وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی اراک

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

ساخت سازه مهندسی جهت بیان انسولین درشرایط In vitro

دانشجو:

شیوا سادات غفلت

اساتید راهنما:

دکترعبدالرحیم صادقی

دکتر بهرام کاظمی دمنه

استاد مشاور:

دکتر مژگان بنده پور

سال:

۹۴-۹۳

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم، بزرگترین نعمت های زندگی ام که در همه لحظه های زندگی کنار من بودند و از هیچ کمکی برای پیشرفت و موفقیت من دریغ نکردند.

تشکر و قدردانی:

شکر و سپاس خدای را که توفیق علم و دانش به من ارزانی داشت،

اکنون که در حال اتمام این دوره تحصیلی می باشم وظیفه خود می دانم که از زحمات و راهنمائی های مفید و ارزنده اساتید راهنمای محترم جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و جناب آقای دکتر عبدالرحیم صادقی سپاسگزاری نمایم. همچنین از استاد مشاور محترم سرکار خانم دکتر مژگان بنده پور به سبب زحمات بی دریغ ایشان نهایت تشکر را دارم.

به جاست که از زحمات کلیه دوستان و همکاران خود در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که مرا دراجرای این پژوهش یاری نمودند تشکر نمایم.

لازم به ذکر است این تحقیق قسمتی از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی میباشد که در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی انجام گرفته است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود

چکیده:

عنوان: ساخت سازه مهندسی شده جهت ژن درمانی دیابت در انسان

مقدمه: دیابت بیماری است که در جهان شیوع بسیاری دارد، از این رو تلاش های مستمری جهت درمان بیماری با روش های مختلف صورت گرفته است . ژن درمانی به دلیل پایداری بهتر نسبت به سایر روش ها اهمیت زیادی دردرمان دیابت بویژه دیابت نوع I پیدا کرده است. وجود یک روش درمانی ایمن و کارآمد همواره مد نظر محققین بوده که با وجود تلاش های فراوان تاکنون این امر محقق نشده است.

هدف از این مطالعه ساخت یک وکتور مناسب جهت ژن درمانی بویژه ژن درمانی دیابت است که معایب و عوارض وکتورهای موجود را نداشته و کارآیی بهتری نیز داشته باشد. از ویژگی های این سازه مهندسی شده می توان به جایگزینی هدفمند در داخل ژنوم و قابلیت استفاده در ژن درمانی بیماری های مختلف اشاره کرد.

روش کار: در این مطالعه از یک وکتور پایه جهت طراحی سازه مورد نظر استفاده شده است. این سازه شامل چهار بخش می باشد که دو بخش انتهایی آن همسان با توالی ژن rDNA بوده و دو بخش دیگر ژن انسولین و پروموتر LPKمی باشند. برای هر یک از این قطعات پرایمر اختصاصی با جایگاه آنزیمی ویژه جهت اتصال طراحی شد. در آخر قطعات در کنار یکدیگر در یک وکتور قرار داده شدند، سپس با برش آنزیمی سازه از وکتور پایه جدا و با روش الکتروپوریشن به داخل سلول فرستاده شد. در ادامه حضور ژن انسولین در داخل ژنوم با استفاده از PCR تایید و بررسی بیان ژن با روش لکه گذاری وسترن انجام شد .

کلمات کلیدی: ژن درمانی، دیابت نوع I، روش های غیر ویروسی، ساخت سازواره

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب

چکیده: ۱

فصل اول ۲

۱-۱- مقدمه: ۳

۱-۲- شیوه ها گوناگون انتقال ژن ۵

۱-۳- بیان مسئله: ۷

۱-۴- ضرورت اجرای طرح: ۸

۱-۵- اهداف پژوهش: ۹

۱-۵- اهداف پژوهش ۹

۱-۵-۱- هدف کلی ۹

۱-۵-۲- اهداف ویژه طرح ۹

۱-۵-۳- فرضیات پژوهش ۹

فصل دوم ۱۰

۲-۱- ژن درمانی: ۱۱

۲-۲- انواع روش های انتقال ژن: ۱۶

۲-۲-۱- سیستم های انتقال ژن ویروسی: ۱۶

۲-۲-۲- سیستم های انتقال ژن غیر ویروسی: ۱۸

فصل سوم ۲۲

۳-۱- دستگاهها و وسایل استفاده شده: ۲۳

۳-۲- مواد استفاده شده: ۲۴

۳-۲-۱- محیط های کشت عمومی: ۲۵

۳-۲-۲- محلول های ذخیره: ۲۶

۳-۲-۳- محلول های لازم جهت الکتروفورز روی ژل آگارز: ۲۷

۳-۲-۴- محلول های لازم جهت الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE: ۲۸

۳-۲-۵- محلول های لازم جهت وسترن بلاتینگ: ۳۰

۳-۳- الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز: ۳۱

۳-۴- انتخاب و طراحی توالی های همولوگ: ۳۱

۳-۵- انتخاب پروموتر مناسب جهت بیان ژن انسولین: ۳۳

۳-۶- طراحی جایگاه های آنزیمی بر روی سازه و ارسال قطعات جهت سنتز: ۳۳

۳-۷- ترانسفورم پلاسمیدهای حامل قطعات ۳۴

۳-۸- ترانسفورماسیون (انتقال DNA پلاسمیدی به باکتری ۳۴

۳-۹- استخراج پلاسمید های ترانسفورم شده (Plasmid extraction): ۳۵

۳-۱۰- کلونینگ قطعات: ۳۷
۳-۱۰-۱- انجام فرایند هضم آنزیمی جهت استخراج قطعات: ۳۷
۳-۱۰-۲- استخراج قطعه بازوهای همولوگ با فرایند آنزیمی از داخل وکتور PEX-A2 ۳۷
۳-۱۰-۳- استخراج DNA از ژل آگارز به کمک کیت خالص سازی از ژل: ۳۸
۳-۱۰-۴- کلون بازوهای همولوگ در پلاسمید pGEM-B۱: ۳۸
۳-۱۰-۵- واکنش اتصال بین قطعه بازوهای همولوگ و وکتور: ۳۸
۳-۱۱- ترانسفورماسیون Transformation: ۳۹
۳-۱۲- غربالگری کلونی های واجد وکتور نوترکیب: ۳۹
۳-۱۳- PCR کلنی(تایید کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب): ۴۰
۳-۱۴- استخراج پلاسمید نوترکیب دارای قطعه: ۴۱
۳-۱۵- الحاق قطعه انسولین/ پروموتر به بازوهای همولوگ: ۴۱
۳-۱۶- استخراج قطعه انسولین/ پروموتر از ژل: ۴۲
۳-۱۷- انجام PCR اختصاصی جهت تائید اتصال قطعات به یکدیگر: ۴۲
۳-۱۸- واکنش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی بازوهای همولوگ و قطعه انسولین/پروموتر ۴۳
۳-۱۹- انتقال سازه به داخل سلول یوکاریوت: ۴۴
۳-۱۹-۱- انتخاب سلول: ۴۴
۳-۱۹-۲- احیا سلول های Hela: ۴۴
۳-۱۹-۳- کشت سلول در فلاسک: ۴۴

۳-۱۹-۴- تریپسینه کردن و تیمار سلول ها: ۴۵
۳-۱۹-۵- شمارش سلول ها با لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری: ۴۵
۳-۱۹-۶- تقسیم تعداد مساوی سلول در میکروپلیت ۱۲ تایی و افزودن سازه تکثیر شده ۴۵
۳-۱۹-۷- مرحله ترانسفکشن با روش الکتروپوریشن: ۴۶
۳-۱۹-۸- تکثیر سلول های ترانسفکت شده: ۴۷
۳-۲۰- تایید ورود قطعه ژنی مورد نظر در جایگاه صحیح در ژنوم: ۴۷
۳-۲۰-۱- استخراج DNA سلولی توسط کیت GeNet Bio : ۴۷
۳-۲۰-۲- انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی: ۴۸
۳-۲۱- القای بیان ژن انسولین توسط گلوکز: ۴۹
۳-۲۲- تایید بیان ژن: ۴۹
۳-۲۲-۱- بررسی بیان انسولین با روش الایزا : ۴۹
۳-۲۲-۲- تایید بیان ژن با لکه گذاری وسترن: ۴۹
۳-۲۲-۲-۱- انجام SDS-PAGE: ۴۹
۳-۲۲-۲-۲- لکه گذاری وسترن : ۵۲

فصل چهارم ۵۴

۴-۱- نتایج انتخاب و طراحی توالی های همولوگ: ۵۵
۴-۲- انتخاب پروموتر مناسب جهت بیان ژن انسولین: ۵۶

۴-۳- نتایج طراحی جایگاه های آنزیمی بر روی سازه و ارسال قطعات جهت سنتز: ۵۶
۴-۴- ترانسفورم پلاسمیدهای حامل قطعات: ۵۶
۴-۵- نتایج کلونینگ قطعات: ۵۷
۴-۵-۱- استخراج بازوی همولوگ به طول 800bp با آنزیم EcoRI از داخل وکتورPEX-A2 : ۵۷
۴-۵-۲- کلون بازوهای همولوگ در پلاسمیدpGEM-B1 : ۵۸
۴-۵-۳- تایید کلونینگ قطعه بازوهای همولوگ در پلاسمیدpGEM-B1 : ۵۸
۴-۵-۴- استخراج قطعه انسولین/ پروموتر با آنزیم های BamHI و KpnI از پلاسمیدpGEM-B1 : ۵۹
۴-۵-۵- تایید اتصال دو قطعه انسولین/پروموتر با بازوهای همولوگ: ۵۹
۴-۶- انتقال سازه به داخل سلول یوکاریوت: ۶۰
۴-۷- تایید بیان ژن: ۶۰
۴-۷-۱- نتیجه بررسی بیان انسولین با روش الایزا : ۶۰
۴-۷-۲- تایید بیان ژن با لکه گذاری وسترن: ۶۲
فصل پنجم..... ۶۴
۵-۱- بحث و نتیجه گیری: ۶۵
۵-۲- پیشنهادات: ۶۶
مراجع: ۶۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱: فهرست دستگاهها و وسایل استفاده شده ۲۳

جدول ۳-۲: مواد استفاده شده ۲۴

جدول ۳-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط L.B مایع ۲۵

جدول ۳-۴: مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط LBA ۲۵

جدول ۳-۵: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر STE ۲۶

جدول۳-۶: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر محلول شماره I ۲۶

جدول ۳-۷: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافرمحلول شماره II ۲۶

جدول ۳-۸: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE 1X ۲۷

جدول ۳-۹: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافرلیز سلولی ۲۸

جدول ۳-۱۰: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافرلودینگ ۲۸

جدول ۳-۱۱: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافرتانک یا بافرحرکت ۲۹

جدول ۳-۱۲: مواد مورد نیاز جهت تهیه محلول محلول ٪۳۸/۵ آکریلامید بیس آکریلامید ۲۹

جدول ۳-۱۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه محلول بافر انتقال (Transfer) وسترن بلاتینگ ۳۰

جدول ۳-۱۴: مواد مورد نیاز جهت تهیه محلول TBSبا غلظت ۲۰X: ۳۰

جدول ۳-۱۵: درصد مناسب ژل آگارز مورد استفاده در الکتروفورز بر حسب اندازه قطعات DNA ۳۱

جدول ۳-۱۶: واکنش آنزیمی وکتورpGEM-B1 با آنزیم EcoRI ۳۸

جدول ۳-۱۷: واکنش آنزیمی وکتور pGEM-B1 با آنزیم EcoRI ۳۸

جدول ۳-۱۸: واکنش اتصال جهت کلون بازوهای همولوگ در وکتور PGEM-B۱ ..... ۳۹

جدول ۳-۱۹: واکنش PCR توسط که پرایمرهای M13 جهت تکثیر MCS وکتور PGEM-B1 ..... ۴۰

جدول ۳-۲۰: برنامه زمانی و دمایی مناسب مربوط به انجام واکنش PCR با پرایمر M13Universal ۴۱

جدول ۳-۲۱: واکنش آنزیمی جهت استخراج قطعه انسولین/ پروموتر با آنزیم های BamHI و KpnI ۴۱

جدول ۳-۲۲: واکنش اتصال جهت کلون قطعه انسولین/ پروموتر در وکتور حامل بازوهای همولوگ ۴۲

جدول ۳-۲۳: واکنش PCR اختصاصی جهت تائید اتصال قطعات به یکدیگر ۴۳

جدول ۳-۲۴: برنامه زمانی و دمایی PCR به به کمک پرایمرهای اختصاصی بازوهای همولوگ و قطعه انسولین/ پروموتر ۴۳

جدول ۳-۲۵: واکنش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی جهت تایید ورود صحیح ژن ۴۸

جدول ۳-۲۶: برنامه PCR با استفاده از پرایمرهای تایید ورود قطعه ژنی ۴۸

جدول ۳-۲۷: میزان ترکیبات مورد استفاده جهت ساخت ژل جداکننده ٪۲۰ ..... ۵۱

جدول ۳-۲۸: میزان ترکیبات مورد استفاده جهت ساخت ژل متراکم کننده٪ ۵ ..... ۵۲

جدول ۴-۱: میزان غلظت انسولین در طول موج ۴۵۰ نانومتر ۶۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱: ناحیه انتخاب شده جهت سنتز بازوهای همولوگ ۳۲

شکل ۳-۲: ناحیه انتخاب شده جهت پروموتر انسولین ۳۳

شکل ۳-۳: وکتور پایه pGEM-B۱ جهت کلون قطعات ۳۷

شکل ۳-۴: سلول ها در فلاسک کشت با میکروسکوپ معکوس ۴۴

شکل ۳-۵:: شمارش سلول ها با لام نئوبار ۴۵

شکل ۳-۶: کشت سلول ها درفلاسک ۲۴ تایی در محیط RPMI ۴۶

شکل۳-۷: کوت های مخصوص دستگاه الکتروپوریشن ۴۶

شکل ۳-۸: شرایط تنظیم شده جهت فرایند ترانسفکشن دردستگاه الکتروپوریشن ۴۷

شکل ۳-۹: اضافه کردن گلوکز جهت القای بیان ژن انسولین ۴۹

شکل ۴-۱: نتیجه همردیف سازی بازوهای همولوگ با توالی rDNA انسانی ۵۵

شکل ۴-۲: نتیجه همردیف سازی پروموتر انسولین ۵۶

شکل۴-۳: پلاسمیدهای حامل قطعات ۵۷

شکل۴-۴: استخراج بازوی همولوگ به طول ۸۰۰ جفت باز ۵۷

شکل ۴-۵: برش آنزیمی پلاسمید pGEM-B1 با آنزیم EcoRI ۵۸

شکل ۴-۶: colony PCR بر روی کلنی های ترانسفورم شده ۵۸

شکل ۴-۷: استخراج قطعه انسولین/پروموتر با آنزیم‌های BamHI و KpnI ۵۹

شکل ۴-۸: باند 1100 bp تایید اتصال قطعه انسولین/ پروموترو بازوهای همولوگ..... ۵۹

شکل ۴-۹: تایید ورود سازه در جایگاه صحیح در ژنوم ۶۰

شکل ۴-۱۰: نتیجه بررسی بیان انسولین با روش الایزا..... ۶۰

شکل ۴-۱۱: نتیجه پس از اضافه کردن محلول متوقف کننده..... ۶۱

شکل ۴-۱۲: تایید بیان ژن با استفاده از لکه گذاری وسترن:..... ۶۱

مقدمه و بیان مسئله

۱-۱- مقدمه:

تعداد مبتلایان به دیابت در ایالات متحده ۱۷ میلیون نفر (۶/۳ درصد از کل جمعیت آمریکا) تخمین زده شده است که با توجه به شیوع و گسترش این بیماری پیش بینی شده است که تا سال ۲۰۵۰ به صورت یک اپیدمی درآید[۱]. درایران نیز تعداد افراد دیابتی به ۷ میلیون نفر می رسد. برطبق گزارشات مختلف سازمان بهداشت جهانی میزان هزینه مورد نیاز برای درمان بیماران دیابتی در سطح جهان یک ششم کل هزینه های مربوط به مراقبت های بهداشتی را شامل می شود[۲] . در حال حاضر طیف وسیعی از افراد در جهان به این بیماری مبتلا بوده و طبق آمار سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۲۵ جمعیتی بالغ بر ۳۰۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا خواهند شد[۳-۴].

دیابت شایع ترین بیماری متابولیسم غیرطبیعی کربوهیدرات هاست که به علت نقص در ترشح انسولین توسط پانکراس، نقص در عملکرد انسولین و یا گیرنده های آن در سطح سلول ها ایجاد می گردد. انسولین یکی ازهورمون هایی است که تاثیرات متفاوتی در مسیرهای متنوع متابولیسمی بدن می‌گذارد. این هورمون توسط سلول های پانکراس ترشح شده و با اثر بر سلول‌های کبد باعث می‌شود که این سلول‌ها با گرفتن قند از خون و ذخیره آن به صورت گلیکوژن، قند خون را کاهش دهند و با تجمع گلیکوژن در سلول‌های ماهیچه ای به عنوان یک منبع سوخت انرژی را افزایش دهند و همچنین با اثر به بافت های چربی، استفاده از چربی به عنوان منبع سوخت را متوقف می‌کند. در عدم ترشح انسولین و یا اختلال در کارایی آن در راستای ورود قند به داخل سلول ها، میزان قند خون افزایش یافته و سبب بروز مشکلات و عوارض متعدد در مبتلایان به انواع دیابت می شود.

انواع مختلفی از بیماری دیابت وجود دارد که تعدادی از آنها نسبت به بقیه شیوع بالاتری دارند. در این میان دیابت تیپ II که تحت عنوان دیابت غیر وابسته به انسولین و یا دیابت مقاوم به انسولین شناخته شده است شایع ترین نوع دیابت در بین اکثر جوامع می باشد که در آن سلول ها به دلایل مختلف قادر به استفاده از قند موجود در خون نمی باشند و در نتیجه این امر سبب بروز اختلالات در متابولیسم افراد مبتلا می شود. دیابت ملیتوس تیپ I یا دیابت وابسته به انسولین یک بیماری خودایمنی است که در آن سلول های T خودواکنشگر ایمنی میزبان سلول های β پانکراس تولیدکننده انسولین را تخریب می کند. این امر موجب کمبود انسولین و هیپرگلیسمی شده و مشکلات بالینی طولانی مدتی از قبیل نارسایی کلیه و رتینوپاتی در مبتلایان سبب می گردد. درمان کلاسیک این بیماری هنوز هم به طور عمده استفاده از انسولین اگزوژن می باشد که این درمان مکمل برای تنظیم گلوکز خون در دامنه نرمال کافی نیست و می تواند باعث ایجاد عوارض بالینی گردد. به همین منظور تحقیقات گوناگونی برای دستیابی به درمان های موثرتر با عوارض جانبی کمتر برای بیماران دیابتی در حال انجام می باشد. به همین منظور در سال های اخیر با

پیشرفت بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی پزشکی، تراژنها (Transgenes) به عنوان ساختارهای جالب توجهی متولد گردیدند و در خدمت اهداف مختلف زیستی و پزشکی قرار گرفتند. در ارتباط با دیابت ملیتوس و راهکارهای مورد نظر مولکولی مورد تحقیق در آن حوزه می توان تراژنها را به سه گروه تقسیم کرد.: گروهی که پروتئینهای محلول جهت تعامل با سلول های infiltrating را کد کنند، گروهی که پروتئین های ضد آپوپتوزی/prosurvival داخل سلولی را کد می کنند و گروهی که فاکتورهای تمایز را برای پیش سازهای سلول β کد می نمایند. از سوی دیگر متدهای دیگری وجود دارند که متکی به تولید سیستمیک فاکتورهایی هستند که تنظیم سلول ایمنی (از طریق افزایش تعداد و فعالیت سلول های T تنظیمی یا از طریق کاهش اثرات سلول های ایمنی آنتی گرافت به عنوان نمونه) را ارتقا نی بخشند[۴]. دو عامل مهم نگران کننده مربوط به ورود به درمانهای انسانی برای محققین وجود دارد: یکی از آنها سمیت وکتور برای بافت القا شده و دیگری پاسخهای ضد وکتوری می باشد.

از انواع دیگر بیماری دیابت میتوان به دیابت MODY که نوع نسبتا نادری از دیابت است و علت آن نوعی موتاسیون ژنتیکی می باشد، دیابت حاملگی (Gestational diabetes)، LADA نوعی از دیابت تیپ I است که در بزرگسالان اتفاق می افتد و همچنینDiabetes insipidus که علت آن مربوط به بالا بودن میزان قند خون نمی باشد اشاره کرد.

با توجه به شیوع بیماری دیابت در جهان، کنترل و درمان این بیماری از اهمیت ویژه ای در میان بیماری های مزمن متابولیسمی برخوردار می باشد، از این رو تلاش های بسیاری ازسوی پژوهشگران و محققین در راستای درمان انواع مختلف از این بیماری انجام گرفته است.

با توجه به اهمیت ویژه فعالیت انسولین در تنظیم سیستم متابولیسمی بدن و به دنبال آن عدم کارایی کافی درمان های فعلی در راستای کنترل این بیماری، راهکارها و روش های بسیاری مورد تحقیق و بررسی می باشد . یکی از روش های درمانی که امروزه مورد توجه ویژه واقع شده است ژن درمانی می باشد که به دلیل پایداری بهتر آن نسبت سایر روش ها اهمیت زیادی به ویژه در درمان دیابت تیپ I پیدا کرده است. با وجود تلاشهای فراوان تاکنون روش ایمن و کارآمدی بدین منظور محقق نشده است.

۱-۲- شیوه های گوناگون انتقال ژن

اشکالات درمان با انسولین شامل طاقت فرسا بودن و هیپوگلیسمی می باشد. بنابراین روش های بهتری در حال بررسی و کارآزمایی های بالینی در سطح سلولی و حیوانی می باشد که از جمله می توان به پیوند سلول های جزیره ای، پیونو پانکراس، رژنراسیون سلول های β و ژن درمانی انسولین اشاره کرد که تا کنون هیچکدام از این روش ها برای درمان دیابت رضایت بخش نبوده است[۵-۶].

ژن درمانی، انتقال ماده ژنتیکی درمانی به سلول های هدف اختصاصی برای جلوگیری یا درمان بیماری خاص می باشد. از آنجایی که دیابت نوع ۱ حاصل کمبود انسولین می باشد بنابراین کاندیدای خوبی برای ژن درمانی در جهت تصحیح کمبود انسولین می باشد. تلاش های فراوانی برای ایجاد روش های مناسب انتقال ژن و جایگزینی عملکردی سلول های β به وسیله ارائه اجزای گوناگونی از ماشین ترشح کننده انسولین به درون سلول های غیرβ در حال انجام می باشد که این سلول ها اهداف پاسخ های اتوایمیون اختصاصی سلول های β نباشند. انتقال مواد ژنتیکی معین به سلول های هدف خاص β نباشند. انتقال مواد ژنتیکی معین به سلول های هدف خاص، یک جزضروری انتقال ژن می باشد که می تواند هم به کمک وکتورهای ویروسی و هم وکتورهای غیرویروسی انجام گیرد.

از سوی دیگر و صرف نظر از نوع حامل ژن، روش های انجام انتقال ژن را نیز می توان شامل این موارد دانست:

۱- انتقال به سلول های زاینده (Germ line): گرچه این روش می تواند باعث حذف بسیاری از مشکلات ارثی گردد اما غیراخلاقی بودن آن مانع از تکامل این زمینه علمی شده است.

۲- انتقال ژن به سلول های بدنی (Somatic cells): حاشیه امنیتی که به دلیل مقبولیت نسبی اخلاقی از ابتدا در این محدوده ایجاد گردید، باعث پیشرفت ژن درمانی در این زمینه شده است. انتقال ژن به سلول های سوماتیک می تواند به شیوه های زیر انجام شود:

الف- رها سازی در خارج ازبدن موجود زنده[۱]:

که بطور خلاصه مراحل آن شامل این موارد می باشد: برداشت سلول سوماتیک فرد، کشت این سلول ها در خارج بدن، دستکاری این سلول ها در آزمایشگاه (In vitro)، رها سازی ژن به وسیله حامل ها، کاشت مجدد (Implantation) در بدن فرد[۷]. از ویژگی هاای این شیوه می توان به این موارد اشاره کرد: عدم وجود مشکلات ناشی از ممانعت رها

[۱]. . Ex vivo gene delivery

سازی ژن به وسیله ایمنی فرد، بازدهی بالاتر نسبت به سیستم درون بدن، کاهش سمیت زایی به دلیل افزایش قدرت هدفگیری. اما از محدودیت های مهم این روش می توان به این موارد اشاره کرد: مشکلات مرتبط با کاشت مجدد سلول های دستکاری شده، از دست رفتن بسیار ساده بسیاری از سلول های دستکاری شده در خارج از بدن به دلیل مشکلات ناشی از کشت سلول ها (حتی با وجود تکنولوژی پیشرفته کشت سلولی و محیط های کشت متنوع)، پرزحمت بودن و نیازمند بودن به نگهداری سلول ها در محیط کشت، آسان نبودن کاشت مجدد سلول ها در بدن و ایجاد لانه گزینی مناسب.

ب- رها سازی درجا[1]

از اشکالات این روش می توان به بازده پایین انتقال ژن در بعضی از موارد اشاره نمود که به دلیل ماهیت بافت های مورد هدف می باشد. به عنوان مثال بافت تومور سخت تر از آن است که اجازه انتشار حامل در خود بدهد. تجویز مستقیم حامل ها به موضع و جایگاه بافت مورد نظر، یک شیوه کاربردی در افزایش کارایی انتقال بسیاری از حامل ها و سیستم های رها سازی ژنی می باشد. در این شیوه اکثرا رهاسازی ژنی فاقد عناصر هدفگیری موثر، مورد توجه می باشند.

ج) رها سازی در بدن[2]

این روش به عنوان یکی از ساده ترین و آسان ترین روش ها می باشد. بزرگترین مشکل موجود در این مسیر، وجود سیستم پاکسازی در بدن فرد می باشد. همچنین عوامل دیگری در این روش مانند سمیت زایی ناشی از حامل ها، تحریک ایمنی و ایجاد التهاب قابل توجه می باشند.

همانطور که گفته شد یکی از مهمترین مراحل در ژن درمانی، انتقال ژن مورد نظر به داخل ژنوم می باشد. در این راستا یکی از روش ها به کار بردن وکتورهای ویروسی در جهت انتقال ژن مورد نظر می باشد. استفاده از وکتورهای ویروسی به دلیل ظرفیت بالای آنها در آلوده سازی سلول ها (ترانسفکشن) و همچنین قدرت بالای جایگیری در داخل ژنوم میزبان مورد توجه قرار گرفت است. از ویروس هایی که در راستای این هدف انتخاب شدند می توان به آدنوویروس ها، آلفاویروس ها، هرپس ویروس ها، لنتی ویروس ها، رترو ویروس ها و ویروس های بکار رفته در ساخت واکسن ها اشاره کرد. اگرچه استفاده از وکتورهای ویروسی در انتقال ژن به سلولهای یوکاریوتی پدیده بسیار ارزشمندی در عرصه

[1]. In situ delivery
[2]. In vivo delivery

پزشکی به ویژه ژن درمانی به شمار می رود اما استفاده از این وکتورها معایب قابل توجهی دارد که می تواند بـر نتیجـه ژن درمانی اثرات منفی بسیاری داشته باشد. از جمله این معایب می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ظرفیت پایین بارگیری این وکتورها به دلیل حذف قسمتهای پاتوژن ویروس

- فعال شدن مجدد ویروس (وکتور مورد نظر) به دلایل مختلف و ایجاد پاسخ های ایمنی

- از مهمترین معایب این وکتورها عدم جایگیری دقیق و صحیح ژن مربوطه در داخـل ناحیـه ژنـی مـد نظـر در داخـل سلول است[۸].

بدین ترتیب تلاش های فراوانی در راستای ایجاد روشی که بتواند کارایی بالایی نسبت به روش های قبلی داشته باشد و در عین حال فاقد معایب ذکر شده باشد صورت گرفته است. از جمله این روش ها می توان به اسـتفاده از فرمـول هـای دارویی مانند طراحی لیپوپلکس و پلی پلکس و دارو های طراحی شده به عنـوان وکتـور جهـت انتقـال ژن، طراحـی و ساخت وکتورهای مصنوعی، استفاده از DNA برهنه مانند الیگونوکلئوتیدها اشاره کرد.

به طور کلی هدف از ژن درمانی شامل جایگزینی ژن جهش یافته عامل بیماری با ژن سالم، غیرفعال کردن و یا ناک اوت کردن ژن با کارایی نامطلوب و انتقال یک ژن جدید در راستای بهبود یا مهار بیماری می باشد[۹] .

با توجه به نقایص و معایب ذکر شده در مورد وکتورهای ویروس، وکتورهای غیرویروسی که امروزه مورد توجـه بسـیار قرار گرفته اند، گام مهمی در راستای ارتقا و پیشرفت این روش درمانی می باشند.

۱-۳- بیان مسئله:

تحقیقات مرتبط با دیابت ملیتوس و روش های درمانی آن از سال های دور آغاز گردیده است. اما پژوهش ها در زمینه روش های نوین از قبیل استفاده از سلول های بنیادی، پیوند سلولی و ژن درمانی به تازگی مورد توجه محققـین قـرار گرفته است. دیابت ملیتوس تیپ ۱ یک بیماری خود ایمنی اسـت کـه در آن لنفوسـیت هـای T خودواکنشـگر ایمنـی میزبان، سلول های β پـانکراس تولیـد کننـده انسـولین را تخریـب مـی کننـد. ایـن امـر موجـب کمبـود انسـولین و هیپرگلیسمی شده و مشکلات بالینی طولانی مدت از قبیل نارسایی کلیه، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری های قلبـی– عروقی در مبتلایان را سبب می گردد. درمان کلاسیک این بیماری به طور عمده استفاده از انسولین اگزوژن مـی باشـد که این درمان برای تنظیم گلوکز خون در محدوده نرمال کافی نیست و می تواند باعث بروز علائم بالینی گردد[۱۰]. به همین منظور در سالهای اخیر با پیشرفت بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی پزشـکی روش هـای تـرانس ژنـی ماننـد ژن درمانی به عنوان روش های درمانی پایدار مورد توجه قرار گرفته اند. با توجه بـه دلایـل پیشـگفت، بـه نظـر مـی رسـد