

RNA کوچک مداخله گر؛ مبانی، کاربرد ها و چالش ها

● شیدا خلیلیان

کارشناسی ارشد، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

sh.khalilian92@gmail.com



● حدیث خیری

کارشناسی ارشد، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

hadis822@yahoo.com



● دکتر زهره حجتی

دانشیار، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

z.hojati@sci.ui.ac.ir



□ چکیده

خاموشی ژن ها با استفاده از (RNA interference) RNAi، اخیرا به عنوان یک تکنیک آزمایشگاهی موفق در تعیین عملکرد و کنترل بیان ژن ها به کار می رود و طیف وسیعی از کاربردها را در بیولوژی مولکولی و ژن درمانی فراهم کرده است. RNAi یک روش سرکوب بیان ژن می باشد که در این راستا از یک RNA دو رشته ای ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی به نام siRNA (Small Interfering RNA) استفاده می‌شود. این RNA ها با اثر گذاری بر روی mRNA هدف، نقش مهمی در تنظیم رونویسی، خاموشی ژن ها و دمتیلاسیون DNA دارند و mRNA رونویسی شده از این هدف را با کمک کمپلکس آنزیمی RISC ، (RNA-induced silencing complex) تجزیه می‌کنند. به کارگیری این RNA ها از تکثیر و

پیشرفت انواع عفونت های ویروسی، باکتریایی، انگلی و ... جلوگیری کرده است. اگر چه استفاده از تکنیک RNAi به عنوان یک روش قدرتمند درمانی مطرح می باشد، ولی انتقال siRNA به درون سلول با محدودیت های بسیاری مواجه است. طراحی انواع متعدد حامل ها از جمله نانوپارتیکل ها انقلابی را در انتقال siRNA به پا کرده است. این نانوپارتیکل ها برای غلبه بر یک یا چند سد درون سلولی و خارج سلولی طراحی شده اند. تکنیک RNAi با مطالعات گسترده ای در سراسر دنیا رو به تکامل است. در این مقاله مروری، با استفاده از منابع معتبر علمی، به بررسی استراتژی های اخیر در انتقال siRNA و چالش های بر سر راه و همچنین پیشرفت هایی در زمینه درمان بیماری ها به واسطه siRNA پرداخته می شود. واژه های کلیدی: RNAi، siRNA، خاموشی ژنی، ژن درمانی، نانوپارتیکل ها



□ مقدمه

تداخل RNA مکانیسمی برای خاموشی ژن است که نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن در قارچ ها، گیاهان و حیوانات ایفا می کند و به ابزاری کارآمد برای بررسی عملکرد بسیاری از ژن ها تبدیل شده است. مهره های کلیدی در این فرآیند مولکول RNA کوچکی به نام siRNA و آنزیم های Dicer و Argonaute می باشند. مولکول های siRNA، RNA های دو رشته ای کوچک با طول ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند. این مولکول های siRNA از یک مولکول dsRNA طویل و توسط آنزیم Dicer پردازش می یابند. این مولکول ها دارای انتهای ۵' فسفات، انتهای ۳' هیدروکسیل و همچنین یک overhang دو نوکلئوتیدی در انتهای ۳' می باشند. آنزیم Dicer یک ریبونوکلئاز می باشد و dsRNA طویل را به گونه ای پردازش می کند که در انتهای ۳' حاوی یک overhang دو نوکلئوتیدی باشد. مولکول Argonaute نیز یک اندونوکلئاز و جزء اصلی کمپلکس RISC می باشد (۱).

□ مکانیسم تداخل RNA^۲

در طی این فرآیند، RNA دو رشته ای طویل توسط آنزیم ریبونوکلئاز Dicer با تجزیه ATP به قطعات کوچک تر با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید شکسته می شود که این قطعات کوچک siRNA نامیده می شوند. سپس siRNA داخل یک کمپلکس چند پروتئینی به نام RISC قرار می گیرد که آنزیم آرگونات جزئی از این کمپلکس می باشد. آرگونات رشته سنس را از siRNA جدا کرده و رشته آنتی سنس به عنوان رشته راهنما در کمپلکس RISC باقی می ماند. پس از آن رشته راهنما، RISC فعال را به سمت mRNA هدف راهنمایی می کند. پس از جفت شدن کامل رشته راهنما، mRNA هدف توسط آنزیم آرگونات تجزیه می شود. با تخریب mRNA بیان ژن متوقف می شود که به این حالت اصطلاحاً خاموشی ژن می گویند (شکل ۱).

یکی از مهم ترین پیشرفت های زیست شناسی کشف siRNA است که به وسیله فرآیندی به نام تداخل RNA قادر به تنظیم بیان ژن می باشد. تداخل RNA فرآیندی است که طی آن توسط یک مولکول RNA دو رشته ای از بیان ژنی معین جلوگیری می شود. مهار بیان ژن، از طریق تجزیه mRNA انجام می شود و به همین دلیل این فرآیند را نوعی مکانیسم خاموشی بعد از رونویسی (PTGS^۱) می نامند. خاموشی RNA برای اولین بار زمانی مشاهده شد که در سال ۱۹۹۰ دانشمندان برای بیان بیشتر آنزیم کالکون سنتاز (CHS) در گیاهان اطلسی در تلاش بودند. کالکون سنتاز یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین است و آنتوسیانین تولیدکننده رنگ دانه های بنفش در گیاه اطلسی می باشد. در این مطالعه با انتظار تولید اطلسی هایی با گلبرگ های با رنگ بنفش تیره، کپی های اضافه از ژن کالکون سنتاز را به گیاه وارد کردند و برخلاف انتظار اطلسی هایی با گلبرگ های کاملاً سفید یا تا حدودی سفید را مشاهده نمودند. پس از بررسی های دقیق تر متوجه شدند که با وارد کردن کپی بیشتر از ژن کالکون سنتاز، هر دو ژن ارائه شده و ژنی که از قبل در گیاه موجود بود، مهار شده اند؛ این فرآیند co-suppression نامیده شد. در سال ۱۹۹۲ خاموشی RNA در قارچ ها توسط Romano و Macino در قارچ Neurospora crassa گزارش شد و Quelling نام گرفت. پس از آن در سال ۱۹۹۸ Fire و همکارانش تداخل ژنتیکی به وسیله RNA را در کرم Caenorhabditis elegans بررسی کردند. آن ها با تزریق dsRNA و همچنین تزریق مجزای هر کدام از رشته های سنس و آنتی سنس، مشاهده نمودند که تزریق dsRNA مکمل یک توالی هدف، نسبت به تزریق هر کدام از رشته های آن به تنهایی به طور قابل ملاحظه ای برای مهار ژن کارآمدتر است. این پدیده تداخل RNA نام گرفت و Fire به منظور طراحی این آزمایش کلیدی در سال ۲۰۰۶ موفق به دریافت جایزه نوبل شد.

- 1- Post-Transcriptional Gene Silencing
- 2- RNA interference

□ طراحی siRNA

بدین منظور، یک دو رشته ای با طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید با استفاده از پایگاه داده ای همچون BLAST طراحی می شود و یک overhang دو نوکلئوتیدی در انتهای ۳' اضافه می شود. لازم به ذکر است که محتوای GC باید بین ۳۰-۷۰ درصد باشد و توالی هدف در حدود ۷۰-۱۰۰ باز قبل از کدون آغاز انتخاب شود.

□ انتقال siRNA و چالش های موجود

جهت انتقال مولکول های siRNA به درون سلول از روش های مختلفی استفاده می شود که از آن جمله می توان به الکتروپوریشن، میکرواینجکشن^۲، استفاده از آنتی بادی ها و سیستم های انتقالی بر پایه فناوری نانو اشاره کرد. یکی از چالش های ابتدایی در درمان بیماری ها بر پایه siRNA، مسئله انتقال آن به درون سلول است. برای استفاده درمانی از siRNA نیاز به وجود حامل هایی است که بتوانند در مدتی که siRNA در گردش خون به سر می برد، از آن محافظت کرده و مستقیماً به سلول هدف تحویل دهند. در این بین حامل های سنتتیک فراوانی وجود دارند که از برهمکنش غیر اختصاصی با اجزای خارج سلولی ممانعت می کنند.

در مقابل عملکرد بالقوه siRNA در درون سلول، یکسری سدهای داخل و خارج سلولی وجود دارند. از جمله چالش های موجود بر سر راه انتقال siRNA به درون سلول، مسئله تخریب داخل عروقی می باشد که علت آن RNase های موجود در فضاهای داخل و خارج سلولی و همچنین کلیرانس کلیوی است که siRNA برهنه را تخریب کرده و نیمه عمر پایین آن را سبب می شود. siRNA برهنه در سرم نیمه عمری از چندین دقیقه تا یک ساعت دارد. به گزارش Reischl D و همکاران، تغییر در بنیان های قندی siRNA توسط OMe/F (2'-Omethyl and 2'-deoxy-2'-fluoro) و یا رابط های فسفوتیوات (phosphorothioate linkages)،

روش موثری برای افزایش پایداری siRNA در داخل سلول و مقاومت به نوکلئازها می باشد. به علاوه نانوپارسیکل ها از جمله حامل هایی هستند که می توانند از تخریب داخل عروقی siRNA جلوگیری کنند، ولی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوپارسیکل ها ممکن است توسط اجزای سیستم ایمنی بدن بیگانه تلقی شود و اجزای کمپلمان فعال شده و موجبات تخریب زودرس نانوپارسیکل ها را فراهم کنند (۲). مولکول siRNA، قطبی و دارای بار منفی است و به راحتی و از طریق انتشار ساده از غشای سلولی عبور نمی کند. Felgner و همکاران در رابطه با لیپوزوم های تشکیل شده از فسفولیپید کاتیونیک DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane) نشان دادند که لیپوزوم های با بار مثبت با اتصال به DNA با بار منفی، کمپلکسی را تشکیل می دهند که در آن DNA توسط لیپوزوم های باردار احاطه شده است. اتصال این کمپلکس به غشا موجب ورود DNA به درون سلول می شود (شکل ۲).

مولکول های siRNA توسط کونژوگه شدن با مولکول هایی همچون نانوپارسیکل ها، آنتی بادی ها، آپتامرها و ... به سلول های مختلف تحویل داده شده و توسط اندوسیتوز با واسطه رسپتور جذب سلول می شوند. siRNA های اندوسیتوز شده تحت عنوان اندوزوم اولیه، با سایر اندوزوم ها الحاق شده و اندوزوم ثانویه را به وجود می آورند. اندوزوم های ثانویه سپس در طی یک مسیر سلولی، به لیزوزوم اسیدی که PH معادل ۴/۵ دارد، می پیوندند. لیزوزوم مملو از آنزیم های اندونوکلیاز مختلف می باشد که تخریب siRNA را موجب می شود؛ بنابراین برای پیشبرد خاموشی ژنی، لازم است قبل از ادغام با لیزوزوم، siRNA ها از اندوزوم به سیتوزول بگریزند (شکل ۳).

یکی از مکانیسم های فرار از اندوزوم، استفاده از لیپیدها و لیپوپلیکس های حساس به pH (pH-Responsive polymers) می باشد که در محیط اسیدی اندوزوم پروتونه می شوند. جذب یون ها باعث عدم تعادل اسمزی، ترکیدن اندوزوم و آزاد سازی siRNA به سیتوپلاسم می شود. پلی اتیلن

3- Microinjection



الکترواستاتیک با اسیدنوکلئیک های با ابر منفی، شرایط ایده آلی را برای انتقال siRNA دارا هستند.

پپتیدهای CADY و MPG-8 نیز با داشتن بار مثبت با اسیدنوکلئیک های با بار منفی برهمکنش داده و lipoplex ها را ایجاد می کنند و در نتیجه برای انتقال siRNA گزینه بسیار مناسبی هستند (۵). پروتئین جدیدی به نام CPP (Cell-Penetrating Peptide) نیز می تواند ضمن اتصال به siRNA، آن را از تجزیه حفظ کرده و به سلول های مختلف انتقال دهد (۶).

۲- نانو لیپوزوم های خنثی همچون DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) به طور رایج در انتقال siRNA به کار می روند و نسبت به نانولیپوزوم کاتیونیک DOTAP، ده برابر موثرتر بوده و تا کنون پاسخ ایمنی خاصی را به همراه نداشته است (۷).

۳- پلیمرهای سنتتیک همچون کیتوزان، سیکلودکسترین، PEI (Polyethylenimine) و Dendrimer ها از جمله حامل های موثر برای انتقال siRNA محسوب می شوند. کیتوزان که از مشتقات کیتین می باشد، ماده ای غیر ایمونوژن، زیست سازگار و زیست تخریب پذیر می باشد و از آنجا که زیست تخریب پذیری، پلیمر را به اندازه ای کوچک تر تبدیل می کند تا دفع کلیوی آن امکان پذیر باشد، کیتوزان به حامل مناسبی برای انتقال siRNA تبدیل شده است. به گزارش Han و همکاران، نشان دار کردن ذرات کیتوزان با پپتید Arg-Gly-Asp، منجر به هدف قرار دادن سلول های اندوتلیال مرتبط با تومور توسط آن ها خواهد شد (۸).

سیکلودکسترین ها الیگومرهای حلقوی از گلوکز با ساختار آمفی پاتیک هستند و در دوزهای پایین توسط سیستم ایمنی تحمل می شوند و پاسخی را به همراه ندارند. تحقیقات اخیر نشان می دهد، گاما سیکلو عکس ترین به دلیل حلالیت زیاد و بر همکنش قوی، در مقایسه با ایزو فرم های آلفا و بتا، گزینه موثرتری به عنوان حامل می باشد.

آمین (PEI)، از مهم ترین پلیمرهای حساس به pH می باشد (۳)، همچنین اخیرا از پلیمرهای حاوی ایمیدازول نیز استفاده می شود. در سال ۲۰۲۰ نیز نوعی پلیمر Curdlan حساس به pH، که نوعی پلی ساکراید خطی می باشد، به عنوان حامل siRNA برای درمان سرطان طراحی و معرفی شد (۴).

یکی از موانع بسیار مهم در مسیر انتقال siRNA به درون سلول، جذب به واسطه سیستم رتیکولاندوتلیال (RES)^(۹) می باشد. RES از سلول های فاگوسیتی شامل مونوسیت های در حال گردش و ماکروفاژهای بافتی تشکیل شده است که عملکرد بیولوژیکی هر کدام پاکسازی پاتوژن های خارجی و حذف باقی مانده سلولی و سلول های آپوپتوتیک است. ماکروفاژها در بافت هایی همچون کبد، طحال و بافت هایی که جریان خون بالایی دریافت می کنند، بسیار فراوان هستند. بنابراین شگفت آور نیست که این اندام ها غلظت بالایی از siRNA را پس از تزریق سیستمیک، انباشته می کنند. گیرنده سطح سلولی ماکروفاژها و نوتروفیل ها، بعضا نانوپارتیکل ها را بیگانه تلقی می کنند و قبل از انتقال siRNA به درون سلول آن را برهنه کرده و در نتیجه مانع از یک siRNA Delivery موفق می شوند.

در سلول های ایمنی پستانداران یک زیر خانواده از رسپتورهای شناسایی کننده الگو به نام TLRs بیان می شوند که الگوهای مولکولی همراه شده با پاتوژن، شامل CpG متیله نشده و dsRNA ویروسی را شناسایی می کنند. TLR3، TLR7 و TLR8 در سطح برخی از سلول های ایمنی، siRNA های دو رشته ای را بیگانه تلقی می کنند و موجب تخریب آن ها قبل از انتقال می شوند.

□ حامل های مورد استفاده در انتقال siRNA

۱- لیپیدهای کاتیونیک همچون DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) به دلیل دارا بودن بار مثبت و توانایی برهمکنش

4- Reticulo Endothelial System



(سطح بسیار پایین اکسیژن در بافت) نشان دار می کند، به عنوان عاملی در افزایش میزان $HIF-1\alpha$ شناخته شده که افزایش $VEGF$ و $iNOS$ را به دنبال دارد. $VEGF$ و $iNOS$ دو مولکول کمک کننده در رگ زایی و ایجاد رگ های مقاوم به نشستی هستند. از دیگر اهداف $siRNA$ برای سرکوب، $GNAS1$ برای القای استخوان سازی، NgR برای القای ترمیم عصب و $HOXB13$ برای کمک در ترمیم زخم می باشد. جدول ۱ دیگر اهداف درمانی $siRNA$ را نشان می دهد.

□ $siRNA$ و درمان بیماری ها

اگر چه استفاده از $siRNA$ در درمان بیماری ها، پیشینه ای طولانی ندارد، ولی در سال های اخیر پیشرفت های بسیاری در این زمینه انجام گرفته است که در ادامه به تعدادی چند از آن ها اشاره خواهد شد.

□ سرطان ها

انواع متعددی از جهش های ژنی در سلول ها می توانند منجر به سرطان شوند. تقریباً یک سوم از داروهای درمانی مبتنی بر $siRNA$ در آزمایش های بالینی، سرطان را مورد هدف قرار داده اند. استفاده از $siRNA$ ها در درمان سرطان، امکان هدف گذاری اختصاصی ژن های مرتبط با سرطان از جمله گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی ($EGFR$), $p53$ و هیستون دآستیلاز ($HDAC$) را فراهم می کند. به طور کلی، فعال سازی ژن های تحریک کننده تومور و غیرفعال سازی ژن های مهار کننده تومور در ایجاد و پیشرفت سرطان دخیل هستند. اختصاصیت بالای $siRNA$ از ویژگی های منحصر به فرد آن در درمان سرطان ها محسوب می شود. واریانت های مختلف $EGFR$ اهداف جذابی در تحقیقات $siRNA$ به منظور مهار رگ زایی تومور هستند. در مدل های سرطان ریه، برخی از ژن های جهش یافته $EGFR$ به طور خاص با $siRNA$ ترکیب شده اند و نتایج بیان ژن $EGFR$ یک اثر درمانی قابل توجه را نشان می دهد. اخیراً تحقیقات مهمی پیرامون هدف گیری $KRAS$ و $p53$ توسط $siRNA$ به منظور درمان تومورهای ریه انجام شده که به شدت مورد توجه قرار گرفته است.

Dendrimer ها دارای یک هسته مرکزی هستند که چندین بازو به آن متصل است. **PAMAM** (Polyamidoamine)، از جمله **Dendrimer** هایی است که با ایجاد سوراخ های کوچک در سطح غشا موجب نفوذ پذیری غشا می شود و به دلیل سمیت کمتر و وزن مولکولی کنترل شده، نسبت به پلیمرهای کاتیونیک، انتقال موثرتری را سبب می شوند.

۴- لیپیدها و ترکیبات کلسترول همچون **PEC** (poly-electrolyte complex)، به دلیل آب گریزی تشکیل میسل می دهند و انتقال موثر $siRNA$ را بدون ایجاد هیچ گونه سمیتی، سبب می شوند. همراه کردن $siRNA$ با ترکیبات کلسترول همچون HDL ، موجب انتقال موثر $siRNA$ به بافت های انتخابی همچون کبد می شود.

□ کار آزمایشی های بالینی در انتقال $siRNA$

طبق آخرین تحقیقات انجام شده در رابطه با منشأ بیماری های التهابی و سرطان ها، اغلب این ناهنجاری ها منشأ ژنی دارند. سرکوب بیان ژن موثر در ایجاد بدخیمی ها، موفقیت های بزرگی را در درمان انواعی از سرطان ها، کارسینوماها و لوسمی ها به همراه داشته است (۹). داروهای مختلفی مانند $Atu027$ ، $TKM-080301$ و $siG12D$ در زمینه درمان انواع مختلف سرطان به موفقیت هایی دست یافته اند. از آنجا که تجزیه و تحلیل عوارض جانبی دارو و بررسی حداکثر دوز قابل تحمل، از شاخص های مهم در بررسی کیفیت دارو می باشد، اکثر این داروها هنوز در مرحله اول کارآزمایی بالینی خود قرار دارند. به نظر می رسد مکانیسم های تحویل برای این داروها از نظر بالینی مناسب و کارآمد بوده است (۱۰). در سال ۲۰۱۸، داروی $siG12D$ به مرحله دوم کارآزمایی بالینی ارتقاء یافت. مرحله اول کارآزمایی با مشارکت بیش از ۱۵ بیمار انجام شد و هیچ بیماری سمیت نسبت به دارو نشان نداد.

سرکوب بیان ژن در سطح پس از نسخه برداری همچنین، از تکثیر عفونت های ویروسی بسیاری ممانعت کرده است. برای مثال سرکوب $PHD2$ که یک پرولیل هیدروزیلاز بوده و $HIF-1\alpha$ را برای تجزیه شدن در $normoxia$



siRNA ها در عفونت ویروس سین‌سیشیال تنفسی (RSV) و پارا آنفلانزا ویروس (PIV) نیز تأیید شده است. همچنین استفاده از siRNA ها در درمان فیبروز کیستیک با هدف‌گیری کانال سدیم اپیتلیالی (ENaC)، مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به بازده عالی انتقال پلیمرهای کاتیونی، مواردی مانند PEI اغلب به طور موفقیت آمیز برای تحویل داروهای siRNA به ریه ها مورد استفاده قرار می گیرند (۱۳).

□ عفونت های کبدی

ویروس هپاتیت، انواع مختلفی داشته که از آن جمله می توان به هپاتیت B و C اشاره کرد. این عفونت های ویروسی نیمه عمر طولانی داشته و اگر درمان نشوند عوارض دیگری همچون سیروز کبدی و سرطان کبد را موجب می شوند. استفاده از داروهای ضد ویروسی و تعدیل عملکرد سیستم ایمنی یک درمان روتین برای بیماران آلوده به هپاتیت است، اما عوارض سمی اثر بخشی این رژیم درمانی را محدود می کند. siRNA ها پتانسیل درمانی بالایی برای درمان این گونه عفونت ها با هدف گیری ژن ویروس هپاتیت B و C در کبد را دارا می باشند و استفاده از لیپوزوم ها و پلیمرهای کاتیونی تحویل آن ها را تسهیل می کند (۱۴).

□ نتیجه گیری

علی رغم کاربرد اصلی RNAi در یافتن مسیرهای تشخیص عملکرد ژن ها، امروزه استفاده از siRNA با به کارگیری سرکوب بیان ژن در سطح پس از نسخه برداری، در درمان بیماری های بی شماری کمک کننده می باشد. به علت گستردگی زیاد مرگ و میر در بیماری هایی همچون سرطان ها، استفاده از روش های درمانی موثر و به موقع مورد توجه قرار گرفته است؛ از این رو تکنولوژی RNAi به دلیل سرکوب بیان یک ژن کلیدی که منجر به توقف مسیرهای پایین دستی می شود، به یک سطح وسیع و گسترده ای از درمان بیماری های انسانی پیشرفت کرده است و امروزه درمان مبتنی بر siRNA به عنوان یک رویکرد ضد سرطان، امیدوار کننده است و تعداد کمی از کار آزمایشی های بالینی

ترکیب miR-34a (که p53 را در پایبندست بازایی می کند) و KRAS siRNA تومورهای ریه را درمان می کند و موجب افزایش آپوپتوز و کاهش حجم تومور می شود. از سوی دیگر، رونوشت بردار معکوس تلومراز انسانی (hTERT) در سلول های سرطان سینه و سلول های کبدی به شدت بیان می شود. استفاده از hTERT siRNA با هدف قرار دادن bioreducible PEI (SS-PEI) می تواند سطوح فعالیت تلومراز را کاهش داده و در درمان یا کندی پیشرفت تومور نقش به سزایی ایفا کند (۱۱).

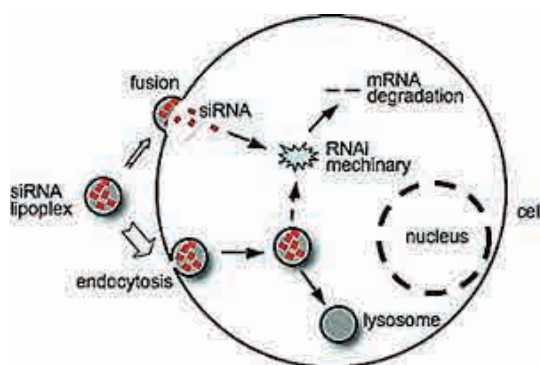
□ بیماری های چشمی

استفاده از siRNA در درمان بیماری های چشمی مؤثر بوده است. siRNA ها در بسیاری از آزمایش های بالینی بیماری های چشمی مانند دژنراسیون ماکولا (AMD)، نوروپاتی قدامی عصب بینایی غیر شریانی (NAION) و گلوکوم استفاده شده اند. رگ زایی نوزادان علت اصلی AMD و رتینوپاتی دیابتی است. مطالعات نشان می دهند که siRNA هایی که فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) را هدف قرار می دهند، موجب مهار رگ زایی در بیماران مبتلا به AMD می شوند. متداول ترین روش تحویل، از طریق تزریق درون چشمی siRNA برهنه به قسمت پشتی چشم است. ارسال نسبتاً آسان دارو به محل هدف مورد نظر، siRNA را به یکی از گزینه های درمانی در بسیاری از بیماری های چشمی تبدیل کرده است (۱۲).

□ بیماری های تنفسی

مطالعات اخیر در زمینه درمان بیماری های تنفسی، امکان استفاده از siRNA ها را در درمان واکنش های التهابی در ارتباط با آسم، عفونت آنفلانزا، فیبروز کیستیک و ویروس سین‌سیشیال تنفسی (RSV) مطرح کرده اند. موش های حامل تومور H69 که بیان بالای پروتئین G را نشان می دهند، ابزارهایی برای مطالعه سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) هستند. نتایج تحقیقات نشانگر کاهش قابل توجه تومورزایی در نتیجه ناک اوت پروتئین G می باشد. تحویل siRNA به مناطق حفاظت شده از ژن ویروس آنفلانزا یا ژن نوکلئوکپسید، از عفونت آنفلانزا جلوگیری کرده و آن را درمان می کند. اثر بخشی

لیپید دو لایه دارای بار مثبت می باشد و از این رو به سادگی به غشای سلولی دارای بار منفی، جذب می شود. در ادامه مسیر، با فرآیند اندوسیتوز یا با ادغام لیپوپلکس با غشای سلول، محتوای نوکلئیک اسید به سیتوزول آزاد می شود (۱۶).

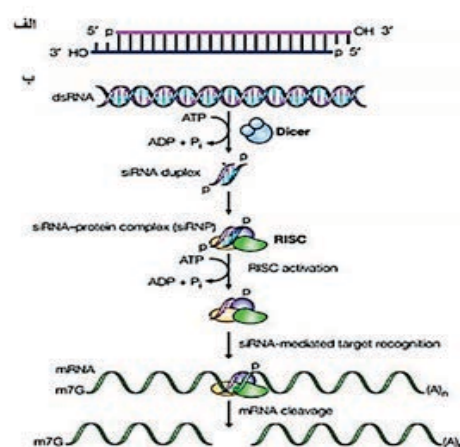


شکل ۳- گریز siRNA از اندوزوم اسیدی به سیتوزول خنثی، به منظور یک انتقال siRNA موفق ناتوانی siRNA ها از گریز به سمت سیتوزول، موجب تخریب آن ها توسط آنزیم های موجود در اندوزوم اسیدی و در نتیجه عدم موفقیت در دستیابی به mRNA هدف می شود (۱۷).

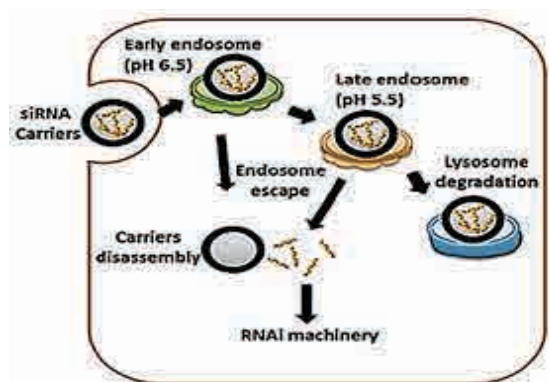
جدول ۱- نمونه هایی از siRNA های درمانی که به طور موفقیت آمیز برای خاموش کردن ژن هدف در vivo استفاده می شوند

توالی siRNA (رشته ی سنس)	ژن هدف	هدف (بیماری)
5'-UCAUCGUCGUAGUUGGUUG-3'	MMP2	قلب (آترواسکلروز)
5'-GGGAGGUGCCCGAACGAUAAUU-3'	MAPK14	ریه (بیماری مزمن انسدادی ریه)
5'-GUCAUCACACUGAAUACCAA* U-3'	ApoB	کبد (کلسترول بالا)
5'-GUAGAGACACCCUAAAGUAUU-3'	GAD67	مغز (صرع، اسکیزوفرنی، پارکینسون)
5'-AAGCUCACCUGAGGACUCATT-3'	KLF5	تومور (xenograft)
5'-CGAUGAAGCCUGGAGUGCTT-3'	VEGF	تومور (xenograft)
5'-GGCGAAGAUAACAUGGCATT-3'	Cy-B1	تومور (xenograft)

در ارتباط با تومورهای جامد تکمیل شده است. امید می رود خاموش کردن ژن ها بتواند به درمان بیماری های ویروسی، قلبی، سرطان های بدخیم و خصوصا عوامل بیماری زای مقاوم به چند دارو، بیانجامد که این مهم، تداوم مطالعات پیوسته و گسترده را می طلبد و قطع به یقین، نقش تعیین کننده ای در آینده زیست پزشکی ایفا می کند.



شکل ۱- الف) ساختار siRNA، ب) مسیر siRNA در طی این مسیر، dsRNA توسط یک عضو از خانواده RNase III به نام Dicer، در یک واکنش وابسته به ATP به siRNA بریده می شود. این siRNA سپس در کمپلکس RISC قرار گرفته، تک رشته ای می شود و طی هدایت کمپلکس به سمت mRNA هدف، موجبات مهار بیان هدف را فراهم می کند (۱۵).



شکل ۲- ادغام لیپوپلکس siRNA با غشای سلولی

References

- 1- Qureshi A, Tantray VG, Kirmani AR, Ahangar AG. A review on current status of antiviral siRNA. *Reviews in medical virology*. 2018:e1976.
- 2- Frede A, Neuhaus B, Klopffleisch R, Walker C, Buer J, Muller W, et al. Colonic gene silencing using siRNA-loaded calcium phosphate/PLGA nanoparticles ameliorates intestinal inflammation in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;222:86-96.
- 3- Peng SF, Hsu HK, Lin CC, Cheng YM, Hsu KH. Novel PEI/Poly-gamma-Gutamic Acid Nanoparticles for High Efficient siRNA and Plasmid DNA Co-Delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2017;22(1).
- 4- Su Z, Erdene-Ochir T, Ganbold T, Baigude H. Design of curdlan-based pH-sensitive polymers with endosome buffering functionality for siRNA delivery. *International journal of biological macromolecules*. 2020;146:773-80.
- 5- Vaissiere A, Aldrian G, Konate K, Lindberg MF, Jourdan C, Telmar A, et al. A retro-inverso cell-penetrating peptide for siRNA delivery. *Journal of nanobiotechnology*. 2017;15(1):34.
- 6- Zhang D, Wang J, Xu D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2016;229:130-9.
- 7- Alamoudi K, Martins P, Croissant JG, Patil S, Omar H, Khashab NM. Thermoresponsive pegylated bubble liposome nanovectors for efficient siRNA delivery via endosomal escape. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2017;12(12):1421-33.
- 8- Corbet C, Ragelle H, Pourcelle V, Vanvarenberg K, Marchand-Brynaert J, Preat V, et al. Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;223:53-63.
- 9- Liu T, Wang L, Xin H, Jin L, Zhang D. Delivery Systems for RNA Interference-Based Therapy and Their Applications Against Cancer. *Science of Advanced Materials*. 2020;12(1):75-86.
- 10- Kaushik M, Raghunand R, Maheshwari S. Exploring Promises of siRNA in Cancer Therapeutics. *Current Cancer Therapy Reviews*. 2020;16(1):29-35.
- 11- Batool R, Akhtar W, Aziz E. *Pharmacogenetics in Cancer Treatment: Challenges and Recent Trends*. 'Essentials of Cancer Genomic, Computational Approaches and Precision Medicine: Springer; 2020. p. 423-30.
- 12- Levin LA. siRNA in neuroretinal disease: from dream to reality. *Acta Ophthalmologica*. 2019;97.
- 13- Dua K, Wadhwa R, Singhvi G, Rapalli V, Shukla SD, Shastri MD, et al. The potential of siRNA based drug delivery in respiratory disorders: Recent advances and progress. *Drug development research*. 2019;80(6):714-30.
- 14- Flisiak R, Jaroszewicz J, Łucejko M. siRNA drug development against hepatitis B virus infection. *Expert opinion on biological therapy*. 2018;18(6):609-17.
- 15- Tatiparti K, Sau S, Kashaw SK, Iyer AK. siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*. 2017;7(4):77.
- 16- Lu JJ, Langer R, Chen J. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Molecular pharmaceuticals*. 2009;6(3):763-71.
- 17- Xu C-f, Wang J. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *asian journal of pharmaceutical sciences*. 2015;10(1):1-12.