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

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

● 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 زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های 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 به‌کار 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 ۲۳-۲۱ 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 ژن‌ها 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. تکنیکRNAi 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 بیماری‌ها به واسطه siRNA پرداخته می شود.

واژه های کلیدی: RNAi ، siRNA، خاموشی ژنی، ژن درمانی، نانوپارتیکل ها

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

❑ مقدمه

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 رشته‌ای 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[1]) 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 اطلسی‌هایی 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 کاملا سفید یا تا حدودی سفید را مشاهده نمودند. پس از بررسی های دقیق‌تر 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.

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 آنزیم‌های Dicer و Argonaute می باشند. مولکول‌های siRNA ، RNA های دو رشته‌ای 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 Dicerیک 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 می‌باشد (۱).

❑ مکانیسم تداخل RNA[2]

در طی این فرآیند، RNA دو رشته ای طویل توسط آنزیم ریبونوکلئاز Dicer با تجزیه ATP به قطعات کوچک تر با طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید شکسته می شود که این قطعات کوچک siRNA نامیده می شوند. سپس siRNA داخل یک کمپلکس چند پروتئینی به نام RISC قرار می‌گیرد که آنزیم آرگونات جزیی از این کمپلکس می‌باشد. 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 تخریبmRNA بیان ژن متوقف می شود که به این حالت اصطلاحاً خاموشی ژن می گویند (شکل ۱).

1- Post-Transcriptional Gene Silencing
2- RNA interference

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

❑ 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 ۷۰-۳۰ درصد باشد و توالی هدف در حدود ۱۰۰-۷۰ 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 می‌توان به الکتروپوریشن، میکرواینجکشن[۳]، 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 مستقیما 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 چالش‌های 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 رابطهای فسفوتیوآت (phosphorothioate linkages)، روش موثری برای افزایش پایداری siRNA در داخل سلول و مقاومت به نوکلئازها می باشد. به علاوه نانوپارتیکل‌ها از جمله حامل هایی هستند که می توانند از تخریب داخل عروقی siRNA جلوگیری کنند، ولی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوپارتیکل ها ممکن است توسط اجزای سیستم ایمنی بدن بیگانه تلقی شود و اجزای کمپلمان فعال‌شده و موجبات تخریب زودرس نانوپارتیکل 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 نمی‌کند. 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 می‌شود (شکل ۲).

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

یکی از مکانیسم های فرار از اندوزوم، استفاده از لیپیدها و لیپوپلکس های حساس به pH (pH-Responsive polymers) می‌باشد 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

آمیـــن (PEI)، از مهـــم ترین پلیمرهای حســـاس به pH می‌باشد (۳)، همچنین اخیرا از پلیمرهای حاوی ایمیدازول نیز اســـتفاده می شـــود. در ســـال ۲۰۲۰ نیز نوعی پلیمر Curdlan حســـاس به pH، که نوعی پلی‌ساکارید خطی می باشـــد، به عنوان حامل siRNA برای درمان ســـرطان طراحی و معرفی شد (۴).

یکی از موانع بســـیار مهم در مســـیر انتقال siRNA به درون ســـلول، جذب به واسطه سیســـتم رتیکولواندوتلیال (RES[4])، مـــی باشـــد. RES از ســـلول های فاگوســـیتی شـــامل مونوســـیت‌های در حـــال گـــردش و ماکروفاژهای بافتی تشـــکیل شده اســـت که عملکرد بیولوژیکی هر کدام پاکســـازی پاتوژن های خارجی و حذف باقی مانده سلولی و ســـلول های آپوپتوتیک اســـت. ماکروفاژها در بافت هایی همچون کبد، طحال و بافـــت هایی که جریان خون بالایی دریافت می کنند، بسیار فراوان هستند. بنابراین شگفت آور نیســـت که این اندام ها غلظت بالایی از siRNA را پس از تزریق سیستمیک، انباشته می کنند. گیرنده سطح سلولی ماکروفاژهـــا و نوتروفیل ها، بعضا نانوپارتیـــکل 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 ســـلول های ایمنی پســـتانداران یک زیـــر خانواده از رســـپتورهای شناســـایی کننده الگو به نـــام TLRs بیان می‌شوند که الگوهای مولکولی همراه شده با پاتوژن، شامل CpG متیله نشـــده و dsRNA ویروســـی را شناســـایی می‌کننـــد. TLR3،TLR7 و TLR8 در ســـطح برخی از سلول‌های ایمنی، siRNA های دو رشته ای را بیگانه تلقی می‌کنند و موجب تخریب آن ها قبل از انتقال می شوند.

❑ حامل های مورد استفاده در انتقال siRNA

۱- لیپیدهـــای کاتیونیـــک همچـــون DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) به دلیـــل دارا بـــودن بـــار مثبـــت و توانایـــی برهمکنش الکترواستاتیک با اســـیدنوکلئیک های با ابر منفی، شرایط ایده آلی را برای انتقال siRNA دارا هستند.

پپتیدهـــای CADY و MPG-8 نیـــز بـــا داشـــتن بار مثبت با اســـیدنوکلئیک های با بـــار منفی برهمکنش داده و lipoplexهـــا را ایجاد می کنند و در نتیجه برای انتقال siRNA گزینه بســـیار مناســـبی هســـتند (۵). پروتئین جدیدی به نـــام(Cell-Penetrating Peptide) CPP نیز می تواند ضمن اتصال به siRNA، آن را از تجزیه حفظ کرده و به سلول های مختلف انتقال دهد (۶).

۲- نانـــو لیپـــوزوم هـــای خنثـــی همچـــون DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) به طور رایج در انتقال siRNA به کار می روند وDOPC نسبت به نانولیپوزوم کاتیونیک DOTAP ، ده برابر موثرتر بـــوده و تا کنون پاســـخ ایمنی خاصی را به همراه نداشـــته است (۷).

۳- پلیمرهای سنتتیک همچون کیتوزان، سیکلودکسترین، PEI (Polyethylenimine) و Dendrimer هـــا از جملـــه حامل هـــای موثر برای انتقال siRNA محســـوب می‌شوند. کیتوزان که از مشتقات کیتین می باشد، ماده‌ای غیر ایمونوژن، زیست سازگار و زیست تخریب پذیر می باشد و از آنجا که زیســـت تخریب پذیری، پلیمـــر را به اندازه‌ای کوچـــک تر تبدیل می کند تا دفع کلیـــوی آن امکان پذیر باشـــد، کینتوزان به حامل مناســـبی برای انتقال siRNA تبدیل شـــده اســـت. به گزارشHan و همکاران، نشان دار کـــردن ذرات کیتوزان با پپتید Arg-Gly-Asp، منجر به هدف قرار دادن سلول های اندوتلیال مرتبط با تومور توسط آن ها خواهد شد (۸).

سیکلودکســـترین هـــا الیگومرهای حلقـــوی از گلوکز با ســـاختار آمفی پاتیک هســـتند و در دوزهای پایین توسط سیستم ایمنی تحمل می شوند و پاسخی را به همراه ندارند. تحقیقات اخیر نشـــان می‌دهد، گاما سیکلو عکس ترین به دلیـــل حلالیت زیاد و بر همکنش قوی، در مقایســـه با ایزو فرم‌های آلفا و بتا، گزینه موثرتری به عنوان حامل می باشد.

4- Reticulo Endothelial System

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

Dendrimerها 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, LDL موجب انتقال موثر siRNA به بافت های انتخابی همچون کبد می شود.

❑ کار آزمایی های بالینی در انتقال siRNA

طبق آخرین تحقیقات انجام شده در رابطه با منشا بیماری‌های التهابی و سرطان ها، اغلب این ناهنجاری‌ها منشا ژنی دارند. سرکوب بیان ژن موثر در ایجاد بدخیمی‌ها، موفقیت های بزرگی را در درمان انواعی از سرطان‌ها، کارسینوماها و لوسمی ها به همراه داشته است (۹). داروهای مختلفی مانند TKM-080301، Atu027 و siG12D در زمینه درمان انواع مختلف سرطان به موفقیت‌هایی 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 می‌رسد 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-1α را برای تجزیه شدن در normoxia (سطح بسیار پایین اکسیژن در بافت) نشان دار می کند، به عنوان عاملی در افزایش میزان HIF-1α 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 نشتی 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 بیماری‌ها، پیشینه‌ای طولانی ندارد، ولی در سال های اخیر پیشرفت‌های بسیاری در این زمینه انجام گرفته است که در ادامه به تعدادی چند از آن ها اشاره خواهد شد.

❑ سرطان‌ها

انواع متعددی از جهش های ژنی در سلول ها می توانند منجر به سرطان شوند. تقریبا 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 دِاَستیلاز (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 سرطان‌ها محسوب می شود. واریانت های مختلف EGFR اهداف جذابی در تحقیقات siRNA به منظور مهار رگ‌زایی 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 می‌دهد. اخیرا 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.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

ترکیب miR-34a (که p53 را در پایینـدسـت بازیابی 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 شـود. 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 پیشـرفت تومور نقش به سزایی ایفا کند (۱۱).

❑ بیماری های چشمی

استفاده از siRNA در درمان بیماری های چشمی مؤثر بوده اسـت. siRNA ها در بسیاری از آزمایش های بالینی بیماری های چشـمی مانند دژنراسیون ماکولا (AMD)، نوروپاتـی قدامی عصب بینایی غیر شـریانی (NAION) و گلوکوم اسـتفاده شـده اند. رگ زایی نوزادان علت اصلی AMD و رتینوپاتی دیابتی است. مطالعات نشان می‌دهند کـه siRNA هایـی که فاکتور رشـد اندوتلیـال عروقی (VEGF) را هدف قرار مـی دهند، موجب مهار رگ زایی در بیماران مبتلا به AMD می شـوند. متداول ترین روش تحویل، از طریق تزریق درون چشـمی siRNA برهنه به قسـمت پشتی چشم است. ارسال نسبتا آسان دارو به محل هـدف 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 اسـتفاده از siRNA ها را در درمان واکنش های التهابی در ارتباط با آسـم، عفونت آنفولانزا، فیبروز کیستیک و ویروس سین‌سیشیال تنفسـی (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 siRNA هـا در عفونت ویروس سین‌سیشـیال تنفسـی (RSV) و پارا آنفولانزا ویروس (PIV) نیز تأیید شـده 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، مـواردی مانند PEI اغلب به طور موفقیت آمیز برای تحویل داروهـای siRNA به ریه ها مورد اسـتفاده قرار می گیرند (۱۳).

❑ عفونت های کبدی

ویـروس هپاتیت، انواع مختلفی داشـته که از آن جمله مـی توان به هپاتیت B و C اشـاره کرد. این عفونت های ویروسـی نیمه عمر طولانی داشـته و اگر درمان نشـوند عوارض دیگری همچون سـیروز کبدی و سـرطان کبد را موجب می شوند. استفاده از داروهای ضد ویروسی و تعدیل عملکرد سیسـتم ایمنی یک درمان روتیـن برای بیماران آلوده به هپاتیت است، اما عوارض سمی اثر بخشی این رژیم درمانـی را محدود می‌کند. siRNA ها پتانسـیل درمانی بالایی برای درمان این گونـه 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 تسـهیل می کند (۱۴).

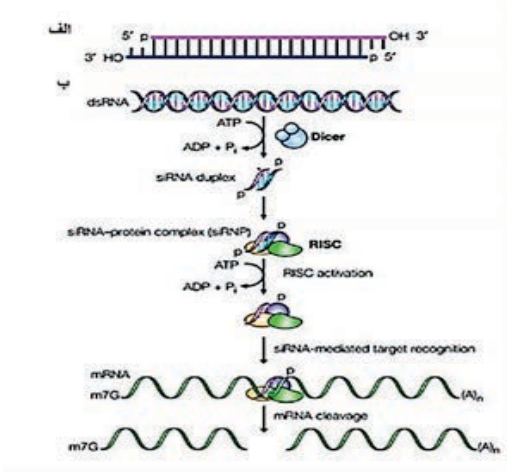
❑ نتیجه گیری

علـی رغم کاربرد اصلـی RNAi در یافتن مسـیرهای تشـخیص عملکرد ژن ها، امروزه استفاده از siRNA با به کارگیری سـرکوب بیان ژن در سطح پس از نسخه برداری، در درمان بیماری های بی شماری کمک کننده می باشد. به علت گسـتردگی 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 سـرکوب بیان یک ژن کلیدی که منجر به توقف مسیرهای پایین دسـتی می شود، به یک سطح وسیع و گسترده ای از درمان بیماری های انسـانی پیشـرفت کرده است و امروزه درمان مبتنی بر siRNA به عنوان یک رویکرد ضد سرطان، امیدوار کننده اسـت و تعداد کمی از کار آزمایی های بالینی

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

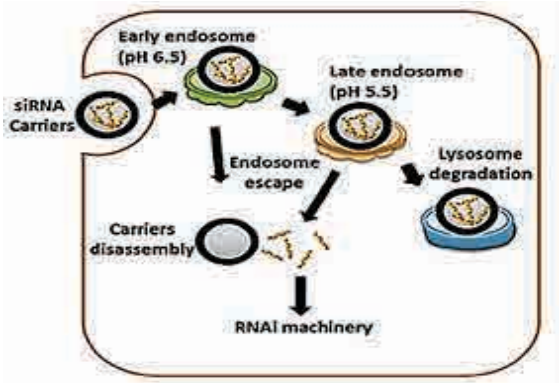
در ارتباط با تومورهای جامد تکمیل شده است.

امید مـــی رود خاموش کـــردن ژن ها بتوانـــد به درمان بیماری‌های ویروســـی، 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.



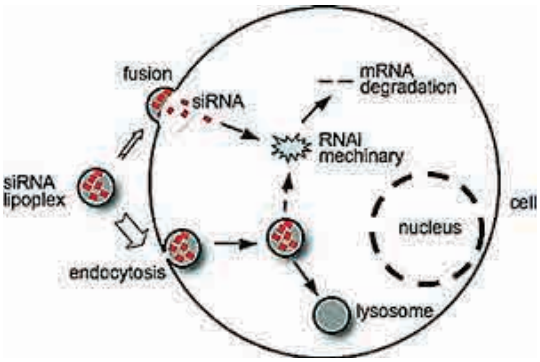
شکل ۱- الف) ساختار siRNA، ب) مسیر siRNA

در طی این مسیر، dsRNA توسط یک عضو از خانواده RNase III بـــه نام Dicer، در یک واکنش وابســـته 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 ســـمت mRNA هدف، موجبات مهار بیان هدف را فراهم می کند (۱۵).



شکل ۲- ادغام لیپوپلکس siRNA با غشای سلولی

لیپیـــد دو لایه دارای بار مثبت می باشـــد و از این رو به سادگی به غشای ســـلولی دارای بار منفی، جذب می شود. در ادامه مسیر، با فرآیند اندوســـیتوز یا با ادغام لیپوپلکس با غشای ســـلول، محتوای نوکلئیک اسید به سیتوزول آزاد می‌شود (۱۶).



شکل ۳- گریز siRNA از اندوزوم اسیدی به سیتوزول خنثی، به منظور یک انتقال siRNA موفق

ناتوانی siRNA ها از گریز به ســـمت سیتوزول، موجب تخریب آن ها توســـط آنزیم های موجود در اندوزوم اسیدی و در نتیجه عدم موفقیت در دســـتیابی 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 in vivo استفاده می شوند

توالی siRNA (رشته‌ی سنس)	ژن هدف	هدف (بیماری)
5′-UCAUCGUCGUAGUUGGUUG-3′	MMP2	قلب (آترواسکلروز)
5′-GGGAGGUGCCCGAACGAUAUU-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′-CGAUGAAGCCCUGGAGUGCTT-3′	VEGF	تومور (xenograft)
5′-GGCGAAGAUCAACAUGGCATT-3′	Cy-B1	تومور (xenograft)

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

Downloaded from labdiagnosis.ir at 14:39 +0430 on Wednesday July 8th 2020

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, Klopfleisch 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 pharmaceutics. 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.