บทฟื้นฟูวิชาการ

การรักษาโรคทางระบบประสาทส่วนกลาง ด้วยวิธีการรักษาด้วยยีน

ยศ นวฤทธิ์โลหะ*

Navalitloha Y. Gene therapy of the central nervous system diseases. Chula Med J 1998 Jan; 42(1): 35-50

Recent advances in cellular and molecular biology and better understanding of genetic and biochemical bases of different central nervous system diseases have made gene therapy of the central nervous system a realistic goal. Concept approaches for gene therapy of the central nervous system diseases are reviewed and include the following : 1) global CNS gene replacement therapy; 2) localized restorative CNS gene therapy; 3) gene therapy of brain tumors; 4) gene therapy of stroke. Techniques of viral vector-mediated CNS transfer of a therapeutic genes, transplantation of genetically modified cells, fetal embryonic implantation and/or implantation of genetically engineered neural progenitor cells, and production of a specific enzyme, neurotransmitter, and/or growth factor are discussed with respect to the therapeutic potential for global and localized CNS neurodegenerative diseases and stroke. Transfection of the CNS tumor cells with drug susceptibility ("suicide") gene and/or "toxic" gene and antisense strategies and a concept of adoptive immunotherapy of brain tumors are also discussed. Other approaches, such as transfer of drug-resistant genes and monoclonal antibody gene transfer, are briefly discussed. In addition to summarizing current principles of gene therapy for several groups of CNS diseases, the issues that remain to be resolved in

* ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

clinical reality, such as delivery of the genetic material and regulation of the cellular expression of the transgene, and the negatives associated with the concepts of gene therapy, such as transient gene expression, toxicity of viral proteins and the problem of immune response to the transfected protein, have been also identified.

Key words : *Alzheimer's disease, Brain tumor, Gene therapy, Parkinson's disease, Stroke.*

Reprint request : Navalitloha Y. Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. November 15, 1997.

ยศ นวฤทธิ์โลหะ. การรักษาโรคทางระบบประสาทส่วนกลางด้วยวิธีการรักษาด้วยยีน. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2541 ม.ค; 42 (1): 35-50

ความก้าวหน้าทางชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลในปัจจุบัน และการเข้าใจพื้นฐานทางพันธุกรรมและชีวเคมีของโรคต่างๆ ทางระบบประสาทส่วนกลางมากขึ้น ทำให้มีการพัฒนาวิธีการรักษาด้วยยีนขึ้น ได้ทบทวนแนวทางการรักษาโรคทางระบบประสาทด้วยวิธีการรักษาด้วยยีน ซึ่งประกอบด้วย 1.) Global CNS gene replacement therapy 2.) Localized restorative CNS gene therapy 3.) Gene therapy of brain tumors และ 4.) Gene therapy of stroke วิธีการใช้ไวรัสเป็นตัวขนถ่ายที่สารพันธุกรรมใช้ในการรักษา การปลูกถ่ายเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงสารพันธุกรรม การปลูกถ่ายเซลล์ตัวอ่อนของทารก การปลูกถ่าย neural progenitor cells ที่ได้รับการปรับปรุงด้วยวิธีทางวิศวพันธุกรรม การสร้างเอนไซม์ และ growth factor ที่ต้องการ การใช้ drug susceptibility ("suicide") gene และ/หรือ "toxic" gene antisense strategies และแนวคิดของ adoptive immunotherapy of brain tumors ได้ถูกอภิปรายถึงประโยชน์ที่จะนำมาใช้ นอกจากนี้วิธีอื่นๆ เช่นการ transfer of drug-resistant genes และ monoclonal antibody gene transfer ได้อภิปรายอย่างสั้นๆ นอกเหนือไปจากการสรุปวิธีการสำคัญในการรักษาด้วยยีนแล้ว ยังได้บอกถึงปัญหาในการนำมาใช้ทางคลินิค เช่น การขนส่งสารพันธุกรรม การควบคุมการทำงานของเซลล์ พิษของโปรตีนของไวรัสและปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่ถูกสร้าง เป็นต้น

ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล ได้ทำให้มีการพัฒนาการรักษาโรคของระบบประสาทส่วนกลางด้วยวิธีการรักษาด้วยยีน (Gene therapy) เกิดขึ้น ซึ่งเรียกว่า "Cellular and Molecular Neurosurgery"ซึ่งในปัจจุบันได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ

1. Global CNS gene replacement therapy วิธีการนี้มุ่งเน้นไปที่โรคของการเสื่อมของระบบประสาททั่วไปซึ่งถ่ายทอดพันธุกรรม เช่น การขาดหายไปของเอนไซม์บางตัว

2. Localized restorative CNS gene therapy วิธีการนี้มุ่งเน้นในการทำให้เซลล์บางกลุ่มของระบบประสาทซึ่งสูญเสียการทำงานไปจากขบวนการเสื่อมกลับมาทำงานได้อีก

3. Gene therapy of brain tumors

4. Gene therapy of stroke

Global CNS gene replacement therapy

Viral vector-mediated gene transfer

การทดแทนยีนที่ขาดหายไปด้วยการใช้ไวรัสเป็นตัวนำยีนเข้าไปมีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะทำให้เซลล์สมอง เช่น neurons และ astrocytes สามารถสร้างโปรตีนที่ขาดหายไปได้ วิธีการนี้ได้นำไปใช้ในการรักษาโรคของการขาดเอนไซม์ และภาวะผิดปกติทางเมตาบอริซึ่มที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม[1] ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ lysosomal storage disorder โดยที่ความผิดปกติเหล่านี้ควรจะได้รับการรักษาเร็วที่สุด โดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการน้อย หรือในผู้ใหญ่ที่มีความผิดปกติเกิดจาก recessive mutation ในยีนเดียว เช่น Sandhoffs disease[2] โดยที่การทดแทนยีนด้วย allele ที่ปกติเพียงอันเดียวก็เพียงพอสำหรับการรักษาความผิดปกติเหล่านี้ซึ่งต่างจากความผิดปกติที่เกิดจาก dominant mutation หรือเกิดจากยีนหลายตำแหน่งหรือยีนหลายตัว ซึ่งพบในเด็กแรกคลอดที่มีความผิดปกติของการเคลื่อนไหวและสติปัญญาอย่างรุนแรง ความผิดปกติที่เกิดกับเนื้อสมองในผู้ป่วยเหล่านี้มักจะไม่สามารถรักษาได้

การใช้ไวรัสเป็นตัวนำยีนเข้าไปเพื่อทดแทนยีนที่ขาดหายไปในการรักษาโรคความผิดปกติทางเมตาบอริซึ่มแต่กำเนิดนั้น จำเป็นต้องทราบถึงยีนที่ผิดปกติว่าอยู่ที่ตำแหน่งใด, ลำดับใดและมีตัวนำที่สามารถนำยีนเข้าไปได้[3] นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคบางอย่างขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ที่ขาดหายไป ซึ่งปริมาณเอนไซม์ 5-10 % ที่พบในเซลล์ปกติก็สามารถทำให้เซลล์เหล่านี้มีการทำงานที่ปกติได้ฉะนั้นการทดแทนยีนแล้วทำให้เซลล์เหล่านี้สามารถสร้างปริมาณเอนไซม์เพียงเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะรักษาโรคเหล่านี้ที่เกิดในระยะหลัง (late onset) ได้[2]

ปัญหาใหญ่ในการรักษาโรคเหล่านี้ คือ วิธีการที่จะนำยีนปกติเหล่านี้ไปสู่เซลล์โดยทั่วไปในระบบประสาทส่วนกลางเพื่อที่จะให้เซลล์เหล่านี้ทำงานตามปกติ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดสามารถนำยีนเข้าไปทดแทนในทุกเซลล์ของระบบประสาทส่วนกลางได้ แต่จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าวิธีการ blood-brain barrier (BBB) disruption delivery technique โดยใช้ hypertonic manitol ทำให้ BBB endothelium หดตัว อาจจะเป็นทางให้ยีนที่มีไวรัสเป็นตัวนำเหล่านี้สามารถผ่านเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้[1]

Neural progenitor cells

การใช้ neural progenitor cells เป็นตัวนำยีนเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการรักษาทางพันธุกรรมของโรคทางระบบประสาทส่วนกลาง[4] ได้มีการนำวิธีนี้ไปทดลองรักษาหนูที่เป็นโรค MPS VII (Sly disease)[5] ซึ่งโรคนี้เกิดจากการขาดเอนไซม์ β-glucuronidase เป็นผลให้ glucosaminoglycans สะสมอยู่ใน lysosome เป็นผลให้เกิดการตายและเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท โดยที่หนูที่เป็นโรคนี้จะถูกปลูกถ่าย neural progenitor cell ที่สามารถผลิต β-glucuronidase ไว้ใน ventricle เมื่อหนูเหล่านี้เจริญเติบโต พบว่าหนูที่ได้รับการปลูกถ่าย

neural progenitor cells มีอาการทางระบบประสาทและพฤติกรรมที่ปกติ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งจะเสียชีวิตไปก่อนหน้านั้น เมื่อนำหนูที่ได้รับการปลูกถ่าย neural progenitor cells มาตรวจจะพบว่า มีการกระจายของเซลล์ที่ถูกปลูกถ่ายอยู่ทั่วไปและสามารถสร้าง β-glucuronidase ได้ นอกจากนี้ยังไม่พบหรือมีปริมาณ lysosome ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[5]

เมื่อเทียบการใช้ neural progenitor cells กับ fibroblast หรือเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ของระบบประสาท ในการนำยีนเข้าไปสู่สมองพบว่า การใช้ neural progenitor cell มีข้อดีกว่าคือเซลล์เหล่านี้สามารถรวมกับเซลล์อื่น ๆ ที่เป็นโครงสร้างของระบบประสาทอยู่ก่อนแล้วได้[6]

Cell replacement and restorative gene therapy

ความซับซ้อนของสาเหตุ, พันธุกรรมและพยาธิสภาพกำเนิดของความผิดปกติเนื่องจากการเสื่อมของเซลล์ระบบประสาทที่เกิดขึ้นระยะหลัง เช่น Parkinson's disease, Huntington's disease หรือ Alzheimer's disease ทำให้มีการศึกษาค้นคว้าวิธีการรักษาด้วยยีนหลายวิธีเพื่อใช้ในการซ่อมแซมเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษเหล่านี้ และเนื่องจากเซลล์ประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เจริญเต็มที่แล้วไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองหรือสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมา จึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการพัฒนาการรักษาด้วยยีน ฉะนั้นวิธีการส่วนใหญ่ในการพัฒนาจึงเป็นการปลูกถ่ายเซลล์ตัวอ่อนของทารกหรือเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงทางพันธุกรรมเข้าไปในระบบประสาทส่วนกลางเฉพาะตำแหน่ง เพื่อให้เซลล์เหล่านั้นทำงานทดแทนหน้าที่ของเซลล์ประสาทที่เสื่อมไป

Parkinson's disease

ถึงแม้ว่าสาเหตุที่แท้จริงและพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพกำเนิดของโรคพาร์คินซันยังไม่ทราบแน่นอน แต่กลไกสำคัญที่ทำให้เกิดอาการในโรคนี้เป็นที่แน่นอนแล้วว่า เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท dopaminergic ของ Nigrostriatal pathway ดังนั้นการรักษาจึงมุ่งเน้นไปที่การซ่อมแซม Dopaminergic system

Cell replacement

ได้มีการปลูกถ่ายเซลล์ dopaminergic ที่เป็นเซลล์ตัวอ่อนของทารกเข้าไปยัง Caudate nucleus เพื่อรักษาโรคพาร์คินซันที่ไม่ทราบสาเหตุและที่เป็นผลจาก 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine พบว่าสามารถรักษาโรคพาร์คินซันในระยะที่สองได้[7] แต่ปัญหาสำคัญของวิธีการนี้คือ การที่จะได้เซลล์เหล่านี้มาทำการปลูกถ่ายนั้นยังเป็นข้อถกเถียงด้านจริยธรรม ขณะนี้จึงได้มีการพัฒนาเพื่อหาเซลล์อื่นมาใช้ทดแทนเช่น การใช้ Cultured neuronal cell line[8]

ได้มีการศึกษาในสัตว์ที่เป็นโรคพาร์คินซัน โดยใช้ fibroblast ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิต levo-3,4-dihydroxyphenylamine (L-dopa)[9] หรือใช้ astrocyte ที่สามารถผลิต L-dopa โดยใช้ retrovirus นำยีนที่ผลิต tyrosine hydroxylase เข้าสู่เซลล์[10] พบว่าสัตว์เหล่านี้มีการทำงานของร่างกายดีขึ้น 2 สัปดาห์ ภายหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์

นอกจากนี้ยังได้มีการ ใช้ neurotrophic factors เพื่อยืดอายุของเซลล์ประสาทในการรักษาโรคที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยเฉพาะ brain-derived neurotrophic factor (BDNF) พบว่าสามารถกระตุ้นและปกป้องเซลล์ประสาท dopaminergic ได้[11] โดยพบว่าเมื่อปลูกถ่าย astrocyte ที่มียีนที่สามารถสร้าง BDNF ของมนุษย์ในหนูที่ทำให้เกิด hemiparkinsonism พบว่าหนูมีการทำงานของร่างกายดีขึ้นอย่างชัดเจน และ astrocyte สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 42 วัน

Viral vector-mediated gene transfer

อีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคพาร์คินซันในขณะนี้ คือการทำให้ striatal cells สามารถผลิต L-dopa ได้เองโดยใช้ตัวนำนำยีน เหล่านี้เข้าไปในเซลล์โดยไม่ใช้การปลูกถ่ายเซลล์ได้มีการศึกษาโดยใช้

defective herpes simplex virus (HSV)-1 ที่สามารถสร้าง Tyrosine hydroxylase ของมนุษย์ใส่ใน partially denervated striatum of 6-hydroxy-dopamine-lesioned rats[12] พบว่าหนูเหล่านี้มีพฤติกรรมและปริมาณ dopamine กลับมาเป็นปกติ และสามารถคงอยู่นานถึง 1 ปี หลังจากการปลูกถ่ายยีน

Plasmid .deoxyribonucleic acid (DNA) lipofectin

การฉีด plasmid .DNA. lipofectin เข้าไปในเซลล์ประสาทโดยตรง เป็นอีกวิธีหนึ่งในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ได้มีการทดลองโดยใช้ plasmid .DNA . lipofectin ที่มียีนที่สามารถสร้าง tyrosine hydroxylase ใส่เข้าไปใน hemiparkinsonian rats พบว่า หนูมีอาการที่ดีขึ้นอย่างมากและรวดเร็ว ซึ่งบ่งชี้ว่า เซลล์ประสาทที่มี plasmid-DNA อยู่ สามารถสร้าง L-dopa ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อชดเชยส่วนที่ขาดหายไปได้[13]

Alzheimer's disease

โรคอัลไซเมอร์ เป็นอาการที่พบบ่อยที่สุดของ human amyloidosis และเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดความจำเสื่อม ซึ่งพบมากกว่า 5% ในประชากรที่มีอายุมากกว่า 65 ปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่ พัฒนาแล้วซึ่งมีอายุเฉลี่ยของประชากรยาวนาน ในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาใด ๆ ที่ได้ผลสำหรับโรคนี้

ในการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ อาศัยการยืนยันจากการตรวจทางพยาธิวิทยา โดยจะพบลักษณะสำคัญ คือ 1) intraneuronal deposits(neurofibrillary tangles) 2) neuritic or senile plaques 3) cerebrovascular amyloidosis ที่เส้นเลือดขนาดกลางและขนาดเล็กของ leptomeninges และ cerebral cortex Amyloid β (Aβ) เป็นส่วนประกอบสำคัญของ fibrils ที่ประกอบเป็น senile plaques และ vascular deposits ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้อายุของเซลล์ประสาทสั้นลงและตายในที่สุด[14] มีการศึกษาพบว่า มีความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมระหว่าง apolipoprotein E4 (apo E4) กับโรคอัลไซเมอร์ ชนิด sporadic และ late-onset familial type[15] โดยที่ Apo E4 allele มีความเกี่ยวข้องกับการสะสมของ senile plaques, เร่งการเกิด cerebral fibrillogenesis, [16] cholinergic dysfunction และทำให้การตอบสนองต่อการรักษาด้วย acetylcholinesterase inhibitors ลดลง[17] ปัจจุบันได้มีการทดลองในหนูซึ่งมีพยาธิสภาพบริเวณ fimbria-fornix ซึ่งจะมีพฤติกรรมและความจำที่ผิดปกติร่วมกับมีการสูญเสีย cholinergic cells บริเวณ septal area เมื่อทำการปลูกถ่าย neural growth factor-expressing immortalized neural progenitor cells เข้าไปบริเวณ septum ของหนูเหล่านี้ พบว่าสามารถหยุดยั้งการสูญเสียของ cholinergic cells ได้[18] ซึ่งวิธีการนี้อาจนำมาใช้ในการให้ neuroprotective trophic factors เพื่อรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในอนาคต นอกจากนี้พบว่าการขาดการทำงานของ apo E3 หรือ apo E2 ในประชากรที่เป็น homozygous apo E4 อาจทำให้เกิดโรคนี้ได้เนื่องจาก apo E3 และ apo E2 มีหน้าที่ป้องกันการเกิด neurofibrillar tangles ฉะนั้นการเข้าใจบทบาทของ apo E4[16] และ apo E3[19] ร่วมกับการป้องกันการขนถ่าย Aβ จากระบบไหลเวียนโลหิตเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง[20] อาจช่วยในการค้นหาวิธีเพื่อป้องกัน หรือให้การรักษาทางพันธุกรรมของโรคอัลไซเมอร์ชนิดนี้ได้ในอนาคต

ในโรคอัลไซเมอร์ชนิด early-onset familial type ได้พบว่ามีความเกี่ยวเนื่องกับยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 14 ที่ชื่อว่า *Presenilin 1*[21] และยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 1 ที่ชื่อว่า *Presenilin 2* [22,23] การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของยีนคู่นี้มากกว่า 26 แบบ พบว่ามีความเกี่ยวเนื่องกับโรคอัลไซเมอร์ชนิดนี้[24] นอกจากนี้ยังพบว่าในโรคอัลไซเมอร์ชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เป็นกำหนดการสร้าง Aβ-precursor protein เหมือนที่พบใน classical hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis,

Dutch-type[25] อีกด้วย

จากการศึกษาทดลองเพื่อรักษาโรคนี้พบว่า blood-brain barrier อาจมีส่วนสำคัญในการควบคุมการขนถ่ายเข้าและออกจากระบบประสาทส่วนกลางของ Aβ และ apolipoproteins ชนิดต่างๆ[20,26,27] ซึ่งบ่งชี้ว่าแนวทางการรักษาของโรคนี้น่าจะมุ่งไปที่ BBB เพื่อลดการเกิด amyloidosis[20]

Gene therapy of brain tumors

"Suicide" genes

ปัจจุบันได้มีการทดลองถ่ายทอดยีนหลายวิธีเพื่อใช้ในการรักษาเนื้องอกสมอง การใช้ยีน *HSV thymidine kinase (HSV-tk)* เป็นตัวอย่างหนึ่งของการใช้ "suicide" หรือ drug susceptibility gene เพื่อทำลายเนื้องอก โดยที่เซลล์ที่ได้รับยีน *HSV-tk* จะสามารถถูกทำลายด้วย ganciclovir (GCV) ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาไวรัสกลุ่ม Herpes โดยที่เอนไซม์ thymidine kinase ซึ่งถูกสร้างโดย HSV จะ phosphorylate nucleoside analoge เช่น GCV เป็น nucleotide-like precursors ซึ่งจะไปหยุดการสร้าง DNA ทำให้เซลล์นั้นตาย ปัจจุบันมีการทดลองการรักษาเนื้องอกสมองในสัตว์ทดลองโดยใช้ retrovirus, HSV หรือ adenovirus เป็นตัวนำยีน *HSV-tk* เข้าสู่เซลล์ของเนื้องอก ซึ่งพบว่าเนื้องอกเหล่านี้มีขนาดเล็กลง[28-32] ในปัจจุบันการรักษาเนื้องอกสมองด้วยวิธีการผ่าตัดและการฉายแสง ร่วมกับการใช้ Retroviral-mediated *HSV-tk/GCV* ขณะนี้อยู่ในขั้น clinical trial โดยการใช้ murine fibroblasts ที่สามารถสร้าง *HSV-tk* retroviral vectors ในผู้ป่วย recurrent glioblastoma พบว่าสามารถลด ขนาดของเนื้องอกบางส่วนได้[33]

เนื่องจาก retrovirus จะรวมตัวเฉพาะกับเซลล์ที่แบ่งตัวจึงเป็นข้อดีของวิธีที่จะนำไปใช้รักษาเนื้องอกสมอง ขณะที่เซลล์ประสาทปกติอื่น ๆ ซึ่งไม่มีการแบ่งตัวจะไม่มีผลกระทบ[34] แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีผลข้างเคียงที่พบคือ 1) พบการแพร่กระจายของ retrovirus ทั้งในและนอกระบบประสาทส่วนกลางได้ 2) พบการเจริญเติบโตของ murine vector producer cell บริเวณที่ฉีด 3) เกิดปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ที่ปลูกถ่ายและเนื้อสมองปกติ ซึ่งเป็นผลจาก toxic by-products ของปฏิกริยาระหว่าง HSV-tk-GCV[31] ซึ่งผลข้างเคียงเหล่านี้ได้มีการรายงานประปราย และเนื่องจาก GCV เป็นยาที่มีผลเป็นพิษต่อระบบการสร้างเม็ดโลหิต และสามารถผ่านระบบประสาทส่วนกลางได้ในปริมาณน้อย ฉะนั้นวิธีการที่จะเพิ่มการขนถ่าย GCV ข้าม blood-brain-tumor barriers จึงยังเป็นปัญหาที่ต้องการการแก้ไขต่อไป[35]

Herpes simplex virus mutants

เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการรักษาเนื้อสมอง โดยใช้ HSV ที่ผ่านขบวนการทางวิศวพันธุกรรม ซึ่งในการทดลองเริ่มแรก ได้ใช้ tk-negative mutant of HSV-1 (dlsp TK) รักษา nude mice ที่เป็น intracranial human glioma พบว่า หนูมีชีวิตอยู่นานขึ้นตามปริมาณไวรัสที่ใช้[36] นอกเหนือไปจากไวรัสที่ขาดยีน *tk* ในปัจจุบันสามารถสร้างไวรัสที่ขาดยีน *ribronucleotide reductase* หรือไวรัสที่ขาดยีน $\gamma_1$34.5 ซึ่งไวรัสเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตเหมือนไวรัสปกติในเซลล์ที่แบ่งตัวหลายชนิด โดยที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ไม่แบ่งตัว[37,38] โดยการทดลองพบว่าไวรัสเหล่านี้จะทำให้ glioma cells แตกสลาย และสัตว์ทดลองที่มีเนื้องอกนี้อยู่มีชีวิตอยู่นานขึ้น[39] แต่ยังไม่พบว่าสามารถทำให้เนื้องอกหายขาดได้และยังพบว่าไวรัสบางตัวอาจทำให้เกิดเนื้อสมองอักเสบได้ และอาจดื้อต่อยาที่ใช้เอนไซม์ *tk* เป็นตัวทำปฏิกริยา แต่อย่างไรก็ตามในสัตว์ทดลองการอักเสบของเนื้อสมองที่เกิดขึ้นสามารถรักษาได้ด้วย GCV ซึ่งอาจจะเกิดจากไวรัสยังมีปฏิกริยาไวต่อยาอยู่[40]

Antisense strategies

การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสมองจากเนื้องอกที่ไม่ร้ายไปสู่เนื้อร้าย อาศัยการเปลี่ยนแปลงของยีนระดับ

โมเลกุลหลายขั้นตอน ยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลง, ยีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการกลายเป็นเนื้อร้ายและการเจริญของเนื้องอก และยีนที่มีผลต่อ cell cycle และ angiogenesis เหล่านี้เป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาโดยการยับยั้งที่ขบวนการ transcription ด้วยการใช้ complementary DNA (cDNA) ซึ่งโดยปกติจะไม่ถูกถอดรหัสสร้างเป็น m-RNA (antisense strand or noncoding strand)

ความผิดปกติในการควบคุมการแบ่งเซลล์ อาจเกิดจากการที่มี peptide growth factor ที่มากเกิน ในสัตว์ทดลองที่มีเนื้องอกสมอง พบว่า การเจริญของเนื้องอกสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดย basic fibroblast growth factor DNA ทั้งจากสายที่ใช้ถอดรหัส และสายที่ไม่ถูกถอดรหัส (sense and antisense orientation) โดยเซลล์ที่มี RNA ที่สร้างจาก DNA สายที่ปกติใช้ถอดรหัส (sense) จะมีการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณ basic fibroblast growth factor ที่สูง ในทางกลับกันเซลล์ที่มี RNA ที่สร้างจาก DNA สายที่ปกติไม่ถูก ถอดรหัส (antisense) จะมีการแบ่งตัวลดลงและไม่สามารถ ตรวจพบปริมาณ basic fibroblast growth factor ได้ [41] อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีอุปสรรคสำคัญ คือการขนถ่าย, ความจำเพาะเจาะจงและประสิทธิภาพในการไปใช้ ซึ่งยังคงต้องได้รับการพัฒนาต่อไป

ได้มีการศึกษาพบว่า การควบคุมการเจริญของเนื้องอกยังสามารถใช้ antiangiogenesis gene[42] โดยพบว่า tumor angiogenesis เกี่ยวข้องกับหลายขบวนการ เช่น การสร้าง inhibitors, proteases และ angiogenesis factors ซึ่งมี chemotactic และ mitogenic effect ต่อ endothelial cells โดยที่ vascular endothelial growth factor เป็น endothelial cell-specific mitogen ที่เร่งการเกิด angiogenesis ในเนื้องอกรวมทั้งเนื้องอกสมอง เช่น astrocytoma จากการทดลองพบว่า เนื้องอกที่ประกอบด้วย antisense vascular endothelial growth factor C6 glioma cell lines จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยพบว่าเนื้องอกนี้จะมีปริมาณหลอดเลือดลดลงและมีบริเวณที่มีการตายของเนื้องอกเพิ่มขึ้น[42]

นอกจากนี้ยังมีการทดลองนอกสิ่งมีชีวิตพบว่า proto-oncogene cyclin G1 มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของ human osteosarcoma cells ซึ่งบ่งชี้ว่า การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่ควบคุม cell cycle อาจจะนำไปสู่การรักษามะเร็งได้[43] จากการศึกษาการเจริญของเซลล์พบว่า cyclin เป็น protooncogenes และ cyclin-dependent kinase inhibitors เป็น tumor suppressors โดยสารทั้งสองตัวนี้ร่วมกันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และการเจริญกลายเป็นเนื้องอก ในระดับ enzymology-governing cell cycle control [44,45] ได้มีการทดลองนำยีน cyclin G1 ใส่ใน human MG-63 osteosarcoma cells พบว่า ทำให้เกิด cytostatic และ cytocidal effect และตามมาด้วย apoptosis[43] ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่ควบคุม cell cycle ในลักษณะนี้อาจจะนำมาใช้ในการรักษาเนื้องอกสมองต่อไปได้

Adoptive immunotherapy

การรักษา malignant glioma ในปัจจุบัน adoptive immunotherapy ซึ่งเป็นการรักษามะเร็งด้วยการเปลี่ยนแปลง cytokines และ immunoregulatory molecules เป็นแนวทางอันหนึ่งในการรักษาที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีผลต่อเนื้องอกแต่ละชนิดอย่างเฉพาะเจาะจง[46] แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะประสบความสำเร็จในการรักษาเนื้องอกนอกเนื้อสมองบางชนิด แต่ผลการรักษาสำหรับเนื้องอกสมองแล้วยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ซึ่งอาจจะเกิดจาก BBB และ blood-brain-tumor barrier ที่ทำให้ปฏิกริยาต่อระบบภูมิคุ้มกันลดลง หรือเนื้องอกสมองเองสามารถรอดพ้นจากการตรวจสอบของระบบภูมิคุ้มกัน[47] หรือสามารถเปลี่ยนแปลงปฏิกริยาของภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มปริมาณของ immunosuppressive cytokines ขณะที่ลดการทำงานของ immunogenic cytokines บางตัว[48]

ปัจจุบันได้มีการค้นพบ transforming growth factor β (TGF-β) ซึ่งเป็น potent immunosuppressive agent ตัวหนึ่งและถูกหลั่งออกมาในปริมาณมากจาก glioblastoma บางชนิด [49] โดยจากการทดลองพบว่าเนื้องอกที่มี murine TGF-β cDNA สามารถรอดพ้นจากการตรวจสอบของระบบภูมิคุ้มกันได้[50] และได้มีการทดลองโดยใช้ antisense therapy หยุดการสร้าง TGF-β ใน rat 9L glioma cells พบว่าสามารถลดการกดภูมิคุ้มกันของ TGF-β เป็นผลให้สัตว์ทดลองที่มีเนื้องอกชนิดนี้มีชีวิตอยู่นานขึ้น[51] แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะประสบความสำเร็จในการรักษาเนื้องอกชนิดนี้ด้วยวิธีนี้ก็ตาม เซลล์เนื้องอกชนิดอื่นอาจหลั่ง cytokines หรือ growth factor ตัวอื่นร่วมด้วย เป็นผลให้การตอบสนองต่อ TGF-β modification ไม่ได้ผลเท่าที่ควร[52,53]

Gene therapy of stroke

Therapeutic genes

ปัจจุบันพบว่ายีนหลายตัว มีผลต่อเนื้อสมองที่ขาดเลือด[54] ตัวอย่างเช่น พบว่า interleukin-1 (IL-1) มีผลต่อความเสียหายของเนื้อสมองที่ขาดเลือด[55] และเมื่อนำ adenovirus ที่มี human IL-1 receptor antagonist protein (IL-1ra) cDNA (Ad. RSVIL-1ra) ใส่ในสมองเพื่อให้มีการสร้าง IL-1ra ในเนื้อสมองพบว่าสามารถลดขนาดของเนื้อสมองที่ตายจากการขาดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ[56] โดยกลไกที่ IL-1ra สามารถลดขนาดของเนื้อสมองที่ตายจากการขาดเลือดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่น่าจะเกี่ยวกับการป้องกันการทำงานของ IL-1 เช่น ลดการหลั่งของ arachidonic acid, ลดการสร้างของ nitric oxide หรือลดปฏิกริยาการอักเสบ[55]

นอกจากนี้ยังพบว่าการที่เซลล์ประสาทตายหลังจากขาดเลือด มีขบวนการบางอย่างคล้ายคลึงกับขบวนการ apoptosis[57] ซึ่งเป็นขบวนการตายของเซลล์ที่ถูกกำหนดโดยยีน เพื่อลดจำนวนเซลล์ที่เกินความจำเป็นขณะที่มีการเจริญและพัฒนาของเซลล์[58] โดยที่การทำงานของยีน bcl-2 สามารถช่วยไม่ให้เซลล์ประสาทตายได้[59] และจากการทดลองโดยใช้ defective HSV-1 ที่มียีน bcl-2 พบว่าสามารถจำกัดการตายของเซลล์ประสาทเมื่อขาดเลือดได้[57]

Genetic manipulation with hemostasis-related proteins

วิวัฒนาการทางการปรับปรุงสารพันธุกรรมในปัจจุบัน สามารถเปลี่ยนแปลงการทำงานของ hemostasis-related proteins หลายชนิดรวมทั้ง fibrinolytic t-PA/PAI-1 system[60] ได้มีการทดลองในหนูที่ขาด *t-PA* และ *PAI-1* โดยใส่ adenovirus ที่มียีน *recombinant PAI-1-resistant human t-PA* ในหนูที่ขาด *t-PA* พบว่ามีการทำงานเพิ่มขึ้นของยีน *recombinant PAI-1-resistant human t-PA* 100-1,000 เท่าของค่าปกติ และสามารถเพิ่มการทำงานของ thrombolytic process ที่ขาดไปได้[61] ในทางกลับกัน adenovirus มีที่ยีน recombinant human PAI-1 สามารถลดการทำงานของ thrombolytic process ที่เพิ่มขึ้นในหนูที่ขาด PAI-1 ได้เช่นกัน

ปัจจุบันได้มีการศึกษาพบว่าการตายของเซลล์ประสาทหลังจากการขาดเลือดในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงอาจเกี่ยวเนื่องกับการลดการทำงานของยีน t-PA และ anticoagulant thrombomodulin ที่หลอดเลือดของสมองเช่นที่ microvascular endothelial cells[62] ดังนั้น การเพิ่มการทำงานของ anticoagulant หรือ ลดการทำงานของ procoagulant และ antifibrinolytic components ที่มีผลโดยตรงบริเวณ microvascular endothelium และ cerebral microcirculation อาจจะเป็นการรักษาทางพันธุกรรมวิธีหนึ่งในอนาคต ในการป้องกันการเกิดสมองขาดเลือดในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยง เช่น เบาหวาน, การสูบบุหรี่ หรือ ความดันโลหิตสูง

Other gene therapy approaches

Transfer of drug resistance genes

ยีนที่มีผลต่อการดื้อยา (drug resistance genes) หลายตัว พบว่ามีประโยชน์ในการรักษาทางพันธุกรรม เพื่อลดผลข้างเคียงของเคมีบำบัด โดยเฉพาะที่ hematopoietic tissue เนื่องจากการกดไขกระดูกเป็นผลข้างเคียงสำคัญของสารเคมีบำบัด การศึกษาในปัจจุบันสามารถทำให้ murine และ human hematopoietic progenitors สามารถสร้าง P-glycoprotein, dihidrofolate reductase และ O6-alkylguanine ได้โดยใช้ retrovirus นำยีนเหล่านี้เข้าสู่เซลล์[63] ซึ่งขณะนี้วิธีการนี้ได้กำลังศึกษาผลอยู่ในผู้ป่วยที่มีการกดไขกระดูกจากสารเคมีบำบัด

Monoclonal antibody gene transfer

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาสารต้านมะเร็งตัวใหม่ที่สามารถแบ่งแยกระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์เนื้องอก[64] โดยที่ antigenic determinants บนผิวของเซลล์เนื้องอกจะเป็นตัวกำหนดการแบ่งแยกระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์เนื้องอก (recognition) ยกตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งรังไข่, มะเร็งปอดและมะเร็งกระเพาะอาหาร จะมีปริมาณของ ErbB-2 receptor(ErbB-2R) มากกว่าปกติมากเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ receptor นี้จึงเหมาะที่จะเป็นเป้าหมายของการรักษาเนื้องอกเหล่านี้ จากการทดลองโดยสร้างยีนที่เป็นตัวกำหนด single chain antibody molecule (scFv) ที่มีความจำเพาะต่อ extracellular domain ของ ErbB-2R จาก cDNA ที่เป็นตัวกำหนด light และ heavy chain variable domain ของ monoclonal antibody FRP5 ซึ่งยีนที่สร้างขึ้นนี้จะนำไปใช้ 2 ลักษณะคือ 1) เชื่อมต่อกับ *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A gene สร้างเป็น recombinant immunotoxin-encoding gene (ซึ่งยีนนี้จะเป็นตัวกำหนดการสร้าง antibody ที่ทำลายเซลล์ที่มี ErbB-2R อยู่บนผิว) และ 2) สร้าง cytotoxic T lymphocytes ที่มีความจำเพาะกับ ErbB-2R-producing tumor cells โดยใช้ retrovirus เป็นตัวนำยีนที่สร้างขึ้นนี้เข้าสู่ T-cell โดยที่ยีนที่สร้างขึ้นนี้จะเป็นตัวกำหนด scFv(FRP5) ที่บริเวณ hinge region ของ zeta chain ของ T-cell receptor complex ทำให้ T-cell นี้ มีความจำเพาะกับเซลล์ที่มี ErbB-2R อยู่บนผิว จากผลการทดลองพบว่ามีการตายเฉพาะเซลล์เนื้องอกที่มี ErbB-2R อยู่บนผิวเท่านั้น

สรุป

ความสำเร็จต่าง ๆ เหล่านี้เกิดขึ้นจาก การเข้าใจพื้นฐานทางพันธุกรรมและชีวเคมี ของความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง ร่วมกับความก้าวหน้าทางวิศวพันธุกรรมของการสร้างเซลล์ หรือไวรัสที่ใช้เป็นตัวนำ suicide และหรือ toxicity gene เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางและเซลล์เนื้องอกสมอง หลายการศึกษาในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลองบ่งชี้ว่าการรักษาด้วยวิธีทางพันธุกรรมสามารถใช้ในการรักษาความผิดปกติของระบบประสาทต่าง ๆ ได้ รวมทั้งยังแสดงถึงอุปสรรคต่าง ๆ ที่จะนำวิธีนี้มาใช้ในการรักษาผู้ป่วย ซึ่งยังต้องได้รับการค้นคว้าต่อไป เช่น ขบวนการขนส่งสารพันธุกรรม การควบคุมการแสดงออกของสารพันธุกรรมในระดับเซลล์ ประสิทธิภาพ ความจำเพาะเจาะจง การที่สารพันธุกรรมสามารถทำงานได้เพียงระยะสั้น ความเป็นพิษของโปรตีนของไวรัส และปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่สร้างขึ้น นอกจากนั้นปัญหาในการที่จะนำผลการศึกษาในระดับเซลล์มาศึกษาในสัตว์ และในสัตว์มาสู่มนุษย์ก็เป็นสิ่งที่ไม่อาจละเลยได้

อ้างอิง

1. Neuwelt EA, Pagel MA, Geller A, Muldoon LL. Gene replacement therapy in the central nervous system : Viral vector-mediated therapy of global neurodegenerative disease. Behav Brain Sci 1995 Mar ; 18(1) : 1-9

2. Leinekngel P, Michel S, Conzelmann E, Sandhoff K. Quantitative correlation between the residual activity of hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. Hum Genet 1992 Mar ; 88(5) : 513-23

3. Fleischman RA. Human gene therapy. Am J Med Sci 1991 May ; 301(5) : 353-63

4. Lacorazza HD, Flax JD, Snyder EY, Jendoubi M. Expression of human beta-hexosaminidase alpha-subunit gene (the gene defect of Tay-Sachs Disease) in mouse brains upon engraftment of transduced progenitor cells. Nature Med 1996 Apr ; 2(4) : 424-9

5. Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. Nature 1995 Mar 23; 374 (6520) : 367-70

6. Gage FH, Kawaja MD, Fisher LJ. Genetically modified cells: applications for intracerebral grafting. Trends Neurosci 1991 Aug ; 14 (8) : 328-33

7. Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA. Embryonic dopamine cell implants as a treatment for the second phase of Parkinson's disease. Replacing failed nerve terminals. Adv Neurol 1993 ; 60 : 721-8

8. Pincus DW, Harrison C, Barry J, Goodman RR, Labar D, Fraser RAR, Nedergaard M, Goldman SA. In vitro generation of precursor-derived neurons from adult human epileptic temporal neocortex . Presented at the 46th Annual Meeting of the Congress of Neurological Surgeons, Montreal, Canada. September 28-October 2,1996 (abstr)

9. Wolff JA,Fisher LJ, Xu L, Jinnah HA, Langlias PJ, Iuvone PM, ŎMalley KL, Rosenberg MB, Shimohama S, Friedmann T, Gage FH. Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-dopa in a rat model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Nov; 86(22) : 9011-4

10. Lundberg C, Horellou P, Mallet J, Bjorklund A. Generation of DOPA-producing astrocytes by retroviral transduction of the human tyrosine hydroxylase gene : in vitro charactesization and in vivo effect in the rat Parkinson model. Exp Neurol 1996 May ; 139(1) : 39-53

11. Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ, Frim DM, Breakefield XO, Bohn MC. Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in rat model of Parkinsons disease. Brain Res 1995 Sep 11; 691(1-2) : 25-36

12. During MJ, Naegele JR, O'Malley KL, Geller AI. Long-term behavioral recovery in parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosin hydroxylase. Science 1994 Nov 25; 266(5189) : 1399-403

13. Cao L, Zheng ZC, Zhao YC, Jiang ZH, Liu ZG, Chen SD, Zhou CF, Liu XY. Gene therapy of Parkinson's disease model rat by dirct injection of plasmid DNA-lipofectin

complex. Hum Gene Ther 1995 Nov ; 6 (11) : 1497-501

14. Ghiso J, Wisniewski T, Frangione B. Unifying features of systemic and cerebral amyloidosis. Mol Neurobiol 1994 Feb ; 8(1) : 49-64

15. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E : high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of Type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Mar 1; 90(5) : 1977-81

16. Gallo G, Wisniewski T, Choi-Miura NH, Ghiso J, Frangione B. Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. Am J Pathol 1994 Sep ; 145(3) : 526-30

17. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimers disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Dec 19; 92(26) : 12260-4

18. Martinez-Serrano A, Lundberg C, Horellou P, Fischer W, Bentlage C, Campbell K, Mc Kay RD, Mallet J, Bjorklund A. CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult rat brain : complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation in to the septum. J Neurosci 1995 Aug ; 15 (8) : 5668-80

19. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau : Implication for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1994 Nov 8; 91(23) : 11183-6

20. Zlokovic BV. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid-beta and apolipoproteins J and E : possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. Life Sci 1996; 59(18) : 1483-97

21. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimers disease. Nature 1995 Jun 29; 375(6534) : 754-60

22. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimers disease locus. Science 1995 Aug 18; 269(5226) : 973-7

23. Rogaev E, Sherrington R, Rogacva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease Type 3 gene. Nature 1995 Aug 31; 376 (6543) : 775-8

24. Van Broeckhoven C. Presenilins and Alzheimer's disease. Nature Genet 1995 Nov; 11(3) : 230-2

25. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Liebergurg I, Power MD, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. Science 1990 Jun 1; 248 (4959): 1124-6

26. Martel CL, Mackic JB, McComb JG, Ghiso J, Zlokovic BV. Blood-brain barrier uptake of the 40 and 42 amino acid sequences of circulating Alzheimer's amyloid beta in guinea pigs. Neurosci Lett 1996 Mar 15; 206(2-3) : 157-60

27. Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, Mc Comb JG, Zheng G, Mc Chuskey RT, Frangione B, Ghiso J. Glycoprotein 330/ megalin : probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer's disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Apr 30; 93(9) : 4229-34

28. Chen CY, Chang YN, Ryan P, Linscott M, McCarrity GJ. Chiang YL. Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir-mediated cytotoxicity and the bystander effect. Hum Gene Ther 1995 Nov; 6 (11): 1467-76

29. Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG. Woo SLC. Gene therapy for brain tumors : regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Apr 12; 91(8) : 3054-7

30. Perez-Cruet MJ, Trask TW, Chen SH, Goodman JC, Woo SL, Grossman RG, Shine HD. Adenovirus-mediated gene therapy of experimental gliomas. J Neurosci Res 1995 Nov 1; 39(4) : 506-11

31. Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Frank JA, Blaese RM, Oldfield EH. Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors. J Neurosurg 1993 Sep ; 79(3) : 400-7

32. Vincent AJ, Vogels R, Someren GV, Esandi MC, Noteboom JL, Avezaat CJJ, Vecht C, Bekkum DWV, Valerio D, Bout A, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy for rat malignant brain tumors. Hum Gene Ther 1996 Jan 20; 7(2) : 197-205

33. Ram Z, Culver K, Oshiro E, Viola J, DeVroom H, Otto E, Long Z, McGarrity G, Muul L, Katz D, et al. Summary of results and conclusions of the gene therapy of malignancy brain tumors : Clinical study. J Neurosurg 1995 Feb ; 82(2) : 343A

34. Gordon EM, Anderson WF. Gene therapy using retroviral vectors. Curr Opin Biotech 1994 Dec ; 5(6) : 611-6

35. LeMay DR, Kittaka M, Gordon EM, Anderson WF, McComb JG, Weiss MH, Bartus R, Zlokovic BV. RMP-7 effect and the role the blood-brain barrier on ganciclovir treatment in a rat model of C6 glioma

transduced with herpes thymidine kinase gene. Presented at the 46th Annual Metting of the Congress of Neurological Surgeons, Montreal, Canada, September 28- October 3, 1996 (abstr)

36. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. Science 1991 May 10; 252(5007) : 854-6

37. Bolovan CA, Sawtell NM, Thompson RL. ICP 34.5 mutants of herpes simplex virus Type 1 strain 17 syn + are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. J Virol 1994 Jan ; 68(1) : 48-55

38. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex-1 neurovirulence to gamma 1 34.5, a gene nonessential for growth in culture. Science 1990 Nov 30; 250(4985) : 1262-6

39. Chambers R, Gillespie GY, Soroceanu L, Andreansky S, Chatterjee S, Chou J, Roizonan B, Whitley RJ. Comparison of genetically engineered herpes simplex virus for the treatment of brain tumors in a Scid mouse model of human malignant glioma. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Feb 28; 54(5) : 1411-5

40. Markert JM, Malick A, Coen DM, Martuza RL. Reduction and elimination of encephalitis in an experimental glioma therapy model with attenuated herpes simplex mutants that retain susceptibility to acyclovir. Neurosurgery 1993 Apr ; 32(4) : 597-603

41. Redekop GJ, Naus CC. Transfection with bFGF sense and antisense cDNA resulting in modification of malignant glioma growth. J Neurosurg 1995 Jan ; 82(1) : 83-90

42. Saleh M, Stacker SA, Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. Cancer Res 1996 Jan 15; 56(2) : 393-401

43. Skotzko M, Wu L, Anderson WF,Gordon EM, Hall FL. Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1(GYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. Cancer Res 1995 Dec 1; 55(23) : 5493-8

44. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II : Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 1994 Nov 18; 79(4) : 573-82

45. Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. Cell 1994 Oct 21; 79(2) : 181-4

46. Cesano A, Visonneau S, Santoi D. Treatment of experimental glioblastoma with a human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line. Cancer Res 1995 Jan 1; 55(1) : 96-101

47. Akbasak A, Oldfield EH, Saris SC. Expression and modulation of major histocom patibility antigens on murine primary brain tumor in vitro. J Neurosurg 1991 Dec ; 75(6) : 922-9

48. Schneider J, Hofman FM, Apuzzo MLJ, Hinton DR. Cytokines and immunoregulatory molecules in malignant glial neoplasms. J Neurosurg 1992 Aug ; 77(2) : 265-73

49. Bodmer S, Huber D, Heid I, Fontana A. Human glioblastoma cell derived transforming growth factor-beta2 : evidence for secretion of both high and low molecular weight biologically active forms. J Neuroimmunol 1991 Oct ; 34(1) : 33-42

50. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber M, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor Type beta1 cDNA escapes immune surveillance. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb ; 87(4) : 1486-90

51. Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, Sobol RE. Eradication of established intracranial rat glioma by transforming growth factor beta antisense gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Apr 2; 93(7) : 2909-14

52. Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, Iland J, Tykocinski ML, Ilan J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. Science 1993 Jan 1; 259 (5091) : 94-7

53. Fenstermaker RA, Capala J, Barth RF, Hujer A, Kung HJ, Kaetzel DM Jr. The effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on in vivo growth of rat C6 glioma cells. Leukemia 1995 Oct ; 9 (Suppl 1) : S106-12

54. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and the brain: role of tumor necrosis factor-alpha. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1994 Winter; 6 (4): 341-60

55. Rothwell NJ, Relton JK. Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischemic brain damage. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1993 Fall; 5 (3) : 178-98

56. Betz AL, Yang GY, Davidson BL. Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. J Cereb Blood Flow Metab 1995 Jul ; 15(4) : 547-51

57. Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, Federoff HJ. Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. Stroke 1995 Sep ; 26(9) : 1670-5

58. Johnson EM Jr, Deckwerth TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. Annu Rev Neurosci 1993 ; 16 : 31-46

59. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DG. Bcl-2 inhibition of neural death : decreased generation of reactive oxygen species. Science 1993 Nov 19; 262(5137): 1274-7

60. Carmeliet P, Collen D. Gene targeting and gene transfer studies of the biological role of the plasminogen/plasmin system. Thromb Haemost 1995 Jul ; 74(1) : 429-36

61. Carmeliet P, Stassen JM, Cullen D, Meidell R, Gerard R. Adenovirus-mediated gene transfer of rt-PA restores thrombolysis in t-PA deficient mice. Fibrinolysis 1994 ; 8 : 282

62. Kittaka M, Wang L, Sun N, Schreiber SS, Seeds NW, Fisher M, Zlokovic BV. Braincapillary tissue plasminogen activatior in a diabetes stroke model. Stroke 1996 Apr ; 27(4) : 712-9

63. Koc ON, Allay JA, Lee K, Davis BM, Reese JS, Gerson SL. Transfer of drug resistance genes into hematopoietic progenitors to improve chemotherapy tolerance. Semin Oncol 1996 Feb ; 23(1) : 46-65

64. Wels W, Moritz D, Schmidt M, Jeschke M, Hynes NE, Groner B. Biotechnological and gene therapeutic strategies in cancer treatment. Gene 1995 Jun 14; 159(1) : 73-80