ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2020;23(3):165-176

Inhibiting the Degeneration of Injured Cartilage Matrix by Using the RNA Interference Technology: New Horizons in Osteoarthritis Treatment

ARTICLE INFO

Article Type
Anatical Review

Authors
Akbari Moghadam N. [1] *MSc,*
Bagheri F. *[2] *PhD,*
Baghaban Eslaminejad M.R.[3] *PhD*

How to cite this article
Akbari Moghadam N, Bagheri F, Baghaban Eslaminejad M.R. Inhibiting the Degeneration of Injured Cartilage Matrix by Using the RNA Interference Technology: New Horizons in Osteoarthritis Treatment. Pathobiology Research. 2020;23(3):165-176.

[1]Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Tarbiat Modares University, Jalale Ale Ahmad Street, Tehran, Iran. P.O.Box: 14115-111
Phone: +98 (21) 82884321
Fax: +98 (21) 82884931
f.bagheri@modares.ac.ir

Article History
Received: March 27, 2020
Accepted: August 12, 2020
ePublished: September 20, 2020

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common articular disease that has significantly affected the patients' quality of life. As cartilage doesn't have any blood vessels and neurons, its treatment is a difficult task to do. Traditional therapeutic approaches, including the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and surgical interventions, can only control the disease, and the joint will lose its functionality after a short period. Consequently, modern methods such as cell therapy and tissue engineering along with using various biomaterials are being attempted to repair degenerated cartilage tissue. Using interfering RNAs is another approach that targets specific destructive or malfunctioned RNA sequences and suppresses the responsible factors for cartilage tissue destruction. Hence, the degenerated tissue can gradually retain the balance between anabolic and catabolic activities. Identification of the affecting genes in degeneration or malfunctioning and their suppression has provided promising results for the treatment of diseases. In the current study, after introducing the tissue, the process of cartilage degeneration and osteoarthritis development, the researches that have investigated the effect of interfering RNAs on rehabilitating cartilage tissue via inhibition of cartilage matrix destruction are reviewed.

Keywords Articular Cartilage; Osteoarthritis; Cartilage Degeneration; RNA Interference

CITATION LINKS

[1] Current research ... [2] The basic science ... [3] Articular ... [4] Osteoarthritis: Pathology ... [5] Matrix degradation in ... [6] Mesenchymal stem ... [7] Intra-articular targeting of ... [8] Articular cartilage engineering with ... [9] Enhanced MSC chondrogenesis following ... [10] Regenerative treatment in ... [11] Advances and challenges in gene-based ... [12] Human umbilical ... [13] Graphene oxide containing ... [14] Tissue engineering: Polymeric scaffolds f ... [15] Emerging potential of gene silencing ... [16] siRNA-mediated knock-down of ... [17] siRNA delivery for treatment of ... [18] Targeted cell delivery for ... [19] The biomechanical role of the ... [20] Anatomy, biochemistry, and ... [21] Current applications of ... [22] Cartilage-targeting drug ... [23] Zone-dependent mechanical ... [24] Composition and structure of articular ... [25] Articular ... [26] Recent advances in intra-articular ... [27] Osteoarthritis [28] Osteoarthritis and ... [29] Matrix metalloproteinases ... [30] Articular cartilage and ... [31] Repair and tissue engineering ... [32] Regeneration of musculoskeletal ... [33] Arthritis gene therapy is becoming ... [34] RNA ... [35] Suppression of early ... [36] RNA interference ... [37] Notch1 targeting siRNA ... [38] siRNA and miRNA: An ... [39] Molecular mechanisms ... [40] Small silencing RNAs ... [41] On the road to reading the RNA-interference ... [42] The small RNA profile during ... [43] Discrete small RNA-generating loci as ... [44] The widespread regulation of ... [45] elegans ... [46] MicroRNAs: Genomics ... [47] RNA interference ... [48] Overextension of DFF40 and ... [49] Current progress in gene ... [50] Non viral vectors in gene ... [51] Physical methods for drug ... [52] Different strategies of gene ... [53] Physical methods of ... [54] Therapeutic potentials of gene ... [55] Non-viral vector mediated gene ... [56] Critical roles for collagenase-3 ... [57] Effective knock down of matrix ... [58] Single vs. repeated matrix ... [59] Wwp2 maintains cartilage ... [60] The amelioration of cartilage ... [61] Protective effect of lentivirus-mediated ... [62] SOX9 is a regulator of ... [63] Fibrin-hyaluronic ... [64] Nanocarrier-mediated codelivery of small ... [65] Runx1 contributes to articular cartilage ... [66] Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses ... [67] Hypoxia-inducible factor-2α is a catabolic regulator ... [68] Intra-articular delivery of anti-Hif-2α siRNA ... [69] NF-κB as a potential therapeutic ... [70] Roles of inflammatory and anabolic ... [71] Suppression of NF-κB activity via ... [72] Development of a peptide-siRNA ... [73] Activation of Indian hedgehog promotes ... [74] A novel therapeutic strategy for cartilage ...

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

مهار تخریب ماتریس غضروف آسیب‌دیده با استفاده از تکنولوژی RNA مداخله‌گر: افق‌های جدید در درمان استئوآرتریت

نغمه اکبری مقدم MSc
گروه زیست‌پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
فاطمه باقری* PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد PhD
گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، تهران، ایران

چکیده
استئوآرتریت یا آرتروز شایع‌ترین بیماری مفصلی است که کیفیت زندگی مبتلایان را به شکل قابل توجهی تحت تاثیر قرار می‌دهد. از آنجا که غضروف بافتی بدون رگ و اعصاب است، درمان آن با مشکل روبه‌رو است. روش‌های رایج درمان از قبیل استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و جراحی تنها موجب کنترل بیماری می‌شوند و با گذشت زمان مفصل کارآیی خود را مجدداً از دست می‌دهد. روش‌های نوین مانند سلول‌درمانی و مهندسی بافت همگام با استفاده از زیست‌مواد مختلف در تلاش برای یافتن راه حلی هستند که بافت تخریب‌شده غضروف ترمیم شود. رویکرد دیگر، استفاده از RNAهای مداخله‌گر است که با هدف قراردادن توالی‌های تخریب‌گر، عوامل موثر در تخریب بافت غضروف را سرکوب می‌کند و در پی آن، بافت آسیب‌دیده به مرور زمان تعادل بین فرآیندهای آنابولیک و کاتابولیک را دوباره به دست می‌آورد. شناسایی ژن‌های موثر در تخریب ماتریس غضروف و سرکوب آنها نتایج امیدبخشی را ارایه کرده است. در مطالعه حاضر، بعد از معرفی بافت غضروف، فرآیند تخریب غضروف و ایجاد استئوآرتریت، به مرور پژوهش‌هایی پرداخته شده است که تاثیر RNAهای مداخله‌گر بر ترمیم بافت غضروف آسیب‌دیده را بررسی کرده‌اند.
کلیدواژه‌ها: غضروف مفصلی، آرتروز، تخریب غضروف، RNA مداخله‌گر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲
*نویسنده مسئول: f.bagheri@modares.ac.ir

مقدمه

غضروف بافت همبند خاصی است که فاقد خون، رگ، عصب و لنف است و شرایط مناسب برای حرکت مفاصل را ایجاد می‌کند. غضروف مفصلی از جنس هیالین است که از کلمه یونانی هیالوس، به معنای شیشه، گرفته شده و فراوان‌ترین نوع غضروف در بدن است. ساختار غضروف متشکل از سلول‌هایی به نام کندروسیت و ماده زمینه‌ای خارج سلولی (ECM) است که به شکل عمده از کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان تشکیل می‌شود[1-3]. عدم وجود خون و فعالیت متابولیک پایین کندروسیت‌ها موجب برهم‌خوردن تعادل ترکیب درصد ECM و تخریب بافت غضروف می‌شود. این عدم تعادل نیز بروز آرتروز (استئوآرتریت) را به دنبال دارد. این بیماری پیش‌رونده، مخرب و ناتوان‌کننده، کیفیت زندگی بیماران را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. افزایش تولید پروتئازها از جمله ماتریس‌متالوپروتئینازها (MMPs) و اگریکانازها موجب تخریب ECM و درنتیجه تخریب ساختار متراکم و چگال غضروف می‌شود[4]. البته باید توجه داشت که فرآیندهای مکانیکی و متاثر از التهاب به‌طور یکسان بر پیشرفت آرتروز تاثیر می‌گذارند، بدین صورت که با تخریب کلاژن نوع II و اگریکان به‌عنوان اجزای اصلی ECM غضروف، شرایط برای التهاب بیشتر فراهم می‌شود و ویژگی‌های مکانیکی تحمل بار غضروف به‌شدت کاهش می‌یابد. از سوی دیگر، با تخریب تدریجی غضروف، تعادل فیزیکی مفصل به هم می‌خورد و فشار بیشتری بر استخوان‌هایی که در تماس با یکدیگر قرار گرفته‌اند وارد می‌شود که احساس درد شدید و التهاب مفصل را در پی دارد[5].

روش‌های متداول از قبیل درمان‌های دارویی و جراحی نتوانسته‌اند بازدارنده پیشرفت آرتروز باشند. در صورت تخریب کامل غضروف، آرتروپلاستی (تعویض مفصل) به‌عنوان گزینه نهایی است. با این حال ۲۰% بیماران پس از عمل جراحی همچنان احساس درد دارند[6]. اما در مواردی که بافت غضروف به‌طور کامل تخریب نشده باشد، استفاده از داروها و تزریق درون مفصلی تا حدودی می‌توانند درد بیمار را تسکین دهند و روند پیشرفت بیماری را کنترل کنند. رساندن مستقیم دارو به مفصل موجب افزایش زیست‌دسترس‌پذیری آن در مقایسه با تزریق سیستمیک می‌شود. اما کلیرانس سریع دارو از مفصل، چه برای داروهای ریزمولکول و چه برای داروهای درشت‌مولکول، همچنان یکی از اصلی‌ترین محدودیت‌های دارورسانی مستقیم است. به همین دلیل، دارورسانی به مفصل مبتلا به آرتروز نیازمند مهندسی دقیق‌تر روش‌های مورد استفاده است تا بتواند تاثیر داروهای استفاده‌شده را افزایش دهد[7]. ایجاد ریزشکست یا موزاییکوپلاستی با هدف رساندن مواد مغذی و سلول‌های بنیادی به بافت تخریب‌شده نیز نتوانسته است روش موفقی در ترمیم بافت آسیب‌دیده باشد[3]. روش‌های نوین سلول‌درمانی و ژن‌درمانی به دنبال یافتن راه حلی برای کنترل روند پیشرفت بیماری و ترمیم بافت تخریب‌شده غضروف هستند. به همین دلیل پیوند مستقیم سلول‌های کندروسیت یا بنیادی مزانشیمی از خود فرد، یا پیوند داربست‌های مهندسی‌شده حاوی سلول یا بدون سلول نیز در پژوهش‌های متعددی مورد بررسی قرار گرفته‌اند[8-11].

برای مثال *صفری* و همکاران[12] با درنظرگرفتن خواص ژله وارتون، از بافت سلول‌زدایی‌شده بند ناف به‌عنوان داربست طبیعی برای رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت استفاده کردند. مقادیر زیاد هیالورونیک‌اسید، کلاژن نوع II، گلیکوزآمینوگلیکان و هیدراته‌بودن ژله وارتون می‌تواند شبیه‌ساز ECM غضروف باشد. در این پژوهش، سطح mRNA مارکرهای غضروفی، از جمله کلاژن II و اگریکان افزایش چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل (داربست ژلاتینی) داشت. از سوی دیگر نتایج نشان داد که استفاده از این داربست طبیعی نیازمند

تغییراتی در نحوه کشت سلول و اندازه حفرات است تا بتواند بستر مناسب‌تری برای تمایز سلول‌های بنیادی و نفوذ آنها را فراهم کند. *شامخی* و همکاران[13] با تکیه بر خواص ضدمیکروبی و زیست‌تخریب‌پذیری کایتوسان، از این پلیمر برای ساخت داربست مهندسی بافت غضروف استفاده کرده‌اند که می‌تواند مورفولوژی گرد کندروسیت‌ها را حفظ کند. در این پژوهش از اکسید گرافن برای افزایش مقاومت داربست نیز استفاده شد. حضور نانوذرات اکسیدگرافن منجر به افزایش رشد سلول‌های کندروسیت در داربست تا روز چهاردهم شد که نشان‌دهنده مناسب‌بودن ترکیب داربست‌های پلیمری با نانومواد است.

با این وجود، پژوهش‌ها نشان می‌دهند که مهندسی بافت غضروف با هدف ترمیم بافت آسیب‌دیده، نتوانسته خواص بافت طبیعی را ایجاد کند. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریسک هایپرتروفی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و نیازمند اصلاحات بیشتری برای استفاده از خواص تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و توانایی بالقوه آنها در تمایز به رده غضروفی است[14].

با توجه به محدودیت‌های مهندسی بافت و نتایج به‌دست‌آمده در درمان‌های مبتنی بر استفاده از داربست و رده‌های مختلف سلولی، ژن‌درمانی با استفاده از RNAهای مداخله‌گر که عملکرد برخی از ژن‌ها را با اختلال در بیان آنها سرکوب می‌کند، شیوه درمان جدیدی است که امروزه در درمان سرطان و بسیاری از بیماری‌های تخریب‌کننده از جمله آرتروز مورد توجه قرار گرفته است[15-17].

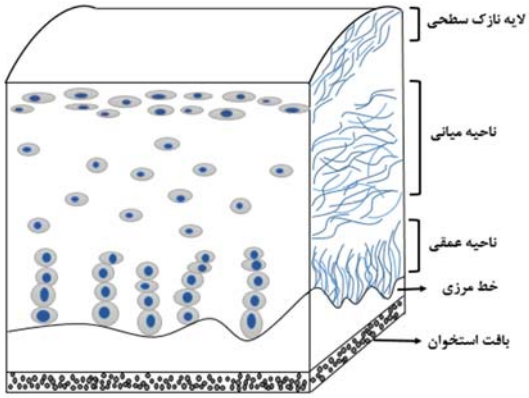
در این مطالعه پس از بررسی ساختار غضروف و فرآیندهایی که منجر به ایجاد آرتروز می‌شود، با تمرکز بر ژن‌درمانی به‌عنوان روشی نوین و نویدبخش برای درمان آرتروز، به بررسی مقالاتی پرداخته شده است که این روش را مورد مطالعه قرار داده‌اند.

ساختار غضروف مفصلی

سلول‌های تشکیل‌دهنده غضروف که کاملاً تمایزیافته و بالغ هستند کندروسیت نام دارند. این سلول‌ها ۱ تا ۵% حجم غضروف را تشکیل می‌دهند. وظیفه آنها تولید، حفظ و بازسازی شبکه برون‌سلولی است. شکل، تعداد و اندازه کندروسیت‌ها بسته به اینکه در کدام ناحیه غضروف قرار گرفته‌اند، متفاوت است. کندروسیت‌های ناحیه سطحی کوچک‌تر و مسطح‌تر هستند و معمولاً تراکم بیشتری نسبت به نواحی عمیق‌تر دارند[18]. هر کندروسیت ریزمحیط اطراف خود را تولید می‌کند و مسئول تغییرات شبکه برون‌سلولی در همسایگی خود است. این ریزمحیط سلول کندروسیت را به دام می‌اندازد تا از مهاجرت آن به نواحی دیگر جلوگیری کند. کندروسیت‌ها به‌ندرت تماس سلول با سلول را به شکل مستقیم برقرار می‌کنند. آنها به محرک‌های محیطی از قبیل فاکتورهای رشد، بار مکانیکی، نیروهای پیزوالکتریک و فشارهای هیدرواستاتیک پاسخ می‌دهند و فعالیت متابولیک خود را با توجه به محرک تنظیم می‌کنند. این سلول‌ها توانایی تکثیر کمی دارند و به همین دلیل، ظرفیت درمان ذاتی غضروف در پاسخ به جراحت محدود است. همچنین زنده‌مانی کندروسیت‌ها به محیط شیمیایی و مکانیکی وابسته است[19]. فعالیت متابولیک این سلول‌ها نیز با توجه به اینکه در کدام ناحیه از غضروف قرار گرفته باشند، متغیر است. به‌عنوان مثال، سلول‌هایی که در ناحیه سطحی قرار دارند مقادیر متفاوتی از اگریکان را نسبت به کندروسیت‌های نواحی عمیق‌تر می‌سازند[20].

شبکه برون‌سلولی به‌طور عمده از مایع بافتی و درشت مولکول‌هایی از قبیل کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و پروتئین‌های غیرکلاژنی تشکیل شده است که مقدار و توزیع آنها با توجه به نوع مفصل، ناحیه غضروف و با افزایش سن تغییر می‌کند[20]. مایع بافتی حدود ۶۵ تا ۸۰% وزن غضروف سالم را تشکیل می‌دهد. لیپیدها، فسفولیپیدها و گلیکوپروتئین‌ها نیز به مقدار کمتری در ECM وجود دارند[2]. مایع بافتی از آب، الکترولیت‌ها، گازها، پروتئین‌های کوچک و متابولیت‌های محلول تشکیل شده است. تعامل بین مایع و درشت مولکول‌های ماتریس، سفتی بافت و مقاومت در برابر نیروهای مکانیکی را فراهم می‌کند[20].

غضروف مفصلی از چهار ناحیه تشکیل شده است که فعالیت متابولیک، اندازه و شکل سلول‌ها در لایه‌های مختلف متفاوت هستند[20]. لایه نازک سطحی لایه‌های پایین‌تر را از تنش برشی محافظت می‌کند و حدود ۱۰ تا ۲۰% ضخامت غضروف مفصلی را تشکیل می‌دهد. رشته‌های کلاژن در این ناحیه موازی با سطح هستند و کلاژن نوع II و IX بیشترین فراوانی را دارند. لایه سطحی تعداد نسبتاً زیادی کندروسیت مسطح دارد. این لایه در تماس با مایع مفصلی و وظیفه آن مقاومت در برابر نیروهای فشاری، کششی و برشی است[21]. ناحیه میانی پل عملکردی بین ناحیه سطحی و عمقی و اولین ناحیه برای مقاومت در برابر نیروی فشاری است. این ناحیه ۴۰ تا ۶۰% کل حجم غضروف را تشکیل می‌دهد و متشکل از پروتئوگلیکان‌ها و فیبریل‌های کلاژنی ضخیم‌تر است. غلظت پروتئوگلیکان‌ها در این ناحیه بیشتر از ناحیه سطحی است و کندروسیت‌ها به شکل کروی هستند[22]. ناحیه عمقی بیشترین مقاومت را در برابر نیروی فشاری دارد. کندروسیت‌ها در این ناحیه به شکل گروه‌های ستونی قرار گرفته‌اند. ضخیم‌ترین فیبریل‌های کلاژنی و کمترین مقدار آب در این ناحیه قرار دارد و میزان پروتئوگلیکان‌ها نیز نسبت به نواحی دیگر بیشتر است. این ناحیه حدود ۳۰% حجم کل غضروف را تشکیل می‌دهد. خط مرزی میان ناحیه عمقی و ناحیه کلسیمی‌شده، دارای مقادیر زیادی فیبریل‌های کلاژنی است. کندروسیت‌ها در این ناحیه بسیار کم هستند. در این ناحیه منافذی برای عبور مواد مغذی از ناحیه کلسیمی به ناحیه عمقی وجود دارد. در نواحی میانی، عمقی و خط مرزی فیبریل‌های کلاژنی عمود بر سطح غضروف قرار گرفته‌اند[23]. نحوه قرارگیری سلول‌ها و فیبرهای کلاژنی به‌طور شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱) نواحی مختلف غضروف هیالین

علاوه بر نواحی مختلف غضروف، بستر احاطه‌کننده کندروسیت‌ها نیز براساس ساختار متغیر است. همه کندروسیت‌ها توسط ناحیه باریک اطراف سلولی که حدود ۲میکرومتر است، احاطه شده‌اند که در آن رشته‌های کلاژنی کمی وجود دارد. ساختار این ناحیه به‌ظاهر بی‌شکل‌تر است و دارای انواع مختلفی از مولکول‌ها از قبیل کلاژن نوع VI و پروتئوگلیکان‌های دکورین و اگریکان است[24]. این ناحیه در ماتریس احتمالاً نقش مهمی در آغاز انتقال پیام بین غضروف و تحمل بار ایفا می‌کند[2]. بستر ناحیه‌ای شبکه اطراف سلول‌ها را دربرمی‌گیرد و بیشتر متشکل از رشته‌های نازک کلاژنی است که شبکه‌ای سبدمانند را در اطراف سلول تشکیل می‌دهد. این ناحیه که ضخیم‌تر از بستر اطراف سلولی است وظیفه محافظت از غضروف در برابر فشارهای مکانیکی و توانایی تحمل بارهای سنگین را دارد[2].

سومین بخش از ماتریس به‌وضوح به کمک ساختارهای تجمعی پروتئوگلیکان‌ها و یا به کمک رنگ‌آمیزی اگریکان‌ها با استفاده از پادتن‌ها یا رنگ‌های متاکروم در ناحیه عمقی قابل مشاهده و تشخیص است. این بستر، بین ناحیه‌ای نامیده می‌شود[24] و بزرگترین بخش در بین تمامی بسترها است. لازم به ذکر است که بیشترین ویژگی‌های بیومکانیکی غضروف مفصلی به‌دلیل وجود این ناحیه است. پروتئوگلیکان‌ها و محصولات تخریب اگریکان، فراوان‌ترین مولکول‌های موجود در این ناحیه هستند که با هیالورونان پیوند برقرار می‌کنند[25].

استئوآرتریت

استئوآرتریت یا آرتروز شایع‌ترین بیماری غضروف مفصلی است. با پیشرفت این بیماری، مقادیر کلاژن و پروتئوگلیکان کاهش و مقدار آب افزایش می‌یابد[3]. این تغییرات موجب کاهش مقاومت کششی و فشاری غضروف می‌شود[5]. عوامل کلیدی موثر بر تخریب اجزای غضروف عبارتند از ماتریس‌متالوپروتئینازها، ADAMTSها، اگریکانازها و کاتپسین‌ها و عوامل التهابی مانند اینترلوکین‌ها و فاکتور نکروزدهنده تومور α (TNF-α) که توسط کندروسیت‌ها ترشح می‌شوند[26]. افزایش سن، آسیب به غضروف، مینیسک و رباط‌ها، چاقی، زمینه ژنتیکی، جنسیت، فعالیت بیش از حد و ورزش از فاکتورهای خطرزای ابتلا به آرتروز هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که آسیب به زانو خطر ابتلا به آرتروز را تا پنج برابر و چاقی این ریسک را تا سه برابر افزایش می‌دهد[27].

مطالعات متعددی به بررسی فرآیندهایی پرداخته‌اند که منجر به تخریب غضروف مفصلی در مدل انسانی و حیوانی می‌شود. محققان دریافته‌اند که افزایش هیدراته‌شدن ماتریس غضروف، رخدادی کلیدی است که منجر به ازهم‌پاشیدن فیبرهای کلاژن نوع II، IV و یا IX می‌شود. افزایش هیدراته‌شدن به دنبال افزایش سن، کارکرد مداوم مفصل و یا فعالیت آنزیم‌های تخریب‌کننده کلاژن رخ می‌دهد[28]. در طول پیشرفت آرتروز فعالیت کندروسیت‌ها تغییر می‌کند، تکثیر، فرآیندهای کاتابولیک و مرگ سلولی افزایش می‌یابند و با ترشح اینترلوکین- یک‌بتا (IL-1β)، کندروسیت‌ها با تکثیر بیشتر سعی در پرکردن منافذ خالی دارند. از سوی دیگر اینترلوکین- یک‌بتا و TNF-α تاثیر مستقیمی بر ازبین‌رفتن یکپارچگی ECM دارند[3]. برهم‌خوردن فعالیت‌های سلولی و آغاز رگ‌زایی در بافت آسیب‌دیده در کنار هایپرتروفی کندروسیت‌ها، منجر به شبه‌استخوانی‌شدن بافت غضروف، احساس درد شدید و عدم کارآیی مفصل می‌شود[26]. در بافت سالم غضروف، سنتز و تخریب پروتئین‌های ماتریس در تعادل هستند. با آغاز آرتروز، تخریب افزایش می‌یابد و پروتئین‌های ماتریس و یکپارچگی آن از بین می‌رود. از سوی دیگر، کلاژن نوع II موجب استحکام غضروف می‌شود. این کلاژن تقریباً منحصر به غضروف است و با تخریب آن، کلاژن نوع I و درنتیجه غضروف فیبری به جای غضروف هیالین ساخته می‌شود[29]. جداشدن پیوند کلاژن- پروتئوگلیکان که منجر به تورم ماتریس غضروف می‌شود، می‌تواند سفتی بافت را بدون ازبین‌بردن شبکه کلاژنی کاهش دهد. بنابراین ازهم‌پاشیدگی فیبرهای کلاژن و یا ازبین‌رفتن اتصالات عرضی آنها می‌تواند الاستیسیته غضروف را از بین ببرد و توانایی آن را برای تحمل بار کاهش دهد[28].

در غضروف بالغ و سالم، کندروسیت‌ها اجزای ماتریس را به‌آرامی سنتز می‌کنند. در حین رشد، فعالیت بیوسنتزی توسط فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های آنابولیک مانند فاکتور رشد تغییردهنده β (TGF-β)، پروتئین‌های شکل‌دهنده استخوان (BMP) و فاکتورهای رشد شبه‌انسولینیI (IGF-I) تحریک می‌شود. در آرتروز بسیاری از این فاکتورها و فاکتورهای دیگری مانند TNF-α و IL-1 توسط مایع مفصلی و کندروسیت‌ها تولید می‌شوند[30]. در غضروف سالم تغییرات ماتریس به‌شدت کنترل و تنظیم می‌شود و تعادل دقیقی بین سنتز و تخریب وجود دارد، اما در آرتروز این تعادل به هم می‌خورد و میزان تخریب بیشتر از سنتز می‌شود. سیتوکین‌های التهابی IL-1، TNF-α، IL-17 و IL-18 فعالیت می‌کنند تا سنتز MMPها را افزایش، بازدارنده‌های آنزیم MMP را کاهش و سنتز ECM را کاهش دهند[30].

آرتروز معمولاً علاوه بر تخریب غضروف، تمامی ساختارهای مفصل را تحت تاثیر قرار می‌دهد. درد جزء اولین علایم آرتروز است که

پس از آن علایم تشخیصی ظاهر می‌شوند. ممکن است چندین سال یا حتی چند دهه تا رسیدن آرتروز به مرحله قابل مشاهده بالینی طول بکشد. درد ناشی از آرتروز با فعالیت بیشتر و استراحت پس از آن افزایش می‌یابد[3]. پس از درد، دشواری حرکت‌دادن مفصل و تورم بافت نرم و سفت نیز ایجاد می‌شود که در این مرحله، بیمار درد شبانه‌روزی خواهد داشت. رشد بیش از حد سلول‌ها و کلسیمی‌شدن در بسیاری از موارد آرتروز گزارش شده‌اند که همانند فرآیند پایانی تمایز در استخوانی‌شدن ناحیه زیر غضروف است. پاره‌شدن مینیسک و التهاب غشای سینوویوم نیز ممکن است در پی تغییرات مکانیکی حاصل از آرتروز رخ دهد[1].

در صورتی که تغییرات ذکرشده در مراحل اولیه ابتلا به آرتروز تشخیص داده شوند، احتمال بهبودی بیمار وجود خواهد داشت. اما در مراحل میانی ابتلا به این بیماری، افزون بر ازبین‌رفتن لایه سطحی غضروف، قطعاتی از آن در مایع سینوویوم پراکنده می‌شوند که منجر به واکنش التهابی شدیدتری از سوی بدن خواهد شد. در مرحله پایانی پیشرفت بیماری، تعداد بسیار زیادی از سلول‌های سالم از دست رفته‌اند که تنها با تزریق مستقیم می‌توان تا حدودی از استخوانی‌شدن سلول‌های باقیمانده جلوگیری کرد. در این مرحله با تزریق مستقیم، استفاده از داروهای خوراکی و فعالیت محدود، می‌توان شرایط شکننده مفصل را پایدار نگه داشت و جراحی آرتروپلاستی را به تعویق انداخت[11].

همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، بافت غضروف توانایی خودترمیمی بسیار کمی داشته و تا امروز درمانی قطعی برای آرتروز وجود ندارد. تنها می‌توان درد ناشی از آن را کاهش داد و عملکرد مفاصل را بهبود بخشید[1]. در سال‌های اخیر، درمان‌های بازساختی مبتنی بر استفاده از سلول‌ها و بیومتریال با هدف ترمیم بافت تخریب‌شده مورد توجه قرار گرفته‌اند.

روش‌های درمان آرتروز

داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی مانند دیکلوفناک، ناپروکسن و اپیوئیدها به‌عنوان اولین گزینه مورد استفاده قرار می‌گیرند که عوارض جانبی زیادی دارند. تزریق درون مفصلی کورتیکواستروئیدها (مانند دگزامتازون)، هیالورونیک‌اسید، کندروئیتین‌سولفات و پلاسمای غنی از پلاکت نیز مراحل بعدی درمان، پیش از مداخله آرتروپلاستی هستند[26].

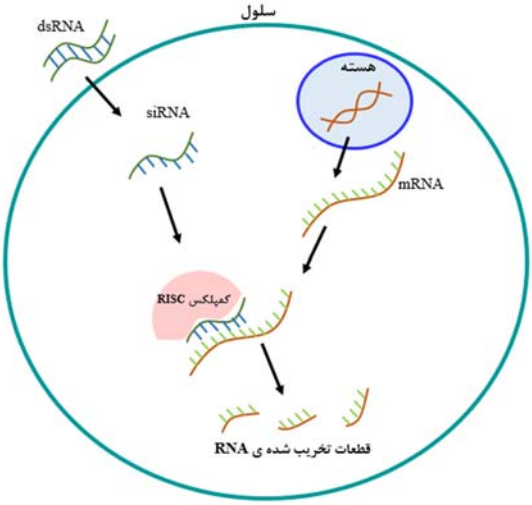
امروزه روش‌های نوینی از قبیل پیوند کندروسیت‌های خودی (ACI)، روش‌های مبتنی بر استفاده از داربست و سلول و پیوند کندروسیت یا سلول‌های بنیادی و سلول‌های القایی پرتوان (iPSC) به محل آسیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند که برخی از آنها در فاز مطالعاتی بالینی هستند[31]. استفاده از کندروسیت‌ها مشکل دو مرحله جراحی (برداشتن بیوپسی و پیوند به محل ضایعه) و تمایززدایی آنها در حین کشت و تکثیر در شرایط آزمایشگاهی را دارد، اما استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی گزینه بهتری است که علاوه بر سرعت تکثیر بالا، روند تمایز به کندروسیت را همانند وقایع جنینی طی می‌کنند[32].

ژن‌درمانی روش دیگری است که برای بازسازی غضروف آسیب‌دیده مورد تحقیق قرار گرفته است. در این روش ژن‌های غیرعادی که عامل بیماری هستند حذف و یا بازسازی نمی‌شوند، بلکه تنها به بیان بیشتر عوامل درمانی مانند فاکتورهای رشد یا فاکتورهای رونویسی کمک می‌کنند یا بیان ژن‌هایی را که باعث تخریب غضروف می‌شوند سرکوب می‌کنند[31]. استفاده از وکتورهای ویروسی یکی از راه‌های ژن‌درمانی است که برخی از پژوهش‌های مربوط به آن حتی به فاز II و III بالینی نیز رسیده‌اند[33]. استفاده از RNAهای مداخله‌گر نیز به‌عنوان یک روش ژن‌درمانی و دستکاری ژنی برای درمان آرتروز معرفی شده است که در ادامه به آن بیشتر پرداخته خواهد شد.

روش‌های مداخله در بیان ژن

با یافتن فرآیند مداخله ژنی با کمک RNAها در نوعی کرم نماتود (*Caenorhabditis elegans*)، تلاش برای مداخله در فرآیندهای بیان ژن با هدف درمان بیماری‌ها آغاز شد[34]. در این روش بیان ژن به‌طور کامل متوقف نمی‌شود و تنها می‌توان مانع بیان بیش از حد آن شد[35]. مداخله ژنی را می‌توان با RNA کوچک مداخله‌گر (siRNA)، RNA واکنش‌دهنده با Piwi (piRNA)، میکروRNA (miRNA)، RNA سنجاقی کوچک (shRNA) و RNA دورشته‌ای بلند (long dsRNA) انجام داد[36]. siRNAها توالی‌های سنتزی ۲۱ تا ۲۵ نوکلئوتیدی RNA هستند که می‌توانند بیان mRNA مشخصی را متوقف کنند[37]. به‌طور خلاصه، RNAهای دورشته‌ای بلند بعد از ورود به سیتوپلاسم به وسیله ریبونوکلئاز Dicer به RNAهای دورشته‌ای کوتاه یا siRNA تبدیل می‌شوند. siRNA روی RISC بارگذاری می‌شود. RISC شامل آرگونات- ۲ (Ago-2) است که یک رشته از RNA دورشته‌ای را شکسته و جدا می‌کند که نتیجه آن یک شکل فعال از RISC با یک RNA تک‌رشته‌ای (guid siRNA) می‌شود. این RNA تک‌رشته‌ای به‌طور اختصاصی به RNA هدف هدایت می‌شود[38]. Ago-2، mRNA هدف را می‌شکند و بنابراین موجب خاموشی ژن می‌شود (شکل ۲) [39, 40]. piRNAها، RNAهای کوچک ۲۳-۲۱ نوکلئوتیدی هستند. علت نامگذاری آنها توانایی تشکیل کمپلکس با پروتئین‌های Piwi از خانواده آرگونات‌ها است[41]. piRNAها یک تغییر ۲- o- متیل روی نوکلئوتید انتهای '۳ و معمولاً یک یوریدین در انتهای '۵ دارند[42]. نقش اولیه این RNAها مهار فعالیت ترانسپوزونی در طول تکوین germ line است[43]. miRNAها، RNAهای تک‌رشته‌ای کوچک حفاظت‌شده‌ای هستند که بیان بسیاری از ژن‌ها را در یک سلول در سطح بعد از رونویسی تنظیم می‌کنند[44]. اولین miRNA توسط *آمبروس* و همکاران در ۱۹۹۳ کشف شد که زمانبری تکوین لارو را به کمک مهار ترجمه lin-14 کنترل می‌کرد[45]. miRNAها از ژن‌های خود ارگانیسم یا از اینترون‌های آنها توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند. این RNAهای اولیه در هسته توسط ریبونوکلئاز دروشا به pre-miRNA (precursor miRNA)

پردازش می‌شود. pre-miRNA توسط اکسپورتین ۵ به سیتوپلاسم منتقل و در آنجا توسط نوکلئاز دیگری به نام Dicer به miRNA تبدیل می‌شود. در این مرحله miRNA به RISC متصل شده و با mRNA الاین می‌شود. در صورتی که توالی miRNA با توالی RNA هدف کاملاً مکمل باشد mRNA به واحدهای سازنده شکسته و در غیر این صورت ترجمه mRNA مهار می‌شود. این RNAها به‌طور طبیعی درون سلول‌های گیاهی و حیوانی وجود دارند که بیان آنها در بسیاری از بیماری‌ها افزایش می‌یابد. مداخله در بیان آنها می‌تواند فنوتیپ نرمال سلول را بازیابی کند. shRNA نیز یک مولکول RNA مداخله‌گر سنتزی است که به کمک حامل‌های ویروسی یا باکتریایی به سلول منتقل می شود. برخلاف siRNA که بیان گذرا در سلول دارد، shRNAها می‌توانند در ژنوم ادغام شوند و بیان پایدار ایجاد کنند[46-48].



شکل ۲) چگونگی تخریب RNA هدف با استفاده از RNA مداخله‌گر

شبیه‌سازی این فرآیند با انتقال توالی‌های مشخص می‌تواند در کنترل تخریب بافت غضروف موثر باشد. سرکوب بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌های کاتابولیک، التهابی و تخریب‌گر ماده زمینه‌ای، هموستازی تدریجی غضروف را فراهم می‌کند و به ترمیم بخش آسیب‌دیده می‌انجامد.

روش‌های انتقال ماده ژنتیکی به سلول

غشای سلول مانع اصلی رسانش توالی‌های ژنی به سلول در شرایط *در محیط زنده* و *در شیشه* است. به همین دلیل، روش‌های مختلفی برای عبور ایمن، موثر و هدفمند از این مانع که مختص سلول خاصی باشد تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این روش‌ها به سه دسته انتقال فیزیکی، ویروسی و غیرویروسی تقسیم می‌شوند[49]. پیش از آغاز فرآیند انتقال ژن لازم است که مراحل خاصی طی شوند. ابتدا ژن جهش‌یافته یا عامل بیماری شناسایی می‌شود. سپس ژن معادل آن برای وضعیت سلامتی که ژن درمانی نامیده می‌شود، کلون‌سازی و تکثیر می‌شود. این ژن با هدف تقویت، ترمیم یا سرکوب مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از تهیه ژن مورد نظر، به حاملی منتقل می‌شود که وکتور نام دارد. وظیفه وکتور، رسانش ژن درمانی به سلول هدف بیمار است[50]. انتخاب وکتور و روش مناسب رسانش ژن بستگی به سلول هدف و ویژگی‌های آن، مدت زمان بیان و سایز ژن بارگذاری‌شونده در وکتور دارد. در ادامه به بررسی برخی از مهم‌ترین روش‌های انتقال ژن با هدف مداخله ژنی خواهیم پرداخت.

ریزتزریق

این روش فیزیکی بیش از ۴۰ سال قبل برای اولین‌بار مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، توالی ژنی با استفاده از میکروپیپت، به‌طور مستقیم وارد سلول می‌شود. از مزایای این روش می‌توان به زنده‌مانی ۱۰۰% سلول‌ها اشاره کرد. از سوی دیگر، این روش بسیار زمان‌بر و برای تعداد بسیار محدودی از سلول‌ها قابل استفاده است[51].

بمباران DNA یا تفنگ ژنی

در این روش انتقال فیزیکی از میکروذرات فلزات سنگین مانند طلا یا تنگستن برای ورود به سلول هدف استفاده می‌شود. مزایای این روش شامل مقدار کمتر DNA مورد نیاز، مهم‌نبودن سایز DNA و تهیه آسان ذرات فلزی پوشیده‌شده با DNA است. این روش نسبت به ریزتزریق، پاسخ ایمنی شدیدتری را ایجاد می‌کند[52].

الکتروپوریشن

الکتروپوریشن روش فیزیکی دیگری است که کاربرد گسترده‌ای در انتقال مولکول‌ها به درون سلول دارد. پالس‌های الکتریکی با شدت و مدت زمان مختلف موجب جهت‌گیری مولکول‌های غشا در جهت میدان الکتریکی و ایجاد حفره برای نفوذ ژن یا دارو می‌شوند. روش‌های فیزیکی متعددی برای انتقال و بیان ترانس ژن یا خاموش‌کردن ژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند که بررسی‌های بیشتر را به کمک مراجع مربوطه می‌توان انجام داد[53].

سیستم‌های رسانش ویروسی

ویروس‌ها ابزار مفیدی برای انتقال RNA به سلول هدف هستند. با این روش انتقال، RNA به ژنوم وارد و خاموشی ژن هدف در مدت زمان طولانی‌تری انجام می‌شود. لنتی‌ویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و وکتورهای مرتبط با آدنوویروس‌ها، وکتورهای ویروسی هستند که تاکنون براساس نوع سلول و هدف پژوهش مورد استفاده قرار گرفته‌اند[54].

به‌دلیل بازده بالا و ورود آسان به سلول، این وکتورها بیشترین پیشرفت را در حوزه ژن‌رسانی داشته‌اند. بیان ژن ویروسی به کمک مکانیزم بیان ژن سلول، به‌راحتی انجام می‌شود. اما اثرات منفی مانند ایمنی‌زایی، جهش ژنی، دشواری افزایش مقیاس و محدودبودن طول توالی ژنی قابل استفاده موجب توجه به سایر روش‌های انتقال ژن شد[49].

سیستم‌های رسانش غیرویروسی

با مشاهده اولین واکنش التهابی پس از استفاده از وکتورهای ویروسی در فاز بالینی ژن‌درمانی، پژوهشگران تحقیقات خود را روی حامل‌های غیرویروسی لیپیدی و پلیمری آغاز کردند که علاوه

بر ویژگی‌های پاتوژن کمتر، قیمت پایین‌تر و روش تهیه آسان‌تری نیز داشت[50]. با توجه به ناپایداری siRNA و توالی‌های ژنی، اصلاح شیمیایی آنها به‌عنوان اولین گزینه برای انتقال موثر معرفی شد. برای مثال، افزودن گروه ′۲- O- متیل در افزایش پایداری siRNA موثر است[54]. اصلاحات شیمیایی توالی‌های ژنی نیز نتوانستند رسانش مناسبی را به سلول‌های هدف داشته باشند و در پی آن، حامل‌های طبیعی و سنتزی مانند لیپیدها، پلیمرها و پپتیدها تحت پژوهش گسترده‌ای قرار گرفتند. اکثر پلیمرهای مورد استفاده دارای بار مثبت بودند تا بتوانند با بار منفی DNA و سلول واکنش الکترواستاتیک دهند. این پلیمرها توانایی حمل ژن در اندازه بسیار کوچک (در حد نانومتر)، امکان ورود به سلول با اندوسیتوز سلولی، انتقال DNA و رهایش آن در هسته را دارند[52]. لیپیدهای کاتیونی و لیپوزوم‌ها نیز به‌دلیل تشکیل ساختار خود به خودی الکترواستاتیک با DNA، به‌راحتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این حامل‌ها زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر هستند که می‌توانند توالی ژنی را به شکل پایداری کپسوله کنند. از معایب این حامل‌ها می‌توان به ورود ناخواسته به سلول‌های غیراختصاصی اشاره کرد که ناشی از واکنش بار مثبت آنها با بار منفی سلول است. از سوی دیگر، مواد مورد استفاده در مرحله آماده‌سازی این ذرات مانند اتیل‌اتر و کلروفرم نیز برای سلول‌ها و بافت‌ها سمی هستند[49].

فرمولاسیون ثابت و دشواری افزایش مقیاس حامل‌های لیپیدی منجر به توجه بیشتر به حامل‌های نوین پلیمری شده است. این حامل‌ها درصد بسیار کمی از فاز بالینی ژن‌درمانی انسان را به خود اختصاص داده‌اند، اما موارد بررسی استفاده از آنها در درمان بیماری‌های مربوط به سرطان و ایمونوتراپی به‌سرعت در حال افزایش است[55]. کایتوسان، ژلاتین، پلی‌اتلین‌ایمین، پلی‌لاکتیک‌اسید و دندریمرها از جمله پلیمرهایی هستند که در قالب نانوذره، هیدروژل و داربست برای ژن‌درمانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند[52].

ژن‌های دستکاری‌شده با رویکرد RNAهای مداخله‌گر برای جلوگیری از تخریب بافت غضروف

در ادامه این مطالعه به بررسی پژوهش‌هایی پرداخته می‌شود که سرکوب توالی‌های اصلی و تاثیرگذار بر آرتروز غضروف مفصلی را هدف قرار داده‌اند.

ماتریس‌متالوپروتئیناز ۱۳ (MMP13)

ماتریس‌متالوپروتئیناز ۱۳ (کلاژناز ۳) به مقدار زیادی در ساختار اسکلت بدن وجود دارد و در طی تکامل صفحات رشد غضروفی در دوران جنینی فعالیت می‌کند[56]. این آنزیم در طی پیشرفت آرتروز، کلاژن نوع II را که پروتئین اصلی سازنده ماتریس است، تخریب می‌کند. *آکاگی* و همکاران[57]، طی پژوهشی به بررسی تاثیر سرکوب MMP13 بر تخریب غضروف با استفاده از تزریق مستقیم و درون مفصلی siRNA پرداختند. در این پژوهش بیان MMP13 تا ۵۵% کاهش یافت که تاثیر مثبت RNA مداخله‌گر را نشان می‌دهد. در پژوهشی دیگر که توسط *ناکاگاوا* و همکاران[58] در ژاپن صورت گرفت، مدت زمان تاثیر siRNA بر سرکوب ژن MMP13 و تاثیر تعداد دفعات تزریق آن بررسی شد. این پژوهش که در ادامه پژوهش *آکاگی* انجام شد، اثبات کرد که تزریق مجدد MMP13 siRNA دو هفته پس از ایجاد مدل موشی مبتلا به آرتروز می‌تواند از پیشرفت آرتروز جلوگیری کند. این دو پژوهش با تزریق مستقیم توالی siRNA به درون مفصل، نتوانستند تاثیر سرکوب‌گر MMP13 siRNA بر سلول‌های کندروسیت را نیز مورد بررسی قرار دهند. همان‌طور که در بخش مقدمه نیز اشاره شد، کلیرانس بالای مفصل می‌تواند siRNA را از محل تزریق حذف کند. به همین دلیل، بررسی تاثیر سرکوب MMP13 بر روند پیشرفت آرتروز، نیازمند انتخاب حامل مناسبی است که علاوه بر هدفمندکردن رسانش این توالی ژنی مهم، پایداری آن در سینوویوم را تا رسیدن به هدف مورد نظر (یعنی سلول‌های کندروسیت) افزایش دهد.

ADAMTS

دیس‌اینتگرین و متالوپروتئیناز با موتیف‌های ترومبوسپوندین، آنزیم‌های پروتئیناز هستند که پروتئین‌های ماتریس خارج سلولی را هدف قرار می‌دهند. ADAMTS4 و ADAMTS5 نقش مهمی در تخریب غضروف و ایجاد آرتروز دارند[59]. این آنزیم‌ها به‌طور عمده اگریکان را تخریب می‌کنند که گفته می‌شود از علل اصلی پیشرفت و تشدید آرتروز است[60]، زیرا تعادل فرآیندهای آنابولیک و کاتابولیک را بر هم می‌زنند. بنابراین هدف‌قراردادن این توالی ژنی و سرکوب‌کردن آن می‌تواند روند تخریب غضروف را تا حد زیادی متوقف کند تا فعالیت‌های آنابولیک مجدداً افزایش یابد.

در پژوهشی که *چو* و همکاران[61] انجام دادند از لنتی‌ویروس برای رساندن ADAMTS5 siRNA به مدل موشی آرتروز استفاده کردند. ویروس‌هایی که توالی ADAMTS5 به‌صورت RNA کوتاه سنجاق سری (shRNA) در آنها قرار گرفته بود با استفاده از لیپوفکتامین به درون سلول فرستاده شدند. این وکتور توانست تا بیش از ۷۵% ADAMTS5 را خاموش کند. بررسی‌های بافتی و ژنی در مدل موش صحرایی مبتلا به آرتروز اثبات کرد که بیان این ژن یکی از اصلی‌ترین علل پیشرفت آرتروز و تخریب بافت غضروف است. طبق یافته‌های این گروه، به نظر می‌رسد سرکوب همزمان ADAMTS-5 و ADAMTS-4 می‌تواند نقش موثرتری در جلوگیری از تخریب بافت غضروف داشته باشد. البته باید در نظر داشت که براساس آنچه که پیش‌تر ذکر شد، انتخاب وکتورهای ویروسی با وجود بازدهی بالا در رساندن ژن به هدف مورد نظر، خطراتی از قبیل جهش ژنی و بیان توالی‌های ناخواسته را نیز در پی دارد. به همین دلیل، گروه‌های پژوهشی به دنبال انتخاب حامل‌های مناسب‌تری با بازدهی بالا هستند.

ژانگ و همکاران[62] با افزایش بیان SOX9، بیان ADAMTS5 را سرکوب کردند و مشخص شد که با کاهش بیان SOX9، بیان ADAMTS4، ADAMTS5، ADAMTS7 و ADAMTS12

افزایش می‌یابد. با سرکوب بیان ADAMTSها توسط افزایش بیان SOX9 در سلول‌های گرفته‌شده از فرد مبتلا به آرتروز، بیان ژن‌های ماتریس غضروف افزایش یافت و درنتیجه آرتروز در مراحل اولیه کنترل شد. همچنین یافته‌ها نشان می‌دهد که ADAMTSها بیان SOX9 را کنترل و تنظیم می‌کنند. بدین ترتیب مسیر معکوسی برای سرکوب‌کردن ژن تخریب‌گر ADAMTS5 توسط SOX9 طی شد.

در پژوهشی دیگر که توسط *گارسیا* و همکاران[63] صورت گرفت از نوکلئیک‌اسیدهای قفل‌شده اصلاح‌شده با گپمر استفاده شد. این توالی‌ها به همراه کندروسیت درون هیدروژل فیبرین و هیالورونیک‌اسید بارگذاری شدند تا رهایش آهسته و هدفمند به‌خوبی صورت گیرد. گروه کنترل این روش، استفاده از ADAMTS5 siRNA بود که به‌عنوان بهترین گزینه برای سرکوب بیان ژن در نظر گرفته شد. اگرچه استفاده از ترکیب هیدروژل با سلول و گپمر نتیجه خوبی بر سرکوب بیان ADAMTS5 داشت، اما طبق نتایج ارایه‌شده همچنان غلظت موثر siRNA نسبت به گپمر بسیار کمتر (حدود ۵۰ برابر) است که مناسب‌بودن مداخله ژنی توسط توالی‌های کوتاه را نشان می‌دهد.

به نظر می‌رسد هدف قراردادن مهم‌ترین توالی‌های ژنی موثر بر تخریب آرتروز اگرچه می‌تواند روند تخریب آرتروز را به مقدار زیادی متوقف کند، اما فقط در مراحل اولیه پیشرفت بیماری تاثیر دارد و نیازمند بررسی‌های بیشتری برای هدف قراردادن ژن‌هایی است که علاوه بر مراحل اولیه پیشرفت، در مراحل بعدی و ادامه روند بیماری نیز موثر هستند.

فاکتور رونویسی مرتبط با Runt

این خانواده پروتئین شامل RUNX1، RUNX2 و RUNX3 است که نقش مهمی در استخوانی‌شدن و تکامل اسکلتی بدن دارد. پروتئین RUNX2 نقش مهمی در پیشرفت آرتروز دارد و باعث هایپرتروفی کندروسیت‌ها و تمایز آنها به سلول‌های استخوانی و افزایش بیان کلاژن نوع X می‌شود[64]. از سوی دیگر RUNX1 بیان فاکتورهای کندروسیتی و تولید ماتریس غضروفی را افزایش می‌دهد. بدین ترتیب با ابتلا به آرتروز بیان RUNX1 به طرز چشمگیری کاهش و بیان RUNX2 افزایش می‌یابد[65].

چن و همکاران[66] این فرضیه را مطرح کردند که مسیر Smad3 می‌تواند بیان RUNX2 و سایر ژن‌های القاشده توسط آن در کندروسیت‌ها را تنظیم کند. به این ترتیب با سرکوب بیان بیش از حد RUNX2، از بیان MMP13 نیز جلوگیری می‌شود که یکی از مهم‌ترین ژن‌های مخرب بافت غضروف مفصلی است. آنها براساس این فرضیه، به کمک وکتورهای ویروسی بیان‌کننده RUNX2 siRNA و Smad shRNA، این دو توالی را وارد سلول‌ها کردند. بررسی بیان ژنی نشان داد که با مداخله در بیان RUNX2، سرکوب بیان MMP13 نیز اتفاق می‌افتد. درنتیجه با سرکوب مسیر بیان این ژن، می‌توان مسیرهایی که تاثیر به‌سزایی در تخریب ECM غضروف دارند را نیز مسدود کرد. همچنین، نتایج آزمایش‌های در *شیشه* و *در محیط زنده* این گروه نشان داد در موش‌هایی که عدم بیان Smad3 و بیان بیش از حد RUNX2 داشتند، هایپرتروفی کندروسیت‌ها و ابتلا به آرتروز در آنها رخ داد. با سرکوب بیان Smad3، بیان MMP13 افزایش یافت که موجب تخریب کلاژن نوع II و اگریکان شد. از سوی دیگر، سرکوب بیان RUNX2 نشان داد که این ژن بر مسیر القای سرکوب بیان MMP13 به وسیله TGF-β موثر است. با کاهش حدود ۶۰% بیان RUNX2، بیان MMP13 کاهش چشمگیری داشت و استفاده از TGF-β تاثیری بر مسیر بیان این ژن نداشت. به این ترتیب، اگرچه RUNX2 ژن لازمی برای حفظ تعادل متابولیک غضروف است، اما بیان بیش از حد آن می‌تواند مانع فعالیت مناسب TGF-β شود.

در پژوهشی که *ژو* و همکاران[64] انجام دادند از سیکلودکسترین برای رسانش همزمان RUNX2 siRNA و داروی کارتوژنین استفاده شد. در این روش به نانوحامل‌ها، کوانتوم‌دات متصل شده بود تا امکان ردیابی آنها وجود داشته باشد. ریزمولکول دارو به غضروفی‌شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی کمک کرد و بیان کلاژن نوع II و اگریکان را تا ۳۰% افزایش داد. از سوی دیگر رسانش همزمان RUNX2 siRNA موجب کاهش بیان RUNX2 و کلاژن نوع X تا ۳۰% شد.

یانو و همکاران[65] با سرکوب‌کردن RUNX1 به بررسی نقش آن در ایجاد آرتروز پرداختند. در این روش با کاهش بیان RUNX1، فاکتورهای موثر در غضروفی‌شدن نیز کاهش یافتند و فاکتورهای منفی مانند کلاژن نوع X که نشان‌دهنده هایپرتروفی و استخوانی‌شدن است، افزایش یافت. RUNX1 به‌طور همزمان به همراه SOX5، SOX6 و SOX9 تولید ماتریس غضروفی را افزایش می‌دهد و همان‌طور که در بخش قبل نیز اشاره شد، کاهش بیان این پروتئین‌ها پیشرفت آرتروز را تسریع می‌کند.

فاکتور القاشده با هیپوکسی 2α (HIF-2α)

HIF-2α یک فاکتور رونویسی است که با کمبود اکسیژن در بافت تولید می‌شود و پاسخ هیپوکسی را کنترل می‌کند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که بیان این فاکتور با سیتوکین‌های التهابی مانند IL-1β افزایش می‌یابد[67]. HIF-2α بیان فاکتورهای کاتابولیک مانند MMPها، ADAMTS4 و ADAMTS5 و نیتریک‌اکسیدسنتاز ۲ را در کندروسیت‌ها افزایش می‌دهد و باعث هایپرتروفی کندروسیت‌ها می‌شود.

در پژوهشی که *پی* و همکاران[68] انجام دادند، HIF-2α siRNA با استفاده از نانوذرات به‌منظور سرکوب بیان HIF-2α و پیشگیری از تخریب غضروف به درون مفصل موش تزریق شد. جنس این نانوذرات از پروتئین CAP و متصل به پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) بوده است. CAP تمایل اتصال به کندروسیت‌ها را دارد و PEI نیز به‌عنوان عامل افزایش ورود ذرات به درون سلول مورد استفاده قرار گرفته است. طبق نتایج به‌دست‌آمده، این ذرات سمیت ناخواسته در سینوویوم نداشتند و بیان ژن *HIF-2α* را سرکوب کردند و مانع از تخریب ماتریس غضروف شدند. اما وجود PEI در این نانوذرات

جای بحث دارد، زیرا این ماده با وجود افزایش نفوذ، سمیت سلولی دارد.

فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-κB)

پروتئین‌های NF-κB خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی هستند که نقشی اساسی در پاسخ‌های التهابی و ایمنی و حفاظت از سلول در برابر آپوپتوز دارند[69]. فعالیت نامناسب مسیر سیگنال‌دهی NF-κB منجر به افزایش تکثیر و تمایز می‌شود. علاوه بر این تغییر، هموستازی کندروسیت‌ها به هم می‌خورد و به شرایط هایپرتروفی نزدیک می‌شوند[70].

در پژوهشی که *چن* و همکاران[35] انجام دادند، از وکتور آدنوویروس برای رساندن NF-κB siRNA استفاده کردند. این پژوهش تاثیر siRNA را در مدل *در محیط زنده* بررسی کرد. نتایج RT-PCR سرکوب بیان NF-κB تا ۷۰% را نشان داد. تاثیر سرکوب بیان این ژن در سینوویوم بیشتر از بافت غضروف بود و علایم التهابی زانو کاهش یافت.

در پژوهشی دیگر، *یان* و همکاران[71] از نانوذرات پپتیدی برای رساندن siRNA به غضروف استفاده کردند. طبق این پژوهش، تزریق مستقیم دارو یا توالی‌های ژنی در محل آسیب روش مناسب و راحتی است و از هدررفت مقادیر زیادی دارو یا توالی جلوگیری می‌کند و اثرات منفی تزریق سیستمیک نیز حذف می‌شود. رساندن siRNA توسط نانوذرات توانست تا ۴۰% شدت آسیب به غضروف مفصلی و علایم التهابی در مدل موشی را کاهش دهد و نانوذرات تا سه هفته در لاکونای کندروسیت‌ها باقی ماندند. اما با مقایسه نتایج پژوهش‌های این گروه و مطالعه‌ای که توسط *چن* و همکاران انجام شده بود، می‌توان مشاهده کرد که بیومتریال مورد استفاده برای ژن‌درمانی، بازدهی بسیار کمتری نسبت به حامل‌های ویروسی دارد و اگرچه انتخاب حامل مناسب مضراتی مانند جهش ژنی ندارد، ولی نیازمند بررسی‌های بیشتری است.

یان و همکاران[72] مطالعه دیگری را برای رساندن NF-κB siRNA با استفاده از ذرات پپتیدی (پپتید p5RHH) منتشر کردند. در این پژوهش با تکیه بر نتایج قبلی به‌دست‌آمده، تاثیر NF-κB siRNA بر سلول‌های کندروسیت انسانی بررسی شد. علاوه بر تنظیم هموستازی کندروسیت‌ها، افزایش زنده‌مانی آنها و سرکوب بیان *NF-κB*، نتیجه جالب دیگری نیز به دست آمد که ارتباط مستقیمی میان مسیر سیگنال‌دهی NF-κB و سیستم کمپلمان را نشان داد. طبق این پژوهش، پروتئین‌های سیستم کمپلمان از قبیل C3، C4 و فاکتور B در غضروف مبتلا به آرتروز بیان می‌شوند. با تیمار کندروسیت‌های مبتلا به آرتروز توسط نانوذرات پروتئینی حامل siRNA NF-κB، بیان C3 به میزان چشمگیری سرکوب شد که نشانگر ارتباط میان سیستم کمپلمان و مسیر سیگنال‌دهی NF-κB است. بررسی‌های بافت‌شناسی و RT-PCR نشان داد که با سرکوب بیان NF-κB به‌عنوان یک فاکتور التهابی مهم در پیشرفت آرتروز، بیان TNF-α، IL-1β، نیتریک‌اکسید، MMPها و خانواده ADAMTS را نیز می‌توان کنترل کرد.

پروتئین Ihh (Indian hedgehog)

Ihh یک مولکول سیگنال‌دهی کلیدی است که در کندروسیت‌هایی که شروع به هایپروتروفی کرده‌اند بیان می‌شود. وظیفه Ihh تنظیم استخوانی‌شدن طی فرآیند تکوین، رشد و هایپرتروفی کندروسیت‌ها است[73]. پژوهش‌ها نشان داده است که افزایش بیان Ihh موجب پیشرفت آرتروز می‌شود. اما باید توجه داشت که سرکوب دایمی Ihh در بدن حیوانات، به‌دلیل کشنده‌بودن حذف آن امکان‌پذیر نیست[74]. *وی* و همکاران[73] به بررسی اثر Ihh بر پیشرفت آرتروز پرداختند. سلول‌هایی که گیرنده Ihh siRNA بودند، میزان بسیار کمی از کلاژن نوع X و MMP13 را بیان کردند که نشانه کنترل پیشرفت آرتروز است. از سوی دیگر افزایش بیان کلاژن نوع X و MMP13 در سلول‌هایی که پروتئین Ihh را دریافت کرده بودند مشاهده شد.

وانگ و همکاران[74] نانوذرات لیپیدی را به‌عنوان حامل Ihh siRNA انتخاب کردند. این نانوذرات دارای قطر حدود ۶۷نانومتر بودند و بار مثبت داشتند. یکی از مهم‌ترین مزایای حامل لیپیدی مورد استفاده، علاوه بر سرکوب بیان Ihh و ترمیم قابل ملاحظه بافت غضروف در مدل *در محیط زنده*، نداشتن سمیت سلولی و کمک به افزایش رشد سلول‌ها بوده است. اما نوع لیپید و هدفمندسازی نانوذرات چالشی است که در انتخاب این نوع ذرات باید مورد توجه قرار گیرد. تغییر pH مفصل ملتهب و اسیدی‌شدن نسبی آن در شرایط آرتروز باید در نظر گرفته شود تا ساختار نانوذره، تا رساندن توالی ژنی به سلول‌های هدف پایدار باقی بماند.

نتیجه‌گیری

آرتروز شایع‌ترین بیماری مفصلی است که حرکت افراد مسن را به‌شدت دچار مشکل می‌کند. البته باید توجه داشت که این بیماری مختص افراد سالخورده نیست و در ورزشکاران، افراد چاق و افرادی با زمینه‌های ژنتیکی نیز امکان ابتلا به این بیماری وجود دارد. تغییر در تعادل سنتز و تخریب پروتئین‌های ماتریس غضروف و تغییر وضعیت کندروسیت‌ها موجب آغاز و پیشرفت آرتروز می‌شود. با ابتلا به آرتروز، در سلول‌های کندروسیت بیان کلاژن نوع II کاهش و بیان پروتئیناز تخریب‌گر MMP13 افزایش می‌یابد.

ژن‌درمانی می‌تواند با تغییر در شرایط متابولیکی و بازگرداندن تعادل و هموستازی غضروف، روش مناسبی برای بازسازی غضروف باشد. شناسایی توالی‌های موثر در تخریب ماتریس غضروفی و سرکوب آنها، یا افزایش بیان پروتئین‌های ترمیم‌کننده با استفاده از مداخله RNA روشی است که با گذشت زمان، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مسلماً انتخاب تنها یک ژن روش صحیحی برای درمان آرتروز نخواهد بود، زیرا در فرآیندهای متابولیکی کندروسیت‌ها و مفصل، مجموعه‌ای از تغییرات ایجاد می‌شود. بررسی‌های بیشتری به‌منظور یافتن مجموعه ژنی و روش

به بهینه‌رساندن توالی‌ها لازم است. همکاری جراحان و متخصصان آسیب‌های مفصلی با دانشمندانی که در زمینه رویکردهای مولکولی فعالیت می‌کنند، می‌تواند نتایج قابل توجه و کارآمدی را برای درمان این بیماری ارایه دهد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: نغمه اکبری مقدم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ فاطمه باقری (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/روش‌شناس (۳۰%)؛ محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۳۰%)

منابع مالی: مطالعه حاضر فاقد منبع مالی است.

منابع

1- Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. Bone Res. 2016;4(1):15040.
2- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. Sports Health. 2009;1(6):461-8.
3- Athanasiou KA, Darling EM, Hu JC, DuRaine GD, Reddi AH. Articular cartilage. Boca Raton: CRC Press; 2017.
4- Holyoak DT, Tian YF, Van Der Meulen MC, Singh A. Osteoarthritis: Pathology, mouse models, and nanoparticle injectable systems for targeted treatment. Ann Biomed Eng. 2016;44(6):2062-75.
5- Cooke ME, Lawless BM, Jones SW, Grover LM. Matrix degradation in osteoarthritis primes the superficial region of cartilage for mechanical damage. Acta Biomater. 2018;78:320-8.
6- Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy-a review. BMC Musculoskelet Disord. 2016;17(1):230.
7- Brown Sh, Kumar Sh, Sharma B. Intra-articular targeting of nanomaterials for the treatment of osteoarthritis. Acta Biomater. 2019;93:239-57.
8- Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, et al. Articular cartilage engineering with hyalograft (R) C: 3-year clinical results. Clin Orthop Relat Res 1976-2007. 2005;435:96-105.
9- Bian L, Zhai DY, Tous E, Rai R, Mauck RL, Burdick JA. Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF-β3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. Biomaterials. 2011;32(27):6425-34.
10- Buda R, Vannini F, Castagnini F, Cavallo M, Ruffilli A, Ramponi L, et al. Regenerative treatment in osteochondral lesions of the talus: Autologous chondrocyte implantation versus one-step bone marrow derived cells transplantation. Int Orthop. 2015;39(5):893-900.
11- Madry H, Cucchiarini M. Advances and challenges in gene-based approaches for osteoarthritis. J Gene Med. 2013;15(10):343-55.
12- Safari F, Fani N, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ, Baghaban Eslaminejad M. Human umbilical cord-derived scaffolds for cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res Part A. 2019;107(8):1793-802.
13- Shamekhi MA, Mirzadeh H, Mahdavi H, Rabiee A, Mohebbi-Kalhori D, Eslaminejad MB. Graphene oxide containing chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2019;127:396-405.
14- Hosseini S, Eslaminejad MB, Bagheri F, Shamekhi MA. Tissue engineering: Polymeric scaffolds for MSC-Based cartilage. In: Mishra M. Encyclopedia of polymer applications. 1st Edition. Boca Raton: CRC Press; 2018. pp. 2683-703.
15- Lolli A, Penolazzi L, Narcisi R, Van Osch GJ, Piva R. Emerging potential of gene silencing approaches targeting anti-chondrogenic factors for cell-based cartilage repair. Cell Mol Life Sci. 2017;74(19):3451-65.
16- Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad MB, Sheibani N. siRNA-mediated knock-down of DFF45 amplifies doxorubicin therapeutic effects in breast cancer cells. Cell Oncol. 2013;36(6):515-26.
17- Zahir-Jouzdani F, Mottaghitalab F, Dinarvand M, Atyabi F. siRNA delivery for treatment of degenerative diseases, new hopes and challenges. J Drug Deliv Sci Technol. 2018;45:428-41.
18- Nasiri N, Hosseini S, Alini M, Khademhosseini A, Eslaminejad MB. Targeted cell delivery for articular cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. Drug Discov Today. 2019;24(11):2212-24.
19- Alexopoulos LG, Setton LA, Guilak F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. Acta Biomater. 2005;1(3):317-25.
20- Huber M, Trattnig S, Lintner F. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. Investig Radiol. 2000;35(10):573-80.
21- Fuentes-Mera L, Camacho A, Moncada-Saucedo NK, Peña-Martínez V. Current applications of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. In: Pham PV. Mesenchymal stem cells-isolation, characterization and applications. Norderstedt: BOD; 2017. pp. 149-84.
22- Bajpayee AG, Grodzinsky AJ. Cartilage-targeting drug delivery: Can electrostatic interactions help?. Nat Rev Rheumatol. 2017;13(3):183.
23- Antons J, Marascio MG, Nohava J, Martin R, Applegate LA, Bourban PE, et al. Zone-dependent mechanical properties of human articular cartilage obtained by indentation measurements. J Mater Sci Mater Med. 2018;29(5):57.
24- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. Clin Orthop Relat Res. 2001;391:S26-33.
25- Flik KR, Verma N, Cole BJ, Bach BR. Articular cartilage. In: Williams RJ. Cartilage repair strategies. Totowa: Humana Press; 2007. pp: 1-12.
26- Maudens P, Jordan O, Allémann E. Recent advances in intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy. Drug Discov Today. 2018;23(10):1761-75.
27- Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. Lancet. 2015;386(9991):376-87.
28- Marks R. Osteoarthritis and articular cartilage: Biomechanics and novel treatment paradigms. Adv Aging Res. 2014;3(04):297-309.
29- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis. Front Biosci. 2006;11(1):529-43.

30- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis: Cell biology of osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 2001;3(2):107.
31- Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. Nat Rev Rheumatol. 2015;11(1):21.
32- Ataie M, Solouk A, Bagheri F, Seyed Jafari E. Regeneration of musculoskeletal injuries using mesenchymal stem cells loaded scaffolds. Tehran Univ Med J TUMS Publ. 2017;75(4):241-50. [Persian]
33- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Arthritis gene therapy is becoming a reality. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(7):381-2.
34- Hannon GJ. RNA interference. Nature. 2002;418(6894):244-51.
35- Chen LX, Lin L, Wang HJ, Wei XL, Fu X, Zhang JY, et al. Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF-κBp65-specific siRNA. Osteoarthr Cartil. 2008;16(2):174-84.
36- Liu Sh. RNA interference ex vivo. In: Liu Sh, editor. Rheumatoid arthritis. Berlin: Springer; 2018. pp. 129-35.
37- Kim MJ, Park JS, Lee SJ, Jang J, Park JS, Back SH, et al. Notch1 targeting siRNA delivery nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. J Controll Release. 2015;216:140-8.
38- Tang G. siRNA and miRNA: An insight into RISCs. Trends Biochem Sci. 2005;30(2):106-14.
39- Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. Int J Biomed Sci IJBS. 2017;13(2):48-57.
40- Grimm D. Small silencing RNAs: State-of-the-art. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(9):672-703.
41- Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. Nature. 2009;457(7228):396-404.
42- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, et al. The small RNA profile during Drosophila melanogaster development. Dev Cell. 2003;5(2):337-50.
43- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. Cell. 2007;128(6):1089-103.
44- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nature Rev Genet. 2010;11(9):597-610.
45- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75(5):843-54.
46- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
47- Xu W, Jiang X, Huang L. RNA interference technology. Compr Biotechnol. 2019:560-75.
48- Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad MB. Overextension of DFF40 and down regulation of DFF45 for evaluation of apoptosis induction in breast cancer cells (T-47D cell line) in presence of doxorubicin and some sulfonamide drugs, in College of Science, School of Biology [Dissertation]. Tehran: University of Tehran; 2013. [Persian]
49- Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. Theranostics. 2014;4(3):240-55.
50- Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. J Clin Diagn Res JCDR. 2015;9(1):GE01-6.
51- Jakutavičiūtė M, Ruzgys P, Tamošiūnas M, Maciulevičius M, Šatkauskas S. Physical methods for drug and gene delivery through the cell plasma membrane. In: Kulbacka J, Satkauskas S, editors. Transport across natural and modified biological membranes and its implications in physiology and therapy. Berlin: Springer; 2017. pp. 73-92.
52- Agi E, Mosaferi Z, Khatamsaz S, Cheraghi P, Samadian N, Bolhassani A. Different strategies of gene delivery for treatment of cancer and other disorders. J Solid Tumors. 2016;6:76-84.
53- Herrero MJ, Sendra L, Miguel A, Aliño SF. Physical methods of gene delivery. In: Brunetti-Pierri N, editor. Safety and efficacy of gene-based therapeutics for inherited disorders. Berlin: Springer; 2017. pp. 113-35.
54- Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. Gene. 2014;538(2):217-27.
55- Nyamay'Antu A, Dumont M, Kedinger V, Erbacher P. Non-viral vector mediated gene delivery: The outsider to watch out for in gene therapy. Cell Gene Ther Insights. 2019;5:51-7.
56- Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, López-Otín C, et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. Proc Natl Acad Sci. 2004;101(49):17192-7.
57- Akagi R, Sasho T, Saito M, Endo J, Yamaguchi S, Muramatsu Y, et al. Effective knock down of matrix metalloproteinase-13 by an intra-articular injection of small interfering RNA (siRNA) in a murine surgically-induced osteoarthritis model. J Orthop Res. 2014;32(9):1175-80.
58- Nakagawa R, Akagi R, Yamaguchi S, Enomoto T, Sato Y, Kimura S, et al. Single vs. repeated matrix metalloproteinase-13 knockdown with intra-articular short interfering RNA administration in a murine osteoarthritis model. Connect Tissue Res. 2019;60(4):335-43.
59- Mokuda S, Nakamichi R, Matsuzaki T, Ito Y, Sato T, Miyata K, et al. Wwp2 maintains cartilage homeostasis through regulation of Adamts5. Nat Commun. 2019;10(1):2429.
60- Chen P, Zhu Sh, Wang Y, Mu Q, Wu Y, Xia Q, et al. The amelioration of cartilage degeneration by ADAMTS-5 inhibitor delivered in a hyaluronic acid hydrogel. Biomaterials. 2014;35(9):2827-36.
61- Chu X, You H, Yuan X, Zhao W, Li W, Guo X. Protective effect of lentivirus-mediated siRNA targeting ADAMTS-5 on cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. Int J Mol Med. 2013;31(5):1222-8.
62- Zhang Q, Ji Q, Wang X, Kang L, Fu Y, Yin Y, et al. SOX9 is a regulator of ADAMTSs-induced cartilage degeneration at the early stage of human osteoarthritis. Osteoarthr Cartil. 2015;23(12):2259-68.
63- Garcia JP, Stein J, Cai Y, Riemers F, Wexselblatt E, Wengel J, et al. Fibrin-hyaluronic acid hydrogel-based delivery of antisense oligonucleotides for ADAMTS5 inhibition in co-delivered and resident joint cells in osteoarthritis. J Controll Release. 2019;294:247-58.
64- Xu J, Li J, Lin S, Wu T, Huang H, Zhang K, et al.

Nanocarrier-mediated codelivery of small molecular drugs and siRNA to enhance chondrogenic differentiation and suppress hypertrophy of human mesenchymal stem cells. Adv Funct Mater. 2016;26(15):2463-72.
65- Yano F, Ohba S, Murahashi Y, Tanaka S, Saito T, Chung UI. Runx1 contributes to articular cartilage maintenance by enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. Sci Rep. 2019;9(1):7666.
66- Chen CG, Thuillier D, Chin EN, Alliston T. Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2012;64(10):3278-89.
67- Yang S, Kim J, Ryu JH, Oh H, Chun CH, Kim BJ, et al. Hypoxia-inducible factor-2α is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. Nat Med. 2010;16(6):687-93.
68- Pi Y, Zhang X, Shao Z, Zhao F, Hu X, Ao Y. Intra-articular delivery of anti-Hif-2α siRNA by chondrocyte-homing nanoparticles to prevent cartilage degeneration in arthritic mice. Gene Ther. 2015;22(6):439-48.
69- Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-κB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Osteoarthr Cartil. 2006;14(9):839-48.
70- Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: Signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. Eur Cells Mater. 2011;21:202-20.
71- Yan H, Duan X, Pan H, Holguin N, Rai MF, Akk A, et al. Suppression of NF-κB activity via nanoparticle-based siRNA delivery alters early cartilage responses to injury. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(41):E6199-208.
72- Yan H, Duan X, Pan H, Akk A, Sandell LJ, Wickline SA, et al. Development of a peptide-siRNA nanocomplex targeting NF-κB for efficient cartilage delivery. Sci Rep. 2019;9(1):442.
73- Wei F, Zhou J, Wei X, Zhang J, Fleming BC, Terek R, et al. Activation of Indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage. Osteoarthr Cartil. 2012;20(7):755-63.
74- Wang S, Wei X, Sun X, Chen C, Zhou J, Zhang G, et al. A novel therapeutic strategy for cartilage diseases based on lipid nanoparticle-RNAi delivery system. Int J Nanomed. 2018;13:617-31.