیدهای افزوده‌شده، می باشد. برای مثال افزودن آنزیمی نوکلئوتیدها هم می تواند با به کارگیری آنزیم DNA پلیمراز و در نتیجه با افزودن تک به تک نوکلئوتیدها انجام شود که در این حالت توالی‌یابی همراه با سنتز توالی خواهد بود، هم می تواند با به کارگیری آنزیم لیگاز و در نتیجه با افزودن اولیگونوکلئوتیدهای کوتاه و مکمل انجام شود که در این حالت توالی‌یابی همراه با لایگیشن خواهد بود.

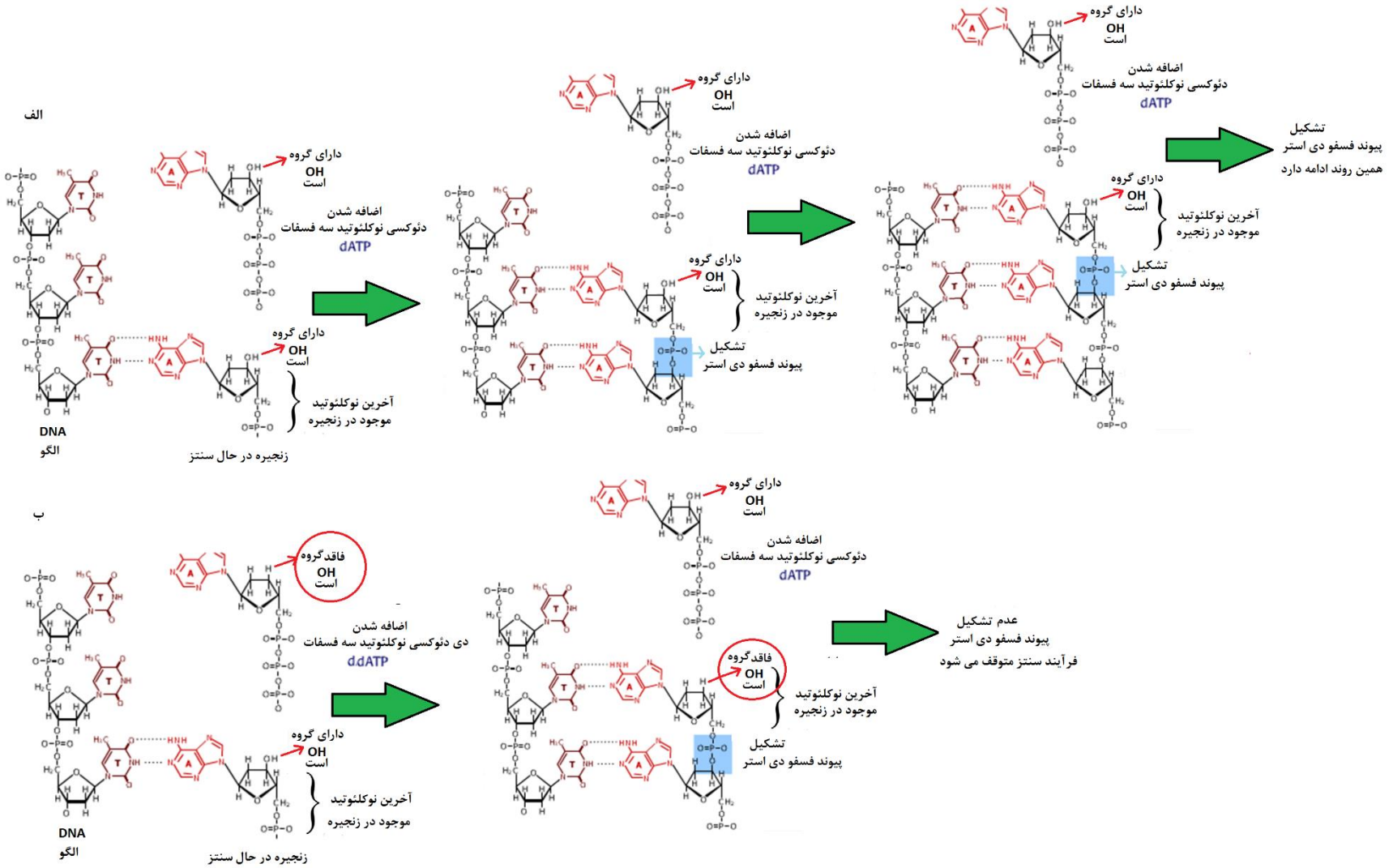
[1] dideoxynucleotide procedure
[2] Frederick Sanger
[3] pyrosequencing
[4] reversible chain terminators
[5] ligation

فرآیند دی دئوکسی نوکلئوتید

فرآیند دی دئوکسی نوکلئوتید، یکی از روش های توالی‌یابی DNA می باشد. همانطور که می دانید در حالت طبیعی سنتز (همانند سازی) رشته جدید همراه با اضافه شدن یک "دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات" به زنجیره درحال سنتز DNA است. بصورت شماتیک "دئوکسی نوکلئوتید سه فسفات" بصورت "dNTP" نمایش داده می شود که حرف N می تواند هر یک از ۴ باز باشد بنابراین چهار dNTP شامل: dTTP، dATP، dCTP و dGTP خواهند بود.

اتصال و پیوند dNTP جدید به آخرین نوکلئوتید موجود در زنجیره از نوع پیوند فسفو دی استر می باشد. بالطبع در این پیوند، یک ناحیه از dNTP با یک ناحیه از نوکلئوتید موجود در زنجیره در تعامل هستند. این ناحیه dNTP، درواقع گروه فسفات است و ناحیه نوکلئوتید موجود در زنجیره یک گروه هیدروکسیل آزاد در کربن شماره ۳ قند این نوکئوتید (3'-OH) است. بنابراین در حالت طبیعی برای تشکیل پیوند فسفو دی استر نیاز به 3'-OH در آخرین نوکلئوتید موجود در رشته است (شکل-۵۴).

حال تصور کنید از نوکلئوتیدی مصنوعی استفاده کنیم که که در موقعیت کربن 3' قند خود فاقد گروه هیدروکسیل است. این نوکلوتید مصنوعی، دی دئوکسی نوکلوتید تری فسفات (ddNTP) خوانده می شود و زمانیکه به انتهای زنجیره در حال رشد DNA اضافه شود، ساخت DNA متوقف می‌شود. چون dNTP بعدی نمی‌تواند با این ddNTP پیوند فسفو دی استر برقرار کند. بنابراین با اتصال ddNTP سنتز متوقف می شود و چون هر ddNTP (ddTTP، ddATP، ddCTP و ddGTP) با یک برچسب متفاوتی مشخص است توالی DNA الگو مشخص می شود.


الف
دارای گروه OH است
اضافه شدن دئوکسی نوکلئوتید سه فسفات dATP
آخرین نوکلئوتید موجود در زنجیره
تشکیل پیوند فسفو دی استر
همین روند ادامه دارد
DNA الگو
زنجیره در حال سنتز
ب
فاقد گروه OH است
اضافه شدن دی دئوکسی نوکلئوتید سه فسفات ddATP
عدم تشکیل پیوند فسفو دی استر
فرآیند سنتز متوقف می شود

شکل-۵۴ فرآیند دی دئوکسی نوکلئوتید. الف) در حالت طبیعی با اضاغه شدن dNTP به زنجیره در حال سنتز، پیوند فسفو دی استر جدیدی تشکیل می شود. ب) زمانیکه ddNTP به زنجیره اضافه شود دیگر امکان تشکیل پیوند فسفو دی استر نبوده و سنتز متوقف می شود.

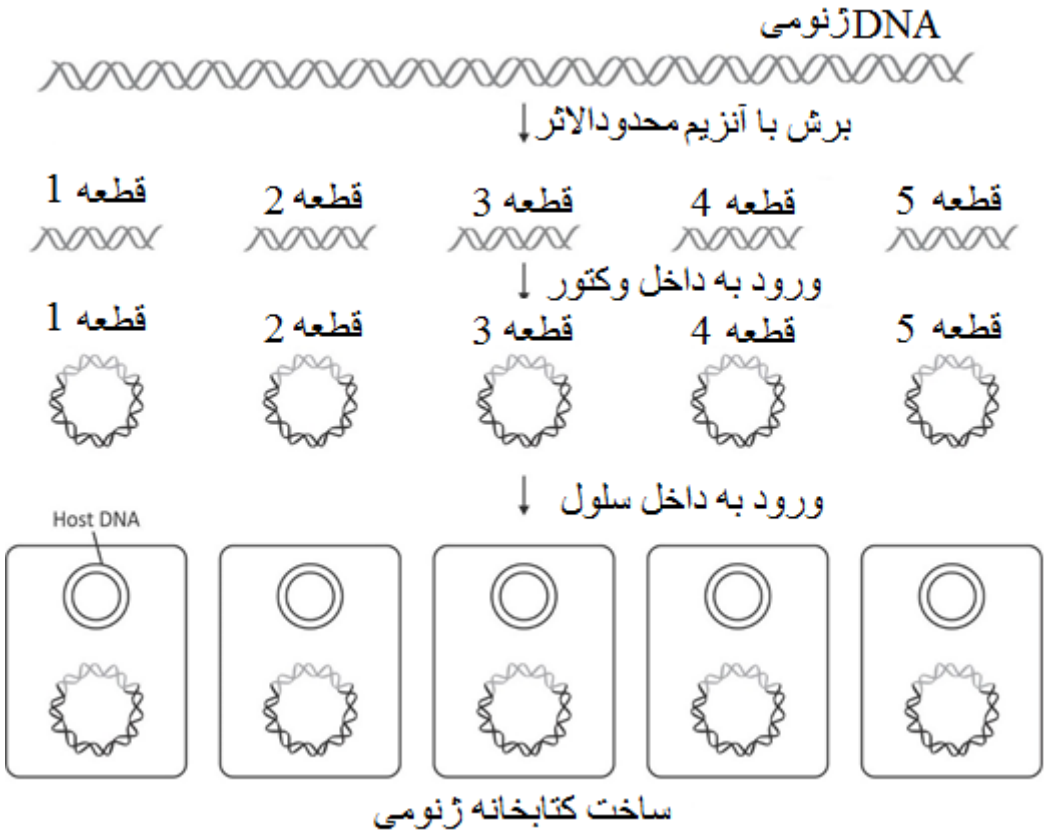
برای درک این روش دانستن این دو نکته کافی است:

۱. افزودن یک دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) جدید به رشته‌ی DNA درحال رشد، نیاز به یک گروه هیدروکسیل در کربن '3 آخرین نوکلئوتید دارد.

۲. اگر یک نوکلئوتید مصنوعی که در موقعیت کربن '3 قند خود، فاقد گروه هیدروکسیل است به انتهای زنجیر در حال رشد اضافه شود، ساخت DNA متوقف می‌شود.

برای به دست آوردن کل توالی ژنومی یک موجود نیاز به تولید کتابخانه‌های ژنومی است. یک کتابخانه‌ی ژنومی مجموعه-ای از قطعات DNA است که هریک درون حاملی کلون شده است. این قطعات می تواند نشان‌دهنده‌ی DNA ژنومی کامل موجود باشد و یا توالی cDNA (DNA مکمل با mRNA) حاصل از استخراج mRNA در یک نمونه باشد. سنتز DNA از یک الگوی mRNA، از طریق رونویسی معکوس انجام می شود که به آن DNA مکمل (cDNA) می گویند. از کتابخانه‌ی cDNA می توان برای شناسایی همه‌ی ژن‌هایی که تحت شرایطی ویژه، به طور فعال در سلول‌های باکتریایی یا یوکاریوتی بیان می‌شوند یا برای شناسایی ژن‌های یوکاریوتی که توالی یا عملکرد ویژه‌ای دارند، استفاده کرد. کتابخانه‌ی ژنومی می تواند حاوی کلیه قطعات مربوط به یک ژنوم کامل استخراج شده از سلول‌ها یا از بافتی گرفته شده از گیاه یا جانور، در یک کشت خالص باکتریایی باشد (شکل-۵۵). همچنین کتابخانه‌ی ژنومی می‌تواند حاوی ژنوم‌های تمام موجودات موجود در یک نمونه‌ی پیچیده مانند جمعیت میکروبی در بافت انسانی باشد. به چنین کتابخانه‌ای، کتابخانه‌ی

متاژنومی می‌گویند. از کتابخانه‌هایی که محتوی تمام ژنوم‌ها[1] هستند، می توان برای به دست آوردن توالی ژنوم یک موجود خاص، یا شناسایی ژن‌هایی که توالی‌های خاص دارند یا عملکرد به خصوصی را کد می‌کنند یا با مولکول‌های دیگر برهم‌کنش دارند، استفاده کرد. توضیحات تکمیلی در خصوص کتابخانه ژنومی در "کتاب مقدمه زیست فناوری" ذکر شده است.



شکل-۵۵ ابتدا ژنوم قطعه قطعه می شود و هر قطعه در یک وکتور (حامل) قرار داده می شود. درنهایت این وکتورها به سلول باکتری (میزبان) انتقال داده و درمراحل بعد با روش های مختلف توالی یابی، توالی یابی می شوند.

[1] Whole-genome libraries

تعیین توالی ژنوم، تنها اولین قدم در فهم یک موجود زنده است. مراحل بعدی شامل تشخیص خصوصیات کدشده در توالی و بررسی عملکردهای زیستی کدشده در RNA، پروتئین‌ها و عناصر تنظیمی می‌شود که فیزیولوژی و اکولوژی موجود زنده را تعیین می‌کنند. زمینه‌ی مطالعاتی که اطلاعات وسیعی از توالی‌های ژنومی را تولید، آنالیز و مدیریت می‌کند، ژنومیکس نام دارد.

داده‌های توالی در پایگاه‌های داده ذخیره می‌شود تا بتوان با استفاده از الگوریتم‌های کامپیوتری اطلاعات توالی را بازیابی کرد (بیوانفورماتیک یا داده‌کاوی[1]). پایگاه‌های داده‌ی عمومی مانند GenBank (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[2])، پایگاه داده‌ی توالی نوکلئوتیدی در آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی اروپا[3] و بانک داده‌ی DNA در ژاپن، داده‌های توالی را از محققان منفرد و از موسسات بزرگ توالی‌یابی می‌گیرند و داده‌ها را به عنوان بخشی از همکاری بین المللی پایگاه داده‌ی توالی نوکلئوتید به اشتراک می‌گذارند. بنابراین می‌توان توالی‌ها را از این پایگاه داده ها بازیابی کرد. چندین پایگاه داده‌ی تخصصی نیز به طور مثال برای ذخیره‌ی توالی ژنوم یک موجود زنده، توالی‌های کدکننده‌ی پروتئین، توالی‌های تنظیمی، توالی‌های مرتبط با بیماری‌های ژنتیکی انسانی، داده های مرتبط با بیان ژن، ساختارهای پروتئینی، برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و انواع دیگری از داده‌ها وجود دارند.

مقایسه‌های ژنومی بین موجودات زنده‌ای که خویشاوندی دوری با هم دارند، دانشمندان را قادر می‌سازد درمورد روابط تکاملی پیش‌بینی کنند. به طور مثال پروژه‌ی 10K ژنوم[4] با هدف توالی‌یابی و آنالیز ژنوم ۱۰هزار گونه‌ی مهره‌داران است. مقایسه‌ی این توالی‌ها، به درک ما از تغییرات ژنتیکی منجر به ایجاد تنوع در مورفولوژی، فیزیولوژی و رفتار در این گروه

[1] data mining, or bioinformatics
[2] National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD
[3] the European Molecular Biology Lab Nucleotide Sequence Database
[4] Genome 10K Project

از حیوانات کمک خواهد کرد. هدف دیگر آنالیز ژنومیک، فهم عملکرد ویژگی‌های توالی است. عملکرد ژن را گاهی می‌توان به وسیله‌ی الگوی رونویسی استنباط کرد.

حوزه بیوتکنولوژی صنعتی، یک صنعت مهم در آمریکا است و براساس تخمین‌ها، نزدیک به دو درصد از تولید ناخالص داخلی آمریکا را تشکیل می‌دهد که هر سال ۱۵ درصد رشد می‌کند. در طول ۴۰ سال گذشته، پیشرفت در فناوری‌های توالی‌یابی منجر به افزایش چشم‌گیر دقت آزمایشات و ظرفیت کلی تولید شده است. این پیشرفت‌ها باعث گسترش دامنه تحقیقات ژنتیکی و ژنومی شده و سبب شده است تا این دو حوزه (بیوتکنولوژی صنعتی و پزشکی) از مفاهیم آزمایشگاهی به کاربردهایی عملی و واقعی تبدیل شوند.

امروزه چنین تلاش‌های تحقیقاتی در ایجاد روش‌های آزمایشگاهی تشخیصی بالینی که قادر به گردآوری اطلاعاتی خاص درباره‌ی خصوصیات ژنتیکی یک فرد هستند، مشارکت دارند. مهمترین مسئله در ابداع روش های نوین تشخیص، پیدا کردن ارتباط بین "وضعیت سلامتی فرد" که می تواند در حالت بیماری یا در پاسخ به دارویی باشد، و "توالی ژنتیکی خاصی" که اغلب دچار جهش شده است، می باشد. به محض این که این ارتباط از نظر بالینی کشف و برقرار شود، می‌توان براساس فناوری‌های حاضر، به سرعت آزمایشی ابداع کرد. بنابراین روش‌های واقعی که توسعه پیدا می‌کنند، اغلب مبتنی بر اندازه‌گیری‌های جدید یا فناوری‌های نمونه‌برداری نیستند، بلکه مبتنی بر ارتباطات تازه کشف شده بین ژنوتیپ و فنوتیپ هستند.

از طریق این آزمایش‌ها، یک پزشک می‌تواند اطلاعات زیادی را از جمله طبع فرد برای ابتلا به بیماری‌های پیچیده با گذر زمان، مانند سرطان، بیماری‌های قلبی، آسم و دیابت را درک کند و به وی این امکان را می‌دهد تا به فرد، تغییراتی در سبک زندگی را توصیه کند تا خطراتی که سلامت فرد را در آینده تهدید می‌کنند به حداقل رسانده یا مراقبت پزشکی

را به حداکثر برساند. در نمونه‌هایی که بیماری ممکن است همچنان وجود داشته باشد، برخی آزمایش‌ها در تشخیص روش‌های کارآمدتر درمانی که مخصوص آن فرد هستند، کارآیی دارند. تست‌های تشخیصی از تست‌های منفرد گسترش می‌یابند، به این صورت که یک ژن و اثرات آن بر سایر ژن‌ها را ارزیابی می‌کنند که درک آن‌ها راحت‌تر بوده و می‌توان با آن‌ها نمونه‌ها را در سطح ژنومی ارزیابی کرد و قادرند چندین عامل ژنتیکی را آنالیز کنند.

این آزمایش‌ها دارایی‌های ارزشمندی را برای شرکت‌هایی که آن‌ها را توسعه می‌دهند و به شکل محصولات مصرفی به بازار عرضه می‌کنند، نشان می‌دهد. درحال حاضر تست‌های تشخیصی به سه روش مختلف در معرض دید عموم قرار می‌گیرند: سرویس‌های توسعه‌ی تست‌های آزمایشگاهی[1]، کیت‌های تشخیصی داخل آزمایشگاه و تست‌هایی که به طور مستقیم به مصرف‌کننده فروخته می‌شوند. جای تعجب نیست که این شرکت‌ها از طریق قانون مالکیت معنوی ("IP") [2] به دنبال حمایت قانونی قوی برای سرمایه‌گذاری خود هستند. به عنوان مثال بسیاری از شرکت‌ها برای اختراعات خود، پتنت‌هایی (حق ثبت اختراع) دارند که به آن‌ها مزیت می‌دهد تا با مکانیسمی قانونی جلوی استفاده‌ی دیگران از تلاش‌های تحقیق و توسعه‌ی خود را بگیرند. با این حال این حمایت‌ها گاهی بر تلاش‌های تحقیق و توسعه‌ی دیگران در این زمینه‌ها، تأثیر منفی می‌گذارد.

تحقیقات نوظهور در تشخیص‌های ژنتیکی و ژنومیک، چالش‌های منحصر به فردی را برای در نظر گرفتن IP ارائه می‌دهد. تغییر در تحقیقات آزمایشگاهی به دلیل اعمال حق ثبت اختراع یا اجرای مجوز می‌تواند نشان‌دهنده‌ی عدم حمایت از طریق مالکیت معنوی باشد تا نوآوری‌هایی را که این حمایت‌ها به هدف ارتقای آن‌ها ایجاد می‌کند، تحریک کند. این

[1] Laboratory Developed Test Services
[2] intellectual property ("IP")

مسائل در مرکز تلاش‌های تحقیقاتی برای همکاری بین دانشگاه ها و بخش‌های صنعت قرار دارد. درواقع به دنبال درک روش‌های نوآوری و ابداعی با کیت‌های تشخیص ژنتیکی هستند و به طوری که موانع استفاده و نوآوری در آن تسهیل یابد. گاهی دو واژه‌ی "ژنتیک" و "ژنومیکس" در چارچوب آزمایش ژنتیکی به جای یکدیگر به کار برده می‌شوند. به طور خاص هردو واژه گاهی برای اشاره به آزمایش ژن‌هایی خاص یا فهرست کردن آزمایش‌های متعدد برای ژن‌های منفرد به کار می‌روند. اگر چه توجه داریم که این اصطلاحات با یکدیگر تفاوت دارند اما از این اصلاحات به صورت مترادف نیز استفاده می‌شود، مگر در مواردی که به طور ویژه ذکر شده باشد که با هم متفاوت هستند.

تفاوت بین این واژگان بسیار مهم است زیرا به مفاهیم مشخصی دلالت دارند. این واژگان اغلب با هم اشتباه گرفته می‌شوند؛ زیرا تفاوت بین روش‌های تشخیصی ژنتیکی و ژنومیکی به ندرت در همه موارد به خوبی مشخص شده است.

تفاوت‌های بین ژنتیک و ژنومیکس

در بیانی ساده می‌توان گفت ژنتیک مطالعه‌ی علمی ژن‌های منفرد و اثرات آن‌ها است. ژن‌ها واحدهای وراثتی هستند که سازه‌های مورد نیاز برای ساخت پروتئین‌ها را حمل می‌کنند که فعالیت‌های سلول‌ها و عملکردهای بدن را هدایت می‌کنند. ژنتیک همچنین واژه‌ای است که به مطالعه‌ی ژن‌ها و نقش آن‌ها در وراثت اطلاق می‌شود. وراثت، مسیر انتقال صفات یا وضعیت‌های مشخص از یک نسل به نسل دیگر است. ژن‌ها روی صفاتی مانند مو و رنگ چشم همچنین سلامتی و ایجاد بیماری تأثیر می‌گذارند. ژنتیک بخش عمده‌ای از ظاهر فرد و وضعیت سلامتی‌اش را تعیین می‌کند. عوامل محیطی همچنین در آن نقش دارند. بسیاری از اختلالات و بیماری ها در بدن انسان مربوط به عملکرد غیرمعمول ژن‌ها

است. مانند بیماری‌های تک‌ژنی شامل سیستسک فیبروزیس[1] و فنیل کتونوریا[2]. برای مطالعه درباره‌ی نمونه‌های بیشتر به مؤسسه‌ی بین‌المللی تحقیقاتی ژنوم انسان و مراکز پیشگیری و کنترل بیماری مراجعه کنید.

بنابراین تست ژنتیکی یا تشخیصی همان تست ژن‌های منفرد با ارزیابی نمونه‌ای نسبتاً کوچک و حاوی DNA به منظور تعیین ژنوتیپ و شناسایی ناهنجاری‌های ژنتیکی شناخته‌شده در ارتباط با بیماری است. به علاوه با این تست‌ها می‌توان پیش‌آگهی بیماری، پاسخ‌های بالقوه به دارودرمانی و سایر عوامل مربوط به وضعیت سلامتی ارائه‌دهنده‌ی نمونه را تعیین کرد.

ازطرف دیگر "ژنومیکس" واژه‌ای تقریباً جدید است که مطالعه ژن‌ها و عملکردشان است. در واقع مطالعه‌ی همه‌ی ژن‌های یک فرد، همچنین برهم‌کنش‌های این ژن‌ها با ژن‌های دیگر و با محیط زیست فرد است. ژنومیکس شامل مطالعه‌ی علمی بیماری‌های پیچیده مانند حمله‌ی قلبی، آسم، دیابت و سرطان می‌شود؛ زیرا این بیماری‌ها بیشتر به دلیل ترکیبی از عوامل ژنتیکی و محیطی رخ می‌دهند. ژنومیکس احتمالات درمانی همچنین روش‌های تشخیصی جدیدی را برای برخی بیماری‌ها پیشنهاد می‌دهد. بیوانفورماتیک، آنالیز ژنتیکی، اندازه‌گیری بیان ژن و تعیین عملکرد ژن، ابزارها و روش‌های اصلی مرتبط با مطالعات ژنومیکس هستند. اطلاعات بیشتر در سایت www.Genome.gov و در منابع سلامتی و ژنومیکس www.CDC.gov موجود است.

با این حال به نظر می‌رسد، از عبارت"تست ژنتیکی" و "تست ژنومیک" به نحوی متفاوت از معانی علمی خود، استفاده می‌شود. اکثر آزمایش های ژنومی که امروزه در دسترس است، برپایه و اساس نسل دوم توالی‌یابی ژنوم هستند. امروزه

[1] cystic fibrosis
[2] PKU (phenylketonuria)

این نوع روش تشخیصی به بررسی و آزمایش قطعاتی از ژنوم کامل یک انسان، اطلاق می‌شود. بنابراین چند ژن ارزیابی می‌شود. با وجود این که توالی‌یابی ژنوم بطور کامل امکان‌پذیر است، ولی آزمایشات ژنومی تقریباً گران هستند زیرا واژه‌ی"آزمایش ژنومیک" به آزمایشاتی اطلاق می‌شود که در آن‌ها حتی پروتئین‌ها، قطعات یا کل ژنوم مورد آزمایش قرار می‌گیرند.

شاید "آزمایشات چندگانه‌ی ژنتیکی" واژه مناسب‌تری برای این نوع تشخیص باشد؛ زیرا نشان‌دهنده‌ی تشخیص‌های ژنتیکی هستند که بطور موازی بوده و بازدهی نسبتاً بالایی دارند، اما برپایه‌ی یک توالی یابی کامل ژنومی نیستند. با آزمایشات ژنتیکی چندگانه می‌توان نتایج بسیار بیشتری نسبت به آزمایشات ژنتیکی ساده بدست آورد. اغلب این آزمایشات با استفاده از "ریزآرایه‌ها" (که گاهی تراشه‌های SNP یا تراشه‌های ژن نیز نامیده می شوند) یا با "نسل دوم توالی‌یابی DNA با بازدهی بالا" (که معمولا نسل بعدی توالی‌یابی (NGS[1]) نامیده می شوند) چندین ژن از یک ژنوم، یا صدها یا هزاران SNP را از یک نمونه‌ی ژنوم توالی‌یابی می‌کنند. ریزآرایه‌ها (در ادامه توضیح داده خواهند شد) به طور گسترده در تشخیص‌های ژنومی که برای بررسی پروفایل‌های خطر در بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی طراحی شده‌اند، بکار برده می شود.

همانطور که در مبحث بیماری ها اشاره شد لزوما یک بیماری ژنتیکی در اثر نقص در یک ژن خاص بروز نمی کند و وجود چندین ژن می تواند مرتبط با ریسک ابتلا و درنهایت منجر به آن بیماری شود. یافتن این ژن ها خود معضلی برای محققین است که بیوتکنولوژی پزشکی در این حیطه فعالیت داشته و انواع این الگوهای وجود ژن ها (پروفایل‌های ژن) و الگوهای بیان ژن ها (پروفایل‌های بیان) را برای بیماری های مختلف معرفی کرده است. بیوتکنولوژی پزشکی بر مبنای

[1] Next Generation Sequencing

این پروفایل ها نیز روش های تشخیصی بسیاری پایه گذاری کرده است و درنتیجه به پیش آگهی (و یا درمان) افراد با ریسک خطر ابتلا (و یا مبتلا) کمک کرده است.

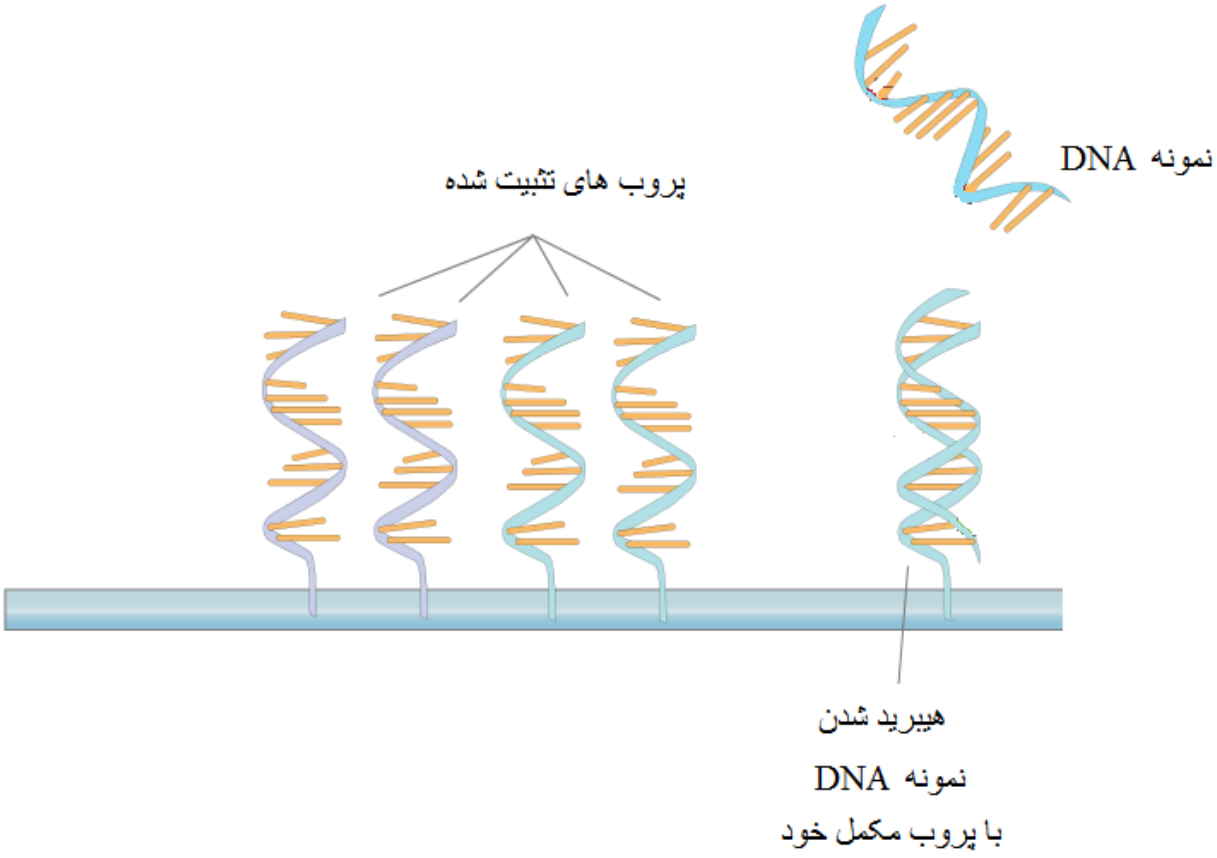
آزمایشات ژنومی برای بیماری‌های پیچیده‌تری که چندین ناهنجاری ژنتیکی سبب بروزشان می‌شود، بسیار کارآمد هستند. از این نظر، آزمایشات ژنومی بررسی "پروفایل‌های جامع خطر ژنتیکی" برای بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی یا "پروفایل‌های ژنتیکی هدفمند" برای وضعیتی (بیماری) خاص را فراهم می‌کنند. آسم، بیماری قلبی، اوتیسم، سرطان و فشارخون بالا مثال‌هایی از بیماری‌هایی هستند که توسط چندین اختلال ژنتیکی ایجاد می‌شوند.

بنابراین چگونه می‌توان تعیین کرد که شرکتی که ارائه‌دهنده تست‌های ژنتیکی است، آزمایشی که ارائه می‌دهد بر پایه چندین ژن است یا یک آزمایش ژنومی؟ بسیاری از شرکت‌ها و آزمایشگاه‌ها در وبسایت خود، درباره‌ی برخی از زمینه‌های علمی خدمات ارائه شده، توضیحاتی را بیان می کنند. باید توجه داشت که معمولاً البته نه همیشه، یک سرویس ارائه دهنده‌ی آزمایش ژنتیکی، تست ژنومیکی را (یعنی تمام ژنوم را توالی‌یابی کند) با قیمت پایین عرضه نمی‌کند. این آزمایشگاه‌ها ممکن است آزمایش‌های تک یا چند ژنی را ارائه می‌دهند و نتایج آن را در یک گزارش ترکیب می‌کنند. بعضی آزمایشگاه‌ها هم هستند که توالی‌یابی کل ژنوم را ارائه می‌دهند اما قیمت این آزمایشات از ده‌ها هزار تا صدها هزار دلار آمریکا متغیر است.

۱-۵) ریزآرایه‌های DNA

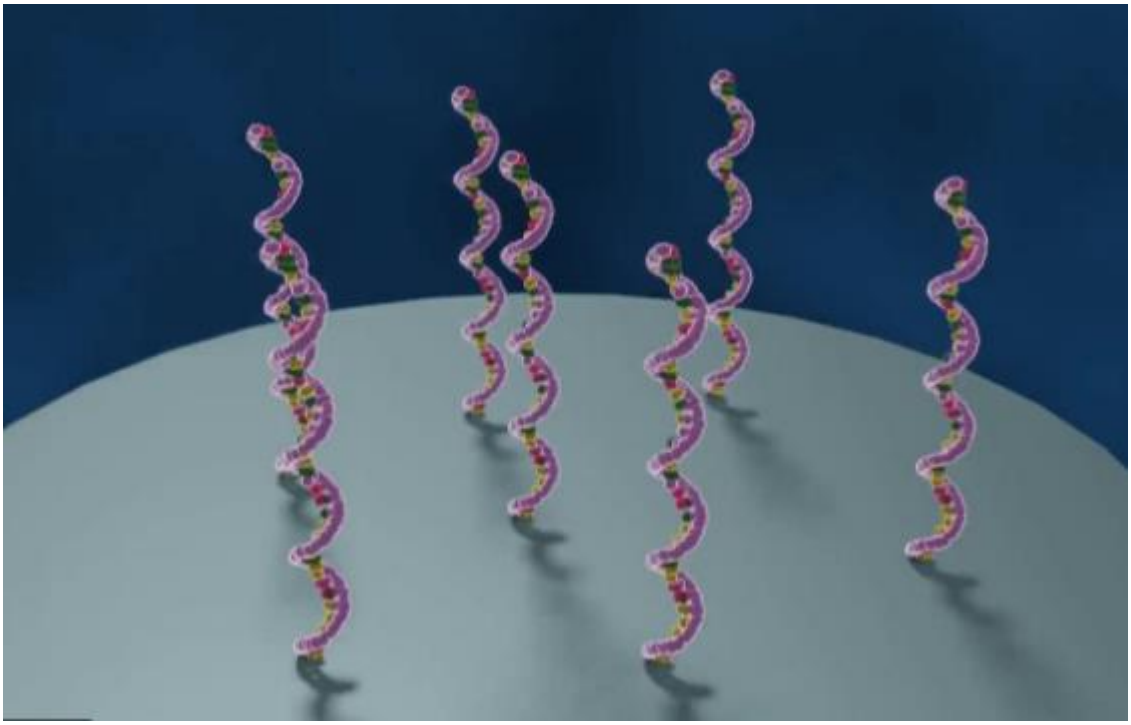
این تکنیک نیز مانند سایر روش های ذکرشده، برای تشخیص بیماری ها بر پایه DNA استوار است. آزمایش ریزآرایه‌ی DNA (تراشه DNA یا تراشه‌ی ژن) شامل نمونه‌ی اسید نوکلئیک (هدف) از سلول یا بافت است که با توالی‌های DNA

تک‌رشته (کاوشگر یا پروب[1]) که روی سطحی جامد آرایش یافته اند، هیبرید شده است. بسته به هدف آزمایش، پروب های موجود در ریزآرایه ممکن است نمایانگر کل ژنوم، یک کروموزوم منفرد، نواحی انتخاب‌شده‌ی ژنوم یا نواحی کدکننده‌ی انتخابی از یک یا چند موجود زنده‌ی مختلف باشند. برخی از ریزآرایه‌های DNA حاوی مجموعه‌ای از اولیگونوکلئوتیدهای پروب هستند که معمولاً نمایانگر هزاران ژن است که به طور مستقیم روی یک سطح جامد سنتز می‌شوند.



شکل-۵۶ نحوه هیبرید DNA هدف به پروب

[1] probe



شکل-۵۷ ریزآرایه‌های DNA حاوی مجموعه‌ای از اولیگونوکلئوتیدهاست که به طور مستقیم روی یک سطح جامد قرار تثبیت شده اند

هزاران کپی از یک اولیگونوکلئوتید با توالی نوکلئوتیدی خاص و یکسان ساخته شده و سپس در محل از پیش تعیین شده‌ای روی سطح آرایه قرار داده می‌شوند (سلول کاوشگر). کاوشگرها معمولاً ۲۰ تا ۷۰ نوکلئوتید طول دارند، با این حال می‌توان از کاوشگرهای بلندتر هم استفاده کرد و معمولاً چندین کاوشگر با توالی‌های مختلف برای هر ژن به منظور کاهش خطا در ریزآرایه وجود دارند. کاوشگرها به طور اختصاصی برای هدف خود طراحی شده‌اند تا از هیبریداسیون با توالی‌های غیرهدف اجتناب شود و دمای اتصال مشابه داشته باشند به طوری که تمام توالی‌های هدف در شرایطی یکسان به کاوشگر مکمل خود متصل شوند. یک آرایه‌ی کامل اولیگونوکلئوتیدی ژنومی ممکن است حاوی بیش از ۵۰۰ هزار کاوشگر باشد که نمایانگر بیش از ۳۰ هزار ژن هستند.

در بیشتر آزمایش‌های بیان ژن که از ریزآرایه‌ها استفاده می‌شود، mRNA از سلول‌ها یا بافت‌ها جداشده و به عنوان الگویی برای ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس قرار می‌گیرد. معمولاً mRNA از دو یا چند منبع استخراج می‌شود برای مثال بافت سالم و بیمار یا سلول‌های رشدیافته در شرایط متفاوت، که نحوه بیان آنها نسبت به هم مقایسه می‌شود. cDNA مربوط به هر منبع را با فلوروفور متفاوت نشاندار می‌کنند. با درج نوکلئوتیدهای نشاندارشده با رنگ فلورسانت طی سنتز cDNA، توالی cDNA حاصل، نشاندار می شود.

توالی‌یابی RNA

درباره تکنیک های تشخیص مبتنی بر اسید نوکلئیک توضیح دادیم و فناوری‌های توالی‌یابی DNA و ریزآرایه‌های DNA را بعنوان زیر مجموعه آن بیان کردیم. لازم است در اینجا ذکر کنیم که گاهی این تشخیص در سطح RNA است. بنابراین می تواند شامل توالی‌یابی و ریزآرایه نیز باشد.

توالی‌یابی RNA و تکنیک ریزآرایه‌های RNA به منظور تشخیص و کمّی‌سازی مجموعه‌ای کامل از رونوشت‌های ژنی تولیدشده در سلول‌ها در مجموعه شرایطی خاص، استفاده می‌شود. به علاوه توالی‌یابی RNA نقطه‌ی آغاز و پایان ژن‌ها را مشخص می‌کند، تغییرات پس از ترجمه را مانند تنوع در برش اینترونی[1] که منجر به تنوع در پروتئین‌ها می‌شود، آشکار می‌سازد و تفاوت‌های موجود در توالی نوکلئوتیدی یک ژن را در میان نمونه‌ها شناسایی می‌کند. البته برخلاف تجزیه وتحلیل ریزآرایه (چه DNA و چه RNA)، در این رویکرد (یعنی توالی‌یابی RNA) نیاز به دانش قبلی ازتوالی ژنوم ندارد. همچنین در روش ریزآرایه‌های DNA ممکن است دقت اندازه گیری برای ژن هایی که تکرار زیاد یا بیان زیاد

[1] intron splicing

دارند کم باشد (مثلاً نگرانی مربوط به اشباع پروب ها در ریزآرایه‌های DNA وجود دارد). در این رویکرد این مشکل نیز رفع شده است. به طور سنتی، رویکردهای تعیین توالی RNA به تولید کتابخانه‌های cDNA از RNA جداشده و سپس تعیین توالی این قطعات درج شده در وکتور (کلون شده) با استفاده از روش دی دئوکسی نوکلئوتید نیاز است. تحولات جدید در فناوری‌های تعیین توالی، نیاز به تهیه‌ی کتابخانه‌ی کلون‌شده را هموار و توالی‌یابی cDNA را با ظرفیت بالا امکان‌پذیر کرده است. همانند ژنومیکس و پروتئومیکس مبحث دیگری بنام ترانسکریپتومیکس وجود داد که در ارتباط با کل محتوای ترانسکریپ (رونوشت یا mRNA) است.

ترانسکریپتومیکس[1] نوعی مطالعه‌ی "کیفی"(تشخیص این که چه ژن‌هایی بیان می‌شوند) یا "کمی" (سنجش میزان تغییرات در سطوح رونویسی ژن‌ها و تعیین الگوهای رونویسی ژن) است. در واقع ترانسکریپتومیکس (مشخص کردن بیان و رونویسی ژن‌ها) با هدف اندازه‌گیری سطوح رونویسی ژن‌ها در مجموعه‌ای از شرایط خاص و براساس یک ژنوم کامل انجام می‌گیرد. رونویسی ممکن است به عنوان تابعی از شرایط پزشکی، به عنوان نتیجه‌ی جهش‌ها، در پاسخ به عوامل طبیعی یا سمی در سلول‌ها یا بافت‌های مختلف یا در زمان‌های مختلف حین فرآیندهای زیستی همچون تقسیم سلولی یا تکوین یک موجود زنده، ارزیابی شود. اغلب هدف مطالعات بیان ژن، شناسایی ژن‌هایی است که در پاسخ به تغییر شرایطی خاص، بیان آن ها بالا یا پایین می‌رود. آنالیز ریزآرایه‌ی RNA و رویکرد جدید با نام نسل بعدی توالی‌یابی RNA با ظرفیت بالا[2]، دو رویکرد آزمایشگاهی عمده برای اندازه‌گیری سطوح رونویسی RNA برپایه‌ی سراسر ژنوم هستند.

[1] Transcriptomics
[2] high-throughput next-generation RNA sequencing

کاربردهای آزمایش ژنتیکی

آزمایشات ژنتیکی از طریق روش‌های مختلف آزمایشی برپایه تکنیک های مختلف زیست فناوری پزشکی انجام می‌شوند. در اصل برای تشخیص، از روش‌های بیوشیمیایی، سیتوژنتیک، مولکولی یا ترکیبی از آن‌ها برای آنالیز DNA، RNA، کروموزوم‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها استفاده می‌شود. آزمایشات ژنتیکی ممکن است به سه شکل انجام بگیرد: "آزمایش‌های بالینی"، "تحقیقاتی"، "آزمایش‌های مصرف کننده[1]" (یا آزمایش های تفریحی[2]: آزمایش هایی هستند که خودکاربر می تواند به راحتی و بطور مستقیم آن را انجام دهد). توجه داشته باشید که این اصطلاحات از روش‌های فنی مورد استفاده در یک روش تشخیصی متمایز هستند. این اصطلاحات علاوه بر افزایش مراحل، کاربرد، اعتبار بالینی یا هدف یک آزمایش را توضیح می‌دهند.

بزرگترین دسته‌ی تست‌های تشخیصی، آن‌هایی هستند که برای کاربردهای بالینی، برای مثال در طول درمان یا تشخیص بیماری‌ها و در طول مراقبت های پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بیشتر مواقع، پزشکان متخصص این آزمایش ها را تجویز می‌کنند. در ادامه دامنه‌ای از اهداف این آزمایشات توضیح داده می شوند.

[1] consumer
[2] Recreational

تشخیص: از این آزمایشات برای تأیید علائم یا نشانگان یک بیماری ژنتیکی در فرد استفاده می‌شود. این تست‌ها برای تشخیص یک بیماری خاص طراحی شده‌اند. این بیماری‌ها شامل سندروم داون و دیستروفی عضلانی دوشن و بیماری-هایی با اختلالات ژنتیکی خاص هستند. اگر علائمی مانند خصوصیات جسمی مربوط به سندروم داون بروز کند، می‌توان از یک آزمایش ژنتیکی استفاده کرد تا مشخص شود که آیا بیمار، کپی اضافه‌ی کروموزوم شماره‌ی ۲۱ را دارد یا خیر.

پیش‌بینی: یک تست پیش‌بینی ژنتیکی پیش از بروز هرگونه علامتی، مستعد بودن یک فرد در ابتلا به یک بیماری را نشان می‌دهد. این نوع از آزمایشات را برای سرطان‌هایی خاص مانند سرطان سینه، روده‌ی بزرگ و تخمدان استفاده می‌کنند. با نتایج این آزمایش‌ها می‌توان با درصدی خطا، احتمال ابتلای فرد در طول زندگی به این بیماری‌ها را پیش‌بینی کرد. معمولاً عوامل خارجی مانند سن و سبک زندگی برای تقویت دقت آزمون درنظر گرفته می‌شود.

پیش‌علامت[1]: تست‌های مربوط به پیش‌علامت شبیه به تست‌های پیش‌بینی هستند. این تست‌ها برای شناسایی خطر ابتلا به بیماری‌های ژنتیکی که در یک خانواده وجود دارند اما علائمی نشان نمی‌دهند، به کار می‌روند. بیماری‌هایی نظیر هانتینگتون و گریوز[2] از جمله مواردی هستند که معمولاً در تست‌های پیش علامت، غربال می‌شوند. نتایج تست به پزشکان این امکان را می‌دهد که توصیه‌های پزشکی داده و اقدامات پیشگیرانه انجام بدهند تا احتمال وقوع را کاهش داده و شانس درمان موفق را بالا ببرند.

غربالگری/حامل[3]: با این‌گونه تست‌ها می‌توان تعیین کرد که آیا افراد تغییراتی در ژن‌های خود دارند که با بیماری اتوزوم مغلوب مرتبط هستند. به اختصار، اگر هر یک از دو والد یک کپی از یک کروموزوم تغییریافته را داشته باشند، فرزندشان

[1] Presymptomatic
[2] Grave's disease
[3] Preconception/Carrier

به احتمال بیشتری دچار بیماری مانند سیستیک فیبروزیس می‌شود. اگر فرزند، هر دو کپی از کروموزوم‌های تغییریافته از والدین خود را به ارث ببرد، به احتمال بیشتر/یا حتما به یک بیماری خاص مبتلا می‌شود.

قبل از تولد[1]: از تست‌های پیش از تولد برای تست جنین، حین بارداری استفاده می‌شود. این تست‌ها به ویژه برای مواقعی که احتمال می‌رود جنین دچار بیماری باشد، کارآمد هستند. برای نمونه اگر هردو والد، حامل ژن‌های مربوط به اختلال ژنتیکی اتوزوم مغلوب باشند یا در جایی که تاریخچه‌ی خانوادگی احتمال ابتلا به هانتینگتون یا بیماری گریوز را نشان می‌دهد، این تست توسط پزشک معالج پیشنهاد می شود.

تازه متولدشده[2]: نوزادان تازه متولد شده هم ممکن است پس از تولد یا در سنین پایین وقتی که شرایط نشان‌دهنده‌ی احتمال ابتلا باشد، غربال شوند. برای مثال با یک تست ساده، نمونه‌های خون را برای یافتن ژن‌های حذف شده یا ناهنجار یا وجود بیماری های مختلف مانند فنیل‌کتونوریا (PKU) (نوعی بیماری متابولیکی است و می‌تواند سبب عقب‌ماندگی شدید ذهنی شود) بررسی می‌کنند.

دارویی[3]: غربالگری دارویی نوعی تست ژنتیکی است که ممکن است پاسخ یک فرد را به انواع خاصی از داروها نشان دهد. این نوع تست به متخصصان کمک می‌کند تا بهترین روش‌های درمانی را پس از تشخیص بیماری انتخاب کنند.

[1] Prenatal
[2] Newborn
[3] pharmacogenic

۲) تشخیص بیماری مبتنی بر پروتئین

همانطور که در بالا ذکر شد تشخیص بیماری بر دو محور است: تشخیص مبتنی بر اسید نوکلئیک و مبتنی بر پروتئین. پروتئین‌ها نقش مهمی را در تمام فرآیندهای سلولی شامل متابولیسم، ارتباطات، دفاع، تکثیر، نقل و انتقالات و نیز حرکت ایفا می‌کنند. پروتئین‌های تنظیم‌کننده ای نیز وجود دارند که به شدت تولید پروتئین‌ها را کنترل می‌کنند تا مطمئن شوند سلول‌ها به طور طبیعی عمل می‌کنند. عدم تنظیم این فرآیندها در بافت‌های بیمار منجر به تغییر محتوای پروتئینی و افزایش/کاهش میزان پروتئین‌های خاصی می‌شود. از تغییر خصوصیات پروتئین‌ها به طور وسیعی برای تشخیص بیماری در بیماری‌های چندژنی استفاده شده است. این تشخیص می تواند براساس وجود پروتئین خاص باشد، یا با اندازه‌گیری سطوح بیان یک پروتئین خاص (این پروتئین خاص به اصطلاح بیومارکر یا نشانگر زیستی یک بیماری نامیده می شود)، یا با تشخیص تغییر میزان بیان در پروتئین‌های هر موجود (پروفایل‌های پروتئینی) باشد. چندین مزیت در استفاده از پروتئین‌ها به عنوان بیومارکر بیماری وجود دارد. سطوح غیرعادی بیان ژن به عنوان نتیجه‌ی جهش‌های مرتبط با بیماری، با اندازه‌گیری مستقیمِ پروتئین، موجب کمّی‌سازی و تشخیص دقیق تر می شود. زیرا که سطح mRNA آن ژن جهش یافته لزوما با سطح بیان و میزان پروتئین آن ارتباط ندارد. بنابراین اندازه گیری در سطح پروتئین بهتر است.

به علاوه ممکن است در بافت بیمار، در تغییرات پس از ترجمه‌ی پروتئین‌ها تغییراتی ایجاد شود که با استفاده از اسیدهای نوکلئیک قابل تشخیص نیست (یعنی این مشکلات و اختلالات در سطح اسیدهای نوکلئیک نبوده است). همچنین بسیاری از بیماری‌ها غالباً نتیجه‌ی تغییر کانفورماسیون (شکل فضایی) پروتئین (مثلا بیماری‌های پریونی[1] و برخی بیماری‌های تحلیل‌برنده‌ی عصبی) هستند که امکان شناسایی آن ها از طریق توالی‌های نوکلئوتیدی وجود ندارد. از طرف

[1] prion diseases

دیگر، شکل منحصر به فرد و مقادیر پایین پروتئین برای ابداع یک روش تشخیصی یک چالش است. می‌توان آنتی‌بادی-هایی را تولید کرد که با تمایل بالا و به طور اختصاصی به پروتئین‌های هدف متصل می‌شوند. در مبحث بعدی به تفصیل آنتی‌بادی توضیح داده خواهد فقط در اینجا اشاره می شود که آنتی‌بادی یا پادتن نوعی پروتئین است که توسط دستگاه ایمنی در پاسخ به حضور آنتی‌ژن خاص در سرم خون ترشح و تولید می‌شود. آنتی بادی مکمل آنتی ژن بوده و بصورت قفل و کلید با آن جفت می شود. بنابراین برای تشخیص بیومارکرهای پروتئینی یک بیماری می توان از روش های ایمونولوژیکی (برپایه ایمنی و تولید آنتی بادی) استفاده کرد. این روش ها حساسیت، اختصاصی بودن و آسانی را برای تست تشخیصی به همراه دارند.

به پروتئینی که برای تشخیص جریان تغییر یافته اطلاعات در یک سیستم زیستی مورد بررسی قرار می‌گیرد، نشانگر زیستی (بیومارکر) می‌گویند. هدف از تحقیقات تشخیصی، یافتن پروتئین‌های خاص یک بیماری[1] (DSP) و ایجاد آزمایشاتی برای تشخیص آن‌ها در مایعات بدن بیماران، به عنوان مثال خون، ادرار یا بزاق است. حوزه‌های اصلی تحقیق به طور عمده بر روی بیماری‌های شایع که فقط آزمایش‌های تشخیصی غیر بهینه برای آن‌ها در دسترس است (مانند سرطان روده، ریه یا پستان و بیماری‌های سیستمیک مانند بیماری‌های روماتیسمی و بیماری‌های مؤثر بر سیستم عصبی مرکزی، به عنوان مثال بیماری آلزایمر) متمرکز شده است. وجه اشتراک همه این اختلالات این است که فاقد یک علت مشخصی هستند. در عوض، آن‌ها توسط یک زنجیره از عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی ایجاد می‌شوند. بنابراین شناخت مراحل اولیه این بیماری‌ها و شکستن این زنجیره از طریق درمان هدفمند از اهمیت زیادی برخوردار است. اگر این

[1] disease- specific proteins

بیماری‌ها ایجاد شوند، درمان زودرس و خاص اغلب نجات‌دهنده زندگی بیماران است اما این مسئله به نوبه خود به یافتن راه تشخیص صحیح و درواقع یافتن نشانگرهای زیستی مناسب وابسته است.

نشانگرهای زیستی می‌توانند تشخیص را در چهار سطح بهبود دهند: ۱. *نشانگرهای غربالگری* می‌توانند حتی در مرحله بدون علامت به تشخیص شروع اختلال در جریان اطلاعاتی که مسئول بیماری است، کمک کنند. برای این منظور کل گروه‌های جمعیتی به عنوان مثال همه افراد بالای یک سن خاص با استعداد خانوادگی یا ناقلین سایر عوامل خطرناک، به طور کلی از نظر حضور این پروتئین (نشانگر زیستی غربالگری) مورد بررسی و غربالگری قرار می‌گیرند. برای اطمینان از اینکه جمعیت بزرگی از افراد از چنین معاینات پیشگیرانه‌ای بهره‌مند شوند، اقدامات باید تا حد ممکن بدون درد، ساده و بی‌خطر باشد. این گروه شامل آزمایشات مختلف غربالگری سرطان است. ۲. *نشانگرهای پیش آگهی* نشان دهنده سرعت پیشرفت بیماری در یک فرد هستند. از آن‌جایی که یک بیماری در افراد مختلف ممکن است با شدت‌های مختلفی بروز کند، در نتیجه به درمان‌های متفاوتی نیز نیاز دارد. به عنوان مثال، علائم زودرس روماتیسم معمولاً با روش‌های محافظه کارانه مانند فیزیوتراپی یا استفاده از پمادهای ضد التهابی و داروها درمان می‌شوند. اما در مواردی که بیماری به سرعت در حال پیشرفت است، ممکن است مداخله درمانی تهاجمی، حتی در مراحل اولیه و علی‌رغم افزایش احتمال بروز عوارض جانبی، اعمال شود.۳. *نشانگرهای طبقه‌بندی*، پزشکان را قادر می‌کند که پیش بینی کنند یک بیمار چگونه به مصرف یک داروی مشخص پاسخ می‌دهد. این امر تا حد زیادی به تغییرات ژنتیکی آنزیم‌های متابولیزه کننده دارو بستگی دارد، که در بیشتر موارد با استفاده از تکنیک‌های مدرن در سطح ژن قابل تشخیص هستند (آزمایش Roche's AmpliChip CYP450نمونه بارز آن است. تست AmpliChip CYP450 یک آزمایش بالینی از شرکت Roche است. اولین آزمایش تشخیصی مولکولی ریزآرایه برای تجزیه و تحلیل ۲۹ چند شکلی و جهش ژن CYP2D6 و دو چندشکلی ژن CYP2C19

است. درواقع ژنوتیپ بیمار از نظر دو آنزیم P450 سیتوکروم یعنی 2D6 و 2C19 بررسی می شود. هدف از این آزمایش یافتن انواع خاص ژن (ژنوتیپ) بیمار است که نحوه متابولیسم برخی داروها را تعیین می کند، بنابراین پزشکان را برای تجویز دارو برای بهترین اثر و کمترین عوارض راهنمایی می کند. آزمایش AmpliChip CYP450 با استفاده از فناوری ریزآرایه AmpliChip CYP450 اولین آزمایش ریزآرایه DNA بوده که ترخیص‌شده توسط FDA آمریکا است.) سرانجام، ۴. *نشانگرهای اثربخشی*، توصیف می‌کنند که دارو در یک بیمار چگونه اثر می‌کند. در اینجا باز هم اغلب نمی‌توان تنها با بررسی علائم بیماری به چگونگی فعالیت دارو پی برد و فقط در سطح مولکولی می‌توان تأثیر بسیاری از داروها را واقعاً ارزیابی کرد. به عنوان مثال، درمان ایدز باید به طور مداوم بررسی شود تا در صورت شروع سریع تکثیر ویروس، داروهای دیگری برای بیمار تجویز شود؛ زیرا این نشان می‌دهد که ویروس در برابر داروهای قبلی مقاوم شده است.

واکنش آگلوتیناسیون[1] یا آگلوتینه شدن، یک تست ایمونولوژیکی ساده، ارزان، سریع و اختصاصی است که در آزمایشگاه-های تشخیصی به طور گسترده انجام می‌شود. برای مثال اغلب برای تعیین نوع گروه خونی انسان برپایه‌ی وجود آنتی-ژن‌های خاصی در سطح گلبول‌های قرمز خون که بین افراد متفاوت است مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنتی (ضد) سرم حاوی آنتی‌بادی‌هایی علیه آنتی‌ژن‌های سطحی A یا B است که با گلبول‌های قرمز خون مخلوط می‌شود. آگلوتینه‌شدن نشان‌می‌دهد که آن آنتی‌ژن وجود دارد. برخی افراد تنها آنتی‌ژن A (گروه خون نوع A) را تولید می‌کنند که با ضدسرم ضد A آگلوتینه می‌شود اما با ضدسرم ضد B آگلوتینه نمی‌شود. افراد دارای گروه خونی B تنها آنتی‌ژن B را تولید می‌کنند که با ضدسرم ضد B آگلوتینه شده و با ضد سرم ضد A آگلوتینه نمی‌شود. سایر افراد یا هردو آنتی‌ژن را دارند (گروه خونی AB) یا هیچکدام را ندارند (گروه خونی O). نمونه‌های خونی افراد با گروه خونی O که بیشترین نوع گروه

[1] Agglutination

خونی است با هیچ ضدسرمی واکنش آگلوتینه مثبت نمی‌دهد. این تست که به آن آگلوتیناسیون خونی[1] می‌گویند برای انتخاب خون مناسب به منظور تزریق (اهدای خون) اهمیت دارد؛ زیرا آنتی‌بادی‌هایی که به طور طبیعی علیه آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز غیرخودی ساخته شوند خون وارد شده را از بین می‌برد. در بعضی از تست‌های آگلوتیناسیون، آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی به کار رفته در تشخیص به ترتیب آنتی‌بادی یا آنتی‌ژنی خاص در نمونه‌های بیمار در پوشش سطحی دانه‌های کوچک لاتکس به کار می‌روند.

پروتئین‌ها ماشین‌های مولکولی در سلول‌ها هستند. آن‌ها واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز، محیط های داخلی و خارجی سلول را کنترل، به استرس‌ها پاسخ می‌دهند و اجزای ساختاری سلول‌ها را می‌سازند. برخی پروتئین‌ها برای مثال پروتئین‌های تشکیل‌دهنده‌ی ریبوزوم یا اسکلت سلولی، در همه‌ی سلول‌های یک فرد و در بسیاری از شرایط تقریباً در سطوح مشابهی وجود دارند. سطوح (بیانی) سایر پروتئین‌ها براساس عملکردهای سلولی در سلول‌های مختلف متفاوت است یا در پاسخ به پیام‌های محیطی یا تکوینی تغییر می‌کند. بنابراین بررسی پروتئین‌هایی که تحت شرایط خاص زیستی وجود دارند، می‌تواند بینشی درمورد فعالیت‌های سلول یا بافت ایجاد کند.

پروتئومیکس[2] دانش مطالعه‌ی تمام جمعیت‌های پروتئینی انواع مختلفی از سلول‌ها و بافت‌ها و برهم‌کنش‌های متعدد بین پروتئین‌ها است. درواقع پروتئومیکس مطالعه‌ی جامع همه‌ی پروتئین‌های یک سلول، بافت، مایعات بدن یا موجود زنده از دیدگاه‌های متعدد شامل ساختار، عملکرد، پروفایل بیانی و برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین است. پروتئومیکس ابزاری قدرتمند برای توصیف انواع پروتئین ها است. در مقایسه با سایر رویکردهای ژنومیکس، مطالعه‌ی پروتئوم سلول‌ها

[1] hemagglutination
[2] Proteomics

یا بافت‌ها مزایای بسیاری دارد. با این که بررسی توالی‌های ژنومی اغلب می‌تواند توالی‌های کدکننده‌ی (رمزگردان) پروتئین را شناسایی کند، اما در بسیاری از موارد نمی‌توان از طریق توالی، عملکرد یک پروتئین و تغییرات پس از ترجمه را که بر فعالیت پروتئین و قرارگیری پروتئین/سلول در محل خود تأثیر می‌گذارد، پیش‌بینی کرد. از طرف دیگر ممکن است عملکرد پروتئین را با تعیین شرایطی که در آن بیان شده و فعال است استنباط کرد. در حالی که پروفایل‌های بیانی توالی‌های رمزگردان پروتئین را می‌توان با ترانسکریپتومیکس تعیین کرد، در همه‌ی مواقع سطوح mRNA با سطوح پروتئین ارتباط ندارد و وجود پروتئین‌های فعال را نشان نمی‌دهد و برهم‌کنش‌های بین پروتئین‌ها با این روش‌ها قابل ارزیابی نیست. به طورکلی mRNA به سرعت به پروتئین ترجمه می‌شود، بنابراین ترانسکریپتومیکس ژن‌هایی را که بیان فعال دارند، اندازه‌گیری می‌کند در حالی که پروتئومیکس تقریباً پروتئین‌های پایدارتری را کنترل می‌کند. از نظر عملی می‌توان از پروتئومیکس برای شناسایی پروتئین‌های مربوط به اختلالات بالینی (نشانگر زیستی پروتئین) به ویژه در مراحل اولیه‌ی تکوین بیماری استفاده کرد که می‌تواند به تشخیص بیماری کمک کند یا اهدافی را برای درمان بیماری فراهم کند.

بطور کلی تشخیص بیماری مبتنی بر پروتئین به چند روش زیر می تواند انجام شود که در ادامه نیز به توضیح آنها نیز پرداخته خواهد شد:

۲-۱) الکتروفورز ژل

۲-۲) طیف‌سنجی جرمی

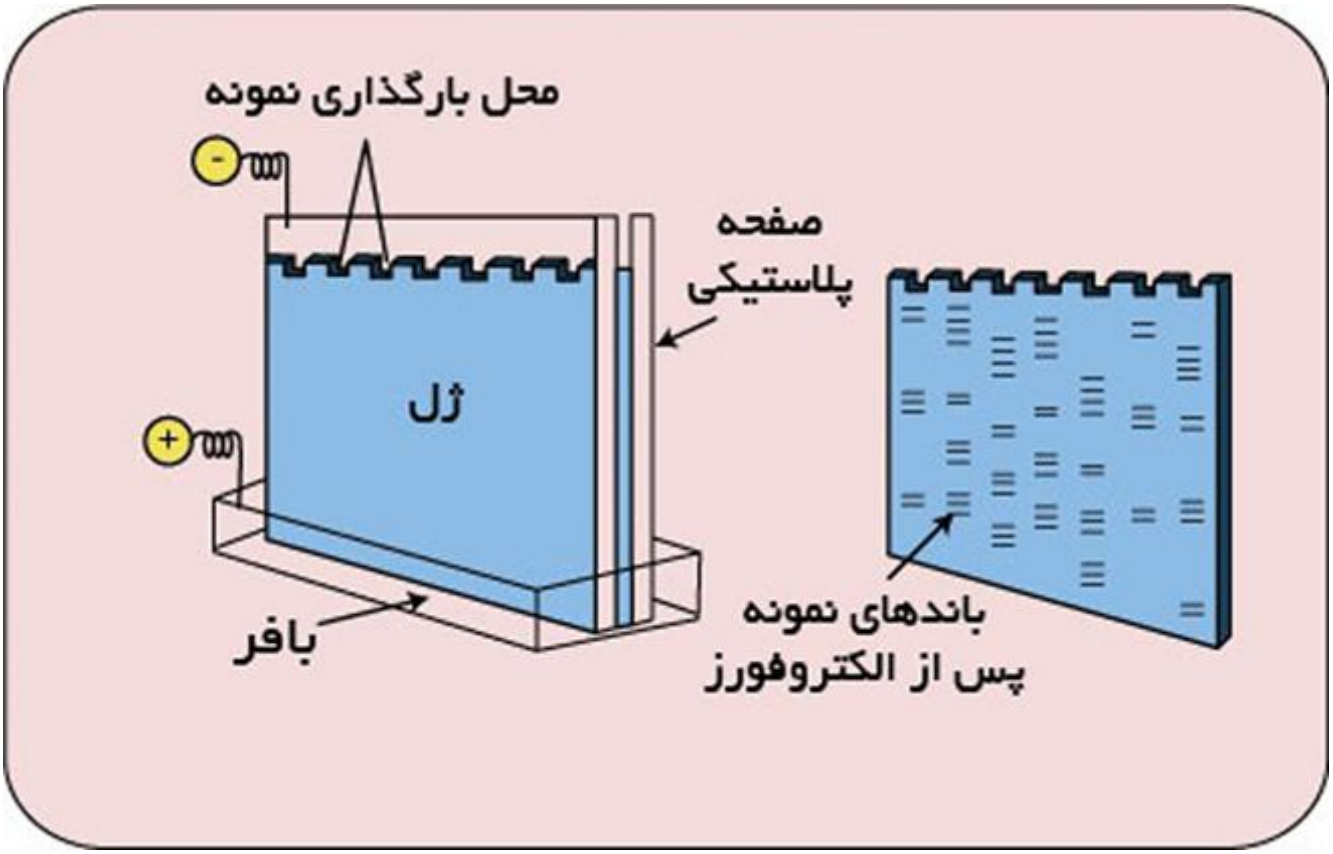
۲-۳) ریزآرایه‌های پروتئینی

۲-۴) تکنیک‌های ایمونولوژیکی

۲-۱) الکتروفورز ژل

یک سلول تعداد زیادی پروتئین متفاوت تولید می‌کند که در ابتدا برای شناسایی اجزای جداگانه‌ی پروتئوم باید از هم جدا شوند. گاهی پروتئین‌ها را به منظور کاهش پیچیدگی از نواحی ویژه‌ای در سلول مثل غشای سلول، هسته، جسم گلژی، اندوزوم‌ها یا میتوکندری‌ها استخراج می‌کنند. ژل الکتروفورز تکنیک جداسازی ماکرومولکول‌ها بر اساس حرکت الکتروفورتیک آن‌ها در یک میدان الکتریکی است. میزان این حرکت به اندازه، کانفورماسیون و بار مولکول بستگی دارد. بر این اساس که نمونه در ژل بارگذاری می شود و ژل در یک بافر که تحت جریان الکتریکی است قرار داده می شود. اگر جنس این ژل، پلی آکریل آمید باشد به آن الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید[1] یا همان PAGE گفته می شود.

[1] Polyacrylamide gel electrophoresis



شکل-۵۸ دستگاه الکتروفورز ژل. ژل پلی آکریل آمید در بافر قرار می‌گیرد و یک میدان الکتریکی از طریق منبع تغذیه اعمال می‌شود.

نمونه ها از محل بارگذاری به سمت دیگر حرکت می کنند و باندهایی را در ژل تشکیل می دهند.

برخی مواقع از طریق این تکنیک ساختار طبیعی ماکرومولکول‌ها را بررسی می کنند که به آن PAGE طبیعی (Native) گفته می شود. گاهی نیز به آن مواد شیمیایی دناتوره کننده اضافه می شود تا درهم پیچیدگی‌ها و ساختار طبیعی پروتئین ها از بین رفته و مولکول‌ها تنها بر اساس تفاوت در وزن مولکولی از یکدیگر جدا شوند. این ماده دناتوره کننده سدیم دودسیل سولفات (SDS) است و به تکنیک حاصل SDS-PAGE می گویند.

تکنیک جدیدتر ژل الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید دوبعدی[1] (2D PAGE) است. در ژلی که جریان الکتریکی اعمال می‌شود، پروتئین‌ها از طریق شیب pH مهاجرت می‌کنند تا این که به pH خاصی برسند. درواقع یک پلی‌پپتید دارای گروه‌هایی است که قابلیت یونیزاسیون دارند و این قابلیت مربوط به بار خالص پروتئین است، از طرفی pH محلول درجه‌ی یونیزاسیون (پروتونی شدن[2]) را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین پروتئین‌های موجود در یک نمونه، ابتدا براساس بار خالص توسط الکتروفورز و از طریق یک شیب pH در یک بعد (بعد اول) بی حرکت شده و درواقع جدا می‌شوند. به pH ای که در آن بار کلی پروتئین صفر باشد، نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین می گویند که در این ناحیه پروتئین دیگر حرکت نمی کند. برهمین اساس به بعد اول، ایزوالکتروفوکوسینگ[3] (IEF) گفته می شود.

یک منطقه‌ی خاص از شیب pH را ممکن است دو یا چند پروتئین با نقطه‌ی ایزوالکتریک یکسان اشغال کنند. بنابراین نیاز به تفکیک دقیق تر در محله دوم است. به این صورت که این پروتئین‌ها اغلب وزن‌های مولکولی متفاوتی با هم دارند و می‌توان آن‌ها را با توجه به جرم مولکولی از طریق ژل SDS-PAGE جدا کرد (بعد دوم). پروتئین‌های جداشده آرایه‌ای از نقاط را در ژل تشکیل می‌دهند که با رنگ‌آمیزی پروتئین توسط رنگ کماسی بلو[4] یا نقره قابل مشاهده است.

براساس اندازه‌ی ژل پلی‌آکریل‌آمید دوبعدی، تقریباً ۲۰۰۰ پروتئین متفاوت به کمک آن، قابل جداسازی است. الگوی لکه‌ها توسط اسکن متراکم ژل به دست می‌آید. با تصاویر ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید دوبعدی مربوط به انواعی از سلول‌ها پایگاه داده‌هایی ساخته شده است و نرم‌افزاری برای تشخیص لکه‌ها، تطبیق الگوهای بین ژل‌ها و جمعیت نیز موجود است. البته باید توجه داشت پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم یا زیاد، آن‌هایی که دارای نقطه‌ی ایزوالکتریک بسیار

[1] Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE)
[2] protonation
[3] isoelectric focusing
[4] Coomassie blue

اسیدی یا بازی هستند (مانند پروتئین‌های ریبوزومی و هیستون‌ها)، پروتئین‌هایی که در غشای سلولی یافت می‌شوند و آن‌هایی که در مقادیر کمی وجود دارند، به راحتی با 2D PAGE جدا نمی‌شوند.

پروفایلینگ بیانی پروتئین برای فهرست کردن تفاوت‌های بین سلول‌های سالم و بیمار اهمیت دارد و می‌توان از آن برای تشخیص، ردیابی تغییرات ایجاد شده حین فرآیند بیماری و نظارت بر پاسخ‌های سلولی به دارودرمانی‌ها استفاده کرد. روش‌های متعددی برای مقایسه‌ی کمّی پروتئوم‌ها بین نمونه‌ها ابداع شده است. الکتروفورز دو بعدی افتراقی درون ژل [1] بسیار شبیه به 2D PAGE است؛ با این حال علاوه بر جداسازی پروتئین‌ها از نمونه‌های مختلف در یک ژل و سپس مقایسه‌ی نقشه‌ی پروتئین‌های جداشده، پروتئین‌های دو نمونه به صورت افتراقی برچسب می‌خورند، سپس در ژل پلی‌آکریل‌آمید دوبعدی مشابه از هم جدا می‌شوند. معمولاً پروتئین‌های هر نمونه با رنگ فلورسنت متفاوتی برچسب می‌خورند (مثلا Cy3 یا Cy5 که از رنگ های سیانین ها هستند که به آنها تترا متیلن دو(دی)-کربوسیانین نیز گفته می شود). نمونه‌های نشاندارشده با هم ترکیب شده، سپس در یک ژل قرار داده می‌شوند که سبب غلبه بر تغییرپذیری ناشی از ژل‌های جداگانه می‌شود. دو رنگ Cy5 و Cy3 جرم و بار یکسانی دارند، بنابراین اگر یک پروتئین با Cy3 نشاندارشده باشد به مکانی مهاجرت می‌کند و اگر با Cy5 هم نشاندارشده باشد به همان نقطه مهاجرت خواهد کرد. الگوهای پروتئینی Cy3 و Cy5 به طور مجزا با برانگیختگی فلورسنت قابل مشاهده هستند. تصاویر با هم مقایسه می‌شوند و هرگونه تفاوتی گزارش می‌شود. به علاوه، نسبت فلورسانس Cy3 به Cy5 برای هر لکه تعیین می‌شود تا پروتئین‌هایی که بیانشان کم شده یا زیاد[2] شده است، شناسایی شوند. از سوی دیگر، پروتئین‌های ناشناخته با طیف‌سنجی جرمی شناسایی می‌شوند.

[1] Two-dimensional differential in-gel electrophoresis
[2] up or downregulated

۲-۲) طیف‌سنجی جرمی

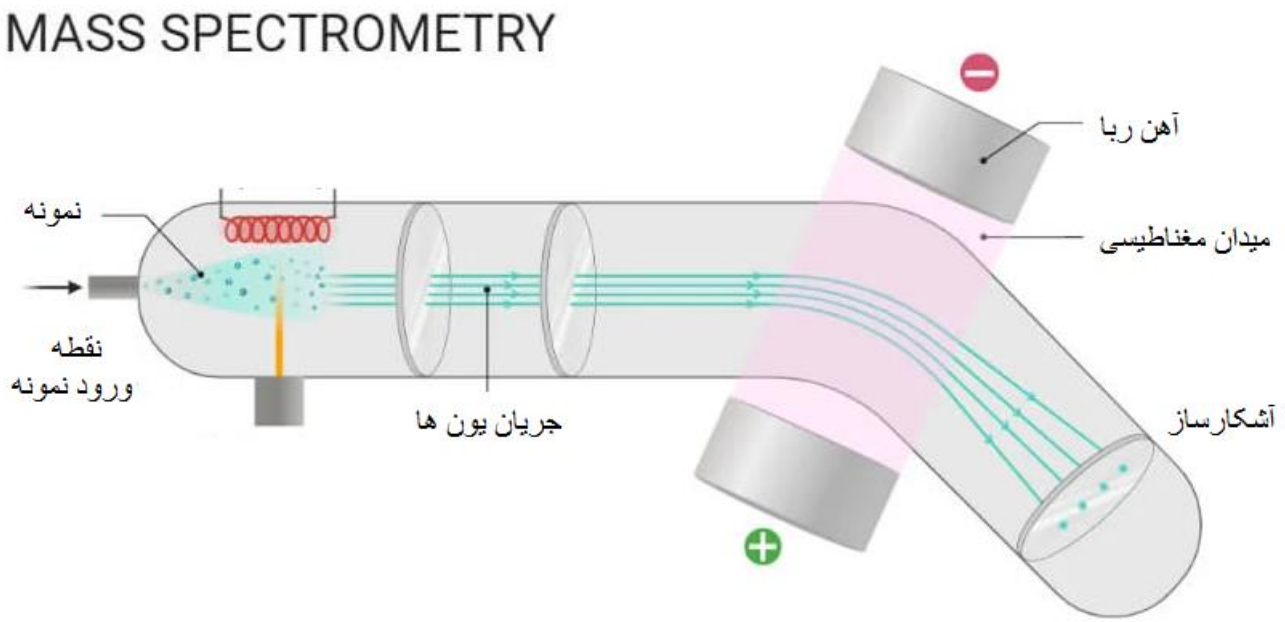
پس از جداسازی، هریک از پروتئین‌ها را از ژل جدا می‌کنند و معمولاً هویت پروتئین را با استفاده از طیف‌سنجی جرمی (MS)[1] مشخص می‌کنند. دستگاه طیف‌سنج جرمی، جرم مولکول‌ها را در حالت یونیزه‌شده تشخیص می‌دهد. برای تشخیص پروتئین مربوطه در ابتدا پروتئین به پپتیدهای سازنده‌اش تجزیه می‌شود. این تجزیه شدن با کمک یک آنزیم برش دهنده پروتئین یعنی پروتئاز مانند تریپسین که در محل اسید آمینه لیزین یا آرژنین می‌برد، انجام می شود.

پپتیدها یونیزه شده و براساس نسبت جرم به بار (m/z) از هم جدا می‌شوند. سپس فراوانی و نسبت‌های m/z یون‌ها اندازه‌گیری می‌شود. انواعی از دستگاه‌های طیف‌سنج موجود هستند که از نظر نوع بررسی نمونه، روش یونیزه‌کردن نمونه، روش تولید میدان الکترومغناطیسی که یون‌ها را از هم مجزا و آن‌ها را مرتب می‌کند و روش تشخیص جرم‌های متفاوت، با یکدیگر تفاوت دارند.

تکنیکی قوی تر برای تشخیص جرم پپتیدها، "طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز در واجذب-یونش لیزری به کمک ماتریکس" [2](MALDI-TOF) MS)) است. برای تعیین مقدار m/z هر پپتید خارج شده از MALDI-TOF MS، پپتیدها با یک ماتریکس حاوی یک اسید آلی مخلوط شده و یونیزه می‌شوند، سپس از یک لیزر برای بهبود یونیزه‌شدن استفاده می‌شود. یون‌ها با استفاده از جریانی با ولتاژ بالا از طریق لوله‌ای بالا می‌روند و زمان لازم برای رسیدن به آشکارساز[3] با توجه به جرم مولکولی تعیین می‌شود و هرچه جرم کمتر باشد زودتر به آشکارساز می‌رسند. برای تسهیل تشخیص پروتئین، الگوریتم‌های کامپیوتری برای پردازش حجم بالایی از داده‌ی MS ابداع شده است. پایگاه‌های داده‌ای با محتوای

[1] mass spectrometry (MS)
[2] matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight (MALDI-TOF) MS
[3] detector

جرم پپتیدهای تجزیه شده به کمک تریپسین برای همه‌ی پروتئین‌های شناخته شده ایجاد شده است. در این پایگاه‌های داده می توان برای شناسایی پروتئینی که جرم پپتیدهای آن با جرم پپتیدهای نمونه‌ی مجهول حاصل از MALDI-TOF MS همخوانی دارد، جست و جو کرد. به این نوع آنالیز، انگشت‌نگاری جرمی پپتید[1] می‌گویند.



شکل-۵۹ طیف‌سنجی جرمی

۲-۳) ریزآرایه‌های پروتئینی

تکنیک قدرتمند دیگر برای مقایسه‌ی جمعیت‌های پروتئینی، استفاده از ریزآرایه‌های پروتئینی است. ریزآرایه‌های پروتئینی مشابه ریزآرایه‌های DNA هستند؛ با این وجود به جای آرایه‌های اولیگونوکلئوتیدی، ریزآرایه‌های پروتئین از

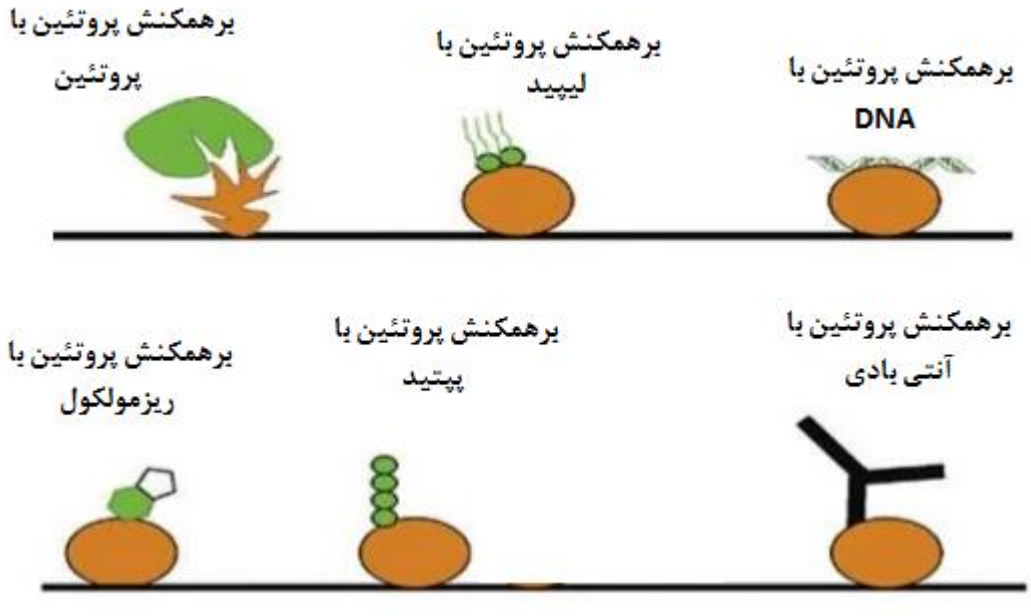
[1] peptide mass fingerprinting

تعداد زیادی پروتئین‌های ثابت شده[1] در جایگاه‌های مشخصی از یک سطح مانند لام شیشه‌ای به صورتی که ساختار و عملکرد این پروتئین‌ها حفظ شود، تشکیل شده‌اند. پروتئین‌های آرایش‌یافته روی سطح، می‌توانند آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای چند پروتئین در یک موجود زنده، پروتئین‌های خالص‌شده و بیان شده از یک کتابخانه‌ی DNA یا cDNA، پپتیدهای مصنوعی کوچک یا نمونه‌های چند پروتئینی از عصاره‌های سلولی یا نمونه‌های بافتی باشند. پروتئین-های آرایش‌یافته با نمونه‌هایی که حاوی مولکول‌های برهم‌کنش‌دهنده با این پروتئین‌ها هستند، پایش می‌شوند. برای مثال این مولکول‌های برهمکنش دهنده می‌توانند پروتئین‌هایی باشند که برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین را تشخیص می‌دهند، یا توالی‌های اسیدنوکلئیکی باشند که برای شناسایی پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان ژن که به DNA یا RNA متصل می‌شوند به کار روند، یا پیش‌ماده‌هایی برای آنزیم‌هایی خاص یا ترکیبات کوچک متصل شونده به پروتئین‌ها مثل لیپیدها یا داروها باشند.

معمولاً پروتئین‌ها به صورت کمپلکس‌هایی متشکل از زیرواحدهای پروتئینی مختلف که با هم برهم‌کنش دارند، عمل می‌کنند. فرآیندهای مهم سلولی مانند همانندسازی DNA، متابولیسم انرژی و انتقال اطلاعات، توسط کمپلکس‌های بزرگ چندپروتئینی انجام می‌شوند. هزاران برهم‌کنش پروتئین-پروتئین دریک سلول رخ می‌دهد. برخی از این برهم-کنش‌ها کوتاه‌مدت هستند، درحالی که سایر آن‌ها کمپلکس‌های چندجزئی پایداری را می‌سازند که ممکن است با سایر کمپلکس‌ها برهم‌کنش دهند. تشخیص ارتباطات داخلی عملکردی بین اعضای پروتئوم کار راحتی نیست. چندین راهکار

[1] immobilized

برای بررسی برهم‌کنش‌های پروتئینی شامل ریزآرایه‌های پروتئینی، سیستم‌های دوهیبریدی[1] و روش‌های خالص‌سازی تمایلی متوالی[2] ابداع شده است.



شکل-۶۰ ریزآرایه‌های پروتئینی

۲-۴) تکنیک‌های ایمونولوژیکی

بسیاری از آزمایش‌های ایمنی حساس، اختصاصی و ساده هستند. می‌توان از آن‌ها برای کاربردهای گسترده‌ای شامل تست دارو، ارزیابی و پایش انواعی از سرطان‌ها، تشخیص متابولیت‌هایی خاص، تشخیص عوامل بیماری‌زا و نظارت بر عوامل عفونی استفاده کرد. با این حال محدودیت‌هایی وجود دارد. اگر هدف، یک پروتئین باشد، برای استفاده از آنتی-بادی‌ها نیاز است که ژن مربوط به بروز ناحیه‌ی هدف بیان شده باشد و ناحیه‌ی هدف به هر شکلی پوشیده یا مسدود

[1] two-hybrid systems
[2] tandem affinity purification

نشده باشد، در غیر این صورت آنتی‌بادی به محل متصل نخواهد شد. روش‌های تشخیصی متداول برای عوامل عفونی به مجموعه‌ای از صفات ویژه‌ی بیماری‌زا یا ترجیحاً یک ویژگی منحصر به فرد و قابل تشخیص وابسته است. هدف، جستجوی کمترین تعداد ویژگی‌های زیستی است که می‌تواند وجود و هویت دقیق یک بیماری‌زا را نشان دهد. برای مثال برخی عوامل عفونی، مولکول‌های بیوشیمیایی مشخصی را تولید می‌کنند. مشکل، چگونگی شناسایی این مولکول‌ها در زمانی است که در یک نمونه‌ی زیستی وجود دارند. اغلب این بیومارکرها را می‌توان به طور مستقیم در یک آزمایش بیوشیمیایی مختص آن، شناسایی کرد. با این وجود، این رویکرد می‌تواند به رشد سیستم‌های تشخیصی اختصاصی برای موجودات زنده بیماری‌زای متفاوتی منجر شود. یک روش استانداردشده برای تشخیص هر بیومارکر کلیدی صرف نظر از ساختار آن ترجیح داده می‌شود. از آن‌جا که آنتی‌بادی‌ها با اختصاصیت بالا به نقاط هدف گسسته (آنتی‌ژن‌ها) متصل می‌شوند، آزمایش‌هایی که صرفاً بر پایه‌ی تشخیص کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن هستند نیاز به ابداع فرآیند تشخیص منحصر به فرد برای هر مولکول مارکر خاص را از بین می‌برد. برخی از این آزمایش‌ها اخیراً ابداع شده‌اند و احتمالاً در آینده بهتر شده و بیشتر مورد استفاده قرار خواهند گرفت. تکنیک‌های ایمونولوژیکی درواقع تکنیک‌هایی که در ارتباط با آنتی بادی ها هستند می توانند انواع مختلفی داشته باشند مانند: تست الایزا، وسترن بلات، فلوسایتومتری، کیت‌های تشخیصی، تست تشخیصی سریع، بیوسنسورها که در ادامه توضیح داده خواهند شد.

تست الایزا (ELISA)[1]

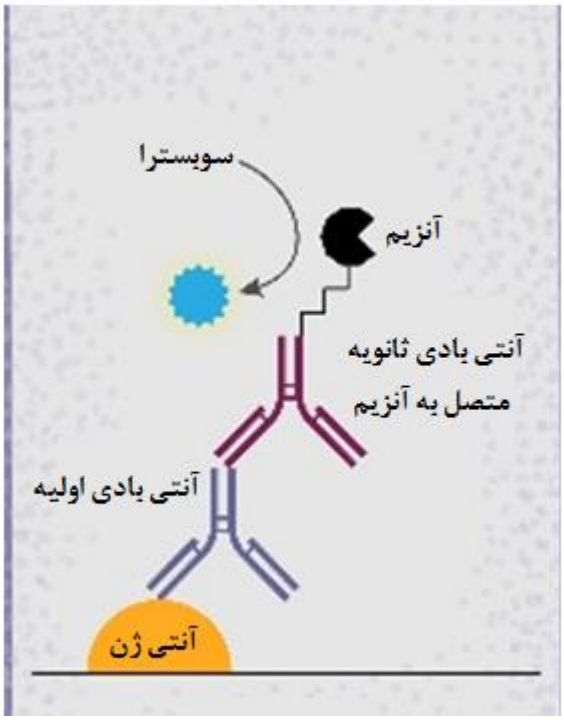
[1] Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

چندین روش مختلف برای تشخیص این که یک آنتی‌بادی به آنتی‌ژن هدف خود متصل شده است وجود دارد. الایزای مستقیم یا غیرمستقیم فرآیندی است که اغلب در آزمایش‌های تشخیصی ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در یک دستورالعمل الایزای غیرمستقیم، نمونه‌ی مورد آزمایش برای وجود یک آنتی‌ژن خاص به پلیت میکروتیتر[1] (MTP) پلاستیکی (برای مثال پلیت ۹۶ خانه) متصل شده است. برای حذف مولکول‌های متصل نشده، پلیت را می‌شویند و نواحی چسبنده باقیمانده روی پلاستیک را با افزودن پروتئین‌های غیر مرتبط با پروتئین هدف، مسدود می‌کنند. یک آنتی‌بادی اولیه‌ی اختصاصی علیه آنتی‌ژن هدف، به خانه‌ها اضافه می‌شود و پس از گذشت زمان مناسب، خانه‌ها شسته می‌شوند تا آنتی‌بادی اولیه‌ای که متصل نشده حذف شود. دومین آنتی‌بادی علیه آنتی‌بادی اولیه ابتدا به طور کووالان به آنزیمی (مثلاً آلکالین فسفاتاز) متصل می‌شود که می‌تواند پیش‌ماده‌ی بی‌رنگ را به محصولی رنگی تبدیل کند. آنتی‌بادی ثانویه که به آنزیم متصل است سپس به خانه‌ها اضافه می‌شود، مدتی می‌ماند و خانه‌ها را دوباره شست‌وشو می‌دهند تا آنتی-بادی‌های ثانویه‌ای که متصل نشده‌اند، حذف شوند. پیش‌ماده‌ی بی‌رنگ در مدت معینی اضافه می‌شود و مقدار محصول رنگی به طور عینی در یک دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری می‌شود که به طور قابل توجهی سرعت آزمایش را بالا می‌برد. اگر آنتی‌بادی اولیه به آنتی ژن هدف در نمونه متصل نشود، با شست و شوی دوم حذف می‌شود. در نتیجه آنتی‌بادی دوم متصل به آنزیم به آنتی‌بادی اولیه متصل نشده و با شست و شو حذف می‌شود و ترکیب نهایی بی رنگ می‌ماند. برعکس، اگر آنتی ژن هدف در نمونه موجود باشد سپس آنتی‌بادی اولیه به آن متصل می‌شود و بعد آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم به آنتی‌بادی اولیه متصل می‌شود و این آنزیم، واکنشی را کاتالیز می‌کند و در نهایت محصولی رنگی را شکل می‌دهد که به راحتی قابل تشخیص است. آنتی‌بادی‌های ثانویه که با یک آنزیم کمپلکس شده‌اند به صورت تجاری موجود هستند

[1] microtiter plate (MTP)

و هر تست تشخیصی جدیدی فقط به یک آنتی‌بادی اولیه‌ی منحصربه فرد نیاز دارد. به علاوه بسیاری از آنتی‌بادی‌های ثانویه که به هرکدام چندین مولکول آنزیمی متصل شده است به یک مولکول آنتی‌بادی اولیه متصل می‌شوند و بنابراین شدت سیگنال را بهبود می‌بخشند.

برای افزایش تشدید حساسیت تشخیص الایزا، ممکن است از مزیت سیستم تشخیصی بیوتین-آویدین استفاده شود. آودین یک پروتئین تترامر است که به چهار مولکول بیوتین متصل می‌شود. ثابت تفکیک (Kd)[1] اتصال بیوتین به آویدین 10^{-13}L/mol است و این عدد برای اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن 10^{-9} L/mol است. بنابراین سیستم بیوتین-آویدین، احتمالاً ۱۰ هزار برابر نتیجه‌ی الایزا را تقویت می‌کند. در این نوع الایزای غیرمستقیم، آنتی‌بادی ثانویه به کمپلکس بیوتین-آویدین متصل می‌شود و آنزیمی به آویدین متصل می‌شود. دستورالعمل آن مشابه توضیحات بالا درمورد الایزای غیر مستقیم است.



[1] dissociation constant (Kd)

شکل-۶۱ نحوه انجام واکنش الایزا غیر مستقیم

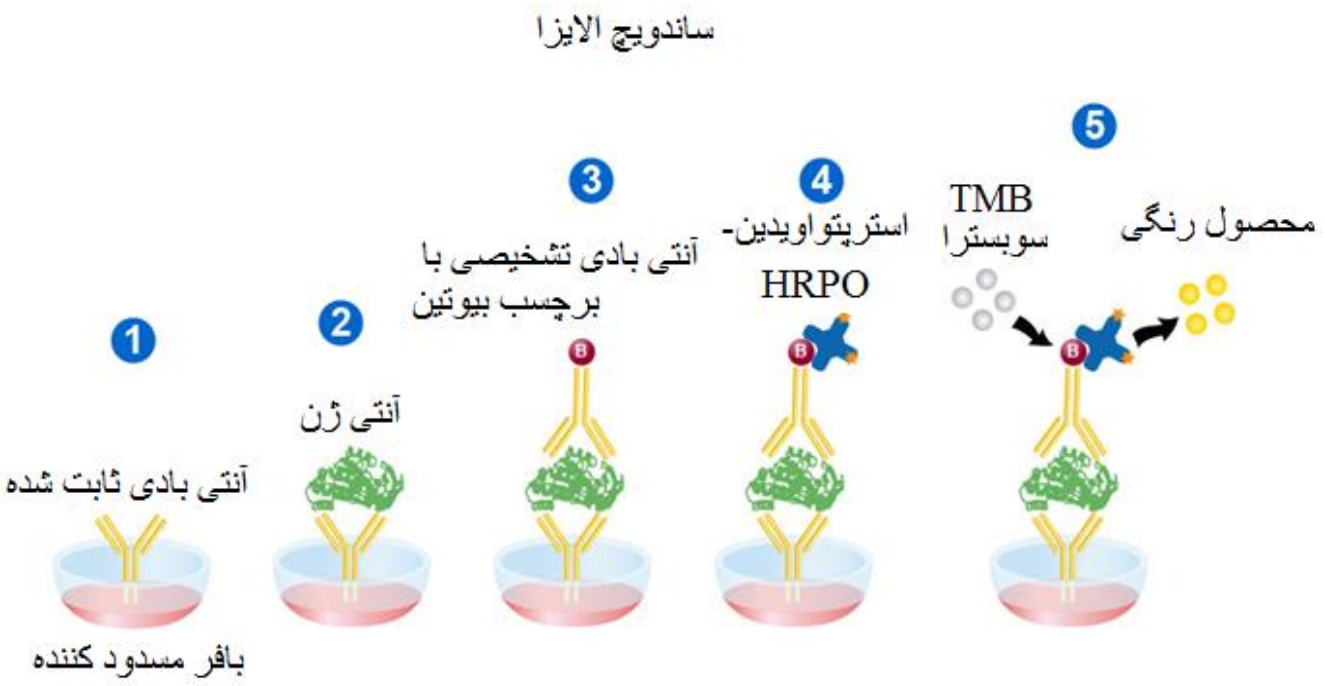
در پروتوکل الایزای مستقیم، یک آنتی‌بادی اولیه (پلی‌کلونال یا مونوکلونال- به مبحث آنتی‌بادی ها مراجعه شود) اختصاصی برای آنتی‌ژن هدف ابتدا به سطح پلیت میکروتیتر، متصل می‌شود. برای ارزیابی مقدار یک آنتی‌ژن خاص در یک نمونه، آنتی‌ژن را به چاهک پلیت اضافه کرده و اجازه می‌دهند با آنتی‌بادی اولیه (متصل به کف چاهک) برهم‌کنش کند، سپس با شستشو، هر مولکولی که متصل نشده است حذف می‌شود. سپس یک آنتی‌بادی ثانویه که به یک آنزیم متصل است افزوده شده و وجود آنتی‌ژن اتصالی با استفاده از طیف سنج نوری اندازه‌گیری شده یا دیدن آن ممکن می‌شود.

اساس الایزا، اتصال اختصاصی آنتی‌بادی اولیه به محل هدف روی آنتی‌ژن است. اگر آنتی‌ژن هدف، پروتئینی باشد، این پروتئین عموماً برای تولید آنتی‌بادی‌هایی (که در آینده برای تشخیص محل هدف روی آنتی‌ژن مورد استفاده قرار خواهند گرفت) به صورت خالص تهیه می‌شود. با این روش ارزیابی، عموماً استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها (mAbs)، افزایش تمایل، اختصاصی بودن، حساسیت و پایداری اتصال یک آنتی‌بادی به آنتی‌ژن هدف خود را به همراه دارد.

الایزای ساندویچی[1] رایج‌ترین شکل الایزا برای ابداع تعداد بسیار زیادی از کیت‌های تشخیصی آزمایشگاهی[2] (IVD) برای کمّی‌سازی بیومارکرهای بالینی است. در این نوع الایزا آنتی ژن موردنظر بین دو آنتی بادی قرار می گیرد (به شکل مراجعه شود). با این حال از این مدل برای بیومارکرهای خیلی کوچک که روی سطحشان اپی‌توپ‌های (ناحیه ای روی آنتی ژن که آنتی بادی به آن متصل می شود) محدودی برای اتصال به آنتی‌بادی تشخیصی دارند کمتر استفاده می‌شود.

[1] Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
[2] In Vitro Diagnostic

کیت تجاری الایزای ساندویچی حاوی: یک پلیت میکروتیتر (MTP) از قبل مسدودشده و متصل به آنتی‌بادی گیرانداز یا نوار (استریپ) های پلیت[1] ۹۶ خانه متصل به آنتی‌بادی، استانداردهای آنالیت، آنتی‌بادی تشخیصی بیوتینیله شده، استرپتاویدین نشاندارشده با پراکسیداز هورس‌رادیش[2] (SA-HRP)، کیت پیش‌ماده‌ی آنزیم، و محلول خاتمه است. کیت پیش‌ماده اغلب حاوی 3,3’,5,5’-تترامتیل بنزیدین (TMB)[3] و ۰/۰۲ درصد H_2O_2 به عنوان پیش‌ماده‌های آنزیم HRP و یک محلول اسیدی (معمولاً سولفوریک‌اسید) خاتمه است. کیت‌های الایزای ساندویچی امکان تشخیص با دقت بسیار بالا و انتخابی آنالیت‌ها را در نمونه‌های بستری مانند سرم انسان، پلاسما، ادرار، مایع مغزی-نخاعی یا خون فراهم می‌کنند.



شکل-۶۲ مراحل انجام واکنش در الایزای ساندویچی

[1] plate strips
[2] horseradish peroxidase
[3] 3, 3′, 5, 5′-tetramethylbenzidine (TMB)

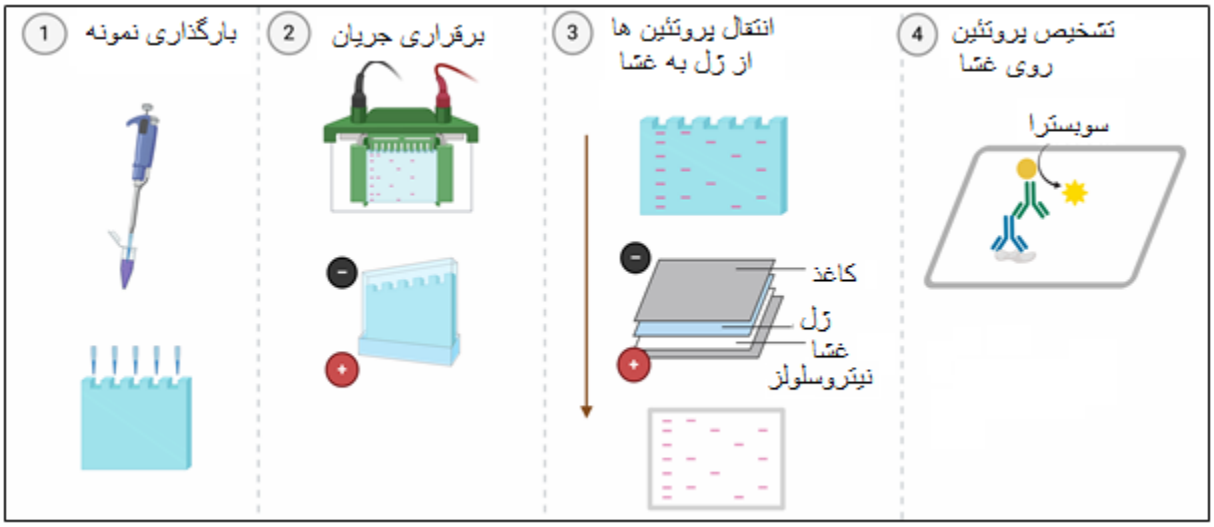
در روش الایزای ساندویچی ابتدا آنالیت هدف (آنتی ژن) به آنتی‌بادی های گیرافتاده در پلیت میکروتیتر برای تشکیل کمپلکس ایمنی متصل می شود. آنالیت‌های اضافه یا آن‌هایی که به طور غیراختصاصی متصل شده‌اند با چند بار شستشو از چاهک‌های پلیت میکروتیتر حذف می‌شوند. اتصال آنتی‌بادی تشخیصی بیوتینیله به آنالیت، یک کمپلکس ایمنی ساندویچی(SIMC)[1] تشکیل می‌دهد، سپس آنتی‌بادی‌های اضافه یا آن‌هایی که به طور غیراختصاصی متصل شده‌اند با چند بار شستشو حذف می‌شوند. متعاقباً SA-HRP به پلیت میکروتیتر اضافه می‌شود و به طور اختصاصی از طریق برهم‌کنش‌های استرپتاویدین -بیوتین قدرتمند و اختصاصی به آنتی‌بادی بیوتینیله‌ی تشخیصی متصل می‌شود. پس از چند بار شستشو، آنزیم HRP متصل‌شده به SA در SA-HRP می‌تواند با پیش‌ماده‌ی آنزیمی واکنش دهد. برای مثال به منظورتولید محصولی آبی‌رنگ، TMB با H_2O_2 ترکیب می‌شود. جذب حاصل به ویژه در ۴۵۰nm و با طول موج مرجع ۵۴۰ nm یا ۶۵۰nm اندازه‌گیری می‌شود. الایزای ساندویچی با استفاده از ایستگاه‌های روباتیک تجاری یا آنالیزورهایی برای آنالیز نمونه‌های بالینی بیماران با توان بالا[2] به صورت خودکار درآمده است.

وسترن بلات

روش لکه غربی (وسترن بلات) یکی از روش‌های لکه گذاری است که برای تشخیص و بررسی پروتئین‌ها استفاده می‌شود. این روش در مقایسه با تست الیزا، اختصاصی‌تر است ولی از حساسیت کمتری برخوردار است و چون آزمایشی نسبتاً گران محسوب می‌شود، به عنوان اولین آزمایش انجام نمی‌گیرد و بیشتر در تأیید نتایج مثبت شده تست الیزا به کار

[1] sandwich immune complex (SIMC)
[2] high-throughput

می‌رود. تست وسترن بلات در همراهی با تست الیزا، بیش از ۹۹٪ مورد اطمینان خواهد بود. در این روش ابتدا باکمک SDS-PAGE پروتئین ها در ژل تفکیک شده و سپس باندهای پروتئینی از ژل به غشایی (مانند نیتروسلولز) که قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین ها را دارد، منتقل می شوند (لکه گذاری). سپس از آنتی بادی ها برای تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشا استفاده می شود. از همین رو چنین روش هایی به ایمونوبلاتینگ نیز معروف هستند.



شکل-۶۳ مراحل انجام تکنیک وسترن بلات

فلوسایتومتری

فلوسایتومتری درواقع ابزار ضروری کار یک زیست‌شناس سلولی یا ایمنی‌شناس سلولی است و اغلب برای مشخصه یابی، شمارش و جداسازی انواع مختلفی از لنفوسیت‌ها استفاده می‌شود. دستگاه فلوسایتومتری سلول‌های منفردی را که در قالب یک جریان از مقابل نور لیزر عبور می‌کنند، شناسایی کرده و می‌شمرد. اگر این یک شمارشگر با توانایی جداسازی

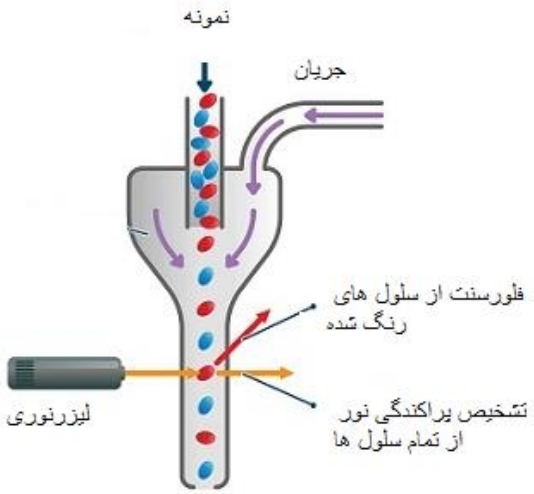
سلول‌های درحال شناسایی مجهز شود به آن این امکان را می‌دهد تا به عنوان یک تفکیک‌کننده‌ی سلولی فعال شده با فلورسنت[1] (FACS) عمل کند. این دستگاه اولین بار حدود ۴۰ سال پیش ساخته شد و اهمیت روزافزونی برای ایمونولوژیست‌های امروزی دارد. این ابزارها برای مطالعه و شناسایی مجموعه‌های مختلف سلولی بکار می رون. درواقع هر زیرمجموعه سلولی بطور اختصاصی دارای پروتئین‌های سطحی سلولی (برای مثال BCR، TCR، CD4، CD8، MHC-I و MHC-II) خاصی هستند. بنابراین با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی که هر یک بطور اختصاصی به یکی از این پروتئین های سطحی متصل می شوند، سلول خاصی را می توان جداسازی کرد.

در فلوسایتومتری آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که علیه آنتی‌ژن‌های سطحی سلول بکار می روند به رنگ فلوروکروم متصل هستند و با کمک این رنگ ها نشاندار می باشند. درنتیجه سلول‌های منفرد در مخلوطی از جمعیت‌های سلولی، با کمک این آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشاندار می‌شوند. سپس مخلوط سلولی همراه با مقادیر زیادی از محلول نمکی از درون نازل دستگاه فلوسایتومتری با فشار خارج می‌شود. درنتیجه یک جریان مناسبی از مایع حاوی سلول‌ها را می‌سازد که در فواصل مشخصی جدا از هم قرار دارند. هر سلول از مقابل اشعه لیزر عبور کرده و هر مولکول فلوروکرومِ آنتی بادی متصل به سطح سلول، برانگیخته شده و نور فلورسانت ساطع خواهد کرد. لوله‌های تشدیدکننده‌ی نوری[2] موارد زیر را شناسایی می‌کنند:

۱. میزان انحراف نور (پراکندگی) که نشان‌دهنده‌ی اندازه و دانه‌داری[3] سلول است.

[1] fluorescence-activated cell sorter (FACS)
[2] Photomultiplier tubes
[3] Granularity

۲. نشر فلورسانس که اطلاعاتی درباره‌ی اتصال مونوکلونال آنتی‌بادی‌های نشاندارشده و نیز درباره‌ی بیان آنتی‌ژن-های سطحی هر سلول می‌دهد.



شکل-۶۴ دستگاه فلوسایتومتری

تفکیک‌کننده‌ی سلولی فعال شده با فلورسنت (FACS)، فلوسایتومتری را گسترش داده است به این شکل که در آن از ابزارهای مکانیکی یا الکتریکی استفاده می‌شود تا سلول‌ها را در قالب قطراتی با یک یا چند خصوصیت اندازه‌گیری شده‌ی مشخص که با تنظیم محدوده یا محدوده‌هایی[۱] توسط کاربر انجام می‌گیرد، جداسازی و جمع‌آوری کند. داده‌ی فلوسایتومتری در قالب یک هیستوگرام از شدت فلورسانس در برابر تعداد سلول‌ها نمایش داده می‌شود. اگر دو یا چند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAbs) نشاندارشده با فلوروکروم استفاده شود، داده‌ها ممکن است به شکل یک نمودار پراکندگی[۲] دوبعدی یا نمودار کانتور[۳] نمایش داده شود که در این حالت یک mAb رنگ‌آمیزی شده در برابر mAb دوم

[1] gate(s)
[2] scatter diagram
[3] contour diagram

رسم می‌شود. نتیجه آن است که جمعیت سلول‌های نشاندارشده با یک mAb را به علاوه می‌توان با mAb دوم نیز نشاندار کرده و به زیرگروه‌هایی تقسیم کرد. بنابراین با فلوسایتومتری می‌توان داده‌های کمی هدفداری را درمورد درصد سلول‌ها با آنتی‌ژن‌های سطحی متفاوتی فراهم کرد که واسطه‌ی تکوین سلولی سلول T اولیه و سلولB یا پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌شوند.

با توجه به این که مقادیر مناسب رنگ‌های فلوروکروم، سخت‌افزار و ابزارهای آنالیز داده در سال‌های اخیر به طور قابل توجهی افزایش یافته است، اکنون این امکان وجود دارد که با استفاده از دستگاه‌های FACS که دارای چندین تشدیدکننده‌ی نور[1] بسیار حساس هستند، ۲۰ آنالیز رنگ را انجام داد. آنالیز و مرتب‌سازی FACS در توانایی شناسایی سلول‌ها و مکانیسم‌هایی که واسطه‌ی شروع بسیاری از بیماری‌های حاد ایمنی می‌شوند؛ مانند سلول‌های CD^{4+} T در HIV، بسیار سودمند بوده است. انتظار می‌رود با توجه به این که آنالیزهای فلوسایتومتری درحال حاضر امکان تشخیص هریک از انواع مختلف سرطان را با یک استراتژی درمانی و فتوفیزیولوژی منحصر به فرد فراهم کرده است، چنین منافعی در آینده ادامه یابد. این نوع آنالیزها امکان جداسازی جمعیت‌های فاقد تومور در بین سلول‌های بنیادی خون‌ساز[2] را برای بیماران سرطانی که پیوند سلول‌بنیادی شده‌اند، فراهم کرده است. امروزه از توانایی یک دستگاه فلوسایتومتری در شناسایی مقادیر اندکی از سلول‌های خاص در مخلوطی از سلول‌های ناهمگن، برای شناسایی باقی‌مانده‌های سلولی بدخیم پس از درمان، در بدخیمی‌های شایع استفاده می‌شود. همچنین با فلوسایتومتری می‌توان به سرعت محتوای تقریبی DNA سلول را در سرطان لنفوبلاستیک حاد، شایع‌ترین سرطان خون در کودکان، تعیین کرد که به طور چشم‌گیری به

[1] photomultipliers
[2] hematopoietic stem cells

هدایت درمان کمک می‌کند. آرایه‌های چندگانه[1] از گوی‌های فلورسنت که به طور انتخابی پروتئین‌ها و توالی‌های خاصی از DNA را گیر می‌اندازند نیز با فلوسایتومتری بررسی شده‌اند. مطالعات اخیر منجر به روش‌هایی سریع و حساس برای آنالیز سایتوکاین‌ها، آنتی‌بادی‌ها و ژنوتیپ‌های HLA با توان بالا[2] شده است که تا به حال کاربردهای مهمی در پیش‌بینی نتایج بالینی در پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان و بیماری قلبی-عروقی داشته‌اند. در آخر آنالیز خودکار مجموعه‌ی بسیار بزرگی از داده‌ها سبب ابداع حوزه‌ی "سایتومیکس[3]" شده است که کاربرد فلوسایتومتری و آنالیز فیزیولوژی سلولی، ژنومیکس و پروتئومیکس را یکی کرده است.

کیت‌های تشخیصی

کیت های تشخیصی از جمله ابزار اساسی برای تشخیص بیماری های مختلف در حوزه های بهداشت و پزشکی هستند بطوریکه در زمان کم و با بیشترین دقت، صحت بدن انسان را بررسی می نمایند. انواع متفاوتی از کیت های تشخیصی در آزمایشگاه ها وجود دارد مانند کیت‌های خودتشخیصی[4]، کیت‌های تشخیصی چندجزئی مبتنی برآگار، تست‌های ابداعی آزمایشگاهی. سازمان غذا و داروی آمریکا FDA چندین گروه از کیت‌ها و معرف‌های تشخیصی را شناسایی کرده و به آنها مجوزهای متفاوتی می دهد مانند: تاییدشده توسط FDA، ترخیص‌شده توسط FDA[5]، کاربرد صرفاً تحقیقاتی، کاربرد صرفاً مطالعاتی، معرف اختصاصی آنالیت.

[1] Multiplex arrays
[2] high-throughput
[3] cytomics
[4] Self-diagnostic
[5] FDA-cleared

اختلالات ژنتیکی غدد درون‌ریز غیرمعمول هستند؛ بنابراین احتمالاً آزمایش آن‌ها شامل مواردی خواهد بود که FDA آن را به عنوان "آزمایش ابداعی آزمایشگاهی (LDT)"[1] و نه یک کیت تجاری تأییدشده توسط FDA، تعیین می‌کند. LDTها را "نرم‌افزار خانگی[2]" می‌نامند که این اصطلاح، باید منسوخ شود. یک LDT ابزارها و کیت های معرف متنوع را ترکیب می‌کند، برای مثال یک کیت تهیه‌ی DNA و یک کیت ازدیاد DNA به روش real-time PCR که مربوط به تولیدکننده‌های متفاوتی هستند. البته نتایج گزارش شده برای LDT باید با اظهار جمله: "این آزمایش ابداعی بوده و ویژگی‌های عملکردی آن توسط (نام آزمایشگاه ذکر شود) مشخص شده است. این آزمایش توسط سازمان غذا و داروی آمریکا تایید یا ترخیص‌نشده است."، سلب مسئولیت شود.

تست تشخیصی سریع

یک تست تشخیصی سریع (RDT)[3] نوعی تست تشخیصی پزشکی است که انجام آن سریع و آسان است. RDTها برای غربالگری پزشکی اورژانسی یا اولیه و استفاده در مراکز درمانی با منابع محدود مناسب هستند. همچنین آزمایش مواردی که پیش از این تنها در آزمایشگاه، قابل آزمایش بود با این نوع از تست‌های سریع در بستر بیمار[4] در مراقبت‌های اولیه قابل اندازه‌گیری شده است. آن‌ها نتایج را همان روز و در طی دو ساعت، به طور معمول تقریباً ۲۰ دقیقه ای، ارائه می‌دهند.

[1] laboratory developed test (LDT)
[2] homebrews
[3] rapid diagnostic test (RDT)
[4] point-of-care

اتحادیه‌ی اروپا یک تست سریع را این‌گونه تعریف می‌کند: دستگاه‌های پزشکی تشخیص آزمایشگاهی[1] کمّی یا نیمه‌کمّی که به طور تکی یا در قالب یک مجموعه‌ی کوچک استفاده می‌شوند و شامل فرآیندهایی غیرخودکار هستند و برای دادن نتایج سریع طراحی شده‌اند.

نوع اول: تست‌های جریان جانبی[2] احتمالاً شناخته‌شده ترین تست‌های تشخیصی سریع هستند که مشابه تست‌های بارداری هستند، اما در آن‌ها سیستم‌های دیگری نظیر معرف نواری[3]، جریان عمودی و غیره وجود دارد. هر چیزی که می‌توان در کنار بستر بیمار از آن استفاده کرد. تست جریان جانبی، اساساً یک دستگاه تشخیصی ساده است که برای تأیید وجود یا عدم وجود آنالیت هدف، مانند پاتوژن‌ها یا نشانگرهای زیستی در انسان یا حیوانات، یا آلاینده‌های موجود در منابع آب، مواد غذایی یا خوراک حیوانات استفاده می‌شود. نمونه مابع حاوی آنالیت هدف بر روی بستری بارگذاری می شود که با خاصیت موئینگی شروع به حرکت می کند و در سر راه خود با آنتی بادی اختصاصی نشاندار (متصل به فلوروفور، ذرات طلا و...) که بر علیه آن آنالیت است برخورد می کند. در ادامه طی این جریان جانبی، کمپلکس آنتی بادی و آنالیت نوارهای مشخصی (به دلیل حضور فلوروفور، ذرات طلا و...) تشکیل می دهند.

نوع دوم: تست‌های سریع آنتی‌بادی (مانند تست سریع HIV، RPR یا همان تشخیص سفلیس[4]) و تست‌های سریع آنتی‌ژن‌ها (RAT) (مانند تست سریع کووید۱۹، تست تشخیصی سریع آنفلوانزا، تست تشخیص آنتی‌ژن مالاریا، تست سریع استریپ، تست سریع اورئاز)

[1] in vitro-diagnostic medical devices
[2] Lateral flow tests
[3] dipsticks
[4] Rapid plasma reagin

تست‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی اغلب از سنجش های ایمنی (IAs)[1] هستند؛ مانند سنجش های ایمنی معرف نواری یا سنجش های ایمنی فلورسانس. با این حال RAT یک ارزیابی ایمونوکروماتوگرافیک است که نتایج آن را می‌توان با چشم غیرمسلح مشاهده کرد. به نظر می‌رسد که یک تست کیفی است اما فردی که یک آزمایش RDT را تجربه کرده باشد به راحتی می‌تواند نتایج را کمّی کند. اگر حساسیت و اختصاصیت برای یک تست غربالگری تقریباً کم باشد، بهتر است نتایج آن براساس تست‌هایی مانند PCR یا وسترن‌بلات (لکه گذاری پروتئین روی غشای نیتروسلولزی و تشخیص آن پروتئین با کمک آنتی بادی اختصاصی) تأیید شود.

یکی از مزایای ذاتی تست آنتی‌ژن نسبت به تست آنتی‌بادی (مثلاً تست‌های تشخیص سریع HIV با آنتی‌بادی) این است که در عمل به زمان کمتری نیاز دارد. زیراکه آنتی‌ژن خارجی از ابتدا وجود دارد اما برای دسترسی به آنتی بادی نیاز است که به سیستم ایمنی فرصت داده شود تا آنتی بادی را تولید کند. از طرف دیگر با این که هر تست تشخیصی ممکن است پاسخ‌های منفی کاذب داشته باشد، این زمان تأخیر که به بدن داده می شود تا آنتی بادی تولید کند، خود می تواند سبب ایجاد منفی‌های کاذب بسیاری در تست آنتی‌بادی شود، زیراکه آنتی بادی های غیراختصاصی بسیاری نیز دراین مدت تولید می شوند. اگرچه جزئیات به نوع بیماری و نوع تست بستگی دارد. ساخت یک تست سریع آنتی‌ژن برای تولیدکننده معمولاً تنها درحدود پنج دلار هزینه دارد.

برخی پروتئین‌ها به ویژه آنزیم‌ها، در مسیرهای بیوشیمیایی تولیدکننده‌ی متابولیت‌ها برای فرآیندهای سلولی مختلف دخیل هستند. متابولومیکس[2] با هدف تعیین مسیرهای متابولیکی با مطالعه‌ی پروفایل‌های متابولیت سلول‌ها انجام

[1] immunoassays (IAs)
[2] Metabolomics

می‌گیرد. درواقع متابولومیکس تصویری از کوچک‌مولکول‌های موجود در یک نمونه‌ی زیستی پیچیده را فراهم می‌کند. تمام اومیک‌ها[1]ی زیرشاخه‌ی ژنومیکس، (ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس) از یک رویکرد سراسری ژنوم[2] برای مطالعه‌ی عملکرد مولکول‌های زیستی در سلول‌ها، بافت‌ها یا موجودات زنده در مراحل مختلف تکوین یا تحت شرایط محیطی یا فیزیولوژیکی متفاوت استفاده می‌کنند. متابولیت‌های موجود در سلول‌ها و ترشحات سلولی تحت تأثیر ژنوتیپ، که توانایی‌های متابولیکی یک موجود زنده را تعیین می‌کند، و شرایط محیطی مانند دسترسی به مواد غذایی و وجود سموم یا مواد استرس‌زای دیگر قرار دارند. ترکیب متابولیتی به شرایط بهداشت و تکوین یک موجود زنده بستگی دارد، بنابراین با پروفایلی مفهومی از متابولیت‌ها می‌توان مولکول‌هایی که شرایط فیزیولوژیکی خاصی را نشان می‌دهند، شناسایی کرد. برای مثال متابولیت‌های موجود در سلول‌های بیمار که در سلول‌های سالم وجود ندارند، بیومارکرهای مناسبی برای تشخیص و نظارت بر بیماری هستند. از پروفایل‌های متابولیت همچنین می‌توان برای درک متابولیسم دارو که ممکن است کارآیی درمان را کاهش دهد یا در درک سمیت دارو که می‌تواند به کاهش واکنش‌های ناخواسته‌ی دارو کمک کند، استفاده کرد. آنالیز متابولومیک را می‌توان در تشخیص فعالیت کاتالیتیک پروتئین‌ها (برای مثال با کمّی‌سازی تغییرات پروفایل متابولیتی در پاسخ به جهش‌های رخ داده در ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌ها و یا بررسی اتصال مسیرهای متابولیکی که حدواسط‌های مشترک دارند)، مورد استفاده قرار داد. نمونه‌های زیستی برای آنالیز متابولیت ممکن است عصاره‌ی سلول یا بافت، مایعات بدن مانند ادرار یا خون، محیط کشت سلولی حاوی متابولیت‌های متنوع باشند. این متابولیت‌ها اجزای پایه‌ای برای بیوسنتز اجزای سلولی مانند آمینواسیدها، نوکلئوتیدها و لیپیدها هستند.

[1] -omic
[2] a genome-wide approach

همچنین به عنوان پیش‌ماده، کوفاکتور، تنظیم‌کننده، حدواسط و محصولات نهایی در مسیرهای متابولیکی مانند کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای آلی، آمین‌ها، الکل‌ها و مولکول‌های غیرآلی حضور دارند. این مولکول‌ها خصوصیات بسیار متفاوتی دارند بنابراین تشخیص و کمّی‌سازی همه‌ی آن‌ها با استفاده از یک روش واحد براساس خصوصیات شیمیایی، یک چالش است.

بیوسنسورها

همانطور که ذکر شد دسته آخر از تکنیک های ایمونولوژیکی در زیست فناوری پزشکی جهت تشخیص بیماری ها، بیوسنسورها هستند. بیوسنسورها (حسگرهای زیستی) و دستگاه‌های مراقبتی بر بالین بیمار، برای تغییر مدل مراقبت‌های بهداشتی، پدیدار شده‌اند. تکنولوژی بیوسنسور را می‌توان در دستگاه‌های مراقبتی در بالین بیمار که ارزان و قابل بازیافت هستند، یا برای نظارت مداوم در دستگاه‌های کاشتنی/پیوندی مورد استفاده قرار داد. اندازه‌گیری مانیتورینگ و ردیابی در زیست‌پزشکی، چالش‌های منحصربه فردی را در اجرا و تفسیر ارائه می‌دهد. زمانی که بیوسنسورها با ابزار پوشیدنی ادغام می‌شوند، بیومارکرها را می‌توان به صورت غیرتهاجمی در نمونه‌هایی مانند بزاق و مایعات هوای بازدم همچنین با تهاجم کمتر در نمونه‌هایی مانند خون و مایع میان‌بافتی با استفاده از مچ‌بندهایی کنترل کرد. با کمک بیوسنسورها با توجه به مطالب ذکر شده (غیرتهاجمی بودن، قابلیت کاشت، سرعت و دقت، راحتی کار، امکان مانیتورینگ طولانی و...) در واقع تشخیص بیماری بر بالین بیمار انجام خواهد شد. بنابراین دیگر نیازی به آزمایشات زمانبر و تهاجمی بعدی و بالطبع بستری شدن طولانی بیمار تنها برای تشخیص بیماری، نخواهد بود.

بیوسنسور، دستگاهی است که از مواد بیولوژیکی مانند DNA، آنزیم ها و آنتی بادی ها برای شناسایی فرآیندهای خاص بیولوژیکی، شیمیایی یا فیزیکی استفاده می کند و سپس این داده ها را منتقل یا گزارش می کند. به بیان دیگر حسگر زیستی یک واکنش زیستی را با مواد زیستی به سیگنالی قابل خواندن تبدیل می‌کند و با استفاده از اجزای زیستی مانند DNA یا پروتئین‌ها (برای مثال آنتی‌بادی‌ها یا آنزیم‌ها) آنالیت هدف -بیومارکر- را شناسایی می‌کند. بیومارکر می‌تواند یک ماده‌ی زیستی مانند پروتئین یا DNA باشد یا می‌تواند غیرزیستی باشد مانند گلوکوز. واکنش معمولاً به وسیله‌ی یکی از دو روش مبدل الکتروشیمیایی یا مبدل نوری به یک سیگنال قابل خواندن تبدیل می‌شود. ارزیابی‌های جریان جانبی و استریپ تست های الکتروشیمیایی، روش‌های قدیمی‌تری هستند که در حال حاضر بر بازار تسلط دارند. امروزه تشخیص‌های مولکولی و آزمایشگاه روی تراشه (Lab-on-a-chip)، تکنولوژی‌های نوظهور بر پایه بیوسنسورها هستند.

همانطور که در مبحث تست تشخیصی سریع (RDT) اشاره شد در ارزیابی‌های جریان جانبی از واکنش موبینگی برای حرکت نمونه‌ها و شناسایی اتصال آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود. این روش بسیار سریع، ارزان و آسان است و به طور گسترده برای تست‌های بارداری یا تست بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود. از استریپ تست های الکتروشیمیایی برای کاربردهایی مانند تست گلوکوز برای کنترل دیابت استفاده می‌شود. از خون انگشت برای اندازه‌گیری سطح قندخون فرد مدت زمان طولانی است که استفاده می‌شود و محققان به دنبال ابداع ابزارهای پوشیدنی یا قابل کاشت هستند که از بیوسنسورها برای کنترل مداوم قند استفاده می‌کنند. دستگاه‌های آزمایشگاه روی تراشه برپایه‌ی فناوری میکروفلوئیدیک (ریز سیال شناسی یا دانش به کارگیری و کنترل مقادیر بسیار کم سیال در حجم پیکولیتر تا میکرولیتر) هستند که اغلب تست‌های مختلفی را در یک دستگاه منفرد جای می‌دهد. این دستگاه‌های مینیاتوری(بسیار کوچک) فرآیند آزمایش را خودکار کرده و وجود بیوسنسورهایی واقعی بر بالین بیمار را امکان‌پذیر می‌کند.

بیوسنسورها برای نظارت بر دستگاه‌هایی که اغلب استفاده می‌شوند مانند پایش قند خون دیابتی یا برای تشخیص در تست‌های باروری و بارداری ایده‌آل هستند. آن‌ها همچنین برای دستگاه‌هایی که تا آخر عمر استفاده می‌شوند مانند آن‌هایی که برای کنترل سطوح کلسترول استفاده می‌شوند، نیز مناسب هستند. بیوسنسورها همچنین برای تست ژنتیکی و تست سرطان به دستگاه‌های تشخیصی دیگر متصل می‌شوند. انواع مختلف بیوسنسورها امکان تشخیص سطح هورمون-ها، داروها، سموم، آلاینده‌ها، فلزات سنگین، آفت‌کش و... را با دقتی قابل توجه فراهم می‌کنند. انواع مختلفی از بیوسنسورها که در پزشکی کاربردهای ضروری دارند مانند بیوسنسورهای یک آنزیم خاص، سنسورهای‌ایمنی، بیوسنسورهای نانویی اختصاصی و بیوسنسورهای DNA، هستند. این بیوسنسورها دستگاه‌هایی هستند که معمولاً سطوح مارکرهای زیستی یا هر واکنش شیمیایی را با تولید سیگنال‌هایی که عمدتاً مرتبط با غلظت یک آنالیت موجود در واکنش شیمیایی هستند تخمین می‌زنند. بیوسنسور معمولاً به پایش بیماری‌ها، کشف دارو، تشخیص آلاینده‌ها، تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا و مارکرهایی که به طور معمول شرایط بیماری را نشان می‌دهند، مانند مایعات بدن (بزاق، خون، ادرار، عرق و...) کمک می‌کنند.

بیوسنسورها تا به حال مراقبت‌های پزشکی را از مرکزیت آزمایشگاه‌ها خارج کرده و بر بالین بیمار آورده‌اند. در روش‌های تشخیصی سنتی نمونه‌ای (مثلاً خون، ادرار، مو، یا نمونه‌ی ژنتیکی) از بیمار جمع‌آوری می‌شود و به آزمایشگاه تشخیصی در محلی دیگر منتقل می‌شود. بیمار باید پس از چند روز برای گرفتن نتایج بازگردد. با تست درجا (بربالین بیمار)، بیمار طی چند ساعت نتایج خود را دریافت می‌کند. اما این روش تنها درباره‌ی حفظ زمان نیست. گاهی به معنای نجات یک زندگی است. تشخیص سریع عامل عفونی زمان لازم برای پاسخ و سپس کنترل سرعت بیماری و جلوگیری از همه‌گیری را فراهم می‌کند.

از تشخیص‌های مولکولی برای ارزیابی وضعیت سلامت فرد در سطح مولکولی استفاده می‌شود که توالی‌های ژنتیکی خاصی را در DNA، ریبونوکلئیک‌اسید (RNA) یا ماده پروتئینی که از این توالی‌های ژنتیکی بیان می‌شود، آنالیز می‌کنند. در این آزمایش‌ها از همان اصلی که در سایر بیوسنسورها وجود دارد، پیروی می‌شود. تشخیص بیومارکری که با یک گیرنده‌ی زیستی شناسایی می‌شود و به یک سیگنال قابل خواندن تبدیل می‌شود. در حال حاضر این تست‌ها خارج از بدن انجام می‌گیرند، بنابراین به عنوان زیر مجموعه‌ای از روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی طبقه‌بندی می‌شوند. روش‌های تشخیصی زیست-پزشکی و بیوسنسورها به دلیل افزایش سن جمعیت جهانی همچنین افزایش نگرانی‌های ایجاد شده با بیماری‌های مزمن مربوط به سبک زندگی اهمیت بالایی یافته‌اند.

یکی از امیدوارکننده‌ترین رویکردها برای امکان تشخیص سریع بیماری، اجرای ایده‌ی غربالگری مبتنی بر بیومارکر است. بیومارکر که درواقع هر نوع اندیکاتور مولکولی است که وجود یک بیماری را نشان می‌دهد، یا مشخص می‌کند که فرد امکان ابتلا به یک نوع بیماری در آینده را دارد یا خیر. سایر بیومارکرهای قابل اتکا، بیومارکرهای پروتئینی (برای مثال تست PSA خون که آنتی ژن اختصاصی پروستات یا Prostate-Specific Antigen را اندازه گیری می کند و برای غربالگری سرطان پروستات است، و یا کیت‌های تشخیص بارداری) و متابولیت‌ها هستند که اطلاعات ارزشمندی را درباره‌ی آنچه در سطح مولکولی رخ می‌دهد فراهم می‌کنند.

یکی از مزایای کلیدی غربالگری مبتنی بر بیومارکر، این است که علاوه بر تشخیص زودهنگام بیماری امکان تشخیص دقیق و امکان انجام پزشکی شخصی را نیز فراهم می‌کنند. پزشکی شخصی توانایی فراهم‌سازی روش تشخیصی است که براساس اطلاعات مولکولی خوده فرد بیمار و نه برپایه‌ی علائم فیزیکی و ظاهری است و احتمال موفقیت بالاتری دارد. همچنین فناوری‌های کوچک‌سازی برای ردیابی و پایش بیومارکرها امکان پایش مستمر سلامتی را فراهم کرده است.

از ارزیابی‌های جریان جانبی تا میکروفلوئیدیک آزمایشگاه روی تراشه، ظهور بیوسنسورها باعث حرکت سیستم‌های تشخیصی از آزمایشگاه به بالین بیمار می‌شود. انجام این کار چالش‌های منحصر به فردی را در اجرا و تفسیر ایجاد می‌کند اما آخرین پیشرفت‌های علمی بر موانع غلبه می‌کنند و نتایج تست‌ها را تغییر می‌دهند.

اولین بار کامان[1] از واژه‌ی بیوسنسور استفاده کرد. درواقع عنوان نمود که بیوسنسورها دستگاه‌های آنالیزگری هستند که یک واکنش زیستی را به یک سیگنال الکتریکی تبدیل می‌کنند. عموماً بیوسنسورها بهتر است صرف نظر از محدودیت‌های فیزیکی مانند pH و دما، به شدت اختصاصی و احتمالاً قابل بازیافت (استفاده‌ی دوباره از دستگاه) باشند. رویکرد عملیاتی برای طراحی یک بیوسنسور نیاز به ساخت، ثابت‌سازی و دستگاه‌های انتقال سیگنال است که این‌ها نشان‌دهنده‌ی نیاز به تحقیق بین رشته‌ای و مهندسی در شیمی و همچنین زیست‌شناسی است. براساس مکانیسم عملکردی و ماده‌ی مورد نیاز برای بیوسنسورها، آنها به ۴ گروه تقسیم می‌شوند:

۱. بیوکاتالیتیک (کاتالیتیک‌زیستی) مانند بیوسنسورهای مبتنی بر آنزیم‌ها،

۲. گروه تمایل‌زیستی[2] مانند حضور آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن یا اسید نوکلئیک،

۳. میکروب‌ها مانند بیوسنسورهای حاوی میکروارگانیسم‌ها،

۴. نانوسنسورها مانند سنسورهایی با نانوذرات فعال که معمولاً حساسیت و اختصاصیت را با تشخیص زودهنگام بیماری بالا می‌برند.

یک بیوسنسر معمولی شامل موارد زیر است:

[1] Cammann
[2] Bioaffinity group

۱. آنالیت: ماده‌ی موردنظر که نیاز به تشخیص دارد مانند گلوکوز برای دیابت.

۲. گیرنده‌ی زیستی: مولکولی که آنالیت را شناسایی می‌کند و می‌تواند گیرنده‌ی زیستی مانند آنزیم باشد.

۳. مبدل: معمولاً یک رخداد شناسایی/تشخیص زیستی را به سیگنالی قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند که به آن سیگنالی‌کردن[1] می‌گویند.

۴. الکترونیک: به طور کلی سیگنال منتقل‌شده را به صورت نمایش پردازش می‌کند.

۵. نمایشگر: معمولاً نمایشگر کریستالی مایع در ترکیب با سخت‌افزار و نرم‌افزار است که منجر به تولید نتایج بیوسنسور به شکلی کاربرپسندانه می‌شود.

شکل-۶۵ اجزای بیوسنسور

خصوصیات عمده‌ی بیوسنسورها شامل موارد زیر هستند:

۱. امکان انتخاب: مهمترین ویژگی بیوسنسور است؛ زیرا وابسته به توانایی بیوسنسور در شناسایی آنالیتی خاص در مخلوطی از نمونه یا آلاینده‌ها است. به طور مثال برهم‌کنش اختصاصی آنتی‌بادی با آنتی‌ژنی خاص.

[1] signalization

۲. تکرارپذیری: گرفتن خروجی یکسان پس از تکرار آزمایش توسط یک بیوسنسور را تکرارپذیری آن می‌گویند.

۳. پایداری: توانایی بیوسنسور در عدم حساسیت به شرایط درونی و محیطی سیستم بیوسنسور است. هرگونه تداخل می‌تواند سیگنال‌های خروجی بیوسنسور را برای اندازه‌گیری آن تغییر دهد که منجر به بروز خطا شده و می‌تواند کارآیی بیوسنسور را تحت تأثیر قرار بدهد. مبدل و بخش الکترونیکی می‌تواند حساس به دما باشد که ممکن است در عملکرد سنسور اختلال ایجاد کند. بنابراین تنظیم دقیق برای اطمینان از خروجی پایدار یک حسگر زیستی ضروری است. علاوه بر این عامل دیگری که می‌تواند روی بیوسنسور اثر بگذارد اتصال تمایلی آنالیت به گیرنده‌ی زیستی است؛ بنابراین بیوسنسور برای غلبه بر این موارد به پایداری بالا نیاز دارد.

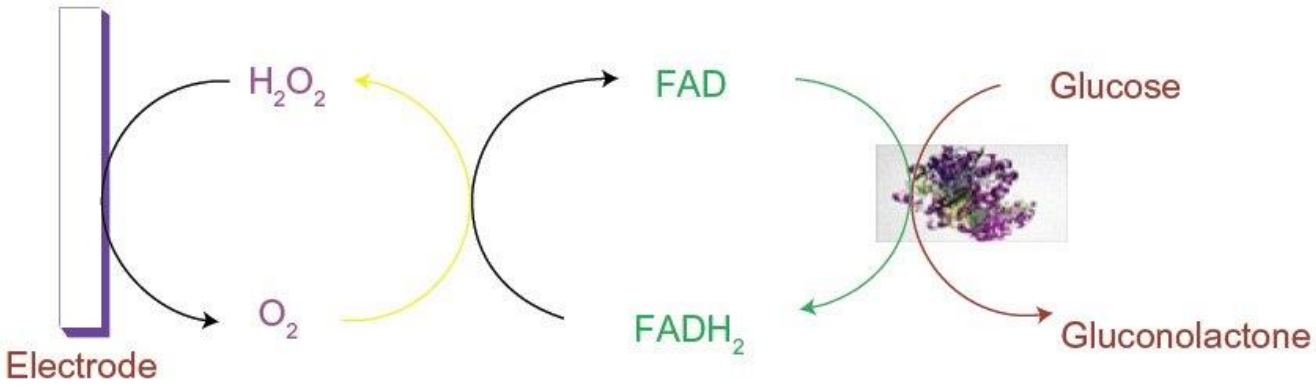
۴. حساسیت: حساسیت را می‌توان براساس محدودیت شناسایی تعریف کرد (LOD)[1]. در بسیاری از کاربردهای پزشکی بیوسنسورها باید آنالیت‌های کوچکی را در دامنه‌ی غلظتی ng/mL (نانوگرم $۱۰^{-۹}$ گرم است) یا fg/mL (فمتوگرم $۱۰^{-۱۵}$ گرم است) برای تایید وجود آنالیت در نمونه شناسایی کنند. برای مثال در سرطان پروستات، غلظت آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) که در مقداری حدود ۴ ng/mL در خون وجود دارد نیاز به تشخیص با دقت بالا دارد.

۵. خطی بودن نمودار تشخیص (نسبت غلظت یک آنالیت به خروجی سیگنال): این ویژگی را به دقت پاسخ اندازه-گیری شده نسبت می‌دهند. از نظر ریاضی می‌توان آن را با $y=mc$ به تصویر کشید. در این فرمول c غلظت آنالیت، y خروجی سیگنال و m تاثیرپذیری بیوسنسور است. تغییری کوچک در غلظت یک آنالیت در عملکرد بیوسنسور تفاوت ایجاد می‌کند. اصطلاح دیگری که در رابطه با بیوسنسور مورد توجه قرار می‌گیرد، خطی‌بودن

[1] limit of detection (LOD)

در یک محدوده‌ی خطی است که می‌توان آن را با تغییر قابل توجهی در سیگنال در اثر تغییر کمی در غلظت، تعریف کرد.

شناخته شده ترین مثالی که برای بیوسنورهای زیست فناوری موجود است، بیوسنسور قند خون می باشد. با توجه به مباحث توضیح داده شده در بالا درباره ویژگی های بیوسنسورها، می توان طراحی و اجزای این بیوسنسور را بررسی کرد تا ایده ای برای ساخت بیوسنسورِ مواد زیستی مختلف فراهم شود. کلارک و لیونز[1] اولین بیوسنسور گلوکوز را در سال ۱۹۶۲ پیشنهاد دادند که مبتنی بر رویکردی الکتروشیمیایی با استفاده از گلوکوزاکسیداز (GOx) بود. بیوسنسور گلوکوز لایه‌ای نازک از GOx دارد که روی یک آند از جنس اکسیژن غوطه‌ور شده است (با استفاده از یک فیلم دیالیز نیمه‌تراوا). اولین بیوسنسور در سال ۱۹۷۵ همراه با ابزارهای نمونه‌برداری دیجیتال[2] که برای سنجش سطح گلوکوز خون طراحی شده بودند تجاری شد. گلوکوز خون در افراد سالم معمولاً بین ۴/۹-۶/۹ mM که ممکن است در بیماران دیابتی پس از دریافت گلوکوز تا ۴۰ mM بالا برود.



شکل-۶۶ بیوسنسور گلوکز مبتنی بر رویکردی الکتروشیمیایی با استفاده از گلوکوزاکسیداز (GOx) است

[1] Clark and Lyons
[2] Yellow Spring Instruments

GOx معمولاً در حضور اکسیژن، گلوکوز را به گلوکونولاکتون[1] اکسید کرده و هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2)[2] و آب به عنوان محصول جانبی تولید می‌شود. سپس واکنشی انجام می‌دهد که محصولی از نوع کربوکسیلیک اسید به نام گلوکونیک اسید[3] تولید می‌کند. GOx برای اجرای فرآیند اکسیداسیون با ورودی فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید (FAD+[4]) به کوفاکتور کاهشی (ردوکس)[5] نیاز دارد. FAD^+ یک گیرنده‌ی الکترون است که با واکنش کاهشی به $FADH_2$ کاهش می‌یابد. واکنش بعدی با اکسیژن انجام می‌گیرد و H_2O_2 تولید می‌شود که FAD^+ را در آند بازسازی می‌کند که تعداد الکترون‌های انتقال‌یافته با میزان تولید H_2O_2 همبستگی دارد و از این رو می توان به میزان گلوکوز موجود پی ببرد.

[1] gluconolactone
[2] hydrogen peroxide (H_2O_2)
[3] gluconic acid
[4] flavin adenine dinucleotide (FAD+)
[5] redox co-factor

فصل سوم: کاربردهای درمانی بیوتکنولوژی پزشکی

تا اینجا درباره کاربردهای زیست فناوری پزشکی در تشخیص بیماری های مختلف توضیح داده شد. اما این تنها کاربرد این علم رو به گسترش و درحال رشد نیست. زیست فناوری پزشکی پس از تشخیص یک بیماری درصدد درمان آن بیماری نیز است. کاربردهای بیوتکنولوژی پزشکی در حوزه درمان بیماری ها در چند دسته تقسیم می شود:

۱) تولید بیوفارماسوتیکال

۲) ژن درمانی و سلول درمانی

۳) مهندسی بافت و پیوند عضو

۱) تولید بیوفارماسوتیکال[1]

یکی از اهداف اصلی در زیست فناوری پزشکی تولید بیوفارماسوتیکال است. بیوفارماسوتیکال چیست؟ مترادف های بسیاری برای این کلمه به کار برده می شود مانند: زیست‌داروها (داروی زیستی (بیولوژیکی)) یا محصولِ زیست پزشکی (محصول ساخته شده طی فرآیندهای زیستی). درواقع بیوفارماسوتیکال هم نوعی داروی زیستی است که از قندها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک، سلول های زنده یا بافت ها تشکیل شده است و هم یک محصولِ دارویی است که از منابع زیستی مانند انسان، حیوانات یا میکروارگانیسم ها استخراج یا نیمه سنتز می شود.

[1] biopharmaceutical

از مهمترین و ابتدایی ترین یافته ها در زمینه زیست فناوری پزشکی کشف آنتی بیوتیک پنی سیلین از کپک پنی سیلیوم در سال ۱۹۲۸ بوسیله الکساندر فلمینگ[1] است. این دارو در سال ۱۹۴۰ به تولید انبوه رسید اما عصر طلایی زیست فناوری پزشکی از سال ۱۹۷۰ و با توسعه تکنیک DNA نوترکیب آغاز شد.

اگرچه ممکن است در نگاه اول چنین چیزی بعید به نظر برسد، ولی زیست‌فناوری مدرن و توسعه داروهای سنتی اشتراکات زیادی با هم دارند. به عنوان مثال، هدف هر دو، تولید موادی است که بتوانند از بیماری پیشگیری یا آن را درمان کنند. برای رسیدن به این هدف، هر دو به یافته‌های جدید علوم زیستی تکیه می‌کنند. برای اکثر بیماران چندان مهم نیست دارویی که مصرف می‌کنند از روش‌های زیست‌فناورانه یا روش‌های شیمیایی تولید شده باشد. بلکه برای آن‌ها بسیار مهم است محصول مورد استفاده، اثرگذاری داشته باشد. با این حال، در لایه‌های زیرین تفاوت‌های چشمگیری میان این دو نوع محصول دارویی وجود دارد.

تقریباً تمام داروهای سنتی کوچک مولکول[2] هستند. این داروها معمولاً ترکیبات آلی نسبتاً ساده شامل چند گروه مولکولی عملکردی هستند. از طرف دیگر، پروتئین‌های درمانی، بزرگترین گروه از داروهای زیستی، حوزه‌ای کاملاً مجزا برای خود تشکیل داده‌اند. این پروتئین‌ها از ده‌ها، و گاهی صدها اسید آمینه تشکیل شده‌اند که اندازه هر کدام تقریباً مشابه اندازه مولکول استیل سالیسیلیک اسید آسپیرین است. به عنوان مثال، ماده فعال موجود در CellCept که در حال حاضر پرفروش‌ترین داروی سنتی شرکت Roche است، یک ترکیب آلی تشکیل شده از ۶۲ اتم با وزن مولکولی ۴۳۳/۵ دالتون است (یک دالتون [Da] برابر $۱,۷ \times ۱۰^{-۲۷}$ کیلوگرم است). محصول بسیار پرفروش بیوفارماسوتیکال از شرکت Roche

[1] Alexander Fleming
[2] small molecule

که آنتی‌بادی مونوکلونال MabThera /Rituxan (ریتوکسیماب) است، تقریباً ۳۵۰ برابر سنگین‌تر از داروی CellCept یعنی ۱۵۰هزار دالتون سنگین‌تر است. جای تعجب نیست که این مولکول بزرگ چالش‌های کاملاً متفاوتی را برای تحقیق، توسعه و تولید ایجاد می‌کند و به طور مشخصی متفاوت از داروهای معمولی در بدن عمل می‌کند.

مهم‌ترین پیامد اختلاف اندازه داروهای سنتی و داروهای ساخته شده به وسیله روش‌های زیست‌فناورانه مربوط به ساختار آن‌ها است. شکل سه بعدی مولکول‌های آلی ساده، که در اصطلاح شیمیایی به آن "کوچک مولکول" می‌گویند، اساساً توسط پیوندهای ثابت میان اتم‌های جدا از هم تعیین می‌شود. در نتیجه، داروهای سنتی معمولاً ترکیبات بسیار پایداری هستند که شکل سه بعدی خود را در طیف گسترده‌تری از شرایط محیطی حفظ می‌کنند و تقریباً می‌توان گفت فقط تغییرات شدید محیطی -به عنوان مثال وجود اسیدها یا بازهای قوی یا حرارت بسیار بالا- قادر به آسیب رساندن به شکل دائمی به این مولکول‌ها هستند. به طور معمول داروهای سنتی را به آسانی می‌توان کنترل کرد و به راحتی و در شکل‌های مختلف مانند قرص، آب میوه یا شیاف برای بیماران تجویز می‌شوند. بسیاری از داروهای سنتی در اصل از محصولات طبیعی گرفته شده‌اند. به عنوان مثال، طبیبان صدها سال قبل از آنکه شیمی‌دان فلیکس هافمن[1] برای تولید استیل سالیسیلیک، سالیسیلات را با استیک اسید واکنش دهد از عصاره برگ یا پوست برخی از گونه‌های خاص بید برای تولید این ماده به منظور بهبود رماتیسم، تب و درد استفاده می‌کردند. امروزه داروهایی از این دست معمولاً با استفاده از مواد اولیه قبلی تولید می‌شوند. این روش‌ها برای دهه‌های زیادی آزمایش شده‌اند و می‌توان آن‌ها را در هر مکانی و با همان استاندارد و به میزان دلخواه تولید کرد. برقراری شرایط استریل، که چالش فنی قابل توجهی ایجاد می

[1] Felix Hoffmann

کند، برای تولید داروهای سنتی به ندرت لازم هستند. اما از طرف دیگر، جلوگیری از آسیب رساندن حلال‌های آلی به محیط زیست در بسیاری از فرآیندهای تولید سنتی به عنوان یک بخش بسیار سخت از فرآیند باقی مانده است.

زیست‌داروها یا بیوفارماسوتیکال به فرآیند تولید بسیار دقیق‌تری نیاز دارند. اکثر داروهایی که با روش‌های زیست‌فناورانه تولید می‌شوند، پروتئین هستند و پروتئین‌ها به تغییرات محیط خود بسیار حساس‌اند. ساختار آن‌ها بر پایه واکنش‌های متنوع و اغلب ضعیف میان آمینواسیدهای سازنده شکل می‌گیرد. این واکنش‌ها در شرایط مطلوب فقط در یک فضای بسیار محدودی از شرایط محیطی با یکدیگر هماهنگ می‌شوند که دقیقاً مطابق با شرایطی است که ارگانیسم تولید کننده آن پروتئین در آن شرایط به بهترین وجه رشد می‌کند. به همین دلیل، حتی تغییرات نسبتاً کوچک دما، مقدار نمک یا pH محلول می‌تواند به ساختار پروتئین آسیب برساند. به هم خوردن این شرایط می‌تواند عملکرد پروتئین را از بین ببرد؛ زیرا عملکرد پروتئین‌ها کاملاً به شکل دقیق و طبیعی ساختار آن‌ها وابسته است.

این مسئله به طور مشابهی برای پروتئین‌های درمانی مورد استفاده در پزشکی نیز صادق است. بیشتر این مولکول‌ها به عنوان پیام‌رسان‌های شیمیایی حیاتی در بدن عمل می‌کنند. سلول‌های هدف که سیگنال‌ها را دریافت و ترجمه می‌کنند، گیرنده‌های خاصی در سطح خود دارند که پیام‌رسان شیمیایی مربوطه دقیقاً درون آن‌ها جای می‌گیرد. اگر شکل سه بعدی پیام‌رسان شیمیایی حتی اندکی تغییر کند، دیگر این مولکول توسط گیرنده خود شناخته نمی‌شود و غیرفعال می‌شود. این وضعیت برای گروه دیگری از پروتئین‌های درمانی، آنتی‌بادی‌ها، نیز وجود دارد. این مولکول‌ها در اصل بخشی از سیستم ایمنی بدن هستند. وظیفه آن‌ها شناخت ساختارهای خارجی است، برای این منظور آن‌ها یک منطقه شناسایی ویژه دارند که شکل آن دقیقاً با شکل مولکول هدف مطابقت دارد. فقط تغییر یکی از چند صد آمینواسیدی که منطقه شناسایی را تشکیل می‌دهند، می‌تواند آنتی‌بادی را غیرفعال کند. به نظر، تولید آنتی‌بادی برای هدف قرار دادن هر ماده

خارجی یا داخلی امکان پذیر است. زیست‌فناوری مدرن از این روش برای مسدود کردن مسیرهای متابولیکی دخیل در فرآیندهای بیماری‌زایی در بدن استفاده می‌کند. مانند سایر پروتئین‌های درمانی، آنتی‌بادی‌ها نیز برای داشتن عملکرد باید آرایش مولکولی صحیحی داشته باشند.

آزمایشگاه‌ها و تولیدکنندگان در سراسر جهان بر روی تولید داروهای زیستی، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها با رده‌های سلولی استاندارد کار می‌کنند؛ چرا که در مورد آن‌ها به خوبی تحقیق شده و تا آنجا که برای موجودات زنده امکان پذیر است، قابل استانداردسازی هستند. این مسئله اجازه می‌دهد نتایج قابل تکراری در سراسر جهان به دست بیاید. یکی از انواع ارگانیسم‌های استاندارد و مهم مورد استفاده در تحقیقات اساسی و صنعت زیست‌فناوری شامل باکتری‌های گونه ایشرشیا کلای و سلول‌های یوکاریوتیCHO (تخمدان همستر چینی[1]) هستند.

محققان زیست‌فناوری، ژن‌های ساختاری و تنظیمی را برای تولید داروی مورد نظر در این لاین ها و یا لاین های سلولی مشابه وارد می‌کنند. این کار یک رده سلولی جدید ایجاد می‌کند، که معمولاً به عنوان یک راز تجاری از سوی شرکت، مورد مراقبت دقیق قرار می‌گیرد. از این گذشته، این سلول‌ها کارخانه‌های واقعی تولید داروی زیستی هستند. به آن‌ها اجازه تولید مثل داده می‌شود و سپس در دمای پایین در جایی که به عنوان بانک سلول اصلی شناخته می شود، ذخیره می‌شوند. اگر سلول‌ها نیاز به ذخیره طولانی مدت داشته باشند، می‌توان آن‌ها را تقریباً به مدت نامحدود در نیتروژن مایع در ۱۹۶- درجه سانتی گراد نگه داشت. سپس سلول‌ها از بانک‌های سلول گرفته شده و در تولید زیست دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند.

به طور کلی، روند تولید به مراحل زیر تقسیم می‌شود:

[1] Chinese hamster ovary

کشت: سلول‌ها از بانک سلول‌های برودتی به یک ماده مغذی مایع منتقل می‌شوند، جایی که اجازه تولید مثل دارند. مدت زمان این مرحله به نوع سلول استفاده شده بستگی دارد. در شرایط مطلوب سلول‌های باکتریایی مانند ایشرشیا کلای معمولاً هر ۲۰ دقیقه یکبار تقسیم می‌شوند. بنابراین یک سلول ظرف ۲۴ ساعت به $۴/۷ \times ۱۰^{۲۱}$ سلول می‌رسد. در مقابل، سلول پستانداران مانند سلول‌های CHO تقریباً هر ۲۴ ساعت یکبار تقسیم می‌شوند و به دست آوردن تعداد کافی سلول، مدت زمان بیشتری طول می‌کشد. در طی مرحله رشد، محیط کشت سلولی به تدریج به ظروف کشت بزرگ‌تر منتقل می‌شوند.

تخمیر: تولید واقعی زیست‌دارو در این مرحله اتفاق می‌افتد. محیط کشت حاوی موادی است که برای سنتز پروتئین درمانی مورد نظر لازم است. در کل، در این مرحله محیط کشت از حدود ۸۰ ماده مختلف تشکیل می‌شود، هرچند تولیدکنندگان هرگز ترکیب دقیق آن را فاش نمی‌کنند. ظروف فولادی در مقیاس صنعتی که تخمیر در آن‌ها انجام می شود دارای ظرفیتی نزدیک به ۱۰ هزار لیتر یا حتی بیشتر هستند. در مورد اندازه فرمانتور نه تنها محدودیت‌های فنی بلکه زیستی نیز وجود دارد: هرچه فرمانتور بزرگتر باشد، ایجاد شرایط یکنواخت در اطراف همه سلول‌های درون آن دشوارتر خواهد بود.

رآکتور شیمیایی وسیله‌ای است که در آن واکنش‌های مختلف انجام می‌شود و طی آن مواد اولیه خام به محصولات مورد نیاز تبدیل می‌شوند. رآکتورها معمولا در اندازه های بزرگ هستند و در صنعت کاربرد دارند. رآکتور زیستی یا بیوراکتور گونه‌ای از راکتورهای شیمیایی است که در آن واکنش‌های زیستی شبیه‌سازی می‌شوند. بیو راکتور ها معمولا برای کاربردهای پزشکی و دارویی و واکنش های بیوشیمیایی استفاده می شوند و درصورتی که بیوراکتور برای فعالیت های تخمیری استفاده شود فرمانتور نامیده می شود.

خالص سازی: از نظر فنی، تولید زیست دارو در سلول‌ها یک فرآیند تک مرحله‌ای است و می‌توان بلافاصله پس از تخمیر محصول را خالص کرد. در ساده‌ترین حالت، سلول‌های کشت شده محصول را به محیط کشت ترشح می‌کنند. در این حالت سلول‌ها از محیط کشت به کمک سانتریفیوژ یا فیلتراسیون جدا شده و سپس محصول مورد نظر از طریق چندین مرحله خالص‌سازی از سایر اجزا جدا می‌شود. از طرف دیگر، اگر محصول پس از بیوسنتز در سلول‌ها باقی بماند، سلول‌ها را باید ابتدا جدا و سپس هضم کرد (یعنی غشای سلولی را باید از بین برد). در مرحله بعد بقایای سلولی را باید از محلول حاوی محصول مورد نظر جدا کرد. عملکرد محصولات حاصل از فرآیندهای زیستی معمولاً بسیار کمتر از محصولات حاصل از سنتز شیمیایی است. به عنوان مثال، یک فرمانتور ۱۰ هزار لیتری فقط چند کیلوگرم از یک آنتی‌بادی درمانی مانند MabThera / Rituxan (ریتوکسیماب) یا Herceptin (تراستوزوماب) تولید می‌کند. مراحل تولید، از جمله خالص سازی، چندین هفته طول می‌کشد. علاوه بر این به چند هفته دیگر برای آزمایش محصول مورد نظر نیز نیاز است به طوریکه خلوص هر دسته از محصولات مورد آزمایش قرار می‌گیرد تا از نوسانات کیفیت جلوگیری شود. برای دریافت تأییدیه فروش از سوی نهادهای ناظر به سطح خلوص ۹۹,۹ درصد نیاز است. تنها در این صورت است که شرکت مجوز انجام پردازش‌های بیشتر و فروش محصول را دریافت می‌کند.

فرمولاسیون: گام‌های نهایی تولید داروهای زیستی نیز طاقت‌فرسا هستند. پروتئین‌های حساس، به فرم‌های دارویی پایدار تبدیل می‌شوند تا بتوان آن‌ها را به آسانی بسته بندی، ذخیره، حمل و نقل و در نهایت تجویز کرد. در تمام این مراحل برای حفظ اثر بخشی، باید از یکپارچگی ساختاری مولکول محافظت شود. در حال حاضر فراهم کردن این شرایط فقط با استفاده از محلول‌های ویژه‌ای ممکن است که بتوان با استفاده از آن‌ها محصول را به صورت برودتی منجمد و حفظ کرد، اگرچه نیاز به تأمین دماهای پایین، حمل و نقل، و تحویل نیز با چالش‌هایی مواجه است. بنابراین داروهای زیستی

حتی بیشتر از داروهای سنتی، دقیقاً بر اساس تقاضای بازار تولید می‌شوند. به دلیل ماهیت حساس بیشتر داروهای زیستی، اشکال تجویز آن‌ها به شکل محلول‌های تزریقی محدود شده است. پروتئین‌های درمانی نه می‌توانند از محیط اسیدی معده بدون آسیب بگذرند و نه از طریق دیواره روده جذب شوند. اگرچه کار بر روی گزینه‌های دیگری مانند اشکال دارویی استنشاقی در حال انجام است (به خصوص برای مولکول نسبتاً پایدار انسولین)، اما در حال حاضر تزریق تنها گزینه برای ورود داروهای زیستی به بدن است. امروزه تمام مراحل تولید داروهای زیستی کاملاً خودکار است. کارکنان تولید، فقط در صورت بروز مشکل وارد عمل می‌شوند. از آنجا که کشت‌های سلولی در برابر نوسانات محیطی بسیار حساس هستند، فرصت تولید با بازده بالا بسیار محدود است. اگر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی حد کمی از شرایط معمول فاصله بگیرد، کارکنان تولید باید برای بازگرداندن شرایط بهینه مداخله کنند. حتی وجود مقادیر کمی ناخالصی می‌تواند ضرر اقتصادی قابل توجهی به بار بیاورد، زیرا کل مجموعه تولید باید کنار گذاشته شود و فرآیند تولید باید از ابتدا با کشت سلول‌های جدید از سر گرفته شود.

حوزه‌های اقتصادی اندکی به اندازه صنعت درمان دارای تحقیقات جدی و گسترده‌ای هستند. هر یافته و روش کشف شده توسط دانشگاه‌ها و موسسات فعال در علوم زیستی معمولاً بلافاصله به آزمایشگاه‌های صنعتی راه می‌یابد. اما شرکت‌ها فقط از یافته‌های محققان دانشگاهی استفاده نمی‌کنند. آن‌ها سرمایه‌گذاری وسیعی بر روی تحقیقات مستقل خود نیز انجام می‌دهند. این امر هم در مورد شرکت‌های زیست‌فناوری و هم در شرکت‌های بزرگ مراقبت‌های بهداشتی صادق است. مبادله بین صنعت و علم بسیار شدید و پر فایده است. در طول دهه ۱۹۹۰ میلادی زیست شناسی توسط رشته-های ژنتیک و ژنومیک انسانی تعریف می‌شد. با رمزگشایی از ژنوم انسانی، محققان بینش جدید و عمیقی در زمینه وراثت انسانی به دست آوردند. با استفاده از انبوه اطلاعات ژنتیکی موجود، محققان می‌توانند مولکول‌های هدف بالقوه را برای

داروهای زیستی جدید جدا کنند. از اواخر دهه ۱۹۹۰، پروتئومیکس هم در تحقیقات پایه و هم در توسعه داروها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. از آنجا که پروتئین ها می‌توانند به عنوان مولکول‌های هدف یا به عنوان مولکول‌های دارویی عمل کنند، یافته‌های جدید اثرات مثبت بیشتری بر روی توسعه داروها می‌گذارد. علاوه بر این، از پروتئین‌ها می‌توان به عنوان نشانگر در آزمایش‌های تشخیصی استفاده کرد. تغییرات DNA و پروتئین‌ها اخیراً توجهات را به خود جلب کرده‌اند. مشخص شده است که این تغییرات در مولکول‌های زیستی -برخی موقت، برخی دائم- نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌ها دارند و در نتیجه می‌توانند به عنوان فاکتورهای کمک کننده به تشخیص بیماری مورد استفاده قرار بگیرند. علاوه بر این، تغییر پروتئین‌های درمانی به شدت بر کارایی و پایداری آن‌ها تأثیر می‌گذارد.

در سال‌های اخیر محققان موفق شده‌اند چگونگی عملکردهای اصلی سیستم ایمنی بدن را روشن‌تر کنند. این یافته‌ها منجر به رویکردهای مختلف تشخیصی جدید و ابداع روش‌های نوین تولید آنتی‌بادی‌های درمانی شده است. تکنیک‌هایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] (PCR) و تولید ریزآرایه‌های DNA، افق های جدیدی را در تحقیقات پایه‌ای و توسعه تست‌های دارویی و تشخیصی باز کرده است. زیست‌فناوری پزشکی مدرن از طیف گسترده‌ای از روش‌ها -از تولید زیست‌فناورانه محصولات طبیعی ساده گرفته تا ژن درمانی- برای تشخیص و درمان بیماری‌ها بهره می‌گیرد. با این حال، مهمترین گروه داروهای زیست‌فناوری، پروتئین‌های درمانی هستند. بیشتر پروتئین‌های درمانی، پیام‌رسان‌های شیمیایی، آنزیم‌ها و یا به ویژه اخیراً آنتی‌بادی‌های مونوکلونال هستند. برخی از این‌ها به طور طبیعی در بدن وجود دارند. به عنوان مثال، بسیاری از محصولات زیست‌فناورانه قدیمی مانند هورمون‌های انسولین و اریتروپویتین (EPO) پیام رسان‌های شیمیایی طبیعی بدن هستند. اکنون این مولکول‌ها را می‌توان در سلول‌های اصلاح شده ژنتیکی که اطلاعات تولید

[1] polymerase chain reaction

پروتئین انسانی را حمل می‌کنند، تولید کرد. علاوه بر این، یافته‌های جدید تحقیقات پایه اکنون اجازه می‌دهد پروتئین-های درمانی با اجزای غیر پروتئینی همراه شوند تا کارایی و مدت زمان عملکرد آن‌ها بهبود یابد.

در بدن انسان هورمون اریتروپویتین تشکیل گلبول‌های قرمز خون از سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان را کنترل می‌کند. از آنجا که این ماده به طور عمده در کلیه تولید می‌شود، بیماران مبتلا به آسیب کلیوی مستعد ابتلا به کم خونی هستند. مبتلایان - غالباً بیماران دیالیزی - به طور کلی احساس ضعف و خستگی می‌کنند؛ زیرا گلبول‌های قرمز خون اکسیژن کافی به بدن را نمی‌رسانند. اما عارضه اصلی و بسیار شدید کم خونی که معمولاً ناشناخته است، نارسایی احتقانی قلبی در حال پیشرفت سریع[1] (CCF) است، زیرا قلب برای جبران کمبود گلبول‌های قرمز خون مجبور است خون بیشتری را پمپ کند. نارسایی احتقانی قلب، مهم‌ترین علت مرگ بیماران مبتلا به کم خونی ناشی از بیماری مزمن کلیوی است. کم خونی همچنین می‌تواند به دلایل دیگری مانند شیمی درمانی، بیماری‌های خود ایمنی، التهاب همراه با سرطان، پیوند مغز استخوان یا عفونت HIV به وجود بیاید. از اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی، تجویز اریتروپویتین نوترکیب جایگزین انتقال خون شده است. انتقال خون وقت گیر، پرهزینه و پرخطر است و قبلاً درمان استاندارد بیماران مبتلا به کم خونی بود. هورمون اریتروپویتین، یک هورمون گلیکوپروتئینی است، بنابراین نمی‌توان آن را در سلول‌های باکتریایی یا مخمری تولید کرد. مولکول اریتروپویتین دارای چندین زنجیره جانبی کربوهیدرات است که نه تنها نرخ تجزیه آن را در بدن کاهش می‌دهد بلکه فعالیت زیستی ذاتی آن را نیز تغییر می‌دهد. این زنجیره‌های جانبی را فقط می‌توان با سیستم‌های سنتزی موجود در سلول‌های پستانداران به پروتئین‌ها متصل کرد. به همین دلیل، فقط از سلول‌های پستانداران می‌توان برای تولید پروتئین‌های درمانی پیچیده استفاده کرد. در مورد اریتروپویتین، محققان ژن EPO انسانی را در سلول‌های

[1] congestive cardiac failure

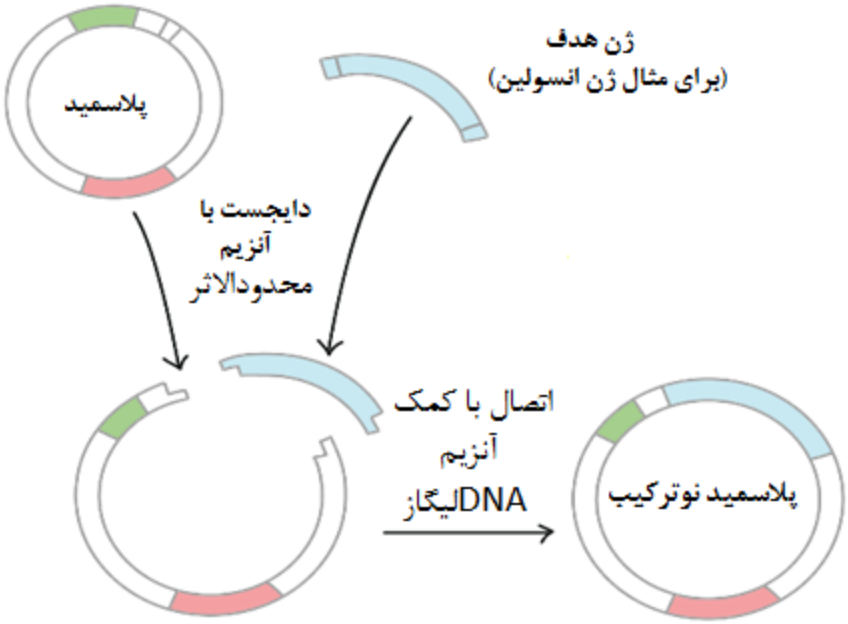
تخمدان همستر چینی قرار دادند، به همین دلیل این محصول با نام rhEPO (اریتروپویتین نوترکیب انسانی) نیز شناخته می‌شود.

همانطور که گفته شد یکی از مهمترین بیوفارماسوتیکال‌ها، پروتئین ها هستند که بیوتکنولوژی پزشکی با کمک تکنیک های تخصصی مهندسی ژن اقدام به تولید پروتئین های نوترکیب کرده است. در این حوزه از روشی تخصصی به نام کلونینگ مولکولی استفاده می شود. پایه‌ی این تکنولوژی، توانایی الحاق یک توالی از DNA هدف درون یک حامل (وکتور) و سپس قرار دادن آن در یک میزبان مناسب است. برای جداسازی ژن‌ها و انتقال آن‌ها از یک موجود به موجود دیگر، در بیوتکنولوژی مولکولی از تکنیک‌های متعددی استفاده می‌شود. درنهایت این فرآیند تکنولوژی DNA نوترکیب[1] یا کلونینگ مولکولی نام دارد. توضیحات کامل مراحل ساخت DNA نوترکیب و کلونینگ در "کتاب مقدمه زیست فناوری" شرح داده شده است.

انواع متعددی از این فرآیند پایه‌ای ابداع شده است. گسترش این فناوری‌ها به فهم فرآیندهای اساسی در زیست‌شناسی مولکولی، ژنتیک باکتریایی و آنزیم‌شناسی اسید نوکلئیک بستگی دارد. شروع کاربرد این فناوری‌ها به منظور دست‌ورزی DNA مدیون آقای استنلی کوهن[2] از دانشگاه استنفورد در کالیفرنیا و آقای هربرت بایر[3] از دانشگاه کالیفرنیا در سن فرانسیسکو است. کوهن روش‌هایی برای انتقال پلاسمیدها، (مولکول‌های DNA حلقوی کوچک) به درون سلول‌های باکتریایی ابداع کرد و بایر روی آنزیم‌هایی کار می‌کرد که DNA را در توالی‌های نوکلئوتیدی ویژه‌ای برش می‌دادند (آنزیم های محدودالاثر). آن‌ها نظریه‌ی زیر را ارائه دادند: می‌توان با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده قطعه‌ی مشخصی

[1] recombinant DNA technology
[2] Stanley Cohen
[3] Herbert Boyer

از DNA را درون پلاسمید قرار داد، سپس پلاسمید نوترکیب را به کمک روش کوهن به میزبان باکتریایی وارد کرد. پروتئینی که از DNA نوترکیب حاصل می شود، پروتئین نوترکیب نامیده می شود. این روش طی مدت کوتاهی در تولید انسولین انسانی که برای درمان دیابت استفاده می‌شود، در باکتری ایشرشیا کلای در سال ۱۹۷۸ موفقیت آمیز بود. بیش از ۲۰۰ داروی جدید تولید شده با روش فناوری DNA نوترکیب برای درمان بیش از ۳۰۰ میلیون نفر با بیماری‌هایی نظیر سرطان، ام اس، سیستیک فیبروزیس، بیماری‌های قلبی-عروقی و برای ایجاد مصونیت دربرابر بیماری‌های عفونی از زمانی که اولین محصول تجاری انسولین انسانی نوترکیب تولید شد، مورد استفاده قرار گرفته است. به علاوه، بیش از ۴۰۰ داروی جدید برای درمان چندین بیماری جدی انسانی در کارآزمایی‌های بالینی در حال آزمایش هستند.



شکل-۶۷ در اثر ادغام قطعه‌ی ژنتیکی کدکننده‌ی محصول مورد نظر ما درون پلاسمید (وکتور)، پلاسمید نوترکیب خواهیم داشت. آنزیم لیگاز نقش متصل کننده‌ی قطعه‌ی خارجی به پلاسمید را دارد.

آماده‌سازی DNA برای کلونینگ

از نظر تئوری DNA هر موجودی را می‌توان کلون کرد. DNA هدف را می‌توان به طور مستقیم از DNA ژنومی، از RNA پیام رسان (mRNA)، از DNA که قبلاً کلون شده، یا از DNA که در آزمایشگاه ساخته شده، به دست آورد. DNA هدف ممکن است حاوی توالی کامل کدکننده‌ی یک پروتئین، بخشی از توالی کدکننده‌ی پروتئین، قطعه‌ای تصادفی از DNA ژنومی یا قطعه‌ای از DNA حاوی عناصر تنظیمی کنترل‌کننده‌ی بیان یک ژن باشد. پیش از کلونینگ، هم DNA منبع که حاوی توالی هدف است و هم حامل کلونینگ باید به قطعاتی جدا و تکرارپذیر برش داده شوند تا بتوانند بعداً به هم متصل یا الحاق[1] شده و یک مولکول پایدار را تشکیل دهند. آنزیم‌های باکتریایی با نام اندونوکلئازهای محدودکننده نوع دو یا با نام مرسوم‌تر آنزیم‌های محدودالاثر، برای این نوع برش مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آنزیم‌ها مولکول‌های DNA را در توالی‌های جفت‌باز مشخصی، تشخیص داده و برش می‌دهند. این آنزیم‌ها به طور طبیعی توسط باکتری‌ها برای برش DNA مجهول و بیگانه مثل DNA ویروس‌های باکتریایی (باکتریوفاژها) ساخته می‌شوند. باکتری که یک اندونوکلئاز ویژه تولید می‌کند، همچنین سیستمی برای تغییر توالی جایگاه شناسایی این اندونوکلئاز در DNA خود دارد تا بتواند از برش این توالی در ژنوم خود محافظت کند. تعداد بسیار زیادی از اندونوکلئازهای محدودکننده از باکتری‌های مختلف، برای تسهیل کلونینگ در دسترس هستند. نوع و طول توالی جایگاه شناسایی[2] در میان آنزیم‌های مختلف متفاوت است و می‌تواند چهار جفت باز یا بیشتر باشد. HindIII یک نمونه از این آنزیم های باکتریایی است. (برای توضیحات بیشتر به "کتاب مقدمه زیست فناوری" مراجعه شود.)

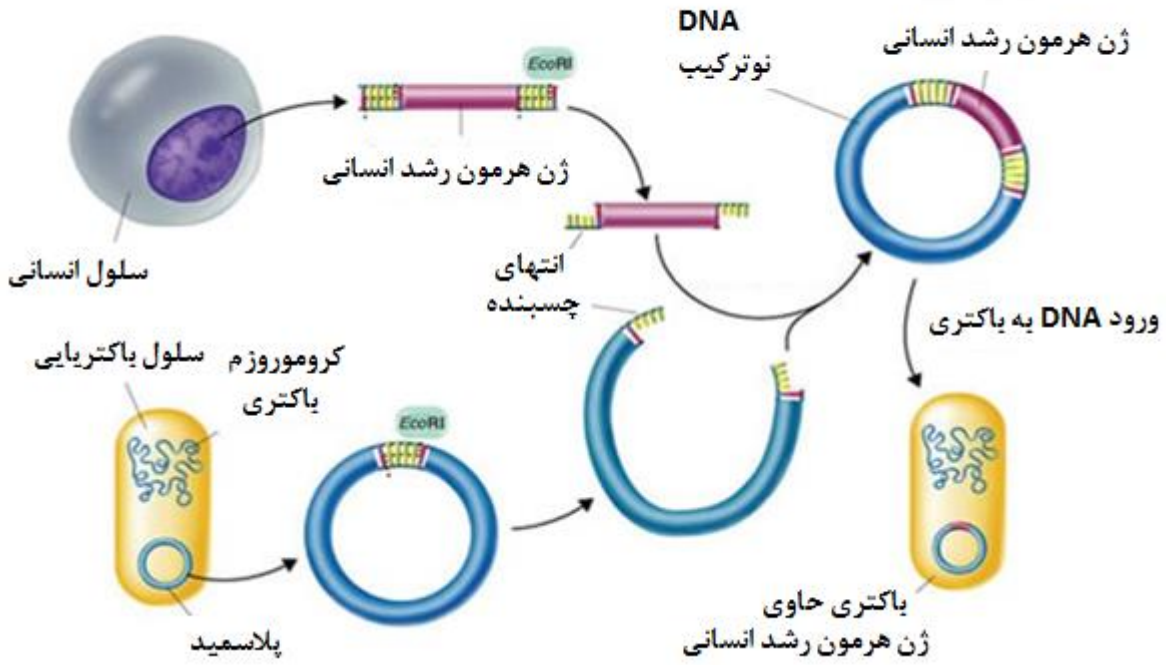
[1] ligated
[2] recognition site

ترنسفورماسیون و انتخاب DNA کلون‌شده در باکتری میزبان

در یک آزمایش کلونینگ پس از مرحله الحاق دو DNA هدف و حامل به یکدیگر، نیاز به ورود DNA هدف-حامل به داخل سلول میزبان مناسب است. از دامنه‌ی وسیعی از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی می‌توان به عنوان میزبان کلونینگ استفاده کرد، با این حال فرآیندهای معمول کلونینگ اغلب با استفاده از یک میزبان شناخته‌شده و در باکتری ایشرشیا کلای انجام می‌گیرد. فرآیند برداشت DNA توسط سلول باکتریایی را ترنسفورماسیون می‌گویند و سلولی که توانایی برداشت DNA را دارد، مستعد[1]می‌نامند. این حالت معمولاً به طور طبیعی در بسیاری از باکتری‌ها زمانی که سلول‌ها در جمعیت‌هایی با چگالی بالا یا در محیط‌های فقیر از نظر مواد مغذی تحت فشار قرار می‌گیرند، رخ می‌دهد و باکتری‌ها را قادر می‌سازد تا توالی‌های جدیدی را به دست بیاورند که ممکن است بقایشان را افزایش بدهد. با وجود این که مستعد شدن و ترنسفورماسیون، ویژگی‌های ذاتی ایشرشیا کلای نیستند، می‌توان با تیمارهای متعددی همچون کلسیم کلرید سرد، مستعد شدن را القا کرد. شوک الکتریکی کوتاه، برداشت مولکول‌های DNA خارجی را تسهیل می‌کند. از طرف دیگر می‌توان با فرآیندی به نام الکتروپوریشن[2] (قرار دادن باکتری‌ها در معرض میدان الکتریکی با ولتاژ بالا)، نیز برداشت DNA آزاد را القا کرد. به طور کلی، ترنسفورماسیون فرآیندی ناکارآمد است؛ بنابراین بیشتر سلول‌ها پلاسمیدی دریافت نخواهند کرد و در بهترین حالت حدوداً از هر هزار سلول میزبان ایشرشیا کلای، یک سلول ترنسفورم می‌شود. همچنین در آن دسته از سلول‌های میزبان که قابلیت تبادل بین مولکول‌های DNA را به دلیل حذف آنزیم ریکامبیناز RecA از کروموزومشان ندارند، یافتن اشکال سالم DNA واردشده محتمل‌تر است. سلول‌های ترنسفورم‌شده

[1] competent
[2] electroporation

با حامل‌هایی که یک ژن کدکننده‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک را حمل می‌کنند، با کشت در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک قابل انتخاب هستند. برای مثال سلول‌هایی که حامل پلاسمید pUC19 هستند را می‌توان روی محیط حاوی آمپی‌سیلین انتخاب کرد. سلول‌هایی که ترنسفورم نشده‌اند، فاقد این پلاسمید هستند و بنابراین مقاوت به آنتی بیوتیک را ندارند و در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین رشد نمی کنند.



شکل-۶۸ مراحل انجام تکنیک کلونینگ

در بحث زیست فناوری پزشکی تولیدِ بیوفارماسوتیکال ها می توانند انواع مختلفی داشته باشند که عبارتند از:

۱) آنتی بیوتیک

۲) آنتی‌بادی

۳) هورمون

۴) واکسن

۱-۱) آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک نوعی ماده ضد میکروبی است که علیه باکتری‌ها فعال است. این ترکیب مهمترین نوع ماده ضد باکتری برای مبارزه با عفونت‌های باکتریایی است و داروهای آنتی بیوتیکی به طور گسترده‌ای در درمان و پیشگیری از چنین عفونت‌هایی استفاده می‌شوند. این داروها ممکن است باکتری‌ها را از بین ببرند یا مانع رشد آن‌ها شوند. تعداد محدودی از آنتی بیوتیک‌ها نیز دارای فعالیت ضد پروتوزوئایی (عفونت با پروتوزوآ (جانورانی کوچک مانند تاژک‌داران، آمیب‌ها، مژک‌داران و...)) هستند. آنتی بیوتیک‌ها در برابر ویروس‌هایی مانند سرماخوردگی یا آنفلوانزا مؤثر نیستند. داروهایی که ویروس‌ها را مهار می‌کنند، داروهای ضد ویروسی یا ضد ویروس نامیده می‌شوند.

اعمال ضد باکتریایی به طور کلی در یکی از چهار مکانیسم قرار می‌گیرند که سه مکانیسم از این چهار مکانیسم به ترتیب شامل مهار یا تنظیم آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز دیواره سلول، متابولیسم و ترمیم اسید نوکلئیک، یا سنتز پروتئین است. مکانیسم چهارم شامل برهم زدن ساختار غشا است. بسیاری از این عملکردهای سلولی که توسط آنتی بیوتیک‌ها هدف قرار می‌گیرند در تکثیر سلولی نقش دارند. از آنجا که میان اغلب این عملکردها بین سلول‌های باکتریایی-پروکاریوتی و سلول‌های پستانداران-یوکاریوتی همپوشانی وجود دارد، جای تعجب نیست که برخی از آنتی بیوتیک‌ها به عنوان عوامل

ضد سرطان نیز مفید شناخته شده‌اند. البته مصرف آنتی بیوتیک‌ها می تواند عوارض جانبی مانند اسهال، درد معده و حالت تهوع داشته باشد.

در سال ۱۹۲۸ الکساندر فلمینگ فرض کرد وجود پنی سیلین، مولکول تولید شده توسط برخی از کپک‌ها، باعث از بین رفتن یا توقف رشد انواع خاصی از باکتری‌ها می‌شود. فلمینگ در حال کار بر روی کشت باکتری‌های بیماری‌زا بود که متوجه اسپورهای یک کپک سبز رنگ به نام Penicillium chrysogenum در یکی از پلیت‌های کشت خود شد. وی مشاهده کرد که وجود کپک باعث از بین رفتن یا جلوگیری از رشد باکتری‌ها می‌شود. فلمینگ فرض کرد که کپک باید ماده‌ای ضد باکتریایی ترشح کند، ماده‌ای که وی در سال ۱۹۲۸ آن را پنی سیلین نامید. فلمینگ معتقد بود که می‌توان از ویژگی‌های ضد باکتریایی آن برای درمان بهره برد. وی در ابتدا برخی از خصوصیات زیستی آن را مشخص کرد و تلاش کرد تا از داروی خام برای درمان برخی از عفونت ها استفاده کند، اما بدون کمک شیمی‌دانان آموزش دیده، قادر به ادامه توسعه آن نبود.

با این حال نباید امید به درمان قطعی هرنوع عفونت با کمک آنتی بیوتیک داشت زیراکه مقاومت باکتری در برابر آنتی بیوتیک معضلی است که امروزه بیش از پیش دست به گریبان محققین شده است. مقاومت به آنتی بیوتیک زمانی رخ می‌دهد که باکتری قادر باشد در حضور یک یا چند آنتی بیوتیک همچنان به زنده ماندن و رشد ادامه دهد. در این صورت با وجود مصرف آنتی بیوتیک، بازهم علائم بیماری شدت می‌یابند و باکتری‌های مقاوم همچنان باعث ایجاد عفونت می‌شوند. بدون وجود آنتی بیوتیک‌های موثر، مشکلات زیادی برای بیماران و جوامع به وجود خواهد آمد. به طور مثال عفونت‌های شایعی مانند ذات الریه باکتریایی، تهدیدکننده‌ی زندگی می‌شوند، اقداماتی مانند جراحی قلب باز بسیار خطرآفرین خواهد شد و آمار مرگ و میر ناشی از عفونت در جوامع افزایش خواهد یافت. مقاوم شدن باکتری‌ها در برابر

آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است. این حالت یک روند طبیعی است که نمی‌توان جلوی آن را گرفت. اما موضوع نگران کننده این است که این روند به سرعت رو به افزایش است. علت اصلی روند سریع مقاوم شدن باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، تجویز آنتی بیوتیک در موارد غیرضروری، تجویز نوع نامناسب و مدت زمان نامناسب مصرف است. جالب این است که فلمینگ افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی را پیش بینی کرده بود.

افراد نباید دوره مصرف آنتی بیوتیک ها را در نیمه راه متوقف کنند. معمولاً آنتی بیوتیک از طریق خوراکی مصرف می شود. با این حال، پزشکان می توانند داروی تزریقی آنتی بیوتیک را نیز تجویز کرده و یا مستقیماً بر روی قسمتی از بدن که دارای عفونت است، اعمال کنند. اکثر آنتی بیوتیک ها طی چند ساعت مبارزه با عفونت را شروع می کنند. برای جلوگیری از بازگشت عفونت، کل دوره درمان را باید کامل شود. قطع دارو قبل از اتمام دوره، خطر ابتلا به باکتری ها در آینده را افزایش می دهد. فرد حتی پس از مشاهده علائم بهبودی، باید دوره درمان آنتی بیوتیک را تکمیل کند.

۱-۲) آنتی‌بادی‌ها

به آنتی‌بادی (پادتن)، ایمونوگلوبین نیز گفته می‌شود؛ پروتئینی محافظ که توسط سیستم ایمنی بدن در پاسخ به وجود ماده‌ای خارجی به نام آنتی‌ژن (پادگن) تولید می‌شود. آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌ها را شناسایی کرده و به آن‌ها متصل می‌شوند تا بتوانند آن‌ها را از بدن خارج کنند. طیف گسترده‌ای از مواد توسط بدن به عنوان آنتی‌ژن در نظر گرفته می‌شوند، از جمله ارگانیسم‌های عامل بیماری و مواد سمی مانند سم حشرات.

آنتی‌بادی‌های درمانی یک کلاس دارویی نسبتاً جدید را تشکیل داده‌اند که فقط با وجود زیست‌فناوری مدرن این امر امکان پذیر شده است. آنتی‌بادی‌ها بخشی از سیستم ایمنی بدن هستند. آن‌ها ساختارهای خارجی، به عنوان مثال

مولکول‌های سطح سلول‌های بدن، باکتری‌ها یا ویروس‌ها، را در بدن شناسایی می‌کنند و آن‌ها را برای از بین بردن توسط سیستم ایمنی علامت‌گذاری می‌کنند. درواقع آنتی بادی ها متعلق به یک دسته پروتئینی به نام ایمونوگلوبولین(Ig) هستند. چندین کلاس آنتی‌بادی وجود دارد که هر کدام عملکرد متفاوتی دارند. آنتی‌بادی IgG فراوان‌ترین آنتی‌بادی است. این پروتئین‌های Y شکل بر روی دو بازوی کوتاه خود دارای دو منطقه یکسان هستند که ساختار خارجی خاصی را تشخیص می‌دهند. ساقه بلند مولکول با سایر اجزای سیستم ایمنی بدن ارتباط برقرار کرده و سپس تخریب عناصر خارجی آغاز می‌شود.

ژرژ کوهلر[1] و سزار میلشتاین[2]، که بعداً جایزه نوبل دریافت کردند، راهی برای تولید نسخه‌هایی از مولکول‌های یکسان آنتی‌بادی در مقادیر نامحدود پیدا کردند. فقط طی چند سال، این آنتی‌بادی‌های به اصطلاح "مونوکلونال" انقلابی در تحقیقات زیستی ایجاد کردند و اجازه دادند مولکول مورد نظر با اطمینان شناسایی و علامت گذاری شود. با این حال، بیش از ۲۰ سال طول کشید تا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بتوانند کاربرد گسترده‌ای در درمان پیدا کنند. اواخر دهه ۱۹۹۰ میلادی محققان موفق شدند از اختصاصیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای اهداف درمانی استفاده کنند. به عنوان مثال، می‌توان آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را به هدف اتصال به مولکول‌های خاص و جلوگیری از بیماری‌زایی آن‌ها طراحی کرد. با این حال، سازندگان دارو قادر به استفاده از آنتی‌بادی‌های به دست آمده از سلول‌های استاندارد پستانداران (معمولاً موش) نبودند. از آنجا که ساختار مولکول‌ها از یک گونه به گونه دیگر متفاوت است، ثابت شد که آنتی‌بادی‌های موشی مزایای اندکی برای مصارف انسانی دارند. علاوه بر این، استفاده از این آنتی‌بادی‌ها ممکن است عوارض جانبی خطرناکی

[1] Georges Kohler
[2] Cesar Milstein

نیز به بار آورد. بنابراین محققان بر روی تولید آنتی‌بادی‌های کایمریک و انسانی شده متمرکز شدند بطوریکه این مولکول‌ها فقط مناطق شناسایی آن‌ها بر پایه ژن‌های موشی است. اکنون می‌توان تمام ژن‌های انسانی مورد نیاز برای تولید آنتی‌بادی را در حیوانات آزمایشگاهی وارد کرد. در نتیجه، اکنون علم پزشکی انباری از آنتی‌بادی‌های درمانی را دراختیار دارد که از لحاظ ساختاری با نمونه‌های طبیعی خود در بدن انسان یکسان هستند.

اولین استفاده از اصطلاح "آنتی‌بادی" در متنی توسط پاول ارلیچ[1] اتفاق افتاده است. اصطلاح Antikörper (کلمه آلمانی برای آنتی‌بادی) در بخش نتایج مقاله او یعنی "مطالعات تجربی در مورد مصونیت"، منتشر شده در اکتبر ۱۸۹۱، آمده است که بیان می‌کند، "اگر دو ماده باعث ایجاد دو Antikörper متفاوت شوند، پس آن‌ها باید متفاوت باشند." با این حال، این اصطلاح بلافاصله پذیرفته نشد و چندین اصطلاح دیگر برای آنتی‌بادی مانند Immunkörper، Amboceptor، Zwischenkörper، sensibilisatrice، copula، Desmon، philocytase، fixators و Immunisin پیشنهاد شد. کلمه آنتی‌بادی دارای تشابه رسمی با کلمه آنتی توکسین و مفهومی مشابه با Immunkörper (ایمنی بدن در انگلیسی) است. بدین ترتیب، ساختار اصلی کلمه حاوی یک نقص منطقی است. آنتی توکسین چیزی است که علیه یک سم کار می‌کند، در حالی که آنتی‌بادی توسط بدن، علیه هدفی هدایت می‌شود.

مطالعه آنتی‌بادی‌ها در سال ۱۸۹۰ و زمانی آغاز شد که امیل فون بهرینگ[2] و کیتاساتو شیباسابوری[3] فعالیت آنتی‌بادی علیه سموم دیفتری و کزاز را توضیح دادند. فون بهرینگ و کیتاساتو، نظریه ایمنی هومورال را مطرح کردند و پیشنهاد دادند که یک واسطه در سرم می‌تواند با یک آنتی‌ژن خارجی واکنش دهد. این ایده پاول ارلیچ را بر آن داشت تا نظریه

[1] Paul Ehrlich
[2] Emil von Behring
[3] Kitasato Shibasaburō

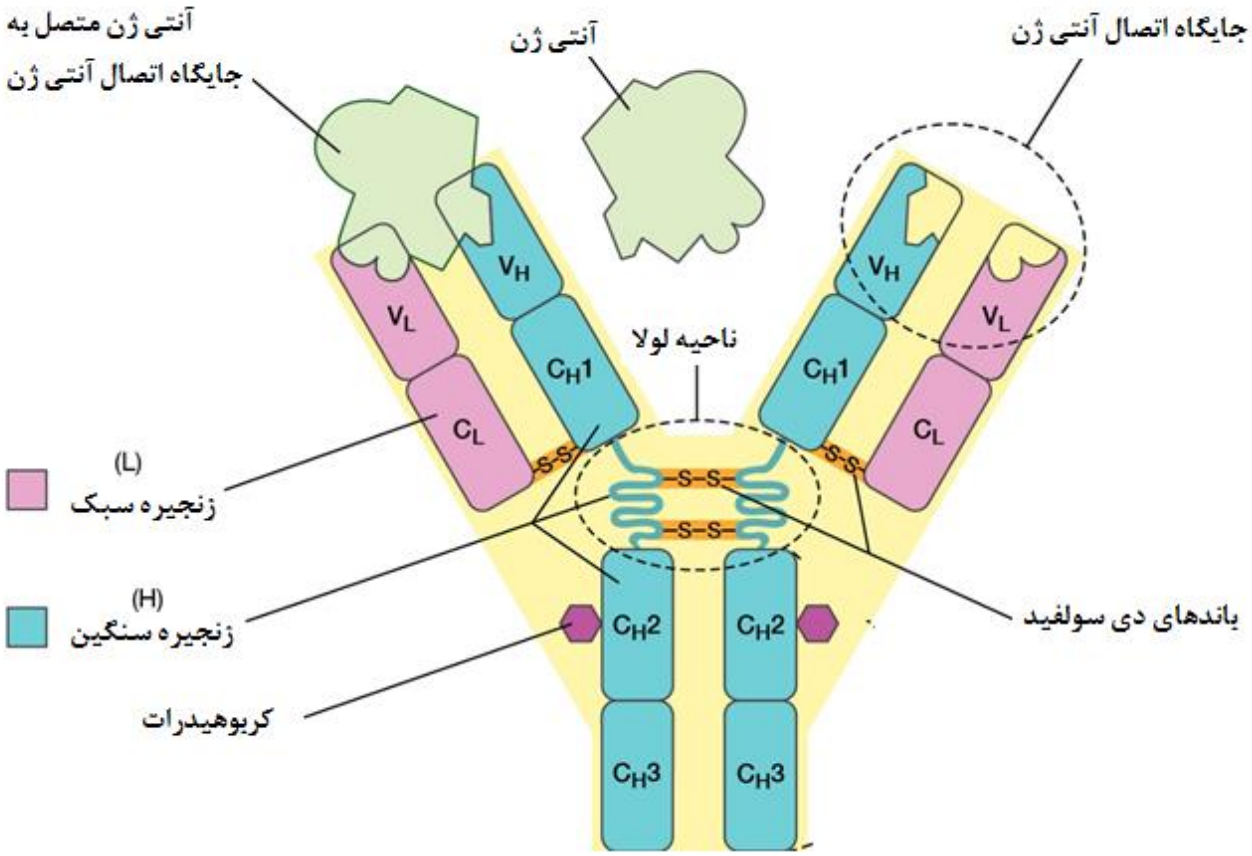
زنجیره جانبی را برای تعامل آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در سال ۱۸۹۷ پیشنهاد کند، نظریه‌ای که وی در آن فرض کرد گیرنده‌های (به عنوان "زنجیره‌های جانبی") موجود در سطح سلول‌ها می‌توانند به طور خاص در یک تعامل "قفل و کلید مانند" به سموم متصل شوند و این اتصال محرک تولید آنتی‌بادی است. سایر محققان معتقد بودند که آنتی‌بادی‌ها به طور آزاد در خون وجود دارند و در سال ۱۹۰۴، آلمروت رایت[1] پیشنهاد کرد که آنتی‌بادی‌های محلول، باکتری‌ها را می‌پوشانند تا آن‌ها را برای فاگوسیتوز (بیگانه‌خواری) و از بین بردن، برچسب‌گذاری کنند. فرآیندی که او به نام اپسینوزاسیون[2] نامید.

در دهه ۱۹۲۰، مایکل هایدلبرگر[3] و اوسوالد اوری[4] مشاهده کردند که آنتی‌ژن‌ها می‌توانند توسط آنتی‌بادی رسوب کنند و ادامه داد که آنتی‌بادی‌ها از پروتئین ساخته شده‌اند. خصوصیات بیوشیمیایی فعل و انفعالات اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در اواخر دهه ۱۹۳۰ توسط جان ماراک[5] با جزئیات بیشتری بررسی شد. پیشرفت عمده بعدی در دهه ۱۹۴۰ بود، زمانی که لینوس پائولینگ[6] با نشان دادن اینکه فعل و انفعالات بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها بیشتر از وضعیت شیمیایی به شکل آن‌ها بستگی دارد و نظریه قفل-کلید که توسط ارلیچ پیشنهاد شده بود را تأیید کرد. در سال ۱۹۴۸، آسترید فاگرئوس[7] کشف کرد که سلول‌های B، زمانی که به شکل سلول‌های پلاسما هستند، مسئول تولید آنتی‌بادی‌ها می باشند. نقش حیاتی و کلیدی آنتی بادی در درمان بیماری ها بر کسی پوشیده نیست، بنابراین زیست فناوری پزشکی در صدد تولید این پروتئین محافظ بر آمده است. برای درک این موضوع باید ابتدا ساختار این پروتئین را بشناسیم.

[1] Almroth Wright
[2] opsoninization
[3] Michael Heidelberger
[4] Oswald Avery
[5] John Marrack
[6] Linus Pauling
[7] Astrid Fagraeus

ساختار آنتی‌بادی

ساختار چهار زنجیره‌ای یک مولکول آنتی‌بادی یا ایمونوگلوبولین از دو زنجیره سبک (L) یکسان و دو زنجیره سنگین (H) یکسان تشکیل شده است که با پیوندهای دی‌سولفیدی به شکل یک حرف "وای انگلیسی Y" انعطاف پذیر در کنار هم نگه داشته می‌شوند. هر زنجیره از یک منطقه متغیر (V) و یک منطقه ثابت (C) تشکیل شده است. حالت‌های تا شده در نواحی مختلف بخصوص ناحیه لولا (hinge) توسط پیوندهای دی‌سولفیدی (—S—S—) حفظ می‌شوند.



شکل-۶۹ ساختار آنتی بادی. دارای دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین است.

هنگامی که یک ماده بیگانه وارد بدن می‌شود، سیستم ایمنی بدن قادر است آن را به عنوان عامل خارجی شناسایی کند؛ زیرا مولکول‌های سطح آنتی‌ژن با آن‌هایی که در بدن هستند، متفاوت است. برای از بین بردن مهاجم، سیستم ایمنی بدن تعدادی از مکانیسم‌ها را به راه می‌اندازد که تولید آنتی‌بادی، یکی از مهمترین مکانیسم‌ها است. آنتی‌بادی توسط گلبول‌های سفید خون اختصاصی به نام لنفوسیت‌های B (یا سلول‌های B) تولید می‌شود. هنگامی که یک آنتی‌ژن به سطح سلول B متصل می‌شود، سلول B تقسیم شده و به گروهی از سلول‌های یکسان (کلون) بالغ می‌شود. سلول‌های B بالغ که سلول‌های پلاسما نیز نامیده می‌شوند، میلیون‌ها آنتی‌بادی به جریان خون و سیستم لنفاوی ترشح می‌کنند. همانطور که آنتی‌بادی‌ها به گردش در می‌آیند، آنتی‌ژن‌های مشابه با آنتی‌ژنی که باعث ایجاد پاسخ ایمنی شده را مورد حمله قرار داده و خنثی می‌کنند. آنتی‌بادی‌ها با اتصال به آنتی‌ژن‌ها به آن‌ها حمله می‌کنند. به عنوان مثال اتصال یک آنتی‌بادی به یک سم، می‌تواند سم را به سادگی و با تغییر در ترکیب شیمیایی آن خنثی کند.

از طرف دیگر با متصل کردن خود به برخی از میکروب‌های مهاجم، می‌توانند چنین میکروارگانیسم‌هایی را بی‌حرکت کنند یا از نفوذ آن‌ها به سلول‌های بدن جلوگیری کنند. در موارد دیگر، آنتی‌ژن پوشش داده شده با آنتی‌بادی، در معرض واکنش‌های زنجیره‌ای شیمیایی با سیستم کمپلمان (یک سری پروتئین یافت شده در خون) قرار می‌گیرند. واکنش کمپلمان می‌تواند باعث لیز شدن (ترکیدن) میکروب مهاجم شود و یا می‌تواند سلول‌های اسکونجر[1] میکروب‌کش که بلعنده یا فاگوسیتوز مهاجم هستند، را جذب کند. پس از شروع، تولید آنتی‌بادی برای چندین روز ادامه دارد تا زمانی که

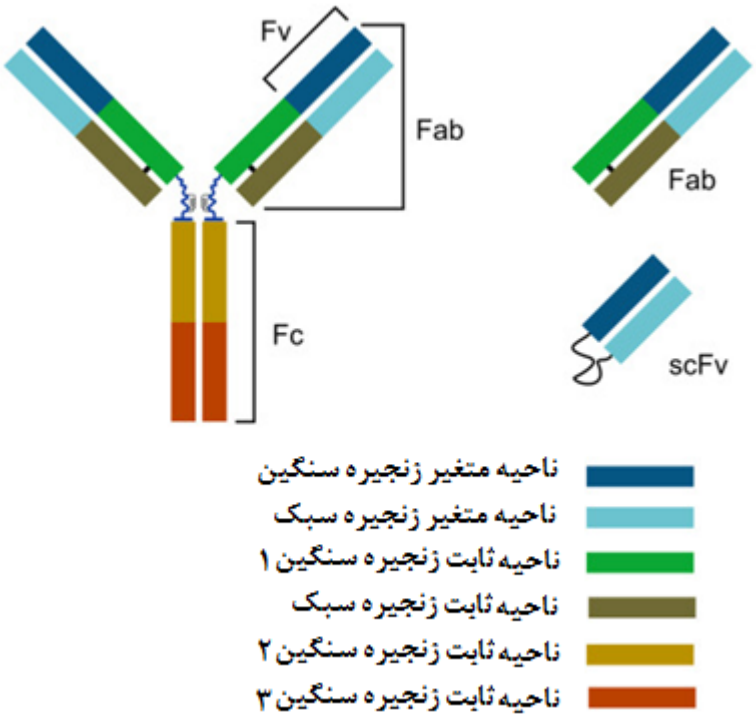
[1] scavenger

تمام مولکول‌های آنتی‌ژن از بین بروند. آنتی‌بادی‌ها برای چندین ماه در گردش خون باقی می‌مانند و باعث افزایش ایمنی در برابر آنتی‌ژن خاص می‌شوند.

سلول‌های B و آنتی‌بادی‌ها با هم یکی از مهمترین عملکردهای دفاعی بدن را ایجاد می‌کنند. این عملکرد شناختن یک آنتی‌ژن مهاجم و تولید تعداد بسیار زیادی پروتئین محافظ که بدن را از تمام آثار آنتی‌ژن پاک می‌کند، می باشد. در مجموع، سلول‌های B تعداد آنتی‌ژن‌های تقریباً نامحدودی را تشخیص می‌دهند اما به طور جداگانه هر سلول B می‌تواند فقط به یک نوع آنتی‌ژن متصل شود. سلول‌های B آنتی‌ژن‌ها را از طریق پروتئین هایی به نام گیرنده‌های آنتی‌ژنی که در سطح آن‌ها وجود دارد، تشخیص می‌دهند. گیرنده آنتی‌ژن، اساساً یک پروتئین آنتی‌بادی است که ترشح نمی‌شود اما در غشای سلول B لنگر می‌اندازد. همه گیرنده‌های آنتی‌ژن موجود در یک سلول B خاص، یکسان هستند، اما گیرنده‌های واقع در سایر سلول های B متفاوت هستند. اگرچه ساختار کلی آن‌ها مشابه است، اما این تغییر در ناحیه‌ای است که آنتی‌بادی به آنتی‌ژن متصل می‌شود و با آن تعامل دارد. این تنوع ساختاری در بین جایگاه‌های اتصال آنتی‌ژن باعث می‌شود سلول‌های B مختلف بتوانند آنتی‌ژن‌های مختلفی را تشخیص دهند. گیرنده آنتی‌ژن در واقع کل آنتی‌ژن را تشخیص نمی‌دهد. در عوض فقط به بخشی از سطح آنتی‌ژن متصل می‌شود، ناحیه‌ای که به آن "تعیین کننده آنتی‌ژنیک" یا "اپی‌توپ" می‌گویند. اتصال بین گیرنده و اپی‌توپ فقط در صورت مکمل بودن ساختار آن‌ها اتفاق می‌افتد. در صورت مکمل بودن ساختارها، اپی‌توپ و گیرنده مانند دو قطعه پازل در کنار هم قرار می‌گیرند، اتفاقی که برای فعال‌سازی تولید آنتی‌بادی توسط سلول B ضروری است.

ساختار هر مولکول آنتی‌بادی، اساساً با گیرنده آنتی‌ژن سلولB تولید کننده آن یکسان است. ساختار اساسی این پروتئین-ها از دو جفت زنجیره پلی پپتیدی (چند اسیدآمینه متصل به هم با پیوندهای پپتیدی) تشکیل شده است که شکلی Y

مانند و انعطاف‌پذیر را در کنار هم می‌سازند. ساقه Y از دو زنجیره سنگین یکسان تشکیل شده است (Fc[1])، در حالی که هر بازو از قسمت باقیمانده یک زنجیره سنگین به علاوه پروتئین کوچکتر (زنجیره سبک) تشکیل شده است که به آنتی ژن متصل می شود (Fab[2]). دو زنجیره سبک نیز یکسان هستند. در گروه‌های خاصی از آنتی‌بادی‌ها، ساقه و پایین بازوها کاملاً شبیه به هم هستند و از این رو به آن‌ها ناحیه ثابت می‌گویند. رأس بازوها از نظر توالی بسیار متغیر هستند. این رأس‌ها هستند که به آنتی‌ژن متصل می‌شوند. بنابراین هر آنتی‌بادی دارای دو محل اتصال به یک نوع آنتی‌ژن است که در انتهای هر دو بازو قرار دارند و این محل‌های اتصال به آنتی‌ژن در میان آنتی‌بادی‌های مختلف با یکدیگر بسیار متفاوت هستند.



[1] fragment crystallizable/constant (Fc)
[2] antigen-binding fragment (Fab)

شکل-۷۰ نواحی Fc و Fab بر روی آنتی بادی مشخص شده است. قطعه scFv نیز از درکنارهم قرارگرفتن دو ناحیه متغیر زنجیره سنگین و سبک به دست می آید

آنتی‌بادی‌ها با توجه به منطقه ثابت خود در پنج کلاس طبقه‌بندی می‌شوند و هر کلاس را با یک حرف متصل به مخفف کلمه ایمونوگلوبولین مشخص می‌کنند : IgG، IgM، IgA، IgD و IgE. کلاس‌های آنتی‌بادی نه تنها در منطقه ثابت، بلکه در فعالیت نیز با یکدیگر متفاوت هستند. به عنوان مثال، IgG، متداول‌ترین آنتی‌بادی، بیشتر در خون و مایعات بافتی وجود دارد، در حالی که IgA در غشاهای مخاطی دستگاه تنفسی و دستگاه گوارش یافت می‌شود.

آنتی‌بادی‌های از پیش ساخته شده، که از سرم خون افراد یا حیواناتی که قبلاً آلوده بودند، گرفته می‌شود، اغلب تحت آنتی‌سرم به فرد دیگری تزریق می‌شود تا ایمنی فوری و غیرفعال را در برابر سموم با عملکرد سریع یا میکروب‌ها مانند آن‌هایی که در گزش مار یا عفونت کزاز وجود دارد، ایجاد کنند.

برهمکنش‌های آنتی‌بادی- آنتی‌ژن

پاراتوپ آنتی‌بادی با اپی‌توپ آنتی‌ژن برهمکنش برقرار می‌کند. یک آنتی‌ژن معمولاً حاوی اپی‌توپ‌های مختلف در امتداد سطح خود است که به صورت ناپیوسته مرتب شده‌اند. آنتی‌بادی و آنتی‌ژن با مکمل شدن با هم از نظر فضایی (قفل و کلید) با یکدیگر برهمکنش برقرار می‌کنند. نیروهای مولکولی درگیر در این تعامل، نیروهای ضعیف و غیر اختصاصی مانند نیروهای الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی، فعل و انفعالات آبگریز و نیروهای وان‌دروالس هستند. این بدان معنی است که اتصال بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن برگشت‌پذیر است و میل آنتی‌بادی به آنتی‌ژن بیشتر نسبی است تا مطلق.

اتصال نسبتاً ضعیف نیز به این معنی است که واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن‌های مختلف که شباهت‌های ساختاری نسبی با یکدیگر دارند، امکان پذیر است.

فعالیت‌های اصلی آنتی‌بادی‌ها شامل موارد زیر است:

۱. خنثی سازی[1]، که در آن آنتی‌بادی‌های خنثی کننده بخش‌هایی از سطح سلول باکتریایی یا ویروسی را مسدود می‌کنند تا حمله آن را بی اثر کنند. درواقع آن‌ها با اتصال به پاتوژن‌ها از ورود یا آسیب رساندن آن‌ها به سلول‌ها جلوگیری می‌کنند.

۲. آگلوتیناسیون[2]، که در آن آنتی‌بادی‌ها سلول‌های بیگانه/خارجی را به هم می‌چسبانند و آن‌ها را به اهدافی جذاب برای فاگوسیتوزها تبدیل می‌کنند به این معنی که با پوشاندن پاتوژن (عامل بیماری زا) باعث حذف پاتوژن‌ها توسط ماکروفاژها و یا سایر سلول‌های بدن می‌شوند.

۳. رسوب[3] که در آن آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌های محلول در سرم را به هم چسبانده و آن‌ها را مجبور به رسوب در محلول می‌کنند و بدین طریق آنتی‌ژن‌های رسوب کرده به هدفی جذاب برای فاگوسیتوز تبدیل می‌شوند.

۴. فعال سازی (تثبیت) کمپلمان[4]، که در آن آنتی‌بادی‌هایی که بر روی یک سلول خارجی چسبیده‌اند، باعث تحریک سایر پاسخ‌های ایمنی مانند کمپلمان می شوند. کمپلمان برای حمله به آن با یک مجموعه واکنش های حمله غشایی از نوع آبشاری عمل می کند، که منجر به تخریب عوامل بیماری‌زا با کمک روش های زیر می‌شود:

[1] Neutralisation,
[2] Agglutination
[3] precipitation
[4] Complement activation

- ✓ لیز سلول خارجی.
- ✓ تحریک التهاب توسط جذب شیمیایی سلول‌های التهابی.

۵. آنتی‌بادی‌ها همچنین باعث دگرانولاسیون آمین وازوآکتیو[1] می‌شوند تا به ایمنی در برابر انواع خاصی از آنتی‌ژن‌ها (کرم‌ها، مواد آلرژی زا) کمک کنند. (آمین وازوآکتیوها، مولکول های حاوی گروه‌های آمین، مانند هیستامین یا سروتونین هستند که بر روی رگ‌های خونی تأثیر می‌گذارد و نفوذپذیری آنها را تغییر می‌دهد و باعث اتساع عروق می‌شود (فرآیند وازودیلاسیون[2] یعنی اتساع عروق). آمین وازوآکتیوها داخل وزیکول های ترشحی به نام گرانول ها در ماست سل ها، بازوفیل ها و پلاکت ها ذخیره شده اند. دگرانولاسیون یک فرآیند سلولی است که در آن، مواد ذخیره در گرانول ها آزاد می شوند.)

سلول‌های B فعال شده به سلول‌های تولید کننده آنتی‌بادی به نام سلول‌های پلاسما که آنتی‌بادی محلول را ترشح می‌کنند و سلول‌های حافظه ای که سال‌ها پس از آن در بدن زنده می‌مانند، تمایز پیدا می‌کنند تا سیستم ایمنی بدن یک آنتی‌ژن را به خاطر بسپارد و در صورت مواجهه مجدد با آن در آینده سریعتر پاسخ دهد.

در مراحل قبل از تولد و نوزادی، وجود آنتی‌بادی با ایمنی‌زایی غیرفعال، از مادر تأمین می‌شود. تولید اولیه آنتی‌بادی در بدن فرد برای انواع مختلف آنتی‌بادی متفاوت است و معمولاً از اولین سال‌های زندگی آغاز می‌شود. از آنجایی که آنتی‌بادی‌ها به طور آزاد در جریان خون وجود دارند، گفته می‌شود که آن‌ها بخشی از سیستم ایمنی هومورال هستند.

[1] vasoactive amine
[2] Vasodilation

آنتی‌بادی‌هایی که در گردش توسط سلول‌های B کلونال تولید می‌شوند به طور خاص فقط به یک آنتی‌ژن پاسخ می‌دهند (به عنوان مثال یک قطعه پروتئین کپسید (پوشش) ویروس).

تفاوت پلی‌کلونال[1] و مونوکلونال[2] آنتی‌بادی چیست؟

همانطور که پیش از این نیز اشاره شد، به ترکیباتی که پس از ورود به بدن موجب برانگیختن واکنش های ایمنی می‌گردند آنتی ژن می گویند که در جریان ورود آن به بدن موادی به نام آنتی‌بادی‌ها تولید می‌شوند. یک آنتی ژن می تواند شامل چندین قسمت باشد که توسط سیستم دفاعی تشخیص داده می‌شود و به هر یک ازین قسمت ها یک اپی‌توپ می گویند. آنتی‌بادی‌ها به طور معمول توسط سلول‌های B، که بخشی از سیستم ایمنی بدن هستند و در پاسخ به ورود مواد خارجی به بدن جانوران، مانند عوامل عفونی، تولید می‌شوند. آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن‌هایی که باعث تولید آن‌ها می‌شوند متصل می‌شوند و آن‌ها را برای تخریب شدن علامت‌گذاری می‌کنند، بنابراین به مبارزه با عفونت کمک می‌کنند. بطور تخصصی تر اتصال آنتی بادی به آنتی ژن مکمل بوده و شبیه به قفل و کلید است و درواقع ناحیه پاراتوپ آنتی بادی مکمل ناحیه اپی‌توپ آنتی ژن می باشد.

از این توانایی ذاتی بدن جانوران یعنی تولید آنتی بادی بر عیله آنتی ژن، می‌توان برای تولید آنتی‌بادی‌هایی که به مولکول‌های خاصی متصل می‌شوند، استفاده کرد. از آنتی‌بادی‌هایی که به هدف خاصی متصل می‌شوند، می‌توان برای

[1] Polyclonal Antibodies

[2] Monoclonal Antibodies

جداسازی و شناسایی مولکول‌های مورد نظر استفاده کرد. آنتی‌بادی‌ها به یکی از مهمترین ابزارها در تحقیقات زیست-شناسی تبدیل شده‌اند که امکان شناسایی، کمّی‌سازی و تعیین تغییرات پروتئین‌ها و سایر مولکول‌ها را با توجه به زمان و سایر اتفاقات فراهم می‌کند.

بسیاری از آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در تکنیک‌های ایمونوشیمیایی با ایمن‌سازی مکرر یک جانور مناسب (تزریق آنتی ژن به بدن جانور)، مانند خرگوش، بز، الاغ یا گوسفند، با یک آنتی‌ژن مناسب تولید می‌شوند. سرم جانور در اوج تولید آنتی‌بادی از بدن وی استخراج می‌شود. با این روش می‌توان غلظت‌هایی اختصاصی از IgG (تقریباً بین ۱ تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر سرم) را به دست آورد. مولکول‌های ضعیف آنتی‌ژنیک ممکن است به افزودن یک کمکی نیاز داشته باشند تا اجازه دهد آنتی‌ژن در بدن جانور به کندی ترشح شود و باعث شود به راحتی توسط ماکروفاژها به دام بیفتد. مولکول‌های کوچکتر، باید با ساختارهای آنتی‌ژنیک بیشتری (به عنوان مثال پروتئین‌های حامل) همراه شوند تا پاسخ ایمنی را تحریک کنند.

تصور کنید که آنتی ژن (حاوی چندین اپی‌توپ) وارد بدن جانور شود درنتیجه برعلیه هر یک از اپی‌توپ های این آنتی ژن، یک کلون سلول B فعال شده و آنتی بادی اختصاصی آن اپی‌توپ را تولید می کند. بنابراین یکی از ویژگی‌های مهم مولکول‌های بزرگ آنتی‌ژن، این است که باعث فعال شدن بسیاری از کلونی‌های سلول B تولید کننده آنتی‌بادی در جانور ایمن شده می‌شوند. در این حالت برعلیه هر یک از اپی توپ های آنتی ژن مربوطه یک کلون سلول B تولید کننده آنتی بادی ایجاد می شود. بنابراین به زبان ساده تر، آنتی بادی ها از سلول‌های ایمنی "متفاوتی" ایجاد می‌شوند. در این حالت آنتی بادی پلی کلونال تولید شده است. این مخلوط پلی‌کلونال آنتی‌بادی حاصل، می تواند انواع مختلف اپی‌توپ را بر روی آنتی‌ژن تشخیص دهد، که می‌تواند در جایگاه خود یک ویژگی مفید در برخی از روش‌های تجربی باشد. از آنجا که

این مخلوط‌های پلی‌کلونال آنتی‌بادی می‌توانند با چندین اپی‌توپ در سطح آنتی‌ژن واکنش نشان دهند، در نتیجه در برابر تغییرات جزئی در آنتی‌ژن، مانند چندشکلی، ناهمگنی گلیکوزیلاسیون یا دناتوراسیون جزئی، تحمل بیشتری نسبت به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (همگن) خواهند داشت.

در مقابل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اتصال تک ظرفیتی دارند بدین معنی که همه به یک نوع اپی توپ متصل می‌شوند و تک‌اختصاصی هستند. این آنتی بادی ها همه مشابه هم هستند چون از سلول‌های ایمنی مشخصی تولید می شوند که این سلول‌های ایمنی از یک سلولِ B کلون شده ایجاد شده اند. تکنیک تولید آنتی بادی منوکلونال تکنیک هیبریدوما است در این تکنیک یک کلون سلول B تولید کننده آنتی بادی علیه یک نوع اپی توپ را با سلول سرطانی نامیرا هیبرید (ترکیب) می شود به این صورت کلون سلول B نامیرا به دست می آید که توانایی تولید آنتی بادی منوکلونال دارد.

بسته به آنتی‌ژنی (پروتئین ایمونوژنی) که برای ایجاد آنتی‌بادی پلی‌کلونال استفاده می‌شود، ممکن است از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برای شناسایی پروتئین‌های بسیار مشابه به آن پروتئین ایمونوژن، و یا غربالگری پروتئین هدف در نمونه‌های بافتی از گونه‌های غیر از ایمونوژن استفاده شود. در همین راستا، بسیار مهم است که هنگام کار با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، تا آنجا که ممکن است در مورد ایمونوژنی که برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال استفاده شده است و پتانسیل واکنش متقابل نامطلوب در نمونه مورد بررسی، اطلاعات کسب شود. از ایمونوژن‌های پپتیدی اغلب برای تولید آنتی‌بادی-های پلی‌کلونال استفاده می‌شود که اپی‌توپ‌های منحصر به فرد را هدف قرار می‌دهند، به ویژه برای هدف قرار دادن خانواده‌های پروتئینی که همولوژی بالایی دارند.

برخی از ویژگی‌های مفید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال:

• آنتی‌بادی های پلی‌کلونال اغلب چندین اپی‌توپ را شناسایی می‌کنند که این امر باعث تحمل آن‌ها در برابر تغییرات کوچک در ساختار ذاتی آنتی‌ژن می‌شود. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال اغلب برای تشخیص پروتئین‌های دناتوره انتخاب بهتری هستند.

•آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ممکن است در انواع مختلفی از گونه‌ها از جمله خرگوش، بز، گوسفند، الاغ، مرغ تولید شود که این مسئله گزینه‌های زیادی در طراحی آزمایش به کاربران می‌دهد.

• بعضی اوقات در آزمایش روی گونه‌ای که قبلا آزمایش نشده و ماهیت آنتی‌ژن نیز مشخص نیست، از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال استفاده می شود.

• آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال چندین اپی‌توپ را هدف قرار می‌دهند و بنابراین به طور کلی توان شناسایی بیشتری دارند.

برخی از ویژگی‌های مفید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال:

• به دلیل اختصاصیت بالا، از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به عنوان آنتی‌بادی اولیه در آزمایش، یا برای تشخیص آنتی‌ژن‌ها در بافت استفاده می‌کنند و اغلب سیگنال پس زمینه کمتری نسبت به آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ایجاد می‌کنند.

• در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، همگنی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بسیار زیاد است.

• اگر شرایط آزمایش ثابت نگه داشته شود، نتایج حاصل از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در بین آزمایش‌های مختلف بسیار قابل تکرار خواهد بود.

• اختصاصیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، آن‌ها را برای اتصال به آنتی‌ژنی خاص در مخلوطی از مولکول‌های مرتبط و مشابه، بسیار کارآمد می‌کند.

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAbs) امروزه به یکی از اصلی‌ترین عوامل درمانی تبدیل شده‌اند که گزینه‌های مؤثری برای درمان بیماری‌های مختلف انسانی ارائه می‌دهند. تا به امروز، ۱۵ آنتی بادی مونوکلونال، توسط سازمان‌های نظارتی در جهان برای استفاده بالینی به منظور درمان بیماری سرطان تأیید شده‌اند. انتخاب و اختصاصیت بالا، فارماکوکینتیک منحصر به فرد و توانایی درگیر کردن و فعال کردن سیستم ایمنی میزبان، این مواد بیولوژیک را از داروهای ضدسرطان کوچک مولکول سنتی متمایز می‌کند. برنامه‌های درمانی مبتنی بر mAbs مزایای بالینی متعددی، از جمله بهبود در بقای کلی، برای بیماران مبتلا به انواع سرطان‌ها به همراه داشته است. هنوز چالش‌های زیادی برای درک کامل پتانسیل این داروهای جدید باقی مانده است. با افزایش درک ما از زیست شناسی سرطان، مکانیسم عملکرد آنتی‌بادی و پیشرفت فناوری‌های مهندسی آنتی‌بادی، بسیاری از اشکال جدید آنتی‌بادی یا مولکول‌های مشتق شده از آنتی‌بادی به عنوان داروهای درمانی امیدوارکننده نسل جدید ظهور می‌کنند. آن‌ها با دقت طراحی و مهندسی شده، مزیت اختصاصیت و انتخاب آنتی‌بادی‌های اصلی را حفظ می‌کنند، اما در این بین ویژگی‌های خاص دیگری مانند بهبود فارماکوکینتیک، افزایش انتخاب و افزایش اثر ضد سرطانی را به دست می‌آورند. نتایج بالینی امیدوار کننده با این روش‌های درمانی مبتنی بر آنتی‌بادی‌های نسل جدید، در حال گزارش است.

اولین نقطه عطف مهم در تاریخ تحقیق و توسعه آنتی‌بادی، اختراع فناوری هیبریدوما برای ایجاد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAbs) در سال ۱۹۷۵ توسط کوهلر و میلشتاین بود که در سال ۱۹۸۴به همین دلیل برنده جایزه نوبل شدند. در سال ۱۹۸۶، OKT3، اولین آنتی‌بادی مشتق شده از هیبریدوما موش، برای استفاده در بیماران دریافت‌کننده پیوند اعضا به منظور جلوگیری از رد پیوند تأیید شد.

با این حال، آنتی‌بادی‌های مشتق شده از هیبریدومای موش می‌توانند توسط سیستم ایمنی بدن انسان به عنوان آنتی‌بادی خارجی شناخته شده و در نتیجه منجر به پاسخ ضد آنتی‌بادی موشی در انسان[1] (HAMA) شوند، که منجر به کوتاه شدن نیمه عمر، کاهش اثربخشی و افزایش سمیّت در برخی از بیماران به واسطه ایجاد پاسخ‌های ایمنی شود. ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته آنتی‌بادی‌های مشتق شده از موش را می‌توان با استفاده از فناوری‌های مهندسی DNA نوترکیب، مانند کایمریزاسیون (یعنی انسانی‌سازی آنتی‌بادی با جایگزینی قسمت‌هایی از آنتی‌بادی موش با همتای انسانی خود) کاهش داد. امروزه فناوری‌هایی برای تولید آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی مانند کتابخانه‌های نمایش فاژی (phage display) و یا موش‌های تراریخته (قادر به تولید انتی بادی انسانی است)، برای کاهش بیشتر ایمنی‌زایی ناخواسته آنتی‌بادی‌ها ایجاد شده است.

از بین بیش از ۳۰ آنتی‌بادی درمانی که برای استفاده بالینی تأیید شده‌اند، ۱۵ مورد از آن‌ها برای مصارف مرتبط با درمان سرطان است. در ترکیب با سیتوتوکسیک (سمیت سلولی) یا پرتودرمانی، mAbs پیشرفت‌های بالینی قابل توجهی را در درمان لنفوم [داروی ریتوکسیماب[2] (ریتوکسان[3])]، سرطان پستان [داروی تراستوزوماب[4] (هرسپتین[5])]، سرطان روده بزرگ [داروی بواکسیزوماب[6] (آواستین[7])، ستوکسی زیماب[8] (اربیتوکس[9]) و پانی تووموماب[10] (وکتیبیکس[11])]، سرطان

[1] human anti-mouse antibody
[2] rituximab
[3] Rituxan
[4] trastuzumab
[5] Herceptin
[6] bevacizumab
[7] Avastin
[8] cetuximab
[9] Erbitux
[10] panitumumab
[11] Vectibix

ریه سلول غیر کوچک[1] (نوع خاصی از سرطان ریه است) [داروی بواکسیزوماب (آواستین)] و سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن [داروی ستوکسی زیماب (اربیتوکس)] ایجاد کرده‌اند.

با این حال، مزایای بالینی اغلب محدود به پاسخ‌های توموری گذرا است که فقط در کسری از بیماران دیده می‌شود. رویکردهای جدید برای بهبود اثربخشی روش‌های درمانی مبتنی بر mAbs شامل موارد زیر می باشد:

(الف) انتخاب بیمارانی که براساس ویژگی‌های مولکولی تومورهایشان بیشترین منفعت را از این درمان می‌برند.

(ب) بهبود توزیع زیستی برای رساندن موثر mAbs به سلول‌های توموری حساس به منظور مهار حداکثری هدف و مسیرهایی که در آن دخیل است.

(ج) بهینه سازی مکانیسم‌های ایمنی‌زایی آنتی‌بادی مانند سمیت سلولی وابسته به کمپلمان (CDC)[2] و سمیت سلولی وابسته به آنتی‌بادی (ADCC)[3].

(د) مهندسی مولکولی اشکال جدید آنتی‌بادی، به عنوان مثال، آنتی‌بادی دوگانه[4]، مخلوط آنتی‌بادی-دارو، و اصلاح Fc (ناحیه ساقه آنتی بادی) برای بالا بردن مدت زمان نیمه عمر آنتی‌بادی موجود در بدن.

مهندسی نسل بعدی درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بادی‌ها

تمرکز اصلی مهندسی آنتی‌بادی در سه دهه گذشته بر روی کاهش ایمنی‌زایی ناخواسته آنتی‌بادی‌های موشی و افزایش میزان تولید بوده است. با استفاده از فناوری مهندسی نوترکیب و درک بیشتر ما از زیست‌شناسی بیماری و مکانیسم‌های

[1] Nonsmall Cell Lung Cancer (NSCLC)
[2] Complement-dependent cytotoxicity (CDC)
[3] Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)
[4] Bispecific antibody

عملکرد آنتی‌بادی‌ها، مجموعه‌ای از طبقات جدید از اشکال مختلف آنتی‌بادی یا مولکول‌های مشتق شده از آنتی‌بادی به عنوان داروهای درمانی امیدوارکننده نسل جدید ظهور می‌کنند. این مواد زیستی جدید با دقت طراحی و مهندسی شده‌اند تا ویژگی‌های خاصی مانند بهبود فارماکوکینتیک، افزایش انتخاب و افزایش کارایی را به دست آورند. برای کاربردهای آنکولوژیک، اخیراً کونژوگه کردن دارو و آنتی‌بادی[1] (ADC) بررسی شده است که نتایج مناسبی را به دنبال داشته است که در ادامه به بررسی نتایج آن می پردازیم.

کونژوگه کردن دارو و آنتی‌بادی

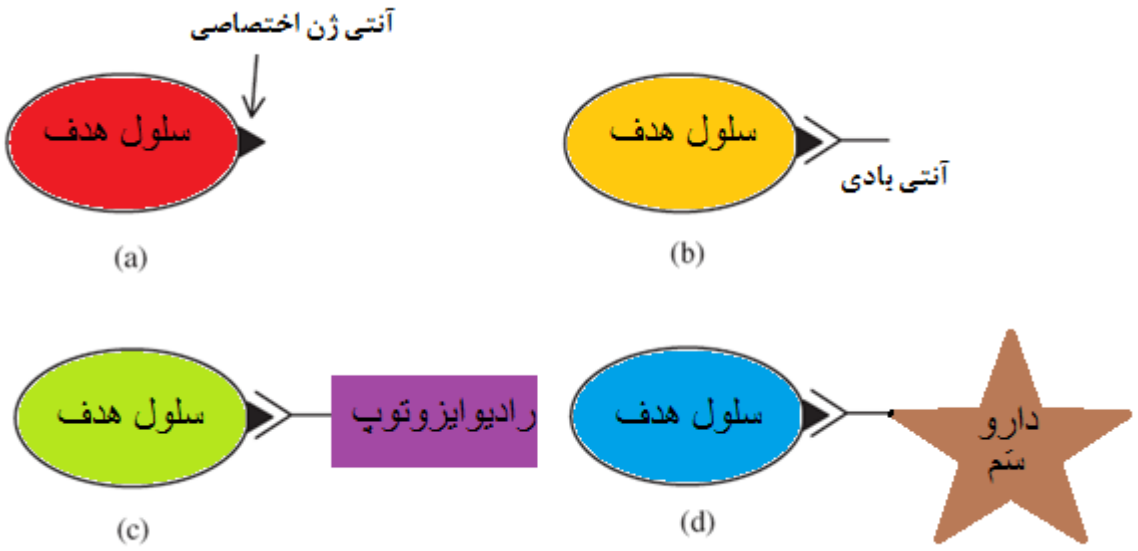
مشکل اساسی آنتی‌بادی‌ها مانند سایر پروتئین‌های درمانی حجیم بودن آنها می باشد. از اینرو، نمی‌توانند به داخل سلول‌ها نفوذ کنند. در نتیجه اهداف بالقوه آنتی‌بادی‌ها به مولکول‌های واقع در خارج یا روی سلول‌های بدن محدود می‌شوند. در مقابل، بسیاری از داروهای متداول سنتز شده با روش‌های شیمیایی می‌توانند به راحتی از غشای سلول عبور کرده و به درون سلول یا حتی هسته سلول برسند. بنابراین برای حل این مشکل، مرحله بعد از ساخت آنتی بادی، اتصال آنتی‌بادی‌های درمانی با کوچک مولکول‌ها (کونژوگه‌های کوچک مولکول) می باشد. این کونژوگه‌های کوچک مولکول می توانند طیف وسیعی از کوچک مولکول‌ها را شامل باشند. برای تولید آن‌ها، محققان کمپلکس‌ها یا کونژوگه‌هایی را ساخته‌اند که متشکل از آنتی‌بادی‌های درمانی متصل به داروهایی با وزن مولکولی کم هستند. در چنین کونژوگه‌هایی، نقش آنتی‌بادی انتقال سریع داروی اصلی به هدف در بدن است. یکی از کاربردهای اصلی استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه، درمان سرطان است. داروهایی که معمولاً برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده می‌شوند به سلول‌های

[1] antibody–drug conjugates

سالم بدن نیز حمله می‌کنند. این مسئله منجر به بروز عوارض جانبی متعددی می‌شود، برخی از این عوارض صرفاً ناخوشایند است (مانند ریزش مو که مربوط به عوارض جانبی معمول است) و برخی دیگر از این عوارض متاسفانه، تهدید کننده حیات فرد هستند (به عنوان مثال وقتی داروها به سلول‌های حیاتی بدن مانند سلول های پیش ساز گلبول‌های قرمز و سفید خون حمله می‌کنند). شرکت های تجاری بیوتکنولوژی در حال کار بر روی آنتی‌بادی‌های کونژوگه هستند که به طور خاص به ساختارهای (به عنوان مثال یک گیرنده) سطحی سلول‌های سرطانی متصل می‌شوند. وقتی این اتصال اتفاق افتاد، کل کونژوگه وارد سلول می‌شود. در سلول‌های سرطانی آنتی‌بادی هضم می‌شود و کوچک مولکول آزاد می‌شود. درنهایت این کوچک مولکول، سلول سرطانی را از بین می‌برد. به این ترتیب می‌توان سلول‌های سرطانی را به طور خاص هدف قرار داد و عوارض جانبی بر سلول‌های سالم را به حداقل رساند. کانژوگه‌های کوچک مولکول نسل جدیدی از داروهای زیستی هستند. اگر یافته‌های آزمایشات به اثبات برسد، آخرین نسل از این داروها نه تنها می‌تواند ما را به موفقیت‌های چشمگیری در درمان سرطان برساند، بلکه در بسیاری از حوزه‌های درمانی که تاکنون علم پزشکی مجبور به مقابله با عوارض جانبی شدید ناشی از اقدامات خاص داروهای معمولی بود، نیز پیشرفت‌هایی به ارمغان می‌آورد.

فناوری ADC برای افزایش کارایی بالینی آنتی‌بادی‌های درمانی با استفاده از ویژگی هدفمندی اختصاصی mAbs و به منظور رساندن محموله‌های درمانی (به طور معمول ایزوتوپ های رادیواکتیو، داروهای شیمی درمانی یا سموم) برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی توسعه یافته است. بنابراین می‌توان با کاهش انتقال دارو به صورت سیستماتیک و سراسری در کل بدن، عوارض جانبی سمیت غیر اختصاصی برای شیمی درمانی بر روی بافت‌های طبیعی و سالم بدن را به حداقل رساند.

سه ADC از این دست توسط FDA ایالات متحده تا به امروز تأیید شده است: جمتوزومب اوزوگامیسین (gemtuzumab ozogamicin) با نام تجاری Mylotarg که نوعی آنتی‌بادی ضد CD33 انسانی متصل به داروی سلول‌کش به نام calicheamicin است. این ADC برای لوسمی حاد میلوئیدی به کار برده می شود. دو داروی ADC دیگر برای درمان لنفوم غیر هوچکین (NHL) می باشند: به نام ibritumomab tiuxetan با نام تجاری Zevalin که در واقع آنتی‌بادی ضد CD20 نشاندارشده با Y۹۰ می باشد و tositumomab با نام تجاری Bexxar که آنتی‌بادی موشی ضد CD20 نشاندارشده با I۱۳۱ است.



شکل-۷۱ کونژوگه کردن دارو و آنتی‌بادی. به طور معمول ایزوتوپ های رادیواکتیو، داروهای شیمی درمانی یا سموم برای اینکار استفاده می شوند.

آنتی‌بادی‌های دوگانه

بعد از آنتی بادی های کونژوگه با دارو، آنتی بادی های دوگانه از دیگر اشکال جدید آنتی بای می باشد. سرطان یک بیماری بسیار پیچیده است که توسط مکانیسم‌های مختلفی شامل مسیرهای پیام رسان به هم پیوسته هدایت می‌شود. عوامل درمانی که نقطه‌ای خاص از شبکه زیستی سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند، به تنهایی نمی‌توانند بیماری را ریشه‌کن کنند یا از عود بیماری جلوگیری کنند. تهاجم همزمان به مسیرها با ترکیب داروهای مختلف که بر روی اهداف مختلف و با مکانیزم‌های مختلف عمل می‌کنند، ابزاری جذاب برای غلبه بر مقاومت درمانی است. چنین رویکردی نشان دهنده اثربخشی برنامه های شیمی‌درمانی متشکل از چندین عامل سمیت سلولی است. این رویکردهای ترکیبی در هنگام ترکیب آنتی‌بادی‌های درمانی با عوامل سیتوتوکسیک و نیز تجویز همزمان دو یا چند آنتی‌بادی درمانی، نتایج خوبی را به همراه داشته است.

یک روش جایگزین امیدوارکننده برای ترکیب آنتی‌بادی‌های منفرد، ایجاد یک آنتی‌بادی دوگانه (BsAb) است، یک مولکول آنتی‌بادی منفرد با قابلیت اتصال قوی و خاص، همزمان به دو آنتی‌ژن هدف مرتبط با بیماری است. بر اساس مکانیسم‌های عمل، BsAb می‌تواند همزمان به اهداف مختلف حمله کند و بدین ترتیب بر روی مسیرهای مختلف پیام رسان در همان سلول بیمار اثر گذارد. اصلاح همزمان (به عنوان مثال، مسدود کردن یا خنثی سازی) دو هدف مرتبط با بیماری احتمالاً موجب افزایش اثربخشی درمانی و همچنین انسداد مکانیسم‌های جبرانی مرتبط با آنتی‌بادی درمانی منفرد می شود، و بدین طریق مقاومت در برابر مونوتراپی (تک درمانی) را از بین می برد. با اتصال همزمان به اهداف مختلف سطح سلول، BsAb ممکن است منجر به افزایش قدرت اتصال و حتی منجر به افزایش اختصاصیت اتصال (اتصال ترجیحی قوی) فقط به سلول‌هایی شود که هر دو هدف را بیان می‌کنند و نه به سلول‌هایی که فقط یک هدف را بیان می‌کنند. بنابراین با BsAb می‌توان به طور دقیق انتخابیت آنتی‌بادی را تنظیم کرد. BsAb می‌تواند برای اتصال به اهداف

مختلف بیان شده در جمعیت سلول‌های مختلف در بافت‌های بیمار برای دستیابی به اثرات درمانی هم افزا و / یا افزایش توزیع در بافتی خاص طراحی شود. علاوه بر این، BsAb می‌تواند از دو آنتی‌بادی ایجاد شود که به اپی‌توپ‌های مختلف روی همان هدف برای افزایش قدرت اتصال و افزایش بار آنتی‌بادی بر روی سلول‌های توموری به منظور دست یافتن به عملکردهای موثرتر، مانند ADCC (سمیت سلولی وابسته به آنتی بادی) و / یا CDC (سمیت وابسته به کمپلمان)، متصل می‌شوند. بنابراین این BsAb دارای اتصال دو پاراتوپی (پاراتوپ: ناحیه ای در آنتی بادی است که به آنتی ژن متصل می شود) است. علاوه بر این، BsAb دو پاراتوپیک، با اتصال همزمان به دو اپی‌توپ مختلف روی یک مولکول هدف، حتی می‌تواند به طور بالقوه عملکرد جدیدی بدست آورد که در صورت استفاده از آنتی‌بادی‌های والد (به تنهایی یا به صورت ترکیبی)، ممکن نبود.

یک مانع عمده در پیشرفت موفقیت آمیز BsAb، مشکل تولید مواد با کیفیت و کمیت کافی برای مطالعات بالینی و پیش‌بالینی بوده است. چالش فناورانه ساخت یک مولکول نوترکیب با خواص دارویی خوب و قابل مقایسه با آن‌هایی که از mAb معمولی هستند، دارا بودن ویژگی‌های خوب مولکولی (مانند همگنی، ثبات، تمایل کم به تجمع)، سهولت ساخت و فرآیندهای پردازش در پایین دست تولید (مانند بهره‌وری در سطح بالا، فرآیند تصفیه ساده و بدون نیاز به فرمولاسیون خاص) را می توان اصلی‌ترین چالش امروز در حوزه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دانست.

از منظر زیست شناسی، مدت‌هاست که می‌دانیم هر مخلوطی از سیتوتوکسیک‌ها یا سایر عوامل اصلاح کننده بیماری، لزوماً منجر به اثر درمانی اضافی یا هم‌افزایی نمی‌شود. توسعه BsAbs بسیار موثر، نیاز به درک روشن و دقیق جزئیات مولکولی مسیرهای پیام رسان فرعی نیز دارد که منجر به بیماری های مختلف می‌شوند تا بتوان به وسیله آن جفت هدف‌های مناسب برای درمان را انتخاب کرد.

پیش‌بینی‌ها

در مقایسه با داروهای شیمیایی با وزن مولکولی کم، آنتی‌بادی‌های درمانی دارای اختصاصیت بالاتر به هدف، سمیت سیستمیک پایین‌تر، و نیمه عمر طولانی‌تر هستند. رشد آتی داروهای مبتنی بر mAb هنوز هم چشمگیر است. در میان تمام مواد زیستی که در آزمایشات بالینی مورد مطالعه قرار می گیرند، ۸۵٪ mAbs یا مولکول‌هایی بر پایه آنتی‌بادی ها هستند. امروزه بیش از یک سوم از داروهای جدیدی که در شرکت‌های زیست‌فناوری و یا داروسازی در حال تحقیق و تولید هستند، از آنتی‌بادی‌ها تشکیل شده اند. پیش‌بینی‌های اجمالی فروش بیان می‌کنند که بیش از نیمی از داروهای پر فروش دنیا آنتی‌بادی درمانی یا پروتئین‌های کونژوگه با آنتی‌بادی ها خواهند بود و و فروش کل داروهای مبتنی بر mAb به میلیاردها دلار برسد.

چالش‌های زیادی بر سر راه توسعه موفق و مداوم mAb درمانی باقی مانده است. اهداف درمانی جدید محدود هستند و بنابراین رقابت بر روی اهداف معتبر بسیار شدید است. با پیشرفت فناوری ADC، برخی از اهداف "غیر قابل تخریب" قبلی، مانند آنتی‌ژن‌هایی که بیش از حد در سلول‌های بیمار بیان می‌شوند و هیچ عملکرد اصلی پاتوفیزیولوژیک شناخته شده‌ای برای مداخله ندارند (به عنوان مثالCD33)، می‌توانند کاندیداهای خوبی برای تحقیق و توسعه ADCها باشند. هدف قراردادن اپی‌توپ‌های مختلف آنتی‌ژن‌های معتبر، فرصتی دیگر برای تولید درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بادی با عملکرد بالینی متفاوت است. از جمله این نمونه‌ها می‌توان به ofatumumab (anti-CD20)، nimotuzumab (anti-EGFR) و موارد دیگر اشاره کرد. علاوه بر این، اهداف (مسیرهای) منفردی وجود دارد که ممکن است در صورت اصلاح به تنهایی

فایده درمانی کافی نداشته باشند، اما اگر همزمان با اهداف دیگر (مسیرها) تعدیل شوند، فعالیت افزودنی و یا هم‌افزایی ایجاد کنند. بنابراین این اهداف، کاندیداهایی عالی برای توسعه درمان‌های مبتنی بر BsAb هستند.

توسعه بسترهای ایجاد فناوری‌های جدید در کشف، مهندسی و تولید آنتی‌بادی برای افزایش کارایی mAb درمانی و کاهش هزینه‌های درمان، یکی دیگر از حوزه‌های مهم تمرکز در ساخت آنتی‌بادی‌های جدید است. با کمک بیوتکنولوژی پزشکی انتظار می رود در آینده نزدیک شاهد ورود نسل های جدیدتر mAbs و نیز مولکول‌های شبه mAb با ویژگی‌های دقیق مهندسی شده به مواضع بالینی باشیم. برای تبدیل این روش‌های درمانی جدید به گزینه‌های درمانی عملی و مقرون به صرفه، به تولید سریع و توسعه فرآیندهای پایین دستی تولید (بخش تصفیه و فرمولاسیون دارو) نیاز است. همچنان بسیاری از موضوعات دیگر، به عنوان مثال، آنالیز و کنترل کیفی، مطالعات سم شناسی و فارماکولوژی بالینی، مسیرهای نظارتی و توسعه بالینی و.... پیش از آنکه قالب‌های جدید آنتی‌بادی به درمان اصلی تبدیل شوند، باید به دقت مورد تحقیق و بررسی قرار گیرند.

۱-۳) هورمون‌ها

سومین گروه از بیوفارماسوتیکال ها که جز مهمترین مباحث زیست فناوری پزشکی هستند، هورمون ها می باشند. به هر عضوی از کلاس مولکول‌های پیام رسان موجودات پرسلولی که برای تنظیم رفتارِ فیزیولوژیک به اندام‌های دوردست منتقل می‌شوند، هورمون گفته می‌شود. هورمون‌ها برای رشد صحیح حیوانات، گیاهان و قارچ‌ها مورد نیاز هستند. درواقع هورمون به عنوان یک مولکول پیام رسان است که از محل تولید خود فاصله دارد. باتوجه به توضیحات داده شده، بسیاری

از طبقات مختلف مولکول‌ها را می‌توان به عنوان هورمون‌ها تعریف کرد. از جمله مواردی که می‌توان آنها را جز هورمون ها دسته بندی کرد عبارتند از:

ایکوزانوئیدها (به عنوان مثال پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌ها)،

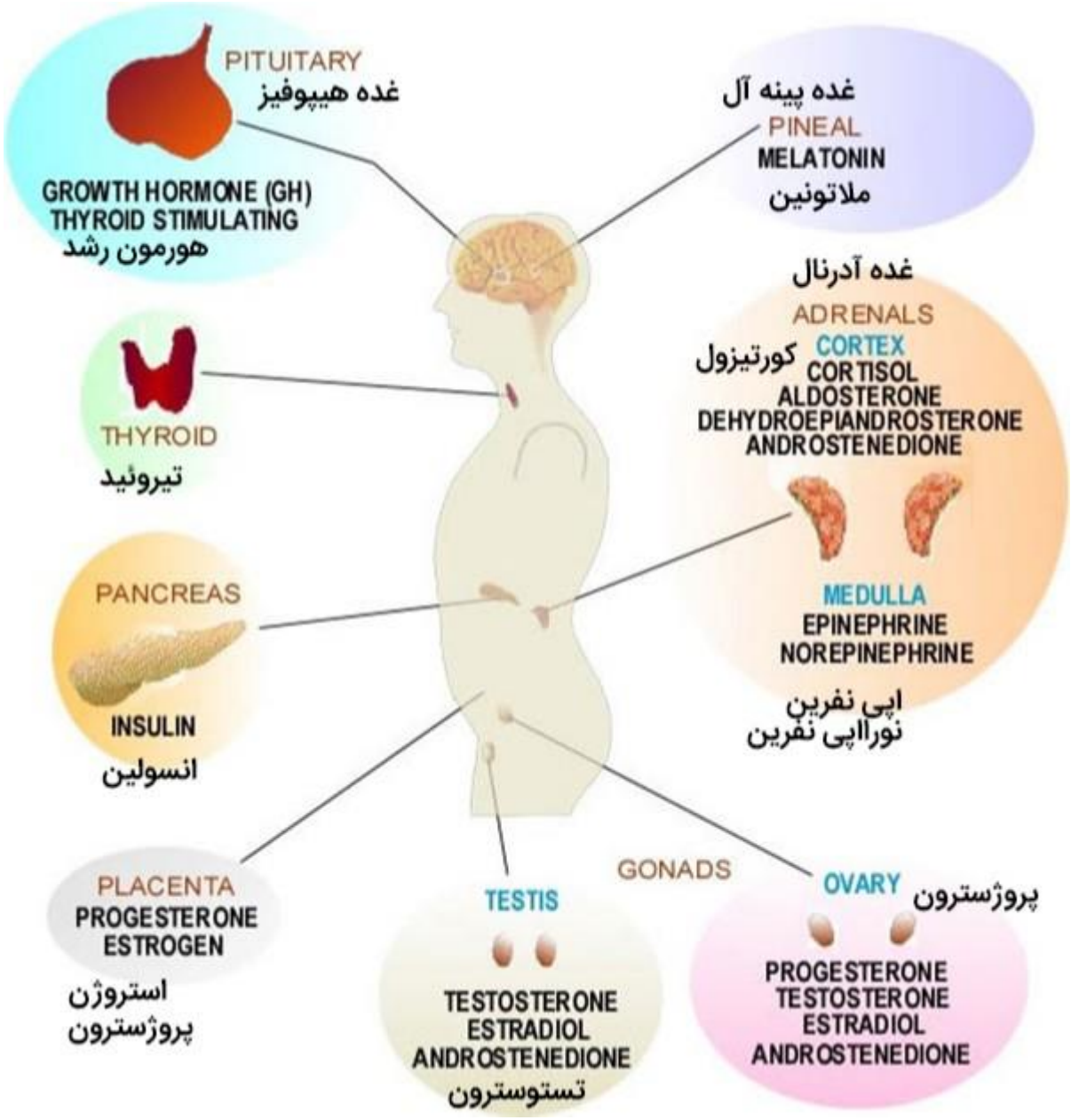
-استروئیدها (به عنوان مثال استروژن و براسینواستروئید)،

-مشتقات اسید آمینه (به عنوان مثال اپی نفرین و اکسین)،

-پروتئین / پپتیدها (به عنوان مثال انسولین و پپتیدهای CLE) و

-گازها (به عنوان مثال اتیلن و اکسید نیتروژن) هستند.

از هورمون‌ها برای برقراری ارتباط بین اندام‌ها و بافت‌ها استفاده می‌شود. در مهره‌داران، هورمون‌ها وظیفه تنظیم بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و فعالیت‌های رفتاری مانند هضم، متابولیسم، تنفس، درک حسی، خواب، دفع، شیردهی، القای استرس، رشد و نمو، حرکت، تولید مثل و دستکاری خلق و خو را بر عهده دارند. در گیاهان، هورمون‌ها تقریباً در همه جوانب رشد از جوانه زنی تا پیری دخالت می‌کنند.



شکل-۷۲ غدد بدن و هورمون هایی که ترشح می کنند

هورمون‌ها با اتصال به پروتئین‌های گیرنده خاص در سلول هدف، سلول‌های دورتر از محل تولید خود را تحت تأثیر قرار داده و در نتیجه عملکرد سلول هدف را تغییر می‌دهند. اتصال هورمون به گیرنده، منجر به فعال شدن مسیرهای پیام رسان که به طور معمول رونویسی ژن را فعال می‌کنند، می‌شود و در نتیجه بیان پروتئین‌های هدف، افزایش می‌یابد.

هورمون‌ها همچنین می‌توانند در مسیرهای سریع و غیر ژنومی نیز عمل کنند که می‌توانند در نهایت با اثرات ژنومیک همراه بوده و یا هم‌افزایی داشته باشند.

در مهره‌داران، اندام‌های اختصاصی که هورمون‌ها را ترشح می کنند "غدد درون‌ریز" هستند. ترشح هورمون در پاسخ به پیام‌های بیوشیمیایی خاص اتفاق می‌افتد و اغلب تحت سیستم تنظیم بازخورد منفی است. به عنوان مثال، قند خون بالا (غلظت گلوکز سرم) باعث سنتز انسولین می‌شود. سپس انسولین برای کاهش سطح گلوکز و حفظ هموستاز (شرایط پایدار) وارد عمل شده که این امر در نهایت منجر به کاهش سطح انسولین می‌شود.

هورمون‌های محلول در آب (مانند پپتیدها و آمین‌ها) به طور کلی با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی و از طریق پیام رسان‌های ثانویه عمل می‌کنند. هورمون‌های محلول در لیپیدها (مانند استروئیدها) به طور کلی از غشاهای پلاسمایی سلول‌های هدف (چه سیتوپلاسمی و چه هسته‌ای) عبور می‌کنند تا در هسته آن‌ها عمل کنند. یک استثنا قابل توجه در این مورد، براسینواستروئیدها در گیاهان هستند، که علی‌رغم محلول بودن در چربی، ولی همچنان در سطح سلول به گیرنده خود متصل می‌شوند. هورمون‌های محلول در آب به راحتی می‌توانند از طریق سیستم گردش خون جابه‌جا شوند. هورمون‌های محلول در لیپید باید به گلیکوپروتئین‌های حامل موجود در پلاسما (مانند گلوبولین متصل شونده به تیروکسین[1] (TBG)) متصل شده و مجموعه پروتئین-لیگاند را تشکیل دهند. بعضی از هورمون‌ها وقتی در جریان خون آزاد می‌شوند، کاملاً فعال هستند (مانند انسولین و هورمون‌های رشد)، در حالی که برخی دیگر از هورمون‌ها باید از طریق یک سری مراحل فعال‌سازی که معمولاً به دقت تنظیم می‌شوند، در سلول‌های خاصی فعال شوند. سیستم غدد درون ریز (اندوکراین)، هورمون‌ها را مستقیماً به جریان خون ترشح می‌کند و از طریق مویرگ‌های نفوذی هورمون به سلول‌ها

[1] thyroxine-binding globulin

می‌رسد، در حالی که سیستم برون‌ریز (اگزوکراین)، هورمون‌های خود را با استفاده از مجاری و به طور غیرمستقیم ترشح می‌کند. اگر هورمون ترشح شده بر روی سلول های مجاور اثر گذارد هورمون پاراکراین است و اگر بر خود سلول مترشحه تاثیر بگذارد اتوکراین است. هورمون‌های دارای عملکرد پاراکراین از طریق فضای بینابینی به بافت هدف نزدیک می‌شوند. گیاهان برای ترشح هورمون، اندام‌های ویژه‌ای ندارند، اگرچه توزیع فضایی برای هورمون‌های تولید شده وجود دارد. به عنوان مثال، هورمون اکسین عمدتاً در نوک برگ‌های جوان و در مریستم رأسی شاخه تولید می‌شود. کمبود غدد تخصصی به این معنی است که محل اصلی تولید هورمون می‌تواند در طول عمر گیاه تغییر کند و این محل تولید، به سن و محیط گیاه بستگی دارد.

هورمون درمانی یا درمان هورمونی به معنای استفاده از هورمون در پزشکی است. درمان با آنتاگونیست‌های هورمون (ماده ای که تقلید کننده هورمون است ولی باعث هیچ‌گونه پاسخ و واکنش از سوی سلول نمی‌شود و درواقع عملکرد واقعی هورمون را مختل می کند) نیز ممکن است به عنوان هورمون درمانی یا ضد هورمون درمانی شناخته شود. عمومی‌ترین کلاس‌های هورمون درمانی شامل هورمون درمانی آنکولوژیک (با کمک هرمون درمانی با سرطان مبارزه کرد)، درمان جایگزینی هورمون[1] (HRT) (برای یائسگی)، درمان جایگزینی آندروژن[2] (ART)، قرص‌های ضد بارداری خوراکی و هورمون درمانی برای تغییر جنسیت است. درمان جایگزینی هورمون که به عنوان هورمون‌درمانی یائسگی[3] (MHT) نیز شناخته می‌شود، برای زنانی است که از علائم یائسگی رنج می‌برند. اساس این روش بر این ایده است که درمان ممکن است از ناراحتی‌های مربوط به کاهش هورمون‌های استروژن و پروژسترون در گردش خون، جراحی و یا

[1] Hormone replacement therapy
[2] androgen replacement therapy
[3] menopausal hormone therapy

قاعدگی زودتر از موعد، جلوگیری کرده و باعث طولانی شدن عمر و کاهش ابتلا به زوال عقل شود. این روش شامل استفاده از یک یا چند گروه از داروهایی است که برای افزایش مصنوعی سطح هورمون‌ها طراحی شده‌اند. انواع اصلی هورمون‌های دخیل در این روش، شامل هورمون‌های استروژن، پروژسترون یا پروژستین و گاهی تستوسترون هستند. اغلب از این مسئله به جای درمان با عنوان "تیمار" یاد می‌شود. درمان جایگزینی آندروژن (ART) در مردان با سطح تستوسترون پایین به دلیل بیماری یا پیری مورد استفاده قرار گرفته است. این یک درمان هورمونی است که اغلب برای مردانی که عملکرد بیضه خود را به علت بیماری، سرطان یا علل دیگر از دست داده‌اند، تجویز می‌شود. از این دارو گاهی برای اواخر شروع هیپوگنادیسم (به اصطلاح "آندروپوز") استفاده می‌شود، اما اهمیت کاهش سطح تستوسترون و درمان آن با جایگزینی هورمونی همچنان مورد بحث است. سازمان غذا و دارو[1] (FDA) در سال ۲۰۱۵ اعلام کرد که نه مزایا و نه ایمنی تستوسترون در مردان مسن با سطح تستوسترون پایین اثبات نشده است. درمان جایگزینی هورمون برای افراد مبتلا به هیپوگنادیسم و اختلالات بین جنسی (مانند سندرم کلاین فلتر و سندرم ترنر) نیز به کارگرفته می‌شود.

هورمون درمانی تغییر جنسیت برای افراد با مشکلات تغییر جنسی تجویز می شود که شامل استفاده از استروئیدهای جنسی مرتبط با تعیین جنسیت و صفات خاص هر جنس است. برخی از افراد بین جنسی نیز ممکن است تحت هورمون درمانی قرار گیرند. هورمون درمانی تغییر جنسیت به وسیله هورمون‌های جنسی به دو نوع اصلی تقسیم می‌شود: هورمون درمانی زنانه و هورمون درمانی مردانه. مثال هایی از همون درمانی های مرسوم که امروزه انجام می شود در ادامه ذکر شده است:

- هورمون درمانی زنانه در درمان تغییر جنسیت برای زنان

[1] Food and Drug Administration

- هورمون درمانی مردانه در درمان تغییر جنسیت برای مردان
- هورمون درمانی برای سرطان
- درمان فقدان آندروژن برای مردان مبتلا به سرطان پروستات
- درمان فقدان استروژن برای زنان مبتلا به سرطان سینه (گیرنده استروژن مثبت)
- استروژن درمانی با دوز بالا برای زنان مبتلا به سرطان سینه گیرنده استروژن مثبت
- هورمون رشد درمانی برای کمبود هورمون رشد
- جایگزینی هورمون تیروئید در کم کاری تیروئید
- درمان ضد تیروئید در پرکاری تیروئید
- جایگزینی گلوکوکورتیکوئید و یا مینرالوکورتیکوئید در شرایطی مانند بیماری آدیسون (Addison's disease)
- درمان آنتی‌گلوکوکورتیکوئید در سندرم کوشینگ
- انسولین درمانی در دیابت نوع ۱
- قرص‌های ضد بارداری خوراکی برای اهداف مختلف از جمله کنترل بارداری

۱-۴) واکسن

واکسن ها گروه دیگری از بیوفارماسوتیکال ها هستند که از مباحث داغ زیست فناوری پزشکی در زمینه درمان می باشند. واکسن در اصل سیستم ایمنی فعال اکتسابی را نسبت به یک عامل عفونی خاص آماده می‌کند. به طور معمول واکسن شامل عاملی شبیه به میکروارگانیسم سازنده بیماری است و اغلب از اشکال ضعیف یا از بین رفته میکروب، سموم

آن یا یکی از پروتئین‌های سطح آن ساخته می‌شود. این عامل سیستم ایمنی بدن را تحریک می‌کند تا آن را به عنوان یک تهدید تشخیص دهد و از بین ببرد. بدین ترتیب سیستم ایمنی هر یک از میکروارگانیسم‌های مرتبط با آن عامل را که ممکن است در آینده با آن روبرو شود، بهتر شناسایی و نابود می‌کند. واکسن‌ها می‌توانند پیشگیرانه (برای جلوگیری یا بهبود اثرات عفونت در آینده توسط یک پاتوژن طبیعی یا "وحشی") یا درمانی (برای مبارزه با بیماری که قبلاً اتفاق افتاده است مانند سرطان) باشند. به تجویز و استفاده از واکسن‌ها، واکسیناسیون گفته می‌شود. واکسیناسیون موثرترین روش پیشگیری از بیماری‌های عفونی است. مصونیت گسترده ناشی از واکسیناسیون تا حد زیادی مسئول ریشه‌کن کردن آبله در سراسر جهان و محدود کردن بیماری‌هایی مانند فلج اطفال، سرخک و کزاز در بسیاری از نقاط جهان است. اثر بخشی واکسیناسیون به طور گسترده‌ای مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، امروزه ۲۵ واکسن مجاز و تأیید شده برای عفونت‌های مختلف در دسترس هستند. اصطلاحات واکسن و واکسیناسیون از Variolae vaccine (آبله گاو) گرفته شده است، اصطلاحی که ادوارد جنر[1] (که هم مفهوم واکسن را ایجاد کرد و هم اولین واکسن را ساخت) ابداع کرد تا نشان دهنده آبله گاو باشد. وی این عبارت را در سال ۱۷۹۸ برای عنوان طولانی تحقیق خود در مورد Variolae vaccine معروف به آبله گاو به کار برد، که در آن اثر محافظتی آبله گاو در برابر آبله را توضیح می‌داد. در سال ۱۸۸۱، به احترام جنر، لوئیس پاستور[2] پیشنهاد کرد که این کلمه برای مایه‌کوبی‌های محافظتی جدیدی که در حال ساخت هستند نیز به کار برده شود.

[1] Edward Jenner
[2] Louis Pasteur

فرآیند ساخت واکسن، از آزمایشگاه تا بالین:

مرحله آزمایشگاهی: در آزمایشگاه واکسن مورد نظر برعلیه بیماری مشخص، ساخته می شود. بسته به نوع واکسن نحوه ساخت متفاوت است (درادامه انواع واکسن ها توضیح داده خواهد شد).

مرحله پیش بالینی: در این مرحله دانشمندان واکسن را به حیواناتی مانند موش یا میمون می دهند تا ببینند که آیا پاسخ ایمنی ایجاد می‌کند یا خیر.

مرحله اول بالینی؛ آزمایش های ایمنی: دانشمندان واکسن را به تعداد کمی از افراد می دهند تا ایمنی و دوز واکسن را آزمایش کنند و همچنین تأیید کنند که سیستم ایمنی بدن را تحریک می کند یا خیر.

مرحله دوم؛ آزمایش‌های گسترده: دانشمندان واکسن را به صدها نفر که به گروه‌هایی مانند کودکان و افراد مسن تقسیم می‌شوند، می‌دهند تا ببینند آیا واکسن در آنها متفاوت عمل می‌کند یا خیر. این آزمایشات بیشتر ایمنی و توانایی واکسن را در تحریک سیستم ایمنی بدن آزمایش می‌کنند.

مرحله سوم؛ آزمایشات اثربخشی: دانشمندان واکسن را به هزاران نفر می‌دهند و منتظرند ببینند که چه تعداد از افراد در مقایسه با داوطلبانی که دارونما (چیزی ظاهراً شبیه به دارو بدون هیچ اثر واقعی) دریافت کرده اند، آلوده می‌شوند. این آزمایشات می‌تواند تعیین کند که آیا واکسن در برابر عامل بیماری محافظت می‌کند یا خیر.

انواع واکسن ها

۱. واکسن زنده‌ی ضعیف شده

واکسن زنده ضعیف شده درواقع منظور استفاده از میکروارگانیسم زنده است ولی بنحوی ضعیف شده باشد که بتواند سیستم ایمنی را تحریک کند ولی قدرت بیماری زایی نداشته باشد. این فرآیند ضعیف کردن میکروارگانیسم بالاخص ویروس و درنتیجه نحوه ساخت این واکسن ها می تواند به چند حالت انجام شود: ۱. استفاده از ویروس مشابه و مرتبط با این ویروس خطرناک بیماری زا بطوریکه این ویروس مشابه در انسان بیماری زا نباشد و در حیوان دیگری بیماری زا باشد. اولین نمونه آن استفاده از ویروس آبله گاوی (گاو میزبان طبیعی آن است) بعنوان واکسن برای جلوگیری از ابتلای انسان به ویروس آبله انسانی بود. ۲. تجویز ویروس بیماری‌زا یا تا حدی ضعیف شده در مسیر غیر طبیعی و متفاوت از نحوه ای که بصورت طبیعی بیماری زا است. ۳. پاساژ (کشت) و تکثیر ویروس در یک میزبان غیر طبیعی و متفاوت از میزبان طبیعی آن ویروس. در این حالت ویروس با پاساژهای پی در پی در میزبانی غیر از میزبان اصلی خود، کم کم ضعیف خواهد شد. ۴. تولید ویروس جهش یافته حساس به دما. البته این روش ممکن است همراه با سایر روش های فوق استفاده شود.

۲. واکسن‌های کاملاً کشته شده

میکروارگانیسم را با کمک موادی مانند فرمالدئید یا بتا پروپیولاکتون می توان کشت و به عنوان واکسن به کار برد. با کمک دوز تقویت کننده[1] (تزریق اضافی واکسن پس از دوز اولیه (پرایمر) است) این واکسن قادر به ایجاد پاسخ ایمنی بدن و تولید آنتی بادی (ایمنی هومورال) خواهد بود. توجه داشته باشید در حالت واکسن زنده‌ی ضعیف شده، از آنجاییکه میکروارگانیسم زنده است و فقط با روش های مختلفی ضعیف شده است، این ترس و نگرانی وجود دارد که با جهشی

[1] booster dose

برگشتی، مجدد ویروس قدرت بیماری زایی خود را به دست آورد. ولی در این حالت میکروارگانیسم بطورکامل کشته شده است و دیگر هیچ جهش یا برگشتی به حالت زنده وجود ندارد، که این خود یک مزیت بزرگ این نوع واکسن ها است (واکسن زنده‌ی ضعیف شده این مزیت را ندارد) این واکسن ها را می‌توان در بیماران با نقص ایمنی نیز استفاده کرد.

۳. واکسن های توکسوئید

توکسوئید (شبه سم) همان سمی غیر فعال (معمولاً اگزوتوکسین) است که سمیت آن توسط مواد شیمیایی (مانند فرمالین) یا فرآیندهای حرارتی سرکوب شده است، در حالی که سایر خصوصیات، به طور معمول ایمنی‌زایی آن، حفظ می‌شود. توکسوئید می‌تواند پاسخ ایمنی ایجاد کند و پس از آن بدون اینکه فرد به بیماری مبتلا شود، در برابر نشانگرهای مولکولی سم حافظه فیزیولوژیک ایجاد می‌شود. دیفتری، کزاز و بوتولیسم از جمله توکسوئیدهای مرسوم استفاده شده تا به امروز هستند.

۴. واکسن‌های زیرواحد[1]

در این نوع واکسن تنها آن قسمت (زیر واحد) از پاتوژن که می تواند باعث ایمنی زایی در بدن شود، استفاده می شود. این زیرواحد می تواند با کمک دو روش به دست آید: می‌توان میکروب را در آزمایشگاه رشد داد و سپس با استفاده از مواد شیمیایی، آن‌ها را تخریب کرد و آنتی‌ژن‌های مهم موجود را جمع‌آوری کرد. بنابراین در این حالت آنتی‌ژن ویروسی

[1] sub unit

با روش هایی از خود ویروس خالص و جداسازی می شود. در روشی دیگر می‌توان مولکول‌های آنتی‌ژن را با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در میکروب تولید کرد. واکسن‌هایی که از این طریق تولید می شوند "واکسن‌های زیر واحد نوترکیب" نامیده می‌شوند. در کنار واکسن‌های زیرواحد از موادی کمکی (اَدجوانت) نیز استفاده می شود. اَدجوانت ها باعث تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی، علیه آنتی ژن می شوند. اَدجوانت می تواند شامل: نمک‌های آلومینیوم، روغن‌های معدنی و انواع گسترده ای از مشتقات باکتریایی (مانند اَدجوانت فروند[1]) باشد.

۵. واکسن وکتور ویروسی

همانطور که از نام آن مشخص است این نوع واکسن ها در واقع حامل (وکتور) ویروسی نوترکیب هستند که کد کننده آنتی‌ژنی خاص (مربوط به عامل بیماری زای مورد نظر) هستند. درحالی که این وکتور ویروسی (ویروس) تنها عامل انتقال است و خود بیماری زا نمی باشد. در واقع ژن بیماری زای را با کمک فناوری‌های DNA نوترکیب، کلونینگ و انتقال ژن، به یک ویروس (وکتور ویروسی) دیگر انتقال می دهند و به این ترتیب ویروس (وکتور ویروسی) نوترکیب بدست می آید. این ویروس (وکتور ویروسی) پس از آلوده کردن میزبان آن ژن بیماری زا را بیان می کند. در این حالت ایمنی زایی با کارایی و شدت زیاد در بدن میزبان بدون ایجاد بیماری رخ می دهد.

۶. آنتی‌بادی‌های ضد ایدیوتیپ[2]

[1] Freund's adjuvants
[2] Anti-idiotype antibodies

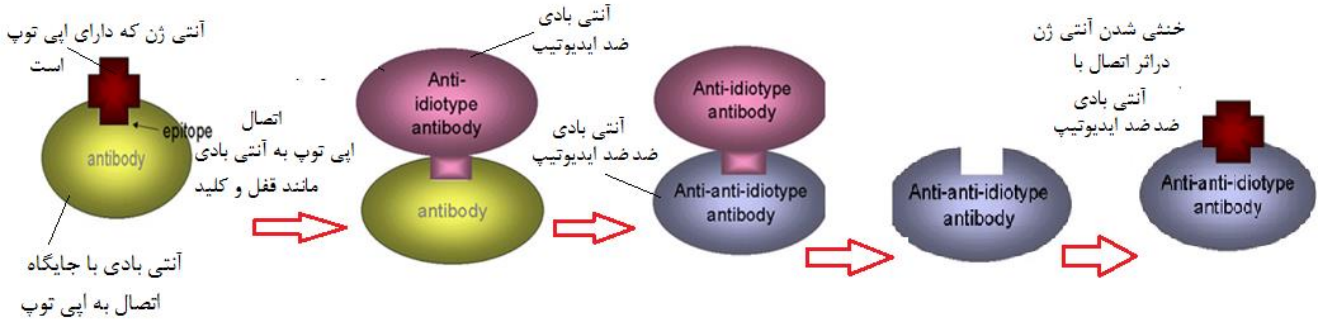
همانطو که گفته شد اپی توپ ها در آنتی ژن ها و پاراتوپ های آنتی بادی در واکنش های برهمکنش آنتی بادی-آنتی ژن شرکت می کنند. مجموعه ای از قسمت های برهمکنشی و شکل سه بعدی آنتی بادی در ناحیه متغیر آن که ویژگی شناسایی و اختصاصیت به آنتی ژنی روی آنتی بادی را مشخص می کند، ایدیوتیپ می گویند. واکسن‌های ضد ایدیوتیپی شامل آنتی‌بادی‌هایی هستند که مناطق ایمنی‌زایی سه بعدی دارند، و متشکل از توالی‌های پروتئینی هستند به طوری که ناحیه اختصاصی شبیه به آنتی‌ژن هدف را تداعی می کنند. Racotumomab نمونه‌ای از واکسن ضد سرطان از نوع آنتی‌بادی‌های ضد ایدیوتایپ است.

تولید و مصرف:

در یک نمونه از واکسن ضد ایدیوتیپ، آنتی‌بادی‌هایی که به آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور[1] (TAA) متصل شده (شکل-۷۳ قسمت a)، جدا شده و به موش تزریق می‌شوند. برای سیستم ایمنی موش، آنتی‌بادی‌های TAA، آنتی‌ژن محسوب می‌شوند و واکنش ایمنی ایجاد می‌کنند. پس از ایجاد واکنش ایمنی، در بدن موش آنتی‌بادی‌های موشی تولید می‌شود که می‌توانند به "ایدیوتیپ TAA " متصل شوند و به همین دلیل گفته می‌شود "ضد ایدیوتیپ" هستند (شکل-۷۳ قسمت b). آنتی‌بادی‌های موشی حاصل، برداشت و برای واکسیناسیون سایر موش‌ها استفاده می‌شوند. یعنی منجر به تولید آنتی بادی "ضد ضد ایدیوتیپ" می شوند (شکل-۷۳ قسمت c). درواقع این آنتی‌بادی‌های حاصل در گروه دوم موش‌ها دارای یک محل اتصال سه بعدی هستند که از آنتی‌بادی‌های اصلی که به آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور متصل می‌شوند، تقلید می‌کنند (شکل-۷۳ قسمت d). بنابراین آنتی‌بادی‌های ضد ایدیوتیپ با مواد کمکی ترکیب شده و به عنوان واکسن تجویز می‌شوند. سیستم ایمنی بدن موش‌ها اساساً نقش "تقویت کننده" و تبدیل توده کوچکی از

[1] tumor-associated antigens

آنتی‌بادی‌های TAA را به توده بسیار بزرگتری که برای واکسیناسیون انسان استفاده می‌شود، ایفا می‌کند. به طور عمده از این واکسن‌ها برای بیماران مبتلا به سرطان با ریسک بالا و همچنین برای آنتی ژن هایی که بدست آوردن آنها دشوار یا رشد عامل بیماری زا در آزمایشگاه بسیار خطرناک است، استفاده می‌شود.



شکل-۷۳ نحوه عملکرد واکسن از نوع "آنتی‌بادی‌های ضد ایدیوتیپ"

۷. DNA واکسن

DNA واکسن، نوعی واکسن است که توالی DNA خاص کد کننده آنتی‌ژن را به سلول‌های یک گونه برای ایمن شدن منتقل می‌کند. DNA واکسن با تزریق پلاسمید مهندسی ژنتیک شده (حاوی توالی DNA رمزگذار آنتی‌ژن (ها) که بدن در برابر آن‌ها پاسخ ایمنی ایجاد می‌کند) کار می‌کند؛ یعنی سلول‌ها مستقیماً خودشان آنتی‌ژن هدف را تولید می‌کنند و سپس سیستم ایمنی بدن به آنتی‌ژن تولید شده پاسخ می‌دهد. از لحاظ تئوری DNA واکسن‌ها دارای مزایایی نسبت به واکسن‌های معمولی از جمله توانایی القای طیف وسیع‌تری از انواع پاسخ‌های ایمنی هستند. تا به امروز از چندین DNA واکسن برای مصارف دامپزشکی استفاده شده است. در برخی موارد، محافظت در برابر بیماری در حیوانات به دست آمده

است، در برخی دیگر محافظتی ایجاد نشده است. تحقیقات مرتبط با این نوع واکسن بر روی بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی در انسان و همچنین انواع مختلف سرطان ادامه دارد.

مزایای DNA واکسن:

- ارائه آنتی‌ژن توسط هر دو مولکول MHC کلاس I و کلاس II
- بدون خطر ابتلا به عفونت
- پاسخ ایمنی متمرکز بر آنتی‌ژن هدف است
- سهولت توسعه و تولید
- پایداری برای ذخیره سازی و حمل و نقل
- مقرون به صرفه بودن
- نیاز به سنتز پپتید، بیان و خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب و استفاده از مواد کمکی سمی نیست
- ماندگاری طولانی مدت ایمونوژن
- بیان در داخل بدن باعث می‌شود ساختار پروتئین شبیه به پروتئین‌های یوکاریوتی باشد.

معایب DNA واکسن:

- محدود به ایمونوژن‌های پروتئینی (برای آنتی‌ژن‌های غیر پروتئینی مانند پلی ساکاریدهای باکتریایی مفید نیست)
- خطر تأثیر بر ژن‌های کنترل‌کننده رشد سلول

- امکان القای تولید آنتی‌بادی علیه DNA
- امکان ایجاد تحمل ایمنی نسبت به آنتی‌ژن (پروتئین) تولید شده (عدم پاسخ دهی بدن به آنتی ژن)
- امکان پردازش غیر معمول پروتئین‌های باکتریایی و انگلی در سیستم یوکاریوتی
- طی تجویز واکسن نانوذرات حاوی DNA پلاسمید به شکل اسپری بینی، امکان آلوده شدن سلول‌هایی که هدف درمان نیستند (مانند سلول‌های مغزی) نیز وجود دارد

طراحی وکتور پلاسمیدی برای DNA واکسن‌ها:

DNA واکسن‌ها به هنگام استفاده از وکتورهای بیانی بسیار فعال، بهترین پاسخ ایمنی را ایجاد می‌کنند. این ناقل‌ها پلاسمیدهایی هستند که معمولاً از یک پروموتر ویروسی قوی برای پیشبرد رونویسی و ترجمه ژن (یا DNA مکمل) مدنظر در داخل بدن ساخته می‌شوند. هنگامی که پلاسمید کد کننده آنتی‌ژن پپتیدی وارد هسته می‌شود، رونویسی از روی آن اتفاق می‌افتد (mRNA تولید می شود) و در سیتوپلاسم فرآیند ترجمه و ساخت پروتئین از روی mRNA رونویسی شده انجام می‌شود. سلول در سطح خود آنتی‌ژن خارجی را با مولکول‌های کلاس I و کلاس II کمپلکس سازگاری بافتی (MHC) نمایش می‌دهد. سپس سلول ارائه کننده آنتی‌ژن به غدد لنفاوی رفته و آنتی‌ژن پپتیدی و مولکول محرک را به سلول T ارائه می‌دهد و پاسخ ایمنی را آغاز می‌کند.

انتقال DNA واکسن:

DNA واکسن ها با روش‌های مختلفی وارد بافت‌های جانوری می‌شوند. دو روش پرکاربرد که در سال ۱۹۹۹ ابداع شدند: DNA در محلول نمکی تهیه و با استفاده از یک سوزن استاندارد زیر پوستی تزریق شود و همچنین با استفاده از تفنگ ژنی وارد سلول شود. روش‌های دیگری نیز در طی سال‌های کنونی (مانند اسپری بینی حاوی نانوذرات دارای DNA پلاسمید) ابداع شده‌اند.

تزریق محلول نمکی: به طور معمول از طریق درون عضله‌ای[1] (IM) در عضله اسکلتی یا داخل پوست[2] (ID) انجام می‌شود و DNA را به فضاهای خارج سلولی می‌رساند. مواردی مانند ۱) الکتروپوراسیون[3] ۲) آسیب زدن موقتی به فیبرهای عضلانی با موادی مانند بوپیواکائین[4] و ۳) استفاده از محلول هایپرتونیک نمکی یا ساکارز می‌تواند به این امر کمک کند. شدت پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده طی این روش می‌تواند تحت تأثیر عواملی از جمله نوع سوزن، تراز سوزن، سرعت تزریق، حجم تزریق، نوع عضله، سن، جنس و شرایط فیزیولوژیکی گیرنده، متغیر باشد.

تفنگ ژنی: با استفاده از گاز هلیوم فشرده به عنوان تسریع کننده، DNA پلاسمید[5] (pDNA) جذب شده به میکروذرات طلا یا تنگستن را به سلول‌های هدف می‌رساند.

انتقال با استفاده از سطح مخاط: این روش شامل تزریق آئروسل DNA برهنه بر روی سطوح مخاطی، مانند مخاط بینی و ریه، و تجویز موضعی pDNA به چشم و مخاط واژن است. تحویل DNA ازطریق سطح مخاط با استفاده از ترکیب

[1] intramuscularly
[2] intradermally
[3] electroporation
[4] bupivacaine
[5] plasmid DNA (pDNA)

DNA-لیپوزوم های کاتیونی، میکروسفرهای زیست‌تخریب‌پذیر[1]، و نیز وکتورهای ضعیف شده سالمونلا، شیگلا یا لیستریا برای تجویز خوراکی به مخاط روده و همچنین وکتورهای آدنو ویروس نوترکیب انجام می‌شود.

حامل‌های پلیمری: برای تحویل DNA واکسن می توان از ترکیب سلول‌های باکتری با پلیمرهای مصنوعی استفاده کرد. برای افزایش کارایی، باکتری ا.کلای (بخش داخلی این ترکیب) و پلی بتا آمینواستر (پوشش بیرونی این ترکیب) با یکدیگر هم‌افزایی می‌کنند تا موانع مرتبط با تحویل ژن به سلول ارائه دهنده آنتی‌ژن را برطرف کنند. این موانع شامل جذب، ورود به داخل سلول، فرار فاگوزومی و افزایش غلظت محموله در داخل سلول می‌باشد. پس از انجام آزمایش در موش‌ها، وکتور هیبریدی (ترکیبی) حاصل برای القا پاسخ ایمنی در بدن کشف شد.

ایمنی‌زایی ELI: روش دیگر DNA واکسیناسیون، استفاده از ایمنی‌زایی به وسیله کتابخانه بیانی[2] (ELI) است. با استفاده از این تکنیک، می‌توان به طور بالقوه تمام ژن‌های یک عامل بیماری‌زا را به طور همزمان تحویل سلول داد، که ممکن است برای کار با عوامل بیماری‌زایی که ضعیف کردن یا کِشت آن‌ها سخت است، مفید باشد. با استفاده از روش ELI می‌توان ژن‌هایی را که باعث ایجاد واکنش محافظتی می‌شوند، شناسایی کرد. این روش با مایکوپلاسما پولمونیس[3]، پاتوژن ریه موش با ژنوم نسبتاً کوچک، آزمایش شده است. حتی کتابخانه‌های بیانی کوچک (جزئی) هم می‌توانند فرد را از چالش‌هایی که در آینده رخ می‌دهند، ایمن کنند.

دوز مورد نیاز برای DNA واکسن ها:

[1] biodegradable
[2] expression library immunization
[3] Mycoplasma pulmonis

روش انتقال DNA، دوز مورد نیاز برای ایجاد یک پاسخ ایمنی مؤثر را تعیین می‌کند. برای تزریق نمکی به مقدار متغیری از DNA، از ۱۰ میکروگرم تا ۱ میلی‌گرم، نیاز است، در حالی که انتقال به وسیله تفنگ ژنی به ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر DNA کمتر نیاز دارد. به طور میانگین برای DNA واکسن‌ها به ۰,۲ میکروگرم تا ۲۰ میکروگرم نیاز است، اگرچه مقادیر بسیار کم ۱۶ نانوگرمی گزارش شده است. این مقادیر بر حسب گونه، متفاوت است. به عنوان مثال موش‌ها تقریباً ۱۰ برابر کمتر از پستانداران به DNA نیاز دارند. تزریق نمکی به DNA بیشتری احتیاج دارد؛ زیرا DNA به فضای خارج سلولی بافت هدف (به طور معمول عضله) منتقل می‌شود، جایی که باید قبل از جذب بر موانع فیزیکی (مانند لایه پایه و مقادیر زیادی از بافت همبند) غلبه کند، در حالی که تفنگ ژنی DNA را مستقیماً وارد سلول‌ها می‌کند و این امر منجر به هدر رفت کمتر DNA می‌شود.

مکانیسم دریافت DNA:

تصور می‌شد سلول‌های عضلانی به دلیل داشتن شبکه گسترده‌ای از توبول‌های T[1] (لوله های تی) برای جذب DNA و بیان این DNA بی‌نظیر هستند (لوله های تی در واقع غشای سلولی امتداد یافته سلول عضله بوده که پر از کانال های یونی است). با استفاده از مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی، پیشنهاد شد که جذب DNA توسط غارها[2] (یا چاله‌های پوشش داده نشده با کلاترین[3]) تسهیل می‌شود. با این حال، تحقیقات بعدی نشان داد که سلول‌های دیگر (مانند سلول‌های کراتینوسیت، فیبروبلاست و سلول‌های اپیتلیال لانگرهانس) نیز می‌توانند DNA خارجی را جذب کنند.

[1] T-tubules
[2] caveolae
[3] non-clathrin coated pits

در اینجا دو نظریه مطرح شد؛ ۱. جذب DNA به صورت درون‌تنی (*in vivo*) به طور غیر اختصاصی (روشی مشابه با فاگو- یا پینوسیتوز) و یا ۲. از طریق گیرنده‌های خاصی رخ می‌دهد. این گیرنده‌ها ممکن است یک گیرنده ۳۰ کیلو دالتونی (30kDa) یا گیرنده‌های اسکَوِنجر (پاک‌کننده) ماکروفاژی باشند. گیرنده ۳۰ کیلو دالتونی سطحی به طور خاص به قطعات 4500 جفت بازی DNA متصل می‌شود (و سپس این قطعات وارد سلول می‌شوند) و در سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC ها) و سلول‌های T حرفه‌ای یافت می‌شود. از طرف دیگر گیرنده‌های اسکَوِنجر نیز در ماکروفاژها یافت می شوند.

۸. RNA واکسن‌ها

RNA واکسن یا mRNA واکسن، نوعی واکسن است که برای تولید پاسخ ایمنی از یک نسخه RNA پیام‌رسان (mRNA) استفاده می‌کند. این واکسن، مولکول‌های RNA سنتز شده را به سلول‌های ایمنی منتقل می‌کند. RNA واکسن هنگامی که داخل سلول‌های ایمنی قرار می‌گیرد، به عنوان mRNA عمل می‌کند و باعث می‌شود سلول‌ها پروتئین خارجی را که به طور معمول توسط یک پاتوژن (مانند ویروس) یا توسط سلول سرطانی تولید می‌شود، بسازند. این مولکول‌های پروتئینی یک پاسخ ایمنی سازگار شونده را آغاز می‌کنند که به بدن می‌آموزد چگونه پاتوژن یا سلول‌های سرطانی مربوطه را شناسایی و از بین ببرد. برای محافظت از mRNA و سهولت ورود به سلول، این مولکول‌ها با نانوذرات لیپیدی ترکیب می‌شوند.

به ویژگی واکسن در توانایی تولید واکنش‌های جانبی متداول "قابل انتظار" ، مشابه سایر واکسن‌های معمول و غیر RNA، واکنش‌زایی[1] گفته می‌شود. افراد مستعد واکنش خود ایمنی، ممکن است واکنش نامطلوبی به RNA واکسن‌ها داشته باشند. از مزایای RNA واکسن‌ها نسبت به واکسن‌های پروتئینی سنتی می‌توان به طراحی و سرعت تولید بیشتر، هزینه کمتر تولید و ایجاد ایمنی سلولی و همچنین ایمنی هومورال اشاره کرد.

امروزه mRNA واکسن‌ها برای واکسن COVID-19 بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. تا دسامبر سال ۲۰۲۰، دو mRNA واکسن جدید برای COVID-19 وجود داشت که دوره هشت هفته‌ای مورد نیاز برای تست‌های انسانی را پشت سر گذاشت و منتظر مجوز استفاده اضطراری[2] (EUA) بودند: واکسن کوویید۱۹- مدرنا[3] (mRNA-1273) و واکسن کوویید۱۹ فایزر-بیون‌تک[4] (BNT162b2). در ۲ دسامبر سال ۲۰۲۰، آژانس تنظیم کننده داروها و محصولات بهداشتی انگلستان[5] (MHRA) اولین نهاد تنظیم کننده‌ای بود که mRNA واکسن را تأیید کرد و مجوز استفاده گسترده از واکسن کوویید۱۹ فایزر-بیون‌تک (Comirnaty) را صادر نمود. در ۱۱ دسامبر سال ۲۰۲۰، اداره غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) مجوز استفاده از واکسن کوویید۱۹ فایزر-بیون‌تک را صادر کرد و مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌های ایالات متحده[6] (CDC) استفاده از آن را برای افراد ۱۶ سال و بالاتر را در ۱۲ دسامبر ۲۰۲۰ توصیه کرد. پس از تایید EUA توسط FDA، CDC در ۱۹ دسامبر سال ۲۰۲۰ استفاده از واکسن کویید مدرنا را نیز برای بزرگسالان پیشنهاد کرد. به دلیل استفاده از RNA در واکسن، اطلاعات غلط قابل توجهی از طریق رسانه‌های اجتماعی منتشر شده است و به اشتباه ادعا

[1] reactogenicity
[2] emergency use authorization
[3] Moderna COVID-19
[4] Pfizer–BioNTech COVID-19
[5] UK's Medicines and Healthcare products Regulatory Agency
[6] US Centers for Disease Control and Prevention

می‌کند که استفاده از RNA، DNA فرد را تغییر می‌دهد، و یا بر جدید و ناشناخته بودن این فناوری تأکید می‌کنند، در حالی که مجموعه شواهد آزمایشاتی اخیر را نادیده می‌گیرد. یک عیب در mRNA واکسن شرکت فایزر-بیون‌تک (Pfizer-BioNTech) برای COVID-19 این است که قبل از توزیع، نیاز به ذخیره‌سازی در دمای فوق العاده سرد دارد درنتیجه نیاز به شرایط خاصی برای حمل و نقل به نقاط مختلف جهان دارد.

مکانیسم RNA واکسن‌ها:

استفاده از RNA به عنوان ابزاری برای واکسن در دهه ۱۹۹۰ به صورت mRNA خود-تکثیرشونده کشف شد. به طور کلی mRNA واکسن‌ها به دو دسته اصلی mRNA واکسن‌های غیرتکثیرشونده (انتقال ویروسی) و mRNA خود-تکثیرشونده مولکولی (انتقال غیر ویروسی) هستند. وقتی mRNA به صورت غیر ویروسی تحویل داده می‌شود، وارد سیتوپلاسم سلول می‌شود و می‌تواند پروتئین آنتی‌ژنیک را بیان و تکثیر کند.

همچنین مشخص شده است که راه‌های مختلف تزریق، مانند وارد شدن به پوست، خون یا عضلات، منجر به تغییر سطح جذب mRNA می‌شود و به همین دلیل انتخاب مسیر تجویز، اساسی‌ترین بخش انتقال mRNA به سلول‌ها است. در مقایسه میان مسیرهای مختلف، به نظر تزریق به غدد لنفاوی منجر به بیشترین پاسخ سلول از جانب سلول های T می‌شود. مکانیسم‌ها و در نتیجه ارزیابی mRNA خود-تکثیرشونده ممکن است متفاوت باشد؛ زیرا اندازه مولکول mRNA خود-تکثیرشونده بسیار بزرگتر از mRNA غیرتکثیرشونده است و درواقع این مسئله تفاوت اساسی آنها است.

هدف یک واکسن، تحریک سیستم ایمنی سازگار شونده برای تولید آنتی‌بادی‌هایی است که دقیقاً یک پاتوژن خاص را هدف قرار می‌دهند. نشانگرهای موجود در پاتوژن که آنتی‌بادی‌ها آن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند، آنتی‌ژن نامیده می‌شوند.

mRNA واکسن‌ها به روشی کاملاً متفاوت از واکسن سنتی کار می‌کنند. واکسن‌های سنتی با تزریق آنتی‌ژن ها، میکروارگانیسم ضعیف شده (یا بی ضرر) و یا حامل ویروس نوترکیب کد کننده آنتی‌ژن، تولید آنتی‌بادی را تحریک می کنند. در مقابل، mRNA واکسن‌ها توالی RNA ویروس که عمر کوتاهی دارد را به فرد واکسینه شده وارد می‌کنند. این قطعات mRNA توسط سلول‌های دندریتیک (نوعی سلول سیستم ایمنی بدن) جذب می‌شود. سلول‌های دندریتیک از ریبوزوم برای خواندن mRNA و تولید آنتی‌ژن‌های ویروسی استفاده می‌کنند. اگرچه سلول‌هایی به غیر از سلول‌های ایمنی، نیز می‌توانند به طور بالقوه mRNA واکسن را جذب کنند. درنتیجه این سلول ها نیز قادر به تولید آنتی‌ژن‌های ویروسی خواهند بود بطوریکه پروتئین اسپایک[1] ویروسی را تولید کرده و آن را در سطح خود به نمایش بگذارند، ولی سلول‌های دندریتیک با شدت بیشتری mRNA را جذب می‌کنند. پروتئنی اسپایک یکی از مهمترین پروتئین های سطح ویروس است که به این ویروس ها اجازه می دهند به سلول میزبان نفوذ کنند و باعث ایجاد عفونت شوند.

هنگامی که آنتی‌ژن‌های ویروسی توسط سلول میزبان تولید می‌شوند، روند طبیعی سیستم ایمنی سازگار شونده دنبال می‌شود. آنتی‌ژن‌ها توسط پروتئازوم‌ها تجزیه می‌شوند، سپس مولکول‌های MHC کلاس I و کلاس II به آنتی‌ژن متصل می‌شوند و آن را به غشای سلولی منتقل می‌کنند و سلول دندریتیک را "فعال" می‌کنند. سلول‌های دندریتیک پس از فعال شدن، به غدد لنفاوی مهاجرت می‌کنند، جایی که آنتی‌ژن به سلول‌های T و سلول‌های B ارائه می‌شود. این مسئله

[1] spikes

در نهایت منجر به تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌شود که به طور خاص برای یک آنتی‌ژن خاص ساخته شده‌اند و در نتیجه ایمنی ایجاد می‌کنند.

تولید mRNA برای سازندگان واکسن بسیار آسان‌تر از پروتئین‌های آنتی‌ژن یا ویروس ضعیف شده است. مزیت دیگر سرعت طراحی و تولید است. شرکت مدرنا واکسن mRNA-1273 خود را برای کووید۱۹ در مدت ۲ روز طراحی کرد. یکی دیگر از مزایای واکسن‌های RNA این است که چون آنتی‌ژن‌ها در داخل سلول تولید می‌شوند، ایمنی سلولی و همچنین ایمنی هومورال را تحریک می‌کنند.

mRNA واکسن‌ها بر DNA درون سلول تأثیر نمی‌گذارند یا آن را از نو برنامه‌ریزی نمی‌کنند. قطعه mRNA سنتز شده در اصل یک کپی از قسمت خاصی از RNA ویروسی است که دستورالعمل ساخت آنتی‌ژن ویروس (در مورد واکسن‌های mRNA ویروس کرونا این mRNA کدکننده پروتئین پوششی اسپایک است) را به همراه دارد و به DNA انسان مربوط نیست. این تصور غلط با مطرح شدن واکسن های mRNA در بین عموم مردم منتشر شد که mRNA واکسن‌ها بر DNA انسانی اثرات نامطلوبی می‌گذارند.

mRNA پس از تولید پروتئین خارجی باید در سلول‌ها تخریب شود. با این حال، از آنجا که فرمولاسیون تولید و جزئیات فنی (شامل ترکیب دقیق پوشش دارویی نانوذرات لیپیدی) توسط تولیدکنندگان mRNA واکسن‌ها، محرمانه نگه داشته می‌شود، جزئیات و زمان بندی آن هنوز مشخص نیست.

انتقال RNA واکسن‌ها:

روش انتقال واکسن را می‌توان به طور کلی به دو دسته طبقه بندی کرد ؛ ۱) انتقال RNA ها به درون سلول از داخل بدن (in vivo) و یا ۲) انتقال به درون سلول‌ها در خارج از بدن (ex vivo)

خارج از بدن: سلول‌های دندریتیک نوعی سلول ایمنی هستند که آنتی‌ژن‌ها را در سطح خود به نمایش می‌گذارند و به وسیله برهمکنش با سلول‌های T، به راه افتادن پاسخ ایمنی را تحریک می‌کنند. سلول‌های دندریتیک را می‌توان از بیماران جمع آوری و با mRNA مورد نظر برنامه‌ریزی کرد. سپس، می‌توان آن‌ها را مجدداً به بدن بیماران وارد کرد تا پاسخ ایمنی ایجاد شود.

داخل بدن: از زمان کشف اینکه وارد کردن mRNA رونویسی شده در شرایط برون‌تنی آزمایشگاهی (in vitro) منجر به بیان پروتئین در داخل بدن/درون‌تنی (in vivo) پس از تجویز مستقیم می‌شود، رویکردهای داخل بدن جذاب‌تر و جذاب‌تر شدند. آن‌ها مزایایی نسبت به روش‌های خارج از بدن (ex vivo) دارند؛ از جمله نداشتن هزینه جمع آوری سلول‌های دندریتیک از بیماران و ایجاد سازگاری در آنها. درواقع در حالتِ ex vivo، عفونت در خارج از بدن تقلید و شبیه سازی می شود. البته همچنان موانعی بر سر راه تبدیل شدن mRNA واکسن‌ها به یک روش قوی درمانی و پیشگیرانه وجود دارد. برای مثال برای شروع ترجمه‌ی این mRNAخارجی، باید بتوانیم مانع از یکسری مکانیسم‌های تکاملی شویم که این مکانیسم‌ها از نفوذ مواد هسته‌ای ناشناخته به درون سلول جلوگیری می کنند. به طوریکه این مکانیسم ها درنهایت باعث تخریب mRNA توسط آنزیم RNases می‌شوند. علاوه بر این، RNA برای حرکت در داخل سلول از طریق انتشار بسیار سنگین است و این امر آن را در معرض کشف و نابودی بوسیله سلول‌های میزبان قرار می‌دهد.

تزریق mRNA برهنه: تزریق برهنه به این معنی است که واکسن به تنهایی در یک بافر نگه داشته شده و به سلول‌های بدن وارد می‌شود. این حالت از جذب mRNA از سال ۲۰۰۰ شناخته شده است. اولین مطالعات بالینی در سراسر جهان (شهر توبینگن در آلمان) از طریق تزریق داخل پوستی mRNA برهنه برای واکسیناسیون انجام شده است.

مزایای RNA واکسن‌ها نسبت به واکسن‌های سنتی:

mRNA واکسن‌ها مزایای خاصی نسبت به واکسن‌های پروتئینی سنتی دارند. از آنجا که این واکسن‌ها از پاتوژن فعال (یا حتی از یک پاتوژن غیرفعال) ساخته نشده‌اند، در نتیجه غیر عفونی هستند. در مقابل، واکسن‌های سنتی به عوامل بیماری زا نیاز دارند، که اگر حجمشان بیش از حد زیاد شود، می‌توانند خود باعث شیوع محلی عامل بیماری‌زا در بخش تولید واکسن شوند. RNA واکسن‌ها را می‌توان بسیار سریعتر و آسان‌تر تولید کرد به همین دلیل برای پاسخ سریع به عفونت‌های جدی بسیار مناسب‌تر هستند. به عنوان مثال، تولید واکسن فایزر-بیون‌تک در ابتدا به ۱۱۰ روز زمان لازم داشت (قبل از اینکه شرکت فایزر فرآیند تولید را فقط به ۶۰ روز بهینه کند)، اما این سرعت هنوز بسیار کمتر از زمان لازم برای ساخت واکسن‌های آنفولانزا و فلج اطفال است. در یک بازه زمانی بزرگتر، زمان تولید واقعی تقریباً ۲۲ روز است: دو هفته برای کلونینگ مولکولی پلاسمیدهای DNA و تخلیص DNA، چهار روز برای رونویسی DNA به RNA و خالص‌سازی mRNA و چهار روز برای کپسوله کردن mRNA در نانوذرات لیپیدی و در نهایت پر کردن ویال‌های واکسن. بیشتر زمان مورد نیاز برای هر دوره تولید، به کنترل دقیق کیفیت در هر مرحله، اختصاص می‌یابد.

قبل از سال ۲۰۲۰، هیچ دارو و یا واکسن ساخته شده از mRNA برای استفاده در انسان مجاز نبود، بنابراین خطر اثرات ناشناخته وجود داشت. مقابله با ویروس کرونا در سال ۲۰۲۰ به تولید سریعتر واکسن‌های mRNA نیاز داشت، و بدین-ترتیب سازمان‌های بهداشت جذب شدند که پس از گذشت موفقیت آمیز دوره هشت هفته‌ای آزمایشات بالینی انسانی، مجوز استفاده اضطراری از این واکسن‌ها را صادر کنند.

ذخیره‌سازی RNA واکسن‌ها:

از آنجا که mRNA شکننده است، واکسن باید در دمای بسیار پایین نگه داشته شود تا از تخریب آن جلوگیری شود. mRNA واکسن فایزر-بیون‌تک باید بین ۸۰- تا ۶۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. شرکت مدرنا می‌گوید واکسن mRNA-1273 آن‌ها می تواند بین ۲۵- تا ۱۵- درجه سانتیگراد ذخیره شود، که قابل مقایسه با توان فریزرهای خانگی است، و البته بین ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد تا ۳۰ روز نیز پایدار باقی می‌ماند. در نوامبر ۲۰۲۰، مجله معتبر علمی نیچر گزارش داد، "گرچه این احتمال وجود دارد که تفاوت در فرمولاسیون LNP[1] (نانوذرات لیپیدی) یا ساختارهای ثانویه mRNA بتواند دلیل اختلاف بین مقاومت حرارتی بین واکسن مدرنا و بیون‌تک را توضیح دهد، ولی بسیاری از کارشناسان گمان می‌کنند که هر دو واکسن در نهایت دارای شرایط ذخیره سازی و ماندگاری مشابهی هستند."

[1] Lipid nanoparticle

۲) ژن درمانی و سلول درمانی

تا اینجا در زمینه کاربردهای درمانی بیوتکنولوژی پزشکی، به مبحث تولید بیوفارماسوتیکال اشاره کردیم، کاربرد بعدی بحث ژن و سلول درمانی است. بیوتکنولوژی پزشکی برای درمان بیماری‌ها دست به اقدامات گسترده ای زده است به طوری که گاهی درصدد جایگزینی یا اصلاح ناحیه ژنتیکی معیوب است (ژن درمانی) و گاهی اقدام به جایگزینی یا بهبود سلول معیوب (سلول درمانی) می کند. درواقع سلول درمانی به روند معرفی سلول جدید به یک بافت برای درمان یک بیماری، گفته می شود. این سلول جدیدی که به بیمار معرفی می شود می تواند سلول دست نخورده و سالم باشد، یا این سلول می تواند با کمک تکنیک های مهندسی ژنتیک دست‌ورزی شده و سپس به بیمار معرفی شود. در حالت اول سلول درمانی بدون ژن درمانی انجام شده است ولی در حالت دوم سلول درمانی همراه با ژن درمانی انجام شده است.

۲-۱) ژن‌درمانی

همانطور که گفته شد روش‌های درمانی سلول‌ها اغلب بر روی معالجه بیماری‌های ارثی است که این سلول درمانی می تواند با یا بدون اعمال تغییرات ژنتیکی روی سلول مورد نظر (ژن‌درمانی) انجام شود. از طرف دیگر ژن درمانی نیز می تواند بطور مستقل و بدون همراهی با سلول درمانی انجام شود. به‌طور عمده انتقال مواد ژنتیکی به درون سلول‌های یک موجود برای مقاصد درمانی است. این امر که به روش‌های مختلف و متنوع صورت می‌گیرد، بر انتقال ژن سالم به درون سلول، اصلاح ژن معیوب از طریق رفع نقص و تغییر ژنوتیپ آن و یا مهار کردن بیان ژن معیوب استوار است. در این تعریف چهار واژه‌ی اساسی در علم ژنتیک، شامل «ژن»، «بیان ژن»، «ژنتیک» و «ماده‌ی ژنتیکی یا ماده‌ی وراثتی» وجود دارند.

شکل-۷۴ ژن‌درمانی در حقیقت تلفیقی از زیست‌فناوری و علم ژنتیک است.

تاریخچه ژن‌درمانی

توانایی ایجاد تغییرات خاص در جایگاه‌هایی خاص و مشخص در ژنوم انسانی از زمان شناسایی ژن به عنوان واحد اصلی وراثت، یک هدف هیجان انگیز بوده است. بنابراین، ژن‌درمانی به عنوان توانایی و بهبود ژنتیکی از طریق اصلاح ژن‌های تغییر یافته (جهش یافته) یا تغییرات خاص در محل‌های خاص که درنهایت منجر به دستیابی به اهداف درمانی شود، شناخته می‌شود. این روش درمانی از طریق پیشرفت‌های ژنتیک و مهندسی زیستی که امکان دستکاری وکتورها برای رساندن مواد خارج کروموزومی‌به سلول‌های هدف را فراهم می‌کنند، امکان پذیر شد. یکی از محورهای اصلی این روش بهینه‌سازی ابزار و وسایل ژن درمانی ازجمله حامل‌ها (وکتورها) است که بیشتر از پلاسمیدها، ساختارهای نانویی و یا ویروس‌ها به عنوان حامل استفاده می شود.. ویروس‌ها به دلیل برتری در حمله به سلول‌ها و قراردادن مواد ژنتیکی خود

در ژنوم آن‌ها بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. با این حال، نگرانی‌های زیادی در مورد تشدید پاسخ‌های ایمنی و دستکاری ژنوم، به ویژه در سلول‌های لایه زایا وجود دارد. مطالعات درون‌تنی (in vivo) در سلول‌های سوماتیک، نتایج مطلوبی را با پروتکل‌های تأیید شده در آزمایشات بالینی نشان داد. این آزمایشات در ایالات متحده، اروپا، استرالیا و چین انجام شده است. پیشرفت‌های اخیر بیوتکنولوژی، مانند سلول‌های بنیادی پرتوان القایی در بیماران مبتلا به بیماری‌های کبدی، ایمونوتراپی سلول‌های T گیرنده آنتی‌ژن کایمریک و ویرایش ژنومی‌توسط روش CRISPR / Cas9 در ادامه بیان شده است.

در سال ۱۹۹۱، جیمز واتسون[1] اعلام کرد که "بسیاری از مردم می‌گویند که نگران تغییر در دستورالعمل های ژنتیکی خود هستند. اما این‌ها (دستورالعمل‌های ژنتیکی) صرفاً محصولی از تکامل‌اند و به گونه‌ای شکل گرفته‌اند تا بتوانیم خود را با شرایط خاصی سازگار کنیم که ممکن است دیگر وجود نداشته باشند. همه ما می‌دانیم که چقدر ناقص هستیم. چرا برای زنده ماندن کمی‌بهتر نشویم؟" از همان آغاز، بشر توانست درک کند که ویژگی‌های عجیب والدین می‌تواند به فرزندان آن‌ها منتقل‌شود. اولین گمانه زنی‌ها از دانشجویان یونان باستان نشأت گرفت و برخی از این نظریه‌ها تا قرن‌ها ادامه داشت. مطالعات علمی-ژنتیکی در اوایل دهه ۱۸۵۰ آغاز شد، زمانی که راهب اتریشی، گرگور مندل[2]، در یک سری آزمایشات با نخود سبز، الگوی وراثت را با مشاهده سرنخ‌هایی که به عنوان واحدهای جداگانه به ارث می‌رسیدند، توصیف کرد. امروزه ما این سرنخ‌ها را با عنوان ژن می‌شناسیم.

[1] James Watson
[2] Gregor Mendel

تا سال ۱۹۵۰، زمانی که بیوشیمیست آمریکایی، جیمز واتسون، و بیوفیزیکدان بریتانیایی، فرانسیس کریک[۱]، مدل انقلابی DNA دو رشته را توصیف کردند، اطلاعات کمی در مورد ماهیت فیزیکی ژن‌ها وجود داشت. در سال ۱۹۷۰، محققان یک سری آنزیم کشف کردند که باعث جداسازی ژن‌ها در مکان‌های از پیش تعیین شده در امتداد مولکول DNA و قرار دادن مجدد آن‌ها به روشی تکرارپذیر می‌شد (آنزیم‌های محدود الاثر). این پیشرفت‌های ژنتیکی امکان استفاده از مهندسی ژنتیک در تولید داروهای جدید و آنتی بادی‌ها را فراهم کرد و از سال ۱۹۸۰، ژن‌درمانی توسط دانشمندان آغاز شد.

نخستین کارآزمایی بالینی موفق ژن‌درمانی در دهه ۱۹۹۰ میلادی برای درمان یک اختلال ژنتیکی ارثی به نام نقص ایمنی مرکب شدید[۲] انجام گرفت. این بیماری در نتیجه‌ی جهش ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی بدن، رخ می‌دهد. در سال‌های بعد تعداد کارآزمایی‌ها فزونی یافت. با این حال هنوز هم انتظارات از این شاخه از بیوتکنولوژی پزشکی برآورده نشده است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌ی حامل‌های انتقال ژن، امیدبخش تحقق رویای ژن درمانی در زمینه‌ی بیماری‌های وخیم و لاعلاج خواهد بود. درواقع ژن درمانی به‌عنوان راهکاری نوید بخش برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌هایی غیر از اختلالات نادر وراثتی و تک‌ژنی توجه بسیاری را به‌خود جلب کرده است. بدین منظور می‌بایست اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های هدف انسانی ارائه و بیان شود.

ژن‌درمانی، تکنیکی آزمایشگاهی بر مبنای استفاده از ژن‌ها برای درمان یا پیشگیری از بیماری هاست. ژن‌درمانی به عنوان امکانی برای بهبود ژن با استفاده از اصلاح ژن‌های تغییر یافته (جهش یافته) یا اصلاحات خاص در محل‌های خاص از ژنوم شناخته می‌شود که اهداف درمانی دارد. بدین منظور استراتژی‌های مختلفی برای دستیابی به این هدف تا به امروز

[1] Francis Crick
[۲] Severe combined immunodeficiency (SCID)

ایجاد شده است. انتظار می‌رود در آینده‌ای نزدیک، این تکنیک پزشکان را قادر سازد تا به جای استفاده از داروها و جراحی‌های متفاوت، از خود ژن‌ها برای درمان اختلالات ژنتیکی بهره بگیرند. در حال حاضر، ژن‌درمانی حوزه‌ای است که به طور عمده در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی انجام می‌شود و کاربرد آن در حال حاضر بیشتر پژوهشی است. بیشتر کارآزمایی‌های ژن‌درمانی در ایالات متحده، اروپا و استرالیا انجام می‌شود. محدوده فعالیت این روش از درمان بالقوه بیماری‌های ناشی از اختلالات ژن مغلوب (فیبروز کیستیک، هموفیلی، دیستروفی عضلانی و کم خونی سلول داسی شکل)، بیماری‌های ژنتیکی اکتسابی مانند سرطان و برخی از عفونت‌های ویروسی مانند ایدز گسترده است.

محققان تاکنون روش‌های مختلفی را برای به انجام رساندن فرآیند ژن‌درمانی آزموده‌اند؛ شامل:

۱) جایگزینی ژن جهش یافته‌ی عامل اختلال با رونوشت سالمی از همان ژن

۲) غیرفعال کردن یا به اصطلاح «از رده خارج کردن» ژن جهش یافته ای که عملکرد مناسبی ندارد

۳) ورود یک ژن جدید به بدن بیمار که بتواند در نهایت بر بیماری غلبه کند.

امروزه فرایند ژن‌درمانی نوید بخش درمان شماری از بیماری‌ها ازجمله اختلالات وراثتی، بعضی از انواع سرطان‌ها و برخی عفونت‌های ویروسی خاص است، با این وجود این تکنیک همچنان بی اشکال نیست و مطالعه بر روی آن همچنان ادامه دارد تا از بی خطر و کارآمد بودن آن اطمینان یابند. ژن درمانی در حال حاضر تنها برای بیماری‌هایی به کار برده شده که هیچ درمان دیگری برای آن‌ها در اختیار نداشته ایم.

پیش از هر اقدامی برای ژن درمانی، مجموعه‌ای از بررسی‌های دقیق و ظریف باید صورت گیرد تا زمینه‌ی مناسب برای انتقال موفقیت‌آمیز ژن فراهم آید. هر چند که بسته به نوع ژن و سلول هدف و مانند آن کم و بیش تفاوت‌ها و محدودیت‌هایی وجود دارد اما به طور کلی موارد زیر از جمله مهمترین اقدامات فرایند ژن درمانی به حساب می‌آیند:

الف) استخراج ژن یا ژن‌های مورد نظر

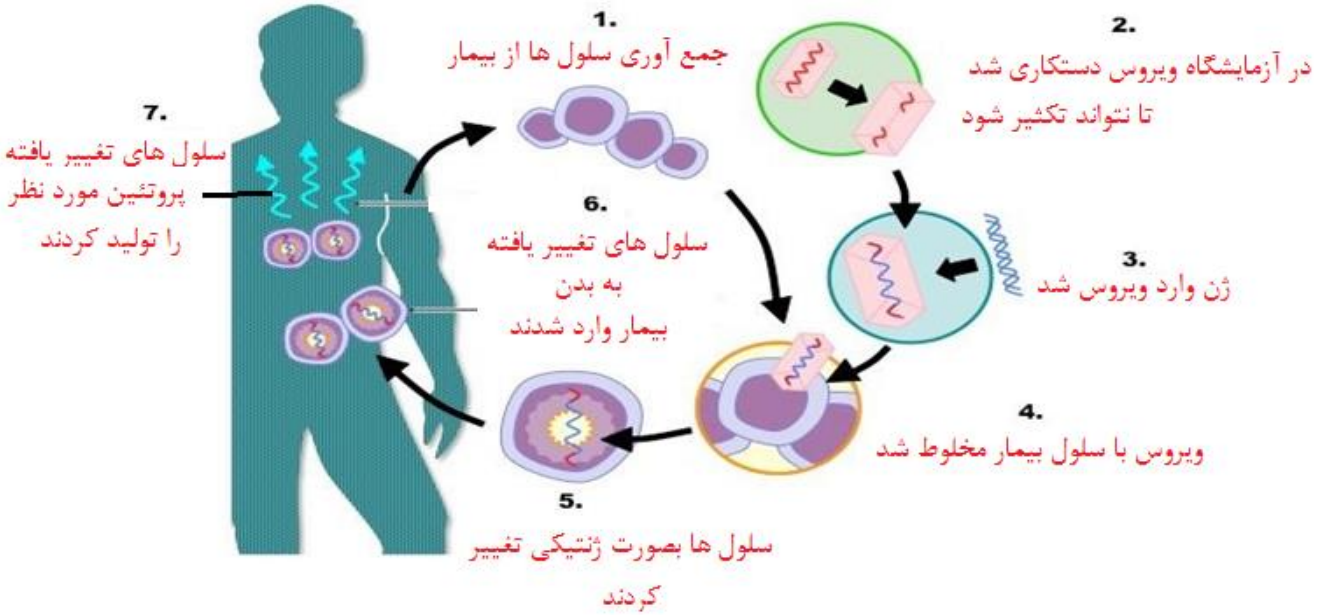
ب) تهیه و جمع آوری سلول‌های هدف مناسب و دارای صلاحیت

ج) آماده سازی ناقلین با کفایت و مطمئن جهت انتقال ژن یا DNA درمانگر به سلول هدف

د) دردسترس داشتن شواهد قوی و اطمینان بخش از تجارب حیوانی مبنی براینکه ژن انتقال یافته در سلول یا جمعیت سلولی هدف بتواند با بازدهی کافی بیان شود

ه) هرگونه خاصیت کشندگی و مخرب ژن انتقال یافته بر سلول‌های هدف باید بررسی شود

و) جمعیت سلول‌های هدف بعد از انتقال ژن، باید دارای طول عمر مناسب و قابلیت تقسیم باشند



شکل-۷۵ پیش از وارد کردن ژن موردنظر درون ماده‌ی ژنتیکی ویروس، ویروس را در آزمایشگاه دستکاری می‌کنند تا فاقد فعالیت‌های مضر برای بدن باشد

پیش از اینکه ژن درمانی بتواند به‌عنوان روشی مقبول جهت درمان بیماری‌ها عمومیت یابد، ابتدا نیاز است برخی از موانع داخل سلولی و خارج سلولی برطرف شود. درواقع در ژن‌درمانی، یک ژن طبیعی به ژنوم وارد می‌شود تا جایگزین ژن غیرطبیعی شود که عامل ایجاد یک بیماری خاص است. از میان چالش‌های مختلفی که در این فرآیند وجود دارد، یکی از مهمترین آن‌ها مشکل وارد کردن ژن در سلول بنیادی است. بنابراین، از یک حامل (ناقل) مولکولی به نام "وکتور" برای وارد کردن ژن به سلول استفاده می‌شود. این وکتور باید بسیار خاص باشد؛ بتواند یک یا چند ژن با ابعاد کافی برای کاربردهای بالینی را با خود حمل کند، توسط سیستم ایمنی بدن قابل تشخیص نباشد، و در مقادیر زیاد و غلظت زیاد خالص‌سازی شود تا بتوان آن را در مقیاس وسیع تولید کرد و در دسترس قرار داد. هنگامی‌که ناقل به بیمار وارد شود، نباید واکنش‌های آلرژیک یا روند التهابی را القا کند. باید عملکردهای طبیعی را افزایش دهد، کمبودها را اصلاح کند یا فعالیت‌های مضر را مهار کند. علاوه بر این، باید نه تنها برای بیمار، بلکه همچنین برای محیط و متخصصانی که آن را دستکاری می‌کنند، بی‌خطر باشد. سرانجام این ناقل باید قادر به بیان ژن، به طور کلی برای تمام مدت عمر زندگی بیمار باشد.

امروزه طیف وسیعی از حامل‌ها جهت انتقال ژن توسعه یافته‌اند. چندین وکتور ویروسی و غیرویروسی ایمن برای درمان موفقیت‌آمیز برخی بیماری‌های ارثی، نقص ایمنی، چشمی و سرطان ابداع و استفاده شده است. وکتورهای ویروسی برای ژن درمانیِ بیماری‌هایی که به بیان طولانی مدت ژن نیاز دارند مناسب است. چرا که ماده‌ی ژنتیکی ویروس می تواند به

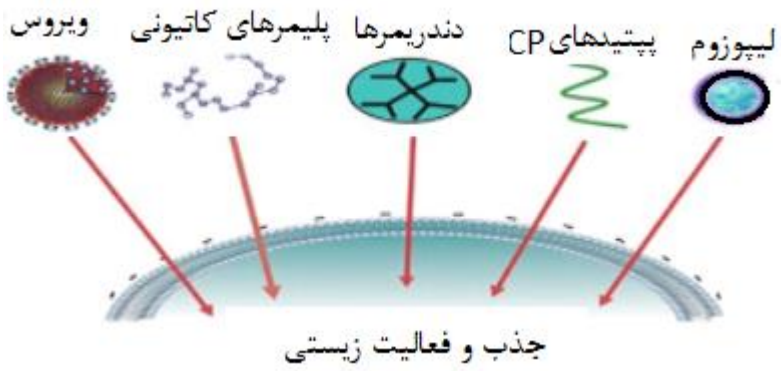
طور نهفته و طولانی مدت در سلول‌های ما تقسیم و بقا داشته باشد. اگرچه اثربخشی وکتورهای ویروسی بیشتر از غیر ویروسی‌هاست اما این وکتورهای ویروسی توانایی انتقال ژن‌های با طول کمتر را دارند.

ورود ژن مورد نظر به وکتور (ویروسی و یا غیرویروسی) با کمک فناوری DNA نوترکیب انجام می شود، که در آن ژن مورد علاقه یا ژن سالم در یک ناقل/حامل/وکتور، که می‌تواند یک پلاسمید، یک سازه نانویی و یا ویروس باشد قرار می‌گیرد. همانطور که در مبحث کلونینگ (توضیحات بیشتر در کتاب "مقدمه زیست فناوری") اشاره شد، پلاسمید یک مولکول DNA حلقوی است که ژن‌ها و سیستم همانندسازی مستقل از ژنوم اصلی دارد. اما ویروس‌ها به دلیل کارآیی در حمله به سلول‌ها و پتانسیل بالا در وارد کردن مواد ژنتیکی خود به ژنوم میزبان، بیشترین استفاده را دارند. به طور خلاصه باید گفت فرایند تولید یک DNA نوترکیب بدین صورت است که ابتدا باید با یک آنزیم خاص دو طرف قطعه‌ی ژنتیکی کدکننده‌ی محصول را برش بزنیم. سپس با همان آنزیم در محتوای ژنتیکی مقصد (ژنوم یا وکتور) نیز یک برش ایجاد می‌کنیم. به این نوع آنزیم‌ها، آنزیم‌های محدود الاثر می‌گویند. ویژگی این آنزیم‌ها این است که حین برش، یک قطعه‌ی تک رشته در محل برش ایجاد می کنند در نتیجه به دلیل استفاده از یک آنزیم مشترک، این قطعه‌ی تک رشته در ژنوم وکتور و قطعه‌ی ژنتیکی مورد نظر ما مشابه خواهد بود و اتصال برقرار می‌شود.

اگرچه تأثیر ناقلین ویروسی تأیید شده است، اما اخیراً برخی مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از این حامل‌ها با محدودیت های زیادی مواجه است. وجود ماده ژنتیکی ویروسی در وکتور می‌تواند اثرات نامطلوبی همچون ایجاد یک تغییر سرطان زا در ژنوم فرد میزبان و بروز پاسخ ایمنی حاد ایجاد کند. در حال حاضر، دو رویکرد اصلی برای اصلاحات ژنتیکی سلول‌ها وجود دارد: دستکاری بوسیله حامل‌های ویروسی و دیگری از طریق مکانیسم‌های فیزیکی که عمدتاً از تکنیک‌های پیشرفته فناوری نانو استفاده می‌شود. در این زمینه، پلیمرهایی وجود دارند که شبکه‌هایی را تشکیل می‌دهند و هنگام

نفوذ به سلول‌ها یک ژن را گرفته و آن را وارد سلول میزبان می‌کنند؛ مانند ریز تزریق DNA، پلیمرهای کاتیونی، لیپوزوم‌های کاتیونی و بمباران ذرات.

هر روشِ ارائه مواد خارجی به سلول، با روش دیگر متفاوت است و به نوع کاربرد پیشنهادی آن بستگی دارد. برخی از آن‌ها کارآیی بیشتری دارند، برخی دیگر برای حمل ژن‌های بزرگ (بیش از ۱۰ کیلوبایت) و ادغام با ژنوم مناسب‌تر هستند، و به این ترتیب یک بیان دائمی‌ایجاد می‌کنند.



شکل-۷۶ علاوه بر ویروس ها، ناقلین دیگری نیز می توانند کاندید مناسبی برای انتقال قطعه‌ی ژنی باشند. از جمله پلی‌مرهای کاتیونی و لیپوزوم‌ها (وزیکول‌های چربی).

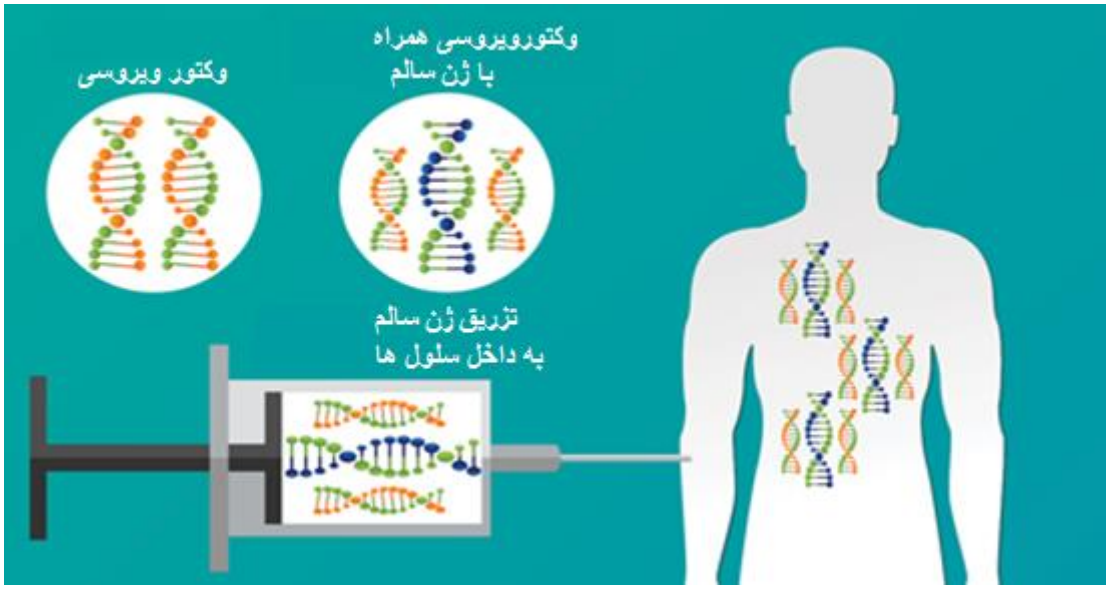
اگرچه چندین پروتکل موفقیت آمیز تا به امروز ایجاد شده است، ولی روند ژن‌درمانی همچنان پیچیده است و بسیاری از تکنیک‌ها نیاز به پیشرفت‌های بیشتری دارند. سلول‌های خاص بدن که نیاز به درمان دارند باید شناسایی و در دسترس باشند. روشی برای توزیع مؤثر کپی‌های ژن به سلول‌ها باید در دسترس باشد و بیماری‌ها و ارتباطات دقیق ژنتیکی آن‌ها باید کاملاً درک شود. همچنین یک مسئله مهم در ژن‌درمانی، نوع سلول هدف تحت درمان است. در حال حاضر سلول‌های

هدف درمان به دو گروه بزرگ تقسیم می‌شوند: ژن‌درمانی سلول‌های زایا (سلول‌های جنسی) و ژن‌درمانی سلول‌های سوماتیک (پیکری).

در ژن‌درمانی سلول‌های زاینده، به عنوان مثال اسپرم و تخمک، با معرفی ژن‌های عملکردی، که در ژنوم ادغام می‌شوند، اصلاح می‌شوند. این تغییرات ارثی است و به نسل‌های بعدی منتقل می‌شود. از نظر تئوری، این رویکرد باید در مبارزه با بیماری‌های ژنتیکی و ارثی بسیار موثر باشد. ژن‌درمانی سلول‌های سوماتیک زمانی است که ژن‌های درمانی به سلول‌های سوماتیک بیمار منتقل می‌شوند. هر گونه اصلاح و هرگونه اثر، فقط به بیمار محدود می‌شود و توسط نسل‌های بعدی به ارث نمی‌رسد.

تاکنون بیماری‌های صعب العلاجی کاندید درمان با ژن درمانی بوده اند. همانطور که گفته شد تعریف پایه و اولیه‌ی ژن درمانی، ورود مستقیم ژن به سلول‌های انسانی، با تمرکز بر بیماری‌هایی است که در اثر نقص در یک ژن به وجود آمده اند؛ مانند سیستیک فیبروزیس، دستروفی عضلانی و کم خونی داسی شکل. به طور کلی سه گروه مختلف از بیماری‌ها با ژن درمانی قابل درمان هستند:

* اختلالات تک ژنی که در آن‌ها تنها یک جایگاه (لوکوس) ژنی مسئول پیدایش بیماری بوده و از نسلی به نسل بعد قابل انتقال است؛ شامل کم خونی داسی شکل، نقص ایمنی مرکب شدید، سیستیک فیبروزیس، هموفیلی، دیستروفی عضلانی دوشن، بیماری هانتینگتون، پارکینسون، گرانولوماتوز مزمن، آنمی فانکونی، بیماری گوشه (Gaucher's disease).



شکل-۷۷ بیماران مبتلا به هموفیلی دچار مشکل در انعقاد خون هستند. با جایگزینی ژن سالم در این افراد می‌توان این بیماری را درمان کرد.

* اختلالات چند ژنی که چندین ژن در شکل گیری آن دخیل اند. فاکتورهای دیگری همچون سبک زندگی و عوامل محیطی نیز ممکن است بر این بیماری تاثیرگذار باشند. بیماری‌هایی نظیر بیماری‌های قلبی، سرطان، دیابت، شیزوفرنی و آلزایمر.

* بیماری‌های عفونی مانند HIV.

ورود ژن‌های درمانگر به درون ژنوم، ممکن است بتواند نقص ژنتیکی را دست کم به سه روش اصلاح کند: فرود تصادفی نسخه ژن طبیعی به سلول هدف، فرود اختصاصی (هدف گیری شده) یا ترکیبی از هر دو. درنهایت با وارد کردن اختصاصی ژن درمانگر ژن معیوب را می توان اصلاح کرد، یا با ژن سالم جایگزین کرد، یا اینکه با تعدیل عناصر تنظیمی سرانجام آن را به حالت طبیعی برگرداند.

ژن‌درمانی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPS)

در مباحث بعدی که مربوط به سلول درمانی است، سلول های بنیادی به تفسیر بیان خواهد شد. سلول‌های بنیادی، سلول های تمایز نیافته ای هستند که به دلیل طول عمر بالا و ظرفیت بازسازی قابل توجه خود، به هدفی ایده آل برای انتقال ژن تبدیل شده‌اند. با کمک وکتورهای انتقال دهنده ژن هایی که منجر به ایجاد سلول بنیادی می شوند، از سلول های تمایز یافته سلول های تمایز نیافته بنیادی به دست آوردند. این یک نمونه از ترکیب ژن‌درمانی و سلول‌های بنیادی می باشد. این سلول های بنیادی به نام سلول های بنیادی پرتوان القایی[1] نامیده شدند. در ادامه با کمک اصلاحات ژنتیکی در iPS تمایز ایجاد شد و یک فنوتیپ جدید در سلول‌های تمایز یافته مشتق شده از iPSها به دست آمد. بیماران مبتلا به بیماری مزمن کبدی و عفونت توسط ویروس هپاتیت (به عنوان مثال، ویروس هپاتیت B و ویروس هپاتیت C)، که نیاز به پیوند کبد دارند، احتمالاً برای درمان، تحت پیوند کبدی سلول‌های کبدی بالغ یا سلول‌هایی که از iPS گرفته شده‌اند، قرار می‌گیرند. نه تنها انتقال ژن‌ها برای تبدیل سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی ممکن است لازم باشد، بلکه از آنجایی که سلول‌های پیوند شده در معرض عفونت مجدد توسط ویروس هپاتیت هستند، انتقال ناقلی که RNA سنجاق سری کوتاه[2] را بر علیه ویروس رمزگذاری می‌کند، می‌تواند سلول‌ها را نسبت به عفونت مجدد ویروسی مقاوم کند. سلول‌های مقاوم می‌توانند به مرور زمان کبد را بازیابی کنند و عملکرد طبیعی آن را برگردانند.

[1] induced Pluripotent Stem (iPS)
[2] short hairpin

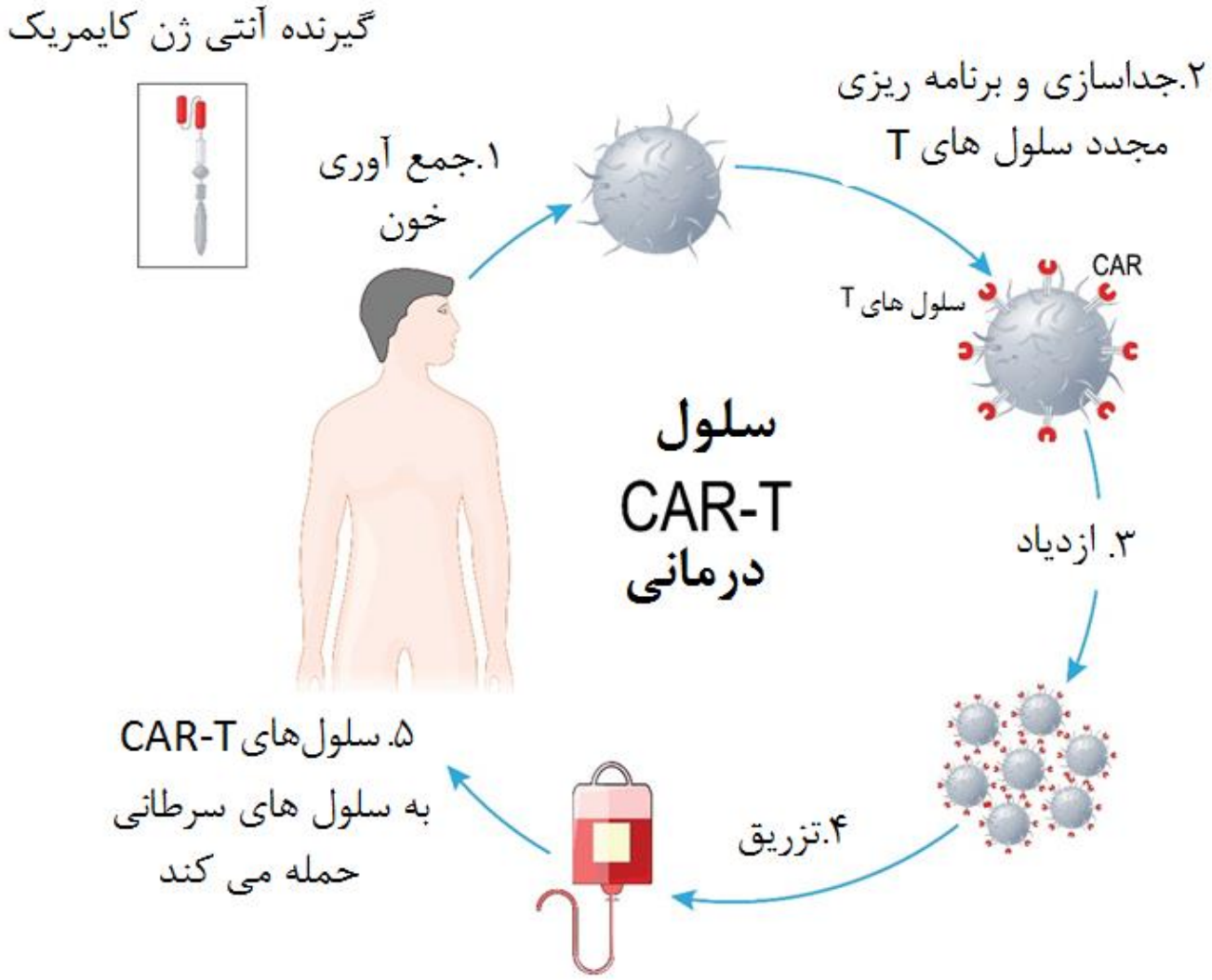
درمان با سلول‌های T دارای گیرنده آنتی ژن کایمریک (CAR-T cell[1])

پروتئین های کایمریک، پروتئین هایی هستند که از اتصال دو یا چند ژن (پروتئین) ایجاد می شوند که در اصل این ژن ها بطور جداگانه برای پروتئین های جداگانه ای کدگذاری شده اند. در اینجا نیز گیرنده‌های کایمریک، گیرنده‌های مهندسی ژنتیک شده حاوی ۱. محل اتصال اختصاصی آنتی‌ژن توموری (توسط ژن های نوترکیب ناحیه متغیر ایمنوگلوبولین (آنتی‌بادی) کد می‌شوند)، ۲. ناحیه عبور کننده از غشا (تراغشایی)، ۳. دم سیتوپلاسمی (حاوی دُمین‌های سیگنال‌دهی) هستند.

سلول‌درمانی با سلول‌های T دارای این گیرنده آنتی ژن توموری که بصورت کایمریک است (یا به اصطلاح گیرنده آنتی ژن کایمریک)، نوعی ایمنی‌درمانی است که شامل دستکاری/ برنامه ریزی مجدد سلول‌های ایمنی (لنفوسیت‌های T) خود بیماران، به منظور شناسایی و حمله به سلول‌های توموری می‌شود. این روش درمانی نوعی سلول درمانی همراه با ژن درمانی است. سلول‌های T فرد بیمار گرفته شده و سپس این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه با وکتور (غالبا ویروسی) که حاوی ژن کدکننده گیرنده آنتی ژن کایمریک است، دست‌ورزی شده به طوری که گیرنده آنتی ژن کایمریک در سطح آن‌ها بیان می شود. سپس این سلول ها به فرد بیمار مجدد بازگردانده می شوند. سلول‌های T دارای گیرنده آنتی ژن کایمریک انقلابی در درمان بود به طوری که اولین سلول درمانی همراه با ژن درمانی مورد تایید سازمان غذا و دارو (FDA) که برای ورود به بازار مجوز گرفت در سال ۲۰۱۷ بود که برای CAR-T cell بود. نام تجاری آن داروی Kymriah می باشد و برای درمان سرطان "لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL)" است.

[1] Chimeric antigen receptor T cell

در طراحی ژن CAR پیشرفت هایی انجام شده است. در واقع پیشرفت ها شامل طراحی های بهینه تر برای توالی ژن CAR بوده است که به اصطلاح نسل های CAR نامیده می شوند. پیشرفت اولیه در طراحی اولین نسل گیرنده آنتی ژن کایمریک یا CAR، توسط Eshhar و همکاران انجام شد. در این طراحی از یک قطعه کوچک بخش متغیر آنتی بادی (scFv) و یک قطعه پیام دهی داخل سلولی (زنجیره CD3 zeta) استفاده شد. از آنجایی که در این طراحی ترکیب بخش فعال یک آنتی بادی مونوکلونال کاملاً شناخته شده با یک قطعه پیام دهی به کاربرده شد، دیگر سلول T حاصل به مولکول‌های پیچیده سازگاری بافتی وابسته نبود. درنتیجه شانس شناسایی اپی‌توپ‌های خاص تومور و فعال شدن سلول‌های T افزایش می‌یافت. سپس در نسل اول CAR بهبودهایی حاصل شد. درواقع گیرنده تحریک کننده (در این نسل از CAR، غالبا نوع CD28 بکار رفت) به عنوان دومین عامل فعال کننده مسیر پیام دهی عمل می‌کند و تکثیر سلول‌های T را همراه با افزایش بیان سایتوکین‌ها امکان پذیر می‌کند. با اینکار، یکپارچه‌سازی مولکول‌های تحریک کننده لازم برای هدایت پیام، انجام شد.



شکل-۷۸ نحوه تولید و درمان با سلول‌های T دارای گیرنده آنتی ژن کایمریک (CAR-T cell)

جدیدترین نسل CAR علاوه بر این، زیرواحدی نیز برای افزایش عملکرد CAR دارد. مولکول‌های محرک ازنوع "گیرنده فاکتور نکروز تومور (CD134 یا CD137)" برای این کار مورد نیاز است. به طور خلاصه، جدیدترین اشکال CAR شامل scFv، زنجیره زتای CD3 (CD3ζ)، همراه با زنجیره‌های تحریک CD28 و CD134 یا CD137 است. با نسل سوم CAR، Zhong و همکاران، توانستند فعال شدن سلول T در مسیر Akt (پروتئین کیناز B) که چرخه سلولی را تنظیم می‌کند

بهبود بخشند. طبق مطالعات دیگر، این نسل آخر منجر به ماندگاری بیشتر سلول‌های T در مقایسه با نسل دوم CAR می‌شود.

مهمترین عارضه جانبی CAR-T cell درمانی، شناسایی سلول‌های غیر توموری است که اپی‌توپ هدف را بیان می‌کنند. آنتی ژن‌های توموری مولکول‌هایی هستند که در سلول‌های توموری بسیار بیان می‌شوند، اما منحصر به این سلول‌ها نیستند. به عنوان مثال، آنتی ژن CD19 را می‌توان در سلول‌های B طبیعی یا بدخیم یافت، و طراحی CAR علیه CD19 قادر به تشخیص آن‌ها نیست. مشکل دیگر درمان CAR-T cell (و بسیاری از انواع دیگر ایمنی‌درمانی برای سرطان) سندرم رهایش سایتوکین (CRS) است. فعال شدن سیستم ایمنی بدن پس از تزریق سلول CAR-T می‌تواند باعث افزایش سریع سطح سایتوکاین‌های التهابی شود.

تحولات جدید در طراحی وکتورها و کارآزمایی CAR-T، تعادل و تقویت ایمنی برای تقویت کاربردهای بالینی را فراهم می‌کند. همانطور که مشاهده کردید از نسل اول تا نسل سوم CARها پیشرفت‌هایی تدریجی حاصل شده است. دانش و تجربه به دست آمده در ارزیابی سمیت CAR-T موفقیت پیشرفت‌های تدریجی را برای آزمایش‌های آینده افزایش می‌دهد.

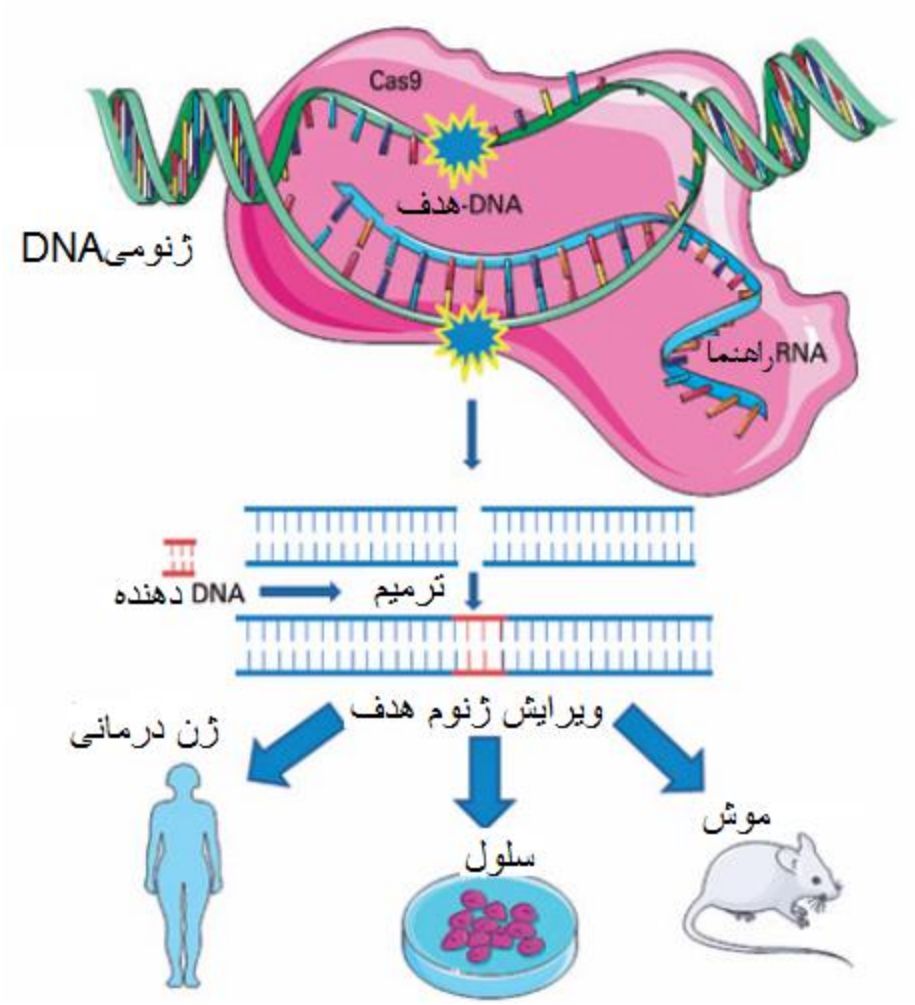
ویرایش ژنومی توسط روش CRISPR-Cas9

در طی دهه ۱۹۸۰، در ژنوم باکتری ا. کلای، منطقه‌ای با الگوی غیرمعمول شناسایی شد که در آن یک توالی بسیار متغیر با یک توالی تکراری و بدون عملکرد شناخته شده جایگزین می‌شد. در سال ۲۰۰۵، فرض بر این بود که توالی‌های متغیر، منشأ خارج کروموزومی‌دارند و به عنوان یک حافظه ایمنی در برابر فاژها و پلاسمیدها عمل می‌کنند و سیستم

کریسپر (مخفف عبارت تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای منظم[1]) و Cas (پروتئین‌های وابسته به آن) را راه می-اندازند. از سال ۲۰۱۲ از این سیستم به عنوان یکی از ابزارهای اولیه بیوتکنولوژی برای دست‌ورزی ژن یاد می‌شود. این مکانیسم که از سیستم تطبیق با شرایط در سیستم ایمنی پروکاریوت‌ها سرچشمه می‌گیرد، ماده ژنتیکی مهاجم را تشخیص داده، آن را به قطعات کوچک می‌شکند و در DNA خود ادغام می‌کند. در عفونت ثانویه توسط همان عامل، مراحل زیر اتفاق می‌افتد: رونویسی از محل کریسپر انجام می شود. رونویسی به پردازش mRNA و ایجاد قطعات کوچک RNA (crRNA ها) ختم می شود. این قطعات کوچک با پروتئین‌های Cas کمپلکس‌هایی تشکیل می‌دهند. این کمپلکس‌ها با اسیدهای نوکلئیک بیگانه که در عفونت ثانویه وارد باکتری شده اند جفت شده (DNA دو رشته‌ای) و توالی بیگانه را تشخیص می‌دهند. در نهایت باعث تخریب و نابودی این توالی های بیگانه می‌شوند.

بر اساس این مکانیسم طبیعی، یعنی تکنیک کریسپر امکان ویرایش توالی مشخصی از DNA ژنوم هر ارگانیسم را در ژن درمانی/سلول درمانی خواهد داشت. اینکار با استفاده از سه مولکول فراهم می‌شود: نوکلئاز (Cas9): مسئول تجزیه DNA دو رشته‌ای. یک RNA راهنما: که مجموعه را به سمت هدف هدایت می‌کند و DNA هدف، همانطور که در شکل-۷۹ نشان داده شده است. درواقع در این حالت RNA راهنما با DNA هدف هیبرید می‌شود. Cas-9 این کمپلکس را تشخیص می‌دهد، شروع به تجزیه رشته دوتایی DNA کرده و درنهایت جایگزینی DNA دهنده رخ می دهد. نتیجه این فرآیند ادغام یک توالی خارجی در ژنوم (ناک‌این[2] کردن ژن) یا جایگزینی آلل است.

[1] clustered regularly interspaced short palindromic repeats
[2] knock-in



شکل-۷۹ ویرایش ژنومی توسط روش CRISPR-Cas9

با توجه به سادگی و دقت آن در مقایسه با سایر تکنیک‌ها (نوکلئازهای انگشت روی[1]، TALEN[2]ها و هدفگیری ژن ها)، از سیستم کریسپر به عنوان ابزاری همه کاره برای ویرایش ژنتیکی یاد می‌شود بطوری که ویرایش ژنتیکی را با غیرفعال سازی ژن (ناک‌اوت کردن ژن[3])، ادغام توالی‌های خارجی در ژنوم اصلی و جایگزینی آلل، انجام می دهد.

[1] zinc finger
[2] Transcription Activator-Like Effector Nucleases
[3] knockout gene

پیشرفت سریع این فناوری جدید، امکان انجام کارآزمایی‌های بالینی با استفاده از ویرایش ژنتیکی توسط کریسپر در سلول‌های سوماتیک انسان فراهم کرد. محققان دانشگاه کالیفرنیا و یوتا اخیراً در اصلاح جهش ژن هموگلوبین، که منجر به کم خونی سلول داسی شکل می‌شود، به موفقیت‌هایی دست پیدا کردند. سلول‌های CD34 + (سلول‌ها بنیادی خونساز) از بیمارانی که ناقل کم خونی سلول داسی شکل هستند جدا شده و توسط CRISPR-Cas9 ویرایش شد و پس از ۱۶ هفته، کاهش میزان بیان ژن جهش یافته و افزایش بیان ژن از نوع طبیعی مشاهده شد. فناوری مورد اشاره عمدتاً در درمان آسیب‌های ژنتیکی تک ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد، که علی رغم نادر بودن، می‌توانند به حدود ۱۰ هزار بیماری که قبلاً شناسایی شده‌اند، منتج شوند.

مباحث اخلاقی اصلاح ژنتیکی

مدت‌هاست که امکان اصلاح ژنتیکی سلول‌های زایا بحث داغ محافل علمی‌بوده است. اخلاق زیستی همیشه در هنگام ایجاد تکنیک‌های جدید حضور دارد تا خطرات این روش و پیامدهای اخلاقی آن را ارزیابی کند. بخش بزرگی از جامعه علمی، درمان ژنتیکی را در سلول‌های سوماتیک، به ویژه در موارد اختلالات شدید، مانند فیبروز کیستیک و دیستروفی عضلانی دوشن، می‌پذیرند و تایید می‌کنند.

در سال ۲۰۱۵، محققان چینی فراتر از مباحث اخلاقی رفتند و برای اولین بار اصلاح ژنتیکی سلول‌های جنینی را با استفاده از تکنیک CRISPR-Cas9 اعلام کردند. در مرحله بعد، یک گروه چینی دیگر نیز انجام همان فرآیند را با هدف ایجاد مقاومت در برابر HIV به وسیله ایجاد جهش در ژن CCR5 گزارش کردند. تجزیه و تحلیل ژنتیکی نشان داد که

۴ جنین از ۲۶ جنین مورد بررسی با موفقیت اصلاح شده‌اند. نتیجه به دست آمده به وضوح، نیاز به بهبود این روش را نشان می‌دهد و از طرفی هشدار می‌دهد که احتمالاً چنین آزمایشاتی قبلاً در مدل‌های حیوانی نیز انجام شده است.

انتشار این مطالب بحث در مورد ویرایش ژن را دوباره زنده کرد. از یک طرف، کمیته اخلاق ژاپن اعلام کرد که نحوه انجام آزمایش صحیح است، زیرا کمیته اخلاق مطالعه انجام شده را تایید می‌کند و همچنین موافقت اهداکنندگان سلول تخم نیز پیش از انجام آزمایش دریافت شده است. در انگلستان، اولین پروژه برای ویرایش جنین انسان تصویب شد. از طرف دیگر، گروه‌های تحقیقاتی آمریکایی محافظه کار باقی ماندند، موضع خود را در مورد عدم حمایت از این نوع آزمایش تکرار کردند و اعلام کردند که منتظر بهبود تکنیک‌ها و تعاریف مباحث اخلاقی هستند.

از زمان اشاره جیمز واتسون در سال ۱۹۹۱ به بهینه‌سازی احتمالی ژنتیک انسانی، ژن‌درمانی در طول دهه‌ها پیشرفت کرده است، چه با بهینه سازی انواع ناقلین، چه با معرفی تکنیک‌های جدید، مانند کار بر روی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی بوسیله مدل‌های فعلی ویرایش ژنتیکی (CRISPR-Cas9) و چه حتی آزمایشات بر روی سلول‌های زایا، همگی جنبه‌های اخلاقی متناقضی را که با این روش همراه است، به همراه خود آورده‌اند.

در حال حاضر موفقیت‌های مختلف باعث تداوم حیات درمان‌ها با استفاده از ژن‌درمانی به عنوان یک شکل جایگزین برای بیماران مبتلا به بیماری‌های مادرزادی یا اختلالات تک ژنی و سرطان، به ویژه هنگامی‌که مداخلات دارویی یا جراحی نتایج خوبی نشان ندهند، شده است. طراحی وکتورهای آزمایشی جدید، افزایش کارایی و اختصاصیت سیستم‌های تحویل و درک بیشتر از نحوه القای پاسخ التهابی ممکن است با توسعه روش‌های مورد استفاده در کاربردهای بالینی، منجر به بهبود ایمنی استفاده از این روش‌ها شود. با این وجود دانش و تجربیاتی که با ارزیابی دقیق سمیت این فناوری‌ها به دست آمده است، در استفاده از این روش‌ها نیز پیشرفت‌های چشمگیری را ایجاد می‌کند. بنابراین، از نظر تاریخی،

ژن‌درمانی و کشف آنتی بیوتیک‌ها و عوامل شیمی‌درمانی و یا هر فناوری جدیدی، به مطالعات پیش بالینی واضح تری نیاز دارد. در آینده، نوید استفاده از این روش‌ها در چندین حوزه پزشکی و درصد بیشتری از آزمایشات بالینی وجود دارد.

وضعیت حال حاضر ایران در ژن درمانی

پزشکان معتقدند ۲۰ ـ۵۰ سال آینده، دیگر دارودرمانی جواب نخواهد داد؛ سلول‌درمانی و ژن‌درمانی یا پزشکی شخصی آینده‌ی پزشکی را متحول می‌کند. دکتر منصوره موحدین رئیس شاخه سلول‌های بنیادی انجمن ژنتیک ایران و استاد تمام دانشگاه تربیت مدرس درباره‌ی وضعیت ژن‌درمانی در ایران می گوید: «در هر کشوری یک نوع بیماری اولویت دارد و الگوی ژنتیکی همان بیماری در حال بررسی است تا با ژن درمانی درمان شود. در ایران نیز به دلیل بروز انواع سرطان‌ها به خصوص سرطان پستان، این بیماری در اولویت است تا با بیومارکرها بتوان سرطان را در کشور درمان کرد. در واقع می توان گفت خط اول سرطان در کشور سرطان پستان است. شخصی سازی درمان سرطان برای اولین بار است که در کشور ما انجام می‌شود و در سال‌های اخیر اقدامات مربوط به آن آغاز شده‌اند. ژن درمانی به قدری داروسازی را متحول می‌کند که به جای تولید کپسول، آمپول، قرص و شربت، سلول تولید می کند؛ این موضوع در صنعت داروسازی تاثیر گذار است. در واقع دارو تولید می‌شود ولی نوع دارو متفاوت می‌شود.»

شکل-۸۰ داروهای ژنی، داروسازی را متحول خواهند کرد

۲-۲) سلول درمانی

مرز بین سلول درمانی و ژن درمانی به یکدیگر بسیار نزدیک است. بطوریکه سلول درمانی می تواند همراه یا بدون همراهی ژن درمانی انجام شود. انواع حالات مختلف سلول‌درمانی را می توان بصورت زیر دسته بندی کرد:

- پیوند سلول‌های بالغ و عملکردی؛
- استفاده از سلول‌های انسانی دستکاری شده به منظور تولید ترکیبات مورد نیاز؛
- پیوند سلول بنیادی بصورت اتولوگ (از خود بیمار) و یا آلوژنیک (از یک فرد دهنده)؛

- پیوند بیگانه[1] از سلول‌های غیر انسانی برای تولید مواد مورد نیاز. به عنوان مثال، درمان بیماران مبتلا به دیابت با وارد کردن سلول‌های خوکی مولد انسولین به طور مستقیم در عضله آن‌ها؛

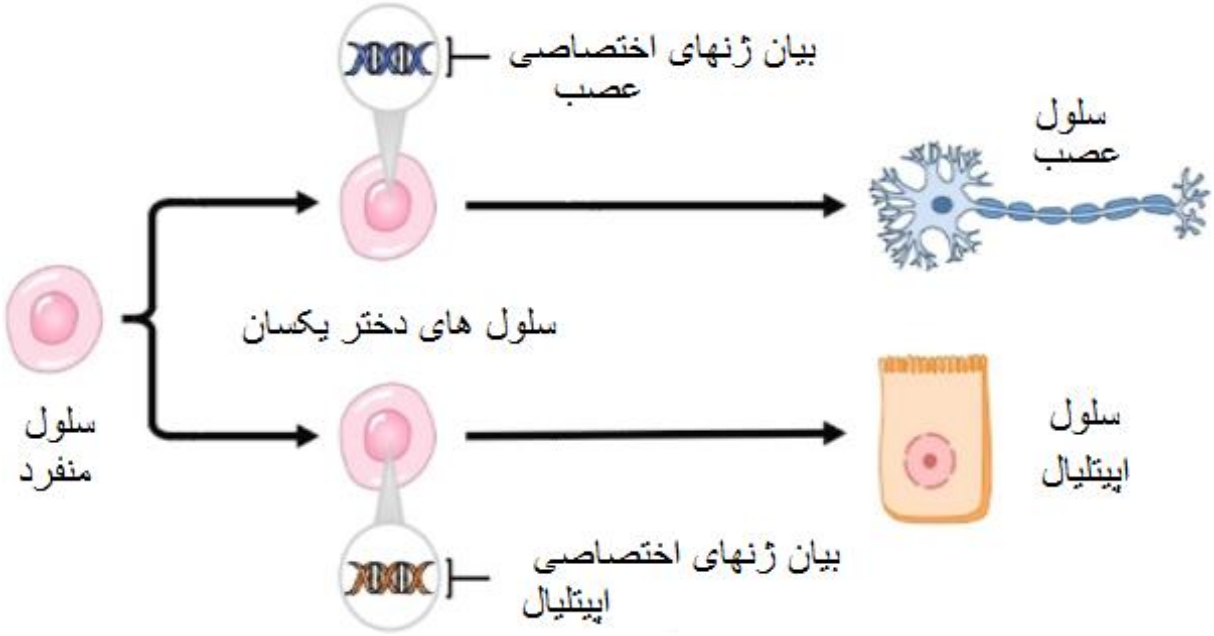
در مباحث گذشته به سلول درمانی و ژن درمانی اشاره کردیم. تا اینجا به تفصیل سلول درمانی با تمرکز بر ژن درمانی توضیح داده شد. درباره سلول درمانی گفتیم که این سلول ها می توانند سلول های بالغ و تمایز یافته و یا سلول های تمایز نیافته باشند. حوزه ای که درباره سلول های تمایز نیافته مطرح می شود بنام سلول های بنیادی خوانده می شود.

سلول های بنیادی

همه ما می‌دانیم که کوچکترین واحد عملکردی زنده در بدن ما، سلول بوده و هر سلول در عین استقلال با سلول‌های دیگر نیز در ارتباط است. در هر جاندار پرسلولی، به مجموعه‌ی سلول‌های بدن به جز سلول‌های جنسی (گامت)، سلول‌های سوماتیک می‌گویند. همینطور می دانیم که انواع مختلفی از سلول‌ها در بدن ما مشغول فعالیت هستند؛ سلول‌هایی که اگرچه در ویژگی‌های ساختاری و عملکردی بسیار با هم متفاوت اند، اما همگی دارای ماده‌ی ژنتیکی یکسانی هستند. به عبارت دیگر به جز موارد خاص (مانند گلبول‌های قرمز که فاقد هسته‌اند یا گامت‌ها که فاقد کروموزوم‌های همتا هستند) همه‌ی سلول‌های بدن ما از نظر ژنتیکی کاملا مشابه بوده و ۴۶ عدد کروموزوم دارند. حال این سوال پیش می‌آید که این همه تفاوت در ساختار و عملکرد سلول‌ها با وجود ژنتیک یکسان، از کجا نشات می‌گیرد؟

[1] xenotransplantation

برای پاسخ به این سوال لازم است نگاهی به ارتباط بین ژن و پروتئین بیندازیم. همانطور که در مبحث ژنتیک گفته شد، پروتئین محصول بیان ژن است. از طرفی پروتئین‌ها مهمترین نقش‌ها را در سلول برعهده دارند و در واقع به سلول جهت می دهند. پس می توان نتیجه گرفت آن چیزی که منجر به تفاوت و تمایز سلول‌ها می شود در واقع بیان ژن‌های آن‌هاست. به‌طور مثال در شکل ۶۹، دو سلول خواهری با محتوای ژنتیکی کاملاً یکسان در سمت چپ تصویر می‌بینید. در پی بیان ژن‌های مخصوص هر نوع سلول، ویژگی‌های سلول به‌کلی تغییر می‌کند. به‌عبارتی شکل، اندازه، سازوکار و کلیه‌ی ویژگی‌های سلول در گرو بیان ژن‌هایش است که سلول را در جهت انجام وظایفش کمک می‌کند.



شکل – ۸۱ در بالا یک سلول عصبی (نورون) را می‌بینید که در پی بیان ژن‌های مخصوص سلول‌های عصبی، شکل کاملاً متفاوتی پیدا کرده‌است. در پایین تصویر، یک سلول پوششی (مثلاً سلول پوست) را می‌بینید که ساختاری متناسب با عملکردش دارد.

سلول‌های بنیادی، سلول‌های مبنا و بنیان همه‌ی اندام‌ها و بافت‌ها در بدن ما هستند. منشأ سلول‌های تخصص یافته ای که در نهایت این بافت‌ها را شکل می دهند، انباری از سلول‌های بنیادی است که تنها کمی پس از لقاح، به وجود می آیند. همه‌ی ما در طول زندگی خود برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده و سلول‌های از دست رفته، به سلول‌های بنیادی متکی هستیم؛ مانند سلول‌های پوست، مو، خون و دیواره‌ی روده.

سلول‌های بنیادی سلول‌های تخصص نیافته ای هستند که شکل هیچ یک از سلول‌های بافت‌های بدن را به خود نگرفته‌اند. در واقع ژن‌های اختصاصی مربوط به هیچ یک از انواع سلول‌ها در سلول‌های بنیادی بیان نشده‌اند. این خاصیت به آن‌ها این امکان را می‌دهد که تحت شرایطی، ساختار و عملکرد خاص و تخصص یافته ای پیدا کنند، بنابراین توانایی قابل توجهی در تبدیل شدن به انواع سلول‌های مختلف بدن دارند. علاوه بر این، در بسیاری از بافت‌ها به عنوان سیستم ترمیمی داخلی عمل کرده و با تقسیمات متوالی جای سلول‌های دیگر را مادامی که فرد زنده است، پر می کنند. هنگامی که یک سلول بنیادی تقسیم می شود هر یک از سلول‌های حاصل تقسیم توانایی حفظ ماهیت خود به عنوان یک سلول بنیادی و یا تبدیل شدن به نوع دیگری از سلول‌ها با وظایف تخصص یافته تری را دارند؛ مانند سلول‌های ماهیچه ای، گلبول‌های قرمز و یا سلول‌های مغز.

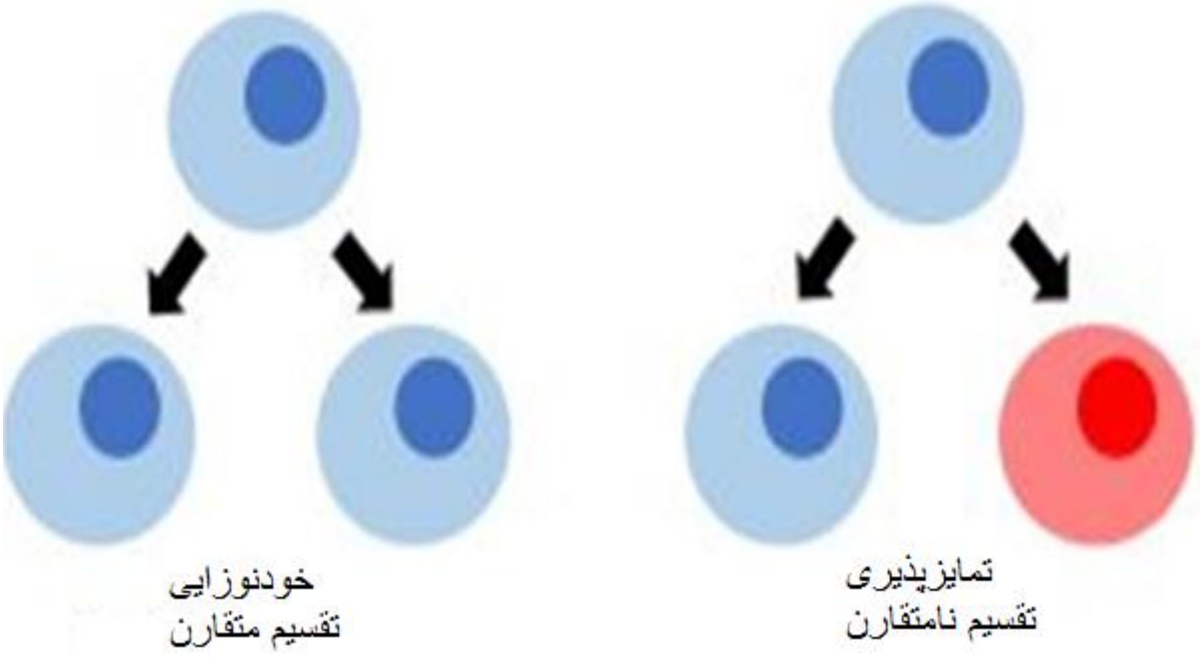
وجه تمایز سلول‌های بنیادی با سایر سلول‌ها داشتن دو ویژگی منحصر به فرد است:

۱. خودنوزایی: این سلول‌ها تخصص نیافته بوده و توانایی خودنوزایی با تقسیم سلولی را دارند، حتی در صورتی که مدت زمان زیادی غیرفعال باشند. به این صورت که آن‌ها را قادر می سازد طی فرایند تقسیم کپی‌هایی دقیقاً مشابه خود را به وجود آورند.

شکل-۸۲ بسیاری از متخصصان و دانشمندان درباره‌ی پتانسیل سلول‌های بنیادی بر این باورند که این سلول‌ها نقش بسیار مهمی در درمان بیماری‌ها تا چند دهه‌ی آینده خواهند داشت.

خودنوزایی فرایندی است که طی آن سلول‌های بنیادی به منظور تولید سلول‌های بنیادی جدید تقسیم می شوند. بدین ترتیب سلول بنیادی قادر است خود را برای مدت طولانی بازتولید کند و سلول‌های حاصل این تقسیمات مانند سلول مادر فاقد تمایز بوده و غیر اختصاصی‌اند.

این سلول‌ها توانایی تکثیر و تقسیم مداوم داشته و از این نظر محدودیتی ندارند. این تقسیمات و در واقع غیر اختصاصی «ماندن» سلول‌های حاصل تقسیم در گرو عوامل کنترل‌کننده‌ی چرخه‌ی سلولی است. مکانیسم‌های درون سلولی با تغییر در پیغام‌های برون سلولی مرتبط با محیط زندگی سلول تنظیم می شوند؛ محیط زندگی سلول همان ریزمحیطی است که سلول‌های بنیادی را در برگرفته و تنظیم‌کننده‌ی نقش آن‌ها در بافت است. در پاسخ به هر گونه تغییر در نیازهای بافت، سلول‌های بنیادی متحمل تغییراتی در چرخه‌ی سلولی خود می شوند، به نحوی که برنامه‌ی خودنوزایی متفاوتی را در طول زندگی خود تجربه می‌کنند. سلول‌های حاصل این گونه تقسیم دیگر همه‌ی ویژگی‌های سلول مادر را نخواهد داشت.

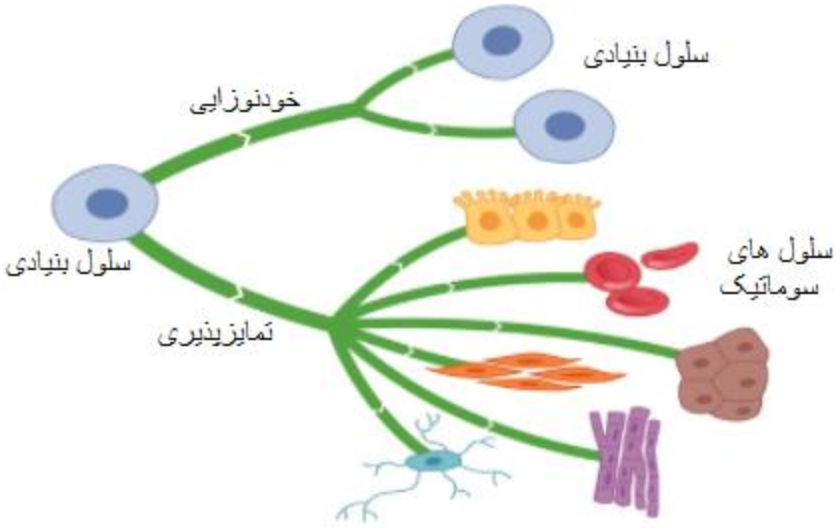


شکل-۸۳ در سمت چپ تصویر، یک سلول بنیادی را می‌بینیم که بصورت معمول تقسیم شده و دو سلول بنیادی کاملاً یکسان ایجاد کرده‌است. در سمت راست، تقسیم سلول بنیادی به‌طور متقارن و معمول انجام نشده و سلول‌های حاصل متفاوت اند. یکی از سلول‌ها دچار فرآیند تمایز شده که در ادامه با آن آشنا می‌شویم.

سلول‌های بنیادی در بعضی از اندام‌ها مانند روده و مغز استخوان با تقسیمات مداوم جایگزین بافت‌های فرسوده و از دست رفته شده، آن‌ها را ترمیم می کنند. اما در سایر اندام ها، همچون پانکراس و قلب، سلول‌های بنیادی در شرایط خاصی تقسیم می شوند.

۲. قابلیت تمایز: در شرایط خاص فیزیولوژیک یا شرایط آزمایشگاهی، می‌توان این سلول‌ها را در جهت تبدیل شدن به سلول‌های متعلق به یک بافت و یا اندام با وظایف خاص تحریک کرد. این توانایی منجر به پیدایش انواع بالغی از سلول‌ها می‌شود که در نهایت بافت‌ها و اندام‌های ما را به وجود می آورند.

سلول بنیادی مادر تمام سلول‌ها است و توانایی تبدیل شدن به تمام سلول‌های بدن را دارد. به فرایندی که طی آن سلول بنیادی تخصص نیافته به سلول تخصص یافته تبدیل می شود، تمایز می گویند. سلول معمولاً چندین مرحله را حین فرایند تمایز طی می‌کند و در هر مرحله تخصصی تر می شود. پژوهشگران اخیراً شروع به بررسی سیگنال های (پیام های) درون سلولی و خارج سلولی دخیل در شروع این فرایند کرده اند، پیام هایی که هر یک از مراحل تمایز را راه اندازی می کنند. سیگنال‌های درونی تحت کنترل ژن‌های هر سلول هستند، قطعاتی از DNA که مجموعه‌ی اطلاعات مربوط به ساختار و عملکرد هر سلول در آن‌ها دخیره شده است (مانند یک کارت حافظه). سیگنال‌های خارج سلولی برای راه اندازی تمایز، شامل مولکول‌های شیمیایی ترشح شده از سایر سلول ها، برخورد فیزیکی با سلول‌های همسایه و مولکول‌های خاصی است که در محیط اطراف سلول پراکنده‌اند (اصطلاحاً همان ریزمحیط). برهمکنش میان این سیگنال‌ها در طول فرایند تمایز، منجر به خاص و محدود شدن بیان ژن شده و در نهایت بر تقسیم سلولی اثر گذار است.



شکل-۸۴ این تصویر دو فرآیند خودنوزایی و تمایز را در کنار هم نشان می‌دهد. در پایین تصویر، سلول بنیادی به تولید سلول‌هایی منجر شده که برخلاف خود سلول مادر، تمایزیافته و دارای ویژگی‌های منحصر به‌فرد هستند.

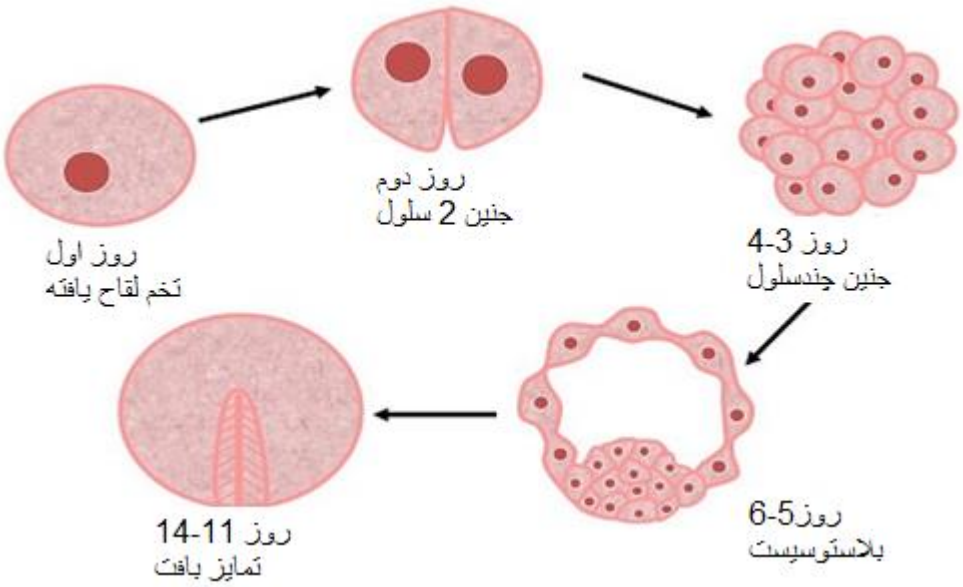
انواع سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی بر اساس دو ویژگی توان تمایزپذیری و برگشت‌پذیری به چند گروه تقسیم می‌شوند:

۱. سلول‌های بنیادی همه توان[1]

توانایی سلول واحد برای تقسیم و تولید تمام سلولهای تمایز یافته موجود در ارگانیسم است. این ویژگی آن‌ها را برای درمان سلول‌ها و ژن‌ها و همچنین مهندسی بافت برای پیوند و جایگزینی سلول‌های بیمار ایده آل می‌کند. در واقع سلول تخم این ویژگی را دارد که قادر است همه‌ی سلول‌ها (سلول‌های فرد و سلول‌های جفت) را بسازند. از زمان تشکیل تخم و ۳-۴ روز پس از لقاح (تشکیل توده کروی شکل جامد بنام مورولا) سلول ها بصورت همه توان هستند.

[1] Totipotent



شکل-۸۵ سلول‌های بنیادی همه‌توان را از جنین سه الی چهار روزه به‌دست می‌آورند.

۲. سلول‌های بنیادی پرتوان[1]

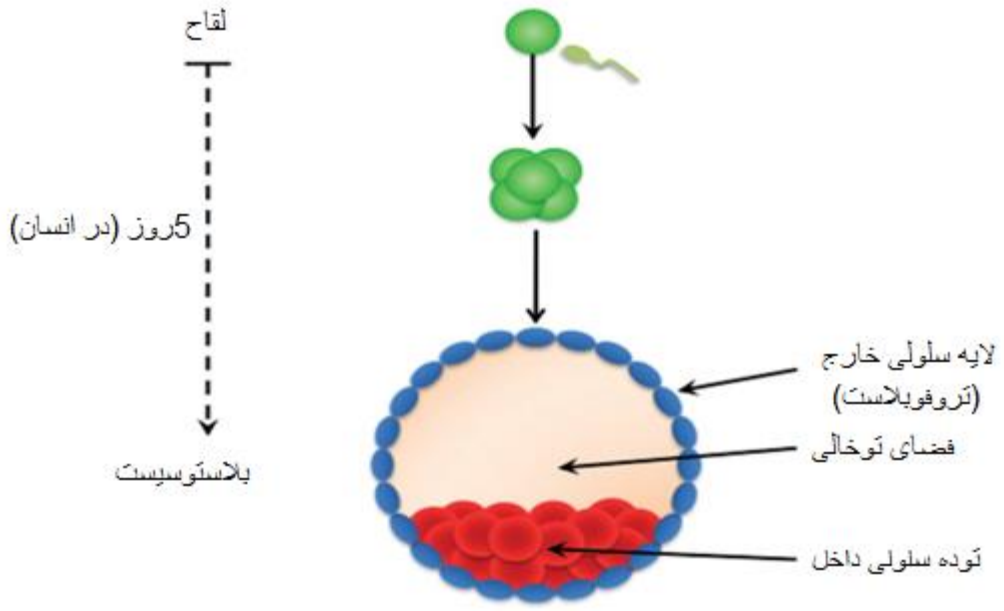
سلول‌های بنیادی پرتوان توانایی تمایز به هر یک از سه لایه جنینی: اندودرم یا لایه‌ی درونی (پوشش داخلی معده، دستگاه گوارش، ریه ها)، مزودرم یا لایه‌ی میانی (عضله، استخوان، خون، دستگاه ادراری تناسلی)، اکتودرم یا لایه‌ی بیرونی (بافت های اپیدرمی و سیستم عصبی) را دارد و اما نمی توانند به سلول و بافت های خارج جنینی مانند جفت تبدیل شوند. همه‌ی بافت‌ها و اندام‌های نوزاد در مراحل بعدی تکامل جنین، از این سه لایه نشات می‌گیرند. سلول های بنیادی جنینی[2]، سلول های بنیادی پرتوان هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست (مراحل اولیه جنین در مرحله قبل از کاشت) بدست می آیند. جنین های انسانی ۴-۵ روز پس از لقاح به مرحله بلاستوسیست می رسند که در این زمان از ۱۰۰-۲۰۰ سلول تشکیل شده است. بنابراین برای رسیدن به سلول های بنیادی جنینی باید توده سلولی داخلی

[1] pluripotent
[2] Embryonic stem cells (ESCs)

جنین را جدا کرد که منجر به تخریب بلاستوسیست می شود و فرایندی است که مسائل اخلاقی بسیاری را به وجود می آورد.

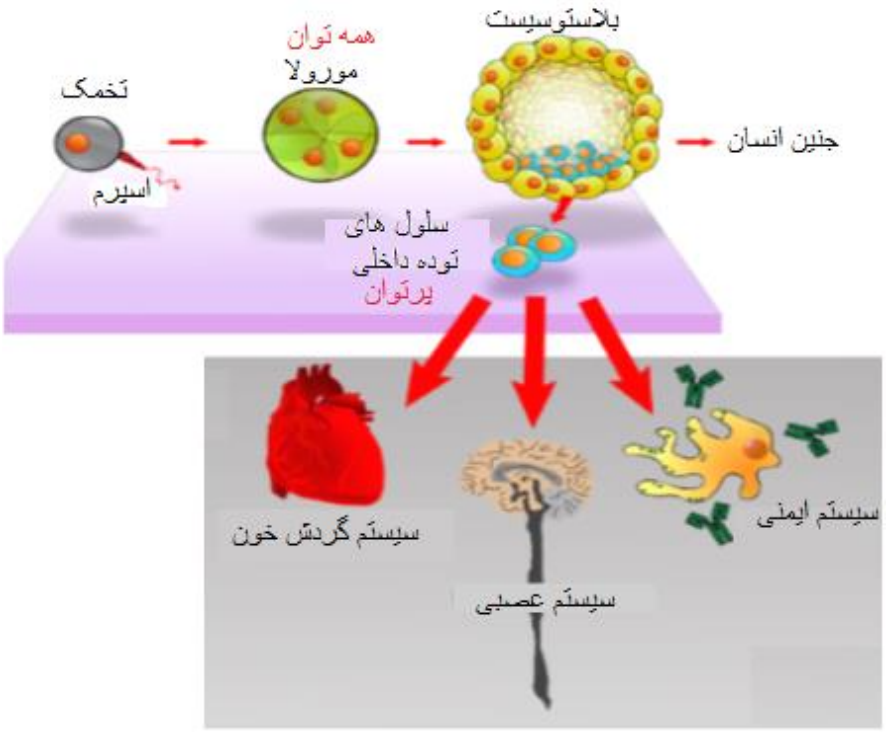
بیایید کمی بیشتر درباره سلول‌های بنیادی جنینی بدانیم:

سلول‌های بنیادی جنینی در گونه‌های جانوری متنوعی مانند انسان شناسایی شده اند. به این گروه از سلول ها، سلول‌های بنیادی پرتوان نیز می گویند به این معنی که قادرند همه‌ی انواع مختلف سلول‌های بدن را تولید کنند. سلول‌های بنیادی جنینی را می توان از بلاستوسیست به دست آورد. بلاستوسیست، ساختاری چند سلولی در مراحل اولیه‌ی شکل گیری جنین است که به ندرت با چشم غیرمسلح می توان آن را دید و بصورت ساختاری کروی و توخالی است. در این مرحله، هیچ اندامی و حتی خون وجود ندارد، تنها یک «توده‌ی سلولی داخلی» تشکیل شده که همان منشأ سلول‌های بنیادی جنینی است.



شکل-۸۶ سلول‌های بنیادی جنینی را از جنین ۵ روزه که بلاستوسیست نامیده می‌شود، به دست می‌آورند.

در ابتدا سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را از بلاستوسیست تشکیل شده در پی «لقاح آزمایشگاهی»[1] به دست می آوردند (البته اکنون دیگر نیازی به این کار نیست از تکنیک ساخت سلول‌های بنیادی پر توان القایی کمک گرفته می شود). تخم لقاح یافته و سلول‌هایی که طی چند تقسیم اول بلافاصله پس از لقاح پدیدار می‌شوند، «همه توان» هستند. با این وجود پس از گذشت مدت کوتاهی این سلول‌ها تغییر کرده و تبدیل به سلول‌های پرتوان می‌شوند.



شکل-۸۷ سلول‌های بنیادی جنینی تنها حدود ۴ روز قابلیت «همه توانی» را دارند.

[1] IVF (invitro-fertilization)

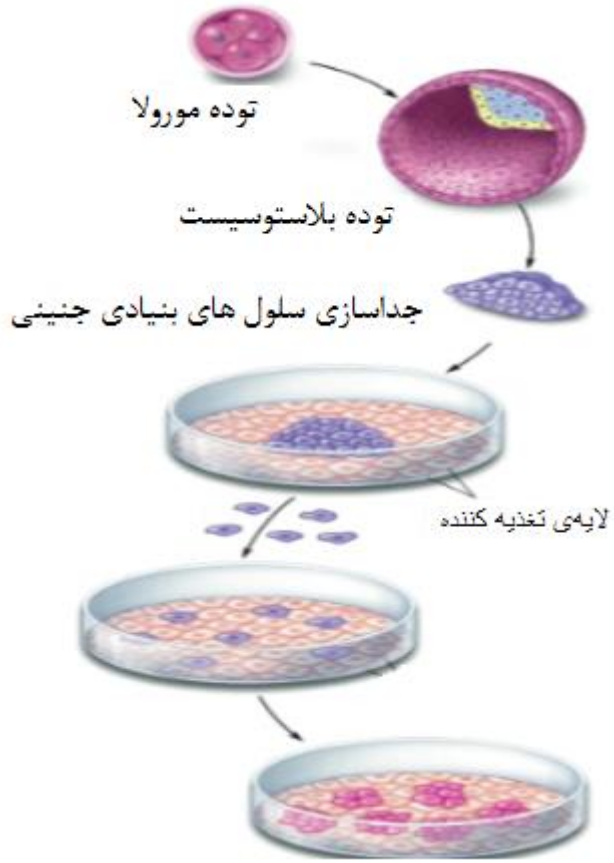
اهمیت سلول‌های بنیادی جنینی در چیست؟

بر خلاف سلول‌های بنیادی بزرگسالان، سلول‌های بنیادی جنینی قادرند هر نوع سلولی را در بدن ایجاد کنند. این سلول‌ها به پژوهشگران کمک می کنند تا درباره‌ی مراحل اولیه‌ی شکل گیری انسان به مطالعه بپردازند، از سازوکار ایجاد بیماری‌ها مطلع شوند و در نهایت راهکارهایی درمانی را برای جایگزینی و یا ترمیم بافت آسیب دیده طراحی کنند.

رشد سلول‌های بنیادی جنینی در آزمایشگاه

رشد و پرورش سلول‌ها در محیط آزمایشگاه را «کشت سلولی» می نامیم. سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را از سلول‌های جنینی در مرحله‌ی «پیش از لانه گزینی» به دست آورده و به ظرف مخصوص کشت در آزمایشگاه که حاوی مایعی مغذی به نام «محیط کشت» است، منتقل می کنند. سلول‌ها در سطح ظرف رشد و تکثیر می‌کنند. در روش اولیه، سطح داخلی ظروف کشت با سلول‌های جنینی پوست موش پوشانده شده‌است. این سلول‌ها دستکاری شده و فاقد توانایی تقسیم هستند. به این لایه‌ی سلولی «لایه‌ی تغذیه کننده»[1] می‌گویند. سلول‌های موش در کف ظروف کشت بستری چسبناک برای اتکا و رشد سلول‌های جدید فراهم می‌آورد. همچنین، سلول‌های تغذیه کننده مواد مغذی را به درون محیط کشت آزاد می کنند. البته استفاده از سلول‌های موش به عنوان لایه‌ی تغذیه کننده، نکات منفی نیز دارد و می تواند منجر به انتقال ویروس‌ها و سایر ماکرومولکول‌های مضر از سلول‌های موش به سلول‌های انسانی شود. بنابراین پژوهشگران در حال بررسی روش‌های نوین بدون استفاده از سلول‌های تغذیه کننده‌ی موشی هستند.

[1] feeder layer



شکل-۸۸ توده‌ی سلولی درونی را استخراج می‌کنند. آن را در ظروف مخصوص کشت می دهند. در کف این ظرف، سلول‌های تغذیه‌کننده حضور دارند تا سلول‌های استخراج شده از بدن را حمایت کنند. پس از مدتی، سلول‌ها بنیادی جنینی روی ظروف رشد و تکثیر پیدا می‌کنند.

در صورتی که کشت سلول‌های جنینی موفقیت آمیز بود و سلول‌ها به اندازه‌ی کافی بقا یافته، تقسیم و تکثیر شدند، آن‌ها را به آرامی برداشته و به پلیت‌های[1] جدید با محیط کشت تازه منتقل می کنند. فرایند تعویض پلیت و کشت

[1] plate

مجدد[1] به دفعات و طی چنین ماه تکرار می‌شود. به کشت مجدد سلول ها، پاساژ دادن[2] می‌گوییم. پس از استقرار خطوط سلولی بر روی پلیت، از سلول‌های اولیه میلیون‌ها سلول بنیادی جنینی به دست می آید. سلول‌های جنینی که طی شش ماه یا بیشتر از طریق کشت سلولی به دست می آیند، فاقد هرگونه تمایز بوده و «پرتوان» هستند، یک دودمان سلول بنیادی جنینی می نامند. در هر یک از مراحل این فرایند، می توان گروه‌های سلولی را فریز کرده و به آزمایشگاه‌های دیگر جهت اقدامات بعدی منتقل کرد.

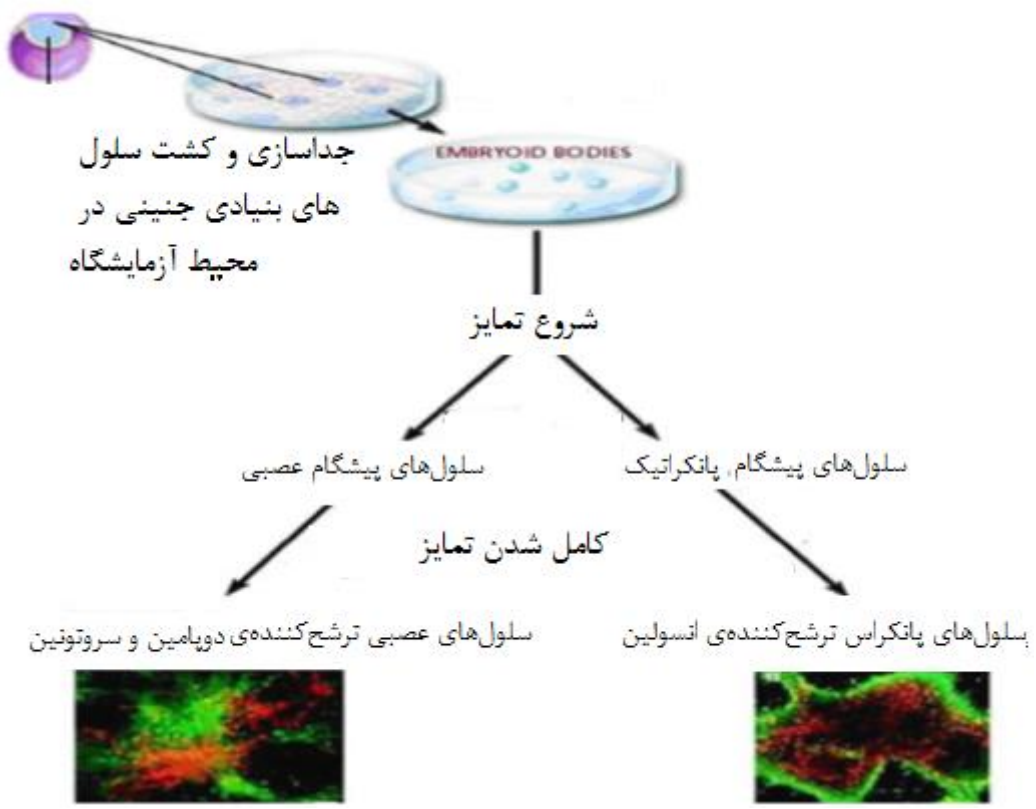
چگونه می توان سلول‌های بنیادی جنینی را در مسیر تمایز قرار داد؟

مادامی که سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط مطلوب و مناسب در آزمایشگاه کشت داده می شوند، تمایز نیافته و تخصص نیافته باقی می‌مانند. اما اگر تجمع کرده و توده‌هایی را به نام «اجسام شبه جنینی»[3] ایجاد کنند، خودبه خود در مسیر تمایز قرار می گیرند. پس از آن ممکن است به سلول‌های ماهیچه ای، سلول‌های عصبی و یا انواع دیگر سلول تبدیل شوند. با وجود این که تمایز خودبه خودی نشانه‌ی سلامت کشت سلول‌های بنیادی جنینی است، این روند غیر قابل کنترل بوده و در نتیجه جهت تهیه‌ی کشت‌های سلولی با انواع خاص ناکارآمد خواهد بود.

بنابراین پژوهشگران برای ایجاد کشت‌هایی از سلول‌های تمایزیافته‌ی دلخواه، مانند سلول‌های قلب، ماهیچه ای، خونی، یا سلول‌های عصبی، در تلاش اند تا تمایز سلول‌های بنیادی جنینی را تحت کنترل قرار دهند. آن‌ها ترکیب محتوای شیمیایی محیط کشت را تغییر داده، سطح ظرف کشت را عوض کرده و سلول‌ها را با وارد کردن ژن‌های خاصی دستکاری

[1] Subculturing
[2] passage
[3] embryoid bodies

می کنند. محققان در پی سال‌ها آزمایش و بررسی، روش‌های بنیادی یا دستورالعمل‌هایی را به منظور تمایز جهت دار سلول‌های بنیادی جنینی پایه گذاری کرده اند.



شکل-۸۹ در شروع فرآیند تمایز، سلول‌هایی به نام سلول‌های پیشگام[1] اولین مرحله از تمایز را طی می‌کنند. تمایز جهت‌دار در این تصویر منجر به تولید دو گروه از سلول‌ها شده‌است. در سمت چپ تصویر، سلول‌های پیشگام عصبی، سلول‌های عصبی ترشح‌کننده‌ی دوپامین و سروتونین و در سمت راست تصویر، سلول‌های پیشگام پانکراتیک، سلول‌های پانکراس ترشح‌کننده‌ی انسولین را تولید کرده‌اند.

[1] precursor

چگونه می توان سلول‌های پرتوان القایی ایجاد کرد؟

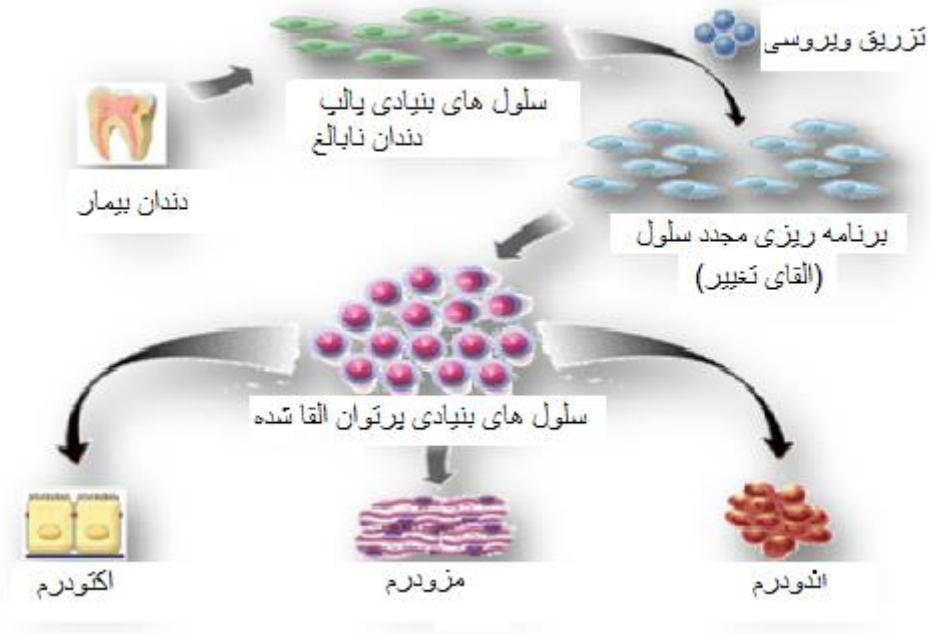
سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته با توانایی تقسیم در محیط کشت و ساخت اشکال مختلف سلول‌های تخصصی هستند. سلول‌های بنیادی با توجه به منبع خود به سلول‌های بنیادی "بالغ" و "جنینی" تقسیم می‌شوند. در حالی که هنوز بحث اخلاقی زیادی در رابطه با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی وجود دارد، تصور می‌شود که یک منبع جایگزین دیگر ممکن است برای ترمیم بافت‌های بیمار یا آسیب دیده یا برای رشد اندام‌های جدید استفاده شود. این منبع جایگزین سلول‌های بنیادی پرتوان القایی[1] می باشد. این سلول‌ها از نوع سلول‌های بنیادی پرتوان هستند که می‌توانند به سلول‌های بنیادی بعدی تقسیم شوند یا به هر نوع سلول در بدن به جز بافت خارج جنینی تمایز پیدا کنند. سلول‌های iPSC زیر کلاس سلول‌های بنیادی پرتوان و از سلول‌های تمایز یافته بالغ گرفته شده‌اند.

امروزه یکی از پرطرفدارترین عناوین در حوزه‌ی سلول‌های بنیادی مطالعه درباره‌ی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی است. این سلول‌ها جزو سلول‌های بزرگسال (مانند پوست) هستند که مهندسی یا برنامه ریزی مجدد[2] می‌شوند تا به سلول‌های پرتوان تبدیل شوند و به عبارت دیگر مانند سلول‌های جنینی عمل کنند. اگرچه این سلول‌های iPS بسیاری از خواص مشابه سلول‌های بنیادی جنینی از جمله، توانایی تبدیل شدن به همه‌ی انواع سلول‌های بدن را دارند، باید توجه داشت که این دو گروه کاملا یکسان نیستند.

سلول‌های iPS اولیه در پی دریافت ویروس‌های مهندسی شده تولید می شوند؛ چندین کپی از سه تا چهار ژن مخصوص که در تمایز سلول‌های جنینی به سلول‌های تخصص یافته نقش مهمی دارند به این ویروس‌ها منتقل شده است. در واقع

[1] iPSc (induced pluripotent stem cells)
[2] reprogramming

تغییر در بیان یکسری ژن‌های سلول‌های بالغ ایجاد می‌شود تا زمانی که مانند سلول‌های بنیادی جنینی شوند. چگونگی عملکرد این سه، چهار ژن در انجام فرآیند «برنامه ریزی مجدد» به منظور القای پرتوانی هنوز برای دانشمندان مشخص نیست. پژوهش‌های حال حاضر در زمینه‌ی سلول‌های بنیادی بر همین سوال متمرکز است. به علاوه، تحقیقات اخیر بر یافتن روش‌های جایگزین برای انجام فرآیند «برنامه ریزی مجدد» سلول‌ها متمرکز است و نیز روش‌هایی ایمن‌تر که بتوان در سطح بالینی از آن‌ها کمک گرفت.



شکل- ۹۰ فناوری iPS. با ایجاد شرایطی برای بیان بیشتر ژن‌های مختص «پر توانی»، می توان سلول‌های iPS را تولید کرد.

تاریخچه‌ی تولید سلول‌های پرتوان القایی

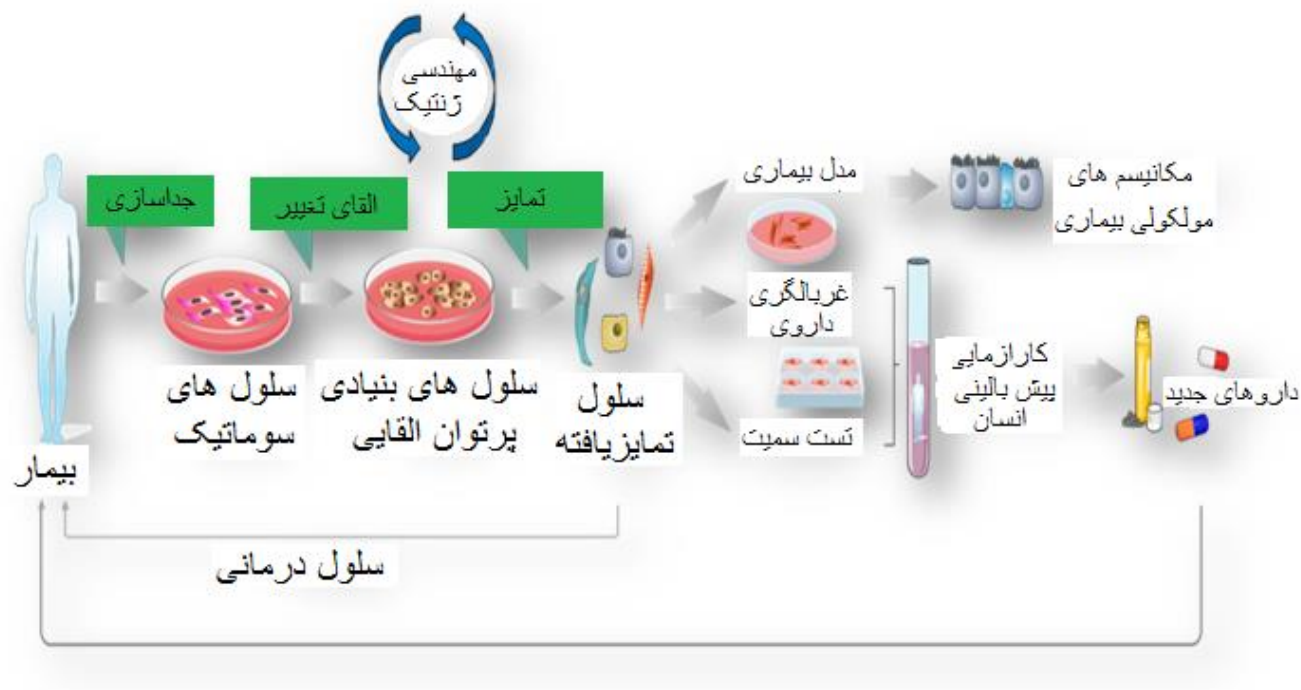
در سال ۲۰۰۷ میلادی، پژوهشگران ژاپنی دست به تولید نوع جدیدی از سلول‌های بنیادی پرتوان را زدند که مشکل ایمونولوژیک و نیز مسائل اخلاقی سلول‌های بنیادی جنینی در مورد آن‌ها مطرح نبود، زیرا از سلول‌های خود فرد دهنده

تولید می‌شدند. پیش از این بسیاری از پیوندهایی که با به کارگیری سلول‌های بنیادی صورت گرفته بود، به دلیل مشکلات ایمونولوژیک با مانع روبه رو شده بود. آن‌ها این سلول‌ها را که با بیان ویروسی چهار ژن مخصوص پرتوانی در سلول‌های سوماتیک تولید شده بودند، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی(iPSCs) نامیدند. این سلول‌ها تمام قابلیت‌های سلول‌های بنیادی جنینی از جمله توانایی تولید یک جاندار کامل را دارند، از این رو ضمن نداشتن مشکل ایمونولوژیک، دارای تمامی کاربردهای بالقوه‌ی سلول‌های بنیادی جنینی شامل غربالگری داروها و مدل‌سازی بیماری‌ها هستند. همچنین با توجه به این که «سلول‌هایiPS خاص بیمار» را می‌توان به راحتی تولید کرد، چشم‌انداز روشنی برای کاربرد درمانی این سلول‌ها در آینده وجود دارد. امروزه نیز یک روش محبوب استفاده از گروهی از ویروس‌ها (رِترو-ویروس) اصلاح شده برای معرفی ژن‌های خاص به ژنوم سلول‌های بالغ برای القا آن‌ها به یک حالت سلول‌های بنیادی جنینی است که این سلول‌های بنیادی پرتوان می‌توانند به هر سلول در یک کلاس سلولی از قبیل خون یا استخوان تمایز پیدا کنند.

ایجاد سلول‌های بنیادی پرتوانِ مختص بیمار یا مختص بیماری

یکی از فواید مهم سلول‌های پرتوان القایی و یکی از دلایلی که پژوهشگران در تحقیقاتشان بر این گروه از سلول‌ها متمرکز شده اند، توانایی این سلول‌ها در ایجاد دودمان‌های سلولی مختص یک بیماری یا حتی مختص یک بیمار است. سلول‌های بنیادی مختص بیمار، ابزاری قدرتمند برای بررسی علل ایجاد یک بیماری خاص یا اصطلاحاً «مدل سازی بیماری» هستند. همچنین می توان با استفاده از آن ها، داروها و یا روش‌های درمانی مختلف برای درمان یا بهبودی یک بیماری را کشف و آزمایش کرد. ایجاد سلول‌های بنیادی مختص بیمار در بحث سلول درمانی نیز بسیار مورد توجه قرار گرفته

اند، چرا که این دودمان‌های سلولی از خود شخص بیمار گرفته شده و موجب کاهش برخی مشکلات و سرکوب‌های ایمنی در پی پیوند می‌شوند.



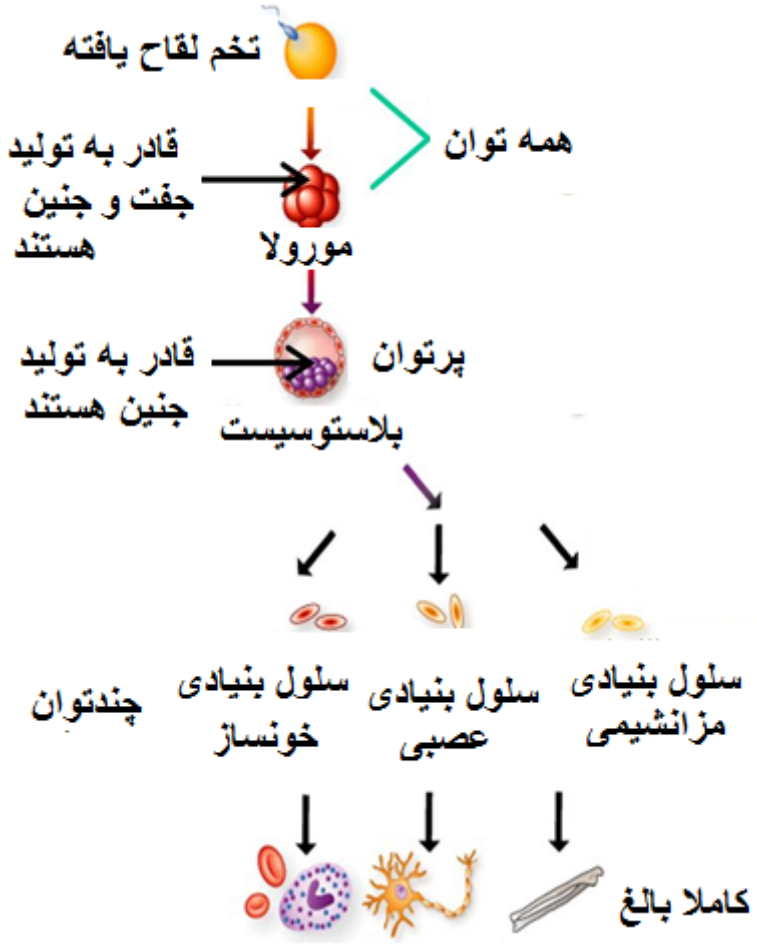
شکل-۹۱ سلول‌های بنیادی پرتوان القایی که در محیط آزمایشگاه کشت داده شده‌اند، فرآیند تمایز را طی می‌کنند و برای اهداف مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله؛ شناسایی سازوکار مولکولی بیماری‌ها، کشف و آزمایش داروها، تست‌های ارزیابی سمیت.

۳. سلول‌های بنیادی چند توان[1]

سلول‌های بنیادی چند توان شامل انواع زیادی از سلول‌ها هستند که اصطلاحاً سلول‌های بنیادی بالغ نامیده می شوند؛ مانند سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی[2] و سلول‌های بنیادی عصبی. مثلا سلول‌های بنیادی خونساز که در مغز استخوان هستند قادر به ساخت سلول‌های مختلف بافت خونی، شامل گلبول‌های قرمز،

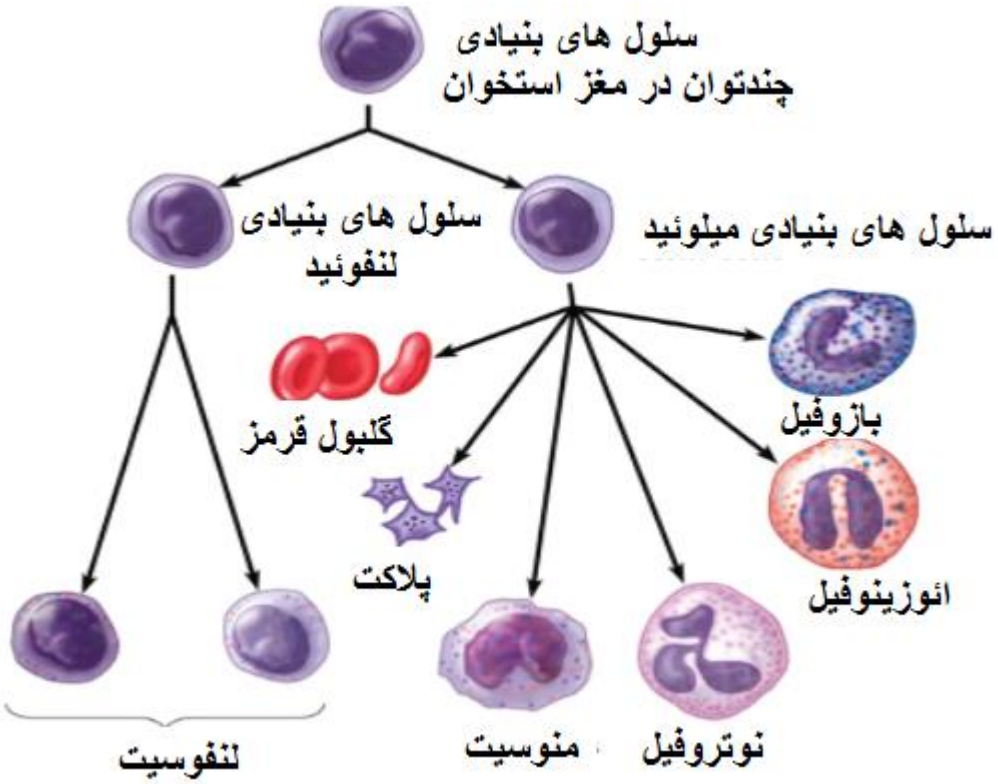
[1] multipotent
[2] Mesenchymal stem cells (MSCs)

گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها هستند. همانند سایر سلول‌های بنیادی ویژگی‌های اصلی را دارند اما تعداد محدودتری از سلول‌ها را ایجاد می کنند.



شکل-۹۲ کمترین سطح تمایز مربوط به سلول‌های بنیادی همه‌توان است که جنین و جفت را تشکیل می‌دهند. بدین ترتیب از بالا به پایین سلول‌ها تمایزیافته‌تر می‌شوند و در پایین تصویر سلول‌های سوماتیک را مشاهده می‌کنید که کاملاً تخصص یافته و بالغ شده‌اند.

(بلوغ سلولی به معنای آمادگی برای انجام وظایف است)



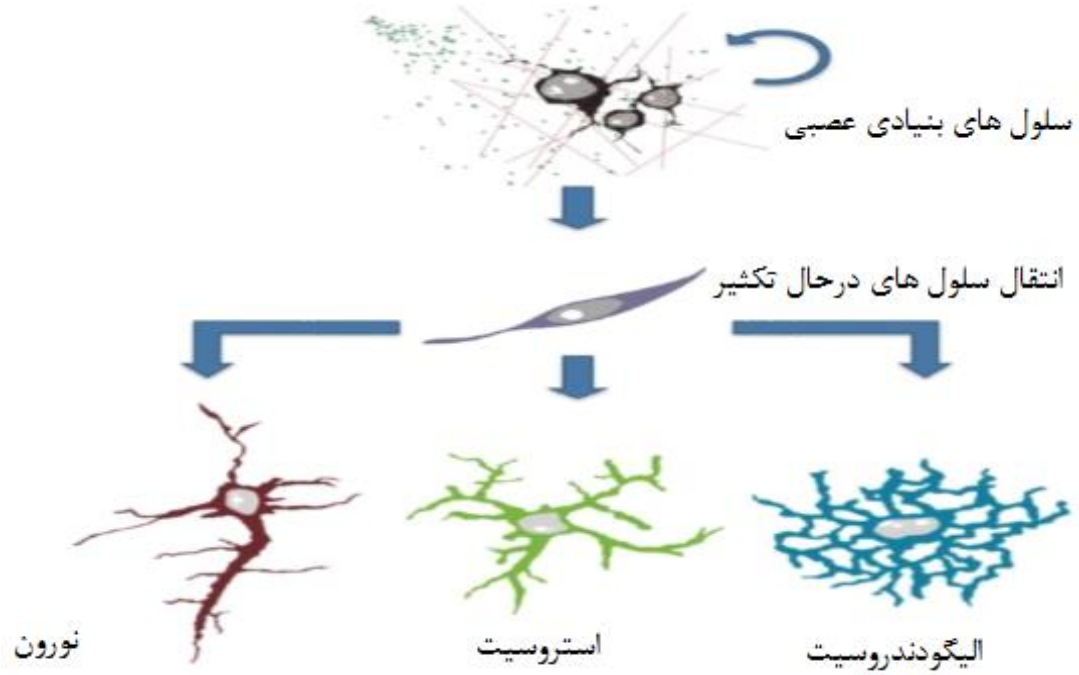
شکل-۹۳ سلول بنیادی چندتوان در مغز استخوان دو نوع سلول به‌نام سلول میلوئیدی و سلول لنفوئیدی تولید می‌کند. سلول‌های لنفوئیدی در نهایت لنفوسیت‌ها را تولید می‌کنند. سلول‌های میلوئیدی نیز به تولید پلاکت، مونوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و بازوفیل منجر می‌شوند.

سلول‌های بنیادی سوماتیک[1]

سلول‌های بنیادی بالغ[2] یا سلول‌های بنیادی سوماتیک تا حدی تخصص یافته اند و قادرند همه‌ی انواع سلول‌های بالغ مربوط به بافت یا اندام محل استقرار خود را تولید کنند. به دلیل داشتن قابلیت تولید سلول‌های چندگانه‌ی مربوط به

[1] Somatic stem cells
[2] Adult stem cells

بافت‌های مختلف، اصطلاحاً این سلول‌ها را سلول‌های بنیادی چند توان می نامیم. برای مثال، سلول‌های بنیادی موجود در مغز بزرگسالان توانایی تولید نورون‌ها و دو نوع از سلول‌های نگهبان یعنی استروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها را دارند.



شکل-۹۴ فرآیند خودنوزایی و تمایز در سلول‌های بنیادی عصبی. سلول‌های بنیادی عصبی سلول‌هایی سه قابلیتی هستند. این سلول‌ها طی تمایز موجب پیدایش موقتی سلول‌های پیشروی تقسیم شونده می شوند که در نهایت ویژگی‌های خاص برای تبدیل شدن به هر یک از این سه گروه سلولی (عصبی، استروسیتی، الیگودندریتی) را کسب می کند.

سلول‌های بنیادی سوماتیک در اندام‌هایی که نیاز به خودترمیمی مداوم دارند، مانند خون، پوست، روده و نیز اندام‌هایی با خاصیت باززایی کمتر مانند مغز، دیده می شوند. همچنین در بافت‌های دیگر نظیر پالپ دندان، عضله اسکلتی، کبد، پانکراس، قرنیه، شبکیه، سیستم گوارش به چشم می خورند. این گروه از سلول‌های بنیادی در جمعیت‌های کوچک و در اعماق بافت موردنظر یافت می شوند. این دو ویژگی شناسایی، جداسازی و پرورش آن‌ها در آزمایشگاه را دشوار می سازد.

چگونه سلول‌های بنیادی سوماتیک را از بافت/اندام استخراج کنیم؟

سلول‌های بنیادی بالغ همان‌طور که از نام‌شان پیداست، پس از تولد از فرد گرفته می‌شوند. برای مثال این سلول‌ها را می‌توان از بافت مغز استخوان یک فرد سالم تهیه کرد. با این حال بعضی پژوهش‌ها حاکی از این است که هر بافتی دارای سلول‌های بنیادی خاص خود است. به‌طور مثال، مشخص شده که قلب، مغز و ماهیچه‌های اسکلتی هر کدام دارای سلول‌های بنیادی خاص خود هستند و همهٔ این سلول‌ها در بدن یک فرد بالغ وجود دارند. به‌عنوان مثال، سلول‌های بنیادی قلبی بیشتر در ناحیه اپیکس[1] قلب و سلول‌های بنیادی مغزی عمدتاً در دیوارهٔ بطن مغز متمرکز هستند. با این حال دقیقاً مشخص نیست که منشأ این سلول‌های بنیادی گوناگون، چه سلولی است؟ آیا منشأ همه این‌ها همان سلول‌های مغز استخوان هستند که هر یک به سمت اندام خاصی مهاجرت کرده و به سلول‌های بنیادی خاص آن تبدیل می‌شوند، یا منشأ دیگری برای آنها وجود دارد؟

۴. سلول‌های بنیادی تک توان[2]

این گروه از سلول‌ها همانطور که از نامشان پیداست تنها قادر به ایجاد یک نوع سلول هستند.

جایگاه سلول‌های بنیادی در پزشکی

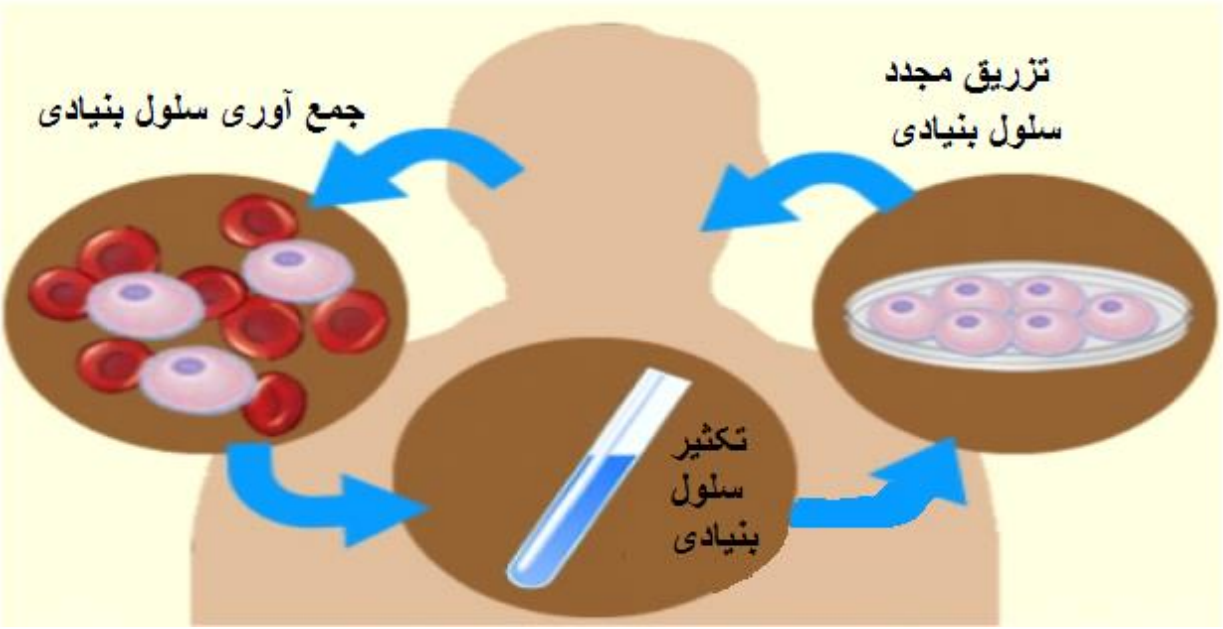
بسیاری از متخصصان و دانشمندان درباره‌ی پتانسیل سلول‌های بنیادی بر این باورند که این سلول‌ها نقش بسیار مهمی در درمان بیماری‌ها تا چند دهه‌ی آینده خواهند داشت. سلول‌های بنیادی به‌طور کلی با سه مکانیسم بر پزشکی تاثیر

[1] Apex
[2] unipotent

می گذارند؛ درمان‌های وابسته به سلول، کشف داروهای نوین و ارتقای دانش پایه ای پیرامون سلول و مکانیسم‌های سلولی. سلول درمانی ممکن است سلول‌های بنیادی و یا سلول‌های حاصل از سلول‌های بنیادی را به منظور ترمیم و جایگزینی بافت آسیب دیده به کار گیرد.

از سلول‌های بنیادی جنینی می توان برای تولید بافت‌های تخصص یافته ای که در پی بیماری یا جراحات آسیب دیده اند، بهره گرفت. همچنین سلول‌های بنیادی می توانند مستقیماً در بافت هایی که به‌طور مداوم و مکرر جایگزین می شوند، مانند خون و پوست جایگزین شوند.

پژوهشگران درصدد یافتن راه هایی برای استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری هایی نظیر دیابت و پارکینسون، جراحات ستون فقرات، نارسایی‌های قلبی و نابینایی و ناشنوایی هستند.



شکل-۹۵ در این تصویر، سلول‌های خونی فرد استخراج شده و طی فرایندی جلوی تمایز آنها گرفته شده است. درنتیجه سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاه تولید شده و مجدداً با هدف ترمیم به بدن شخص منتقل می‌شوند.

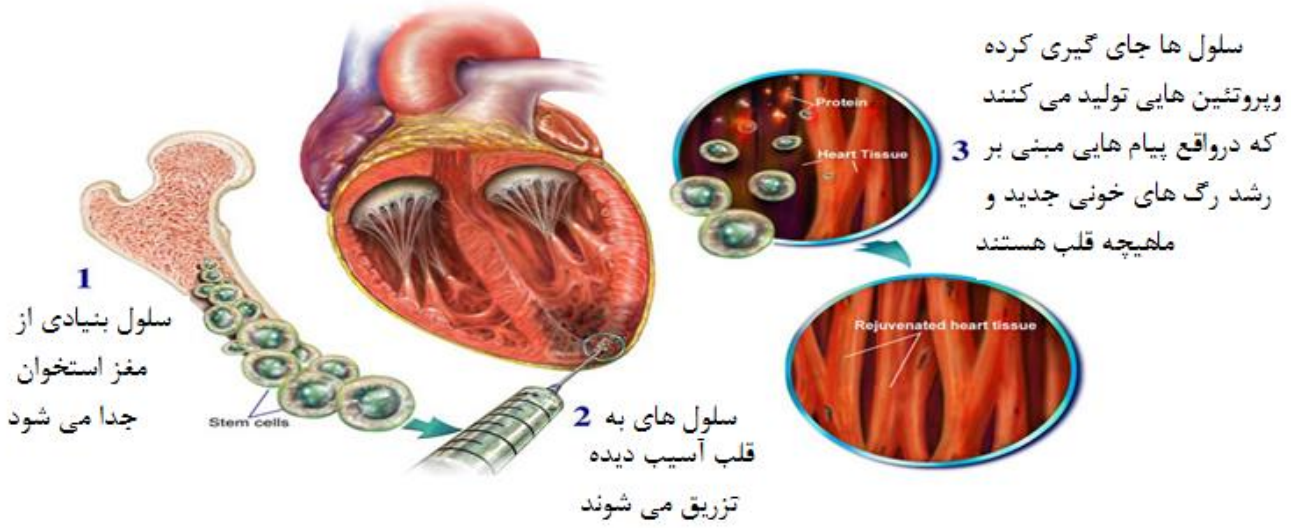
سلول‌های بنیادی خون در حال حاضر یکی از رایج ترین موارد استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان هستند. بیش از ۵۰ سال است که پزشکان از پیوند مغز استخوان برای انتقال سلول‌های بنیادی خونی به بیماران بهره گرفته اند. همینطور روش‌های پیشرفته تری برای دستیابی به سلول‌های بنیادی خونی در دست بررسی است؛ روش‌هایی که در نهایت به درمان لوسمی، لنفوما و بعضی ناهنجاری‌های وراثتی خونی منتج می شوند. خون بند ناف نیز مانند مغز استخوان برای دستیابی به سلول‌های بنیادی خونی و در موارد خاص به عنوان جایگزین پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می گیرد.

علاوه بر این، می توان بعضی از بیماری‌های استخوانی، خونی و پوستی و یا جراحات را از طریق پیوند زدن بافت‌هایی که از سلول‌های بنیادی مشتق شده اند، درمان کرد. این قبیل درمان‌ها تاکنون مفید و کاملاً بی خطر بوده اند. بسیاری از متخصصان و دانشمندان درباره‌ی پتانسیل سلول‌های بنیادی بر این باورند که این سلول‌ها نقش بسیار مهمی در درمان بیماری‌ها تا چند دهه‌ی آینده خواهند داشت.

گفتیم یکی از کاربردهای بیوتکنولوژی پزشکی، سلول درمانی است. در این حیطه، سلول های تمایزنیافته ای بنام سلول های بنیادی بیشترین استفاده را دارد. اکنون می خواهیم بطور تخصصی به چند مورد از کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی که در دست بررسی و آزمایش هستند، اشاره می کنیم:

۱) ترمیم بافت آسیب دیده‌ی قلب

متخصصان امیدوار هستند سلول‌های بنیادی را از مغز استخوان فرد بیمار (یا جنین در مراحل اولیه) استخراج و آنها را در محیط آزمایشگاه به سلول‌های قلبی تبدیل کنند. سپس با تزریق این سلول‌های تمایزیافته به بدن، امکان ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده قلب را فراهم آورند. البته این تکنیک هنوز در مرحله آزمایشگاهی است، اما موفقیت‌های به‌دست آمده در حیوانات آزمایشگاهی، امیدبخش استفاده از این فناوری در انسان خواهد بود.



شکل-۹۶ سلول‌های بنیادی از مغز استخوان فرد بیمار استخراج و به بافت آسیب دیده‌ی قلب تزریق می‌شوند. در مرحله‌ی بعد سلول‌ها در بافت قلب تکثیر شده و پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها نقش یک پیام (سیگنال) را ایفا می‌کنند که منجر به ساخت رگ‌های خونی در بافت قلب برای تغذیه‌ی این سلول‌ها می‌شود.

۲) ترمیم بافت‌های استخوانی

در افرادی که دچار شکستگی‌های شدید استخوانی شده و مورد عمل جراحی مغزی قرار گرفته و کاسه سر آنها برداشته شده است و همچنین اشخاصی که استخوان‌های آنها به‌کندی جوش می‌خورد، از سلول‌های بنیادی برای جوش‌خوردگی

سریع و جلوگیری از عفونت‌های بعدی استفاده می‌شود. در این تکنیک، سلول‌های بنیادی بالغ از فرد گرفته شده و در محیط آزمایشگاه به سلول‌های استئوبلاست (استخوانی) تبدیل می‌شوند، سپس این سلول‌ها در کنار بافت‌های آسیب‌دیده قرار می گیرند و باعث جوش‌خوردگی سریع این بافت‌ها می گردند. در این مورد، سلول‌ها از خود شخص جدا می‌شوند؛ بنابراین مشکل پس‌زدگی و عوارض جانبی را در پی نخواهند داشت. این تکنیک مرحله آزمایشگاهی را پشت سر گذاشته و هم‌اکنون درکشورهای پیشرفته دنیا از جمله آمریکا و ژاپن به طور عملی و کاربردی بر روی بیماران انجام می‌شود.

شکل-۹۷ در سمت چپ تصویر، بافت آسیب دیده‌ی زانوی بیمار را می‌بینید که پس از پیوند سلول‌های بنیادی در سمت راست تصویر، ترمیم شده و بهبود یافته‌است.

۳) ترمیم پوست آسیب دیده

یکی از کاربردهای سلول بنیادی، نقش آنها در بهبود سوختگی و همچنین زخم‌ها و جراحات است. درمان ترکیبی که در حال حاضر در دست بررسی است، با استفاده از سلول‌های بنیادی و ماتریکس بافت (ماتریکس خارج سلولی و بافت در ادامه توضیح داده خواهد شد) صورت می گیرد. منظور از سلول درمانی در درمان سوختگی‌ها، جایگزین ساختن بافت‌های آسیب دیده با سلول‌های سالم کشت داده شده در آزمایشگاه است. سپس این سلول‌های کشت داده شده بعد از گذشت حدوداً ۳ تا ۵ هفته به نواحی سوخته توسط یک حامل تزریق می‌شوند و پوششی اپیدرم مانند روی سطح آسیب دیده ایجاد می‌نمایند. با استفاده از این روش، گرانولاسیون (گوشت اضافی روی محل سوختگی) نیز رخ نخواهد داد.

شکل-۹۸ کودک ۲ ساله که سوختگی درجه ۲ داشت و با کمک سلول‌های بافت سالم و تکثیر سلولی کاملا درمان شد.

ایران؛ یکی از معدود کشورهای تولیدکننده‌ی سلول‌های بنیادی جنینی

فناوری تولید و پرورش سلول‌های بنیادی جنینی در دنیا، یک فناوری بدیع و روبه رشد است؛ به‌طوری‌که پس از کشف سلول‌های بنیادی جنینی موش در سال ۱۹۸۱، اولین سلول‌های بنیادی جنینی انسان در سال ۱۹۹۸ تکثیر شد. ایران، پس از چند کشور پیشرفته نظیر آمریکا، استرالیا، اسرائیل، سنگاپور، انگلستان، ژاپن، سوئد، هند و کره‌جنوبی که به فناوری تکثیر و پرورش این سلول‌ها دست پیدا کرده‌اند، از جمله معدود کشورهایی است که به این فناوری دست یافته است و لذا فاصله کشورمان در این مورد از دیگر کشورهای پیشرو چندان زیاد نیست.

مدیر عامل بانک خون بند ناف رویان در این زمینه می گوید: «درمان با سلول‌های بنیادی ممکن است جای درمان با دارو را نگیرد اما آینده بسیار درخشان و پراهمیتی در انتظار این رشته از علوم است. سلول بنیادی خون مهمترین نوع از سلول‌های بنیادی بوده که در رابطه با درمان سرطان خون کاربرد ویژه ای دارد، مغز استخوان مهمترین منبع این سلول بنیادی است. خون بند ناف از منابع مهمی بوده که مملو از سلول‌های بنیادی است که به دلیل سهولت جمع آوری از درجه اهمیت ویژه ای در درمان بیماری‌های مورد نظر برخوردار است. بین ۸۰ تا ۲۰۰ سی سی خون بند ناف را می توان در هر نوبت زایمان جمع آوری کرد، این نوع جمع آوری خون بند ناف در زایمان طبیعی بیشتر است. فقط ۵ تا ۱۰ دقیقه برای جمع آوری خون بند ناف در موقع زایمان زمان لازم است، این اقدام هیچ گونه صدمه ای به نوزاد و مادر وارد نمی کند. حجم خون جمع آوری شده از خون بند ناف باید در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شود.

وی با اشاره به انوع بانک‌های خون بند ناف ادامه داد: بانک عمومی و خصوصی خون بند ناف دو نوع از بانک‌های موجود در این زمینه است. در بانک‌های عمومی افراد متقاضی خون بند ناف را به صورت رایگان به بانک های مجاز اهدا کرده و در نوع دوم خون بند ناف به صورت خانوادگی در بانک های موجود نگهداری می‌شود. جالب است بدانید بیش از ۲۰۰

مورد پیوند سلولی با کمک سلول های بنیادی خون بند ناف از زمان توسعه این علم در سطح کشور انجام گرفته که نشان دهنده‌ی پتانسیل بالای کشورمان در این فناوری است.

شکل-۹۹ اهدای سلول‌های بنیادی؛ اهدای زندگی

سلول‌های بنیادی سرطانی چه سلول‌هایی هستند؟

با بررسی دقیق سلول های موجود در تومورهای سرطانی و نیز زیرگروه‌های مختلف تومورهای سرطانی، دیده شده است که سلول‌های موجود در جمعیت تومور، ناهمگونی عملکردی از خود نشان می‌دهند. به طوری که تومورها از سلول‌هایی با ظرفیت‌های تکثیر و تمایز مختلف تشکیل می‌شوند. این ناهمگونی عملکردی در میان سلول‌های سرطانی منجر به ایجاد مدل‌های تکثیر متعددی برای پاسخگویی به ناهمگونی و تفاوت در ظرفیت بازسازی تومور شده است: مدل سلول

بنیادی سرطانی و مدل تصادفی. با این حال از دیدگاه تخصصی این مرزبندی و تفکیک مدل ها درعمل رخ نمی دهد زیرا هر دو فرآیند در مورد جمعیت واقعی سلول‌های توموری به صورت مکمل عمل می‌کنند.

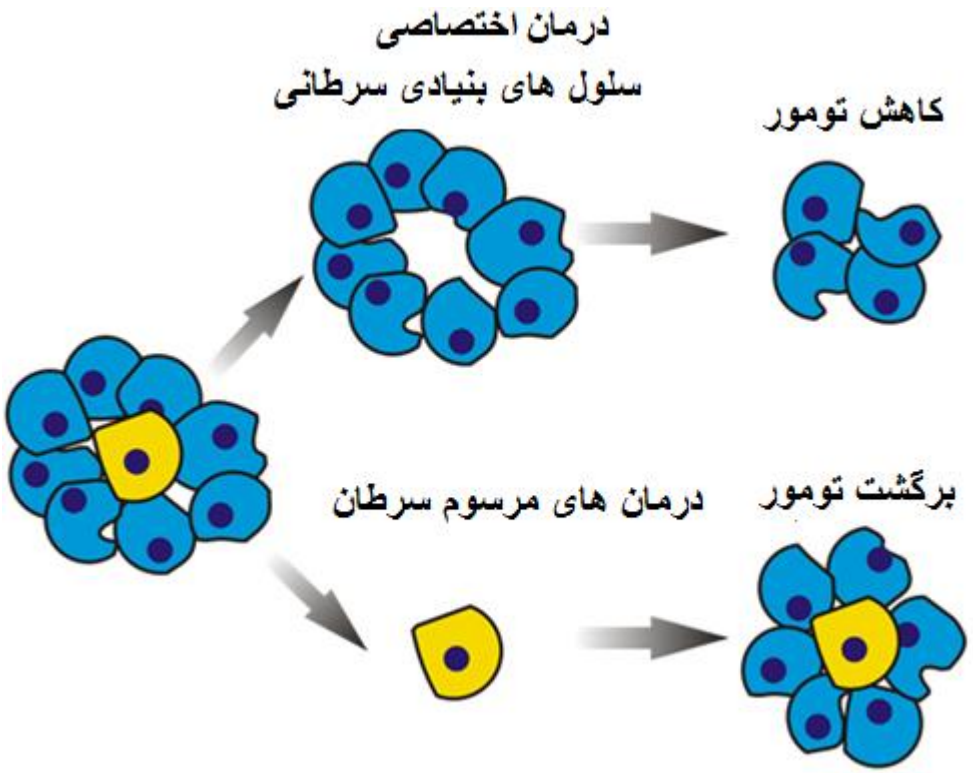
اعتقاد بر این است که سلول‌های سالم بدن جهش یافته و به سلول‌های توموری تبدیل می شوند که با برتری رشد نسبت به دیگران تکثیر می‌یابند. به این حالت مدل تکامل کلونال[1] گفته می شود (یعنی یک سلول جهش یافته تکثیر شده و یک کلون (یا جمعیت) توموری را ایجاد می کند). این مدل که باور دانشمندان است هم در مدل سلول بنیادی سرطانی و در مدل تصادفی گنجانده شده و رخ می دهد. این دو مدل از یکدیگر جدا نیستند، زیرا سلول‌های بنیادی سرطانی خود تکثیر شده و کلون جمعیت سلول های توموری (تکامل کلونال) را به وجود می آورند.

۱. مدل سلول بنیادی سرطانی

مدل سلول‌های بنیادی سرطانی که به آن مدل سلسله مراتبی[2] نیز می‌گویند، پیشنهاد می‌کند که تومورها به طور سلسله مراتبی سازمان یافته‌اند. در جمعیت سرطانی تومورها، سلول‌های بنیادی سرطانی وجود دارد که سلول‌های تومورزا هستند و از نظر زیست شناختی از سایر زیرجمعیت‌ها متمایز هستند. آن‌ها دو ویژگی مشخص یعنی توانایی طولانی مدت در خود تقسیمی و توانایی تمایز به سلول‌های غیر تومورزا که همچنان به رشد تومور کمک می‌کنند را دارند. این مدل نشان می‌دهد که فقط برخی از زیرمجموعه‌های سلول‌های سرطانی توانایی پیشبرد و پیشرفت سرطان را دارند. به این معنی

[1] clonal evolution model
[2] Hierarchical Model

که ویژگی‌های خاص و ذاتی دارند که براساس آنها می‌توانند شناسایی شوند و سپس هدف درمان قرار گیرند تا بدون آنکه نیازی به مبارزه با تمام تومور باشد، تومور به صورت دراز مدت از بین برود (شکل-۱۰۰).



شکل-۱۰۰ در مدل سلول‌های بنیادی سرطانی با هدف درمان قرار دادن این سلول‌ها، تومور در دراز مدت از بین می رود

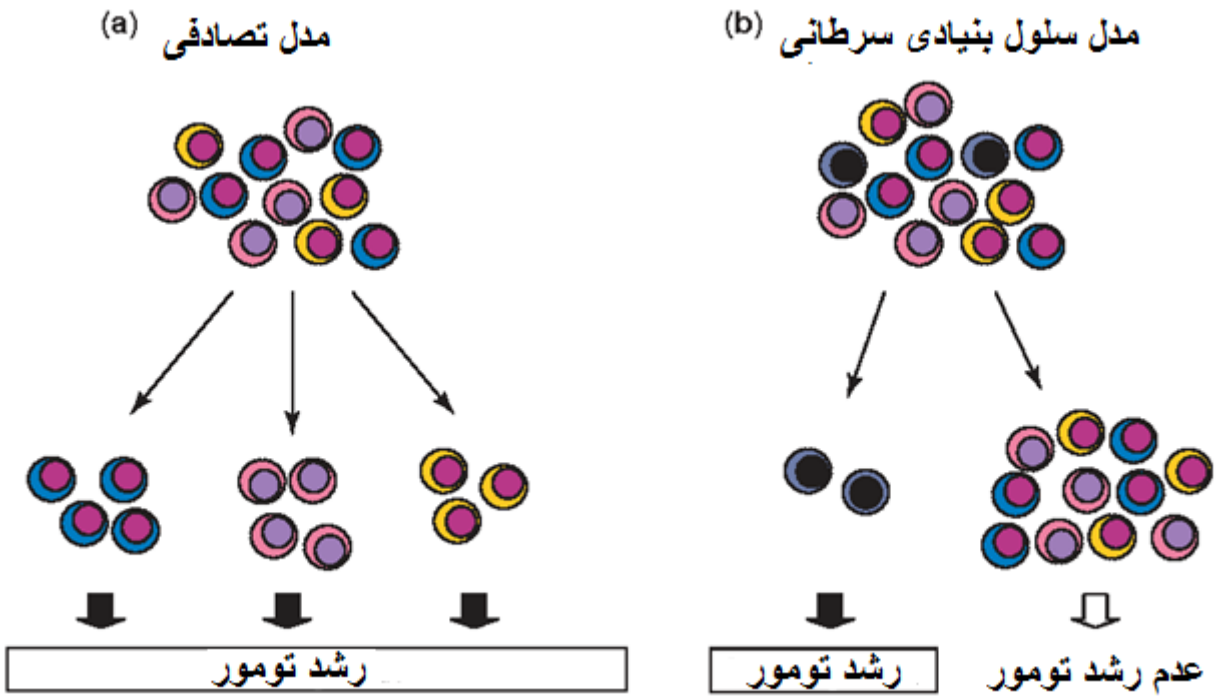
درواقع سلول‌های بنیادی سرطانی[1] (CSC) سلول‌های سرطانی هستند که در تومورها یا سرطان‌های خون یافت می‌شوند. این سلول‌ها دارای ویژگی‌های مشابه با سلول‌های بنیادی طبیعی هستند، به ویژه توانایی ایجاد تمامی سلول‌های موجود در یک نمونه خاص سرطان. در تضاد با سایر سلول‌های سرطانی که غیر تومورزا هستند، سلول CSC تومورزا (تومور ساز) است. CSCها ممکن است تومورهایی را از طریق همان فرآیندهای سلول‌های بنیادی مانند خود تقسیمی و تمایز به انواع

[1] Cancer stem cells

مختلف سلول، ایجاد کنند. فرض براین است که این سلول‌ها که در تومورها به عنوان یک جمعیت مشخص باقی می‌مانند، با ایجاد تومورهای جدید باعث عود بیماری و متاستاز می‌شوند. بنابراین، توسعه روش‌های درمانی خاص علیه CSC امید به بهبود بقا و کیفیت زندگی بیماران سرطانی، به ویژه برای بیماران مبتلا به بیماری سرطان متاستاتیک را افزایش می‌دهد.

۲. مدل تصادفی

برای اینکه یک سلول سرطانی شود باید تغییرات قابل توجهی در توالی DNA آن ایجاد شود. این مدل سلولی نشان می‌دهد که این جهش‌ها ممکن است در هر سلول از بدن منجر به سرطان شود. اساساً این تئوری پیشنهاد می‌کند که همه سلول‌ها توانایی تومورزایی دارند و باعث می‌شوند سلول‌های توموری خود تقسیمی و تمایز انجام دهند و منجر به ناهمگونی توموری شوند. پتانسیل سلولی می‌تواند تحت تأثیر عوامل پیش بینی نشده ژنتیکی یا محیطی قرار گیرد و در نتیجه سلول‌های متنوعی از نظر فنوتیپی هم در سلول‌های تومورزا و هم در سلول‌های غیر تومورزا که مجموعاً تومور را تشکیل می‌دهند، ایجاد شود. طبق "مدل تصادفی" هر سلول سرطانی در یک تومور، می‌تواند توانایی خود تقسیمی و تمایز به دودمان های متعدد و ناهمگن سلول‌های سرطانی را که یک تومور را می‌سازند، بدست آورد. این جهش‌ها می‌توانند به تدریج منجر به تجمیع و افزایش مقاومت و تناسب سلول‌ها شوند که به آن‌ها اجازه می‌دهد تا از سلول‌های دیگر تومور، که به عنوان نمونه‌هایی از تکامل پیکری بدن هستند، پیشی بگیرند.



شکل-۱۰۱ مدل های تکثیر سلول های توموری. الف) مدل تصادفی: سلول‌های توموری ناهمگن هستند و هر سلول احتمال تکثیر گسترده و تشکیل تومورهای جدید دارد. طبق این مدل، تغییرات ژنتیکی منجر به توسعه و پیشرفت بدخیمی در تمام سلولهای داخل تومور است. رویکردهای درمانی و تحقیقاتی موجود با هدف سلول‌های تومور تا حد زیادی بر اساس این مدل است. (ب) مدل سلول بنیادی سرطانی: سلولهای توموری ناهمگن هستند، اما اکثر سلول‌ها فقط توانایی تکثیر محدود دارند و فقط زیر مجموعه کوچکی از سلولهای سرطانی توانایی شروع رشد جدید تومور را دارند. طبق این مدل، این سلولهای بنیادی سرطانی از نظر زیست شناختی و عملکردی از سلولهای تومور متمایز هستند و برای دستیابی به درمان دائمی باید توسط درمان های سرطانی هدف گذاری شوند. این مدل توسط خصوصیات اخیر CSC در تومورهای پستان و مغز پشتیبانی می شود.

۳) مهندسی بافت و پیوند عضو

سومین کاربرد درمانی زیست فناوری پزشکی، مهندسی بافت و پیوند عضو است. تصورکنید دچار سوختگی در ناحیه ای از دست شده اید و یا دچار نارسایی کلیه هستید و یا نیاز به ترمیم بافت یا اندام خود دارید، در این حالت بیوتکنولوژی پزشکی به کمک شما می آید. یکی از حوزه های مورد توجه بیوتکنولوژیست ها حوزه مهندسی بافت و پیوند عضو (اندام) است. پیوند عضو یک روش پزشکی است که در آن عضوی از بدن یک فرد جدا شده و در بدن فرد گیرنده قرار می‌گیرد تا جایگزین عضو آسیب دیده یا از دست رفته شود. اهدا کننده و گیرنده ممکن است در یک مکان باشند، یا اعضای بدن از مکانی که فرد دهنده در آن قرار دارد به به مکان دیگری منتقل شوند. به اندام‌ها و / یا بافت‌هایی که از خود فرد به بدن همان فرد پیوند زده می‌شود، اتوگرافت[1] می‌گویند. پیوندهایی که میان اعضای یک گونه انجام می‌شود آلوگرافت[2] می‌گویند. آلوگرافت‌ها می‌توانند از یک منبع زنده یا جنازه باشند.

تا به امروز اندام‌هایی مانند قلب، کلیه، کبد، ریه‌ها، لوزالمعده، روده، تیموس و رحم و بافت‌هایی مانند استخوان، تاندون (هر دو به عنوان پیوند اسکلتی عضلانی)، قرنیه، پوست، دریچه‌های قلب، اعصاب و رگ ها به صورت موفقیت آمیز پیوند زده شده‌اند. در سراسر جهان، کلیه بیشترین تعداد عمل پیوند اندام را به خود اختصاص داده است و بعد از آن‌ها اندام‌هایی مانند کبد و قلب قرار دارند. قرنیه و اسکلت عضلانی، بافت‌هایی پیوندی هستند که در میان تمامی‌بافت‌ها بیشترین میزان پیوند را دارند، از طرفی تعداد پیوند سالانه این بافت‌ها بیش از ده برابر عمل‌های پیوند اندام است.

[1] autografts
[2] Allografts

اهدا کنندگان عضو ممکن است زنده یا با مرگ مغزی مرده باشند. برخلاف اندام‌ها، اکثر بافت‌ها (به استثنای قرنیه چشم) می‌توانند تا پنج سال حفظ و ذخیره شوند؛ یعنی در اصل می‌توان آن‌ها را در "بانک" نگهداری کرد.

تاریخچه‌ی مهندسی بافت و پیوند عضو

سال ۱۹۰۵: اولین پیوند قرنیه موفقیت آمیز توسط ادوارد زیرم[1]

پیوند قرنیه انسان (کراتوپلاستی[2]) در طول دهه ۱۸۰۰ با استفاده از قرنیه اهدا کننده حیوان و بافت پیوندی انسان با موفقیت کم یا حتی با شکست آزموده شده بود. بافت اهدا کننده اعم از حیوانی یا انسانی می‌تواند به صورت دیسک با ضخامت کامل قرنیه یا با ضخامت جزئی قرنیه (لاملا[3]) به چشم میزبان پیوند شود. در اواخر دهه ۱۸۸۰، گمان می‌شد که پیوند لاملا شانس موفقیت بیشتری نسبت به پیوند قرنیه کامل که همگی چند روز پس از عمل پیوند از بین می‌رفتند، دارد. در سال ۱۹۰۵، زیرم با آلوئیس گلوگار[4]، کارگر ۴۵ ساله‌ای از یک شهر کوچک در جمهوری چک مواجه شد که یک سال قبل قرنیه هر دو چشمش به واسطه کار با آهک، سفید مایل به خاکستری و مات شده بود. همان زمان با معاینه گلوگار، پسری ۱۱ ساله به نام کارل براوئر[5] با آسیب دیدگی غیرقابل برگشت از ناحیه هر دو چشم به وسیله اجسام خارجی (فلزات آهنی) به کلینیک زیرم آورده شد. هنگامی‌که تلاش برای نجات چشم براوئر ناموفق بود، زیرم با اجازه پدر پسر، قرنیه‌ها را برای پیوند به چشم‌های گلوگار جدا و ذخیره کرد. اگرچه عوارض عمل، یک چشم را تحت تأثیر قرار داد، ولی چشم دیگر همچنان شفاف شد و برای گلوگار امکان بازگشت به کار را فراهم کرد. عمل جراحی و فرآیندهای

[1] Eduard Zirm
[2] keratoplasty
[3] lamellae
[4] Alois Glogar
[5] Karl Brauer

بهبودی پس از آن در آن زمان دشوار بود؛ زیرا بدون میکروسکوپ و ابزارهای جراحی، بخیه زدن قرنیه دهنده به بافت میزبان غیرممکن بود. زیرم توانست با موفقیت بافت ملتحمه[1] را به محل خود در فرد گیرنده پیوند بزند. در طول قرن بیستم، پیشرفت‌های موازی در ساخت میکروسکوپ، بیهوشی، ابزار جراحی میکروسکوپی و بی‌حسی منجر به موفقیت روزافزون کراتوپلاستی شد. روش زیرم همچنان پایه‌ای برای ترمیم آسیب قرنیه است.

پیوند، موضوعات اخلاق زیستی زیادی را ایجاد می‌کند، از جمله چگونگی تعریف مرگ، زمان و چگونگی دریافت رضایت برای پیوند عضو و پرداخت پول برای اهدای عضو. سایر موارد اخلاقی شامل جا به جایی عضو پیوندی و به طور گسترده‌تر مباحث اقتصادی - اجتماعی است که در طی تهیه و یا پیوند عضو ممکن است اتفاق بیفتد. یک مشکل خاص قاچاق اعضای بدن است. همچنین مسئله اخلاقی دیگری که وجود دارد این است که به بیماران امید کاذب داده نشود. پزشکی پیوند، یکی از زمینه‌های چالش برانگیز و پیچیده پزشکی مدرن است. یکی از چالش برانگیزترین حوزه‌های آن، مسئله رد پیوند است، که در طی آن بدن پاسخ ایمنی به اندام پیوند شده می‌دهد، که بدین ترتیب احتمالاً منجر به نارسایی پیوند می‌شود. در این صورت نیاز به خارج شدن سریع عضو از فرد گیرنده است. در صورت امکان، رد پیوند را می‌توان از طریق سروتایپینگ برای تعیین مناسب ترین فرد برای اهدای عضو نسبت به فرد گیرنده و همچنین استفاده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی کاهش داد. تمام موارد ذکر شده دانشمندان را به سمت تولید بافت‌های مصنوعی با کمک تکنولوژی مهندسی بافت سوق داده است. (سروتایپینگ: اشاره به بررسی سروتایپ دارد. سروتایپ یک تنوع مشخص در یک گونه است که بر اساس آنتی‌ژن‌های سطحی‌شان طبقه‌بندی می‌شوند و امکان طبقه‌بندی موجودات در سطح زیرگونه‌ها را فراهم می‌کند.)

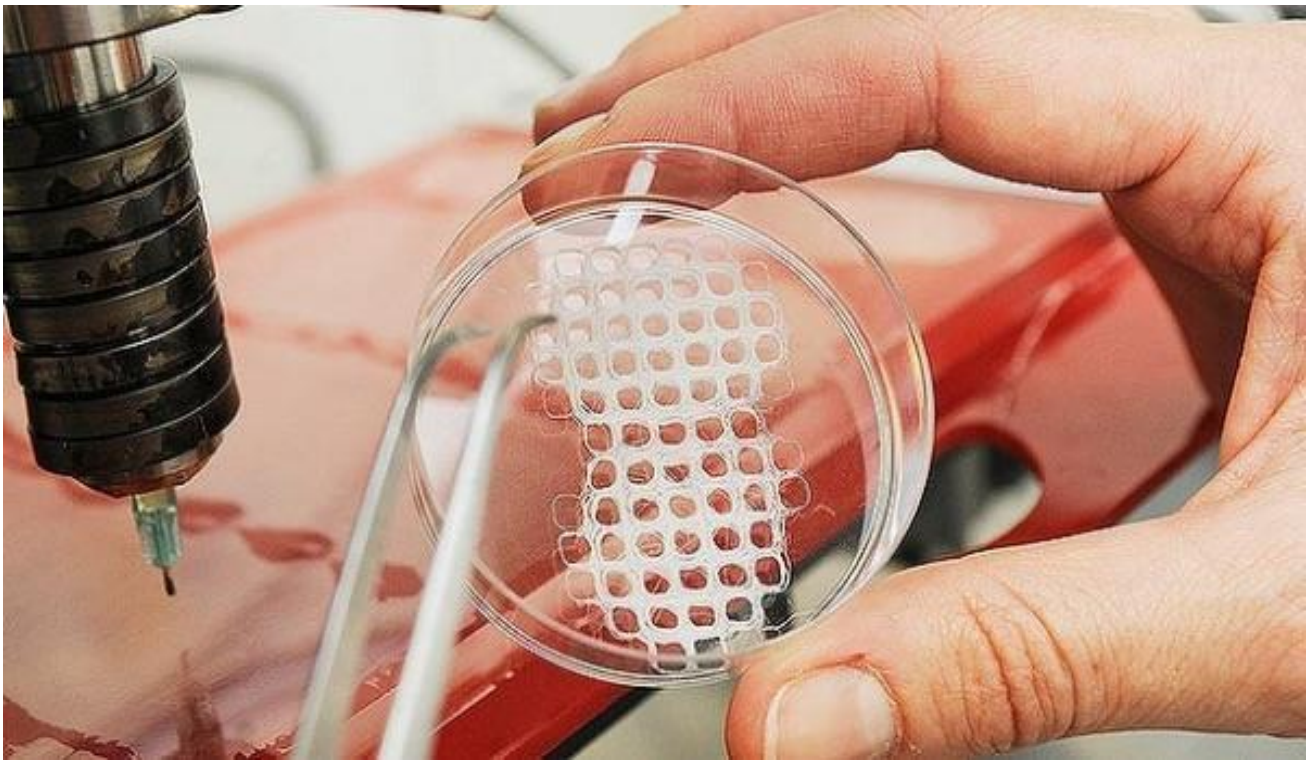
[1] conjunctival

مهندسی سلول و بافت شامل مطالعه و رشد آزمایشگاهی مولکول‌ها و سلول‌ها در بافت یا اندام، به منظور جایگزینی یا ترمیم بخش‌های از دست رفته‌ی بدن است. مهندسی بافت درواقع از ترکیب سلول‌ها، مهندسی مواد و عامل فیزیک وشیمیایی یا بیوشیمیایی برای بازسازی، حفظ، بهبود یا جایگزینی انواع مختلفی از بافت‌های زیستی بهره می‌گیرد. فناوری مهندسی بافت مستلزم رشد شبکه‌های پیچیده و سه بعدی سلولی برای دستیابی به بافت یا عضو موردنظر است. براین اساس دستیابی به یک بافت به شیوه‌های مهندسی نیازمند داربستی[1] با جنس و ساختار فیزیکی ویژه است که امکان چسبندگی سلول‌ها به آن، مهاجرت سلولی، تبادلات سلولی، تکثیر سلولی، تمایز، رشد و در کل همه‌ی وظایف و ویژگی‌های سلولی برای داشتن یک بافت سالم فراهم آید. این حوزه در واقع حاصل ارتباط تنگاتنگ علم زیست پزشکی، مهندسی و طراحی است. مهندسی بافت اغلب شامل قرار دادن سلول‌ها در داربست‌های بافتی در قالب یک بافت زنده‌ی جدید برای یک هدف پزشکی است اما محدود به استفاده از سلول‌ها و داربست‌ها نیست. با این که مهندسی بافت در ابتدا شاخه‌ای از زیست‌مواد[2] بود، با رشد و افزایش اهمیت آن می‌تواند به عنوان یک حوزه‌ی مستقل در نظر گرفته شود. می‌توان گفت توسعه‌ی مهندسی بافت در گروِ تکامل زیست ماده است.

درحالی که بیشتر تعاریف مربوط به مهندسی بافت، طیف گسترده‌ای از کاربردها را شامل می‌شود، اما در عمل واژه‌ی مهندسی بافت ارتباط تنگاتنگی با بازسازی یا جایگزینی بخش‌هایی از بافت یا کل بافت (برای مثال استخوان، غضروف، رگ‌های خونی، مثانه، پوست، ماهیچه و...) دارد. اغلب، بافت‌های درگیر در فرآیند مهندسی بافت برای عملکرد صحیح به ویژگی‌های ساختاری و مکانیکی خاصی نیاز دارند. اصطلاح مهندسی بافت را برای تلاش‌های صورت گرفته در عملیاتی

[1] scaffold
[2] biomaterial

کردن عملکردهای بیوشیمیایی خاص با استفاده از قراردادن سلول‌ها درون سیستمی که به روش مصنوعی تولید شده نیز به کار برده‌اند (برای مثال یک پانکراس مصنوعی یا یک کبد مصنوعی).



شکل-۱۰۲ دانشمندان از سال‌ها پیش قادر به کشت سلول‌ها در خارج از بدن بودند اما فناوری رشد شبکه‌های سه بعدی سلولی، با هدف جایگزینی آن به جای بافت آسیب دیده، اخیراً میسر شده‌است.

اولین بار در سال ۱۹۰۰ الکسی کارل[1] واژه‌ی مهندسی بافت را مطرح نمود. او به همراه لیندربرگ در انستیتوی مطالعاتی در نیویورک با هدف نگهداری بافت‌های جدید در شرایط آزمایشگاهی و جایگزینی آن‌ها در بدن موجود زنده آزمایش‌هایی را آغاز نمود. اولین تلاش در حوزه‌ی مهندسی بافت در دهه‌ی ۱۹۷۰ رخ داد که حاصل دست‌رنج یک جراح ارتوپد

[1] Alexie Carl

کودکان بود. آزمایشات او با هدف تولید بافت غضروفی جدید با استفاده از سلول‌های اولیه‌ی غضروفی نشات گرفته از خارهای استخوانی صورت گرفت. وی از موش‌های نود[1] به عنوان میزبان برای این سلول‌ها کمک گرفت. گرچه آزمایشات او چندان موفقیت آمیز نبود اما در نهایت به این نتیجه رسید که با به کارگیری مواد نوین زیست سازگار، داشتن سلول‌های زنده و همچنین ساختار داربستی مناسب می توان بافتی جدید تولید کرد. سال‌ها بعد جمعی از پزشکان بیمارستان ماساچوست با همکاری یکدیگر مطالعاتی چه در سطح آزمایشگاهی و چه بر روی انسان به انجام رساندند. تلاش آن‌ها تولید بافت پوست مهندسی شده با استفاده از ماتریکس کلاژنی به منظور کمک به رشد سلول‌های اولیه‌ی پوست بود که در نهایت روی یک بیمار نیز آزمایش شد. از آن پس به تدریج مهندسی بافت به عنوان یک زمینه یا شاخه جدیدی از علم شروع به گسترش نمود.

[1] nude mouse

شکل-۱۰۳ در این تصویر، بافت پوست مصنوعی را می‌بینید که با هدف ترمیم پوست آسیب‌دیده در اثر سوختگی یا جراحات شدید، به فرد پیوند زده می‌شود.

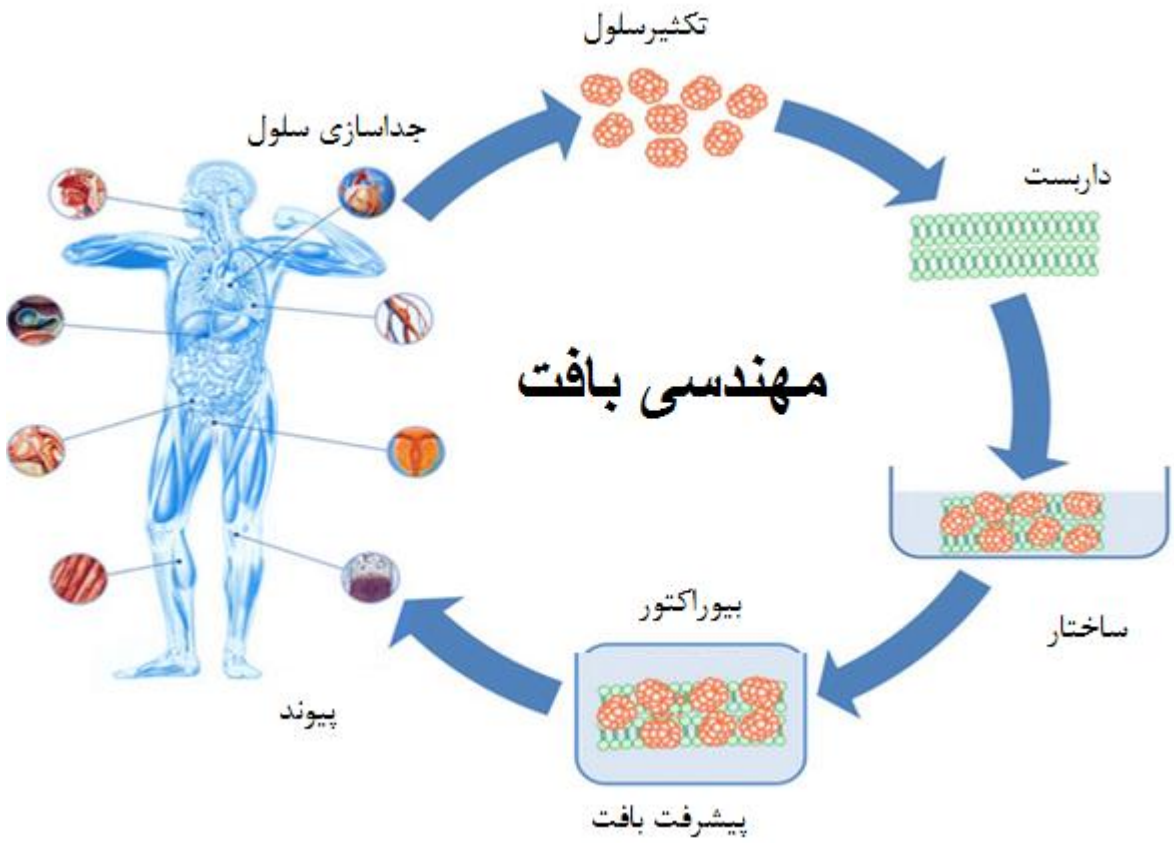
در آگوست ۱۹۹۷ دکتر چالرز وکانتی[1] از بیمارستان ماساچوست بوستون، داربستی به شکل گوش انسان ساخت. او ابتدا سلول‌های غضروف (کندروسیت) گاو را روی آن داربست کشت داد و سپس آن را به یک موش آزمایشگاهی پیوند زد. پیوند موفقیت آمیز بود، به طوری که پس از مدتی گوش جزو بافت‌های بدن موش شد و به هیچ عنوان توسط سیستم ایمنی بدن موش پس زده نشد. البته این گوش هرگز به انسان پیوند زده نشد، زیرا از سلول‌های غضروف گاو تهیه شده بود و پیش‌بینی می‌شد که توسط سیستم ایمنی انسان بیگانه شناسایی شده و پس زده شود. سال‌ها بعد فردی با نوعی بیماری نادر به نام سندرم لهستان به دنیا آمد که فاقد استخوان در نیمه‌ی چپ قفسه‌ی سینه‌اش بود. با این شرایط، اندام های نیمه چپ بدن او نظیر ریه و قلب با قفسه سینه محافظت نمی شدند؛ دکتر وکانتی و برادرش از فناوری مشابه در تجربه موشِ گوش برپشت برای ایجاد غضروف دنده‌ها در نجات جان این کودک استفاده کردند. پس از گذشت یک سال قفسه سینه او با ظاهر طبیعی حاصل شد و به عنوان یکی از پیوندهای موفقیت آمیز مهندسی بافت در یادها ماند.

[1] Charles Vacanti

شکل-۱۰۴ موشی که در تصویر می‌بینید، موش نود نامیده می‌شود که در پیوندهای آزمایشی، مانند آزمایشی که دکتر چالرز وکانتی انجام داد، مورد استفاده قرار می گیرد. ویژگی این موش‌ها این است که دارای نقص در سیستم ایمنی خود هستند؛ بنابراین برای انجام پیوند مناسب‌ترند و احتمال پس زدن پیوند کمتر است.

یک بافت از چه اجزایی تشکیل شده است

برای آشنایی با چگونگی فرایند تولید یک بافت مهندسی شده بهتر است ابتدا شناخت مختصری از بافت داشته باشیم. بدن انسان در اولین سطح از واحدهای سازنده‌ی زنده و مستقلی به نام سلول ساخته شده است، اجتماع سلول‌ها، بافت‌ها را تشکیل می‌دهند و بافت‌ها واحدهای اصلی عملکردی در بدن هستند. مجموع چند بافت یک اندام را می‌سازد و نهایتاً چند اندام یک دستگاه را به وجود می‌آورند و بدن مجموعه‌ای از دستگاه‌ها است.

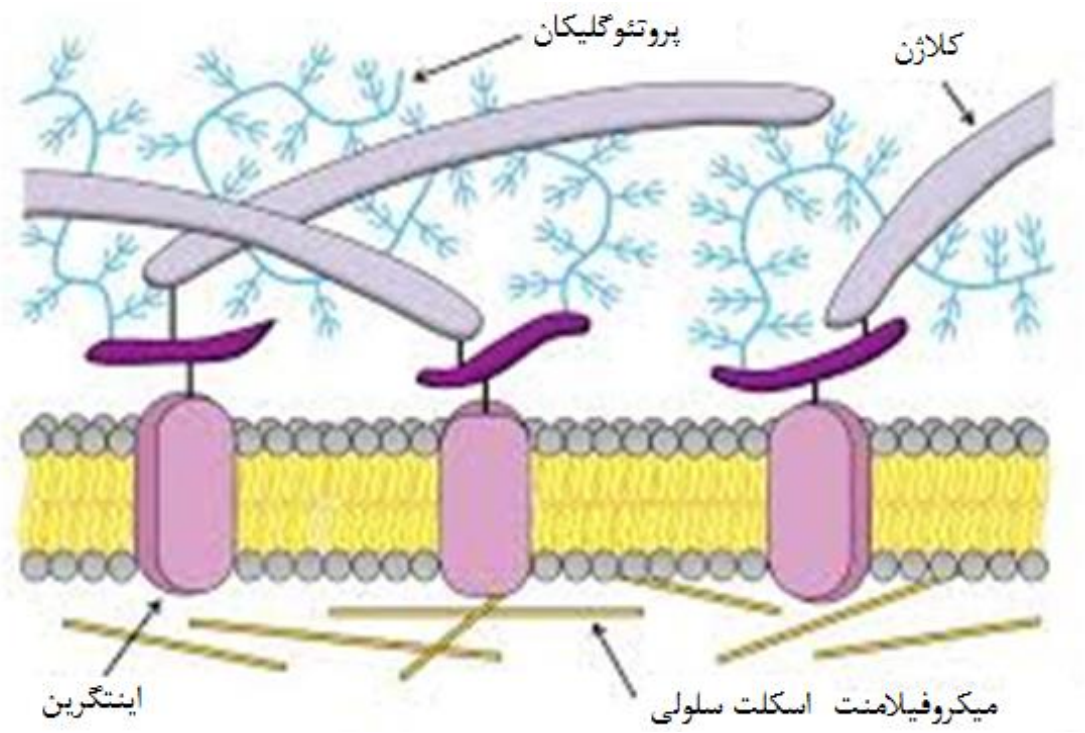


شکل-۱۰۵ نقطه‌ی آغاز مهندسی بافت، دستیابی به سلول‌های بدن شخص است. بدین ترتیب احتمال پس زدن پیوند و واکنش سیستم ایمنی نسبت به بافت تولیدشده به روش مهندسی بافت، کمتر می‌شود.

سلول‌ها در ریزمحیطی قرار گرفته‌اند که در مقیاس کوچکتر از آن عملکرد بافت مشاهده نمی‌شود و اگر بخواهیم شرایط محیط زندگی سلول در بدن را بشناسیم باید درک صحیحی از این زیستگاه سلول پیدا کنیم و این تمام مفهوم مهندسی بافت است؛ تقلید کردن ریزمحیط طبیعی سلول با تمام پیچیدگی‌هایش توسط تکنیک‌های مهندسی. ریزمحیط یا همان محل زندگی سلول شامل هر گونه مولکول، سلول و پیام هایی است که اطراف سلول را دربرگرفته‌اند. در این میان دو عامل مهم بیشتر از همه شناخته شده‌اند و توجه عمده محققان را به خود جلب کرده‌اند. یکی از این دو، بستری است

که سلول روی آن قرار دارد، به آن چسبیده و اتکا دارد. این بستر را ماتریکس خارج سلولی [1]می‌نامند که به طور عمده از پروتئین ها، پروتئوگلیکان ها و پلی ساکاریدها ساخته شده است. به طور کلی گروه‌هایی از سلول‌ها این ساختارهای حمایتی خود یعنی ECM را می‌سازند و ترشح می‌کنند. این ماده‌ی زمینه‌ای یا داربست، عملکردی فراتر از پشتیبانی از سلول‌ها دارد. دومین عاملی که در تعیین بسیاری از رفتارهای حیاتی سلول نقش دارد، مولکول های زیستی فعالی هستند که در محیط زیست اطراف سلول به حالت محلول وجود دارند. این مولکول‌ها سیگنال (پیام) هایی به مرکز فرماندهی سلول (هسته) ارسال می کنند و از این طریق رفتار سلول را تحت کنترل دارند. این ماده‌ی زمینه‌ای به عنوان محل قرارگیری انواعی از مولکول‌های پیام رسان عمل می‌کند. بنابراین پیام‌هایی که باید به سلول‌ها برسد، از طریق محیط محلی آن‌ها که همان ماده‌ی زمینه‌ای خارج سلولی است در دسترسشان قرار می‌گیرد. این پیام ها می توانند شامل پروتئین‌های کوچکی مانند فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها، استروئیدها و هورمون‌ها باشند. از این میان، فاکتورهای رشد از همه مهمترند و عمده تحقیقات بر آنها متمرکز شده است. هر سیگنال می‌تواند زنجیره‌ای از پاسخ‌ها را آغاز کند که تعیین‌کننده‌ی رخدادهای داخل سلولی است. با درک چگونگی پاسخ هر سلول به سیگنال‌ها، برهم‌کنش با محیط و چگونگی سازمان‌یافتگی بافت‌ها و اندام‌ها، محققان توانسته‌اند این فرآیندها را دستکاری کرده تا بافت‌های آسیب دیده را ترمیم و یا بافت‌های جدید بسازند. پس تا اینجا دانستیم که دو عنصر اساسی و نام آشنا در ریزمحیط سلول، ECM و فاکتورهای رشد هستند و بنابراین، برای تقلید ریز محیط باید این دو عنصر را به خوبی شناخته و سعی در شبیه‌سازی این محیط برای سلول کنیم.

[1] Extracellular Matrix (ECM)



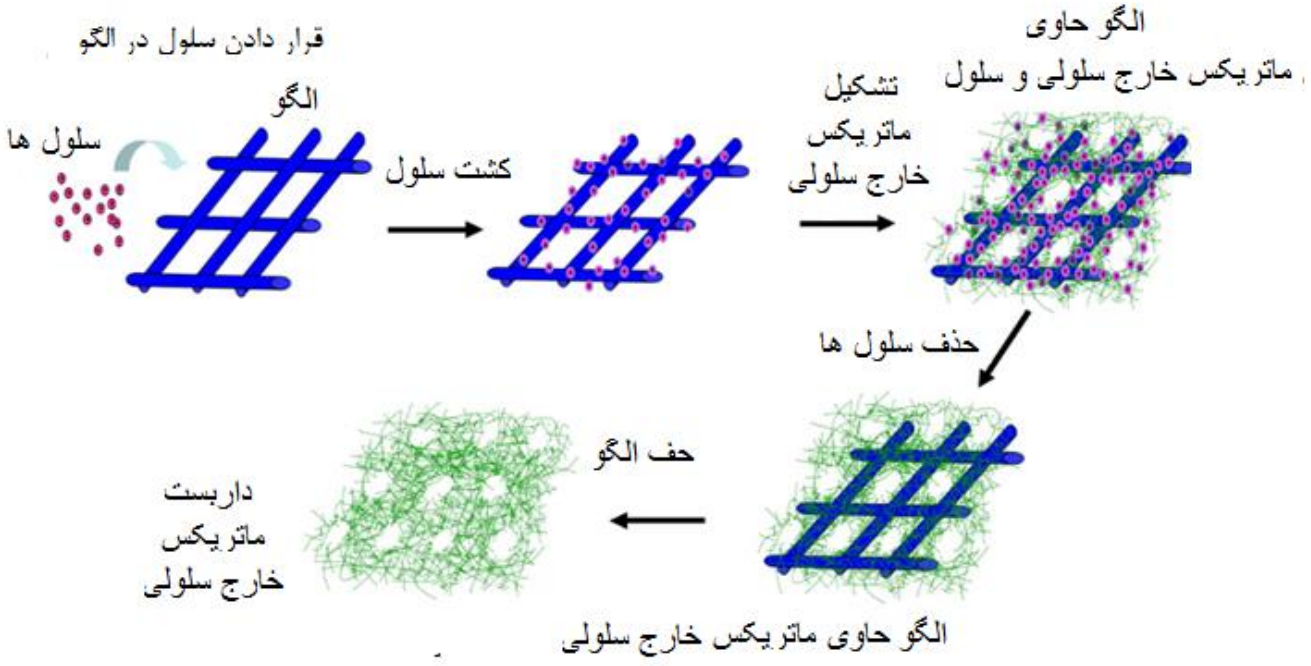
شکل-۱۰۶ ساختار ماتریکس خارج سلولی در یک بافت که شامل، پروتئوگلیکان‌ها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و یک سری مولکول‌های دیگر است.

اولین قدم در مهندسی بافت آن است که بستری مشابه با ECM طبیعی سلول بسازیم که سلول روی آن احساس آرامش کند، طوری که انگار دقیقاً روی همان بستر طبیعی خود قرار گرفته است. در واقع باید سلول را فریب دهیم تا محیط را بیگانه نداند و فعالیت طبیعی خود را به درستی انجام دهد. پس اولین نکته‌ای که در ساختن بستر باید رعایت کنیم آن است که جنس ماده سازنده آن کاملاً زیست‌سازگار باشد و برای سلول سمی و مضر نباشد. بنابراین این فرآیند اغلب با ساخت داربستی متشکل از مجموعه‌ی منابع گسترده از پروتئین‌ها گرفته تا پلاستیک‌ها، آغاز می‌شود. هنگامی که داربست ساخته شد، سلول‌ها را به همراه مجموعه‌ای از فاکتورهای رشد یا بدون آن‌ها وارد داربست می‌کنند. اگر محیط مناسب باشد، یک بافت ایجاد می‌شود. در برخی موارد، سلول‌ها، داربست‌ها و فاکتورهای رشد را از ابتدا با هم ترکیب

می‌کنند و اجازه می‌دهند تا بافت خودآرایی[1] انجام بدهد. این داربست نقش یک قالب را برای «بازتولید بافت»[2] ایفا می کند؛ فرایندی که در نهایت موجب رشد بافت جدید می‌شود.

در روش دیگر، سلول‌های اندامِ دهنده را جدا می‌کنند و از داربست کلاژنی به جا مانده برای رشد بافت جدید استفاده می‌کنند بنابراین در این حالت برای ساخت بافت جدید از داربست طبیعی موجود استفاده می‌کنند. برای مهندسی زیستی بافت‌های قلب، کبد، ریه و کلیه از این فرآیند استفاده شده است. این روش برای استفاده از بافت انسانی دورانداخته شده حین عمل جراحی به عنوان داربست و ترکیب آن با سلول‌های خود بیمار برای ساخت اندام‌های سفارشی که توسط سیستم ایمنی رد نمی‌شوند، نویدبخش است. ایده ای که درپس مهندسی بافت قرار دارد ساخت دو نوع اتوگرافت است، یکی با رشد دادن سلول‌های خود شخص در محیط آزمایشگاه که بر روی یک داربست انجام می‌شود و دیگری با کاشت یک داربست غیرسلولی در داخل بدن تا سلول‌های بدن بیمار، بافت آسیب دیده را با هدایت داربست ترمیم نمایند. درهر دو مورد، داربست باید همزمان با رشد بافت تخریب شود، بنابراین پس از تکامل و رشد بافت، داربست دیگر وجود نخواهد داشت و بافت تازه تولید شده، می تواند مانند بافت از دست رفته عمل کند.

[1] self-assemble
[2] tissue regeneration



شکل-۱۰۷ چگونگی تهیه‌ی داربست با ماهیت ماتریکس خارج سلولی.

مراحل تهیه‌ی داربست با ماهیت ماتریکس خارج سلولی از چند مرحله تشکیل شده است:

۱. تهیه‌ی قالب (الگو)

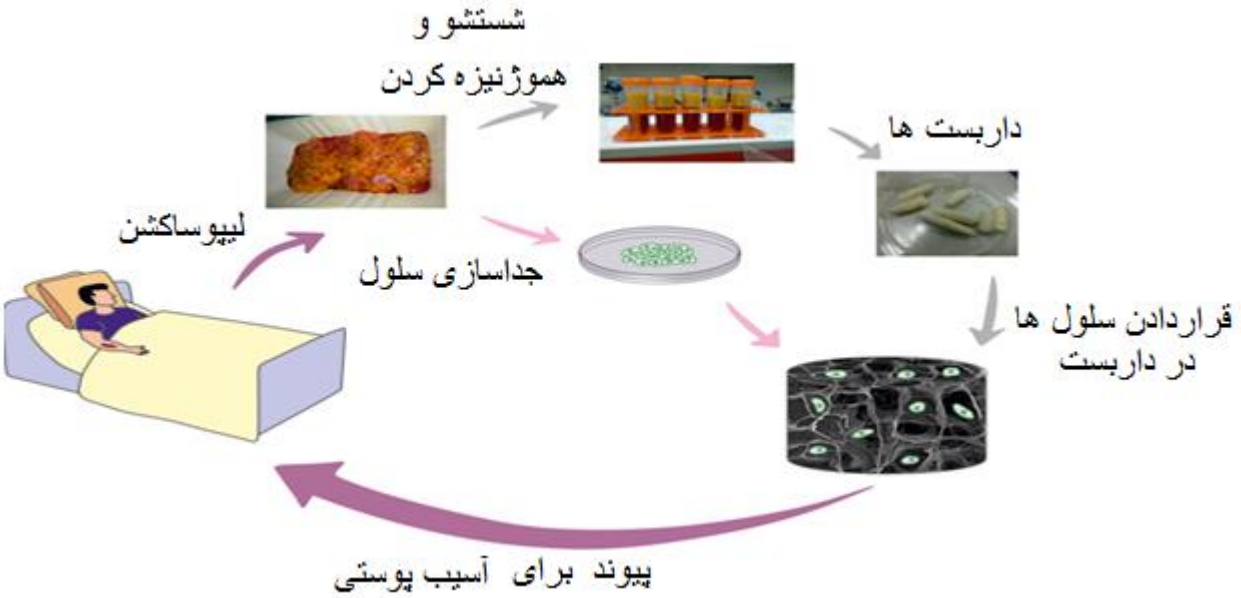
۲. قرار دادن سلول‌ها بر روی الگو

۳. شکل گیری ماتریکس خارج سلولی

۴. از بین بردن سلول ها

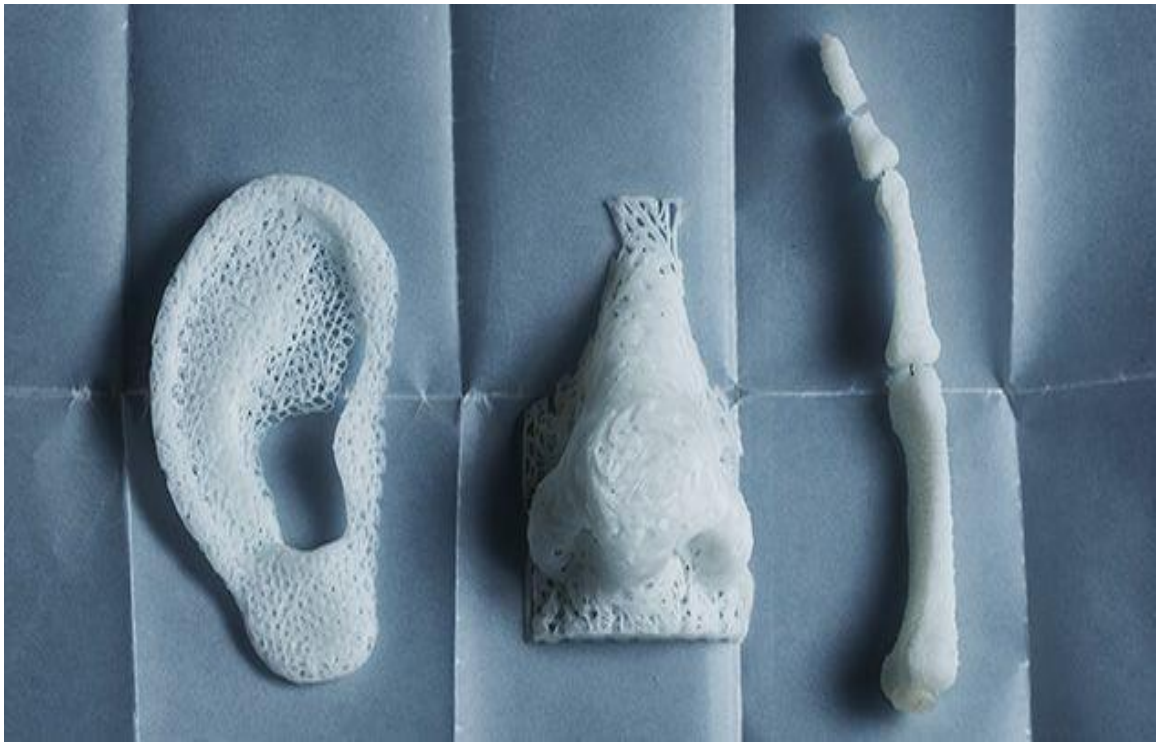
۵. شکل گیری ترکیب مارتریکس خارج سلولی-قالب

۶. از بین بردن قالب و در نهایت بوجود آمدن داربستی از جنس ماتریکس خارج سلولی



شکل-۱۰۸ در این تصویر، روی بیماری که دچار جراحت پوستی شده، عمل لیپوساکشن (چربی کشی) انجام می‌شود. بافت چربی را به آزمایشگاه برده و سلول‌های فرد را از آن استخراج کرده و در محیط آزمایشگاه رشد می‌دهند. همچنین با استفاده از مواد بافت چربی، داربست طراحی و ساخته می‌شود. در مرحله‌ی بعد سلول‌ها را در داربست قرار می دهند تا بافت جدید شکل گیرد. پوست مصنوعی را به محل آسیب‌دیده از بدن شخص پیوند می‌زنند. در مهندسی بافت ابتدا یک ماده متخلخل (دارای حفره‌های ریز) به عنوان ماتریکس خارج سلولی یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه شده و سپس عوامل رشد بر روی آن قرار می‌گیرد. پس از رشد مناسب سلول‌ها در فضای تخلخل‌ها، داربست از محیط آزمایشگاه به درون بدن موجود زنده منتقل می‌شود. پس از این انتقال، مرحله‌ی بعد نفوذ رگ‌های خونی به داربست است تا بتوانند سلول‌ها را تغذیه نمایند. در غیر این صورت پیوند در همین مرحله با شکست روبه رو می شود. در مورد بقای داربست در بدن فرد، برای بافت‌های مختلف متفاوت است به‌طوری که در بافت‌های نرم بدن الزاماً داربست مصنوعی تخریب شده و بافت جدید (که بطور طبیعی توسط بیمار ساخته می‌شود) جایگزین آن می‌شود ولی در بافت‌های سخت مانند استخوان، می‌توان جنس داربست‌ها را طوری در نظر گرفت که در بدن بیمار باقی بمانند و تخریب نشوند.

مهندسی بافت شاخه ای از پزشکی بازساختی[1] و مهندسی زیست‌پزشکی است. دغدغه‌ی اصلی در این حوزه جایگزینی و یا بازساخت سلول ها، بافت‌ها (تمرکز اصلی مهندسی بافت) و یا اندام هاست تا در نهایت به عملکرد زیستی طبیعی خود دست یابند. با وجود پیشرفت‌های زیادی که در زمینه مهندسی بافت انجام شده است اما تلاش بیشتر برای جایگزینی اندام و بافت ضروری است. بزرگ‌ترین آرزوی پژوهشگران این حیطه ساخت اندام‌هاست که از چندین نوع بافت و سلول تشکیل شده‌اند. اگرچه با توجه به پیچیدگی اندام‌ها تا رسیدن به این مرحله فاصله زیادی در پیش است.

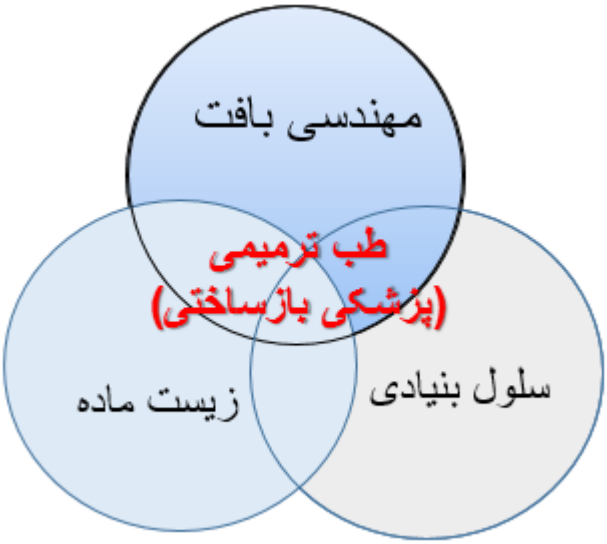


شکل-۱۰۹ استفاده از پرینترهای سه بعدی، مهندسین بافت را بیش از پیش به آینده امیدوار کرده‌است! گفته می‌شود با به‌کارگیری این پرینترها برای ساخت داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر[2]، امکان ساخت بافت‌های بیرونی (مانند اجزای چهره) و درونی (مانند رگ‌ها) تا دو دهه‌ی آینده فراهم خواهدشد.

[1] Regenerative medicine
[2] biodegradable

حوزه مهندسی بافت در زیست‌فناوری پزشکی به ترکیب داربست‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های فعال زیستی و وارد کردن آن‌ها به بافت‌های کارآمد اشاره دارد. هدف اصلی مهندسی بافت سرهم کردن ساختارهای کارآمدی است که قابلیت ترمیم، ماندگاری و بهبود بافت‌های آسیب دیده یا کل یک اندام را داشته باشند. پوست مصنوعی و یا غضروف مصنوعی مثال‌هایی از مهندسی بافت هستند که تاکنون به تایید سازمان جهانی غذا و دارو رسیده اند و در حال حاضر نیز به طور محدود در بیماران مورد استفاده قرار می گیرند. پزشکی بازساختی حوزه‌ی گسترده‌تری است که مهندسی بافت را نیز مشمول می‌شود و همچنین با « خود-ترمیم شونده»[1] نیز آمیخته است. خود-ترمیم شوندگی فرایندی است که طی آن بدن از سیستم‌های خود و گاهاً از مولکول‌های زیستی برای بازتولید سلول‌ها و بازسازی بافت‌ها و اندام‌ها کمک می گیرد. دو عبارت «مهندسی بافت» و «پزشکی بازساختی» این روزها به جای یکدیگر نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند، چراکه هدف مشترک هر دو تمرکز بر «بهبودی» به جای «درمان‌های پزشکی» برای بیماری‌های پیچیده و بعضاً مزمن است. اگرچه افرادی که کار پزشکی بازساختی انجام می‌دهند بیشتر بر استفاده از سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پیش‌ساز برای تولید بافت تأکید دارند درحالیکه مهندسی بافت به یک یا چند مورد از موارد زیر اطلاق می‌شود: "فقط به کارگیری سلول‌ها"، "سلول‌ها به همراه داربست" یا "عوامل القاکننده‌ی بافت".

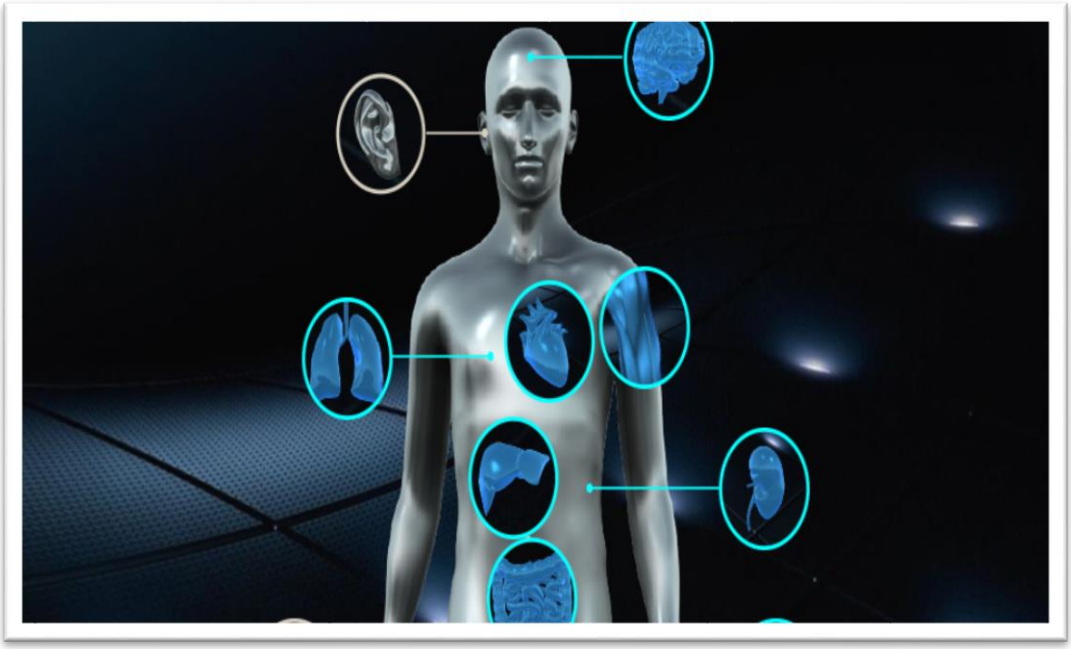
[1] self-healing



شکل-۱۱۰ همپوشانی مهندسی بافت، زیست ماده و درمان با سلول‌های بنیادی که همگی زیرمجموعه‌ی «پزشکی بازساختی» هستند.

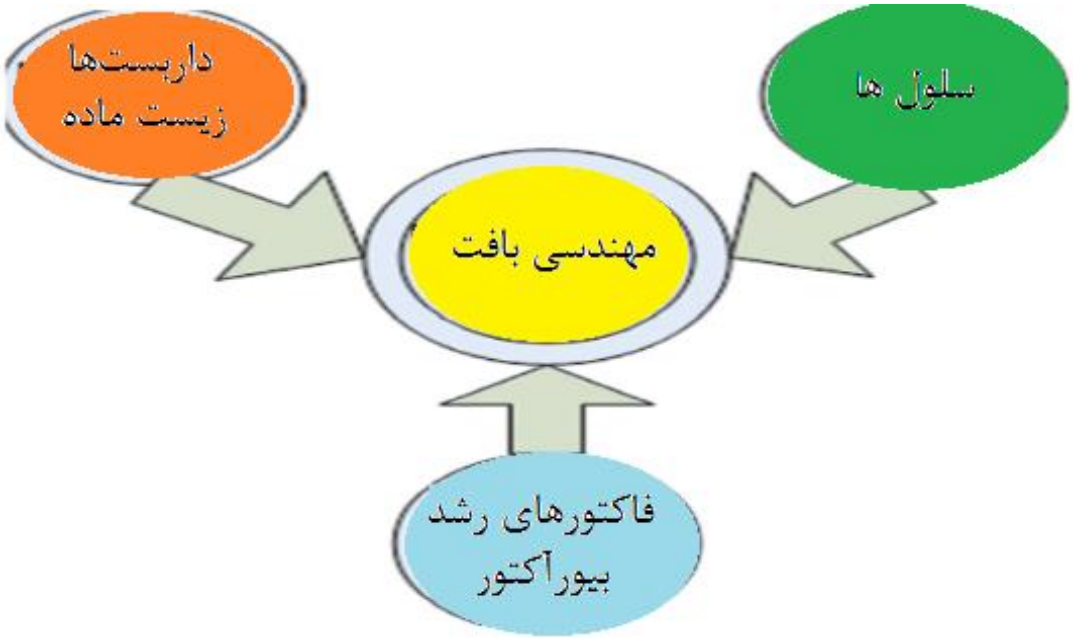
روزانه هزاران جراحی به منظور جایگزینی و ترمیم بافت آسیب دیده (در اثر یک بیماری یا حادثه) صورت می گیرد. این حوزه همچنان رو به تکامل و پیشرفت است. علاوه بر کاربردهای پزشکی، کاربردهای غیر درمانی نیز دارد که می‌توان به استفاده از بافت به عنوان بیوسنسورهای (حسگرهای زیستی)[1] به منظور شناسایی عوامل تهدیدآمیز زیستی و شیمیایی و همچنین استفاده از تراشه‌های[2] بافت برای آزمایش میزان سمیت یک دارو، اشاره کرد.

[1] biosensors
[2] chip



شکل-۱۱۱ تراشه‌های بافتی دقیقاً مشابه ساختار و عملکرد اندام‌های بدن انسان، مانند قلب، ریه، کلیه و غیره طراحی و مدل سازی شده اند. محققان با توسعه و به کارگیری این مدل‌ها می توانند به نحوی سریعتر و کارآمدتر، میزان سمیت یا بی خطر بودن دارو، واکسن یا هر عامل زیستی را در بدن انسان پیش بینی کنند.

مهندسی بافت یک حوزه‌ی چندگانه است و متخصصان علوم مختلف نظیر پزشکی بالینی، مهندسی مکانیک، علوم مواد، ژنتیک و بسیاری از علوم دیگر را به چالش می کشد. باتوجه به تعریف بیورآکتور (به هر وسیله یا سیستمی گفته می‌شود که انواع مختلفی از محرک‌های شیمیایی و مکانیکی را در برابر سلول اعمال می کند) حتی می توان گفت داربست ها در نقش بیورآکتور نیز عمل می کند زیراکه این داربست‌ها بستر مساعدی جهت شکل گیری بافت ایجاد کرده و معمولاً با سلول ها و گاهی اوقات با فاکتورهای رشد یا محرک‌های بیوفیزیکی همراه هستند.



شکل-۱۱۲ مهندسی بافت ترکیب سه گانه ای از سلول ها، سیگنال‌ها (سیگنال‌های شیمیایی که از طریق فاکتورهای رشد به وجود می آیند و سیگنال‌های فیزیکی که از طریق بیورآکتور ایجاد می شوند) و داربست‌هایی از جنس زیست ماده است.

ویژگی های اختصاصی داربست های مهندسی بافت

این داربست باید چه ویژگی‌هایی داشته باشد تا امکان شناسایی، مهاجرت، استقرار، رشد سلول و در نهایت شکل گیری بافت جدید فراهم آید:

۱- زیست سازگاری:

از مهمترین خواص یک داربست، سازگاری آن با بدن فرد است. بدین معنی که منجر به واکنش ایمنی و پاسخ‌های التهابی نشود، چرا که در این صورت روند درمان با مشکل روبه رو شده و ممکن است پیوند بافت پس زده شود.

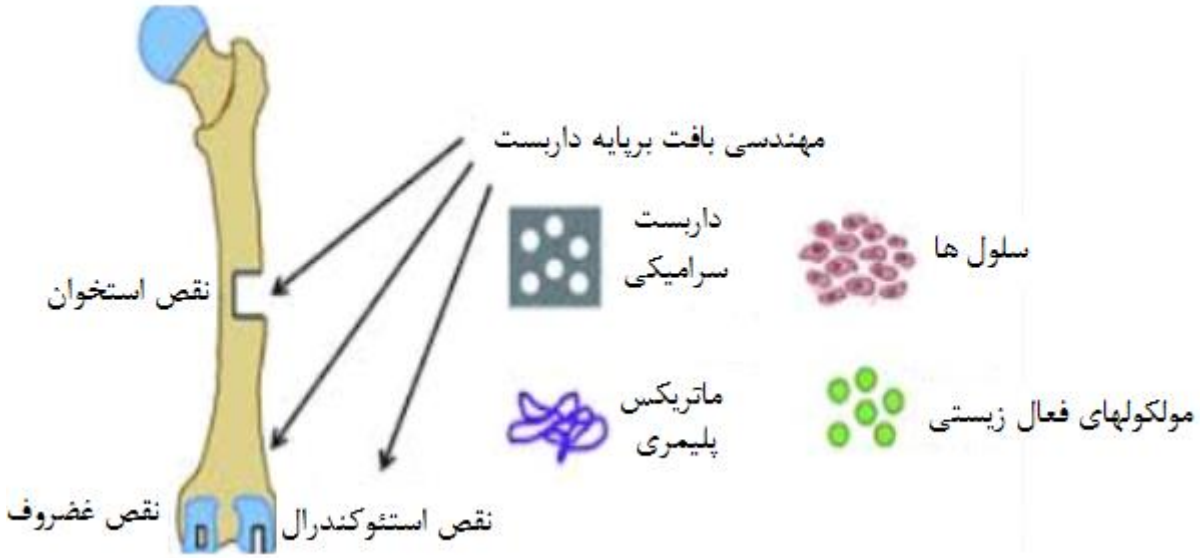
۲- زیست تخریب پذیری[1]:

دومین ویژگی مهم داربست‌ها زیست تخریب پذیری آن هاست. داربست‌ها عموماً پس از پیوند در بدن از بین می روند. زیست تخریب پذیری داربست به سلول‌ها امکان تولید ماتریکس خارج سلولی را می دهد. همینطور تجزیه‌ی داربست در بدن نباید هیچگونه مواد سمی را در بدن ایجاد کند و بدون تداخل با اندام‌ها از بدن خارج شود. سیستم ایمنی و سلول‌های ایمنی، نظیر ماکروفاژ، در فرایند هضم و تجزیه‌ی داربست‌ها نقش مهمی ایفا می کنند.

۳- ویژگی‌های مکانیکی:

داربست‌ها باید از ویژگی‌های مکانیکی و مقاومت مناسبی برخوردار باشند بطوریکه بتوانند در طول فرایند جراحی پیوند و تا مدتی در بدن ساختار خود را حفظ کنند. این خصوصیت در مورد داربست‌های مربوط به بافت قلبی عروقی، استخوانی و غضروفی چالش برانگیزتر است.

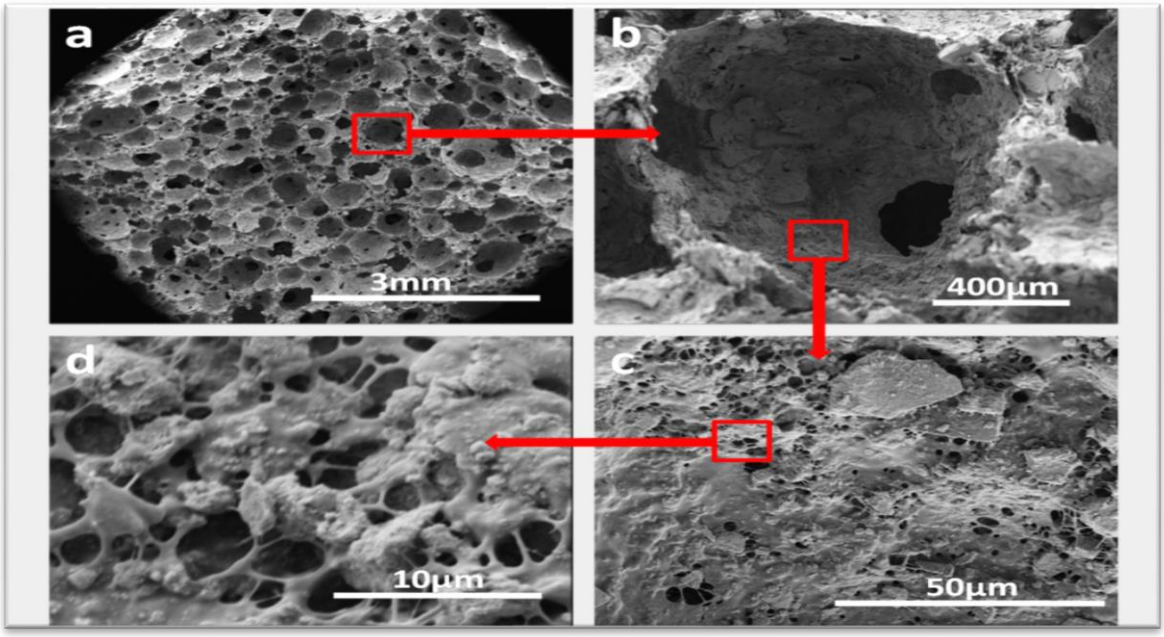
[1] biodegradable



شکل-۱۱۳ با بهره‌گیری از داربست سرامیکی، ماتریکس خارج سلولی مصنوعی و مولکول‌های زیستی فعال در کنار سلول‌های بدن شخص، درنهایت منجر به ترمیم بافت غضروفی فرد شده‌اند.

۴- معماری داربست ها:

معماری و طراحی داربست نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. ساختار حفره‌ها که نفوذ و استقرار سلول‌ها به داخل داربست را فراهم می آورند و همچنین اندازه‌ی حفرات فاکتورهای مهمی در طراحی یک داربست مناسب هستند. حفره‌ها باید به اندازه‌ی کافی بزرگ باشند تا امکان انتقال سلول‌ها به داخل ساختار داربست وجود داشته باشد همینطور باید به حدی کوچک باشند که تعداد سلول‌های منتقل شده به داربست از حد مجاز بیشتر نباشد. بنابراین اندازه‌ی حفرات دامنه‌ی مشخصی دارد که به نوع سلول و نوع بافت مهندسی شده بستگی دارد.



شکل-۱۱۴ با توجه به کاربرد و عملکرد بافت مهندسی شده، داربست‌هایی با اندازه‌ی حفرات متفاوت ساخته می‌شوند.

۵- ویژگی های زیست‌ماده:

آخرین و شاید مهمترین فاکتور برای یک داربست مناسب، زیست‌ماده‌ای است که در فرایند ساخت داربست مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه زیست ماده نقشی تمام کننده را در علم پزشکی ایفا می کند؛ به طوری که در افراد بیمار یا دارای جراحت، به بازگشت عملکرد اندام‌ها کمک کرده و روند درمان را تسهیل می کند. زیست ماده می تواند طبیعی یا مصنوعی باشد و در مصارف پزشکی به منظور حفاظت، بهبود و یا جایگزینی بافت آسیب دیده یا عملکردهای حیاتی بدن مورد استفاده قرار می گیرد. اولین تجربه‌ی بهره گیری از زیست ماده به مصریان باستان برمی گردد که از رباط و زردپی حیوانات برای بخیه زدن کمک می گرفتند. اما شکل مدرن زیست ماده، ترکیبی از پزشکی، زیست شناسی، فیزیک، شیمی است که اخیراً از مهندسی بافت و علم مواد نیز الهام می گیرد. این حوزه در دهه‌ی اخیر رشد چشم‌گیری را تجربه کرده که آن‌ها مدیون یافته‌های مهندسی بافت و پزشکی بازساختی است به طوریکه مهندسی بافت و پزشکی

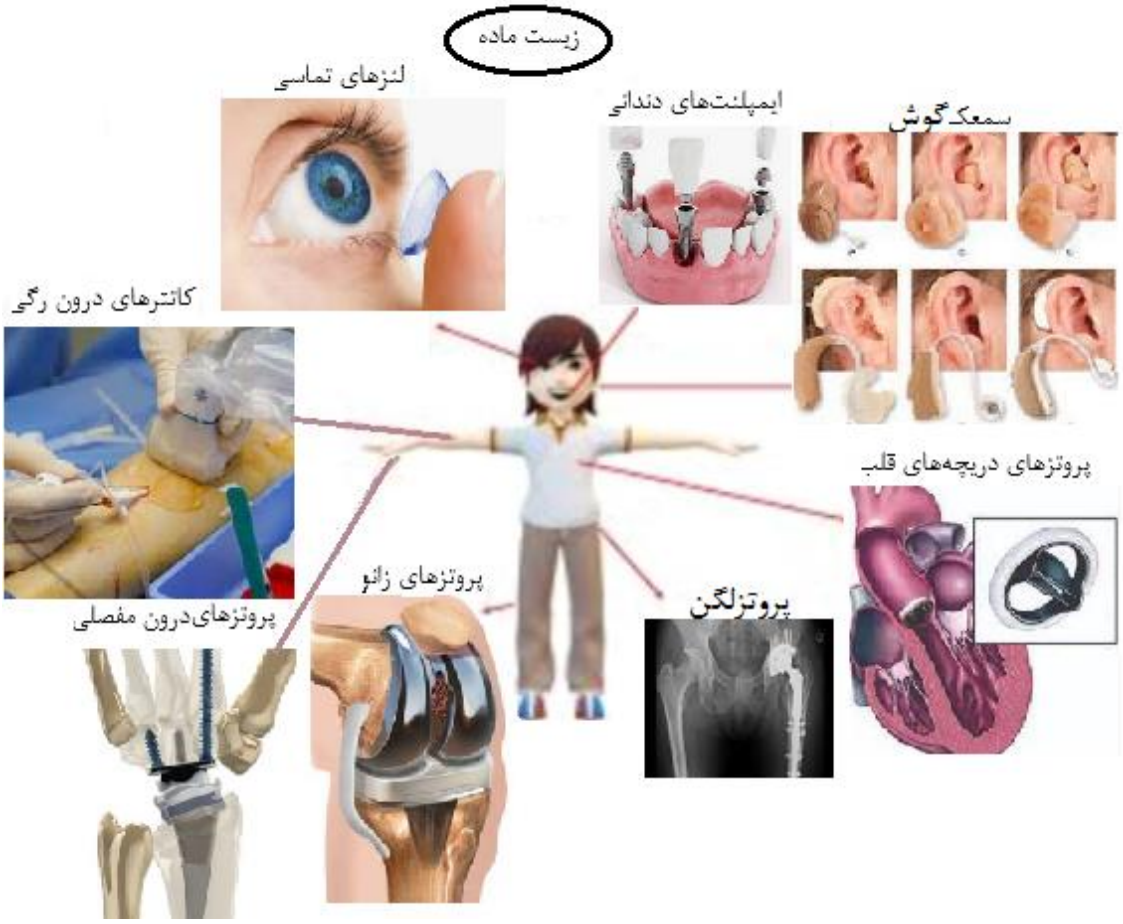
بازساختی با اقدامات پزشکی فعلی سازگار شده است. زیست‌ماده‌ی ساخته شده از روده‌ی خوک‌ها را می‌توان برای بهبود زخم‌ها در انسان‌ها استفاده کرد. زمانی که این ماده مرطوب می‌شود SIS نام دارد که انعطاف‌پذیر است و کار با آن آسان است. امروزه مثانه‌های کمکی[1]، سرخرگ‌های کوچک، پیوندهای پوستی، غضروف و حتی ساختار کامل نای را به بیماران پیوند زده‌اند اما فرآیندهای تولیدی آن‌ها هنوز درحال آزمایش و بسیار هزینه‌بر است. درحالی که بافت‌های مربوط به اندام‌های پیچیده مانند قلب، ریه و کبد به طور موفقیت‌آمیز در آزمایشگاه بازسازی شده‌اند، مسیر طولانی برای تکرارپذیری کامل و آماده‌سازی برای پیوند به بیمار در پیش دارند. با این وجود این بافت‌ها می‌توانند در تحقیقات به ویژه در کشف و بررسی داروها مفید باشند. با استفاده از بافت بازسازی عملکردی انسانی برای کمک به غربال کاندیدهای دارویی می‌توان سرعت ساخت و تولید داروهای جدید را بالا برد و در عین کاهش هزینه و تعداد حیوانات مورد استفاده در تحقیقات، ابزارهایی کلیدی برای آسان‌سازی پزشکی شخصی و درمان اختصاصی مختص هرفرد را فراهم کرد.

[1] Supplemental bladders

شکل-۱۱۵ ایمپلنت مفصل ران، از نمونه‌های کاربرد بیومتریال در پزشکی است.

می‌توان از موادی نظیر فلزات، سرامیک، پلاستیک، شیشه و حتی سلول‌ها و بافت‌های زنده برای ایجاد یک زیست ماده کمک گرفت. همچنین می توان آن‌ها را به صورت بخش‌های متحرک یا رویشی، پوششی، فیبرها، فیلم ها و فوم‌ها مهندسی کرده و در محصولات و ابزارهای زیست پزشکی مورد استفاده قرار داد. این محصولات ممکن است دریچه‌های قلب، ایمپلنت مفصل ران، ایمپلنت‌های دندانی یا لنزهای تماسی را شامل شوند. اکثر آن‌ها زیست تخریب پذیر و بعضی از آن‌ها زیست جذب پذیر[1] هستند، بدین معنا که پس از انجام وظایف خود در بدن به تدریج ناپدید می شوند. اکنون به کاربردهای زیست ماده در حوزه‌ی پزشکی بازساختی نگاهی می اندازیم.

[1] bio-absorbable



شکل-۱۱۶ لنزهای تماسی، ایمپلنت‌های دندانی، کاتترهای درون رگی[1]، سمعک، پروتزهای زانو، پروتزهای دریچه‌های قلب و پروتزهای درون مفصلی، همگی از کاربردهای زیست ماده در پزشکی هستند.

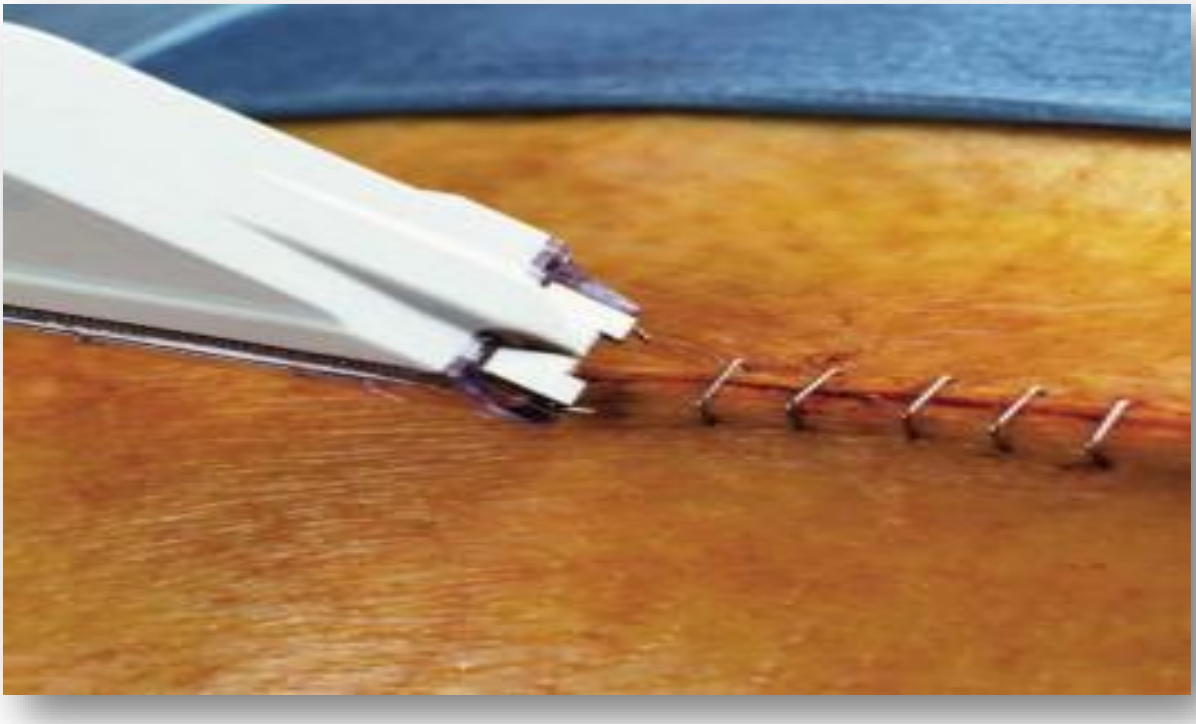
پزشکان، محققان و مهندسین زیست شناسی از کاربردهای زیست مواد در مقیاس وسیعی بهره می برند؛ مانند:

- ایمپلنت‌های طبی؛ مانند دریچه، استنت و حتی پیوند قلب
- رباط، زردپی و مفصل مصنوعی

[1] catheter

- سمعک، ایمپلنت دندانی و ابزارهای تحریک کننده‌ی اعصاب

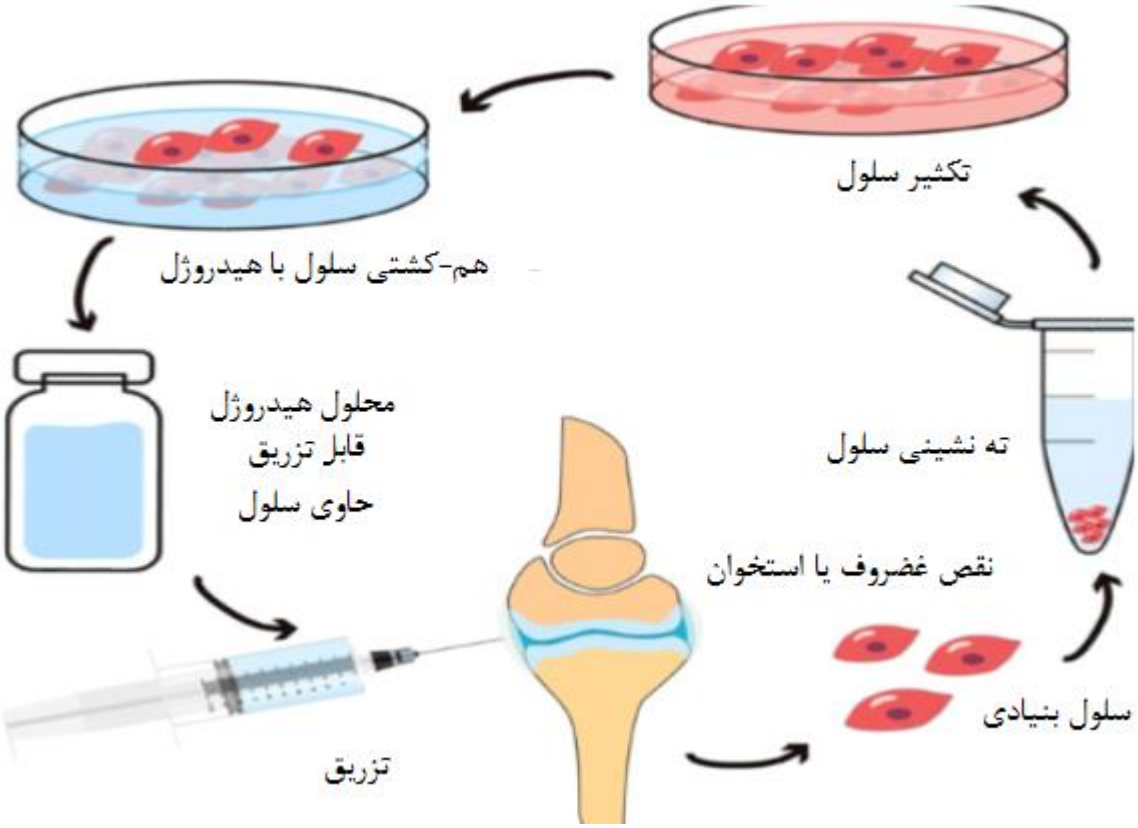
- بهبود ترمیم بافت‌های انسانی با بخیه و پنس (منگنه) برای بستن زخم



شکل-۱۱۷ تصویر کاربرد منگنه برای بستن زخم

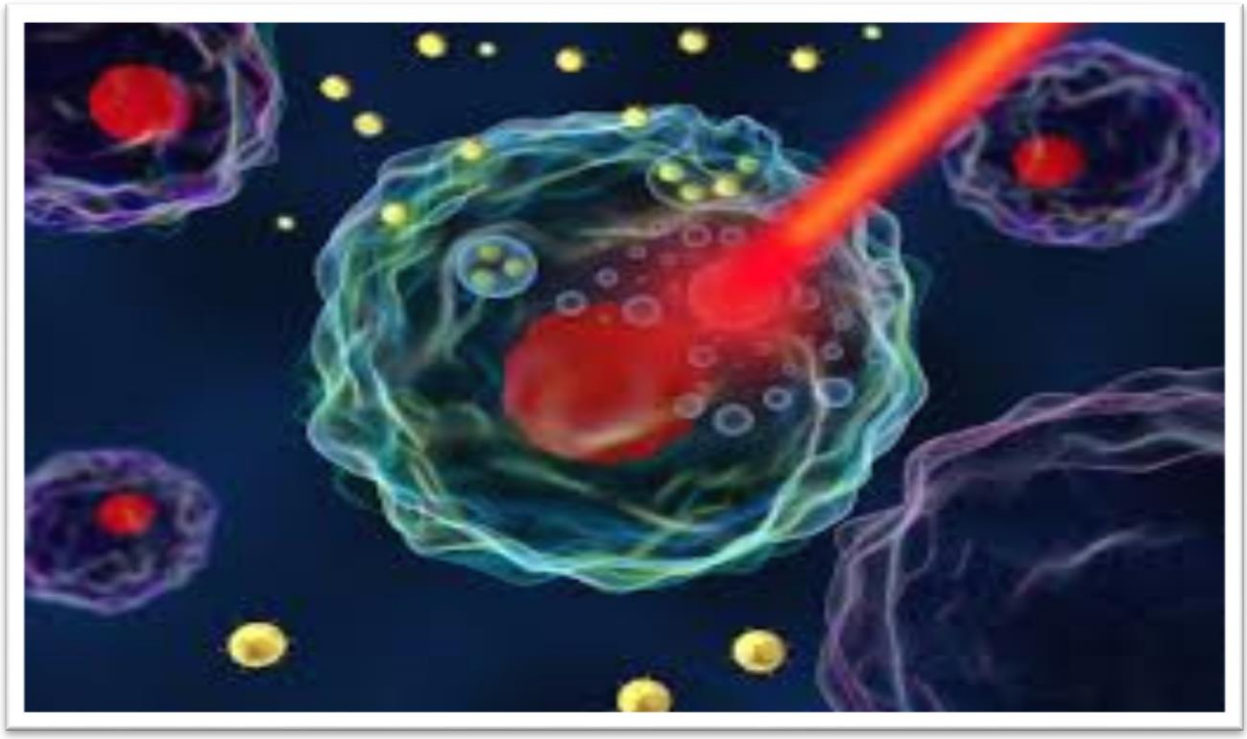
- ترمیم بافت‌های انسانی با بهره گیری از ترکیب زیست ماده (داربست)، سلول‌ها و مولکول‌های زیست فعال. مانند:

مثانه‌ی رشد یافته در آزمایشگاه و هیدروژل استخوان ترمیم یافته



شکل -۱۱۸ تصویر شماتیکی از روش تهیه‌ی هیدروژل قابل تزریق و کاربرد آن در مهندسی بافتِ غضروف یا استخوان

- زیست موادی که از مرزهای زیستی عبور کرده و بعنوان نشانگرهای مولکولی و نانوپارتیکل ها به تصویر برداری و درمان سلول‌های سرطانی در سطح مولکولی کمک می کنند.

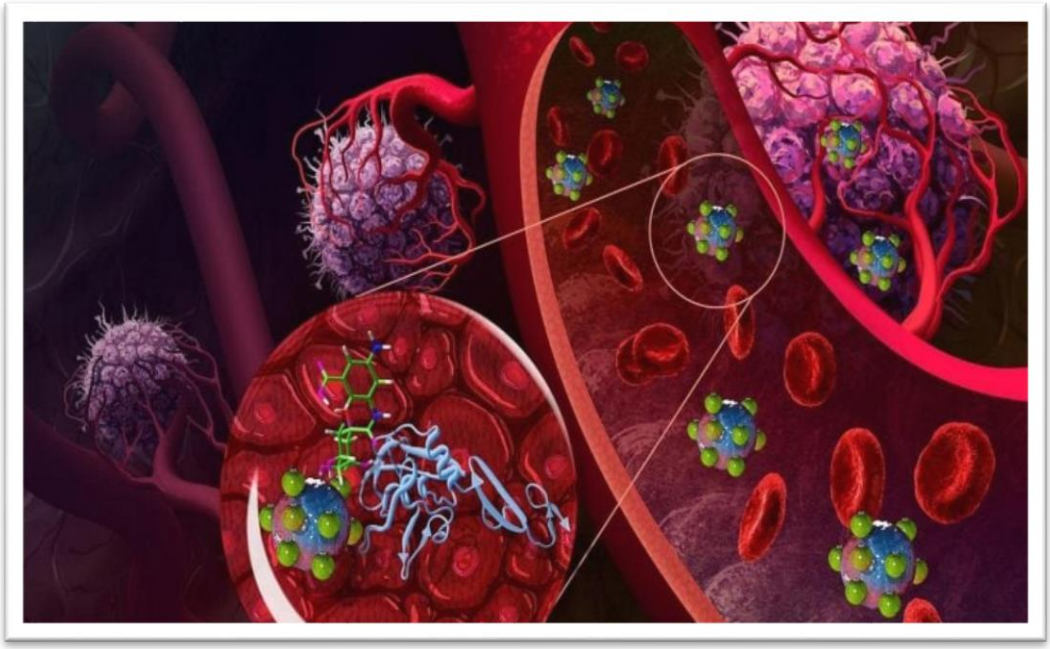


شکل-۱۱۹ نانوپارتیکل‌های (نانوذرات) طلا در نزدیکی سلول سرطانی

- حسگرهای زیستی که حضور و میزان یک ماده‌ی خاص را شناسایی کرده و داده‌ها را به مرکز داده منتقل می کنند مانند حسگر زیستی نمایش دهنده‌ی گلوکز خون و حسگر فعالیت مغز

- سیستم رهایش دارو[1] که دارو را در محل هدف دریافت و یا حمل می کنند مانند استنت‌های عروقی پوشیده شده با دارو و تراشه‌های قابل کاشت برای درمان بیماران سرطانی

[1] drug delivery



شکل-۱۲۰ براساس مطالعه انتشار یافته در مجله درشت‌مولکول‌های زیستی[1] ، گروهی از پژوهشگران ایرانی موفق به ساخت دارو رسانی هوشمند با رویکردی نوین شدند. این نانو مواد سنتزی پوشش یافته، به‌صورت نانوذرات هیدروژل مغناطیسی با ساختاری چندلایه هستند. این نانو دستگاه‌های زیست تخریب‌پذیر، به‌عنوان حامل‌های هدفمند داروی دگزامتازون[2] معرفی شدند.

مهندسین زیست شناسی، عملکرد یک زیست ماده را با اندازه گیری کیفیت انجام یک عمل خاص و کیفیت به کارگیری آن بررسی و ارزیابی می کنند. به طور مثال یک سیستم ترمیم زخم بایستی رشد سلول‌های پوست و شکل گیری عروق خونی را ارتقا دهد، یا یک ماده‌ی جای‌گیر شده در بافت استخوانی باید موجب اتصال سلول‌ها شده و رشد استخوان را تسهیل کند.

[1] Biological Macromolecules
[2] Dexamethasone

تحقیقاتی که موسسه ملی سلامت در دنیا از آن حمایت مالی می‌کند شامل ابداع مواد داربستی جدید و ابزارهای جدید برای ساخت، تصویربرداری، نظارت و حفظ بافت‌های مهندسی شده است. برخی از تحقیقاتی که در این زمینه انجام می‌گیرد در ادامه توضیح داده می‌شوند:

- ✓ کنترل سلول‌های بنیادی از طریق محیط خود: چندین سال است که دانشمندان به امید ابداع روش‌های درمانی جدید، به دنبال مسیرهایی برای کنترل تمایز سلول‌های بنیادی به سایر انواع سلول‌ها هستند. محققان در محیط‌های معین مختلفی سلول‌های چندتوان (یعنی سلول‌های بنیادی که توانایی تبدیل به هرنوع سلولی را دارند) را رشد داده‌اند و دریافته‌اند که این محدودیت‌سازی با استفاده از محیط‌های کشت خاص سبب راه‌اندازی شبکه‌های ژنی بسیار ویژه‌ای می‌شود که تعیین‌کننده‌ی سرنوشت نهایی سلول‌ها هستند. بسیاری از دیگر تحقیقات پزشکی درمورد سلول‌های بنیادی پرتوان روی اصلاح ترکیب محلول‌های رشد که سلول‌ها درون آن قرار می‌گیرند، متمرکز شده است. از آن‌جا که دانشمندان سعی می‌کنند سلول‌های بنیادی را برای کاربردهای پزشکی مهار کنند، کشف این نکته که عامل بیوشیمیایی، کنترل‌کننده‌ی چگونگی تبدیل سلول‌های بنیادی به سایر انواع سلول‌ها است، قطعه‌ی مهمی از این پازل است.
- ✓ پیوند کبدهای انسانی در موش: محققان بافت کبد انسانی را مهندسی کردند که می‌توان به موش پیوند زد. موش، کبد طبیعی خود را نیز با عملکرد طبیعی حفظ می‌کند اما قطعه‌ی کبد انسانی اضافه شده به بدن موش می‌تواند به همان شکل که در انسان‌ها عمل می کند، داروها را متابولیزه کند. این امکان را به محققان می‌دهد تا سمیت احتمالی و پاسخ‌های مختص به گونه‌ها را که طی کارآزمایی بالینی مشخص نمی‌شود پیش‌بینی کنند.

استفاده از بافت مهندسی شده‌ی انسانی به این شکل می‌تواند باعث کاهش زمان و هزینه‌ی تولید داروهای جدید شود همچنین امکان آزمایش برهمکنش‌های دارویی مهم را در سیستمی شبیه به انسان فراهم می‌کند.

- ✓ مهندسی سلول‌های بنیادی استخوانی بالغ: محققان توانستند سلول‌های بنیادی را از حالت پرتوان به سلول‌های بنیادی استخوانی بالغ (درنتیجه بافت استخوان) که بالقوه می‌توان به بیمار پیوند زد، تبدیل کنند. پیش از آن، محققان فقط می‌توانستند سلول‌ها را به اشکال اولیه‌ی بافتی که کاملاً عملکردی نبودند، تمایز دهند. علاوه بر این، طی این مطالعه دریافتند هنگامی که استخوان به موش‌های دارای نقص ایمنی پیوند زده شود، هیچگونه رشد غیرطبیعی رخ نمی‌دهد. رشد غیرطبیعی استخوان مشکلی است که اغلب پس از پیوند سلول‌های بنیادی یا داربست‌های استخوانی فاقد سلول رخ می‌دهد.
- ✓ استفاده از شبکه‌ای متخلخل برای کمک به زنده‌مانی بافت مهندسی‌شده: در حال حاضر بافت‌های مهندسی‌شده که ابعادی بزرگتر از ۲۰۰ میکرون دارند (حدود دو برابر قطر تارموی انسان) در هر بعدی که باشند به دلیل عدم وجود شبکه‌ی رگی (سرخرگ‌ها یا سیاهرگ‌ها) قابلیت حیات ندارند. بافت‌ها به یک سیستم انتقال مواد مناسب[1](مسیری که مواد غذایی را به سلول‌ها برساند و مواد زائد را از آن‌ها دور کند) نیاز دارند و بدون تأمین خون یا مکانیسمی شبیه به آن، سلول‌ها به سرعت می‌میرند. روش ایده‌آل برای محققان این است که بتوانند بافتی را مهندسی کنند که در آن این سیستم انتقال مواد از قبل تعبیه شده است. محققین روی ایجاد یک سیستم بسیار کوچک با توان بازتولید بالا برای حل این مشکل کار می‌کنند. این کار با یک پرینتر جوهرافشان اصلاح‌شده که شبکه‌ای متخلخل از جنس محلول قندی را ایجاد می‌کند، انجام می شود. این محلول، سفت شده

[1] plumbing system

و بافت مهندسی‌شده اطراف شبکه (در قالب ژل) را فرا می‌گیرد به این صورت شبکه قندی پس از سخت شدن در میان بافتی که به حالت ژل درآمده قرار می‌گیرد. پس از آن خون اضافه می‌شود که به راحتی شبکه‌ی قندی را حل می‌کند و کانال‌های از پیش شکل گرفته (حاصل از شبکه‌ی قندی) را برای عمل به عنوان رگ‌های خونی بر جای می‌گذارد.

- ✓ امید تازه برای زانوی ازکارافتاده: تا الان طبق این واقعیت که غضروف، رگ خونی برای کمک به بهبود ترمیم ندارد، بازسازی غضروف اگر نگوییم غیرممکن، بسیار سخت بوده است. استفاده از عمل جراحی سوراخ کننده (عمل میکروفرکچر[1]) برای جوانانی که از زخم‌های ورزشی رنج می‌بردند، نرخ موفقیت طولانی مدت ۵۰ درصدی داشته درحالی که برای بیمارانی که دچار تخریب غضروف گسترده بوده‌اند مانند استئوآرتریت[2] موفقیتی بسیار ناچیز داشته یا اصلاً موفقیت‌آمیز نبوده است. مهندسین بافت، ژل زیستی ابداع کرده اند که می‌توان پس ازعمل جراحی میکروفرکچر به محل غضروف معیوب تزریق کرد تا محیطی برای بهبود ترمیم ایجاد کند. به منظور قرارگیری این ژل در محل زانو، محققان چسب زیستی جدیدی ابداع کرده‌اند که می‌تواند در محل زانو به ژل و غضروف بچسبد و غضروف در حال رشد را در محل نگه دارد. اخیراً ترکیب ژل و چسب پس از عمل جراحی در کارآزمایی بالینی برای ۱۵ بیمار در ترمیم بافت غضروف موفقیت‌آمیز بوده است و همه‌ی آن‌ها اعلام کردند که در مدت شش ماه پس از عمل جراحی دردشان کاهش یافته است. برخلاف آن، بسیاری از بیماران تحت میکروفرکچر پس از کاهش درد در مدت زمان شش ماهه به همان حالت درد قبلی بازگشتند. با کمک

[1] microfracture surgery
[2] osteoarthritis

تصویربرداری از بیمارانی که تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند می توان به محققان مهندسین بافت در ابداع روش‌هایی جدید و کمتر تهاجمی و همراه کردن آن با این عمل جراحی کمک کرد تا نتایج بهتری در زمان کمتری بدست آورند.

- ✓ بازسازی یک کلیه جدید: توانایی بازسازی یک کلیه از سلول‌های فرد بیمار برای هزاران بیمار که از بیماری کلیوی رنج می‌برند، تسکین بزرگی خواهد بود. محققان با آزمایش روی سلول‌های کلیوی موش، خوک و انسان برای دستیابی به این هدف گامی بزرگ برداشته‌اند. آن‌ها ابتدا سلول‌ها را از اندام دهنده جدا می‌کنند و از کلاژن به جا مانده به عنوان داربست برای کمک به هدایت رشد یک بافت جدید استفاده می‌کنند. به منظور بازسازی بافت زنده‌ی کلیه، محققان سلول‌های اپی‌تلیال و اندوتلیال را در داربست‌های کلیه وارد کردند. بافت حاصل می‌توانست متابولیت‌ها را پاکسازی کند، بازجذب مواد غذایی را انجام دهد و در داخل بدن موش‌ها و در آزمایشگاه ادرار تولید کند. این فرآیند پیش از این برای مهندسی زیستی بافت قلب، کبد و ریه استفاده شده بود. خلق بافتی با قابلیت پیوند برای جایگزینی دائمی عملکرد کلیه، جهشی در غلبه بر مشکلات مربوط به پیوند عضو یعنی کمبود دهنده‌ی اندام و عوارض ناشی از سرکوب ایمنی است.
- ✓ گوشت آزمایشگاهی (گوشت بدون دام): بافت مصنوعی و خوراکی ماهیچه‌ی حیوانی کِشت شده در محیط آزمایشگاه را گوشت آزمایشگاهی می‌گویند.

- ✓ دستگاه کبد مصنوعی زیستی،"کبد موقت"، دستگاه کمکی کبد خارج از بدن (ELAD [1]): رده‌ی سلولی پاتوسیت (رده‌ی C3A) در بیوراکتور هالوفایبر [2] می‌تواند عملکرد کبدی را در موارد حاد فقدان کبد شبیه‌سازی کند. یک ELAD با کارایی بالا به صورت موقت به عنوان کبد فرد عمل خواهد کرد؛ بنابراین نیاز به پیوند نیست و اجازه می‌دهد کبد خود فرد ترمیم شود.
- ✓ پانکراس مصنوعی: تحقیقات در این زمینه شامل استفاده از سلول‌های جزایر لانگرهانس برای تنظیم قند خون بدن به ویژه در دیابت است. ممکن است از عوامل بیوشیمیایی برای تمایز (تبدیل) سلول‌های بنیادی چندتوان به سلول‌هایی استفاده شود که شبیه سلول‌های بتا (سلول‌هایی که در جزایر لانگرهانس تولید انسولین را برعهده دارند) عمل می‌کنند.
- ✓ مثانه‌های مصنوعی: گروهی تحقیقاتی به عنوان بخشی از یک آزمایش طولانی‌مدت با موفقیت توانسته است مثانه‌ی مصنوعی را به ۷ نفر از تقریباً ۲۰ نفر گروه مورد آزمایش پیوند بزند؛ این مثانه از سلول‌های کشت‌شده در داربستی شبیه به مثانه تشکیل شده بود.
- ✓ غضروف: غضروف رشدیافته در محیط آزمایشگاه که روی یک داربست کشت شده بود، با موفقیت به عنوان یک پیوند اتولوگ [3] برای ترمیم زانوهای بیمار، مورد استفاده قرار گرفته است. غضروف فاقد داربست یعنی تولید غضروف بدون استفاده از مواد داربست خارجی که در این روش همه مواد موجود در ساختار بافتی به طور مستقیم توسط خود سلول‌ها تولید شده است.

[1] Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD)
[2] hollow fiber bioreactor
[3] autologous transplant

- ✓ قلب مصنوعی زیستی: محققان آزمایشگاه با سلول‌زایی مجدد بافت قلب، یک قلب موشی زیست‌سازگار تولید کرده‌اند. این داربست و سلول‌ها را در یک بیوراکتور قرار دادند که در آن‌جا در قالب یک اندام پیوندی کامل یا جزئی این اجزا بالغ شدند. این پژوهش به عنوان نقطه‌ی عطف برای تولید قلب مصنوعی نام گرفت. آن‌ها ابتدا سلول‌های قلب موش را از آن خارج کردند (طی فرآیند سلول‌زدایی) سپس سلول‌های بنیادی را به قلب سلول-زدایی شده‌ی موش تزریق کردند.
- ✓ راه هوایی مهندسی شده: تاکنون موفقیت هایی درباره راه هوایی مهندسی شده بدست آمده است. نای تولید شده بهمراه سلول‌های اتولوگ (سلول های خوده فرد گیرنده) به گیرنده پیوند زده شد.
- ✓ رگ‌های خونی مهندسی شده: رگ‌های خونی که در آزمایشگاه رشد یافته است را می‌توان برای ترمیم رگ‌های خونی آسیب‌دیده بدون تحریک سیستم ایمنی استفاده کرد. در سال ۲۰۰۹، یک تیم بین رشته‌ای به سرپرستی یک جراح قفسه‌ی سینه، تورستن والس[1]، اولین پیوند زیستی مصنوعی را که شبکه‌ی عروقی ذاتی برای تأمین خون (تغذیه) بافت پس از عمل پیوند فراهم می‌کرد با موفقیت برای بیماری که در انتظار بازسازی نای بود انجام دادند.
- ✓ پوست مصنوعی: با استفاده از سلول‌های پوستی انسانی که در یک هیدروژل تعبیه شده است پوست مصنوعی ساخته شده است مانند ساختارهای چاپگرهای زیستی (بیوپرینت) که برای ترمیم سوختگی‌های جنگی استفاده می شود.

[1] Thorsten Walles

- ✓ استخوان مهندسی‌شده: ماده‌ی زمینه‌ای ساختاری می‌تواند دارای فلزاتی چون تیتانیوم، پلیمرهایی با نرخ تخریب گوناگون یا انواع مشخصی از سرامیک‌ها باشد. اغلب مواد مختلفی برای حمل استئوبلاست‌ها انتخاب می‌شوند تا به بازسازی استخوان و بازگردانی عملکرد زیستی آن کمک کنند. انواع مختلفی از سلول‌ها را می‌توان برای تسریع در روند کار به طور مستقیم به ماده‌ی زمینه‌ای افزود. مغز استخوان مصنوعی نیز با کشت مغز استخوان در محیط آزمایشگاه بدست می آیند. این ساختارها که با هدف پیوند تولید می شوند در واقع ساختارهای مهندسی بافتی هستند که فقط از سلول تشکیل شده‌اند.
- ✓ اندام تناسلی مذکر تولید شده در آزمایشگاه: داربست‌های سلول‌زدایی شده‌ی خرگوش با سلول‌های اندوتلیال و ماهیچه‌ی صاف، دوباره سلول‌زایی شدند. سپس این اندام را به خرگوش‌های زنده پیوند زدند که در مقایسه با اندام خودی خرگوش، دارای عملکرد بود. این نتیجه نشان می‌دهد که امکان ترمیم اندام تناسلی آسیب‌دیده در اثر ضربه وجود دارد.
- ✓ در مهندسی بافت موکوز دهان، از رویکرد کاربرد سلول‌ها به همراه داربست برای همانندسازی ساختار سه بعدی و عملکرد موکوز دهان استفاده می‌شود.

آینده‌ی مهندسی بافت و پزشکی بازساختی در ایران

دکتر حاجی میر اسماعیلی رئیس دانشکده علوم پزشکی ایران می گوید: «پزشکی بازساختی در دهه ۸۰ به عنوان رشته علمی مستقل مورد توجه قرار گرفت. ترمیم پوست و بافت‌های بدن آرزوی دیرینه بشر بود که پیشرفت این علم امروزه

این آرزو را به حقیقت تبدیل کرده است و در عصر حاضر با وجود بیماری‌های مزمن اهمیت پزشکی بازساختی بیشتر شده است». وی در خصوص مزایای پزشکی بازساختی عنوان کرد: «بسیاری از تخصص‌های پزشکی و بیولوژی در این حوزه درگیر هستند و فرصت شغلی بسیار مناسبی در این زمینه ایجاد می‌شود و این حوزه دارای ارزش استراتژیک است» پزشکی ایران در زمینه‌ی مهندسی بافت در حال پیشرفت است و آینده درخشانی دارد. تلاش برای واردات بافت‌های بنیادی به کشور زیاد است و در نتیجه این حوزه بسیار وسیع و پر هزینه بوده و نیاز جامعه پزشکی ایران است.

شکل-۱۲۱ شبیه سازی و مهندسی بافت ریه در ایران انجام شده است

همانطور که گفته شد بیوتکنولوژی پزشکی شاخه ای از پزشکی است که بطور کلی از سلول های زنده و مواد سلولی برای تحقیق و سپس تولید محصولات پزشکی، دارویی و تشخیصی استفاده می کند. درواقع این مواد سلولی و همچنین سلول های زنده پایه های اصلی مهندسی بافت و پزشکی بازساختی هستند. بنابراین یکی از کاربردهای بیوتکنولوژی پزشکی، مبحث مهندسی بافت است. بیوتکنولوژی پزشکی با رویکرد اعمال تغییرات در خوده سلول ها و نیز محصولات

جانبی مشتق از سلول ها، بطور مستقیم در بهبود مهندسی بافت موثر است و هم با پیشرفت های چشمگیر خود در زمینه شناخت مسیرهای سیگنال دهی و بیولوژیکی سلولی و بالطبع محیط سلولی بطور غیر مستقیم در حیطه مهندسی بافت مفید فایده بوده است.

منابع

1. Glick BR, Patten CL, Delovitch TL. Medical biotechnology: John Wiley & Sons; 2020.

2. Masson P, Tonello C, Balny C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2001; 1(2):85-8.

3. Metkar SK, Girigoswami K. Diagnostic biosensors in medicine–a review. Biocatalysis and agricultural biotechnology. 2019; 17:271-83.

Brunham, L. R., and M. R. Hayden. 2012. Whole-genome sequencing: the new standard of care? Science 336: 1112–1113.

4. Sasson A. Medical biotechnology: Achievements, prospects and perceptions: United Nations University Press; 2005.

5. Bhardwaj, M. (2003) ‘‘Global bioethics and international governance of biotechnology’’, Asian Biotechnology and Development Review 6(1): 39–53.

6. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. Molecular Oncology. Mol Oncol.2012; 6(2):140-6.

7. Dickson, M., and J. P. Gagnon. 2004. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. Nat. Rev. Drug Discov. 3: 417–429.

8. Friedmann T. A brief history of gene therapy. Nat Genet. 1992; 2(2):93-8. Review.

9. Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. J Assoc Physicians India. 2013; 61(2):127-33. Review.

10. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. Blood. 2014; 124(2):188-95.

11. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. J Oral Biol Craniofac Res. 2016; 6(2):153-9.

12. Bhalla N, et al. Introduction to biosensors. Essays Biochem. 2016; 60(1):1-8.

13. Bohunicky B, Mousa SA, Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. NanotechnolSci

Appl. 2011; 4:1.

14. Mukherjee S. Genetic therapies: posthuman gene therapy. In: Mukherjee S. The gene: an intimate history. Nova York: Scribner; 2016. Chap. 34. p. 415.

15. The Economist (2003) ‘‘Biotechnology. Carbon copy: Making generic biotech drugs will be a tough business’’, The Economist, 11 October, pp. 70–71.

واژه نامه

الف

- آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: آنتی‌بادی‌های که از یک دودمان (کلون) سلول B تولید می شوند و میل ترکیبی فقط به همان یک نوع اپی‌توپ دارند.
- آپوپتوز: گونه‌ای از مرگ سلولی یا زوال سلولی طی فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول است که در جانداران پرسلولی به وقوع می‌پیوندد.
- آلرژن: یا حساسیت‌زا نوعی آنتی‌ژن است که باعث واکنش غیرطبیعی و شدید سیستم ایمنی می‌شوند. آلرژن‌ها طیف وسیعی دارند که می‌توانند در مواد مختلف وجود داشته باشند.
- آندروژن: نام اصطلاحی است که به طور عمومی برای اشاره به هر ترکیب طبیعی یا مصنوعی (معمولاً یک هورمون استروئیدی) به کار می‌رود، که با اتصال به گیرنده‌های آندروژنی باعث تحریک، کنترل، توسعه یا نگهداری خصوصیات نرینه در مهره‌داران شود.
- استرس اکسیداتیو: (oxidative stress) بازتاب‌دهنده عدم تعادل میان تظاهرات سیستماتیک «گونه‌های فعال (واکنش‌پذیر) اکسیژن» (ROS) و توانایی یک سیستم زیستی در خنثی سازی و مهار میانجی‌های سمی آن یا ترمیم آسیب‌های وارده است. هرگونه آشفتگی و اختلال در وضعیت طبیعی اکسیداسیون-احیا، از طریق تولید پراکسید و رادیکال‌های آزاد، منجر به تولید اثرات سمی و آسیب به تمامی اجزاء و ساختارهای درون‌سلولی، از جمله پروتئین‌ها، لیپید و دی‌ان‌ای می‌گردد.

- اُنکولوژی: سرطان‌شناسی. از دو واژه یونانی تشکیل شده‌است؛ اُنکوس به معنی توده و پسوند لوژی به معنی شناختن. سرطان‌شناسی شاخه‌ای از رشته پزشکی است که در مورد تومورها و سرطان مطالعه می‌کند.
- اینترون‌ها: یا میانه ها بخش‌هایی از ژنوم هستند؛ که رونویسی از روی آن‌ها انجام می‌پذیرد ولی در فرایند پیرایش به کمک آنزیم پیرایشگر برداشته می‌شوند. از این رو، در فرایند ترجمه، پروتئینی از روی آن‌ها ساخته نمی‌شود. در مقابل اگزون ها هستند که رونویسی و ترجمه از روی آنها انجام می شود.
- ایمنی اکتسابی: بدن با دو روش ایمنی ذاتی/طبیعی (دفاع غیر اختصاصی) و ایمنی تطبیقی/اکتسابی (دفاع اختصاصی) عوامل بیماری‌زا و بیگانه را از بین می‌برد و مانع بروز بیماری می‌شود. مهم‌ترین ویژگی دستگاه ایمنی تطبیقی (برخلاف دستگاه ایمنی ذاتی) پاسخ اختصاصی به آنتی ژن و ایجاد حافظه ایمونولوژیک، پس از مواجهه است لذا در واکسیناسیون این سیستم فعال می‌شود.
- ایمنی هومورال: نوعی از دفاع اختصاصی دستگاه ایمنی تطبیقی است که در آن، آنتی بادی ها به عنوان ریزمولکول‌های واسطه، وارد عمل می‌شوند.
- ایمونوژن: عبارت است از بخشی از یک آنتی ژن که می‌تواند با عملکردی شبیه به قفل و کلید سیستم ایمنی را به‌طور اختصاصی تحریک کند.
- ایکوزانوئیدها: از اکسیداسیون اسیدهای چرب ۲۰ کربنه غیر اشباع تشکیل می‌شوند. این مواد یک خانواده از پیام‌رسان های بیولوژیکی هستند که در زمان کوتاه در سلول‌های نزدیک بافتی که آن‌ها را تولید کرده‌است اثر می‌کنند و به ویژه در ایمنی و التهاب نقش دارند.

- الکتروپوراسیون: یک روش میکروبیولوژی است که در آن یک با اعمال میدان الکتریکی به سلول‌ها به منظور افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی، اجازه می‌دهد مواد شیمیایی، مواد دارویی یا DNA به سلول منتقل شود.

ب، پ، ت، ث

- بیماری اپیدمی: همه‌گیری یا اپیدمی بروز بیش‌ازحد یک بیماری یا عارضه در جمعیتی معین را گویند. درواقع شیوع سریع بیماری عفونی به تعداد زیادی از افراد در یک جمعیت خاص در یک دوره زمانی کوتاه است.
- پروژه ژنوم انسان: (Human Genome Project) طرح نقشه‌برداری و تعیین توالی کل ژنوم انسان با استفاده از روش‌های علمی، برای نخستین بار در سال ۱۹۸۴ میلادی در کنفرانسی در شهرک آلتا، یوتا عنوان شد. هدف این پروژه بین‌المللی تعیین توالی جفت بازهای تشکیل‌دهنده DNA انسان از هردو نظر فیزیکی و عملکرد بود.
- پروژه بین‌المللی هپ‌مپ: (انگلیسی: International HapMap Project) یا به‌اختصار هپ‌مپ سازمانی است که هدفش ایجاد و توسعه یک نقشه هاپلوتیپ از ژنوم انسان است تا بتوان با آن، گوناگونی‌های ژنتیکی در انسان را شرح و توضیح داد. هپ‌مپ تلاش دارد تا گوناگونی‌های ژنی انسانی را که سلامت، بیماری‌ها، پاسخ‌های به درمان دارویی و عوامل محیطی را در این رابطه شرح دهد. اطلاعات این وبگاه به‌صورت رایگان جهت انجام پژوهش در دسترس است.
- پروژه ۱۰۰۰ ژنوم: (به انگلیسی: ۱۰۰۰ genomes project) یک پروژه تحقیقاتی بین‌المللی برای فراهم کردن یک فهرست جامع و بسیار دقیق از تنوّع ژنتیکی انسان است. یکی از اهداف مهم این بررسی کشف روابط بین فنوتیپ (رُخ‌نمود) و ژنوتیپ (اطلاعات ژنتیکی)، بررسی تکامل و عوامل تأثیرگذار در بیماری‌های با عامل ژنتیکی

در انسان است. این پروژه در سال ۲۰۰۸ با همکاری مؤسسه ملی تحقیقات ژنوم انسان (آمریکا)، مؤسسه سَنگِر (انگلستان) و مؤسسه ژنومیک بجینگ (چین) آغاز شد. در این پروژه محققان قصد داشتند ژنوم حداقل ۱۰۰۰ فرد ناشناس از اقوام مختلف را با استفاده از روش‌های جدید که نسبت به روش‌های قدیمی، سریع‌تر و ارزان‌تر بودند توالی‌یابی کنند.

- پروتئازوم: کمپلکس های پروتئنی هستند که عملکرد اصلی آنها حذف پروتئین‌های غیرضروری یا آسیب دیده، توسط پروتئولیز است. پروتئولیز واکنش شیمیایی است که پیوندهای پپتیدی را می شکند. آنزیم هایی که به چنین واکنش هایی کمک می کنند، پروتئاز نامیده می شوند.
- پریون: انواعی از پروتئین است که می‌تواند به شکل‌های متنوعی تا شود. آن‌ها معمولاً بیماریزا هستند و در گروه‌های مختلف موجودات ایجاد بیماری می‌کنند.
- تکنولوژی ریزآرایه: (micro array) امکان بررسی همزمان بسیاری از فعل و انفعالات زیستی را فرآهم می کند و در دو زمینه ژنومیکس (مطالعه مجموعه ژن های موجود زنده) و پروتئومیکس (مطالعه مجموعه پروتئین های موجود زنده) کاربردهای وسیعی دارد. چه در آرایه پروتئین و چه DNA، اساس کار یکسان می باشد. به این ترتیب که یک بستر جامد وجود دارد که بر روی آن لیگاند مورد نظر قرار گرفته است و سپس محلول مورد بررسی بر روی این سطح قرار داده می شود تا بر حسب اتصال لیگاند با مواد مورد نظر، تجزیه و تحلیل نتایج صورت بپذیرد.

- حرکت الکتروفورتیک: اصطلاحی برای طیف گسترده ای از فرایندهای صنعتی است. ویژگی بارز این فرایند این است که ذرات کلوئیدی معلق در یک محیط مایع تحت تأثیر یک میدان الکتریکی (الکتروفورز) مهاجرت می کنند و روی یک الکترود قرار می گیرند.

د، ذ، ر، ز، ژ

- دی‌ان‌ای برهنه: DNA برهنه یا Naked DNA. به DNA ای اطلاق می شود که برای محافظت از آن با پروتئین ها، لیپیدها یا هیچ مولکول دیگری مرتبط نیست.
- زیست‌توده: یا بیومس (به انگلیسی: Biomass) یک منبع تجدیدپذیر انرژی است که از مواد زیستی به دست می‌آید.
- ژن سرکوبگر تومور: ژنی است که از ایجاد سرطان در یاخته جلوگیری می کند. اگر در این ژن جهشی روی دهد که به از دست دادن یا کاهش کارایی بینجامد، سرطان از یاخته گسترش خواهد یافت.

س، ش، ص، ض، ط، ظ

- سیستم کمپلمان: مجموعه‌ای از عوامل (کمپلمان ها) است که به سلول‌های ایمنی در از بین بردن سلول‌های بیگانه و تولید آنتی بادی کمک می‌نماید. پروتئین‌های این سیستم طی واکنش آبشاری و پی در پی بر روی یکدیگر عمل نموده و محصول هر واکنش بر ایجاد واکنش بعدی اثر می‌گذارد.

- سیتوتوکسین: سمیت سلولی و خصوصیت سمی‌بودن برای سلول‌ها است. بنابراین داروی سیتوتوکسیک یعنی دارویی که به طور مستقیم سلول را نابود می‌نماند.
- سلول‌های اسکَوِنجر: (scavenger cells) یا سلول های پاک کننده/پاکسازی کننده/روبنده. ماکروفاژها سلول هایی در سیستم ایمنی هستند که به خانواده فاگوسیت ها یا به اصطلاح سلول های پاکسازی کننده تعلق دارند. آنها تقریباً در تمام بافت های بدن، به عنوان مثال در روده کوچک، کبد، مغز و پوست وجود دارند.

ع، غ، ف، ق

- فعالیت کاتالیتیک: به واکنشی که در آن کاتالیز صورت پذیرد، واکنش/فعالیت کاتالیتیک گفته می‌شود.
- فارماکوکینتیک: جنبه‌ای از داروشناسی می‌باشد که به بررسی پارامترهائی چون فراهمی زیستی، کلیرانس، متابولیسم، نیمه‌عمر، حجم توزیع و اثر عبور اوّل داروها می‌پردازد. اغلب فارماکوکینتیک به صورت مزدوج همراه با فارماکودینامیک مطالعه می‌شود. در واقع اولی اثر بدن بر دارو است و دومی اثر دارو بر بدن.

ک، گ، ل، م، ن

- گیرنده‌های اسکَوِنجر: (scavenger receptors) یا گیرنده های روبنده. یک ابرخانواده بزرگ و متنوع از گیرنده های سطح سلولی هستند. این گیرنده‌ها در طیف وسیعی از فرآیندها، مانند: هموستاز، آپوپتوز، بیماری‌های التهابی و پاکسازی پاتوژن‌ها نقش دارند. گیرنده‌های روبنده عمدتاً روی سلول‌های میلوئیدی و سایر سلول‌ها یافت می‌شوند که به لیگاندهای متعدد، متصل می‌شوند و آنها را حذف می‌کنند.

- متابولیت‌ها: در علم بیوشیمی مواد شرکت‌کننده در متابولیسم یا سوخت و ساز سلولی را متابولیت (Metabolite) می‌نامند. در واقع متابولیت‌ها ترکیبات واسطه یا محصول سوخت و ساز سلول زنده هستند و معمولاً اشاره به مولکول‌های کوچک شرکت‌کننده در سوخت و ساز سلولی دارد.
- مجموعه سازگاری بافتی اصلی: (به انگلیسی: Major histocompatibility complex) یا مختصراً MHC مولکول‌های پروتئینی روی غشای سلول‌های مختلف بدن در مهره داران است. در انسان این مولکول‌ها را آنتی‌ژن‌های گلبول سفید انسانی (HLA) می‌نامند. البته این مولکول‌ها روی سایرسلول‌های بافت‌های مختلف بدن (مثل پوست، کلیه، قلب، ریه و سایر اعضا) نیز موجود می‌باشند و کارکردهای متعددی دارند.
- مایه‌کوبی: (به انگلیسی: Inoculation) یا تلقیح، مجموعه ای از روش ها برای ایجاد مصونیت مصنوعی در برابر بیماری های عفونی مختلف است. در اصطلاح باستانی، مایه کوبی برای پیشگیری ابتلا به آبله است. در این روش مایع داخل آبدانه آبله خفیف یا آبله گاوی را خارج کرده و به وسیله اجسام تیز یا سوزن به بدن شخص دیگر تلقیح یا وارد می‌کنند.
- موش نود: (nude mouse) یا موش برهنه. یک موش آزمایشگاهی از سویه‌ای با یک جهش ژنتیکی است که باعث تخریب یا حذف تیموس می‌شود و در نتیجه به دلیل کاهش بسیار زیاد تعداد سلول‌های T، سیستم ایمنی مهار می‌شود. در فنوتیپ و ظاهر بیرونی موش، کمبود موهای بدن مشاهده می شود که به آن لقب "برهنه" داده است. موش برهنه برای تحقیق ارزشمند است زیرا می‌تواند انواع مختلفی از بافت‌ها و پیوندهای تومور را دریافت کند، زیرا هیچ پاسخ ردی ایجاد نمی‌کند (عدم پس زدن پیوند).

و، ه، ی

- هیپوتونیک: محلول هیپوتونیک یک محلول است که غلظت املاح کمتری نسبت به داخل سلول دارد. از این رو فشار اسمزی این محلول در مقایسه با سایر محلول ها بسیار کم است. هنگامی که یک سلول در یک محلول هیپوتونیک غوطه ور می شود، مولکول های آب به دلیل پتانسیل اسمزی از محلول به داخل سلول حرکت می کنند. انتشار مداوم مولکول های آب به داخل سلول باعث تورم سلول می شود و ممکن است منجر به سیتولیز سلول (پارگی) شود.
- هایپرتونیک: محلول هایپرتونیک نسبت به داخل سلول غلظت بالایی از املاح دارد. هنگامی که یک سلول در محلول هایپرتونیک غوطه ور می شود، مولکول های آب از سلول به داخل محلول خارج می شوند. به دلیل حرکت آب از سلول به خارج، سلول چروک می شود.