

روش‌های ژن درمانی برای ترمیم و نوسازی دستگاه عضلانی اسکلتی

* بیتا صدقاتی: گروه تکنولوژی دارویی، انستیتو دارویی، دانشگاه لیبزیگ، لیبزیگ، آلمان (*مترجم). bita.sedaghati@uni-leipzig.de
 کریستوفر اچ اوانس: گروه جراحی ارتوپدی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه پیتزبورگ، آمریکا. evans.christopher@mayo.edu
 جانی هوارتز: گروه جراحی ارتوپدی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه پیتزبورگ، 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 وکتور ویروسی 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 مهره‌های، 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

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 مورفوزن‌ها (Morphogenes) و فاکتورهای رشد پروتئین دار برای مثال فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin Growth Factor-1) برای شروع فرآیند دارند. اهمیت این عمل توسط حجم پژوهش

سالانه بیش از ۲۰ میلیون آسیب به سیستم عضلانی-اسکلتی در ایالات متحده 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

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 >1200 ژن درمانی 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 القا (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 ژن درمانی منجر شد (۱۰).

تولید وکتورهای ویروسی نو ترکیب سهل نبوده و بر توانایی انجام مطالعات پیش بالینی در آزمایشگاه، سهولت آزمون در مدل‌های بزرگ حیوانی، هزینه آزمایش‌های بالینی و نهایتاً قیمت محصولات ژن درمانی در بازار دارویی تأثیر می‌گذارد. آخرین عامل از عوامل بالا به‌طور قابل توجهی اهمیت داشته و به شدت می‌تواند استفاده از ژن درمانی موفق را محدود کند. به‌عنوان مثال، گلیبراً® (آدیپژن تیپارووک، یونی کیور، هلند) (tiparvovec alipogene; Glybera®) (uniQure, Netherlands) یک محصول ژن درمانی (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

اختصاص داده شده در جهت تولید داربست‌هایی (Scaffolds) با توانایی ارائه فاکتورهای مناسب به شیوه‌ای کنترل شده و پایدار (Controlled and sustained release) (۳-۵) 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 نو ترکیب 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 درون سلولی (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 ژن درمانی 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 ژن درمانی برای کمک به ترمیم و بازسازی سیستم عضلانی-اسکلتی تمرکز دارد.

پرایمر ژن درمانی

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 ژن درمانی، معمولاً توالی ژنوم ویروسی که مسئول ایجاد بیماری و شدت آن

نکات کلیدی

- انتقال ژن یک راه حل برای مشکل تحویل مورفوزن ها و سایر 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 آزمایشگاهی (*ex vivo*) وجود دارد.
- پیشرفت های پیش بالینی در ترمیم غضروف، بهبود استخوان و بازسازی عضلات، دیسک مهره، مینیسک، تاندون و رباط انجام شده است.
- تا کنون تعداد کمی از مطالعات بالینی برای آرتروز و ترمیم غضروف صورت گرفته است.

معمولاً از ACI استفاده می شود. 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 های درون ضایعه ای بهبود می یابد. با وجود اینکه، این روش ارزان، ساده و مؤثر است، FDA نیازمند روش های جدید ترمیم بافت غضروفی می باشد که از شکستگی میکرو برتر باشد که خود پیامدهای جدی برای طراحی کارآزمایی بالینی به همراه دارد. روش های مبتنی بر دو ژن نیز برای بهبود اثربخشی شکستگی های میکرو مطرح شده اند. هر دو عمل ساده و واکنشی باشند. با استفاده از یک روش، آدنو همراه با ویروس نوترکیب AA (Adeno-Associated Virus) به طور مستقیم به آگزودایی که داخل ضایعه استئوکندرال شده، وارد می شود (۱۷-۱۵). در یک مدل استئوکندرال در خرگوش، فاکتور رشد فیبروبلاست (Fibroblast Growth factor-FGF-2)، IGF-1 (۱۵) 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 می یابد. مغز استخوان منعقد شده، شامل سلول وکتور، به عنوان یک شاخه ژن شناخته شده و سپس در ضایعه غضروف قرار داده می شود (شکل ۲). آدنوویروس برای انتقال به سلول های دیگر در دسترس است، فرآیندی که در آن ویژگی برتر انتقال آدنوویروس در زمان اتصال به ماتریکس کمک کننده می باشد (۱۹).

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

پیشرفت های ژن درمانی

غضروف مفصلی: آسیب به غضروف مفصلی می تواند منجر به درد و آرتروز (Osteoarthritis-OA) شود. به دلیل اینکه که غضروف مفصلی ظرفیت محدودی برای بازسازی خودبه خودی دارد، تعداد روش های جراحی در جهت ترمیم گسترش یافته است (۱۴). از لحاظ ژن درمانی، مرتبط ترین روش ها شامل شکستگی های میکرو (Microfracture) و کاشت کندروسیت های اتولوگ (Autologous Chondrocyte Implantation-ACI) می باشد. شکستگی های میکرو یکی از چندین تکنیک های مرتبط است که در آن ضایعه غضروف با تمام ضخامت با مغز استخوان زیرین در ارتباط است. سلول های مولد از منطقه ساب کندرالوارد ضایعه شده و به دام لخته فیبرینی در ضایعه می افتند که در آنجا برخی از آنها به بافت غضروفی تمایز می یابند تا بافت را ترمیم کنند. تصور می شود که برخی از شکستگی های میکرو برای درمان ضایعات کانونی کوچک کارآمد باشند اما در ضایعات بزرگ تر

این نوع درمان نتایج بالینی مشابه و یا بهتر از شکستگی میکرو گزارش شده است (۱۴). ماهیت این فرآیند برای شرایط آزمایشگاهی ژن درمانی 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 (۲۶-۲۹). کاشت سلول‌های غضروفی آلوگرافت در ادامه انتقال آدنووایروس 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 قرار گرفته است. یک لاین سلولی از سلول‌های غضروفی یک نوزاد پلی داکتیلی و یک گروه متشکل از سلول‌ها با رتروویروس حامل TGFβ1 cDNA برای ترمیم بافت غضروفی، ایجاد شدند

با این روش در خرگوش استفاده از cDNA کد کننده برای پروتئین مورفولوژیکی استخوان (BMP-2 - Bone Morphogenetic Protein)، 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 TGFβ1 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 نمونه برداری) 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 آدنووایروس 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

درحالی‌که تشکیل استخوان مطلقاً نیازمند به تشکیل عروق می‌باشد. در مورد تشکیل استخوان، cDNA کد کننده VEGF و BMPs، بهبود آسیب استخوانی را به‌طور قابل توجهی 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). موفقیت‌های قابل توجهی 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 موفق‌تری از بز (۶۱)، خوک (۶۲)، اسب (۶۳) با استفاده از آدنوویروس برای انتقال cDNA کد کننده BMPها به ضایعه استخوان‌های دراز، نقص جمجمه و محل‌های نکرور استخوان لگن، با MSCهای مغز مشتق شده از مغز 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-6 به اسب گزارش شده است (۷۰ و ۷۱).

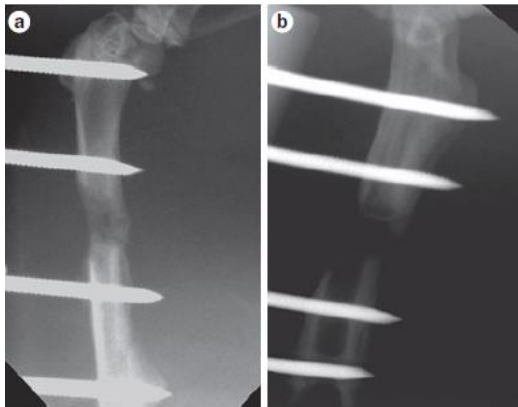
فرآیندهای تسریع در شرایط آزمایشگاهی که با استفاده از چربی و عضله اتولوگ انجام می‌شود باعث تحریک پاسخ آنتی بادی به وکتور آدنوویروس ۲۳ نمی‌شود و با ضریب اطمینان بیشتری نقص عضو در موش را نسبت به تزریق مستقیم همان وکتور تحریک می‌کند (شکل ۳). این تکنولوژی در مدل پیوند از دیگر (Xenotransplantation)، در

علاقه به استفاده از GAMS (۴۵ و ۴۶) و پژوهش در بهبود بهره‌وری و هدف قرار دادن وکتورهای غیر ویروسی همچنان ادامه دارد. پی‌ا 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. ژن درمانی برای ترمیم غضروف در جای دیگر مرور شده است (۴۸).

استخوان

از بافت استخوان در ترمیم بافت اغلب به‌عنوان "میوه‌های پایین درخت" یاد می‌شود، زیرا استخوان یکی از معدود اندام‌هایی 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 نکرور فاقد رگ (Avascular Necrosis)، ترمیم آلوئولار و آسیب‌های فک پایین و لثه نیز بررسی شده است (۲).

تحقیق در ژن درمانی عمدتاً روی تحویل مورفوژن‌ها به خصوص BMPs (۵۰-۴۹)، پروتئین‌های Wnt ۱، عوامل رگ‌زا مانند اندوتلیال عروقی فاکتور رشد (Vascular Endothelial Growth Factor -VEGF) (۵۲)، عوامل رونویسی استخوان‌زا (۵۳)، پروتئین‌های دامنه LIM (LMPها) (۵۴) و سیکلواکسیژناز-۲ (۵۵) تمرکز یافته است. استفاده بالقوه از microRNAها نیز از مورد توجه بوده است (۵۶). انتخاب ترانس ژن‌ها توسط انتخاب پیچیده بین مسیر اندوکندرال به سمت تشکیل استخوان که نیاز به شکل‌گیری اولیه از غضروف دارد (۵۷)، یا مسیر داخل‌غشایی، متغیر می‌باشد. این دوگانگی برای نیاز به یک منبع خون می‌باشد؛ تشکیل غضروف در محیط بدون رگ رخ می‌دهد



عوض ۲- نخودایه دکلیشن طاقه لگورد "العلی الیه هکذیه البالیج هکذیه نیهی" یغ
 خله : خه لاقه نوما نهقیقه هکذیه ا. BMP-2 ب. هکذیه خه
 خاله "علی ایجهک اهل" لخد لله لخد لله طیه لیه که کیره له ؟ ان کینه هکذیه cDNA
 هکذیه BMP2 هکذیه ان غ نالی طیه کنگا کیهج نه لاقه خه خاله "علی ای" له "هکذیه
 الگ هکذیه لاقه هکذیه "له ا" "ال" "هکذیه".

Evans, C. H. et al. *Eur. Cell. Mater.* 18, 96-111 (2009)^{۷۲}.

سلول‌های آلوژنیک و انتقال آن‌ها با آدنووایروس بیان کننده BMP-2 در ذرات هیدروژل قابل جذب، مورد بررسی قرار دادند. با این روش بهبود استخوان قابل توجهی در مدل نقص عضو در موش 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 قابل توجهی از استخوان که در نقص عضو در موش‌ها و سگ‌ها با استفاده از DNA پلاسمید تحریک شده بود، تمایل‌ها به استفاده از GAM افزایش یافت. پلاسمیدهای کد کننده ۳۴ اسید آمینه هورمون پاراتیروئید (تریپاراتید: فورتئو®، الی لیلی، امریکا Teriparatide; 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. پیشرفت‌های بعدی این محصول به دلیل قابلیت انتقال ضعیف پلاسمید DNA در این شرایط کندتر شد؛ بنابراین روی بهبود توانایی انتقال از ماتریکس‌ها (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 خلاقانه‌ای 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

موش با استفاده از عضله 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 جمعیت MSC 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 طولانی‌تر و با کیفیت بهتر نسبت به زمانی که توسط آدنووایروس 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

(۸۵). یک روش جایگزین، تحویل مبتنی بر انتقال (Transfection-based Delivery) از IGF-1 برای بهبود درمان عضله است (۸۶).

از آنجاکه 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 مولکول‌ها (مانند دکورین، γ -IFN، لوزارتان، رلاکسین و سورامین) استفاده می‌کند که باعث آنتاگونیزه کردن $\text{TGF-}\beta$ به‌عنوان محرک عمده فیبروز، می‌شود. این عوامل می‌تواند فیبروز را مسدود و باعث بهبود عضلانی پس از جراحی شوند (۹۵-۹۷). به‌عنوان مثال، ژن کد کننده دکورین، به نام DCN، به ماهیچه‌های 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 رگ‌زایی نیز می‌باشد و سلول‌های مولد مشتق از عضله (Muscle-Derived Progenitor Cells) که VEGF را بیان می‌کنند باعث تحریک رگ‌زایی و کاهش فیبروز در موش شده‌اند (۹۶). اثرات مشابه در رت با استفاده از میوبلاست‌های آلوده به دست آمد؛ یک هم‌افزایی بین VEGF و فاکتور مشتق از سلول‌های بنیادی ۱- (Factor Stromal-Derived) ۱ 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 میوبلاست‌ها شود، مؤثر تر شوند (۹۸).

تاندون و رباط

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

ناتوانی آن در ادغام و دوباره‌زایی 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 استئوکلاست‌های 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 $\text{NF}\kappa\text{B}$ - Receptor Activator of Nfkb Ligand) صورت گرفت (۸۱). اثربخشی متعاقب با AAV حامل cDNA کد کننده BMP2 (۸۲) و گیرنده فعال اکتیوین نوع ۱ (۸۳) مشاهده شد. هیچ‌گونه 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 چرخه‌های متوالی از مراحل، از جمله دژنراسیون عضلانی، التهاب، رگ‌زایی، بازسازی و فیبروز قرار می‌گیرند (۸۴). اگرچه روش‌های زیستی برای بهبود درمان عضله اسکلتی مراحل مختلف فرآیند درمان را هدف قرار داده‌اند، اما امیدوارکننده‌ترین بخش نتایج در نوسازی عضلات و فیبروز صورت 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 بلاست‌های آلوده به آدنویروس تحویل شده است

سیتوکین‌ها و متالوپروتئینازهای مهار کننده بافت مشاهده کرد (۱۲۳). از آنجاکه دیسک مهره‌ها از نظر ایمنی جدا شده‌اند، بیان بلند مدت ترانس ژن را، حتی هنگام استفاده از وکتور با خاصیت بسیار آنتی ژنی مانند آدنووایروس می‌توان به دست آورد، اگرچه این حفاظت در دیسک‌های دژنره کاهش یافته است.

مینیسک

انتقال ژنی به مینیسک توسط چندین وکتور مختلف ویروسی (۱۲۴-۱۲۶) و غیر ویروسی (۱۲۷ و ۱۲۸) با روش‌های *in vivo* و *ex vivo* انجام پذیرفته است. در این روش ترانس ژن‌های کد کننده (۱۲۸) IGF-1، 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 مینیسک 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 مانده‌اند. برای مثال اطلاعاتی در مورد این که چه مقدار و در چه مرحله‌ای از درمان یک فاکتور رشد یا مورفوژن مورد نیاز می‌باشد. بیشتر تحقیقات، ژن‌ها را بلافاصله پس از جراحی و با هدف جایگزینی بهبود دهنده معرفی کرده و فرض می‌کنند که بیشتر بودن برتری می‌آورد. با توجه به زیست‌شناسی 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 فوق‌العاده‌ای حاصل می‌کند (۱۲۹). همچنین، اگرچه BMP-2 می‌تواند ساخت

مولد می‌شوند. نتایج جالبی در مدل‌های حیوانی ترمیم تاندون با استفاده از انتقال cDNA حاصل از کد کردن 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 سیستم‌ها 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 اسکلاکسیز (Scleraxis) باعث افزایش تمایز MSC‌ها به سلول‌های تاندون‌زا در *in vitro* شده (۱۰۸) و هنگامی که در *ex vivo* به همراه MSC‌ها 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، PDGF، IGF-1، TGF- β و VEGF را کدگذاری می‌کنند، استفاده کرده و به‌طور کلی تشکیل ماتریس، رگ‌زایی و تکثیر سلولی را تحریک می‌نمایند (۱۱۱-۱۱۴).

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 با کاهش التهاب بهبود می‌دهد (۱۱۸). استفاده از siRNA‌ها (Short RNA-interference) هم عنوان یک روش جلوگیری استخوان‌سازی نابه‌جا 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 مهره‌ها نیز تعمیم داد (۱۲۱) و اثبات آن را می‌توان در دژنراسیون دیسکی در مدل خرگوش با استفاده از آدنووایروس و وکتور AAV برای تحویل فاکتورهای رشد، آنتاگونیست

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 پاسخ‌های ایمنی همومورال 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 پیش‌بینی نشده را نشان داد که بیان ترانس ژن را محدود کرده است (۱۳۰). مطالعات بیشتر، ایمنی زایی‌های مختلف در سروتیپ‌های مختلف AAV در گونه‌های متفاوت را گزارش می‌دهد. یکی از مزیت‌های وکتورهای غیر ویروسی این است که بسیاری از آن‌ها ایمنی زایی کمی دارند (۱۳۱).

اگرچه منابع علمی نشانگر نمونه‌های متعددی از استفاده‌های موفقیت‌آمیز از ژن‌درمانی برای بازگرداندن بافت عضلانی آسیب‌دیده در حیوانات آزمایشگاهی کوچک هستند، فقط دو پروتکل در مطالعات بالینی بروز یافته‌اند. این پروتکل‌ها 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 استفاده‌های 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 تهدیدکننده حیات نیستند، انجام می‌شوند. مطالعات فارماکولوژی، سم‌شناسی و توزیع حیاتی که بدون شک نیازمند GLP (عملیات آزمایشگاهی صحیح) و امکانات و گران‌قیمت وقت گیر می‌باشند، بی‌شک 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، شرکت‌های بزرگ دارویی تمایلی به

استخوان‌راه‌بهدود دهد، دوزهای بالاتر آن تولید التهاب کرده و باعث بازجذب استخوان می‌شوند. یکی از مزایای انتقال ژنی در قدرت تنظیم کمی و موقت ژن است. با این حال تا زمانی که ما می‌دانیم 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 مقایسه‌ای 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 موفقیت‌آمیزی در درمان ضایعات استخوانی در اسب مورد استفاده قرار گرفتند (۶۳).

بسته به کاربرد، پاسخ‌های التهابی و ایمنی به وکتور ویروسی می‌تواند مشکل‌ساز 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 (قبلاً 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 برنامه‌های 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 ایمنی به سروتیپ ۵ آدنوویروس می‌باشند که پس از تحویل در داخل بدن، انتقال

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. Cucchiari, 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. Cucchiari 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. Cucchiari 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

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 کلیت، 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. همان‌طور که اشاره شد، یکی از پروتکل‌ها برای ترمیم غضروف مفصلی در کره (۳۲) و چهار آزمون مرتبط با OA در ایالات متحده 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

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 Ther*2013;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- β 1 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. Orved 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. *Cytherapy* 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-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-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*

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. Alaei, 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 Ther* 2008;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* 2002;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 fracture 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).

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. *Cytherapy* 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. *Am J 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- β 1, 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

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

125. Cucchiari 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, Cucchiari 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- β 1 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

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.

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