

Chương XIV

CHUYỂN GEN KHÁNG THUỐC - MỘT CHIẾN LƯỢC KHÁNG U

MỞ ĐẦU

Áp dụng kỹ thuật chuyển gen là một hứa hẹn tuyệt vời đối với việc cải thiện trị liệu kháng u. Mục tiêu tổng quát của việc chuyển gen trong điều trị các bệnh tăng sản ung thư là nâng cao khả năng của cơ thể để loại trừ khối u hoặc làm suy yếu khối u một cách đặc hiệu. Trong mỗi trường hợp đều có liên quan tới các mô bình thường khác trong cơ thể. Trong các chương trước đã đề cập trực tiếp tới các cách tiếp cận phân tử, miễn dịch, hoạt hóa tiền thuốc và kháng tạo mạch với tư cách là các chiến lược trị liệu kháng u. Nhưng còn một cách tiếp cận khác đã được nghiên cứu là đưa các gen vào để làm các tế bào và mô bình thường kháng lại các tác nhân hóa trị và được coi như phương thức bảo vệ khỏi các hiệu ứng phụ của hóa trị ung thư. Những hệ thống đã được nghiên cứu một cách sâu rộng cho mục đích này là hệ thống kháng đa thuốc hoặc glycoprotein -P (P-glycoprotein-P or multidrug resistance system - MDR), các dạng kháng thuốc của folat reductase (DHFR) và O⁶ - alkylguanin - DNA- alkyltransferase [AGT]), mặc dầu vậy các hệ thống khác cũng đã được nghiên cứu khá kỹ lưỡng.

Nhìn chung, chiến lược trị liệu liên quan tới việc đưa vào và làm biểu hiện một gen kháng thuốc trong các quần thể tế bào tạo máu là làm cho tác nhân hóa trị ít độc hơn đối với người nhận và cho phép hóa trị kháng u hiệu ứng hơn thông qua việc thuốc được sử dụng tích cực hơn hoặc làm giảm nhẹ các hiệu ứng phụ ở liều không tăng dần. Một ứng dụng liên quan tới sự chuyển gen kháng thuốc là sự chọn lọc *in vivo*.

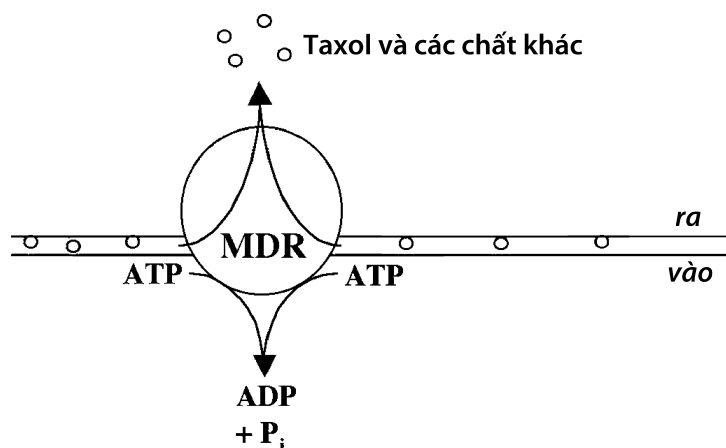
Trong chương này sẽ lược qua cơ chế phân tử của các hệ thống kháng thuốc này, các bằng chứng tiền lâm sàng và lâm sàng về các hiệu ứng của chúng trong việc hỗ trợ cải thiện hóa trị kháng u cũng như tương lai và những thách thức trong việc phát triển và ứng dụng chuyển gen kháng thuốc trong tương lai. Nhìn chung, các hệ thống này đã được xác định đặc tính trước tiên ở các tế bào nuôi cấy động vật có vú, đôi khi nó như là các marker có thể khuếch đại và chọn lọc được. Điều đó đã cung cấp cho chúng ta những hiểu biết ban đầu về dược lý học và phân tử về tiềm năng của chúng trong các ứng dụng *in vivo*. Việc ứng dụng công nghệ chuyển gen tế bào soma và tế bào mầm cho phép đánh giá các hệ thống này trong môi trường *in vivo* (ở chuột và một số trường hợp khác là các động vật lớn hơn). Những ứng dụng này đã đạt được tiến bộ trong TNLS với một số báo cáo về sự chuyển gen MDR lâm sàng và một vài thử nghiệm chuyển gen kháng thuốc khác cũng đang được xem xét.

CÁC HỆ THỐNG KHÁNG THUỐC

Gen *mdr - 1* của người mã hóa cho P - glycoprotein - một bơm thoát dòng (efflux pump) có thể nhận biết được nhiều hợp chất thuốc kháng ung thư như paclitaxel (Taxol), vincristin, doxorubicin, eposid và actinomycin D để loại chúng ra khỏi tế bào. Sản phẩm của gen này là một glycoprotein màng 170-kDa, làm trung gian cho việc phát sinh phản ứng phụ thuộc ATP. P-glycoprotein có 12 vùng xuyên màng và 2 domain liên kết ATP.

Cơ chế của sự thoát dòng (efflux) bởi MDR chưa được rõ nhưng rõ ràng là có liên quan tới việc loại các thuốc ưa lipid từ bên trong màng nguyên sinh (plasma membrane) (Hình 14.1). Vai trò của MDR trong việc kháng lại các tác nhân này đã

được quan sát qua việc xuất hiện các khối u kháng thuốc biểu hiện quá mức MDR. Sự biểu hiện MDR cũng quan sát thấy ở các tế bào tạo máu, đặc biệt là các tế bào tiền thân CD34⁺. MDR sau này được thể hiện là một công cụ hữu hiệu với tư cách là một marker ưu thế có thể khuếch đại chọn lọc trong các tế bào nuôi cấy của động vật có vú. Do vậy nó càng ủng hộ cho quan điểm sử dụng MDR để tránh khỏi các độc tính của thuốc. Kiểu hình MDR cũng liên quan tới gen MRP mã hóa cho protein kháng đa thuốc – một glycoprotein màng. Tuy nhiên, việc sử dụng MRP với tư cách là một gen kháng thuốc có thể chọn lọc thì vẫn phải nghiên cứu sâu rộng hơn nữa.



Hình 14.1. Cách thức hoạt động của MDR.

MDR là một glycoprotein màng làm trung gian cho sự thoát dòng phụ thuộc ATP của nhiều thuốc có độc tính (vòng tròn nhỏ) như Taxol, chúng tích tụ trên màng tế bào.

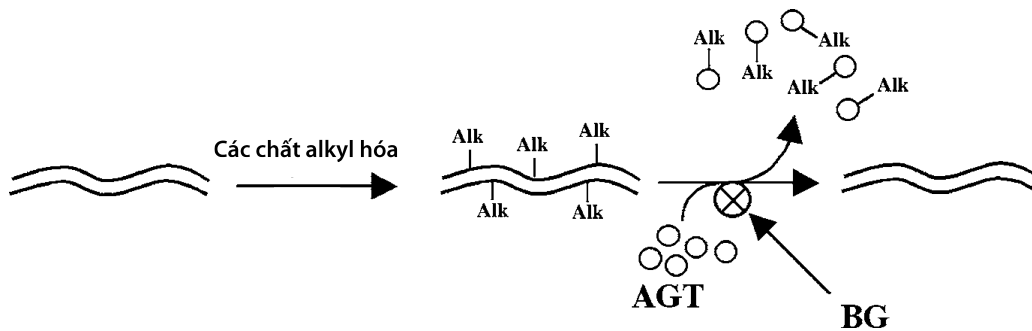
(Theo Colin L. Sweeney và R. Scott và McIvor. (2005) Cancer Gene Therapy. Human Press. Totowwa, New Jersey)

O⁶- alkylguanin –DNA alkyltransferase (AGT)

Các tác nhân methyl hóa DNA như temozolomide và các tác nhân chloroethyl hóa như 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) và mitozolomid gây nên sự alkyl hóa ở vị trí O⁶ của guanin trong DNA đã được sử dụng như các tác nhân hóa trị điều trị nhiều khối u. Việc xử lý với các tác nhân chloroethyl hóa sẽ gây nên độc tế bào vì có sự hình thành nhanh chóng các liên kết chéo các chuỗi giữa guanin cải biến và cytosin chuỗi bổ cứu.

Cơ chế gây độc của các tác nhân methyl hóa có liên quan tới sự cảm ứng làm đứt gãy nhiễm sắc thể do sự sửa chữa không thích ứng hậu sao chép. ATG cũng được hiểu là O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT), đó là một protein dùng để sửa chữa những hư hỏng gây bởi các tác nhân alkyl hóa DNA. AGT của động vật có vú sửa chữa O⁶-methylguanin trong các chuỗi kép, nhưng nó cũng tác động trên các nhóm alkyl hóa khác ở vị trí O⁶ của guanin và có thể sửa chữa được cả O⁴-methylthymin. ATG sửa chữa các DNA alkyl hóa bằng cách chuyển cân bằng hóa học trực tiếp sản phẩm cộng alkyl (adduct) tới gốc cystein nội tại (Hình 14.2). Sự chuyển giao này là bất thuận nghịch do đó dẫn đến bất hoạt protein AGT alkyl hóa nhờ một quá trình có tên là “tự sát” (suicide process).

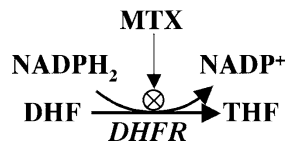
AGT của người là một protein 21-kDa với 207 amino acid đã được kết tinh thành tinh thể. Các tế bào tổ tiên tạo máu và tế bào tủy xương người có biểu hiện AGT nội sinh với mức thấp, điều đó được giải thích là do sự kiểm chế tủy có giới hạn liều của các tác nhân alkyl hóa trong hóa trị liệu. Tuy nhiên, cũng có nhiều khối u có hoạt tính AGT cao khiến cho chúng kháng mạnh hơn với các tác nhân alkyl hóa.



Hình 14.2. Sự hoạt động của AGT.

Các tác nhân như BCNU gây cải biến DNA (đường lượn sóng kép) bằng cách alkyl hóa base guanine (Alk). AGT (vòng tròn nhỏ) loại bỏ các sản phẩm cộng alkyl hóa này với phong cách cân bằng hóa học – một quá trình được ức chế bởi O⁶-benzylguanin (BG), trừ phi AGT là thể đột biến kháng lại BG.

Theo Colin L. Sweeney và R. Scott và Mclvor. (2005) Cancer Gene Therapy. Human Press. Totowwa, New Jersey)



Hình 14.3. Sự hoạt động của DHFR.

DHFR chuyển đổi dihydrofolat (DHF) thành tetrahydrofolat (THF) với sự hiện diện của NADPH₂ dạng khử của nicotinamid adenin dinucleotid phosphat (NADP⁺). Phản ứng này bị ức chế bởi các chất kháng folat như methotrexat (MTX).

Theo Colin L. Sweeney và R. Scott và Mclvor. (2005) Cancer Gene Therapy. Human Press. Totowwa, New Jersey)

Việc sửa chữa DNA bởi các AGT động vật có vú có thể bị ức chế bởi các hợp chất không chứa base như O⁶-benzylguanin (BG); BG cạnh tranh trực tiếp với các DNA đã alkyl hóa để gắn vào AGT, làm bất hoạt vĩnh viễn AGT người thông qua việc chuyển sản phẩm cộng benzyl của BG tới vị trí acceptor cystein của protein. Khi cộng hợp với các tác nhân alkyl hóa thì BG sẽ làm tăng độc tính tế bào trong các dòng tế bào khối u của người *in vitro* và làm giảm sự tăng trưởng khối u trong các mô hình ghép ngoại lai; các TNLS về vấn đề này đang được khảo sát.

Nhiều protein đột biến được thiết lập đã làm tăng đề kháng với BG. Những đột biến này nằm cạnh vị trí tiếp nhận cystein tại amino acid 145 của AGT người. Đặc biệt là những đột biến ở vị trí 140 và 156 đã được nghiên cứu rất kỹ. Đột biến của prolin ở vị trí 140 thành alanin (P140A) hoặc lysin (P140K) đã làm tăng sự đề kháng đối với BG lần lượt là 25 lần và trên 6000 lần so với AGT dạng hoang dã. Sự thay thế glycin thành alanin ở vị trí 156 (G156A) làm tăng đề kháng lên 240 lần; một đột biến kép của prolin thành alanin ở vị trí 140 và glycin thành alanin ở vị trí 156 (P140A/G156A) đã làm tăng sức đề kháng lên trên 1200 lần. Khi đưa các gen AGT thể đột biến vào các dòng tế bào đã bảo vệ được chúng khỏi độc tính tế bào gây ra bởi sự kết hợp BG với các tác nhân alkyl hóa DNA.

Dihydrofolat reductase (DHFR)

Hệ thống kháng thuốc thứ 3 đã được phát triển là các dạng kháng thuốc đột biến của DHFR. Enzym này xúc tác cho sự chuyển đổi phụ thuộc nicotinamid adenin-

dinucleotid phosphat của dihydrofolat thành tetrafolat (Hình 14.3) - một tiền chất gần nhất thành vô số các chất chuyển hóa folat đáp ứng như các chất cho một carbon (one - carbon donors) trong chuyển hóa tế bào, bao gồm sinh tổng hợp purin và tổng hợp thymidylat *de novo*. Các chất kháng folat như methotrexat (MTX) và trimetrexate là những chất ức chế liên kết chặt chẽ tương tự như cơ chất của DHFR. Các tế bào được xử lý với thuốc này làm ức chế sâu sự chuyển hóa của tế bào và tiếp sau là hiệu ứng kháng tăng sinh. MTX được dùng như một tác nhân kháng u hiệu quả, đáng chú nhất là trong điều trị các bệnh bạch cầu lympho cấp, u xương ác tính, bệnh carcinoma Ewing và ung thư rau (choriocarcinoma). Tuy nhiên cũng có độc tính khá lớn liên quan tới việc sử dụng MTX, đặc biệt là gây độc cho đường tiêu hóa và ức chế tủy.

Đề kháng tế bào đối với MTX có liên quan tới sự khuếch đại gen DHFR, giảm vận chuyển thuốc và thay đổi glutamyl hóa hay deglutamyl hóa nội bào của thuốc. Kích thích đồng thời cả gen cùng với DHFR đã được sử dụng rộng rãi như một phương thức công nghệ tế bào để biểu hiện các protein ở mức cao trong các tế bào động vật có vú. Sự hiện diện của các dạng DHFR kháng thuốc là một cơ chế khác, theo đó các tế bào trở nên kháng antifolat. Vấn đề này đã được gọi lên sớm từ những nghiên cứu ức chế động học enzym được chiết xuất từ một số dòng tế bào khác nhau thích nghi tăng trưởng ở các nồng độ cao của MTX. Giả thuyết đột biến sau đó được xác nhận bằng giải trình tự dòng DNA bổ cứu của DHFR (cDNA) mã hóa cho sự thay thế leucin thành arginin ở vị trí mã 22 được phân lập từ dòng tế bào 3T6 kháng MTX biểu hiện DHFR kháng thuốc. Đột biến này ở gen DHFR đã làm tăng sự đề kháng với MTX. Điều này đã được khẳng định bằng việc thâm chuyển các plasmid biểu hiện vào nhiều dòng tế bào động vật có vú nuôi cấy, điều đó chứng tỏ rằng trình tự cải biến đã đảm nhiệm chức năng như một marker trội có thể chọn lọc tương tự như các gen *NEO* và *EcoGPT* của vi sinh vật được xác định đặc tính cùng thời điểm đó.

Kể từ khi phân lập được đột biến L22R của chuột đã có rất nhiều nghiên cứu về việc tạo ra và xác định đặc tính các DHFR kháng thuốc liên quan tới việc áp dụng những gen kháng thuốc này cả *in vitro* và *in vivo*. Các báo cáo đề cập tới việc phân lập các cDNA từ các dòng tế bào kháng thuốc, sàng lọc các dạng kháng thuốc ở *E.coli* và sự phát sinh đột biến định hướng vị trí. Các nhà khoa học đã sử dụng chiến lược phát sinh đột biến bão hòa trên cơ sở PCR cùng với sự chọn lọc MTX trong các tế bào động vật có vú và đã phân lập được 13 tái tổ hợp ở các vị trí 22 và 31 của gen DHFR chuột tạo nên sự kháng thuốc.

Do thiết lập hợp lý những thay thế ở một số vị trí trong trung tâm hoạt động của DHFR người ta đã tạo được nhiều dạng kháng thật sự với antifolat, trong đó có cả nghiên cứu về các thể đột biến kép. Việc tạo ra các biến thể này cũng như xác định các đặc trưng về sự ức chế động học của chúng đã giúp chúng ta thấu hiểu mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng vị trí hoạt hóa của DHFR, cung cấp cho chúng ta những công cụ tạo nên sự kháng thuốc cũng như lựa chọn các quần thể tế bào đích trong các nghiên cứu về sự chuyển gen.

Nhìn chung có sự cân bằng giữa độ kháng thuốc và mức hoạt hóa xúc tác được thể hiện ở bất kỳ biến thể DHFR đặc biệt nào. Chẳng hạn như thể đột biến L22R được phân lập trước đây đã được xác định là có độ kháng cao với MTX (nồng độ ức chế 50% [IC₅₀] tăng 2000 lần so với dạng hoang dã, nhưng khi bị tổn thương về xúc tác thì chỉ đạt 1-2% mức hoạt tính dạng hoang dã.

Các nghiên cứu về phát sinh đột biến cũng đã mô tả một số thể đột biến với sự cải biến tổ hợp cả về sự kháng thuốc cũng như hoạt tính xúc tác như các biến thể L22Y của chuột và người. Nói chung, việc kiểm tra các đặc tính ức chế động học của

các enzym thể đột biến này và mối liên quan tới sự đề kháng của tế bào sẽ tạo cơ sở thiết yếu cho việc áp dụng chúng trong hóa trị liệu và chọn lọc *in vivo*.

BẢO VỆ ĐỘNG VẬT KHỎI ĐỘC TÍNH CỦA THUỐC *IN VIVO*: CÁC NGHIÊN CỨU TRÊN CHUỘT

Các hệ MDR, AGT và DHFR đã được kiểm tra sâu rộng trên chuột với tư cách là hệ thống mô hình động vật nhỏ về tiềm năng biểu hiện gen kháng thuốc ở các tế bào tạo máu cho phép giải thoát độc tính liên quan tới việc sử dụng thuốc hóa trị liệu. Những nghiên cứu này đã tận dụng các động vật chuyển gen biểu hiện các gen kháng thuốc và việc ghép tủy tải nạp với retrovirus vào các đối tượng tiếp nhận bình thường để hướng các gen kháng thuốc biểu hiện trong các tế bào tạo máu. Những kết quả từ các nghiên cứu này đã cho những bằng chứng tin cậy về nguyên lý của khái niệm biểu hiện kháng thuốc, làm tăng sự đề kháng của động vật đối với các tác nhân hóa trị liệu liên quan với việc áp dụng phương pháp này trong các chiến lược tăng cường liều hoặc giảm thiểu độc tính đối với các liệu đang được áp dụng hiện tại của các tác nhân kháng u.

Việc sử dụng MDR với mục đích bảo vệ hóa học (chemoprotection) lần đầu tiên được chứng minh trong các thực nghiệm trong đó gen biểu hiện trong chuột chuyển gen kháng lại nhiều tác nhân bao gồm Taxol và daunomycin đã quan sát thấy không những trong các động vật chuyển gen mà còn trong cả những động vật đã được cấy ghép tủy. Các chiến lược tải nạp với retrovirus nổi lên vào thời điểm này sau đó đã được sử dụng để chứng minh sự tải nạp và biểu hiện của MDR trong tủy chuột đã làm tăng đáng kể độc tính máu ở các chuột được sử dụng Taxol và bisantren.

Hanania và cộng tác đã chứng minh rằng khi chuyển gen vào các tế bào tạo máu trong nhiều thực nghiệm cấy ghép, trong đó sự biểu hiện của gen tải nạp vẫn được duy trì thông qua ghép đa tủy ở chuột. Các nghiên cứu về tải nạp đã gặp trở ngại do giảm biểu hiện MDR vì có sự ghép nối sai lệch từ MDRCcDNA trong các vec tơ. Việc cấy ghép tủy tải nạp MDR cũng liên quan tới rối loạn tăng sinh tủy ở một số động vật.

Trong hệ AGT, khi so sánh với chuột được cấy ghép với tủy tải nạp *lacZ*, Davis và cộng sự báo cáo đã cải thiện đáng kể khả năng sống sót của chuột được chiếu xạ liều chí tử sau đó được cấy ghép các tế bào tiền thân của tủy xương được tải nạp với một retrovirus mã hóa cho G156A AGT và được xử lý với BG và BCNU. Hơn nữa, việc xử lý với BG và BCNU còn làm tăng tỷ lệ % tế bào tủy xương biểu hiện G156A AGT sau 13 tuần cấy ghép từ 30-60% và tăng sự đề kháng BG/BCNU của các tế bào hình thành quần thể đã được tải nạp với G156 A sau 23 tuần cấy ghép khi so sánh với các tế bào tải nạp với *lacZ* hoặc chuột không được xử lý, điều đó đã chứng minh có sự chọn lọc *in vivo* của các tế bào tiền thân tủy xương biểu hiện AGT kháng thuốc.

Việc bảo vệ khỏi hiệu ứng gây đột biến tiềm tàng khi xử lý với BG và temozolomid đã được Chinnasmy và cộng sự chứng minh nhờ việc sử dụng AGT thể đột biến P140A/G156. Người ta quan sát thấy những chuột đã được xử lý với thuốc sau đó được ghép tủy tải nạp thì giảm sự hình thành các nhân nhỏ (micronucleus) trong tủy xương.

Liên quan tới việc áp dụng trên người thì sự tải nạp của các tế bào CD34⁺ người sơ cấp với một vec tơ retrovirus mã hóa cho AGT thể đột biến G156A sẽ làm tăng sự đề kháng đối với BG + BCNU trong các thí nghiệm về sự hình thành quần thể trên methylcellulose so với các tế bào không tải nạp và các tế bào khởi đầu được nuôi cấy dài hạn từ các tế bào nguyên thủy cũng như các tế bào được tải nạp với vec tơ *lacZ* đối chứng.

Công trình về sự chuyển gen đầu tiên được dẫn dắt bởi Isola và Gorden ở hệ DHFR, những động vật được thiết lập có mang gen chuyển DHFR của chuột L22R. Sự chuyển gen DHFR vào trong các tế bào tạo máu được chứng minh bởi Hock và Miller trong các phân tích *in vitro* và kế tiếp là William và cộng tác chứng minh khả năng bảo vệ khỏi liều chí tử của MTX khi đưa vào tủy tấp nạp DHFR.

Corey và cộng tác chứng minh có duy trì kháng thuốc ở các tế bào tủy cấy ghép và đã khẳng định có sự tấp nạp retrovirus và kháng thuốc của các tế bào gốc tạo máu tấp định cư. Nhiều DHFR kháng thuốc tiếp tục được thử nghiệm (test) và đã phát hiện có khả năng bảo vệ khỏi các độc tính của MTX hoặc trimetrexat do nó có biểu hiện trong các tế bào tạo máu.

Các nhà khoa học đã sử dụng hệ thống mô hình chuyển gen với nền tảng đồng thuận, cho phép các điều kiện có thể được kiểm soát một cách chặt chẽ về tần số và đặc tính các tế bào kháng thuốc trong các động vật tiếp nhận. Mặc dầu có sự nhân tạo hóa cao trong việc làm cho các tế bào biểu hiện DHFR có chứa các gen chuyển giống nhau, nhưng hệ thống này đã cho phép lặp lại các nhóm, các thí nghiệm tạo thuận lợi cho việc xác định các đặc tính về huyết học và dược lý của sự kháng thuốc ở các động vật tiếp nhận.

Các nhà khoa học khởi đầu đã chứng minh được có sự kháng thuốc ở các động vật nhận FVB/N được ghép tủy chuyển gen L22R và L22Y DHFR đồng thuận. Việc cấy ghép với tủy chuyển gen L22R đã tạo được đề kháng với MTX ở liều phân phối 4mg/kg. Thật ngạc nhiên là liều này chẳng những gây được sự kiềm chế tủy mà còn gây độc đáng kể đối với đường tiêu hóa của chuột. Sự bảo vệ hóa học dưới những điều kiện này không liên quan gì với việc giảm các mức thuốc được định giá trong các thí nghiệm dược động học. Các nhà khoa học cũng phát hiện rằng có sự gia tăng đáng kể chiều dài nhưng mao trong các động vật được bảo vệ bằng cách ghép tủy chuyển gen L22R DHFR và có sự thâm nhập đáng kể các tế bào chuyển gen DHFR của vật cho vào trong ruột non của động vật. Một khả năng hấp dẫn nảy sinh từ các kết quả này là khi đưa tủy kháng thuốc vào cũng bảo vệ được những động vật khỏi độc tính ở đường tiêu hóa khi sử dụng MTX. Cơ chế tế bào và phân tử trong đó xảy ra sự bảo vệ bất chéo hiện nay đang được khảo sát.

Việc sử dụng hệ thống chuyển gen sau này cho phép các nhà khoa học chứng minh được tầm quan trọng của các tế bào tổ tiên kháng thuốc trong việc làm trung gian kháng thuốc sớm sau cấy ghép và cho phép các nhà khoa học xác định chính xác sự tăng liều dung nạp tối đa do ghép tủy chuyển gen L22R và L22Y DHFR (tăng 2-3 lần). Các nhà khoa học cũng quan sát thấy có tăng đáng kể sự kháng thuốc ở những động vật cấy ghép ở mức thấp (1% tế bào chuyển gen DHFR). Mặc dầu cơ chế kháng thuốc ở các động vật tiếp nhận này chưa được xác định, nhưng những kết quả đã chỉ rõ rằng chỉ với mức chuyển gen vừa phải (trên 1%) thì đã bảo vệ khỏi độc tính của antifolat.

ÁP DỤNG CHUYỂN GEN KHÁNG THUỐC ĐỂ NÂNG CAO TRỊ LIỆU KHÁNG U

Một trong những mục đích chính của việc chuyển gen kháng thuốc là nâng cao sự dung nạp liều trong cơ thể, tức là làm giảm độc tính tại liều hiện hữu (existent dose) của hóa trị kháng u hoặc cho phép tăng cường liều. Mặc dầu đã hoàn tất nhiều thí nghiệm trên động vật chứng minh có sự giảm độc tính sau khi chuyển gen kháng thuốc, nhưng những nghiên cứu nhằm test khả năng áp dụng của nó trong việc nâng cao tính kháng thuốc để cải thiện hơn nữa hiệu quả trị liệu kháng u thì vẫn còn hạn chế.

Zhao và cộng tác đã chứng minh là có thể nâng cao được khả năng tồn tại của chuột có mang các khối u vú EO771 được cấy ghép với tủy đã được tiếp cận biến thể serin - 31.DHFR retrovirus rồi sau đó được xử lý với MTX. Hanania và Deisseroth đã chứng minh sự hiệu quả hơn của việc xử lý Taxol với các khối u vú 11A1 được tải nạp với vec tơ nhạy cảm hóa học p53 ở chuột được ghép tủy tải nạp MDR. Hiệu quả của AGT thể đột biến đối với việc nâng cao hiệu quả hóa trị khối u đã được test bởi Koç và cộng tác trong mô hình ghép ngoại lai ung thư kết tràng người SW460 ở chuột được ghép tủy tải nạp với AGT thể đột biến G156A. Khi quay vòng nhiều lần với BG và BCNU thì sẽ chọn lọc được tủy G156A tải nạp và cuối cùng sẽ nâng cao được sự dung nạp thuốc ở chuột và làm chậm lại đáng kể sự tăng trưởng u ở liều cao của BG + BCNU, đó là liều chí tử đối với chuột không có tủy G156A.

Các nhà khoa học đã sử dụng liều dung nạp tăng với mức có thể dự đoán được ở các đối tượng nhận tủy chuyển gen L22Y DHFR để test khả năng ứng dụng nó trong điều trị một số khối u có tính nhạy cảm antifolate khác nhau. Trong hệ thống này, không phát hiện thấy liều MTX tăng dần kháng lại một cách hiệu ứng bệnh bạch cầu tủy mạn tính (CML) trong mô hình chuột 32Dp210. Trên thực tế, MTX còn gây hại hơn cả sự sinh u. Tuy nhiên, nếu sử dụng trimetrexat liều cao hơn thì sẽ làm chậm lại đáng kể sự khởi phát u và các khối u không nảy sinh nữa khi trimetrexat được phân phối đồng thời với một tiền thuốc ức chế vận chuyển nucleosid có tên là nitrobenzylmercaptapurin-ribosid phosphat (NBMPR-P), chất này ức chế sự cứu hộ thymine và các nucleosid của purin vì vậy mà làm tăng hiệu lực antifolat. Mặc dầu sau khi ngừng thuốc các khối u vẫn xuất hiện, nhưng những thí nghiệm này đã chứng minh được tính hữu dụng tiềm tàng của MTX kháng lại antifolate khi phân phối tăng liều một cách hợp lý do có sự biểu hiện của DHFR kháng thuốc. Vì vậy việc kết hợp cùng với antisense nhằm vào điểm dừng của *BCR/ABC* oncogene trong CML đang được Trường Đại học Minnesota khai thác như một cách tiếp cận trị liệu.

Các nhà khoa học cũng thiết lập một loại ung thư vú FVB/N (FVB/N mammary carcinoma –FMC) – một dạng ung thư vú mới tồn tại như một dòng khối u dưới da có thể cấy ghép được ở chuột FVB/N để thử nghiệm về sự kết hợp với hệ thống ghép đồng thuận như đã mô tả với việc sử dụng tủy chuyển gen DHFR. Khối u FMC không bộc lộ sự nhạy cảm đáng kể đối với MTX ngay cả ở các nồng độ cao hơn mà ở đó đã đạt được trong các động vật được ghép tủy chuyển gen hoặc trong các động vật chuyển gen DHFR. Tuy nhiên người ta đã quan sát thấy có nâng cao về hoạt tính kháng u khi động vật được xử lý với trimetrexat, đặc biệt khi được phân phối đồng thời với NBMPR-P. Với công trình về các khối u 32Dp210 và FMC thì rõ ràng là với các khối u không thể hiện tính nhạy cảm với MTX thì việc sử dụng một antifolat luân phiên như trimetrexat kết hợp cùng với một chất ức chế vận chuyển nucleosid thì có thể đây là một cách tiếp cận kháng u hiệu quả, đặc biệt khi áp dụng một chế độ trị liệu mạnh mẽ hơn để biểu hiện được DHFR kháng thuốc. Có thể dự đoán được rằng tăng dần liều MTX tăng dần sẽ làm tăng hiệu ứng kháng lại các khối u có tính nhạy cảm lớn hơn với thuốc này. Các nghiên cứu kiểu này hiện đang được thực hiện trong hệ mô hình chuyển gen.

SỰ CHỌN LỌC *IN VIVO* CỦA TẾ BÀO BIỂU HIỆN GEN KHÁNG THUỐC

Việc dự đoán hiệu quả của chuyển gen vào trong tế bào tạo máu hiện nay còn bị hạn chế là do hiệu quả của nó đối với các động vật lớn và người. Tuy nhiên cũng có nhiều hy vọng trong việc nâng cao hiệu quả của chuyển gen thông qua việc sử dụng các vec tơ xen kẽ (alteRNAt vector) như các vec tơ lentivirus hay vec tơ foamy virus hoặc thông qua sự tiếp xúc và các quy trình xử lý tế bào. Một cách tiếp cận khác làm

tăng sự trình diện các tế bào tải nạp trong tuần hoàn là sự chọn lọc *in vivo* thông qua việc ứng dụng chọn lọc được lý học.

Trong các nghiên cứu độc lập ở hệ MDR, Sorrentino và cộng sự, Podda và cộng sự thấy có sự tăng các tế bào bạch cầu máu ngoại vi tải nạp MDR sau khi được xử lý với Taxol, do vậy đã chứng minh được tính hữu dụng của việc chọn lọc thuốc để làm tăng sự trình diện của các tế bào biểu hiện gen kháng thuốc. Tuy nhiên, sự chọn lọc ở mức các tế bào gốc tạo máu có khả năng ghép dài hạn ổn định thì vẫn chưa được chứng minh trong các nghiên cứu này. Một cách giải thích hợp lý về việc thiếu sự chọn lọc ở mức tế bào gốc là do có sự biểu hiện MDR nội sinh ở mức tương đối cao trong nhiều tế bào tạo máu nguyên thủy. Khi đưa vào tế bào các MDR thể đột biến kháng các chất ức chế của P-glycoprotein hoang dã có thể chọn lọc được các tế bào gốc tải nạp tốt hơn là các tế bào chỉ biểu hiện nội sinh MDR dạng hoang dã.

Việc sử dụng gen DHFR cho việc chọn lọc *in vivo* đã được dự đoán trước từ nhiều năm rồi, nhưng cách tiếp cận này không mang lại thành quả, vấn đề này chỉ được giải quyết cho đến tận khi Allay và cộng sự chứng minh được rằng với các antifolat (trong trường hợp này là trimetrexat) thì bản thân nó không gây được hiệu ứng với tư cách là trung gian gây độc tế bào gốc mà độc tính tế bào gốc chỉ có khi được phân phối đồng thời với NBMRP - P để ngăn ngừa sự cứu hộ của nucleosid và cứu được độc tính của antifolat. Allay và cộng tác sau đó lại tiếp tục khẳng định khả năng sử dụng cách tiếp cận được lý học trong việc mở rộng các tế bào tải nạp L22Y của người theo cách là làm ổn định lâu dài các đối tượng nhận sơ cấp cũng như các đối tượng nhận cấy ghép thứ cấp. Các nhà khoa học đã khẳng định tính chọn lọc của các tế bào gốc biểu hiện DHFR cũng tương tự như các điều kiện được lý học như đã được Allay và cộng tác mô tả. Tuy nhiên, những điều kiện tin cậy trong chọn lọc *in vivo* các tế bào gốc biểu hiện DHFR ngay từ khi khởi đầu cấy ghép (từ 0,1 đến 1%) thì vẫn chưa được thiết lập.

Hệ AGT nổi bật là một hệ thành công nhất đạt được trong chọn lọc *in vivo*. AGT kháng thuốc được chứng minh là cho phép làm giàu tới 940 lần các thành viên tế bào tổ tiên của tủy tải nạp G156A được cấy ghép vào chuột nonmyeloblat sau khi được xử lý với BG và BCNU – một mức chọn lọc *in vivo* lớn hơn mức đã quan sát thấy với các gen kháng thuốc khác. Ragg và cộng tác, Sawai và cộng tác đã báo cáo, dựa trên việc cấu trúc lại tế bào tạo máu của các đối tượng ghép thứ cấp nối tiếp thì sự chọn lọc *in vivo* ở mức tế bào gốc tạo máu có được là do việc xử lý thuốc trên chuột được ghép tủy tải nạp P140K. Việc phân phối thuốc trong những nghiên cứu này gồm BG và BCNU mỗi tuần 1 lần, kéo dài 4-5 tuần hoặc BG và temozolomid 5 lần một tuần, kéo dài 3-4 tuần.

Trái ngược với hệ AGT, sự chọn lọc tế bào gốc trong hệ DHFR đòi hỏi phải phân phối hàng ngày trimetrexat + NBMPR - P trên 2 tuần với vài chu kỳ xử lý qua một thời gian dài. Sự khác nhau giữa 2 hệ thống này là ở chỗ các cơ chế tác động của chúng rất khác nhau. Đối với antifolat, sự chọn lọc được dựa trên hiệu ứng kháng tăng sinh thu được từ các nhóm thymidin và nucleotid purin, đòi hỏi phải có sự hiện diện tiếp tục của thuốc trong quá trình chọn lọc. Đối với các chất alkyl hóa như BCNU, những kết quả thu được đơn giản là do cải biến DNA làm cho sự tăng sinh tiếp theo sẽ không có thuốc và dẫn đến việc phát ra một tín hiệu apoptosis và tế bào bị chết, trừ khi sự hư hỏng này được sửa chữa bởi AGT.

NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT LỚN VÀ NGƯỜI

Các nghiên cứu về biểu hiện và chuyển gen kháng thuốc ở động vật lớn cho tới nay vẫn còn hạn chế, nhưng đầu sao những vấn đề về sự thách đố tế bào, di truyền học và dược lý học của chuyển gen cũng đã được nghiên cứu rộng rãi. Stead và cộng sự đã báo cáo các nghiên cứu về chuyển gen DHFR bởi retrovirus *ex vivo* trên chó, qua đó cho thấy nó bị hạn chế do hiệu lực chuyển gen kém. Trong nghiên cứu về chuyển gen MDR ở khỉ đuôi sóc (marmoset), Hibino và cộng sự báo cáo đã phát hiện thấy các tế bào tạo máu tải nạp sau cấy ghép 400 ngày, nhưng lại có một ít (dưới 1%) các tế bào bạch cầu hạt máu ngoại vi tải nạp không bảo vệ được động vật kháng lại sự giảm bạch cầu do cảm ứng docetaxel. Việc cấy ghép dài hạn cũng quan sát thấy ở khỉ rhesus được truyền tủy tải nạp MDR. Có các tế bào tải nạp đạt mức khởi đầu cao sau đó lại rơi xuống mức thấp mặc dù đã được bổ sung cytokin. Một báo cáo *ex vivo* về chuyển gen MDR trên chó đã ghi nhận có các tế bào máu ngoại biên tải nạp sau khi được xử lý với taxol nhưng sau khi ngừng thuốc thì mức tế bào lại giảm xuống, tuy nhiên cũng duy trì được tới 16 tháng.

Những kết quả này cho thấy, mặc dầu đã tải nạp thành công các tế bào gốc tạo máu nguyên thủy, nhưng sự chọn lọc cao hơn chỉ xảy ra chủ yếu ở các quần thể tế bào đã biệt hóa. Có một ngoại lệ quan sát thấy trong các động vật lớn ở hệ AGT là có hiện tượng tăng ổn định các tế bào dương tính AGT sau khi được phân phối BCNU + BG. Những kết quả này đã tạo hy vọng cho việc áp dụng sự biểu hiện và chuyển gen kháng thuốc như một phương thức chọn lọc *in vivo* làm tăng trình diện của các tế bào tải nạp gen *in vivo*.

Sự thành công của các nghiên cứu về sự chuyển gen MDR trên động vật là các tiền đề tiền lâm sàng cho việc thực hiện các thử nghiệm chuyển gen trên người (Bảng 14.1). Những thử nghiệm này đã được thiết kế để test trước tiên về hiệu lực tải nạp retrovirus làm trung gian đưa các gen chuyển vào trong các quần thể tế bào tạo máu, sau đó xác định xem việc xử lý như vậy có bảo vệ được các bệnh nhân khỏi sự ức chế tủy hay không để có những giải pháp thích hợp.

Hanania và cộng sự báo cáo có tải nạp cao trong các đơn vị hình thành quần thể bạch cầu hạt - đại thực bào (CFU-GM). Cowan và cộng tác báo cáo có các mức tương đối cao (9%) bạch cầu hạt mang dấu ấn MDR vẫn tồn tại khi sử dụng nhiều lần paclitaxel trong một bệnh nhân được ghép tủy tải nạp MDR, tuy nhiên những mức này cuối cùng cũng bị hạ thấp dần.

Bảng 14.1. Các quy trình bảo vệ hóa học lâm sàng đối với người

Số	OBA	Người đứng đầu nghiên cứu	Bệnh	Gen	Tác nhân
9306-044		Deisseroth	Ung thư buồng trứng	MDR-1	Paclitaxel
9306-051		Hesdorfter	Ung thư tiến triển	MDR-1	Paclitaxel
9309-054		O'Shaughnessy	Ung thư vú	MDR-1	Paclitaxel
9406-077		Deisseroth	Ung thư vú	MDR-1	Paclitaxel
9601-143		Cowan	Ung thư vú	MDR-1	Paclitaxel
9701-172		Cornetta	U tế bào mầm	MDR-1	Paclitaxel
9701-173		Croop	U não	MGMT	CCNU ^b
9705-187		Verfaillie	Bệnh bạch cầu tủy mạn	DHFR	Methotrexate
9809-265		Gerson	Các khối u đặc tiến triển	MGMT	BG, BCNU ^c
0001-376		Bertino	U lympho	DHFR-CD ⁴	Metho.
0005-400		Becker	U lympho	MDR-1	Paclitaxel
0104-466		Belant	Ung thư phổi	MnSOD ^E	Tia xạ

Ghi chú:

a = Được liệt kê bởi Office of Biotechnology Activities 2003

b = ^bCCNU, lomustine

c = ^cBG, BCNU

d = ¹⁴Cd, cystidine deaminase

e = ⁵⁵MnSOD, manganese superoxide dismutase

Một số nghiên cứu cũng phát hiện thấy dấu ấn tế bào ở mức thấp thậm chí không thể phát hiện được ở các bệnh nhân khi áp dụng quy trình cải tiến tải nạp retrovirus. Abonour và cộng sự đã đạt được sự chuyển gen MDR ở mức cao hơn trong các tế bào tạo máu và báo cáo có tăng nhẹ sự trình diện tế bào tải nạp khi được xử lý với Taxol. Công trình này được xem như đã cung cấp các chứng cứ về tính khả thi của sự chuyển gen vào trong các tế bào tạo máu và mở rộng thêm khái niệm về chọn lọc *in vivo* với người.

Trong tất cả các hệ kháng thuốc đã đề cập trong chương này thì MDR có lợi thế nhất cho các ứng dụng lâm sàng. Tuy nhiên, ngay cả với MDR thì mục đích chính của thao tác gen (cho phép hóa trị “hiệu chiến” hơn hoặc làm giảm độc tính ở liều không tăng dần) cũng vẫn chưa được giải quyết trong lâm sàng.

KẾT LUẬN VÀ CÁC NGHIÊN CỨU TRONG TƯƠNG LAI

Các tế bào tạo máu đã có một thời gian dài được coi là quần thể đích chủ chốt cho sự chuyển gen liệu pháp và việc đưa vào các gen kháng thuốc là chiến lược chủ chốt, theo đó việc chuyển gen vào các tế bào tạo máu có thể được áp dụng trong điều trị ung thư. Những tiến bộ đạt được trong lĩnh vực này như đã tóm tắt ở trên đã chứng minh được tiềm năng của các chiến lược trong các hệ thống mô hình tiền lâm sàng cũng như các thử nghiệm lâm sàng khởi đầu. Khả năng làm cho động vật ít nhạy cảm với độc tính của thuốc rõ ràng là cần phải có sự kết hợp giữa các tác nhân hóa trị và các gen kháng thuốc. Mức độ tăng dần liều có thể áp dụng để nâng cao khả năng trị liệu kháng u phụ thuộc vào sự tăng thực tế của liều dung nạp đạt được thông qua sự biểu hiện gen kháng thuốc. Khả năng áp dụng tăng liều dung nạp có thể được thực nghiệm trực tiếp trên các động vật mang u để nâng cao hiệu ứng kháng u ở liều dung nạp cao hơn qua sự biểu hiện gen kháng thuốc.

Các gen kháng thuốc cũng có thể được áp dụng trong chọn lọc *in vivo*, trong việc mở rộng quần thể các tế bào biểu hiện gen kháng thuốc nhờ sự điều khiển của các tác nhân chọn lọc. Khả năng áp dụng phương pháp này sẽ còn phụ thuộc vào mức độ mở rộng của các tế bào biểu hiện gen kháng thuốc có thể đạt được. Tính chọn lọc như vậy sẽ càng mở rộng khả năng sử dụng sự chuyển gen kháng thuốc trong điều trị các bệnh di truyền và các bệnh khác ngoài ung thư.