روش‌های ژن درمانی برای ترمیم و نوسازی دستگاه عضلانی اسکلتی

* **بیتا صداقتی:** گروه تکنولوژی دارویی، انستیتو دارویی، دانشگاه لیپزیگ، لیپزیگ، آلمان (*مترجم). bita.sedaghati@uni-leipzig.de
کریستفر اچ اوانس: گروه جراحی ارتوپدی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه پیترزبورگ، آمریکا . evans.christopher@mayo.edu
جانی هوارتز: گروه جراحی ارتوپدی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه پیترزبورگ، آمریکا.

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۸

چکیده

آسیب‌های دستگاه اسکلتی- ماهیچه‌ای شایع و ناتوان‌کننده بوده، به علاوه درمان آن‌ها بسیار هزینه‌بر می‌باشد. در بسیاری از موارد، بهبود ناکامل منجر درد مزمن می‌شود. انتقال ژنی (Gene transfer) توسط فعال کردن بیان موضعی، پایدار و تنظیم شده ژن از جمله: ماکروفاژها، فاکتورهای رشد و عوامل ضد التهابی می‌تواند باعث بهبود فرآیند ترمیم و بازسازی محل‌های آسیب دیده شود. پروتئین‌های آندوژن تولید شده در نتیجه انتقال ژنی، مولکول‌های نوپایی هستند که تحت اصلاحات پس از ترجمه (Post-Translational Modifications) قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، انتقال ژنی مزایای خاصی برای تحویل محصولات پروتئینی در درون سلول و در محل ایفای نقششان، مانند عوامل رونویسی، RNA های بدون کد (Non-Coding RNAs) و پروتئین‌هایی که نیاز به ورود به درون سلول (مثلاً داخل غشاء) دارند را ارائه می‌دهد. ترانس ژن‌ها (Transgenes) می‌تواند توسط وکتورویروسی و یا غیر ویروسی در داخل بدن (*in vivo*) و یا با تحویل (Delivery) در شرایط آزمایشگاهی (*ex vivo*) و با استفاده از پروتکل‌های سلول‌های مولد (Progenitor) و یا سلول‌های تمایز یافته تحویل داده شوند. اولین انتقال ژنی در مطالعات بالینی برای آرتروز و ترمیم غضروف‌ها در حال حاضر تکمیل شده است. پروتکل‌های مختلف درمان استخوان‌ها در مرحله پیشرفته مطالعه شامل مطالعات آزمایشگاهی با حیوانات بزرگ هستند که می‌تواند (در آینده) به آزمایش‌های انسانی منجر شوند. کاربردهای دیگر آن، در ترمیم و نوسازی عضله اسکلتی، دیسک مهرهای، مینیسک، رباط و تاندون هنوز در مرحله مطالعات پیش بالینی می‌باشد. علاوه بر ملاحظات علمی، پزشکی و ایمنی، ترجمه بالینی (Clinical translation) توسط مسائل اجتماعی، مالی و آمادی نیز تحت بررسی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ژن درمانی، دستگاه عضلانی اسکلتی، ترمیم و نوسازی

مقدمه

سالانه بیش از ۲۰ میلیون آسیب به سیستم عضلانی-اسکلتی در ایالات‌متحده آمریکا گزارش می‌شود. رگ به رگ شدن، شکستگی و کوفتگی شایع‌ترین آن‌ها هستند. آن‌ها در مجموع، ۱۵۰ میلیارد دلار هزینه سالانه به سیستم بهداشت و درمان آمریکا تحمیل می‌کنند (۱). توانایی بافت‌های عضلانی-اسکلتی در ترمیم خودبه‌خودی بعد از ضربه به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای متفاوت است (۲). به‌عنوان مثال اکثر شکستگی استخوان‌های بلند خودبه‌خود التیام می‌یابد، درحالی‌که دراز بین رفتن بخشی از استخوان (نقص عضو)، ترمیم خودبه‌خودی صورت نمی‌پذیرد. غضروف‌های مفصلی بدون توجه به اندازه ضایعه، تقریباً هیچ فعالیت جبرانی ذاتی ندارند و تاندون‌ها با یک بافت با کیفیت پایین‌تر از بافت قبلی ترمیم می‌شوند. آسیب‌های عضلانی جزئی، مانند آسیب به گونه‌ها، بدون دخالت ترمیم می‌شوند، اما در صدمات شدید یک اسکار متراکم تشکیل می‌دهند. در بسیاری از موارد، توانایی یک بافت برای نوسازی توسط التهاب و میزان آسیب به بافت‌های اطراف آن تعیین می‌شود.

تحقیقات زیادی به توسعه فن‌آوری در جهت افزایش ترمیم و یا بازسازی بافت عضلانی اسکلتی آسیب‌دیده انجام شده است. بسیاری از این قبیل روش‌ها اغلب بستگی به تحویل مورفوژن‌ها (Morphogenes) و فاکتورهای رشد پروتئین دار برای مثال فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin Growth Factor-IGF-1) برای شروع فرآیند دارند. اهمیت این عمل توسط حجم پژوهش

www.SID.ir

اختصاص داده شده در جهت تولید داربست‌هایی (Scaffolds) با توانایی ارائه فاکتورهای مناسب به شیوه‌ای کنترل شده و پایدار (Controlled and sustained release) (۵-۳) منعکس می‌شود؛ پروسه پرتلاشی که دشواری می‌طلبد.

انتقال ژنی فن‌آوری جایگزینی برای ارائه محصولات ژن به محل‌های آسیب بافتی ارائه می‌دهد (۶ و ۷). همچنین چشم‌اندازی برای سنتز پایدار و تنظیم شده در محل، از یک یا چند مورفوژن، به‌صورت در جایگاه (*in situ*) را عرضه می‌کند. برخلاف بسیاری از فاکتورهای رشد نوترکیب تولید شده در بیوراکتورها که در معرض فرآیندهای بسته‌بندی و ذخیره‌سازی قرار می‌گیرند، محصولات انتقال ژنی، پروتئین‌های نوپای سنتز شده در محل با قابلیت اصلاح پس از ترجمه می‌باشند. انتقال ژنی نسبت به روش‌های سنتی تحویل محصولات با یک محل عمل درون‌سلولی (همانند عوامل رونویسی، مولکول‌های سیگنال دهنده، RNA بدون کد و همچنین پروتئین‌هایی که باید به یک محفظه سلولی خاص مانند گیرنده وارد شود)، برتری دارد. مطالعات پیش بالینی گسترده، از مفهوم استفاده از ژن‌درمانی برای ترمیم و نوسازی قسمت‌های مختلف سیستم عضلانی پشتیبانی می‌کند و اولین آزمایش‌های بالینی انسانی در این زمینه صورت گرفته است اما پروتکل‌های دیگر ترجمه بالینی در حال پیشرفت است. این مقاله بر روی جنبه‌های ترجمه‌ای استفاده از ژن‌درمانی برای کمک به ترمیم و بازسازی سیستم عضلانی-اسکلتی تمرکز دارد.

پرایمر ژن‌درمانی

وکتورها: وکتورها برای انتقال ژن‌های موردنظر (معمولاً cDNA ها) به سلول‌های میزبان به شیوه انتقال تسهیل یافته به هسته، با میزان بالای بیان ترانس ژن استفاده می‌شوند. ویروس‌ها به دلیل توانایی ذاتی در انتقال مواد ژنتیکی خود به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان وکتور استفاده می‌شود. برای ایجاد یک وکتور در ژن‌درمانی، معمولاً توالی ژنوم ویروسی که مسئول ایجاد بیماری و شدت آن است، حذف شده و با ژن موردنظر و توالی تنظیمی خود درحالی‌که قدرت انتقال خود را هنوز حفظ کرده است، جایگزین می‌گردد. تعدادی از ویروس‌ها با این روش مهندسی شده‌اند و ۱۲۰۰< ژن‌درمانی با استفاده از وکتورهای ویروسی انجام شده است (۸).

ویروس‌های مختلف ویژگی‌های متفاوتی را به وکتور مشتق شده می‌بخشند. ملاحظات مهم برای یک داروی انسانی شامل ملاحظات زیستی، ایمنی، سهولت ساخت و مقرون‌به‌صرفه بودن آن است. ملاحظات زیستی شامل ظرفیت حمل وکتور، مدت زمانی که ژنوم قادر است که برای حفظ بیان ژن در بدن باقی بماند و درجه‌ای که در آن پاسخ ایمنی خنثی‌کننده تولید می‌کند، می‌باشد. اینکه وکتور مواد ژنتیکی خود را به سلول میزبان منتقل می‌کند، فرآیندی است که می‌تواند به جهش‌زایی القایی (Insertional Mutagenesis) و سرطان منجر شود و جز ملاحظات ایمنی قرار می‌گیرد (۹). پاسخ ایمنی به وکتور می‌تواند مدت بیان ترانس ژن را محدود کرده و از دوزهای تکرارشونده پیشگیری کند. به‌عنوان مثال، یک واکنش ایمنی قوی بدن به وکتور ویروسی آدنو به دلیل کمبود اورنیتین ترانس کاربامیلاز (Ornithine transcarbamylase deficiency)، به مرگ یکی از بیماران شرکت‌کننده در یک بررسی ژن‌درمانی منجر شد (۱۰).

تولید وکتورهای ویروسی نوترکیب سهل نبوده و بر توانایی انجام مطالعات پیش بالینی در آزمایشگاه، سهولت آزمون در مدل‌های بزرگ حیوانی، هزینه آزمایش‌های بالینی و نهایتاً قیمت محصولات ژن‌درمانی در بازار دارویی تأثیر می‌گذارد. آخرین عامل از عوامل بالا به‌طور قابل‌توجهی اهمیت داشته و به شدت می‌تواند استفاده از ژن‌درمانی موفق را محدود کند. به‌عنوان مثال، گلیبرا® (آدیپژن تیپاروک، یونی کیور، هلند) (Glybera® (tiparvovec alipogene; uniQure, Netherlands)یک محصول ژن‌درمانی (تصویب شده توسط آژانس داروهای اروپا) است که برای کمبود لیپوپروتئین لیپاز به کار می‌رود اما ممکن است که به اندازه ۱ میلیون یورو برای یک

Archive of SID

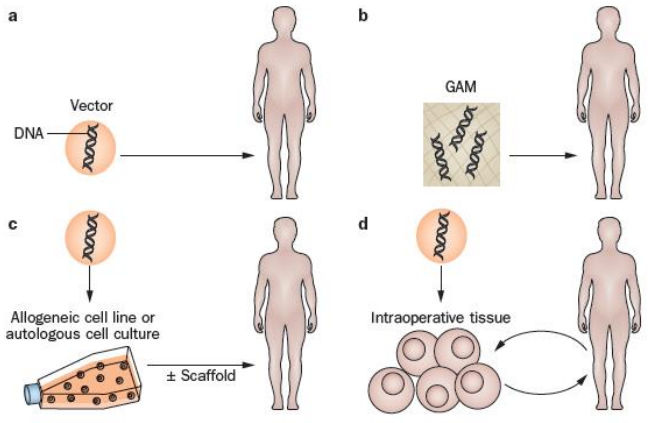
بار درمان هزینه‌بر باشد. مسائل مربوط به مالکیت انحصاری هم در استفاده کلینیکی از تحقیق مهم است. ویژگی‌های استفاده از وکتورهای ویروسی معمول، مربوط به ترمیم و بازسازی بافت در جای دیگری مرور شده است (۱۱).

به دلیل پیچیدگی‌های انتقال ژن ویروسی، وکتورهای غیر ویروسی موردتوجه خاصی می‌باشد. این وکتورها می‌توانند به سادگی یک پلاسمید DNA باشند، اما معمولاً با لیپوزوم و یا انواع مختلفی از پلیمرها به‌منظور ارتقاء جذب همراه می‌باشند. محرک‌های فیزیکی مانند الکتروپوراسیون(Electroporation) (و فراصوت (Sonication)، همچنین می‌تواند کارایی انتقال (Transfection Efficiency) را بالا ببرند. به‌طور کلی، وکتورهای غیر ویروسی ارزان‌تر بوده و فرآیند ساخت آسان‌تری دارند، ولی قدرت انتقال کمتری دارند. در نتیجه، آزمایش‌های انسانی کمتری با وکتورهای غیر ویروسی صورت گرفته است. وکتورهای غیر ویروسی در مقاله دیگری مرور شده است (۱۲).

انتقال ژن به محل‌های آسیب بافت

وکتورها را می‌توان به‌طور مستقیم (تحویل *in vivo*) به بدن معرفی و یا به‌طور غیرمستقیم (تحویل *ex vivo*) به سلول‌هایی که در محل آسیب هستند، رساند. استراتژی دوم ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر است، اما به دلیل اینکه پس از ورود وکتور به بدن، کنترل مستقیم بر فعالیت‌های سلول وجود ندارد، ممکن است مشکلات ایمنی ایجاد کند. یک تحویل *in vivo* موفق همچنان نیازمند وجود جمعیتی کافی از سلول‌های سالم در داخل بافت‌های آسیب‌دیده برای بیان ترانس ژن در سطوح مناسب می‌باشد. ازآنجاکه صدمات به سیستم عضلانی-اسکلتی اغلب با مرگ سلولی قابل‌توجهی همراه است، این پیش‌شرط همیشه پابرجا نیست.

تحویل ژنی در شرایط آزمایشگاهی با مزیت معرفی سلول‌ها به همراه محصولات ژنتیکی در محل آسیب، این مشکلات را مرتفع کرده است. انتقال ژنی در شرایط آزمایشگاهی به‌خوبی با روش‌های مهندسی بافت سنتی (که در آن: سلول‌ها از بدن خارج شده، پخش و اصلاح شده، سپس روی داربست‌ها قرار گرفته، داخل بیوراکتورها انکوبه شده و دوباره در بدن کاشته می‌شوند) همگام شده است .اگرچه این فن‌آوری‌های بالقوه موفق هستند اما به دلیل استفاده از سلول‌های اتولوگ (Autologous) در این روش نیاز به دو عمل جراحی و امکانات GMP (Manufacturing Practice Good) (تولید با کارایی خوب) برای رشد اصلاح شده ژنتیکی سلول‌ها (که باید قبل از کاشت دوباره در بدن به‌طور گسترده‌ای آزمایش شود) می‌باشد. به‌علاوه، سلول‌های بنیادی همیشه به‌خوبی گسترده نشده یا انتقال (Tranduce) نمی‌یابند. با توجه به این محدودیت‌ها، علاقه به استفاده از روش‌های سریع‌تر، ارزان‌تر و عملی‌تر افزایش یافته است. با



یضط ۱- یق ؤ ُفُضاظ ُفُ" لغژظ لان ِلَه ُخ تلاُه ن اَلقعُ ن "یان ُژقنظ *in vivo* ا قصُقیر" ل ثقیرغ اُصُغ" لغژظ تلاخ ل یاُفگی غ نیقگا a." لقیقف خص لَه اُیخ آقَ آَفُ لَه قد b. ذا لغیلی یگی" ا GAM."یان ُژقنظ *ex vivo* قصُقیرلاغ اُصُغ" ل تلاخ لاخیص نفغ نیقگا"خص لِهم ا"یان لبلاُچ ُفُضُ ن لَمقظ لان نضل اُ لله اُ ُف گاُلی گیر"گگ خص لیُ ُ لغ نیقگ" لضایرغ ن یقگ c. یق ؤ لان قی ُ ن ِاُغُذ قظ ا لا ذ نخخقلاُ یُ نُغظ اَلصیایر لَمقظ لان آقَقطاغ ذ"یُ گضل" ل ثقیر ُفُضُ نا *in vitro*/ لبلاُچ یُ گی فُگ لمغقیه ف خص یگی لَمقع نیقطیلُ ُ غ ذ ُقفگ" لضایر یقگ آ َ لله لَمقظ لان لبلاُچ یُ گی ُچگ اُ ُضُ ُ یقن خص گایُ ا ُ ف ا آ ُ گیرغ ژظ یایرغ نطه یقگ d. یق ؤ لان آیخ *ex vivo* "ذ ِ ُعقطه ین اُ ُهاُ" لضُ ُ لَمقع ن ق گایُ ا ُ ُقا ُ "لُ ُ لبلاُچ یُ گی ُفُضُ ن (غ ف گ غز ُ اَلگ قفا خ تا ق پیُ" ن) ق یایرگگف فِم ا یاگیر تلاخ ل گیر ثقظ ض ُ یلچ ذ غ نیقگ گگ س GAM: غاُ ینله ُفُسخاظ یُ گی.

نکات کلیدی

- انتقال ژن یک راه حل برای مشکل تحویل مورفوژن ها وسایر محصولات ترمیم و نوسازی کننده پایدار به محل های آسیب ارائه می دهد.
- پروتئین نوپای تولید شده در محل پس از انتقال ژنی به احتمال زیاد تحت تأثیر اصلاح پس از ترجمه قرار گرفته و فعالیتی بالاتراز همتایان نوترکیب خود خواهد داشت.
- انتقال ژنی می تواند بیان تنظیم شده ترانس ژن و تحویل محصولات را با یک عمل داخل سلولی (برای مثال، عوامل رونویسی و RNA های بدون کد) یا پروتئین که نیاز دارند که به یک محفظه سلولی (برای مثال، گیرنده) وارد شوند فراهم نماید.
- چند استراتژی برای انتقال ژن به محل های آسیب با استفاده از وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی مختلف داخل بدن (*in vivo*) و یا با تحویل در شرایط ازمایشگاهی (*ex vivo*) وجود دارد.
- پیشرفت های پیش بالینی در ترمیم غضروف، بهبود استخوان و بازسازی عضلات، دیسک مهرها، مینیسک، تاندون و رباط انجام شده است.
- تا کنون تعداد کمی از مطالعات بالینی برای آرتروز و ترمیم غضروف صورت گرفته است.

چنین روش‌هایی، بافت از محل بدن بیمار برداشته شده، اصلاح ژنتیکی شده و در طول زمان همان جراحی دوباره در محل کاشته می‌شود (۱۳). یک استراتژی جایگزین سریع، استفاده از سلول‌های آلوگرافت از اهداکنندگان جهانی است. در نتیجه، چهار روش مختلف برای ژن‌درمانی در زمینه درمان صدمات اسکلتی-عضلانی موجود می‌باشد که دو تا از آن‌ها در شرایط *ex vivo* و دوتای آن‌ها در *in vivo* انجام می‌شود (شکل ۱).

پیشرفت‌های ژن‌درمانی

غضروف مفصلی: آسیب به غضروف مفصلی می‌تواند منجر به درد و آرتروز (Osteoarthritis-OA) شود. به دلیل اینکه که غضروف مفصلی ظرفیت محدودی برای بازسازی خودبه‌خودی دارد، تعداد روش‌های جراحی در جهت ترمیم گسترش یافته است (۱۴). از لحاظ ژن‌درمانی، مرتبط‌ترین روش‌ها شامل شکستگی‌های میکرو (Microfracture) و کاشت کندروسیت‌های اتولوگ (Autologue Condrocyte Implantation-ACI) می‌باشد. شکستگی‌های میکرو یکی از چندین تکنیک‌های مرتبط است که در آن ضایعه غضروف با تمام ضخامت با مغز استخوان زیرین در ارتباط است. سلول‌های مولد از منطقه ساب کندرالوارد ضایعه شده و به دام لخته فیبرینی در ضایعه می‌افتند که در آنجا برخی از آن‌ها به بافت غضروفی تمایز می‌یابند تا بافت را ترمیم کنند. تصور می‌شود که برخی از شکستگی‌های میکرو برای درمان ضایعات کانونی کوچک کارآمد باشند اما در ضایعات بزرگ‌تر معمولاً از ACI استفاده می‌شود. بافت جدید تشکیل شده حاصل از شکستگی میکرو، یک غضروف فیبری است که دوامی کمتر از غضروف مفصلی داشته و گاهی اوقات با حضور استئوفیت هایدرون ضایعه‌ای بهبود می‌یابد. با وجود اینکه، این روش ارزان، ساده و مؤثر است، FDA نیازمند روش‌های جدید ترمیم بافت غضروفی می‌باشد که از شکستگی میکرو برتر باشد که خود پیامدهای جدی برای طراحی کارآزمایی بالینی به همراه دارد. روش‌های مبتنی بر دو ژن نیز برای بهبود اثربخشی شکستگی‌های میکرو مطرح شده‌اند. هر دو عمل ساده و واکنشی باشند. با استفاده از یک روش، آدنو همراه با ویروس نوترکیب AA(Adeno-Associated Virus) به‌طور مستقیم به اگزودایی که داخل ضایعه استئوکندرال شده، وارد می‌شود (۱۷–۱۵). در یک مدل استئوکندرال در خرگوش، فاکتور رشد فیبروبلاست (Fibroblast Growth factor-FGF-2) (۱۵)، IGF-1 (۱۶) و SOX9 با این روش و با نتایج مطلوب تحویل داده شده است.

در روش جایگزین پاشر و همکارانش (۱۸)، فرآیند، با از بین بردن مغز استخوان و مخلوط کردن آن با وکتورهای آدنو در طول لخته شدن خون، شتاب می‌یابد. مغز استخوان منعقد شده، شامل سلول وکتور، به‌عنوان یک شاخه ژن شناخته شده و سپس در ضایعه غضروف قرار داده می‌شود (شکل ۲). آدنوویروس برای انتقال به سلول‌های دیگر در دسترس است، فرآیندی که در آن ویژگی برتر انتقال آدنوویروس در زمان اتصال به ماتریکس کمک‌کننده می‌باشد (۱۹).

Archive of SID

با این روش در خرگوش استفاده از cDNA کد کننده برای پروتئین مورفولوژیکی استخوان (Bone Morphogenetic Protein -BMP-2)، نتایج امیدوارکننده‌ای گزارش شده است. اگرچه استخوان‌سازی اندوکندریال (Endochondral ossification) با تأخیر هم دیده شده است. در آزمایش‌های مشابه، cDNA کد کننده پروتئین خارپشت هندی نسبت به BMP -2 نتایج بهتری نشان داده است زیرا که باعث ترمیم غضروف بدون استخوان‌سازی اندوکندریال شده است (۲۰). ایکوویک و همکارانش (۲۱) از تکنولوژی شاخه ژن در یک مدل ضایعه غضروفی در گوسفند از TGFB1 و cDNA به‌عنوان ترانس ژن استفاده کردند. با این روش نتیجه بهبود یافت، اما منجر به ترمیم کامل ضایعه نگردید که احتمالاً به علت آنکه شاخه ژن فاقد تعداد کافی از سلول‌های غضروف ساز بوده و با مغز استخوان به‌عنوان یک منبع اضافی سلول در ارتباط نبوده است، می‌باشد. تعداد سلول‌های مولد در یک شاخه ژن توسط اضافه کردن سلول‌ها در طول لخته شدن، تکمیل و افزایش می‌یابد (۱۸).

یکی دیگر از تکنولوژی‌ها شامل پیوند عضلات اسکلتی اتولوگ یا چربی (از نمونه‌برداری) که اصلاح ژنتیکی شده‌اند، به ضایعه می‌باشد. این بافت‌ها را می‌توان از بدن برداشته، اصلاح ژنتیکی نموده و سپس می‌توان در طول زمان همان جراحی در ضایعه استئوکندرال در بدن برگرداند. نتایج حاصل از آزمایش‌های اولیه با خرگوش، با استفاده از وکتور آدنوویروس حامل BMP2 cDNA جالب بوده است (۲۲). به‌طور جالب توجهی، بافت استخوان کاشته شده در منطقه ساب کندرال و بالای غضروف تشکیل شده که نشانگر اهمیت علائم محلی در تغییر آینده سلول می‌باشد (۲۲).

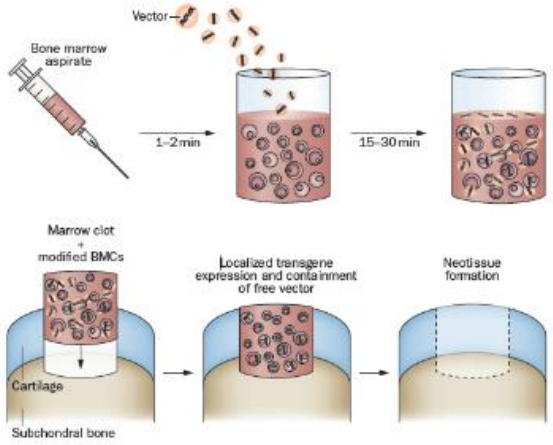
ضایعات غضروفی بزرگ گاهی اوقات توسط ACI درمان می‌شوند، اما این نیاز به برداشت غضروف مفصلی از بخشی از بدن دارد که وزن کمتری تحمل می‌کند. این غضروف یک منبع از سلول‌های غضروفی اتولوگ است که در کشت سلولی گسترش یافته و در محل آسیب کاشته می‌شود. با این نوع درمان نتایج بالینی مشابه و یا بهتر از شکستگی میکرو گزارش شده است (۱۴). ماهیت این فرآیند برای شرایط آزمایشگاهی ژن‌درمانی مناسب است.

استفاده از ACI به دلیل هزینه بالای درمان اتولوگ (به دلیل نیاز به گسترش مجدد جمعیت سلولی قبل از کاشت مجدد در بدن که نیازمند دو عمل جراحی می‌باشد) محدود شده است. اگر سلول‌های آلوگرافت مورد استفاده قرار گیرند هزینه و پیچیدگی درمان تا حد زیادی کاهش می‌یابد. اساس ترمیم غضروف‌ها با استفاده از آلوگرافت اصلاح ژنتیکی شده توسط کانگ و همکاران (۲۳) ارائه شد. آن‌ها برای اولین بار در خرگوش نشان دادند که سلول‌های غضروفی آلوگرافت اصلاح ژنتیکی شده می‌توانند باعث بیان ترانس ژن را در محل ضایعه شوند.

مطالعات زیادی شامل داده‌هایی است که با استفاده از مدل‌های حیوانات کوچک (خرگوش و موش) تأیید می‌کنند که سلول‌های آلوژنیک یا اتوژن (Autogenous) غضروفی که اصلاح ژنتیکی شده‌اند، از عوامل مؤثر در ترمیم بافت غضروفی می‌باشند (۲۴ و ۲۵). اثر مشابه در حیوانات بزرگ‌تر توسط نیکسون و همکارانش ارائه شد که از اسب به‌عنوان مدل استفاده کرده‌اند (۲۹–۲۶). کاشت سلول‌های غضروفی آلوگرافت در ادامه انتقال آدنوویروس با BMP-7 روند ترمیم اولیه را سرعت بخشید، اما بعد از ۸ ماه هنوز تفاوت اندکی با کنترل وجود دارد (۲۶). در مقابل، انتقال توسط IGF-1، یک بهبود پایدار در ترمیم ایجاد می‌کند (۲۷ و ۲۸). این گروه در جدیدترین کار خود، از AAV برای انتقال IGF-1 به سلول‌های غضروفی اتولوگ استفاده نمودند و شاهد بهبود ترمیم ضایعه غضروفی با تمام ضخامت بودند (۲۹).

سلول‌های غضروفی آلوگرافت اصلاح ژنتیکی شده، در آزمایش‌های کلینیکی انسانی توسط شرکت کلون در کره جنوبی مورد استفاده قرارگرفته است. یک لاین سلولی از سلول‌های غضروفی یک نوزاد پلی داکتیلی و یک گروه متشکل از سلول‌ها با رتروویروس حامل TGFB1 cDNA برای ترمیم بافت غضروفی، ایجاد شدند

Archive of SID



Pascher, A. *et al. Gene Ther.* 11, 133–141 (2004). [۱۸]

(۳۰). برای ترمیم غضروف، سلول‌های حامل رتروویروس با استفاده از یک داربست فیبرینی به محل‌های آسیب غضروفی معرفی می‌شوند. ازآنجاکه وکتور رتروویروس داخل ژنوم میزبان ادغام شده و بنابراین به‌طور بالقوه سرطان زا هستند (۹)، سلول‌های حامل قبل از کاشت تحت تابش قرارگرفته و برای تقویت اثر با سلول‌های غیر حامل و تابش ندیده مخلوط می‌شوند. این روش تحت آزمایش‌های بالینی بیشتر در کره جنوبی قرار دارد (۳۱).

بیماران مبتلا به OA اغلب نیاز به ترمیم غضروف مفصلی دارند، اما این روند که توسط یک بیماری همزمان تولید یک محیط نامناسب برای ترمیم و بازسازی غضروف می‌کند، پیچیده است. به ویژه، سایتوکاین پیش التهابی فعال کننده NFκB (Nfκb- Activating Proinflammatory Cytokines) (مانند IL- 1) ساخت غضروف از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells-Mscs) درمفاصل بیماران مبتلا به OA را مهار می‌کند (۳۲). این شرایط فرصت های بیشتری برای ژن‌درمانی به‌عنوان وسیله ای برای کنترل فعالیت واسطه های التهابی فراهم می‌کند. در رویکرد ماتریس ژن فعال (Gene-Activated Matrix -GAM) وکتور ویروسی بیان کننده آنتاگونیست گیرنده IL-1 (IL-1Ra) برای رسیدگی به این مشکل استفاده شد (۳۳). ساخت AAV-IL-1Ra در حال حاضر تحت تصویب قانونی برای استفاده کلینیکی انسانی برای درمان OA می‌باشد (۱۱).IL-4 یک سیتوکین موردنظر دیگر از جمله سایتوکاین های ضد التهابی است (۳۴). تحویل همزمان cDNA ای که یک فاکتور ضد التهابی مانند IL-1Ra یا IL-10 و یک فاکتور رشد غضروف مانند IGF-1 را کد می‌کند، نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۵ و ۳۶).

روش درمان OA معمولاً شامل تزریق وکتور و یا سلول‌های اصلاح ژنتیکی شده به محل مفصل می‌باشد. تحت این شرایط، محل اصلی بیان ترانس ژن، سینوویوم و تمام بافت داخل مفصلی شامل غضروف که در معرض محصول ژن از طریق انتشار از مایع سینوویال است، می‌باشد. با این حال، داده های مطالعه واتسون و همکاران (۳۷) نشان می‌دهد که AAVبه اندازه کافی کوچک است که به ماتریس غضروف مفصلی نفوذ و کندروسیت‌ها را در محل انتقال دهد.

در چهار آزمایش بالینی در ایالات‌متحده آمریکا و کره جنوبی، سوسپانسیون هایی از سلول‌های غضروفی آلوژنیک که TGF- β1 را بیان می کردند به مفاصل زانو در بیماران مبتلا به OA تزریق شد (۱۱). این مطالعات فاز اول (۳۸ و ۳۹) و دوم ازمراحل آزمایش ها را تکمیل کرده‌اند و فاز سوم در حال انجام است (۴۰). ژن‌درمانی برای OA در مقالات دیگر مرور شده است (۱۱، ۴۱ و ۴۲).

اصلاحات آینده این روش شامل استفاده از سلول‌های مولد، به جای سلول‌های غضروف ساز، به‌عنوان عوامل انتقال ژنی درترمیم غضروف‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (۲۶، ۴۳ و ۴۴).

Archive of SID

علاقه به استفاده از GAMS (۴۵ و ۴۶) و پژوهش در بهبود بهره وری و هدف قرار دادن وکتورهای غیر ویروسی همچنان ادامه دارد .پی ال و همکاران (۴۷)، برای مثال، پپتیدهایی را شناسایی کرده‌اند که به‌طور مشخص به سلول‌های غضروفی رفت و آمد می‌کنند و همچنین آن‌ها به همراه پلی اتیلین ایمین باعث افزایش قدرت انتقال می‌شوند. ژن‌درمانی برای ترمیم غضروف در جای دیگر مرور شده است (۴۸).

استخوان

از بافت استخوان در ترمیم بافت اغلب به‌عنوان "میوه های پایین درخت" یاد می‌شود، زیرا استخوان یکی از معدود اندام هایی است که در بدن معمولاً بدون ایجاد عارضه و به‌خوبی بهبود می‌یابد. با این حال، بازسازی درمانی هدفمند استخوان دشوار است. بیشتر تحقیقات با مدل‌های حیوانی با آسیب به جمجمه و یا آسیب‌های بزرگ در استخوان‌های بلند (نقص عضو) انجام شده است. جوش خوردن ستون فقرات، درمان شکستگی، شکستگی‌های ترمیم نشده (Nonunions)، بازسازی استخوان پس از نکروز فاقد رگ (Avascular Necrosis)، ترمیم آلوئولار و آسیب‌های فک پایین و لثه نیز بررسی شده است (۲).

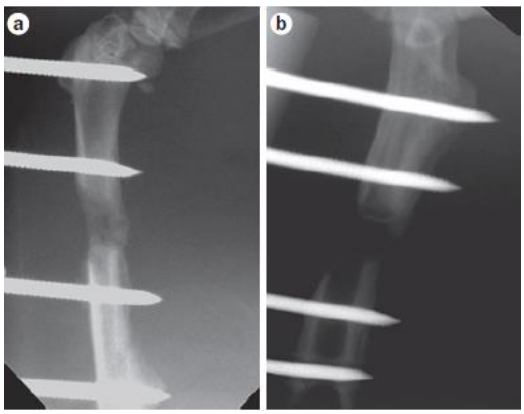
تحقیق در ژن‌درمانی عمدتاً روی تحویل مورفوژن ها به خصوص BMPs (۵۰–۴۹)، پروتئین‌های Wnt۵۱، عوامل رگ زا مانند اندوتلیال عروقی فاکتور رشد (Vascular Endothelial Growth Factor -VEGF) (۵۲)، عوامل رونویسی استخوان زا (۵۳)، پروتئین‌های دامنه LIM (LMP ها) (۵۴) و سیکلواکسیژناز-۲ (۵۵) تمرکز یافته است. استفاده بالقوه از microRNA ها نیز از موردتوجه بوده است (۵۶). انتخاب ترانس ژن ها توسط انتخاب پیچیده بین مسیر اندوکندرال به سمت تشکیل استخوان که نیاز به شکل گیری اولیه از غضروف دارد (۵۷)، یا مسیرداخل غشایی، متغیر می‌باشد. این دوگانگی برای نیاز به یک منبع خون می‌باشد؛ تشکیل غضروف در محیط بدون رگ رخ می‌دهد درحالی‌که تشکیل استخوان مطلقاً نیازمند به تشکیل عروق می‌باشد. در مورد تشکیل استخوان، cDNA کد کننده VEGF و BMPs، بهبود آسیب استخوانی را به‌طور قابل‌توجهی افزایش داده‌اند (۵۸).

اکثر مطالعات آزمایشگاهی از روش‌های سنتی با وکتورهای آدنوویروسی، لنتوویروسی یا غیرویروسی در ترکیب با سلول‌های بنیادی مشتق از عضلات (Muscle-Derived Stem Cells-MDSCs) و یا MSCهای مشتق از مغز استخوان یا چربی استفاده کرده‌اند (۵۹). موفقیت های قابل‌توجهی با استفاده از مدل جوندگان و خرگوش گزارش شده است که در آن یک ضایعه با اندازه قابل توجه در یک استخوان دراز و یا جمجمه ایجاد می‌شود (۶۰). تعداد نسبتاً کمی از این مطالعات به استفاده از حیوانات بزرگ برای مطالعات پیش بالینی انسانی منجر شده است. با این حال، مدل‌های حیوانی موفقی از بز (۶۱)، خوک (۶۲)، اسب (۶۳) با استفاده از آدنوویروس برای انتقال cDNAکد کننده BMP ها به ضایعه استخوان‌های دراز، نقص جمجمه و محل‌های نکروز استخوان لگن، با MSC های مغز مشتق شده ازمغز استخوان یا فیبروبلاست پوستی به‌عنوان حامل گزارش شده است.

تزریق مستقیم آدنوویروس حامل cDNA کد کننده BMP (۶۴) در درمان نقص عضو در حیوانات کوچک {موش (۶۷) و خرگوش (۶۵ و ۶۶)} نتایج قابل قبولی نشان داده است، اما در درمان گوسفند احتمالاً به دلیل یک واکنش ایمنی به وکتور و به BMP-2 انسانی بی اثر بوده است (۶۸ و ۶۹). با این حال موفقیت در برخی اما نه همه مطالعات، تحویل آدنوویروس BMP-2 و یا BMP-6به اسب گزارش شده است (۷۰ و ۷۱).

فرآیندهای تسریع در شرایط آزمایشگاهی که با استفاده چربی و عضله اتولوگ انجام می‌شود باعث تحریک پاسخ آنتی بادی به وکتور آدنوویروس ۲۳ نمی‌شود و با ضریب اطمینان بیشتری نقص عضو در موش را نسبت به تزریق مستقیم همان وکتورتحریک می‌کند (شکل ۳). این تکنولوژی در مدل پیوند از دیگر (Xenotransplantation)، در

Archive of SID



یضط ۳- تلخدا یفٔ دگیگحشٔ ظقٔ اگیږ "ٔلئ اٗ ٔقتگکد عدلبلأچ ٔضف نیگ یغغ
مثل: خ عدلأقع ٔقآ ٔگققنیق ٔفضقیگ a. BMP-2 قb. ٔفضقیگ ض ف
خلأء ٔطیأبحگ أ ٔتئلٔ لخضلله ٕیخدلأضلله طیب ٔلیگ قگیږ ٔله ' لان گیئسل ٔقیگ cDNAضگ
قیگBMP۲ فقآ أن غ ذألگ طیگنگا گیجیخ نضلأفض ف خلأء ٔطیأب" لخ ٔ شغط
ألگ ققف ظ یگنگ لبلأچ یگ" لضآ ' أ ٔلأ" لا ٔتفقٔ.

Evans, C. H. *et al. Eur. Cell. Mater.* 18, 96–111 (2009)[۳۲].

موش با استفاده ازعضله اصلاح ژنتیکی شده گوسفند (ایوانز، مقاله منتشر نشده)، مؤثر واقع شده و مشوق ادامه مطالعه در گوسفند می‌باشد.

یک روش جایگزین برای تسریع فرآیندها در شرایط آزمایشگاهی روشی است که در آن وکتور لنتی ویروس برای انتقال به سلول‌های مغز استخوان اتولوگ استفاده شود (۷۲). آزمایش‌های قبلی از گروه لیبرمن(Lieberman)، با استفاده از یک جمعیتMSC مشتق شده از مغز استخوان گسترده در مدل نقص عضو موش، نشان داد که BMP-2 زمانی که توسط یک وکتور لنتی ویروسی تحویل می‌شود برای مدت زمان طولانی تر و با کیفیت بهتر نسبت به زمانی که توسط آدنوویروس تحویل می‌شود، بیان می‌گردد (۷۳). در روش تسریع تحویل بیان، مغز استخوان برای جدا کردن پرده لیفی خون (Buffy Coat) قبل از انتقال لنتی ویروس جدا شده است. به دلیل آن که وکتور لنتی ویروس در ژنوم میزبان ادغام می‌شوند، مطالعات جاری به دنبال افزودن "ژن‌های انتحاری (Suicide Gene)" به وکتور هستند تا در موارد تغییرات بدخیمی فعال شوند (۷۴).

یک پیوند امن، اصلاح ژنتیکی شده و آلوگرافت سلول استخوان می‌تواند باعث تسریع و تسهیل روند شرایط آزمایشگاهی انتقال ژنی شود. با این حال، برخلاف ترمیم غضروف، استخوان توسط سلول‌های آلوژنیک اصلاح ژنتیکی شده ترمیم نمی‌شوند مگر اینکه یک داروی سرکوب کننده سیستم ایمنی استفاده گردد (۷۵). سونتو همکارانش (۷۶) این مشکل را با کپسوله کردن سلول‌های آلوژنیک و انتقال آن‌ها با آدنوویروس بیان کننده BMP-2 در ذرات هیدروژل قابل جذب، مورد بررسی قرار دادند. با این روش بهبود استخوان قابل‌توجهی درمدل نقص عضو درموش حتی در صورت میزان پایین بیان BMP-۲ مشاهده شد.

بعد از انتشار اولین مقاله در استفاده از فن‌آوری GAM (۱۴ و ۷۷)، به دلیل نوسازی مقدار قابل‌توجهی از استخوان که در نقص عضو در موش ها و سگ ها با استفاده از DNAپلاسمید تحریک شده بود، تمایل ها به استفاده از GAM افزایش یافت. پلاسمیدهای کد کننده ۳۴ اسید آمینه هورمون پاراتیروئید (تریپاراتید: فورتئو®، الی لیلی، امریکاTeriparatide; Forteo®, Eli Lilly, USA) و BMP-4 توسط یک اسفنج کلاژن تحویل داده شد. این مواد پایدار هستند و می‌توانند پایه یک محصول "خارج از قفسه" را تشکیل دهند. پیشرفت های بعدی این محصول به دلیل قابلیت انتقال ضعیف پلاسمید DNA در این شرایط کندتر شد؛ بنابراین روی بهبود توانایی انتقال از ماتریکس ها (۷۸) با استفاده از وکتور ویروسی توسط داربست (۷۹) تمرکز بیشتری شده است. ژن‌درمانی غیرویروسی برای بازسازی استخوان در مقاله دیگری مرور شده است (۸۰).

باززایی آلوگرافت بهبود خلاقانه ای از فن‌آوری GAM می‌باشد. در این کاربرد، استخوان آلوگرافت به‌عنوان داربست استفاده شده و با AAV پوشش داده می‌شود. این روش نشانگر استفاده بالینی از استخوان آلوگرافت می‌باشد که کاربرد آن توسط

Archive of SID

ناتوانی آن در ادغام و دوباره زایی محدود شده است. هنگامی که با AAV پوشش داده شوند، سلول‌های نفوذ یافته با آدنویروس آلوده شده با ترانس ژن مناسب باعث افزایش استخوان‌سازی شده و همزمان به‌عنوان محرک تحلیل استئوکلاست های آلوگرافت به کار می‌رود. مطالعه شاهد برای اولین بار در موش با استفاده از ترانس ژن کد کننده VEGF و RANKL (فعال کننده گیرنده لیگاند Receptor Activator of -NFκB Nfκb Ligand.) صورت گرفت (۸۱). اثربخشی متعاقب با AAV حامل cDNA کد کننده BMP۲(۸۲) و گیرنده فعال اکتیوین نوع ۱ (۸۳) مشاهده شد. هیچ گونه کارآزمایی بالینی از انتقال ژنی برای ترمیم استخوان استفاده نکرده است.

ماهیچه‌های اسکلتی

آسیب‌های عضلانی معمولاً به دلیل صدمات در ورزش‌های حرفه‌ای و تفریحی وارد می‌گردند. در واقع، صدمات عضلانی ۵۵–۱۰٪ کل جراحات ورزشکاران، بسته به نوع ورزش را تشکیل می‌دهند (۸۴). درحالی‌که آسیب‌های عضلانی نسبتاً جزئی (مانند گونه) می‌تواند خودبه‌خودی و کامل التیام یابد، صدمات شدید عضلانی معمولاً منجر به شکل گیری بافت اسکار متراکم (فیبروز) می‌شود که می‌تواند باعث اختلال در عملکرد عضله و درد مزمن و انقباض عضلانی شود.

روش‌های پزشکی بازسازی و ترمیم بافت هنوز برای چنین صدمات شدید عضلانی بهینه سازی نشده است. عضلات مجروح تحت چرخه های متوالی از مراحل، از جمله دژنراسیون عضلانی، التهاب، رگ زایی، بازسازی و فیبروز قرار می گیرند (۸۴). اگرچه روش‌های زیستی برای بهبود درمان عضله اسکلتی مراحل مختلف فرآیند درمان را هدف قرار داده اند، اما امیدوارکننده ترین بخش نتایج در نوسازی عضلات و فیبروزصورت گرفته است. چالش در ترمیم عضله شامل تحریک بازسازی بافت‌های منطقه و جلوگیری از فیبروز می‌باشد.IGF-1 دارای خاصیت سلول‌های بافت قلبی بوده و به‌عنوان یک ترانس ژن توسط میو بلاست های آلوده به آدنویروس تحویل شده است (۸۵). یک روش جایگزین، تحویل مبتنی بر انتقال (Transfetion-based Delivery) از IGF-1 برای بهبود درمان عضله است (۸۶).

ازآنجاکه پس از درمان، نوسازی عضلات اغلب با فیبروز همراه است، کاربرد بالینی این روش نیاز به درمان همراه با داروهای ضد فیبروز دارد. مثلاً یکی از این روش‌ها از خواص ضد فیبروزی این مولکول ها (مانند دکورین، IFN-γ، لوزارتان، رلاکسین و سورامین) استفاده می‌کند که باعث آنتاگونیزه کردن TGF-β به‌عنوان محرک عمده فیبروز، می‌شود. این عوامل می‌تواند فیبروز را مسدود و باعث بهبود عضلانی پس از جراحت شوند (۹۵–۸۷). به‌عنوان مثال، ژن کد کننده دکورین، به نام DCN، به ماهیچه های اسکلتی آسیب‌دیده (پارگی) از طریق یک وکتور AAV قادر به مهار تشکیل فیبروز و بازسازی عضلات اسکلتی تحویل داده شده است (۸۷).

درمان عضله اسکلتی وابسته به فرآیند رگ زایی نیز می‌باشد و سلول‌های مولد مشتق از عضله (Muscle-Derived Proganitor Cells) که VEGF را بیان می‌کنند باعث تحریک رگ زایی و کاهش فیبروز در موش شده‌اند (۹۶). اثرات مشابه در رت با استفاده از میوبلاست های آلوده به دست آمد؛ یک هم افزایی بین VEGF و فاکتور مشتق از سلول‌های بنیادی -۱ (Factor Stromal-Derived 1) مشاهده گردید (۹۷). روش‌هایی که از سلول‌های مولد عضله استفاده می‌کنند ممکن است توسط آلودگی با پروتئین تعیین میوبلاست - ۱ (Myoblast Determination Protein 1) که می‌تواند باعث تمایز آن‌ها به میوبلاست ها شود، مؤثر تر شوند (۹۸).

تاندون و رباط

همان طور که توسط دوتچوا و همکاران مرور شد (۹۹)، چندین روش ژن‌درمانی برای درمان تاندون و رباط مورد استفاده قرار گرفته است. مورفوژن ها، از جمله BMP-12 (به‌عنوان عامل رشد / تمایز Growth-Differentiation Factor -GDF -7)، BMP-13 (یا GDF-6) و BMP-14 (یا GDF-5) باعث تشکیل تاندون و رباط از سلول‌های اولیه

Archive of SID

مولد می‌شوند. نتایج جالبی در مدل‌های حیوانی ترمیم تاندون با استفاده از انتقال cDNA حاصل از کدکردن BMP-12 (۱۰۰ و ۱۰۱) و BMP-14 (۱۰۲ و ۱۰۳) ولی نه برای BMP-13 (۱۰۴) حاصل شده است. اگرچه هر سه منجر به تحریک تولید تاندون در دیگر سیستم ها شده (۱۰۵) و همچنین انتقال GDF6 (کد کننده BMP-13) به سلول‌های MSCs باعث تحریک تولید رباط در شرایط آزمایشگاهی شده است (۱۰۶)؛ عوامل مکانیکی نیز ممکن است در این اختلاف نقش داشته باشند (۱۰۷). این انتقال از فاکتور رونویسی اسکلراکسیز (Scleraxis) باعث افزایش تمایز MSC ها به سلول‌های تاندون زا در *in vitro* شده (۱۰۸) و هنگامی که در ***ex vivo*** به همراه MSC ها استفاده می‌شود، باعث افزایش قدرت بهبود در عضلات چرخاننده شانه (Rotator Cuff)می‌شود (۱۰۹). نتایج مشابهی با استفاده از ترکیبی از cDNA کد کننده BMP-2 و SMAD8 در مدل موش مشاهده شد (۱۱۰). روش‌های غیر اختصاصی تر از ترانس ژن‌هایی که پروتئین‌های FGF-2، IGF-1، PDGF، TGF-β و یا VEGF را کدگذاری می‌کنند، استفاده کرده و به‌طور کلی تشکیل ماتریس، رگ زایی و تکثیر سلولی را تحریک می نمایند (۱۱۴–۱۱۱).

انتقال ژنی برای تحریک استخوان‌سازی در جایگاه استخوان پس از جراحی مورد استفاده قرار گرفته است، در نتیجه باعث افزایش ثابت شدن تاندون روی استخوان شده (۱۱۷–۱۱۵) و درمان را باکاهش التهاب بهبود می‌دهد (۱۱۸). استفاده از siRNA ها (Short RNA-interference) هم عنوان یک روش جلوگیری استخوان‌سازی نابه جا در داخل بافت مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱۹ و ۱۲۰).

دیسک مهره‌ای

روش شرح داده شده در این مقاله مروری را می‌توان به دیسک مهرها نیز تعمیم داد (۱۲۱ و ۱۲۲). اثبات آن را می‌توان در دژنراسیوندیسکی در مدل خرگوش با استفاده از آدنویروس وکتور AAV برای تحویل فاکتورهای رشد، آنتاگونیست سیتوکین ها و متالوپروتئینازهای مهار کننده بافت مشاهده کرد (۱۲۳). ازآنجاکه دیسک مهره ها از نظر ایمنی جدا شده‌اند، بیان بلند مدت ترانس ژن را، حتی هنگام استفاده از وکتور با خاصیت بسیار آنتی ژنی مانند آدنوویروس می‌توان به دست آورد، اگرچه این حفاظت در دیسک های دژنره کاهش یافته است.

مینیسک

انتقال ژنی به مینیسک توسط چندین وکتور مختلف ویروسی (۱۲۶–۱۲۴) و غیر ویروسی (۱۲۷ و ۱۲۸) با روش‌های *in vivo* و *ex vivo* انجام پذیرفته است. در این روش ترانس ژن‌های کد کننده IGF-1 (۱۲۸)، FGF-2 (۱۲۵) و TGF-β (۱۲۶) استفاده شده است. بسیاری از تحقیقات از کشت سلولی، کشت بافت و مدل‌های کوچک حیوانات استفاده کرده‌اند است، اما در یک مطالعه جالب از بز استفاده شده است (۱۲۸). سلول‌های استرومایی مزانشیمی (MSC Mesenchymal -Stromal Cells) با ساختار IGF1 آلوده شده و داخل یک ژل آلژینات کلسیم در یک ضایعه با تمام ضخامت در قسمت‌های سفید منیسک قرار گرفتند. ۱۶ هفته بعد از عمل جراحی، ضایعه با بافتی متفاوت از بافت مینیسک اصلی، ترمیم شد (۱۲۸).

مشکلات حل نشده

با وجود موفقیت مطالعات پیش بالینی، تعدادی از مسائل هنوز بدون راهکار باقی مانده اند. برای مثال اطلاعاتی در مورد این که چه مقدار و در چه مرحله ای از درمان یک فاکتور رشد یا مورفوژن مورد نیاز می‌باشد. بیشتر تحقیقات، ژن ها را بلافاصله پس از جراحی و با هدف جایگزینی بهبود دهنده معرفی کرده و فرض می‌کنند که بیشتر بودن برتری می آورد. با توجه به زیست شناسی پویا در ترمیم بافتی و بازسازی آن، این رویکرد احتمالاً نامناسب می‌باشد. برای مثال، تجویز طولانی مدت BMP-2 در درمان نقص عضو استخوان، نتایج فوق العاده ای حاصل می‌کند (۱۲۹). همچنین، اگرچه BMP-2 می‌تواند ساخت

Archive of SID

استخوان رابهبود دهد، دوزهای بالاتر آن تولید التهاب کرده و باعث بازجذب استخوان می‌شوند. یکی از مزایای انتقال ژنی در قدرت تنظیم کمّی و موقت ژن است. با این حال تا زمانی که ما می دانیم چه مقدار و چه هنگام ترانس ژن بیان می‌شود، این قابلیت نیاز نبوده و بنابراین، به‌طور گسترده مورد بررسی قرار نگرفته است.

موضوع دیگری که نیاز به توضیح دارد، نوع سلول مناسب برای ژن‌درمانی در ex *vivo* می‌باشد. سلول‌های مولد غالباً برای این منظور استفاده می‌شود، اما اینکه آیا منشا این سلول‌ها اهمیت دارد یا نه نامشخص است؛ اما برای نمونه، مطالعات مفصل مقایسه ای میان سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، عضله و مغز استخوان در مدل یکسان هنوز انجام نشده است. سلول‌های مولد بر اساس آن که نه تنها از محصولات ژن استفاده می‌کنند، بلکه به سلول‌های بافت نوسازی شده، تمایز می‌یابند. با این حال، حضور بدون ابهام تعداد زیادی از سلول‌های کمک‌کننده در ترمیم بافت دشوار است و این سوال را مطرح می‌کند که آیا لازم است که سلول‌های مورد استفاده برای انتقال ژنی قادر به تمایز به این صورت باشند. برای مثال، سلول‌های پوست اصلاح ژنتیکی شده به‌طور موفقیت آمیزی در درمان ضایعات استخوانی دراسب مورد استفاده قرار گرفتند (۶۳).

بسته به کاربرد، پاسخ‌های التهابی و ایمنی به وکتور ویروسی می‌تواند مشکل ساز شود. آدنوویروس خاصیت آنتی ژنی به خصوصی دارد که هر دو اجزای ذاتی و تطبیقی از سیستم ایمنی بدن را فعال کند. در یک حالت افراطی (قبلا اشاره شد) ولی نامربوط به پزشکی ترمیم و نوسازی بافت، این خاصیت آنتی ژنی منجر به مرگ یکی از بیماران شرکت‌کننده در یک آزمون ژن‌درمانی شد (۱۰). برای برنامه های کاربردی مورد بحث در این مقاله، نگرانی عمده این است که سیستم ایمنی بدن با راندمان انتقال ژنی تداخل کند و در نتیجه التهاب بیش از حد باعث جلوگیری از روند نوسازی بافت شود. اکثر انسان‌ها، برخلاف حیوانات آزمایشگاهی دارای پیش ایمنی به سروتیپ ۵ آدنوویروس می‌باشند که پس از تحویل در داخل بدن، انتقال را مهار کند. این محدودیت می‌تواند در ابتدا با استفاده از سروتیپ‌های جایگزین برطرف شود، اما پاسخ ایمنی ایجاد شده باعث منع تکرار دوز می‌شود. AAV، به‌طور کلی به‌عنوان حداقل خاصیت آنتی ژنی از وکتورهای شایع ویروسی در نظر گرفته شده است که پاسخ های ایمنی هومورال و نه سلولی را در حیوانات آزمایشگاهی تولید می‌کند. با این حال، یک کارآزمایی بالینی انسان با استفاده از AAV برای ارائه فاکتور IX در بیماران مبتلا به هموفیلی یک پاسخ سلولی قوی و پیش بینی نشده را نشان داد که بیان ترانس ژن را محدود کرده است (۱۳۰). مطالعات بیشتر، ایمنی زایی های مختلف در سروتیپ های مختلف AAV در گونه‌های متفاوت را گزارش می‌دهد. یکی از مزیت های وکتور های غیر ویروسی این است که بسیاری از آن‌ها ایمنی زایی کمی دارند (۱۳۱).

اگرچه منابع علمی نشانگر نمونه‌های متعددی از استفاده‌های موفقیت آمیز از ژن‌درمانی برای بازگرداندن بافت عضلانی آسیب‌دیده در حیوانات آزمایشگاهی کوچک هستند، فقط دو پروتکل در مطالعات بالینی بروز یافته اند. این پروتکل ها در OA و ترمیم غضروف (۴۰–۳۲ و ۳۸) با استفاده از سلول‌های غضروفی آلوژنیک اصلاح ژنتیکی شده استفاده می‌شوند. همچنین، عوامل متعددی باعث نرسیدن به ترجمه بالینی هستند (۱۳۲ و ۱۳۳).

هر گونه تلاش برای آوردن ژن‌درمانی به کلینیک برای استفاده های غیر کشنده و غیر ژنتیکی، توسط نهادهای نظارتی که نگرانی اصلی شان تأمین ایمنی و نسبت خطر به نفع درمان می‌باشد، مورد بررسی دقیق قرار خواهد گرفت. این بررسی‌ها با دانستن این واقعیت که بسیاری از صدمات اسکلتی- عضلانی تهدید کننده حیات نیستند، انجام می‌شوند. مطالعات فارماکولوژی، سم شناسی و توزیع حیاتی که بدون شک نیازمند GLP (عملیات آزمایشگاهی صحیح) و امکانات و گران قیمت وقت گیر می‌باشند، بی شک مورد نیاز هستند. علاوه بر این، اثبات اثربخشی در یک مدل حیوانی بزرگ به احتمال زیاد مورد نیاز است. انجام چنین فعالیت‌هایی در دانشگاه‌ها دشوار است. به‌علاوه، شرکت های بزرگ دارویی تمایلی به

Archive of SID

سرمایه‌گذاری در محصولات مرتبط با ژن‌درمانی، به خصوص در مراحل اولیه مطالعه که از نظر پزشکی و تجاری ریسکی هستند، ندارند (۴۲ و ۱۳۲).

نتیجه‌گیری

با وجود آزمایش‌های بالینی، زمینه برای خوش‌بینی‌های محتاطانه در این زمینه وجود دارد. ژن‌درمانی به‌عنوان یک کلیّت، تحت یک تجدید حیات بوده و چندین پروتکل در حال ورود به فاز III مطالعه بالینی دارد. ژن‌درمانی برای اولین بار برای استفاده بالینی توسط سازمان پزشکی اروپا تأیید شده است تا به تنها داروی دیگر مورد تأیید ژن‌درمانی، جندیسین که در چین برای درمان سرطان سر و گردن استفاده می‌شود، بپیوندد.

اگرچه توجه جهان است بر روی بیماری‌های مندلی ژن‌درمانی و سرطان متمرکز است، برنامه‌های کاربردی از نوع شرح داده شده در این مقاله نیز باید به‌طور موازی در زمینه ژن‌درمانی توسعه و گسترش یابد. همان طور که اشاره شد، یکی از پروتکل‌ها برای ترمیم غضروف مفصلی در کره (۳۲) و چهار آزمون مرتبط با OA در ایالات‌متحده آمریکا و کره وارد فاز III آزمایش‌ها شده‌اند (۳۲ و ۴۰–۳۸). در برخی موارد، صنعت داروسازی نیز باید توجه ویژه‌ای به ژن‌درمانی به خصوص به‌عنوان یک نیاز برآورده نشده در بازار بزرگ برای روش‌های نوسازی سیستم عضلانی آسیب‌دیده، داشته باشد.

منابع

1. Jacobs JJ. In: The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States. 2nd edn. Ch. 6, 129–179 (American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2011).

2. Evans C H. Advances in regenerative orthopedics. Mayo Clin Proc 2013;88:1323-9.

3. Koria P. Delivery of growth factors for tissue regeneration and wound healing. BioDrugs 26, 163–175 (2012).

4. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2012;29:1–63.

5. Lam J, Lu S, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of biologics for cartilage repair. Adv Drug Deliv Rev Volume 84, April 2015, 123-134

6. Evans CH, Robbins PD. Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. Clin Orthop Relat Res 1999;(367 Suppl.):S410–S418.

7. Evans C. Using genes to facilitate the endogenous repair and regeneration of orthopaedic tissues. Int Orthop 2014;38:1761-9.

8. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR,Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. J Gene Med 2013;15:65–77.

9. Hacein-Bey-Abina, S. et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 2003;302:415-9.

10. Raper, S. E. et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in an ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. Mol Genet Metab 2003;80:148-58.

11. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Getting arthritis gene therapy into the clinic. Nat Rev Rheumatol 2011;7:244-9.

12. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-viral gene delivery methods. Curr Pharm Biotechnol 2013;14:46–60.

13. Evans, C. H. et al. Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical, and economical. Tissue Eng 2007;13:1987-93.

14. Minas T. A primer in cartilage repair. J Bone Joint Surg 2012;94:141-6.

15. Cucchiarini, M. et al. Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. Mol Ther 2005;12:229-38.

16. Cucchiarini M, Madry H. Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. Gene Ther 2014;21:811-9.

17. Cucchiarini M, Orth P, Madry H. Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. J Mol Med (Berl.) 2013;91:625-36.18. Pascher, A. et al. Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. Gene Ther 2014;11:133-41.

19. Neumann AJ, Schroeder J, Alini M, Archer CW, Stoddart MJ. Enhanced adenovirus transduction of hMSCs using 3D hydrogel cell carriers. Mol Biotechnol 2013;53:207-16.

20. Sieker, J. T. et al. Direct bone morphogenetic protein 2 and Indian hedgehog gene transfer for articular cartilage repair using bone marrow coagulates. Osteoarthritis Cartilage Volume 23, Issue 3, March 2015, Pages 433–442 http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.008.

21. Ivkovic, A. et al. Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in

Archive of SID

2005;23:118-26.

36. Neumann, E. et al. Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. Gene Ther 2002;9:1508-19.37. Watson, R. S. et al. scAAV-mediated gene transfer of interleukin-1-receptor antagonist to synovium and articular cartilage in large mammalian joints. Gene Ther2013;20:670-77.

38. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], https://clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT00599248 (2010).

39. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], https://clinicaltrials. gov/ ct2/show/NCT01671072 (2015).

40. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], https://www.clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT02072070 (2015).

41. Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SC. Osteoarthritis gene therapy. Gene Ther 2004;11:379-89.

42. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic. Transl Res 2013;161:205-16.

43. Pagnotto, M. R. et al. Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-β1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. Gene Ther 2007;14:804-13.

44. Gelse, K. et al. Cell-based resurfacing of large cartilage defects: long-term evaluation of grafts from autologous transgene-activated periosteal cells in a porcine model of osteoarthritis. Arthritis Rheum 2008;58:475-88.

45. Needham, C. J. et al. Osteochondral tissue regeneration through polymeric delivery of DNA encoding for the SOX trio and RUNX2. Acta Biomater 2014;10:4103-12.

46. Brunger, J. M. et al. Scaffold-mediated lentiviral transduction for functional tissue engineering of cartilage. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111:E798–E806.

47. Pi, Y. et al. Targeted delivery of non-viral vectors to cartilage in vivo using a chondrocyte-homing peptide identified by phage display. Biomaterials 2011;32:6324-32.

48. Saraf A, Mikos AG. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 2006;58:592-603.

49. Betz, O. B. et al. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. J Bone Joint Surg Am 2006;88:35565.

50. Wright, V. et al. BMP4-expressing muscle-derived stem cells differentiate into osteogenic lineage and improve bone healing in immunocompetent mice. Mol Ther 2002;6:169-78.

51.Gao F, Zhang CQ, Chai YM, Li XL. Lentivirus-mediated Wnt10b overexpression enhances fracture healing in a rat atrophic non-union model. Biotechnol Lett March 2015, Volume sheep. Gene Ther 2010;17:779–89.

22. Evans, C. H. et al. Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage. Eur Cell Mater 2009;18:96–111.

23. Kang, R. et al. Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study. Osteoarthritis Cartilage 1997:5:13943.

24. Orth, P. et al. Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. Knee Surg. Sports Traumatol Arthrosc 2011;19:2119-30.25. Matsumoto, T. et al. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. Arthritis Rheum 2009;60:1390-405.

27. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. J Bone Joint Surg 2007;89:672–85.

26. Hidaka, C. et al. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein‐7. J Orthop Res 2003;21:573-83.

28. Brower-Toland, B. D. et al. Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function. Hum Gene Ther 2001;12:117-29.29. Ortved KF, Begum L, Mohammed HO, Nixon AJ. Implantation of rAAV5-IGF-I transduced autologous chondrocytes improves cartilage repair in full-thickness defects in the equine model. Mol Ther 2015 Feb;23(2):363-73

30. Ha CW, Noh MJ, Choi KB, Lee KH. Initial phase I safety of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-β-1 in degenerative arthritis patients. Cytotherapy 2012;14:247-56.

31. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], https://clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT01825811 (2015).

32. Wehling, N. et al. Interleukin-1β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-κB-dependent pathways. Arthritis Rheum 2009;60:801–12.

33. Glass, K. A. et al. Tissue-engineered cartilage with inducible and tunable immunomodulatory properties. Biomaterials 35, 5921–5931 (2014).

34. Rachakonda PS, Rai MF, Schmidt MF. Application of inflammation-responsive promoter for an in vitro arthritis model. Arthritis Rheum. 58, 2088–2097 (2008).

35. Haupt J. L. et al. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. J Orthop Res

Archive of SID

66. Baltzer, A. W. et al. A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene expression in a New Zealand white rabbit model. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 1999;7:197–202.

67. Betz, V. M. et al. Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose. Hum Gene Ther 2007;18:907-15.

68. Egermann, M. et al. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. Gene Ther 2006;13:1290-9.

69. Egermann, M. et al. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. Hum Gene Ther 2006;17:507–17.

70. Southwood, L. L. et al. Evaluation of direct in vivo gene transfer in an equine metacarpal IV ostectomy model using an adenoviral vector encoding the bone morphogenetic protein-2 and protein-7 gene. Vet Surg 2012;41:34554.

71. Menendez, M. I. et al. Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. Osteoarthritis Cartilage 2011;19:1066-75.

72. Virk, M. S. et al. "Same day" ex-vivo regional gene therapy: a novel strategy to enhance bone repair. Mol Ther 2011;19:960-8.

73. Virk, M. S. et al. Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model. Bone 2008;42:921-31.

74. Alaee, F. et al. Suicide gene approach using a dual-expression lentiviral vector to enhance the safety of ex vivo gene therapy for bone repair. Gene Ther 2014;21:139-47.

75. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. J Orthop Res 2003;21:44–53.

76. Sonnet, C. et al. Rapid healing of femoral defects in rats with low dose sustained BMP2 expression from PEGDA hydrogel microspheres. J Orthop Res 2013;31:1597-604.

77. Fang, J. et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:5753–58.

78. Tierney EG, Duffy GP, Hibbitts AJ, Cryan SA, O'Brien FJ. The development of non-viral gene-activated matrices for bone regeneration using polyethyleneimine (PEI) and collagen-based scaffolds. J Control Release 2012;158:304-11.

79. Dupont, K. M. et al. Synthetic scaffold coating with adeno-associated virus encoding BMP2 to promote endogenous bone repair. Cell Tissue Res 2012;347:575-88.

80. Wegman F, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J. Non-viral gene therapy for bone tissue engineering. Biotechnol Genet Eng Rev 2013;29:206-20.

37, Issue 3, pp 733–739

52. Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. J Orthop Res 2009;27:8-14.

53. Han D, Li J. Repair of bone defect by using vascular bundle implantation combined with Runx II gene-transfected adipose-derived stem cells and a biodegradable matrix. Cell Tissue Res 2013;352:561-71.

54. Lattanzi, W. et al. Ex vivo-transduced autologous skin fibroblasts expressing human Lim mineralization protein-3 efficiently form new bone in animal models. Gene Ther2008;15:1330-43. (2008).

55. Rundle, C. H. et al. Retroviral-based gene therapy with cyclooxygenase-2 promotes the union of bony callus tissues and accelerates fracture healing in the rat. J Gene Med 2008;10:229–41.

56. Li, Y. et al. The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. Biomaterials 2013;34:5048-58.

57. Scotti, C. et al. Engineering of a functional bone organ through endochondral ossification. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:3997–4002.

58. Peng, H. et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. J Clin Invest 2002;110:7519.

59. Gates CB, Karthikeyan T, Fu F, Huard J. Regenerative medicine for the musculoskeletal system based on muscle-derived stem cells. J Am Acad Orthop Surg 2008;16:68–76.

60. Evans C. Gene therapy for the regeneration of bone. Injury 2011;42:599–604.

61. Zhu L, Chuanchang D, Wei L, Yilin C, Jiasheng D. Enhanced healing of goat femur-defect using BMP7 gene-modified BMSCs and load-bearing tissue-engineered bone. J Orthop Res 200;28:412-8.

62. Chang, S. C. et al. Large-scale bicortical skull bone regeneration using ex vivo replication-defective adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-2 gene-transferred bone marrow stromal cells and composite biomaterials. Neurosurgery 2009;65:75—81.

63. Ishihara A, Zekas LJ, Litsky AS, Weisbrode SE, Bertone AL. Dermal fibroblast-mediated BMP2 therapy to accelerate bone healing in an equine osteotomy model. J Orthop Res 2010;28:403–11.

64. Baltzer, A. W. A. et al. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing facture repair. Clin Orthop Relat Res 2000;379 (Suppl.):S120–S125.

65. Bertone, A. L. et al. Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. J Orthop Res 2004;22;1261-70. (2004).

Archive of SID

regenerative capacity of muscle stem cells in dystrophic skeletal muscle. Mol Ther 2009;17:1788-98.

97. Zhou, W. et al. Angiogenic gene-modified myoblasts promote vascularization during repair of skeletal muscle defects. J Tissue Eng Regen Med Volume 9, Issue 12, pages 1404–1416, December 2015.

98. Goudenege, S. et al. Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD Mol Ther 2009;17:1064–72.

99. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. Adv Drug Deliv Volume 84, April 2015, Pages 222–239.

100. Lou J, Tu Y, Burns M, Silva MJ, Manske P. BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. J Orthop Res 2001;19:1199-202.

101. Majewski, M. et al. Ex vivo adenoviral transfer of bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) cDNA improves Achilles tendon healing in a rat model. Gene Ther 2008;15:1139-146.

102. Basile, P. et al. Freeze-dried tendon allografts as tissue-engineering scaffolds for Gdf5 gene delivery. Mol Ther 2008;16:466-73.

103. Rickert M. BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of achilles tendon injury. J. Bone Joint Surg Am 2008;90:445; author reply 445–446 (2008).

104. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Ehteshami JR, Rodeo S. A. Adenoviral-mediated gene transfer of human bone morphogenetic protein-13 does not improve rotator cuff healing in a rat model. Am J Sports Med 2011:39:180-7.

105. Wolfman, N. M. et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-β gene family. J Clin Invest 1997;100:321-30.

106. Haddad-Weber, M. et al. BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells. Cytotherapy 2010:12:505-13.

107. Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P. Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: a role for follistatin? Clin Orthop Relat Res 2008;466:1592-7.

108. Alberton, P. et al. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. Stem Cells Dev 2012:21:846-58.

109. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. AmJ Sports Med 2011;39:1282-9.

110. Hoffmann, A. et al. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling

81. Ito, H. et al. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. Nat Med 2005;11:291-7.

82. Yazici, C. et al. Self-complementary AAV2.5-BMP2-coated femoral allografts mediated superior bone healing versus live autografts in mice with equivalent biomechanics to unfractured femur. Mol Ther 2011;19:1416-25.

83. Koefoed, M. et al. Biological effects of rAAV-caAlk2 coating on structural allograft healing. Mol Ther 2005;12:212-8.

84. Gharaibeh, B. et al. Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease. Birth Defects Res C Embryo Today 2012;96:82–94.

85. Kasemkijwattana, C. et al. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. Cell Transplant 1998;7:585-98.

86. Schertzer JD, Lynch GS. Comparative evaluation of IGF‐I gene transfer and IGF‐I protein administration for enhancing skeletal muscle regeneration after injury. Gene Ther 2006;13: 1657-64.

87. Li, Y. et al. Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. Mol Ther 2007;15:1616-22.

88. Zhu, J. et al. Relationships between transforming growth factor-β1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. J Biol Chem 2007;282:25852–63.

89. Fukushima, K. et al. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. Am J Sports Med 2001;29:394-402.

90. Nozaki, M. et al. Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. Am J Sports Med 2008;36:235462.

91. Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. J Orthop Res 2003;21:798-804.

92. Li Y, Negishi S, Sakamoto M, Usas A, Huard J. The use of relaxin improves healing in injured muscle. Ann NY Acad Sci 2005;1041:395-7.

93. Terada, S. et al. Use of an antifibrotic agent improves the effect of platelet-rich plasma on muscle healing after injury. J Bone Joint Surg Am 2013;95:980-8.

94. Kobayashi, T. et al. The timing of administration of a clinically relevant dose of losartan influences the healing process after contusion induced muscle injury. J Appl Physiol 1985;114:26273.

95. Bedair HS, Karthikeyan T, Quintero A, Li Y, Huard J. Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle. Am J Sports Med 2008;36:1548-54.

96. Deasy, B. M. et al. Effect of VEGF on the

Archive of SID

to the meniscus. J Bone Joint Surg Am 1999;81:918-25.

125. Cucchiarini M, Schetting S, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H. rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and α-SMA expression in human meniscal lesions. Gene Ther 2009;16:1363-72.

126. Steinert, A. F. et al. Genetically enhanced engineering of meniscus tissue using ex vivo delivery of transforming growth factor-β 1 complementary deoxyribonucleic acid. Tissue Eng 2007;13:2227-37.

127. Lee HP, Kaul G, Cucchiarini M, Madry H. Nonviral gene transfer to human meniscal cells. Part I: transfection analyses and cell transplantation to meniscus explants. Int Orthop 2014;38:1923-30.

128. Zhang H, Leng P, Zhang J. Enhanced meniscal repair by overexpression of hIGF-1 in a full-thickness model. Clin Orthop Relat Res 2009;467:3165-74.

129. Betz, O. B. et al. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. Gene Ther 2007;14:1039-44.

130. Manno, C. S. et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nat Med 2006;12:342-7.

131. Calcedo R, Wilson JM. Humoral immune response to AAV. Front Immunol 2013;4:341.

132. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Orthopedic gene therapy—lost in translation? J Cell Physiol 2012;227:416-20.

133. Madry, H. et al. Barriers and strategies for the clinical translation of advanced orthopaedic tissue engineering protocols. Eur Cell Mater 2014;27:17–21.

pathway in mesenchymal stem cells. J Clin Invest 2006:116:940-52.

111. Tang, J. B. et al. Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. J Bone Joint Surg Am 2008;90:1078-89.

112. Hou, Y. et al. Effects of transforming growth factor-β1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. Matrix Biol 2009:28:324-35.

113. Nakamura, N. et al. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. Gene Ther 1998;5:1165-70.

114. Schnabel, L. V. et al. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. J Orthop Res 2009;27:1392-8.

115. Coen MJ, Chen ST, Rundle CH, Wergedal JE, Lau KH. Lentiviral-based BMP4 in vivo gene transfer strategy increases pull-out tensile strength without an improvement in the osteointegration of the tendon graft in a rat model of biceps tenodesis. J Gene Med 2011;13:511-21.

116. Martinek, V. et al. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. J Bone Joint Surg Am 2002;84:1123-31.

117. Lattermann, C. et al. Gene transfer to the tendon-bone insertion site. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2004;12:510-15.

118. Ricchetti, E. T. et al. Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon in a murine patellar tendon model. J Hand Surg Am 2008;33:1843-52.

119. Lin, L. et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against Runx2/Cbfa1 inhibits the formation of heterotopic ossification in animal model. Biochem Biophys Res Commun 2006;349:564-72.

120. Xue, T. et al. Non-virus-mediated transfer of siRNAs against Runx2 and Smad4 inhibit heterotopic ossification in rats. Gene Ther 2010;17:370-9.

121. Evans C. Potential biologic therapies for the intervertebral disc. J Bone Joint Surg Am 2006;88 (Suppl. 2):95-8.

122. Nishida K, Gilbertson LG, Robbins PD, Evans CH, Kang JD. Potential applications of gene therapy to the treatment of intervertebral disc disorders. Clin Orthop Relat Res 2000;379 (Suppl.):S234–S241.

123. Woods BI, Vo N, Sowa G, Kang JD. Gene therapy for intervertebral disk degeneration. Orthop Clin North Am 2011;42:563-74.

124. Goto, H. et al. Transfer of lacZ marker gene

Archive of SID

Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system

*__Bita Sedaghati__, Pharmaceutical Technology, Institute of Pharmacy, University Leipzig, Leipzig, Germany (*Translator). bita.sedaghati@uni-leipzig.de

Christopher H. Evans, Department of Orthopedic Surgery, Stem Cell Research Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA. evans.christopher@mayo.edu

Johnny Huard, Department of Orthopedic Surgery, Stem Cell Research Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.

Archive of SID

Abstract

Background: Injuries to the musculoskeletal system are common, debilitating and expensive. In many cases, healing is imperfect, which leads to chronic impairment. Gene transfer might improve repair and regeneration at sites of injury by enabling the local, sustained and potentially regulated expression of therapeutic gene products; such products include morphogens, growth factors and anti-inflammatory agents. Proteins produced endogenously as a result of gene transfer are nascent molecules that have undergone post-translational modification. In addition, gene transfer offers particular advantages for the delivery of products with an intracellular site of action, such as transcription factors and noncoding RNAs, and proteins that need to be inserted into a cell compartment, such as a membrane. Transgenes can be delivered by viral or nonviral vectors via in vivo or ex vivo protocols using progenitor or differentiated cells. The first gene transfer clinical trials for osteoarthritis and cartilage repair have already been completed. Various bone-healing protocols are at an advanced stage of development, including studies with large animals that could lead to human trials. Other applications in the repair and regeneration of skeletal muscle, intervertebral disc, meniscus, ligament and tendon are in preclinical development. In addition to scientific, medical and safety considerations, clinical translation is constrained by social, financial and logistical issues.

Keywords: Gene therapy, Musculoskeletal system, Regenerating