RNA کوچک مداخله‌گر (siRNA)

محمد ابوطالب، نرجس محمدی بندری*

دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵)

چکیده

بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌ها هم‌چنان به‌عنوان علل عمده مرگ در سراسر جهان مطرح بوده و افزایش تعداد سویه‌های مقاوم آن‌ها باعث نگرانی زیادی شده است. از زمان کشف خاموشی ژن توسط RNA (RNAi) انقلابی در زمینه کاربرد درمانی آن به‌راه افتاده است. استفاده از RNA مداخله‌گر پتانسیل درمانی بسیاری برای درمان یا پیش‌گیری از بیماری‌ها دارد. این RNA ها نقش‌های حیاتی در تنظیم رونویسی و پس از رونویسی، خاموشی ژن و دمتیلاسیون DNA دارند. امروزه برعلیه بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها مقاومت دیده شده است و حتی برای برخی از آن‌ها هیچ آنتی بیوتیکی وجود ندارد. و روش‌های جایگزین برای درمان آن‌ها به‌شدت احساس می‌شود. با به-کارگیری این روش از تکثیر و پیشرفت عفونت‌های ویروسی، قارچی، باکتریایی و انگلی جلوگیری به‌عمل آمده است. انتقال موضعی siRNA برای درمان بیماری‌ها دارای رشد سریعی است و امید می‌رود که در آینده بتواند در مطالعات بالینی کاربرد بیابد. تزریق موضعی موجب کاهش آثار سمی می‌شود و در دسترس بودن دارو برای سلول‌های توموری را افزایش می‌دهد.در این مقاله،وضعیت درمانی حال حاضر با siRNA، فواید کاربرد آن و چالش‌های استفاده از آن بررسی شده است.

کلیدواژگان

خاموشی ژن، عفونت، RNA مداخله‌گر.

* نویسنده مسئول، رایانامه: Narjes_bandari@yahoo.com

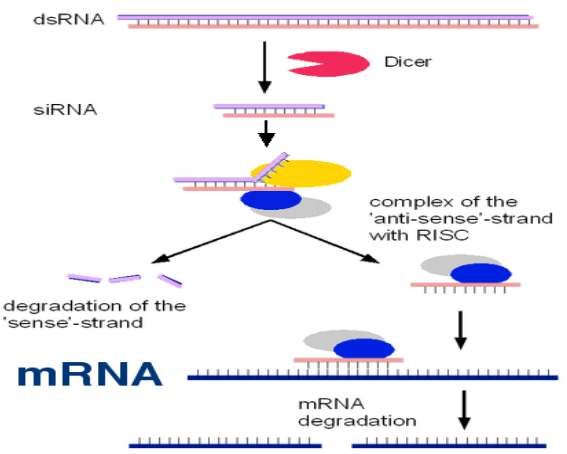
مقدمه

خاموشی RNA یک مکانیسم تنظیم ژنی نسبتاً جدید است که سطح رونوشت‌ها را در سطح رونوشت برداری(خاموشی ژن درسطح رونویسی)[1] و یا با فعال سازی فرآیند تجزیه توالی ویژه RNA (خاموشی پس از رونویسی[2]) یا RNA مداخله‌گر[3] کاهش می‌دهد.

ناپولی و همکارانش در سال ۱۹۹۰برای اولین‌بار اثرات RNAi را برافزایش بیان کالکون سنتتاز(CHS) یا دهیدروفلاونال ۹- ردوکتاز آنزیمی که تا حد زیادی مسئول تولید رنگ گیاهی در گل اطلسی (Petunia hybrida) است، مشاهده کردند.

کشف این ژن که منجر به بلوکه شدن سنتز رنگدانه ها و رشد گل‌های کاملاً سفید یا تا حدودی سفید رنگ به جای گل‌های بنفش میشد آن‌ها را شگفت زده کرد. این پدیده را co-suppression نام‌گذاری کردند ولی مکانیسم مولکولی آن ناشناخته باقی ماند. تا سر انجام در سال1998 فایر و ملو با انتشار مقاله ای دلیل این پدیده و سایر پدیده‌های مشابه را توضیح دادند. آن‌ها از RNAهای دو رشته‌ای (Antisense RNA و Sense) RNAبرای دستکاری بیان ژن در نماتود Caenorhabditis elegans استفاده کردند و RNAi را به‌عنوان مسیری اساسی که در آن رشته‌های RNA اختصاصی توالی، قادرند mRNA مکمل خود را هدف قرار داده و سرکوب بیان آن را القاء کنند، شناسایی کردند. بنابراین اولین‌بار این پدیده توسط آن‌ها، تداخل RNA یا (RNA interference،RNAi) نامیده شد(۲۴).

siRNA: siRNA ها۴، RNA های دورشته‌ای کوچک با ۲۲ -۲۱ نوکلئوتید، با طول تقریبی ۷/۵ nm و قطر۲ nm هستن(۱۴،۱۵،۲۶).siRNA ها به صورت داخل سلولی و با صرف ATP به دنبال شکست RNA دو رشته‌ای بلند توسط آنزیم دایسر، که فعالیت ریبونوکلئازی دارد، ایجاد می‌شوند(۱۵،۳۱). در سیتوپلاسم دو رشته siRNA توسط آنزیم با خاصیت هلیکازی از هم باز می‌شوند . رشته سنس siRNA (passenger) شکسته و تخریب می‌شود، درحالی‌که رشته آنتی‌سنس (guide) به RNA-induced silencing complex (RISC) ملحق می شود(۲۶،۳۰). سپس RISC که اکنون دارای siRNA نیز هست، به سمت mRNA هدف(از نظر توالی، مکمل رشته آنتی‌سنس siRNA است) هدایت می‌گردد.در مرحله بعد آنزیم آرگونات که عضو RISC است و فعالیت ریبونوکلئازی دارد، سبب شکست در mRNA هدف می‌شود.با تخریب mRNA بیان ژن متوقف می‌شود که به این حالت اصطلاحاً خاموشی ژن پس از رونویسی می گویند(۲۶،8). برای مولکول‌های شکسته شده RNA دو مسیر وجود دارد: ۱-RNA های ناقص توسط ریبونوکلئازها تجزیه شوند و ۲- روی رشته‌هایی که با آن‌ها همولوژی دارند، قرار گیرند و توسط RNA پلی مراز وابسته به RNA مجددا دو رشته ای شده که در این صورت موجب تداوم مسیر RNAi می‌شوند. RNA دو رشته ای عامل اصلی تحریک دایسر است(۱،۲۱)، که در شکل ۱ نمایش داده شده است:



شکل ۱- بررسی مکانیسم فرایند تداخل RNA

1. Transcriptional Gene Silencing(TGS)
2. Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS)
3. RNA Interference(RNAi)
4. Small interfering RNA

کاربرد های siRNA

۱. شناسایی توالی خاص
۲. کاربردهای درمانی

قواعد طراحی siRNA

باید به گونه‌ای طراحی شود که مؤثر و غیر سمی باشد. برای طراحی آن قواعدی وجود دارد که به تأثیر هرچه بیشتر آن در درمان بیماری‌ها کمک کرده و از اثرات سمی احتمالی آن جلوگیری می‌کند. به علاوه، این تغییرات به پایداری آن در برابر نوکلئازها کمک می‌کند. این قواعد عبارتند از:

۱- طراحی یک دو رشته‌ای ۲۲-۲۱ نوکلئوتیدی با استفاده از Database مناسب (مثلا BLAST). ۲- اضافه کردن یک Overhang ۲ نوکلئوتیدی در انتهای ۳′. ۳- محتوای CG باید بین ۳۰ تا ۷۰ درصد انتخاب شود. ۴- توالی هدف باید ۱۰۰-۷۰ باز قبل از کدون آغاز باشد. ۵- تغییرات شیمیایی مناسب اعمال شود(7).

منابع مختلف dsRNA جهت شروع فرایند RNAi

RNA دو رشته‌ای بلند جهت شروع فرایند تداخل RNA مهم و حیاتی می‌باشد. این مولکول‌های dsRNA از منابع زیر تأمین می‌شوند:

۱- از طریق لوکوس‌های ژنی بازآرایی شده قابل رونویسی. ۲- از طریق نسخه برداری ژن‌های دارای پروموترهای هم‌گرا. ۳– توسط تزریق ترانس ژن‌های با توالی تکراری معکوس، که در ابتدا در هسته‌ی سلول به صورت مولکول‌های RNA دو رشته‌ای سنجاق‌سری(dsRNA hairpin) نسخه برداری شده و پس از ورود به سیتوزول به dsRNA تبدیل می‌شوند. ۴- از طریق نسخه برداری از روی عناصر قابل انتقال، هم چون ترانسپوزون‌ها که در ژنوم اکثر سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند و می‌توانند نسخه‌هایی از ژن‌ها را برای هر دو رشته تولید کنند. این رشته‌ها به صورت سنس و آنتی‌سنس رونویسی شده و سپس به یکدیگر اتصال یافته تا مولکول dsRNA تشکیل دهند. ۵- بعضی از ویروس‌های حاوی RNA و حتی حاوی DNA طی مراحل تکثیرشان به طور طبیعی می‌توانند مولکول RNA دو رشته‌ای تولید کنند. ۶- مولکول‌های dsRNA را می‌توان به طور سنتتیک در خارج از سلول تولید و سپس به طرق مختلف به سلول تزریق کرد. ۷- تولید مولکول‌های siRNA به وسیله ی ورود ناقل DNA همچون پلاسمیدهای باکتریایی و وکتورهای ویروسی به درون سلول نیز امکان‌پذیر است(۲۲).

سیستم‌های انتقالی و تحویل دهنده siRNA به درون سلول از روش‌های مختلفی جهت انتقال مولکول‌های siRNA به درون سلول‌ها استفاده می‌شود. مهم‌ترین و رایج‌ترین روش‌های انتقال شامل موارد ذیل می باشد:

۱- استفاده از الکتروپوریشن، ۲- تزریق به سلول با روش Microinjection، ۳- از طریق تجویز داخل وریدی کپسول‌های لیپیدی حاوی siRNA، ۴- تحویل و هدایت siRNA به سلول توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویژه سلول (Antibody-directed)، ۵- با استفاده از سیستم‌های تحویل دهنده بر پایه فن‌آوری نانو و ذرات نانو[1]. (12،4)

کاربردهای تحقیقاتی و درمانی فرایند تداخل RNA

با ظهور فن‌آوری تداخل RNA و بکارگیری RNA های کوپک یا همان siRNA جهت خاموش کردن بیان هر ژنی[2] انقلاب بزرگی در دانش ژنتیک معکوس حاصل شده است. از آنجایی‌که بسیاری از بیماری‌ها به دنبال افزایش بیان یک یا چند ژن ایجاد می‌شوند، با پتانسیل درمانی RNAi برای تعدادی از بیماری‌ها از جمله سرطان، عفونت و التهاب، بیماری‌های تنفسی،

1. Nanoparticle-based siRNA delivery
2. Gene knockdown technonlogy

عصبی و خودایمنی موفقیت‌هایی حاصل شده است. هم‌چنین در درمان بسیاری از عفونت‌های ویروسی و انگلی نیز با بکارگیری سرکوب بیان ژن در سطح پس از نسخه برداری با استفاده از مولکول‌های siRNA، از تکثیر و پیشرفت عفونت جلوگیری به عمل آمده است. برای مثال با سرکوب ژن Vif که یک ژن تنظیمی در ویروس HIV-1 می‌باشد، از همانندسازی و تکثیر ویروس ممانعت به عمل آمده است. علاوه بر این در درمان برخی عفونت‌های باکتریایی مانند پنومونی و شوک عفونی نیز از این تکنیک با موفقیت استفاده شده است(۲۷،۱۳).

فواید استفاده از siRNA نسبت به داروهای دیگر

۱- درجه بالایی از ایمنی را دارد، چرا که با DNA درگیر نمی‌شود و امکان ایجاد جهش کاهش پیدا می کند؛ ۲- نسبت به بقیه داروها بازده فراوانی دارد، چرا که بیان ژن را سرکوب می‌کند؛ ۳- نسبت به بقیه دارو ها هدف خود را دقیق تر شناسایی کرده و در خاموش سازی ژن می‌تواند اختصاصی عمل کند(۱۰،۲۰)

چالش‌های تحویل siRNA:

یکی از چالش‌های اولیه در درمان بر پایه siRNA مسئله تحویل آن است. استفاده درمانی از siRNA نیازمند توسعه حامل‌هایی است که بتوانند:

۱- از siRNA در مدتی‌که در خون در گردش است محافظت کند؛ ۲- siRNA را به سلول‌های هدف تحویل دهد و مانع از تحویل آن به سلول‌های غیر هدف شود؛ ۳- جذب سلولی و فرار آندوزومی siRNA را تسهیل کند؛ ۴- باعث آزادسازی siRNA به صورت داخل سلولی شود تا siRNA برای اجزاء سلولی در دسترس باشد(۹)

حامل‌های موجود معمولاً حاوی یک جز کاتیونیک مثل لیپیدکاتیونیک، پلیمر کاتیونیک یا پپتید کاتیونیک هستند تا بتوانند به طور موثر به siRNA متصل شوند. سایر اجزا تکمیلی به بهبود ثبات، حلالیت یا پروفایل دارویی کمپلکس‌های siRNA–حامل کمک می‌کنند(۳). اکثر حامل‌های موجود اساساً برای تحویل DNA [1] طراحی شده‌اند. تحویل siRNA [2] و تحویل DNA از جنبه‌های مختلفی مانند : جایگاه عمل در سلول، سایز مولکول و ثبات مولکولی برای ژن درمانی با هم تفاوت دارند(۹).

جایگاه عمل siRNA سیتوپلاسم است، درحالی‌که برای ژن درمانی لازم است که مواد ژنتیکی از غشا هسته عبور کنند و وارد هسته شوند. مدت زمان خاموشی ژن توسط siRNA 3 تا ۷ روز در سلول های در حال تقسیم و حدود 3 تا 4 هفته در سلول هایی است که تقسیم نمی‌شوند(۲۳).درحالی‌که، بیان ترانس‌ژن به عنوان یک نتیجه ژن درمانی بر پایه DNA، متغیر است و محدوده آن از کوتاه مدت تا دائمی می‌تواند متغیر باشد(۲۹).

وزن مولکولی یک مولکول siRNA دو رشته‌ای درحدود ۱۳ kDa است، در حالی‌که وزن مولکولی یک مولکول DNA دو رشته‌ای برای ژن درمانی (نه آنتی‌سنس درمانی) اغلب چند صد برابر است . متعاقباً، موادی که برای تحویل DNA مناسب هستند، ممکن است برای تحویل siRNA مناسب نباشند و دلیل این امر این است که سایز

Lipoplexes و polyplexes توسط سایز مواد ژنتیکی و حامل تحت تأثیر قرار می‌گیرد(۷).

به طورکلی، حامل‌های siRNA باید طوری طراحی شوند تا در جایگاه هدف تجمع یابند تا مانع از جذب غیراختصاصی siRNA در بافت غیر هدف شوند. بسیاری از حامل‌ها طوری طراحی شده اند تا مانع از برهم‌کنش غیراختصاصی با عناصر خونی و اجزا خارج سلولی شوند(۱۱).

1. DNA delivery
2. siRNA delivery

پیشرفت‌های صورت گرفته در مسیر طراحی siRNA به منظور کاهش چالش‌های استفاده از آن:

۱- تغییرات شیمیایی به‌منظور، پایداری و رسیدن به مقاومت نوکلئازی، کاهش اثرات خاموشی هدف۱،کاهش فعال‌سازی سیستم ایمنی. ۲- انتقال سیستماتیک siRNA: استفاده از نانوذرات برای انتقال siRNA.

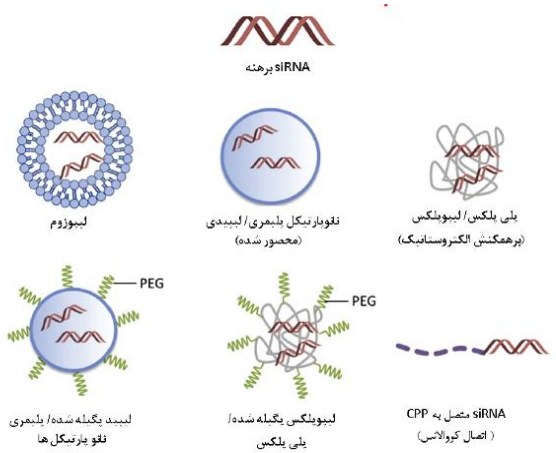
انتقال سیستماتیک siRNA: نانوکریرها

یکی از راه‌هایی است که از طریق آن بازده استفاده از siRNA در درمان افزایش می یابد.

دلایل استفاده از نانوذرات در انتقال siRNA: افزایش جذب سلولی، کاهش پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده از siRNA، جلوگیری از اثرات خاموشی هدف، پیشرفت در پروفایل های کینتیک دارویی.

انواع نانوذرات مورد استفاده در انتقال siRNA

لیپیدی، پلیمری، ذرات کونژوگه، نقاط کوانتومی، نانو ذرات فلزی (شکل ۲)



شکل۲- انواع نانوذرات مورد استفاده در انتقال si RNA

نانوذرات لیپیدی به دو دسته تقسیم می‌شوند

۱- لیپوزوم‌ها بر پایه لیپیدهای کاتیونی؛ ۲- نانوذرات جامد بر پایه لیپید که مانند کپسول عمل می‌کنند (SNALP، لیپیدوئیدهای تشکیل شده از کلسترول، لیپیدهای روکش شده با پلی‌اتیلن گلیکول و فسفولیپیدهای خنثی)

نانوذرات پلیمری: ۱- طبیعی (chitosan، Atelocollagen و سیکلودکسترین) ۲- سنتتیک.

نانوذرات کونژوگه: siRNA+CPP (پپتید نفوذ سلولی)، siRNA+Aptamer،siRNA+Antibody، siRNA+cholesterol.

نقاط کوانتومی: نانو کریستال‌هایی اغلب از جنس عناصر نیمه رسانا که به دلیل سایز کوچک‌شان توانایی نفوذ بالایی دارند و می‌توان سطح آن‌ها را برای اتصال بهتر به siRNA با گروه‌های مناسب پوشاند.

نانوذرات فلزی: نانوذرات طلا و آهن که می‌توانند با گروه‌های مناسب برای اتصال به siRNA پوشیده شوند.

چالش‌های پیش رو در استفاده از نانوذرات برای انتقال siRNA

پایداری داخل سلولی بالا و آزادسازی کم آن‌ها از سیستم اندوزومال، ایجاد مسمومیت در استفاده از دوزهای بالا آن، گاهی ایجاد پاسخ ایمنی و التهاب(۱۹)

سمیت با واسطه نانوذرات

سیستم تحویل ایده‌آل؛ سیستمی هست که علاوه بر تحویل dsRNA بارگذاری شده، یکسری ویژگی های دیگر نیز داشته باشد. از جمله:

۱- زیست سازگار (biocompatible) باشد؛ ۲- زیست تجزیه پذیر (biodegradable) باشد؛ ۳- عمدتاً برای سیستم ایمنی بی اثر باشد؛ ۴- دارای کلیرنس سیستمیک قابل پیش بینی باشد(۲۵)

1. Off-target

پیشرفت‌های صورت گرفته در استفاده از نانوذرات در انتقال siRNA

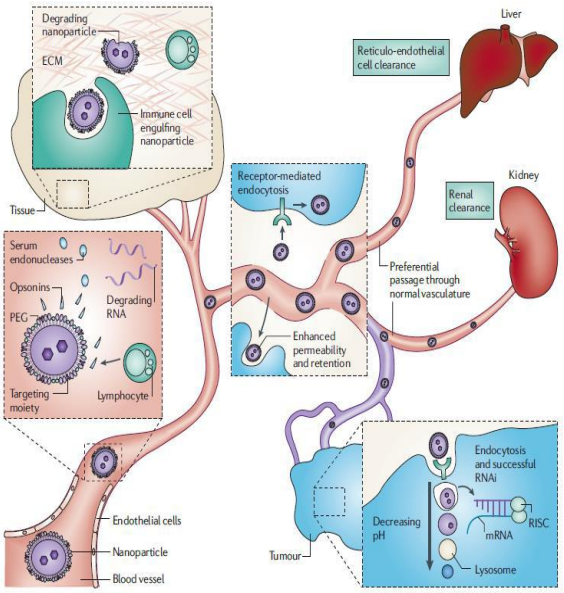
عملکرد سطح نانوذرات،با گروههایی نظیر فولات (برای اتصال به گیرنده آلفا فولات)، ترانسفرین، آنتی بادی ها، هیالورونیک اسید (برای گیرنده CD44) که به صورت ویژه تر متصل می‌شوند(5)

کارآزمایی‌های بالینی انجام شده با استفاده از siRNA

۱- siRNA به صورت موضعی به بدن بیمار وارد شوند (مثلا در بیماری های چشمی، پوستی و ریوی) که با روش‌های اسپری کردن و یا تزریق مستقیم انجام می‌شود. ۲- انتقال siRNA به صورت سیستماتیک (siRNA ها برای انتقال به بافت هدف وارد جریان خون می شوند)که مستقیم و یا با واسطه نانو کریرها هستند(11).

سرنوشت siRNA در مایعات بیولوژیکی

مطالعات زیادی در شرایط in vitro انجام شده و درباره سدهای داخل سلولی برای تحویل siRNA اطلاعات زیادی وجود دارد ولی با وجود اهمیت فاکتورهای خارج سلولی موجود در ریز محیط اطراف سلول‌ها، اطلاعات کمی درباره آن‌ها وجود دارد.برای یک تحویل موفق، لازم است که نانوذره از رگ خارج شده و در طول ماتریکس پیچیده خارج سلولی[1] حرکت کرده تا به سلول‌های هدف، برای مثال سلول سرطانی، برسد(شکل ۳). ویژگی‌های بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکیECM می‌تواند در جذب نانوذرات و استفاده از داروها به صورت زودرسی نقش داشته باشد.



شکل ۳- غلبه بر سدهای بیولوژیکی تحویل RNAi

سمیت با واسطه سیستم ایمنی

سمیت‌های ناشناخته و غیر منتظره مرتبط با تحویل سیستمیک RNAi باید مدنظر قرار داده شوند. پاسخ‌های ایمنی ذاتی علیه siRNA ها به دو گروه تقسیم می شوند:

۱- پاسخ‌های ایمنی ذاتی با واسطه TLRs

۲- پاسخ های ایمنی ذاتی بدون واسطه TLRs (۱۷).

اثرات خاموشی ژن هدف مشابه باmiRNA

در ابتدا تصور می‌شد که siRNA ها به صورت کاملاً اختصاصی ژن هدف را خاموش می‌کنند ولی امروزه مشخص شده است که اینطور نیست و عمل‌کرد آن‌ها ممکن است غیر اختصاصی باشد، حالتی مشابه عملکردmiRNA ها.

ناحیه seed از miRNA ها معمولاً با مکمل شدن ناکامل با ناحیه 3' UTR از mRNA منجر به سرکوب بیان ژن می‌شوند .

مشاهده شده که مشابه این حالت در مورد siRNA

1. complex extracellular matrix (ECM)

ها نیز رخ می‌دهد. siRNAها ممکن است باعث القا تنظیم وابسته به توالی در رونوشت‌های ناخواسته به دنبال تطابق ناکامل با ناحیه UTR '۳ از mRNA شوند و از آن جهت که این مکانیسم یادآور نحوه عملmiRNAها است به آن اثرات خاموشی هدف مشابه microRNA[1] می‌گویند(۱۶)

تحویل سیستمیک در مقابل تحویل موضعی

نتایج حاصل از برخی مطالعات نشان داده‌اند که تزریق مستقیم داخل توموری نانو ذرات حاوی siRNA نیز می‌تواند نتایج خوبی در خاموشی ژن داشته باشد. هرچند تزریق موضعی موجب کاهش آثار سمی می‌شود و در دسترس بودن دارو برای سلول‌های توموری را افزایش می‌دهد ولی باید مدنظر داشت که بسیاری از تومورها قابل دسترسی نیستند. بعلاوه، تحویل موضعی برای درمان بیماری‌های micrometastatic نیز قابل دوام نیست. بنابراین، هرچند تحویل موضعی siRNA یک گزینه درمانی مناسب برای تومورهای اولیه کوچک و قابل دسترس مثل: ملانوما،سرطان پستان و سرطان رحم باشد ولی می‌تواند در آینده نقش محدودی در انکولوژی بالینی داشته باشد(۲۸،۱۸).

نتیجه گیری

پس از کشف تداخل RNA، این پژوهش سرآغازی برای فعالیت و تحقیقات بعدی شرکت‌های دارویی و زیست فناوری شد. هرچند که در ابتدا کاربرد اصلی RNAi برای یافتن مسیرهای مشخص کننده عملکرد ژن‌ها بود. امروزه در درمان بسیاری از سرطان‌ها و بسیاری از عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی با بکارگیری سرکوب بیان ژن در سطح پس از نسخه برداری با استفاده از مولکول‌های siRNA موفقیت هایی به دست آمده است، که این چشم انداز روشنی را برای آینده باز می‌کند.

سپاسگزاری

از کلیه افرادی که در نگارش این مقاله ما را یاری دادند قدردانی می‌نماییم.

1. microRNA-like off-target effects

منابع و مآخذ

1. Agrawal N, Dasaradhi P, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. 2003. "RNA interference: biology, mechanism, and applications." *Microbiology and molecular biology reviews* 67 (4): 657-685.
2. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmed A, Malhotra PBhatnagar RK, Mukherjee SK. 2003. "RNA interference: biology,mechanism, and applications." *Microbiology and molecularbiology reviews 2003; 67(4):* 67 (4): 657-685.
3. Bartlett DW, Davis ME. 2006. "Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging." *Nucleic acids research* 34 (1): 322-333.
4. Berkhout B, Brake TO. 2010. " RNAi Gene Therapy to Control HIV-1 Infection. RNA Interference and Viruses: Current Innovations and Future Trends." *Caister Academic Press* 971-978.
5. Burke RS, Pun SH. 2008. "Extracellular barriers to in Vivo PEI and PEGylated PEI polyplex-mediated gene delivery to the liver." *Bioconjugate chemistry* 19 (3): 693-704.
6. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. 2016. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. International Journal of Molecular Sciences 17(10):1712.
7. Cornelia Lorenzer et al. 2003 . "Going beyond the liver Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics." *Journal of Controlled* 203: 1-15.
8. E. Check. 2004. "Hopes rise for RNA therapy as mouse study hits target." *Nature* 136.
9. Gary DJ, Puri N, Won Y-Y. 2007. "Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery." *Journal of Controlled Release* 121 (1): 64-73.
10. Gong, Manju Saraswathy and Shaoqin. 2014. "Recent developments in the co-delivery of siRNA and small molecule anticancer drugs for cancer treatment." *Materials today 17* 17: 298-306.
11. Gulnihal ozcan et al. 2015. "Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics." *Advanced Drug Delivery Reviews* 1-12.
12. H.Gregory. 2002. "RNA Interference." *Nature* 418: 244-251.
13. Haasnoot J, Berkhout B. 2006. "RNA interference: its use as antiviraltherapy. RNA towards Medicine." *Handbook of Experimental Pharmacology* 89 (173): 117-150.
14. Hansen KM, Ji H-F, Wu G, Datar R, Cote R, Majumdar A, et al. 2001. "Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches." *Analytical Chemistry* 73 (7): 1567-1571.
15. Ho W, Zhang XQ, Xu X.2016. Biomaterials in siRNA Delivery: A Comprehensive Review. Advanced Healthcare Materials.
16. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, et al. 2006. "Widespread siRNA "off-target transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity." *Rna* 12 (7): 1179-1187.
17. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. 2005. "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." *Nature biotechnology* 23 (4): 457-462.
18. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG. "Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer". Journal of Controlled Release. 2008;129(2):107-\16.

19. Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Löhr JM, et al. 2007. "Pancreatic cancer microenvironment." *International journal of cancer* 121 (4): 699-715.

20. Larson SD, Jackson LN, Chen LA, Rychahou PG, Evers BM. 2007. "Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods." *Surgery* 142 (2): 262-269.

21. Matzke MA, Birchler JA. 2005. "RNAi-mediated pathways in the nucleus." *Nature Reviews Genetics* 6 (1): 24-35.

22. Merai Z, Ker´enyi Z, Kertesz S,. 2006. "Double stranded RNA binding may be a general plant viral strategy to suppress RNA silencing." . *J Virol* 80: 5747-5756.

23. Mintzer MA, Simanek EE. 2008. "Nonviral vectors for gene delivery." *Chemical reviews* 109 (2): 259-302.

24. Sakamoto JH, van de Ven AL, Godin B, Blanco E ,Serda RE, Grattoni A, et al. 2010. "Enabling individualized therapy through nanotechnology." *Pharmacological Research* 62 (2): 57-89.

25. Rossi JJ. Medicine: "a cholesterol connection in RNAi" .Nature. 2004;432(7014):155-156

26. Underwood, Lindsey T. 2010. "siRNA gene silencing for therapeutic purposes." *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal* 6 (1): 25-32.

27. Wang, Cong-fei Xu and Jun. n.d. "Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy."

28. Wolff JA, Rozema DB. 2007. "Breaking the bonds: non-viral vectors become chemically dynamic." *Molecular Therapy* 16 (1): 8-15.

29. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." *Cell* 101 (1): 25-33.

30. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. 2004. "Single processing center models forhuman Dicer and bacterial RNase III ." *Cell* 118 (1): 57-68.