23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΣΠΟΝΔΥΛΙΟΥ ΔΙΣΚΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΣΠΟΝΔΥΛΟΔΕΣΙΑ ΤΗΣ ΟΣΦΥΪΚΗΣ ΜΟΙΡΑΣ ΤΗΣ ΣΣ

Α.Α. ΠΑΡΤΣΙΝΕΒΕΛΟΣ

Την τελευταία δεκαετία, η πρόοδος στη μοριακή βιολογία έδωσε τη δυνατότητα μεγαλύτερης κατανόησης των σπονδυλικών παθήσεων σε μικροσκοπικό επίπεδο. Έτσι σήμερα είναι εφικτό να εξετάσουμε σε μοριακό επίπεδο την έκφραση των γονιδίων σε διάφορα κύτταρα. Πολλές παθήσεις που αντιμετωπίζει συχνά ο χειρουργός σπονδυλικής στήλης (ΣΣ)[1], όπως η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου (ΜΔ)[2,3], φλεγμονώδεις σπονδυλαρθροπάθειες[4,5], αλλά και κακώσεις του νωτιαίου μυελού[6], μπορεί να είναι ευαίσθητες στη γονιδιακή θεραπεία.

Η γονιδιακή θεραπεία δεν αναφέρεται πλέον αυστηρά στη θεραπεία μιας πάθησης με την αντικατάσταση ενός παθολογικού γονιδίου με ένα λειτουργικό αντίγραφο. Αντίθετα, βασίζεται στη χρήση ενός νουκλεϊκού οξέος, είτε DNA είτε RNA, για τη θεραπεία αλλά και την πρόληψη μιας νόσου[6,7].

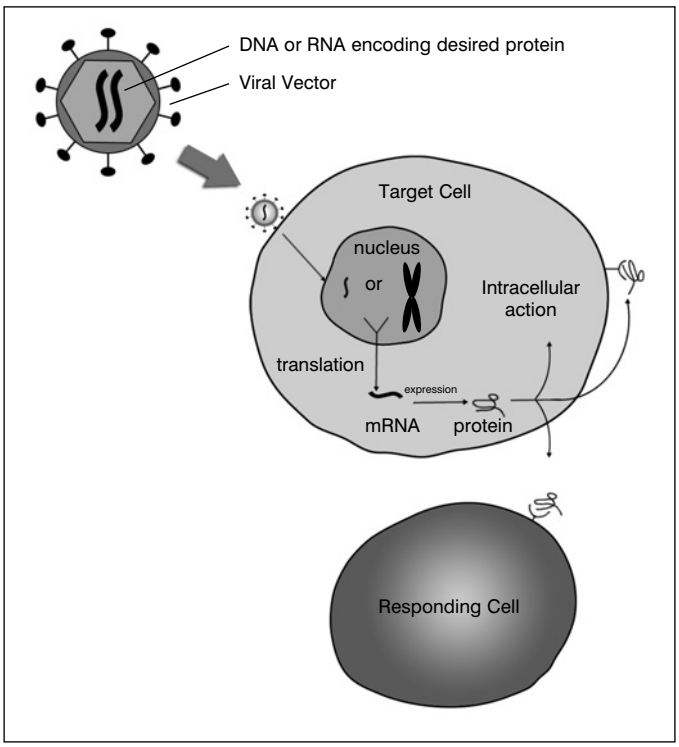
Αρχικά η γονιδιακή θεραπεία απευθυνόταν σε κληρονομικές παθήσεις που απειλούσαν την ανθρώπινη ζωή. Όμως πρόσφατη πρόοδος έχει επεκτείνει τις εφαρμογές της σε επίκτητες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων και παθήσεων του μυοσκελετικού συστήματος[8]. Πλήθος ερευνητών έχει αναφέρει επιτυχή γονιδιακή μεταφορά σε κύτταρα του μυοσκελετικού συστήματος, όπως στους μυς, τα οστά, τα χονδροκύτταρα, τους μηνίσκους, τον αρθρικό θύλακο, τους συνδέσμους, τους τένοντες και το μεσοσπονδύλιο δίσκο (ΜΔ). Τελευταία γίνονται κλινικές έρευνες για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

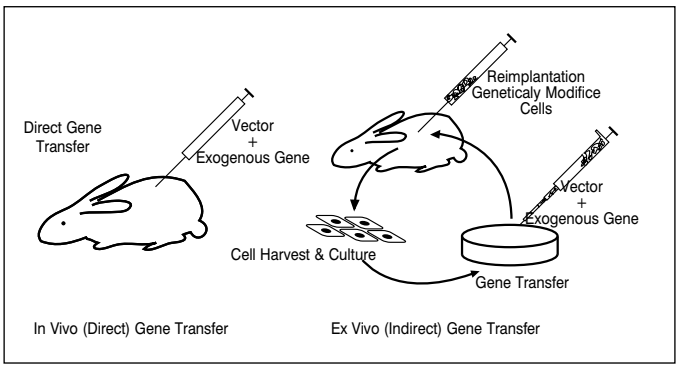
Το 1988 δόθηκε άδεια από τη Συμβουλευτική Επιτροπή Ανασυνδυασμένου DNA του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας για την πρώτη γονιδιακή μεταφορά σε άνθρωπο ενός γονιδίου δείκτη (που δεν αναμένεται να έχει θεραπευτική δράση αλλά αποτελεί ένδειξη επιτυχούς μεταφοράς). Ένα χρόνο αργότερα έγινε η πρώτη μεταφορά θεραπευτικού γονιδίου σε ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα για τη διόρθωση της γονιδιακής βλάβης της διαμινο-αδενοσίνης[9]. Το 1993 εγκρίθηκε το πρώτο πρωτόκολλο για εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας στο μυοσκελετικό σύστημα, που αφορούσε στη θεραπεία της νόσου του Gaucher. Ωστόσο, την πρώτη κλινική εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας σε μη θανατηφόρο νόσο του μυοσκελετικού αποτελεί η ρευματοειδής αρθρίτιδα[10].

ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Η διαδικασία της γονιδιακής μεταφοράς περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός νουκλεϊκού



Εικόνα 1. Στάδια γονιδιακής θεραπείας. Το DNA (ή RNA) που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο γονίδιο εισάγεται στο κύτταρο-στόχο μέσω ενός φορέα (π.χ. ιός). Το DNA εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και είτε παραμένει επισωματικό (ενδιάμεσος ξενιστής αδενοϊός) είτε ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα του κυττάρου ξενιστή (ενδιάμεσος ξενιστής ρετροϊός). Στη συνέχεια το DNA αντιγράφεται (transcription) και μεταφράζεται σε αγγελιαφόρο RNA (m-RNA) (translation). Το m-RNA κατευθύνει τις οδηγίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών (expression). Οι νέες πρωτεΐνες που συνθέτονται επιδρούν πάνω στο ίδιο το κύτταρο που τις παράγει ή προάγουν την ανταπόκριση από άλλα κύτταρα (π.χ. οστεοβλάστες).



Εικόνα 2. Στην in vivo γονιδιακή θεραπεία εισάγονται οι ενδιάμεσοι ξενιστές που περιέχουν το κατάλληλο γονίδιο κατευθείαν στο όργανο ή ιστό-στόχο. Η ex vivo θεραπεία απαιτεί την απομάκρυνση των κυττάρων-στόχων από τον οργανισμό, γενετική μετάλλαξή τους in vitro και επανεμφύτευση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων στο όργανο ή ιστό-στόχο.

οξέος σ' έναν πληθυσμό κυττάρων ή σ' έναν ιστό, με αποτέλεσμα τη μετάλλαξη του κυττάρου και τη μετάφραση ενός ιδιαίτερου γονιδίου. Η αλλαγή αυτή του γενετικού υλικού έχει ως συνέπεια την παραγωγή πρωτεϊνών που επηρεάζουν όχι μόνο το μεταβολισμό των συγκεκριμένου κυττάρου αλλά και των γειτονικών του, που δεν έχουν υποστεί γενετική αλλαγή (εικόνα 1)[11].

Οι μέθοδοι γονιδιακής θεραπείας διαφέρουν ανάλογα με το γονίδιο, το φορέα του γονιδίου (ενδιάμεσος ξενιστής), τα κύτταρα-στόχους στα οποία γίνεται η γονιδιακή μεταφορά, το χώρο στον οποίο συμβαίνει η διαδικασία της γονιδιακής μεταφοράς (καλλιέργεια του ιστού ή μέσα στον ξενιστή) (εικόνα 2)[12] και τον τρόπο χορήγησης (τμηματική ή συστηματική).

Διάρκεια και τόπος παραγωγής των πρωτεϊνών

Ανάλογα με τη νόσο, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί θεραπεία με βραχείας ή μακράς διάρκειας έκφραση των πρωτεϊνών.

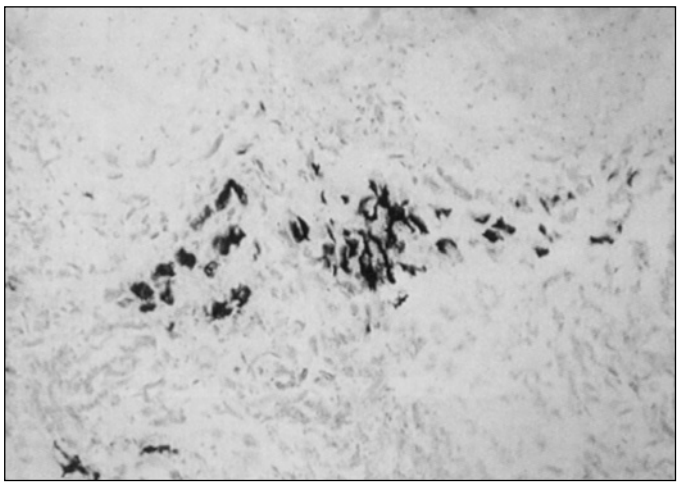
Σε θεραπεία μιας χρόνιας νόσου, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή η οστεοπόρωση, είναι πιθανότερο να απαιτηθεί μακράς διάρκειας έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου, για να είναι αποτελεσματική[8,13]. Αντίθετα, σε θεραπεία που αποσκοπεί σε σπονδυλοδεσία, μικρής διάρκειας πρωτεϊνική σύνθεση όχι μόνο είναι αποδεκτή, αλλά και επιθυμητή.

Ο φορέας του γονιδίου μπορεί να χορηγηθεί στον ξενιστή είτε τοπικά είτε συστηματικά. Στη συστηματική χορήγηση ο φορέας ή τα μεταφερόμενα κύτταρα ενίονται ενδοφλεβίως. Αν όμως μία μόνο ανατομική περιοχή ή οργανικό σύστημα υπόκειται σε γονιδιακή θεραπεία -όπως συμβαίνει στην περίπτωση της σπονδυλοδεσίας- τοπική γονιδιακή θεραπεία θα εξασφαλίσει ότι μονάχα τα κύτταρα που συμμετέχουν στην τοπική οστεοεπαγωγική διαδικασία θα υποστούν γενετική αλλαγή.

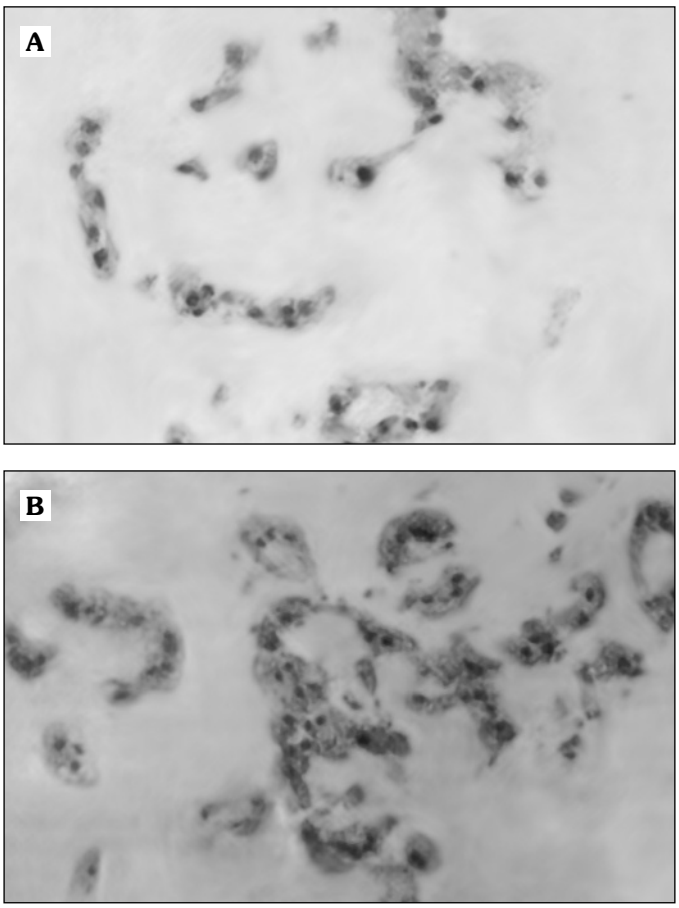
Ενδιάμεσοι ξενιστές

Η διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης αρχίζει με την εισαγωγή εξωγενούς DNA στο κύτταρο-στόχο, αποφυγή της ενζυμικής του διάσπασης από τα λυσοσωμάτια και είσοδο του DNA στον πυρήνα του κυττάρου, όπου αρχίζει η αντιγραφή του[14]. Το DNA είτε ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα του κυττάρου-στόχου είτε παραμένει εξωχρωμοσωματικό (επισωματικό).

Οι ενδιάμεσοι ξενιστές είναι οι παράγοντες εκείνοι που προάγουν την είσοδο και την έκφραση του DNA μέσα σ' ένα κύτταρο-στόχο. Η επιτυχία του ενδιάμεσου ξενιστή έγκειται στην ικανότητά του να οδηγεί το ενσωματωμένο γονίδιο μέσα στο κύτταρο-στόχο και να εμποδίζει ή να εξασθενίζει την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή προς



Εικόνα 3. Αντιπροσωπευτικό παρασκεύασμα ΜΔ κουνελιού με χρώση X-gal, 12 εβδομάδες μετά την έγχυση του Ad/LacZ in vivo. Η μπλε χρώση καταδεικνύει την παρουσία της β-γαλακτοσιδάσης (αρχική μεγέθυνση x 100).



Εικόνα 4. Ανοσοϊστοχημική χρώση για ανθρώπινη TGF-1 σε ΜΔ κουνελιών. Παρασκεύασμα πηκτοειδούς πυρήνα από: **Α.** Φυσιολογικό ΜΔ (ΜΔ ελέγχου). **Β.** ΜΔ 1 εβδομάδα μετά την έγχυση Ad/TGF-β1 (αρχική μεγέθυνση x 400). Διακρίνεται η εκτεταμένη και πυκνή χρώση των κυττάρων του πηκτοειδή πυρήνα με έγχυση του Ad/TGF-β1 σε σύγκριση με το ΜΔ ελέγχου.

το ξένο γενετικό υλικό[15]. Ο ιδανικός ενδιάμεσος ξενιστής θα πρέπει:

1. Να δεσμεύεται από συγκεκριμένα κύτταρα στόχους
2. Να εισάγεται σε πολλαπλασιαζόμενα και μη κύτταρα
3. Να επιτρέπει τη δυνατότητα ρύθμισης της διάρκειας και του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου
4. Να μην προκαλεί ανοσολογική και φλεγμονώδη αντίδραση, ούτε και να έχει καρκινογόνο δράση
5. Να έχει μικρό κόστος παραγωγής[6,15-17].

Ιδανικός ενδιάμεσος ξενιστής δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα, παρόλο που αρκετοί διαθέσιμοι πληρούν πολλά από αυτά τα κριτήρια.

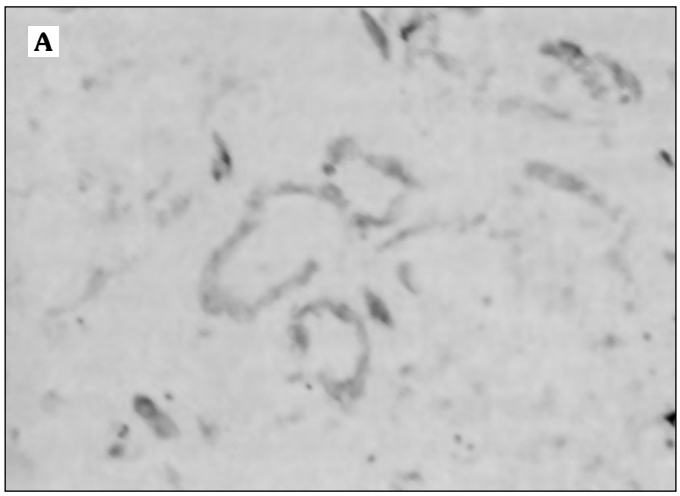
Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες ενδιάμεσων ξενιστών: οι ιικοί και οι μη ιικοί.

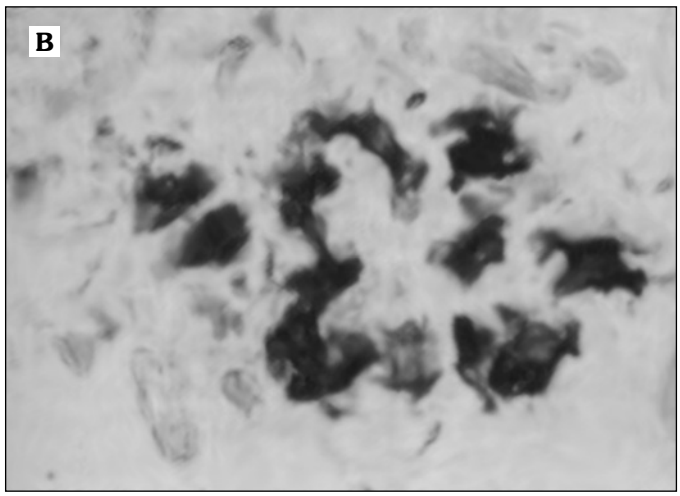
- Ιικοί

Ο ιός είναι αποτελεσματικός ενδιάμεσος ξενιστής, γιατί ο φυσιολογικός κύκλος της ζωής του περιλαμβάνει την είσοδό του στα κύτταρα του ξενιστή και την έκφραση των κωδικοποιημένων γονιδίων του. Πριν όμως ένας ιός χρησιμοποιηθεί ως ενδιάμεσος ξενιστής, απομακρύνεται τμήμα του γονιδιώματός του για να αποφευχθεί η αντιγραφή του, αλλά και για να δημιουργηθεί χώρος για την εισαγωγή του θεραπευτικού DNA.

Διάφοροι τύποι ιών έχουν τροποποιηθεί στο εργαστήριο για να βρουν εφαρμογές στη γονιδιακή θεραπεία. Αυτοί περιλαμβάνουν ρετροϊούς, αδενοϊούς, τον ιό του απλού έρπητα και ιούς που συνδέονται με τους αδενοϊούς. Οι τελευταίοι και οι ρετροϊοί είναι δύο τύποι ιών που ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό στο DNA των κυττάρων ξενιστών. Τα πλεονεκτήματα των ρετροϊών είναι η σταθερή ενσωμάτωσή τους στο DNA του ξενιστή και η γονιδιακή έκφραση καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου. Στα μειονεκτήματά τους συγκαταλέγονται η ενσωμάτωσή τους μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα, η δυνατότητα παραγωγής μόνο σχετικά αραιών διαλυμάτων ιού, ενώ ενδέχεται να συμβεί μετάλλαξη από τυχαία τοποθέτησή τους στο γονιδίωμα του ξενιστή. Οι ιοί αυτοί είναι κατάλληλοι για ex vivo γενετική μετάλλαξη, ώστε τα απομονωμένα κύτταρα του ξενιστή να πολλαπλασιαστούν πριν την εισαγωγή τους στους ιστούς του ξενιστή.

Οι ιοί που συνδέονται με αδενοϊούς είναι μικροί DNA ιοί που ανήκουν στην οικογένεια των παρβοϊών. Πλεονεκτούν έναντι των ρετροϊών στο ότι δεν είναι δυνητικά παθογόνοι και προσβάλλουν μη διαιρούμενα κύτταρα. Επιπλέον, το DNA τους εισέρχεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή σε μια απλή και συγκεκριμένη θέση, που





Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικά παρασκευάσματα από ΜΔ κουνελιών, μετά από χρώση X-gal, 12 εβδομάδες μετά την in vivo έγχυση: Α) Φυσιολογικού ορού. Β) AD/CMV-LacZ (αρχική μεγέθυνση x 400). Η μπλε χρώση καταδεικνύει την παρουσία της β-γαλακτοσιδάσης (προϊόν του LacZ γονιδίου), αποτελώντας ένδειξη επιτυχούς γονιδιακής μεταφοράς και μακροπρόθεσμης γονιδιακής έκφρασης σε αυτό το in vivo πειραματικό μοντέλο.

βρίσκεται στην κορυφή του ανθρώπινου χρωμοσώματος 19[18]. Ωστόσο ο ανασυνδυασμένος ιός φαίνεται να χάνει την ικανότητά του για ενσωμάτωση σε ειδική θέση.

Ιοί όπως ο αδενοϊός και ο ιός του απλού έρπητα (HSV) δεν ενσωματώνονται στα χρωμοσώματα του ξενιστή. Έτσι δεν αλλάζουν το γονότυπο του κυττάρου και δεν περνούν στα θυγατρικά κύτταρα. Σε αντίθεση με τους ρετροϊούς, οι αδενοϊοί μπορούν να προσβάλλουν πολλαπλασιαζόμενα αλλά και μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τόσο in vivo όσο και in vitro, και μπορούν να παραχθούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η επισωμιακή θέση του εισαγόμενου DNA και η φλεγμονώδης αντίδραση στις ιικές πρωτεΐνες περιορίζει τη διάρκεια της γονιδιακής έκφρασης στις περισσότερες περιπτώσεις από ημέρες μέχρι εβδομάδες[6,15,19,20,21]. Επίσης σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί η πρόκληση σοβαρής ανοσολογικής αντίδρασης[22]. Πρόσφατα έχουν περιγραφεί δεύτερης γενιάς αδενοϊοί-ενδιάμεσοι ξενιστές, στους οποίους έχουν απομακρυνθεί όλες οι γονιδιακές ακολουθίες σύνθεσης ιικών πρωτεϊνών[23-25]. Πρόκειται για ενδιάμεσους ξενιστές με μικρότερη ανοσολογική αντίδραση και σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα ενσωμάτωσης γονιδίων, επιτρέποντας έτσι εισαγωγή και περισσότερων γονιδίων.

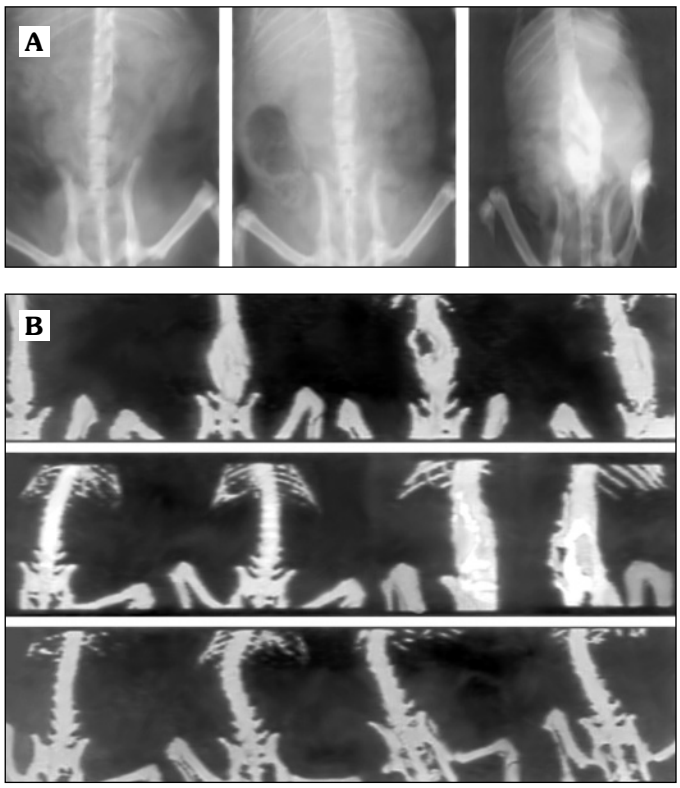
- Μη ιικοί

Μη ιικοί ενδιάμεσοι ξενιστές παρασκευάζονται συνήθως ευκολότερα και συχνά έχουν μεγαλύτερη χημική σταθερότητα από τους ιούς[8]. Προάγουν, όπως και οι ιικοί ενδιάμεσοι ξενιστές, την είσοδο του DNA στα κύτταρα του ξενιστή, προκαλούν μικρότερη ανοσολογική αντίδραση, αλλά έχουν μικρότερη αποτελεσματικότητα στη γονιδιακή έκφραση από τους ιούς. Όλοι οι γνωστοί μη ιικοί ενδιάμεσοι ξενιστές ενσωματώνουν το DNA επισωματικά, με αποτέλεσμα βραχύτερης διάρκειας γονιδιακή έκφραση. Παραδείγματα τέτοιων φορέων αποτελούν τα λιποσωμάτια και τα σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών. Τα τελευταία έχουν την ικανότητα στόχευσης συγκεκριμένων κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου[26]. Η κυτταρική πρόσληψη DNA που δε συνδέεται με κάποιο φορέα (naked DNA) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να προάγει την οστεογένεση, καθώς πρόκειται για μια σχετικά εύκολη και ασφαλή διαδικασία[26]. Τυπικά, απομονωμένο DNA εισάγεται στα κύτταρα στόχους μετά την ενσωμάτωσή του σ' ένα πλασμίδιο, που είναι ένα κυκλικό εξωχρωματοσωμικό τμήμα DNA βακτηριακής προέλευσης. Ωστόσο, η χρήση του απομονωμένου DNA στη γονιδιακή θεραπεία είναι σημαντικά περιορισμένη λόγω της ικανότητάς του να προσβάλλει λίγους κυτταρικούς τύπους[27-29]. Τέλος, το γονιδιακό όπλο αποτελεί μια άλλη μέθοδο γονιδιακής μεταφοράς που πραγματοποιείται χωρίς ενδιάμεσο ξενιστή κάποιον ιό. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, μικρά σωματίδια επικαλυμμένα με cDNA προωθούνται μέσα σε ιστό ή κύτταρα[39] και έχει αναφερθεί υψηλή δυνατότητα γονιδιακής μεταφοράς. Παρόλα αυτά, η χρήση του είναι περιορισμένη, επειδή δύναται να προξενήσει ιστική βλάβη, αλλά και λόγω μικρής διεισδυτικότητας στους ιστούς.

Μεταφορείς

Αποτελούν, όπως και οι ενδιάμεσοι ξενιστές, μέσα μεταφοράς. Στην in vivo γονιδιακή θεραπεία ο μεταφορέας άγει τον ενδιάμεσο ξενιστή στην κατάλληλη ανατομική θέση. Αν πρόκειται για ex vivo θεραπεία, ο μεταφορέας

Εικόνα 6. Γονιδιακή θεραπεία που προάγει σπονδυλοδεσία σε πειραματικό μοντέλο (κουνέλι). Διακρίνεται μεσεγκάρσια σπονδυλοδεσία στο Ο4-Ο5, 4 εβδομάδες μετά την εμφύτευση μεταλλαγμένων γενετικά κυττάρων του μυελού, ικανών να παράγουν BMP-2.



Εικόνα 7. Α) AP ακτινογραφία της ΟΜΣΣ 6 εβδομάδες μετά το χειρουργείο σε ζώα που έλαβαν Matrigel (μεταφορέας) μόνο (αριστερή ακτινογραφία), Matrigel και διάφορα μεσεγχυματικά κύτταρα (μεσαία ακτινογραφία) ή Matrigel και D1-BAG (κλωνοποιημένα πρόδρομα οστεογενετικά κύτταρα) (δεξιά ακτινογραφία). Β) Οστική μάζα ενδεικτική σπονδυλοδεσίας είναι εμφανής μόνο στα ζώα που έλαβαν D1-BAG κύτταρα.

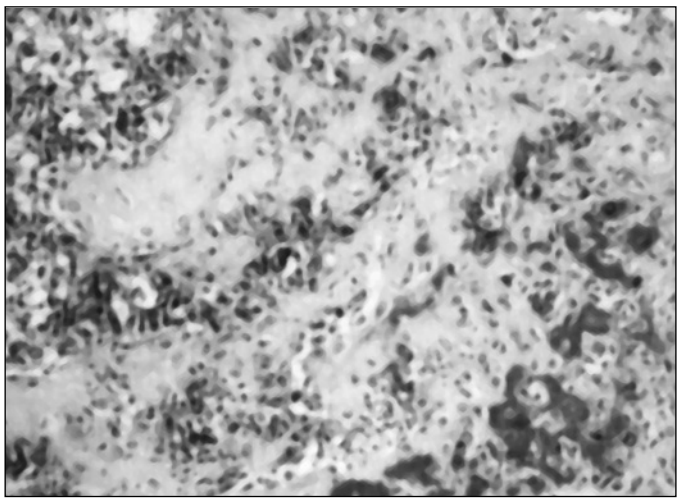
διανέμει στην ανατομική τους θέση τα κύτταρα που υπέστησαν γενετική μετατροπή στην καλλιέργεια του ιστού. Οι μεταφορείς επιτελούν δύο βασικές λειτουργίες:

1. Περιορίζουν το ρυθμό διάχυσης του ενδιάμεσου ξενιστή ή των κυττάρων από την επιθυμητή θέση.
2. Ενισχύουν την οστεοεπαγωγική δραστηριότητα του ενδιάμεσου ξενιστή ή των κυττάρων.

Οι μεταφορείς μπορεί να είναι οστεοεπαγωγικοί ή οστεοκαθοδηγητικοί και βιολογικοί ή συνθετικοί. Παραδείγματα συνθετικών οστεοκαθοδηγητικών μεταφορέων αποτελούν τα κεραμικά, τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου, σπόγγοι κολλαγόνου και πολυμερή πολυγαλακτικού και πολυγλυκολικού οξέος. Οι συνθετικοί μεταφορείς μπορούν να μιμηθούν το φυσιολογικό βιολογικό περιβάλλον του οστού ή είναι ταχέως βιοαπορροφήσιμοι[30]. Σημαντικά υποσχόμενες μελέτες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με ειδικές μήτρες από πολυμερές υλικό, πάνω στις οποίες παγιδεύονται γονίδια με οστεογενετική δράση[31].

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΣΠΟΝΔΥΛΙΟΥ ΔΙΣΚΟΥ

Η εκφύλιση του ΜΔ μπορεί να συμβεί φυσιολογικά με την πάροδο του χρόνου[32] και περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των ινών του ινώδους δακτυλίου, με ταυτόχρονη αφυδάτωση του πυρήνα, αποδόμηση των πρωτεογλυκανών και διαρροή τους έξω από τον πηκτοειδή πυρήνα διαμέσου του ινώδους δακτυλίου[33]. Η αυξημένη ωσμωτική πίεση μέσα στον πηκτοειδή πυρήνα από την υψηλή συγκέντρωση των πρωτεογλυκανών έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του ύψους του ΜΔ και συνεισφέρει στην ικανότητά του να δέχεται φορτία. Έτσι η μείωση των πρωτεογλυκανών έχει ως συνέπεια την ελάττωση του ύψους του ΜΔ, ελάττωση του μεσοσπονδύλιου διαστήματος και



Εικόνα 8. Νεοσχηματιζόμενο οστό.

οστική αντίδραση των τελικών πλακών, με ταυτόχρονη χαλάρωση των συνδέσμων[34]. Η αστάθεια της σπονδυλικής μονάδας που προκαλείται είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση οσφυαλγίας. Επίσης, από κλινικές παρατηρήσεις έχει βρεθεί συσχέτιση της διάσπασης του ινώδους δακτυλίου των ΜΔ γειτονικά μιας εκτεταμένης σπονδυλοδεσίας και της εκφύλισης του ΜΔ.

In vivo μελέτες την τελευταία δεκαετία έχουν αποδείξει ότι οι αυξητικοί παράγοντες ενδείκνυνται μελλοντικά για πολλές κλινικές εφαρμογές στην ορθοπαιδική χειρουργική[35,36]. Πολλές από τις αρχικές έρευνες σχετικά με τη θεραπεία της εκφύλισης του ΜΔ περιελάμβαναν τη χρήση των αυξητικών παραγόντων.

Η μελέτη του ινώδους δακτυλίου του ΜΔ σε κουνέλια μετά από προσθήκη του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα IL-1[37] έδειξε μια αύξηση στην in vitro σύνθεση των πρωτεογλυκανών, που σημαίνει ότι ο παράγοντας αυτός μπορεί να είναι χρήσιμος στη θεραπεία της εκφύλισης του ΜΔ. Επίσης, ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκε να έχει η εισαγωγή του παράγοντα TGF-β1 σε κύτταρα ΜΔ σκύλου[38], αλλά και του IGF-1 σε κύτταρα ΜΔ βοδιού in vitro[39].

Ωστόσο η χρησιμοποίηση αυτών των παραγόντων παρουσιάζει ένα βασικό μειονέκτημα: οι παράγοντες αυτοί έχουν χαρακτηριστικά μικρή διάρκεια δράσης. Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση που ξεπερνά τα μικρής διάρκειας αποτελέσματα μετά από εξωγενή έγχυση αναπτυξιακών παραγόντων, ενώ διατηρεί πολλές από τις ευεργετικές ιδιότητες αυτών. Στόχος της είναι η θεραπεία ή η αποφυγή της εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου μέσα από τη γενετική τροποποίηση των κυττάρων του ΜΔ, που οδηγεί σε αύξηση ή διατήρηση της ποσότητας των πρωτεογλυκανών μέσα στον πηκτοειδή πυρήνα[40].

Γονιδιακή μεταφορά ενός γονιδίου δείκτη στο ΜΔ με ενδιάμεσο ξενιστή αδενοϊό

In vivo και in vitro μελέτη σε κουνέλια πραγματοποιήθηκε για να διερευνηθεί η δυνατότητα γονιδιακής μεταφοράς στο ΜΔ με ενδιάμεσο ξενιστή αδενοϊό. Το γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η βακτηριδιακή β-γαλακτοσιδάση (LacZ). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης, που ανιχνεύεται με χρώση X-gal και έτσι αποτελεί ποσοτικό δείκτη της γονιδιακής μεταφοράς και πρωτεϊνικής έκφρασης.

Στην in vitro μελέτη καλλιέργειες κυττάρων από πηκτοειδή πυρήνα λευκών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας υπέστησαν μετάλλαξη με το γονίδιο LacZ, συνδεδεμένο με τον αδενοϊό (Ad/LacZ). Στην in vivo μελέτη έγινε χειρουργική διάνοιξη του πρόσθιου τμήματος των ΜΔ των κουνελιών και κατόπιν αλατούχο διάλυμα του Ad/LacZ ενέθηκε στον πηκτοειδή πυρήνα. Ίση ποσότητα καθαρού διαλύματος ενέθηκε σε δίσκους ελέγχου. Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του μεταφερόμενου γονιδίου έγινε με χρώση X-gal (εικόνα 3). Η in vivo τοποθέτηση του γονιδίου μέσα στον πηκτοειδή πυρήνα οδήγησε στη μετάλλαξη αξιόλογου αριθμού κυττάρων. Η γονιδιακή έκφραση συνεχίστηκε με αμείωτο ρυθμό για τουλάχιστον 12 εβδομάδες. Στους δίσκους ελέγχου δεν ανιχνεύθηκε χρώση X-gal[2].

Η επιτυχής και μεγάλης διάρκειας γονιδιακή έκφραση των κυττάρων του ΜΔ με τη χρησιμοποίηση ενός γονιδίου-δείκτη δηλώνει ότι οι αδενοϊοί ως ενδιάμεσοι ξενιστές αποτελούν ένα κατάλληλο μεταφορικό σύστημα για τη γονιδιακή μεταφορά θεραπευτικών γονιδίων, με σκοπό τη θεραπεία σπονδυλικών παθήσεων.

Μεταφορά ενος θεραπευτικού γονιδίου στο ΜΔ με ενδιάμεσο ξενιστή αδενοϊό

Οι Nishida και συν. σε μια νέα in vivo μελέτη πέτυχαν μεταφορά θεραπευτικού γονιδίου σε λευκά κουνέλια Ν. Ζηλανδίας[11]. Ο ενδιάμεσος ξενιστής ήταν αδενοϊός που περιείχε το γονίδιο για την ανθρώπινη TGF-β1 (Ad/TGF-β1). Η επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου έγινε λόγω του μεγάλου εύρους των θεραπευτικών του δράσεων, που περιλαμβάνουν και τη δυνατότητά του να προάγει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών σε καλλιέργειες κυττάρων από ΜΔ σκύλων[38]. Η διαδικασία περιελάμβανε την έγχυση αλατούχου διαλύματος, που περιείχε ή όχι το Ad/TGF-β1, στον πηκτοειδή πυρήνα των ΜΔ της ΟΜΣΣ. Η γονιδιακή έκφραση του TGF-β1 γονιδίου καθορίστηκε με ELISA και η σύνθεση της πρωτεογλυκάνης προσδιορίστηκε με την επίδραση θειικού οξέος. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για τη μέτρηση της παραγωγής της TGF-β1 (εικόνες 4, 5).

Το συνολικό παραγόμενο ποσό της TGF-β1 (ενεργό

και λανθάνον) παρουσίασε αύξηση περίπου κατά 6 φορές. Η αύξηση στη σύνθεση των πρωτεογλυκανών ήταν 2 φορές μεγαλύτερη στην ομάδα των ΜΔ με το θεραπευτικό γονίδιο σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου[11]. Η αύξηση αυτή θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει μια συνολική αύξηση στην παραγωγή της θεμέλιας ουσίας του ΜΔ.

Το παραπάνω πείραμα αποδεικνύει τη δυνατότητα μεταφοράς in vivo ενός εξωγενούς θεραπευτικού γονιδίου στο ΜΔ με ενδιάμεσο ξενιστή έναν αδενοϊό και την επακόλουθη παραγωγή θεραπευτικών αυξητικών παραγόντων. Η αύξηση στην παραγωγή της TGF-β1 σε συνδυασμό με την αυξημένη σύνθεση πρωτεογλυκάνης καθιστά τη γονιδιακή θεραπεία κατάλληλη θεραπευτική μέθοδο για την αντιμετώπιση σπονδυλικών παθήσεων, όπως η εκφύλιση του ΜΔ.

Γονιδιακή μεταφορά στην τελική πλάκα με ενδιάμεσο ξενιστή ρετροϊό

In vitro μελέτη πραγματοποιήθηκε για τη μεταφορά 2 εξωγενών γονιδίων σε καλλιέργεια χονδροκυττάρων από τις τελικές πλάκες ΜΔ βοδιού[3]. Ως ενδιάμεσος ξενιστής χρησιμοποιήθηκε ρετροϊός, ενώ τα εν λόγω γονίδια ήταν τα LacZ και IL-1Ra. Η δραστηριότητα του LacZ καθορίστηκε με χρώση X-gal και τα επίπεδα του IL-1Ra προσδιορίστηκαν με ELISA. Η μεταφορά του LacZ οδήγησε σε περίπου 1% LacZ-θετικά κύτταρα, ενώ του IL-1Ra σε παραγωγή 24ng/mL/10^6 κυττάρων της IL-1Ra σε 48h. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι εφικτή η αφαίρεση ιστού από την τελική πλάκα εκφυλισμένου ΜΔ (είτε αρθροσκοπικά είτε με φθοριοσκοπικό έλεγχο) και η ex vivo μετάλλαξη των κυττάρων αυτών με θεραπευτικά γονίδια, που στη συνέχεια ενίενται πάλι μέσα στο ΜΔ. Με τη διαδικασία αυτή τα κύτταρα του ξενιστή είναι δυνατό να συνθέτουν θεραπευτικές πρωτεΐνες ή ακόμη και φάρμακα. Η τεχνολογική αυτή μέθοδος θα μπορούσε να δημιουργήσει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση των εκφυλιστικών παθήσεων της ΣΣ.

Γονιδιακή μεταφορά στα κύτταρα του ΜΔ με τη χρήση γονιδιακού οπλου

Η γονιδιακή μεταφορά με μη ιικούς ενδιάμεσους ξενιστές σε λίγες περιπτώσεις είχε επιτυχία. Πρόσφατα όμως έγινε επιτυχώς γονιδιακή μεταφορά με τη χρήση του γονιδιακού όπλου.

Σε μελέτη των Chang και συν. απομονώθηκαν κύτταρα από τον ινώδη δακτύλιο και τον πηκτοειδή πυρήνα ΜΔ από λευκά κουνέλια N. Ζηλανδίας[41]. Μετά την καθίζηση του γονιδίου LacZ πάνω σε σωματίδια επικαλυμμένα με DNA, τα σωματίδια αυτά, με τη χρήση του γονιδιακού όπλου, προωθήθηκαν από μικρή απόσταση σε μονοστρωματική καλλιέργεια κυττάρων ΜΔ. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, η ικανότητα μετάλλαξης βρέθηκε να είναι περίπου 10% μετά από μέτρηση με χρώση X-gal και απλή καταμέτρηση. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε αύξηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής σύνθεσης για περίοδο μεγαλύτερη από 3 εβδομάδες. Η μελέτη αυτή δείχνει ότι η γονιδιακή μεταφορά με γονιδιακό όπλο μπορεί να βρει εφαρμογή στην ανακατασκευή ή και επιδιόρθωση του μυοσκελετικού ιστού σε ένα ευρύ φάσμα ορθοπαιδικών παθήσεων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΓΙΑ ΣΠΟΝΔΥΛΟΔΕΣΙΑ

Η σπονδυλοδεσία ακόμη και σήμερα παραμένει συχνά ανεπιτυχής χειρουργική επέμβαση[42]. Σε 40% των ασθενών που υποβάλλονται σε σπονδυλοδεσία παρουσιάζεται ψευδάρθρωση ή αδυναμία σχηματισμού μιας συνεχούς οστικής γέφυρας. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες σε πειραματόζωα, που πέτυχαν σπονδυλοδεσία με εντελώς διαφορετικές μεθόδους γονιδιακής θεραπείας[43,44]. Συγκριτικές μελέτες και κλινικές δοκιμές σε άνθρωπο δεν είναι ακόμα διαθέσιμες, αλλά πριν την πραγματοποίησή τους είναι αναγκαία η ταυτοποίηση των καταλληλότερων γονιδίων και των ασφαλέστερων μεθόδων γονιδιακής θεραπείας για την παραγωγή νέου οστού[45].

Ex vivo θεραπεία

Ex vivo τμηματική γονιδιακή θεραπεία πραγματοποιήθηκε για να προάγει τη σπονδυλοδεσία σε κουνέλια. Μετά από αφαίρεση μυελού των οστών από κουνέλια και καλλιέργεια των κυττάρων του, τα κύτταρα αυτά προσβλήθηκαν από αδενοϊό που περιείχε το γονίδιο για τον αναπτυξιακό παράγοντα BMP-2. Τα παραγόμενα κύτταρα που συνέθεταν BMP-2 εμφυτεύθηκαν στη συνέχεια με ένα μεταφορέα (ανενεργό DBM) σε ΣΣ κουνελιών μεταξύ των ακανθωδών αποφύσεων του O4 και O5 σπονδύλου[46]. Ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν:

1) κύτταρα από την αποφλοίωση,
2) DBM,
3) κύτταρα που μεταλλάχθηκαν από μη οστεοεπαγωγικό γονίδιο,
4) αυτομόσχευμα από τη λαγόνιο ακρολοφία,
5) ανασυνδυασμένη BMP-2 πρωτεΐνη και
6) κύτταρα του μυελού των οστών με DPM.

Η εμφύτευση των κυττάρων του μυελού που συνέθεταν BMP-2 οδήγησε σε σπονδυλοδεσία σε όλες τις περιπτώσεις (10/10) (εικόνα 6). Επιτυχής σπονδυλοδεσία συνέβη επίσης στις ΣΣ που έλαβαν ανασυνδυασμένη

BMP-2. Βέβαια αξίζει να σημειωθεί ότι από διάφορες μελέτες φαίνεται να υπάρχει ποσοτική αλλά και ποιοτική υπεροχή στο νεοσχηματιζόμενο οστό με γονιδιακή θεραπεία, σε σύγκριση με αυτό που σχηματίζεται από ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη[47]. Στις υπόλοιπες ομάδες δεν επιτεύχθηκε σπονδυλοδεσία σε 8 εβδομάδες.

Οι Viggeswarapu και συν. σε μια άλλη μελέτη πραγματοποίησαν γονιδιακή μεταφορά, με ενδιάμεσο ξενιστή αδενοϊό, πλασμιδίου του DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LMP-1 (LIM mineralization protein-1)[48]. Η μελέτη έγινε ex vivo σε καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών κουνελιού. Επίσης καθορίστηκε η κατάλληλη δόση χορήγησης του αδενοϊού που έφερε το πλασμίδιο και το χρονικό διάστημα προσβολής των κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να παίζει ρόλο κλειδί στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και στην οστεοεπαγωγική διαδικασία σύνθεσης διαφόρων οστικών αναπτυξιακών παραγόντων[49]. Αντίθετα με άλλες οστεοεπαγωγικές πρωτεΐνες, η LMP-1 φαίνεται να δρα ενδοκυτταρικά προάγοντας την έκφραση άλλων γονιδίων ή ομάδων γονιδίων. Η δυνατότητα προαγωγής της σύνθεσης μιας πρωτεΐνης που δρα ενδοκυτταρικά και προάγει την έκφραση άλλων γονιδίων είναι πολύ σημαντική και επιτυγχάνεται μόνο με τη γονιδιακή θεραπεία.

Οι δύο παραπάνω μελέτες επιτυγχάνουν σπονδυλοδεσία παρά τη χρήση διαφορετικών φορέων και γονιδίων. Αυτό δείχνει ότι δεν ενδείκνυται μια συγκεκριμένη θεραπεία για τη σπονδυλοδεσία, αλλά αυτή διαφοροποιείται ανάλογα με τον ασθενή και τις απαιτήσεις της δέκτριας περιοχής. Έτσι, διαφορετική θα είναι η μέθοδος γονιδιακής θεραπείας σε ασθενή καπνιστή για να επιτευχθεί πρώιμη σπονδυλοδεσία, απ' ό,τι στην περίπτωση μιας ψευδάρθρωσης.

Άλλες παραλλαγές στη γονιδιακή θεραπεία είναι η χρησιμοποίηση ρετροϊών ως ενδιάμεσων ξενιστών ή η γονιδιακή θεραπεία με εναλλακτικές BMPs[50]. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες, αλλά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί προς το παρόν για επίτευξη σπονδυλοδεσίας. Εξάλλου, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται σήμερα στην έρευνα για συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας με θεραπεία με αρχέγονα κύτταρα.

Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι μεσεγχυματικά κύτταρα που τροποποιούνται γενετικά διατηρούν την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε οστεογενετικά κύτταρα, ενώ διατηρούν την έκφραση των γονιδίων-δεικτών και μετά τη διαφοροποίησή τους[51]. Οι Lieberman και συν. έδειξαν ότι με in vitro γονιδιακή θεραπεία σε κουνέλια με ενδιάμεσο ξενιστή αδενοϊό, είναι δυνατή η παραγωγή μεταλλαγμένων στρωματικών κυττάρων του μυελού που παράγουν BMP-2 σε ικανή ποσότητα για την αναπλήρωση οστικού ελλείμματος από μηριαίο[47].

Σε μια άλλη μελέτη κλωνοποιημένα πρόδρομα οστεογενετικά κύτταρα (D1-BAG), τα οποία υπέστησαν μετάλλαξη με το γονίδιο LacZ και το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη, αλλά και ανάμικτα κύτταρα του στρώματος του μυελού, χρησιμοποιήθηκαν για να προάγουν σπονδυλοδεσία σε κουνέλια. Έξι και εννέα εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση και εμφύτευσή τους στην ΟΜΣΣ (εικόνες 7, 8), παρατηρήθηκε επιτυχής σπονδυλοδεσία σε ποσοστό 100% στα D1-BAG και 50% στα στρωματικά κύτταρα. Στα πειραματόζωα ελέγχου, στα οποία έγινε εμφύτευση μόνο του μεταφορέα Matrigel, δε συνέβη σπονδυλοδεσία[52].

Εξάλλου σημαντική είναι η πρόοδος της γονιδιακής θεραπείας σχετικά με τη δυνατότητα καθορισμού του χρόνου, της ποσότητας και του τόπου πρωτεϊνικής έκφρασης. Σε μια ex vivo μελέτη αναφέρεται μετάλλαξη ενός ετερογενούς πληθυσμού κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια εμφυτεύονται στον ξενιστή με ενδοφλέβια έγχυση. Χάρη στη σύνδεση του θεραπευτικού γονιδίου με συγκεκριμένη ουσία (οστεοκαλσίνη), η γονιδιακή έκφραση συντελείται μόνο στον οστίτη ιστό. Αν και διάφοροι τύποι κυττάρων προσβάλλονται, μόνο κύτταρα της οστεογενετικής σειράς (αυτά που παράγουν οστεοκαλσίνη), εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο[53].

In vivo γονιδιακή θεραπεία

Μια εναλλακτική μέθοδος γονιδιακής θεραπείας είναι η άμεση έγχυση ενδιάμεσων ξενιστών, είτε πρόκειται για ιό είτε όχι, στην περιοχή που επιθυμούμε τη σπονδυλοδεσία. Έτσι, η υποδόρια έγχυση αδενοϊού που περιείχε το γονίδιο BMP-2 σε κουνέλια οδήγησε με επιτυχία στο σχηματισμό οστού παρασπονδυλικά.

Ο τακτικός έλεγχος με αξονική τομογραφία έδειξε την αυξανόμενη έκτοπη οστεοποίηση παρακείμενα των ακανθωδών αποφύσεων και του σπονδυλικού τόξου, σε όλες τις περιοχές έγχυσης. Αντίθετα, στην ομάδα πειραματόζωων ελέγχου, στα οποία έγινε έγχυση αδενοϊού που περιείχε ένα γονίδιο δείκτη (β-γαλακτοσιδάση), δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός έκτοπου οστίτη ιστού παρασπονδυλικά[54].

Η in vivo γονιδιακή θεραπεία με μη ιικούς φορείς δεν έχει κατορθώσει έως σήμερα να επιτύχει σπονδυλοδεσία. Ωστόσο πολλές είναι οι μελέτες με υποσχόμενα αποτελέσματα στη θεραπεία αναπλήρωσης οστικών ελλειμμάτων των μακρών οστών ζώων[55].

Σύμφωνα με μια τέτοια μελέτη, εμφύτευση του GAM (gene activated matrix) χρησιμοποιήθηκε για την αναπλήρωση οστικών ελλειμμάτων από το μηριαίο οστό σε κουνέλια[26]. Το GAM είναι ένα τρισδιάστατο δομικό υλικό, στο οποίο συγκρατείται το πλασμίδιο DNA μέχρι να μεταναστεύσουν ινοβλάστες και να υποστούν μετάλλαξη. Στην παρούσα μελέτη το GAM αποτελείται από σπόγγο κολλαγόνου που περιέχει πλασμίδιο DNA για την παρα-

θυρεοειδική ορμόνη (PTH 1-34) και/ή BMP-4. Η απλότητα της μεθόδου επέτρεψε τη δοκιμασία εμφύτευσης ενός δεύτερου γονιδίου για να διαπιστωθεί αν θα υπάρξει συνέργεια. Η θεραπεία οστικών ελλειμμάτων με 1 πλασμίδιο-GAM επέφερε οστική γεφύρωση σε διάστημα 9 εβδομάδων, ενώ με τη χρησιμοποίηση 2 πλασμιδίων-GAM οστική γέφυρα σχηματίστηκε σε 4 εβδομάδες.

Οι Bonadio και συν., εφαρμόζοντας την ίδια in vivo τεχνική με τη χρησιμοποίηση του GAM , πραγματοποίησαν 3 πειράματα σε σκύλο για τη διερεύνηση της ικανότητας μετάλλαξης, της διάρκειας της γονιδιακής έκφρασης, αλλά και της δόσης ανταπόκρισης[31]. Έτσι βρέθηκε ότι σε 30-50% όλων των κυττάρων στην περιοχή του ελλείμματος πραγματοποιήθηκε γονιδιακή μεταφορά με αυτή την τεχνική. Τα περισσότερα κύτταρα που υπέστησαν μετάλλαξη ήταν ινοβλάστες, το δε πλασμίδιο DNA και το συμπληρωματικό του RNA ανευρίσκονταν στην περιοχή του οστικού ελλείμματος για τουλάχιστον 6 εβδομάδες. Σχετικά με τη δόση ανταπόκρισης, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του πλασμιδίου DNA, τόσο μεγαλύτερη η οστική αναπλήρωση.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στην in vivo γονιδιακή θεραπεία απαιτείται η χρησιμοποίηση ανοσοκατεσταλμένων ζώων[56]. Αν ο ξενιστής είναι ανοσοενεργός ελλοχεύει ο κίνδυνος σοβαρής ανοσολογικής αντίδρασης[54], η οποία εξασθενίζει ή και σταματά την οστεοεπαγωγή[4,54]. Εξάλλου η προσεκτική εφαρμογή μιας in vivo γονιδιακής θεραπείας επισημαίνεται και από το γεγονός ενός πρόσφατου θανάτου ασθενούς. Ο ασθενής αυτός παρουσίασε θανατηφόρο ανοσολογική αντίδραση σε αδενοϊό που χορηγήθηκε άμεσα στο ήπαρ.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η γονιδιακή θεραπεία είναι ένα ταχέως εξελισσόμενο πεδίο με πολλές δυνητικά εφαρμογές στη ΣΣ. Εντελώς ξεχωριστές μέθοδοι έχουν φέρει υποσχόμενα αποτελέσματα σε μελέτες σε ζώα. Η ανάπτυξη φορέων που είναι ασφαλείς, εξειδικευμένοι, ικανοί και μπορούν να υποστούν ρυθμίσεις βρίσκεται σε εξέλιξη. Η γονιδιακή θεραπεία σε συνδυασμό με θεραπεία των μεσεγχυματικών κυττάρων μπορεί να αποτελέσει το μέσο παραγωγής αυτογενούς αναπληρωματικού ιστού (π.χ. νέο ΜΔ ή σπονδυλικό σώμα). Μπορεί επίσης να αλλάξει σημαντικά τη χειρουργική της σπονδυλικής στήλης: εφόσον εξασφαλιστεί η οστεοεπαγωγή, ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές (ενδοσκοπική ή υποδόρια) μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Μετατρέποντας λοιπόν την κληρονομική αναγεννητική ικανότητα των ενδογενών κυττάρων, η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να εξελιχθεί στο μέλλον σε ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία των χειρουργών της ΣΣ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chen Y. Orthopedic applications of gene therapy. J Orthop Sci 2001; 6:199-207.
2. Nishida K, Kang JD, Suh JK et al. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleous pulposus cells. Implications for treatment of intervertebral disk degeneration. Spine 1998; 23:2437-2442.
3. Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD et al: Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. Spine 1997; 22:1092-1097.
4. Takayanagi h, Juji T, Miyazaki T et al. Suppression of athritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. J Clin Invest 1999; 104:137-146.
5. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S et al. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. Bone 1999; 24:541-547.
6. Crystal RG. Transfer of genes to humans: Early lessons and obstacles to success. Science 1995; 270:404-410.
7. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther 1998; 80:35-47.
8. Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy. J Bone Joint Surg Am 1995; 77:1103-1114.
9. Anderson WF. Human gene therapy. Science 1992; 256:808-813.
10. Muzzonigro TS, Ghivizzani SC, Robbins PD et al. The role of gene therapy. Fact or friction? Clin Sports Med 1999; 18:223-239.
11. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disk by gene therapy by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor β1 encoding gene. Spine 1999; 24:2419-2425.
12. Nishida K, Gilbertson LG, Evans CH et al. Spine Update: Potential applications of gene therapy to the treatment of spinal disorders. Spine 2000; 25:1308-1318.
13. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially antiarthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. Hum Gene Ther 1996; 7:1261-1280.
14. Niyibizi C, Baltzer A, Lattermann C et al. Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing. Clin Orthop 1998 (suppl); 355:S148-S153.
15. Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. N Engl J Med 1996; 334:1185-1187.
16. Anderson WF. Human gene therapy. Nature 1998; 392:25-30.
17. Curiel DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. Ann N Y Acad Sci 1999; 886:158-171.
18. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X et al. Targeted intergration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. EMBO J 1991; 10:3941-3950 (published erratum appears in EMBO J 1992; 11:1228).
19. Mitani K, Graham FL, Gaskey CT. Transduction of human bone marrow by adenoviral vector. Hum Gene Ther 1994; 5:941-948.
20. Setoguchi Y, Jaffe HA, Danel C et al. Ex vivo and in vivo gene

transfer to the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. J Invest Dermatol 1994; 102:415-421.
21. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC al: In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. Cell 1992; 68:143-155.
22. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:4407-4411.
23. Bett AJ, Haddara W, Prevec L et al. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:8802-8806.
24. Mitani K, Graham FL, Gaskey CT et al. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:3854-3858.
25: Morsy MA, Gu M, Motzel S et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:7866-7871.
26. Fang J, Zhu YY, Smiley E et al: Stimylation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:5753-5758.
27. Sikes ML, O' Malley BW Jr, Finegold MJ et al. In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. Hum Gene Ther 1994; 5:837-844.
28. Raz E, Carson DA, Parker SE et al. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:9519-9523.
29. Wolff JA, Malone RW, Williams P et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 1990; 247:1465-1468.
30. Bhravesh E, Yasko AW, Engel PS et al. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. Clin Orthop 1999; 367(suppl): S118-S1129.
31. Bonadio J, Smiley E, Patil P et al. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: Prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. Nat Med 1999; 5:753-759.
32. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 1995; 20:1307-1314.
33. ΔΕΠ Α' Ορθοπαιδικής Κλινικής. Ορθοπαιδική και Τραυματιολογία: Παθήσεις θωρακικής και οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης: Οσφυαλγία-Σπονδυλολίσθηση. Εκδόσεις Κωνσταντάρας, Αθήνα 2001.
34. Butler D, Trafimow JH, Andersson GB et al. Discs degenerate before facets. Spine 1990; 15:111-113.
35. Eck JC, Hodges SD, Humphreys SC. Techniques for stimulating spinal fusion: efficacy of electricity, ultrasound, and biologic factors in achieving fusion Am J Opthop 2001; 30:535-541.
36. Ludwing SC, Kowalski JM, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes Eur Spine J 2000; 1:S119-125.
37. Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi M et al. The role of interleukin-1 on proteoglycan metabolism of rabbit annulus fibrosus cells cultured in vitro. Spine1988; 13:1284-1290.
38. Osada R, Ohshima H et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglykan synthesis in bovine intervertebral discs. J Orthop Res 1996; 14:690-699.
39. Thompson JP, Oegema TR, Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. Spine 1991; 16:253-260.
40. Ronald A. Hall and James D. Kang. Gene therapy applications for intevertebral disc degeneration. Oper Techn Orthop 2000; 10:263-270.
41.Chang SM, K, Takegami, K, Sumner D et al. Gene gun-mediated gene transfer to intervertebral disc cells. Orthopaedic Reasearch Society Meeting, Orlando, FL, 2000.
42. Boden SD, Hair GA, Viggeswarapu M et al. Gene therapy for spinal fusion. Clin Orthop 2000; 379:S225-233.
43. Khan SN, Hidaka C, Sandhu HS et al. Gene therapy for spinal fusion. Orthop Clin North Am 2000; 31:473-484.
44. Boden SD. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation. Tissue Eng 2000; 6:383-399.
45. Anthony A. Scaduto, and Jeffrey C. Wang. Gene therapy applications for lumbar fusion surgery. Oper Techn in Orthop 2000; 10:325-331.
46. Wang JC, Kanim LE, Yoo S et al. Gene tjherapy for spinal fusion: Transformation of marrow cells with an adenoviral vector to produce BMP-2. Presented at the Annual Meeting of The Scoliosis Research Society, San Diego, CA, September 1999 (abstr).
47. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. J Bone Joint Surg Am 1999; 81:905-917.
48. Viggeswarapu M, Boden SD, Liu Y et al. Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo. J Bone Joint Surg Am 2001; 83:364-376.
49. Boden SD, Liu Y, Hair GA et al. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation. Endocrinology 1998; 139:5125-5134.
50. Breitbart AS, Grande DA, Mason JM et al. Gene-enhanced tissue engineering: Applications for bone healing using cultured periosteal cells transduced retrovirally with the BMP-7 gene. Ann Plast Surg 1999; 42:488-495.
51. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE et al. LacZ and interleunkin-3 expression in vivo after retroviral trnasduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. Hum Gene Ther 1997; 8:1417-1427.
52. Quanjun Cui, Zeng Ming Xiao, Gary Balian et al. Comparison of lumbar spine fusion using mixed and cloned marrow cells. Spine 2001; 26:2305-2310.
53. Hou Z, Nguyen Q, Frenkel B et al. Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells: Implications for skeletal gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:7294-7299.
54. Alden TD, Pittman DD, Beres EJ et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. J Neurosurg 1999; 90:109-114.
55. Goldstein SA. In vivo nonviral delivery factors to enhance bone repair. Clin Orthop 2000; 379:S113-119.
56. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K et al. Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression. Biochem Biophys Res Commun 2000; 267:382-387.