

انتقال siRNA به سرطان ریه با استفاده از نانوذرات

سعیده عسکریان^۱، رضا کاظمی اسکویی^{۲*}

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات التهاب نوروزنیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران.

چکیده:

سرطان ریه شایع ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می باشد و سالانه بیشتر از یک میلیون نفر به علت ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می دهند. این سرطان به دو گروه اصلی به نام های سرطان ریه با سلول های غیر کوچک (NSCLC) و سرطان ریه با سلول های کوچک (SCLC) تقسیم می شود این دو گروه در خصوصیات بسیاری از جمله رفتار های بیولوژیک، پاسخ به درمان و تغییر های ژنتیکی متفاوت هستند. مقاومت به درمان های مرسوم (شیمی درمانی) به خصوص در بیماران مبتلا به نوع NSCLC، یکی از چالش های عمده در پروسه درمانی این بیماری است. بنابراین ابداع روش های درمانی جدید برای افزایش میزان بقا و بهبود شرایط بیماران ضروری است و ترکیبی از روش های مختلف می تواند بازدهی درمانی را ارتقا بخشد. استفاده از RNA تداخل گر (siRNA) پتانسیل درمانی بسیاری برای درمان یا پیش گیری از بیماری های ریوی دارد. زمانی که مولکول siRNA وارد سلول هدف شود می تواند بیان ژن خاصی را مهار کند و اثرات درمانی دلخواه ما ایجاد شود. اما بزرگترین محدودیت این تکنیک که بزرگترین مانع بین مطالعه ها آزمایشگاهی و بالینی می باشد انتقال آن به درون سلول است. یک سیستم انتقال ایده آل می تواند از siRNA در مقابل تجزیه آنزیمی محافظت نموده و فرار آن از آندوزوم سلول را نیز تسهیل کند در عین حال سمیت کم و یا قابل چشم پوشی دارد. در حال حاضر مطالعه های کمی به منظور فرمولاسیون siRNA برای سیستم تنفسی وجود دارد که امید می رود در آینده ارتقا یابد این مقاله مروری ضمن معرفی سرطان ریه و siRNA به عنوان یک راه کار درمانی جدید، به بررسی چالش های انتقال siRNA به سلول های ریه با استفاده از حامل های غیر ویروسی می پردازد. به علاوه تعدادی از نانوحامل ها با پایه لیپیدی، پلیمری و پپتیدی برای انتقال siRNA به سیستم تنفسی را مورد مطالعه قرار داده است.

کلمات کلیدی: سرطان ریه، RNA تداخل گر، انتقال، نانوذرات.

مقدمه

با این حال، توجه بسیاری به موانع بیولوژیک در سیستم تنفسی وجود دارد و بایستی برای یک ژن رسانی موفق در نظر گرفته شود که در این مقاله به صورت خلاصه به آن ها پرداخته خواهد شد. با توجه به این موانع، فورمولاسیون های غیر ویروسی بر پایه پلیمر ها برای انتقال ژن های درمانی و siRNA ها پیشنهاد شده است، زیرا با وجود اینکه انتقال siRNA از طریق ریه محبوبیت بسیاری در مطالعه ها بالینی کسب نموده ولی تاکنون نتوانسته به صورت کاربردی وارد کلینک شود.

در این مطالعه ابتدا با انواع سرطان ریه و راه کار های درمانی موجود آشنا شده و سپس به بررسی siRNA به عنوان یک درمان جدید خواهیم پرداخت بدین صورت که موانع بیولوژیک و نانوحامل هایی

انتقال از طریق سیستم تنفسی راه کاری مناسب، غیر تهاجمی و آسان برای استفاده از ماکرومولکول های زیستی در درمان سرطان و بیماری های ریوی به نظر می رسد و می تواند راهبردی برای درمان های سیستمیک و موضعی باشد، از این رو مطالعه ها رو به رشد بسیاری که برخی از آن ها در این مقاله آمده بازتابی از فرآیند ژن رسانی به ریه هستند.

* نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات التهاب نوروزنیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران.

پست الکترونیکی: Oskueekr@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۰۴

❖ سرطان ريه با سلول هاي غير كوچك، (NSCLC)
Non-Small-Cell Lung Cancer

❖ سرطان ريه با سلول هاي كوچك، Small-Cell Lung
Cancer (SCLC)

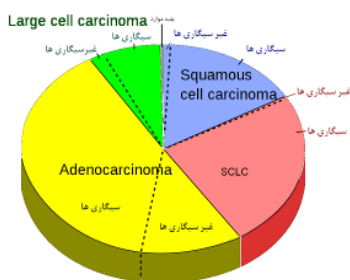
اين دو گروه نه تنها در شيوع و بروز بلكه در رفتار هاي بيولوژيكي،
بافت شناسي و تغيير هاي ژنتيكي نيز متفاوتند.

NSCLC حدود ۸۰٪ از سرطان ريه را شامل مي شود و سه زير
گروه اصلي دارد كه عبارتند از:

۱. سلول هاي كارسينوماي سنگ فرشي (SCC)
Squamous Cel lung Carcinoma

۲. سلول هاي آدنو كارسينوما Adenocarcinoma

۳. كارسينوما ريه با سلول هاي بزرگ- Large (LCLC)
Cell Lung Carcinoma



شكل ۱- مقايسه درصد بروز انواع سرطان ريه در افراد سيگاري و غير سيگاري
(۱۸).

راه كار هاي درمانی موجود

نحوه مقابله با بيماري سرطان ريه يكي از چالش هاي امروز سرطان
شناسان است. در حالي كه درمان ممكن است در مراحل اوليه موثر
واقع شود اما عمده بيماران (حدود ۷۷٪) تا زمان پيشروي سرطان
و مراحل پيشرفته شناسايي نمي شوند (۲۵). درمان سرطان ريه
بستگي به نوع سلول سرطاني، مقدار گسترده گي بافت سرطاني و
وضعيت بيمار دارد، راه كار هاي درمانی موجود شامل جراحي، شيمي
درمانی و پرتودرمانی می باشد برای افرادی با بيماري پيشرفته شيمي
درمانی ممكن است تنها انتخاب باشد. با اين حال مقاومت به دارو
هاي رايج شيمي درمانی به خصوص در نوع سرطان NSCLC
يكي از معضلات درمانی اين بيماري است، با اين حال در حال حاضر
استراتژی قابل قبولی در خط اول درمانی به منظور جلوگيري از
مقاومت به شيمي درمانی مطرح نشده، گرچه مطالعه ها كلينيكي
بسياری در حال انجام است.

اعم از ليپيدي، پليمري و.. كه برای انتقال siRNA می توانند به كار
گرفته شوند معرفي و نقاط قوت و ضعف آن ها بررسی خواهند شد.

سرطان ريه

به دليل افزايش سن، رشد جمعيت و بروز رفتار هاي ايجاد كننده
سرطان مانند افزايش كشيدن سيگار در خانم ها ميزان بروز سرطان
هاي دستگاه تنفسي در سطح جهاني هم چنان بالا است. تا اوایل
قرن بيستم سرطان ريه بيماري نادری بود اما شيوع آن به شدت
افزايش يافت، به طوري كه امروزه از رايج ترين سرطان ها می باشد.
پس از سرطان سينه در خانم ها و پروستات در آقایان، سرطان ريه
دومين سرطان رايج با نسبت ۱۵٪ از كل سرطان ها و اولين عامل
مرگ و مير ناشی از سرطان در هر دو جنس (در خانم ها ۲۶٪ و در
آقایان ۲۹٪) می باشد (۱۵).

عامل عمده ابتلا به سرطان ريه مجاورت طولاني مدت با مواد سرطان
زا و كارسينوژن (موجود در دود تنباكو) می باشد، ۱۵٪ از موارد
سرطان ريه مربوط به افراد غير سيگاري (۴۶) و افرادی كه در ارتباط
با فاكتر هاي مضر ژنتيكي مثل گاز رادون (۱۲)، آزيستوز (۱)،
آلودگي هوا و يا سيگاري هاي ثانويه (استنشاق دود سيگار ديگران)
می باشد (۳۵). به نظر می رسد كه ويروس ها نيز می توانند در
حيوانات ايجاد سرطان ريه نمايند (۳)، البته پتانسيل ايجاد سرطان
ريه در انسان نيز مطرح شده است (۲۱).

آسيب هاي كروموزمی می توانند سبب غير فعال شدن ژن هاي
مهارگر توموري شوند، آسيب كروموزم هاي ۱۷p، ۱۳q، ۵q، ۳p به
طور عمده در سرطان SCLC رايج هستند. چندين پلي مورفيسم
در ارتباط با سرطان ريه شناسايي شده كه شامل ژن هاي MMP۱
IL-۱۰ و CASP-۸ مولكول هاي ترميم كننده DNA مثل
XRCC۱ می باشد (۴۹).

جهش در ژن K-ras مسئول ۳۰-۱۰٪ از آدنو كارسينوما هاي
ريه است (۱۴). فاكتر رشد اپيدرمي (EGF)، رگزايبی، آپوپتوز،
تكثير سلول و ت هاجم تومور را كنترل می كند. جهش در گيرنده
مربوط به آن (EGFR) به عنوان ماركری برای شناسايي نوع
پيشرفته سرطان NSCLC مطرح شده و استفاده از مهار كننده
هاي تيروزين كينازی مثل Gefitinib نيز به منظور اهداف درمانی
پيشنهاد شده است (۸).

طبقه بندی سرطان ريه

سرطان ريه را بر اساس اندازه و بروز سلول هاي بدخيم در زير
ميكروسكوپ به دو گروه اصلي طبقه بندی می نمايند:

استفاده همزمان از چندین داروی شیمی درمانی که اثرات مضرتری بر بیمار دارد یکی از راه های درمانی موجود است و هر روز دارو های جدیدی از جمله آنالوگ های Platinum مثل Picoplatin (یک آنالوگ سیس پلاتینی) و ABT-751 (یک داروی سولفونامیدی) طراحی و ساخته می شود (۹، ۲۶). جراحی زمانی موثر است که تومور به طور کامل قابل برداشت باشد و بیمار تحمل عمل جراحی را داشته باشد، رادیوتراپی چه همراه با شیمی درمانی باشد و چه بدون آن اگر چه گاهی در تسکین علائم موفق است اما نقش آن از جراحی کم تر است. در مورد سرطان SCLC معمولاً جراحی به کار برده نمی شود زیرا به علت تمایل این نوع سرطان به متاستاز زودرس در گره های لنفاوی و اعضای دوردست، وقتی این سرطان تشخیص داده می شود که در مراحل پیشرفته است. درمان این سرطان معمولاً شیمی درمانی همراه با یا بدون رادیوتراپی است و اغلب با وجود پاسخ خوبی که به درمان اولیه می دهند به سرعت عود کرده و باعث مرگ بیمار می شود (۱۹).

برخلاف برخی موفقیت های درمانی، هنوز ترکیب دارو ها و روش های جدید، کارآمدی چندانی در بهبود وضعیت و افزایش طول عمر بیماران ندارد. بنابراین ابداع راه کار های درمانی جدید از جمله ژن درمانی به شدت مورد نیاز و مهم هستند. ژن درمانی استراتژی کلی است که شامل انتقال توالی ژنتیکی اختصاصی به درون سلول است تا سبب تخفیف بیماری شود. در این مقوله جایگزینی ژن، استفاده از ژن های خودکشی مثل ژن HSV-tk، خاموش کردن ژن با استفاده از RNAi و ... مطرح می شود.

RNA تداخل گر

یکی از روش های ژن درمانی، ناپایدار کردن mRNA هدف اختصاص یافته است. در این زمینه یک راه کار، استفاده از مکانیسم موسوم به RNA تداخل گر^۱ (RNAi) است که از طریق وارد کردن RNA کوچک^۲ (siRNA) و یا shRNA (RNA کوچک با ساختار سنجاق سر) امکان پذیر است و راه کاری قوی و اختصاصی در مهار بیان ژن می باشد. این مولکول ها به دلیل عملکرد اختصاصی، تطبیق پذیر بودن با اهدافشان، اثرات دائمی یا موقتی آن ها و امکان استفاده از آن ها در سیستم های زنده (in vivo) بسیار مورد توجه هستند.

به طور خلاصه، RNA دو رشته ای (dsRNA) می تواند به طور مصنوعی یعنی به صورت RNA دو رشته ای کوتاه (siRNA)

وارد سلول شود و یا به صورت RNA دورشته ای درون سلولی^۳ (miRNA) باشد و یا محصول جانبی ویروسی و یا رونوشت اضافی ترانس ژن باشد که همه بعد از شناسایی توسط نوعی از آنزیم RNase III به نام Dicer به قطعات کوچکی به نام siRNA که حدود ۲۲ نوکلئوتید طول دارند تبدیل می شوند. قطعات siRNA در یک مجموعه پروتئینی به نام کمپلکس خاموش گر تحت القای RNA^۴ (RISC) قرار می گیرند، RISC دارای نواحی هلیکازی، اگزونوکلازی، آندونوکلاز و یابنده همولوژی است، رشته آنتی سنس، کمپلکس RISC را به سمت mRNA هدف راهنمایی می کند و سپس زیر واحد های آندونوکلازی موجود در ساختار RISC، mRNA هدف را می برد و در ن هایت سبب خاموش شدن بیان ژن هدف می شود (۴۳).

RNA تداخل گر می تواند برای درمان و یا پیش گیری از بیماری هایی که سیستم تنفسی را درگیر می کند مثل سرطان ریه، انواع مختلف عفونت های تنفسی، بیماری های التهابی مجاری تنفسی و ... به کار گرفته شود (۳۴). انتقال siRNA به ریه می تواند هم از مسیر سیستمیک (گردش خون) و هم به صورت انتقال به محل (Local delivery) صورت پذیرد. فرایند انتقال siRNA به طور خلاصه در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.

مثل انتقال DNA هر دو نوع حامل های ویروسی و غیر ویروسی برای انتقال siRNA نیز استفاده شده است، حامل های ویروسی با وجود کارایی بالا در انتقال اسید های نوکلئیک، نگرانی هایی از لحاظ ایمنی (Safty) ایجاد نموده اند که استفاده از آن ها را با محدودیت مواجه می سازد، که پاسخ های سیستم ایمنی به ویروس ها بزرگترین چالش آن ها است (۵۱).

۱ RNA interference

۲ Small interference RNA

۳ micro RNA

۴ RNA-Induce silencing complex (RISC)

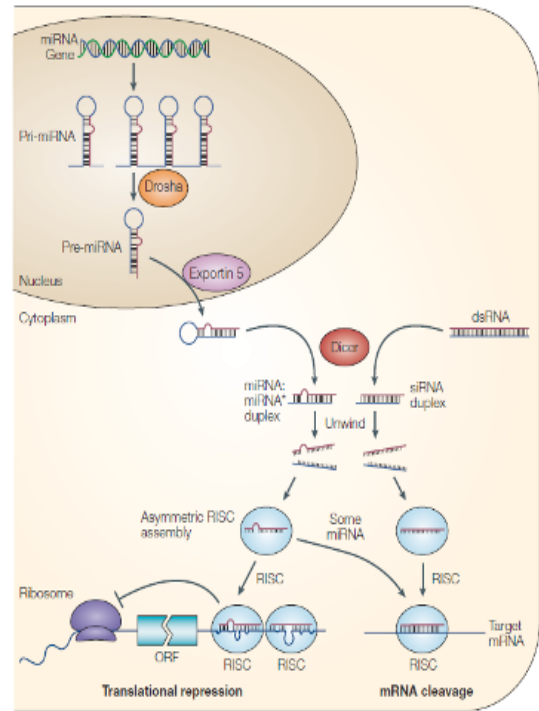
مشابه مشکلات انتقال دیگر ماکرو مولکول ها است. عوامل بسیاری از قبیل موانع آناتومیک، فیزیکی، موانع درون سلولی و ... مطرح هستند. سایز مناسب برای انتقال به سیستم تنفسی تحتانی حدود ۱۰۰-۵۰۰ nm است (۴۱). نانوحامل های با سایز حدود ۱۰۰ nm، به نظر می رسد با کارایی بالاتری به محل آلوئول ها (کیسه های هوایی ریه) می رسند و درصد تخریب و آزاد سازی آن ها حدود ۵۰٪ است. مسیر های پاک سازی متعددی برای حذف نانوپارتیکل های موجود در ریه وجود دارد که می توان به سرفه، تخریب و تجزیه، جریان متحرک موکوسی، فاگوسیتوز با کمک ماکروفاژ ها و برداشت های عصبی اشاره نمود (۵۰). هنوز اطلاعات دقیق کمی، درباره پاک سازی siRNA از ریه وجود دارد.

الف (موانع برون سلولی

بزرگترین مانع فیزیکی در انتقال به ریه فعالیت مژکی سلول های اپیتلیال است که از طریق ایجاد جریان موکوسی سبب پاک سازی اجرام خارجی می شود (۳۸)، ترکیب اصلی موکوس، موسین ها بوده که پروتئین هایی گلیکوزیله هستند. در طی عفونت و التهاب، افزایش ترشح موکوس پیش می آید که سبب نقص در حرکات مژک ها و پاک سازی موکوسی می شود برای غلبه بر مانع موکوسی، مواد تخریب کننده موکوس مثل ناکیستلین^۵ و یا مهار کننده های موکوس مثل گلیکوپیرولات^۶ (که سبب مهار ترشح موکوس می شود) به کار می روند. کاهش موانع موکوسی با تنفس مانیترول قبل از انتقال siRNA نیز می تواند مفید واقع شود (۵).

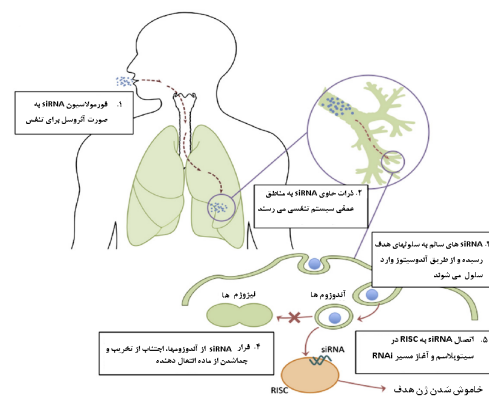
ب (موانع درون سلولی

زمانی که siRNA به سطح سلول های هدف ریوی می رسد بدین معنی است که توانسته از دست موانع خارج سلولی خلاص شود ولی هنوز باید از غشای سلولی عبور کند و به سیتوپلاسم برسد، محلی که کمپلکس RISC قرار داد. siRNA ماکرومولکولی هیدروفیل با بار منفی است و به دلیل خصوصیات فیزیکی شیمیایی اش قادر نیست به تنهایی از غشای سلولی عبور کند. آندوسیتوز با واسطه کلاترین بهترین و اصلی ترین مسیر جذب اسید نوکلئیک در روش های غیر ویروسی است برای آندوسیتوز موفق تر، بهتر است اندازه ذرات کم تر از ۱۵۰ nm باشد (۲۳). ذرات پس از جذب وارد آندوزوم های اولیه شده که با تلفیق با یکدیگر تبدیل به آندوزوم ثانویه می شود و در نهایت به صورت لیزوزیم در می آیند. در لیزوزیم pH حدود ۵ بوده و حاوی آنزیم های تجزیه کننده بسیاری از جمله نوکلئاز ها می باشد (۳۳). بنابراین siRNA درمانی باید بتواند از لیزوزوم به داخل سیتوپلاسم فرار کند قبل از اینکه توسط نوکلئاز های لیزوزیم تخریب



شکل ۲- شمایی از مسیر های RNA تداخل گر در سلول. پیش ساز های dsRNA بلند یا miRNA توسط آنزیم متصل شونده به نام Dicer به واسطه های ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی dsRNA ای تبدیل می شوند و در مجموعه RISC قرار می گیرند که برش RNA را هدایت می کند (۱۳).

به دلیل مشکلات ایمنی در وکتور های ویروسی، بسیاری از مطالعه ها انتقالی siRNA بر روی تکامل سیستم های غیر ویروسی تمرکز یافته است. siRNA های درمانی را می توان به طور مستقیم با کمک حامل های غیر ویروسی به محل هدفشان منتقل نمود. رایج ترین وکتور های مورد استفاده لیپید ها، پلیمر ها و پپتید ها هستند.



شکل ۳- نمایی از مراحل انتقال siRNA به ریه (۲۲).

چالش های انتقال siRNA به ریه توسط حامل های غیر

ویروسی

چالش های انتقال siRNA به مجاری تنفسی و ریه کم و بیش

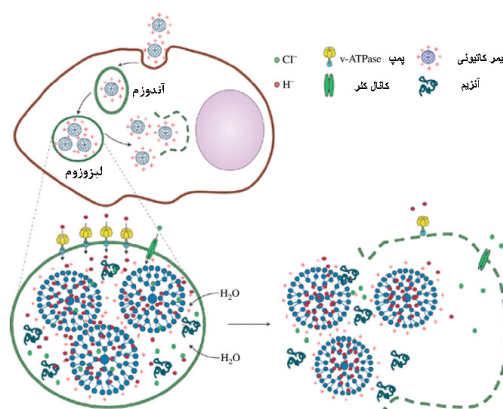
۵ Nacystelyn
۶ Glycopyrrolate

شود (شکل ۴).

خاموش نمودن ژن هدف نشان داده است.

siRNA برهنه

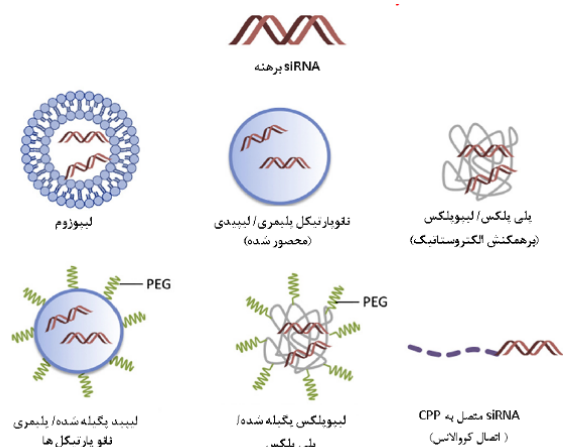
اصطلاح siRNA برهنه^۸ یا siRNA فرموله نشده به انتقال siRNA بدون هیچ ماده انتقالی می گویند. گرچه خود siRNA را می توان از لحاظ شیمیایی تغییر داده تا سبب بهبود عملکرد، افزایش اختصاصیت، کاهش تحریک سیستم ایمنی و کاهش اثرات غیر اختصاصی^۹ شود (۴۷). جالب است که موفقیت هایی در انتقال siRNA به صورت برهنه به ریه گزارش شده است (۳۷، ۴۴)، این مشاهدات بسیار قابل توجه هستند و این سوال را مطرح می سازند که چطور siRNA برهنه از موانع خارج سلولی و غشای بیولوژیک عبور نموده است؟ گرچه کاهش فعالیت نوکلئاز ها در ریه شاید تاحدودی به این سوالات پاسخ دهد اما در حقیقت جزئیات امر هنوز آشکار نمی باشد.



شکل ۴- پدیده اسفنج پروتونی. نمایی از مکانیسم اسفنج پروتونی که منجر به تخریب آندوزوم یا لیزوزوم شده و سبب ر هاسازی محتویات به داخل سیتوپلاسم می شود (۲۴).

در مطالعه ها بالینی ۱ ALN-RSV۰۱ مدلی از siRNA تغییر یافته (Modified) بررسی شده این siRNA برهنه به صورت درون نایی در قالب اسپری دهانی استفاده شده و کاهش عفونت ویروسی RSV^{۱۰} را نشان می دهد (۶).

انتقال مستقیم عوامل درمانی از جمله siRNA به ریه اغلب از مسیر های استنشاقی (Inhalation)، درون نایی (Intratracheal) و مسیر بینی (Intranasal) صورت می گیرد. با استفاده از عوامل انتقالی مختلف می توان انتقال به سلول خاصی را ارتقا داد و توانایی هدفمندی (Targeting) سلول ها مطرح می شود.



شکل ۵- انواع مختلف نانو حامل های غیر ویروسی رایج برای انتقال siRNA (۲۲).

راهبرد دیگر استفاده از پپتید های فوزژنیک حساس به pH، به عنوان حامل است، از این پپتید ها می توان به KALA، GALA و ... برای انتقال siRNA در سیستم های درون تنی (in vivo) و برون تنی (in vitro) اشاره نمود (۲). این پپتید ها در pH پایین تغییر کنفورماسیون داده و به عنوان ناپایدار کننده غشای آندوزومی عمل نموده و سبب تخریب و آزاد سازی محتویات آندوزوم به داخل سیتوپلاسم می شوند. وقتی siRNA درون آندوزوم است می تواند پاسخ ایمنی ذاتی را تحریک کند، گیرنده های شبه تول (TLRs)^۷ از نوع TLR۷ و TLR۸ که در غشای آندوزومی قرار دارند siRNA را شناسایی نموده و سبب تحریک پاسخ های ایمنی ذاتی می شوند. البته تغییر در ساختار siRNA می تواند تا حدودی این مشکل را بر طرف سازد (۳۶).

حامل های غیر ویروسی در انتقال siRNA به ریه

حامل ایده آل برای انتقال siRNA باید شرایط زیر را دارا باشد: (۱) بتواند siRNA را به صورت ذره ای در سایز نانو متراکم کند، (۲) از siRNA در مقابل آنزیم های تجزیه کننده محافظت کند، (۳) جذب سلولی را تسهیل بخشد، (۴) فرار آندوزومی را القا کند، (۵) سبب ر ها سازی siRNA به سیتوپلاسم جایی که RISC قرار دارد بشود، (۶) سمیت کمی داشته باشد. گرچه رایج ترین حامل های غیر ویروسی siRNA شامل لیپید ها، پلیمر ها و پپتید ها هستند، siRNA برهنه نیز در حالت درون تنی توانایی جالب توجهی در

۸ Naked siRNA

۹ Off-target

۱۰ Respiratory Syncytial Virus

۷ Toll-like receptors

وكتور هاى انتقالى با پايه ليپيدى

سيستم هاى انتقالى با پايه ليپيدى براى انتقال siRNA در دو حالت درون تنى و برون تنى رايج هستند ليپيد هاى كاتيوني و ليپوزوم ها با siRNA كه داراى بار منفى است كمپلكس هاى تشكيل مى دهند كه ليپوپلكس^{۱۱} ناميده مى شود. مواد ترانسفكشن بسيارى صورت تجارى براى انتقال درون تنى siRNA به ريه از قبيل *TransIT-TKO*، *Oligofectamine™* وجود دارند. اما بزرگترين مشكل سيستم هاى ليپيدى سميت بالينى آن ها و فعال سازى غير اختصاصى سايتوكاين هاى التهابى است (۱۰).

۱- ليپيد هاى كاتيوني و ليپوزوم ها

تهيه ليپوپلكس ها بسيار آسان مى باشد و داراى كارايى ترانسفكشن خوبى نيز هستند، اما عيبي كه دارند پايدارى ضعيف و تكرار پذيرى پايين آن ها است. مطالعه ها نشان داده كه در موش ها استفاده ريوى از ليپوزوم هاى كاتيوني مثل ليپوفكتامين و DOTAP سميت وابسته به دوز را در ايجاد التهابات ريوى کاهش مى دهد (۷).

۲- ليپيد هاى پگيله شده PEGylated

پليمر هاى هيدروفيلي مثل پلى اتيلن گليكول (PEG) براى کاهش پاسخ هاى التهابى به كار مى رود به علاوه سبب افزايش نيمه عمر در گردش خون نيز مى شود زيرا فعاليت اپسونيزاسيون فاگوسيت ها را کاهش مى دهد. در مطالعه اى درون تنى كارايى GL-۶۷ يك ليپيد كاتيوني حاوى DOPE:DMPE-PEG۵۰۰۰ در انتقال DNA پلاسמידى (تشكيل ليپوپلكس مى دهد) در درمان بيمارى سيستيك فيبروزيس (CF) در انسان بررسى شده بود و در بيمارانى كه درمان را به صورت نبولايزر دريافت كرده بودند به طور چشم گيرى اتصال باكتريايى به ريه ها کاهش يافته بود (۴۰). بنابر اين از اين حامل ليپيدى براى انتقال siRNA به ريه موش ها از مسير درون بينى استفاده شد. siRNA ژن بتا گالاكتوزيداز را هدف قرار داده بود و سبب کاهش بيان ژن تا حدود ۳۳٪ مى شد اما تغيير معنا دارى در بيان پروتئين مشاهده نشد (۱۱). به نظر مى رسيد اين حامل با وجود موفقيت در انتقال DNA پلاسמידى، براى انتقال siRNA موفق نيست و يا به طور احتمال استفاده از مسير بينى و نبولايزر براى سيستم هاى ليپيدى نيازمند مطالعه ها بيش ترى است.

۳- ليپيد هاى خنثى^{۱۲}

براى اجتناب از سميت و تحريك التهاب، علاوه بر PEG از ليپيد

هاى با بار خنثى نيز مى توان استفاده نمود. گرچه اين سيستم هاى خنثى از لحاظ ايمنى مطلوب تر هستند اما قابليه برهمكنش با siRNA با بار منفى نمى باشند و اين امر كاربرى آن ها را به عنوان حامل انتقال با محدوديت مواجه مى سازد. براى حل اين مشكل siRNA و ليپيد ها به جاي برهمكنش هاى الكتروستاتيكي با پيوندد كووالان به يكدیگر متصل مى شوند. اين راهبرد براى انتقال siRNA به ريه مورد بررسى قرار گرفته است به عنوان مثال در مطالعه اى كلسترول به siRNA متصل شده و به موش منتقل شد، كه علاوه بر افزايش مدت اثرات كاهشى، پاسخ التهابى مشاهده نشد هر چند در مقايسه با siRNA برهنه کاهش قابل توجهى نداشت (۴۵).

۴- ذرات ليپيدى

راه كار ديگر براى افزايش ايمنى حامل هاى ليپيدى، محصور كردن siRNA درون ذرات ليپيدى خنثى مى باشد. ذرات ليپيدى پايدار حاوى نوكلئيك اسيد^{۱۳} (SNALP) داراى سايز يكنواخت هستند كه مقادير زيادى siRNA را درون خود كپسوله مى كنند. مشخصه جالب ليپيد هاى SNALP اين است كه در pH اسيدى بار مثبت نشان مى دهند درحالى كه در pH فيزيولوژيك خنثى هستند و در مطالعه ها درون تنى در ميمون ها كارايى قابل توجهى در خاموش نمودن ژن نشان داده اند كه مى توانند در انتقال ژن به ريه نيز مورد بررسى قرار گيرند (۳۹).

وكتور هاى انتقالى با پايه پليمر

خصوصيت جالب وكتور هاى انتقالى پليمرى طبيعت متنوع و منعطف آن هاست، به علاوه آن ها به شدت ليپوزوم ها پاسخ ايمنى را تحريك نمى كنند. در كل حامل هاى پليمرى به دو دسته تقسيم مى شوند: پلى كاتيون ها و نانوپارتيكل هاى پليمرى. پلى كاتيون هاى سنتزى شامل پلى اتيلن ايمين (PEI)، دندريمر هاى پلى آميدو آمين (PAMAM) و پلى كاتيون هاى طبيعى مثل كايوتوزان ها هستند. اين پليمر ها دانسيته بار مثبت بالايى دارند كه با بار منفى اسيد هاى نوكلئيك تركيب شده و پلى پلكس^{۱۴} را تشكيل مى دهند. ساختار غير منعطف siRNA سبب برهمكنش هاى ضعيف با پلى كاتيون ها مى شود. در نتيجه پلى پلكس ها در مقايسه با DNA كارايى كم ترى براى محافظت از siRNA عليه نوكلئاز ها دارند، افزايش مقدار پلى كاتيون ها مى تواند تا حدودى اين نقص را بهبود بخشد اما خود سبب افزايش سميت مى شود (۲۹).

۱۳ Stable nucleic acid lipid particle

۱۴ Polyplex

۱۱ Lipoplexes

۱۲ Neutral lipids

PEI

پليمير سنتزى PEI به دليل كارايى بالاىى براى انتقال siRNA به درون سلول دارد كاربرى بالاىى دارد و به عنوان استاندارد طلاىى براى انتقال ژن در محيط برون تنى به حساب مى آيد البته كارايى ترانسفكشن آن به وزن مولكولى و ميزان شاخه هايش نيز بستگى دارد. پليمير هاىى مثل پلى اتيلن ايمين (PEI) ق ابلت فرار از آندوزوم را دارند. اين توانايى كه اسفنج پروتونى^{۱۵} نام دارد به دليل ظرفيت بافرى بالاىى PEI مى باشد بددين ترتيب كه در طيف وسيعى از pH پليمير پروتونه مى شود (پروتون آزاد مى كند) و اين امر سبب ورود يون هاى CL^- به آندوزوم و به دنبال آن آب به درون آندوزوم ها مى شود. در نهايت به دليل فشار اسمزى بالاىى كه ايجاد شده، آندوزوم پاره و محتوياتش به درون سيتوپلاسم ر ها مى شود (۴). در مطالعه اى كه پلى پلكس هاى PEI و PEI-PEG را براى انتقال siRNA به ريه مورد مطالعه قرار داد. سيستم PEI-PEG كارايى بالاترى براى خاموش نمودن ژن EGFP تا حدود ۴۲٪ نشان داد. هر چند پلى پلكس هاى PEI-PEG اثرات پيش التهابى ملايمى در افزايش سطح سايتوكاين هاى IL-۶ و TNF α نيز داشتند (۲۸). مشكل ديگر PEI سميت نسبتا بالا و زيست تجزيه پذير نبودن آن مى باشد (۲۳). براى حل اين امر آقاى XU و همكارانش مشتقات زيست تجزيه پذيرى از PEI تهيه كردند (پلى استر آمين به همراه PEG) و انتقال siRNA را در محيط درون تنى بررسى نمودند. انتقال اين پلى پلكس حامل siRNA به سلول سرطانى ريه به منظور كاهش بيان ژن Akt۱ در موش صورت گرفت و نتيجه حاصله كاهش چشمگير پيشروى سلول سرطانى بدون ايجاد اثرات سمى قابل توجه بود (۴۸). البته مطالعه ها مختلفى به طور كلى، براى اصلاح ساختار PEI به منظور افزايش قدرت انتقال ماده ژنتيكى (siRNA) به درون سلول و كاهش سميت اين حامل ارزشمند صورت گرفته است (۳۱، ۳۲) و اين موضوع هم چنان در حال بررسى است.

Chitosan

كايتوزان به دليل برخى ويژگى هاىى از جمله طبيعى بودن، زيست سازگار بودن و زيست تجزيه پذيرى اش به عنوان يك حامل بالقوه در انتقال siRNA بسيار مورد توجه قرار گرفته است. به علاوه قابليت اتصال به موكوس و نفوذ در آن، كايتوزان را تبديل به حاملى مطلوب براى انتقال مواد به ريه ساخته است. متاسفانه تنها نقص آن كارايى ترانسفكشن متوسط در محيط درون و برون تنى مى باشد زيرا توانايى كمى براى فرار از آندوزوم در درون سلول دارد (۴۲). به منظور ارتقا كارايى انتقال siRNA توسط كايتوزان آقاى كاتاس روش ژلاتينه سازى يونى^{۱۶} را پيشنهاده نموده كه با استفاده از سديم

ترى فسفات و كايتوزان نانوحامل siRNA توليد شود و در مقايسه به نانوحامل كايتوزان/siRNA اين حامل در محيط in vitro بهتر توانست ژن هدف را خاموش سازد (۱۷).

PLGA^{۱۷}

پليمير PLGA زيست سازگار و زيست تجزيه پذير بوده و براى آزاد سازى كنترل شده ماكرومولكول هاى درمانى از جمله پپتيد ها، پروتئين ها و DNA پلاسميدى استفاده مى شود. برخلاف ديگر پلى كاتيون ها، PLGA تشكيل پلى پلكس با اسيد نوكلئيك نمى دهد بلكه آنرا در درون خود كپسوله (محصور) مى كند. مطالعه اى توليد نانوذرات PLGA حاوى siRNA را به صورت پودرى با سايز كنترل شده بررسى کرده است، فرمولاسيون حاوى لاکتوز، تر هالوز و مانيتول براى محافظت از نانوحامل هاى siRNA مى باشد و در نهايت فرمولاسيونى براى siRNA قابل استنشاق ارائه نموده است كه در مطالعه هاى in vivo مى تواند براى خاموشى ژن استفاده شود (۱۶).

وكتور هاى انتقالى با پايه پپتيدى

از زمان كشف پروتئين TAT از ويروس HIV-۱ كه مسبب جذب سلولى ويروس بود ۱۵۹ نوع از پپتيد هاى نفوذ كننده به سلول^{۱۸} (CPPs) شناسايى و يا سنتز شده اند. اين پپتيد هاى مى توانند براى انتقال siRNA نيز به كار گرفته شوند، عمده CPP هاى استفاده شده براى انتقال siRNA شامل ۶۱ TAT ۱۶۳ ۱۶۲، پنتراتين ۱۶۳-۱۶۵، ترانسپورتين، MPG، CADY و LAH۴ هستند (۲۰). اين پپتيد ها از طريق پيوند كوالان يا برهمكنش الكتروستاتيك به siRNA متصل مى شوند. هنوز مكانيسم دقيق عملكرد CPP ها شناخته نشده است. گرچه CPP هاى بسيارى براى انتقال siRNA بررسى شده اما مطالعه ها كمى انتقال درون تنى siRNA به ريه را گزارش نموده اند. در مطالعه اى siRNA اى كه ژن P۳۸ از مسير MAP كيناز را مورد هدف قرار مى داد به دو صورت siRNA برهنه و siRNA متصل به TAT و پنتراتين در in vivo و in vitro بررسى شد. siRNA هاى متصل به CPP ها حدود ۳۶-۲۰٪ سبب كاهش بيان ژن هدف شدند در حالى كه siRNA برهنه ۴۵-۳۰٪ توانست بيان ژن را كاهش دهد (۳۰).

شناسايى مكانيسم دقيق فعاليت CPP براى كاريدهاى آن به عنوان حامل انتقالى siRNA بسيار مهم است، مطرح شده كه اتصال كوالان CPP به siRNA اثرات منفى در انتقال سلولى دارد و باعث

۱۷ Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)

۱۸ Cell-Penetrating Peptides

۱۵ Proton sponge

۱۶ Ionic gelation method

بتواند به راحتی در انسان از طريق تنفس مورد استفاده قرار گيرد هنوز چالشی بنيادی است. انتقال موضعی siRNA برای درمان بیماری های ریوی زمینه در حال رشد سریعی است و امید می رود در آینده بتواند در مطالعه ها بالینی کاربرد بیابد.

سپاسگزاری:

از کلیه افرادی که در نگارش این مقاله ما رایاری دادند قدردانی می کنیم.

تغییر فعالیت بیولوژیک پپتید ها می شود (۲۷) اتصال غیر کوالان یک راه حل ممکن به نظر می رسد گرچه هنوز هیچ مطالعه درون تنی برای انتقال به ریه گزارش نشده است.

نتیجه گیری

کارایی درمانی siRNA در درمان بیماری های ریوی و سرطان نشان داده شده ولی یکی دیگر از موانعی که بایستی بر آن غلبه شود تهیه یک فورمولاسیون پایدار و قابل تنفس برای siRNA است. برای انتقال ریوی و کاربرد های بالینی در انسان فورمولاسیون بایستی در برابر نیرو های تخریب کننده در طی نبولایزشن^{۱۹} مقاوم باشد، در حالی که DNA برهنه، حاملین ویروسی و بسیاری از فرمولاسیون بر پایه لیپید اغلب فعالیت بیولوژیک خود را در این حین از دست می دهند. ولی فرمولاسیون بر پایه پلیمر هایی مثل پلی اتیلن ایمین (PEI) در طی فرایند نبولایزشن پایدار هستند. از زمان کشف siRNA، پتانسیل های درمانی بسیاری برای آن مطرح شده است. گرچه مطالعه ها کمی برای فرمولاسیون siRNA به صورت تنفسی برای مصارف بالینی وجود دارد به عنوان مثال جنسن و همکارانش روش Spray-drying را برای نانوذرات PLGA حاوی siRNA مطرح نموده ولی متاسفانه هنوز به مرحله درون تنی نرسیده است (۱۶).

مهم ترین چالش های در انتقال siRNA به ریه عبارتند از: (۱) عدم ارتباط متقابل بین مطالعه ها درون تنی و برون تنی، به عنوان مثال siRNA برهنه در *in vitro* نمی تواند سبب خاموشی بیان ژن شود در حالی که مطالعه ها *in vivo* عکس این را نشان داده است (۲). تعمیم مطالعه ها از حیوانات به انسان بسیار مشکل است زیرا ویژگی های بیولوژیک و آناتومیک سیستم تنفسی بین حیوانات و انسان متفاوت است (۳). برخی مسیر های مورد استفاده در حیوانات در عمل برای انسان مناسب نیست و هم چنین مشکلات بسیاری برای ارتقای کارایی فرمولاسیون قبل از ورود به فاز بالینی وجود دارد. بنابراین گرچه بسیاری از مطالعه ها قابلیت siRNA برای بیماری های مختلف ریوی را نشان داده اند کماکان به تلاش های بیش تری برای فهم عمیق تری از مکانیسم های ژن رسانی ریوی و غلبه بر مشکلات تا رسیدن به مرحله بالینی نیاز می باشد.

در این مطالعه ژن رسانی با حامل های غیر ویروسی مورد بررسی قرار گرفت، چندین مطالعه سمیت حاملین را مطرح نموده اند بنابراین مطالعه ها آینده به طور عمده بر روی زیست تجزیه پذیری، زیست سازگاری و هدفمند نمودن حامل های غیر ویروسی متمرکز خواهد شد. طراحی حامل هایی مناسب در یک فورمولاسیون پایدار که

منابع

1. Attanoos RL. Asbestos-Related Lung Disease. *Surg Pathology Clinics*, 2010; 3: 109-127.
2. Choi SW, Lee SH, Mok H, and Park TG. Multifunctional siRNA delivery system: polyelectrolyte complex micelles of six-arm PEG conjugate of siRNA and cell penetrating peptide with crosslinked fusogenic peptide. *Biotechnol Prog*, 2010; 26: 57-63.
3. Cousens C, Thonur L, Imlach S, Crawford J, Sales J, and Griffiths DJ. Jaagsiekte sheep retrovirus is present at high concentration in lung fluid produced by ovine pulmonary adenocarcinoma-affected sheep and can survive for several weeks at ambient temperatures. *Res Vet Sci*, 2009; 87: 154-156.
4. Creusat G, Rinaldi A-S, Weiss E, Elbaghdadi R, Remy J-S, Mulherkar R, and Zuber G. Proton Sponge Trick for pH-Sensitive Disassembly of Polyethylenimine-Based siRNA Delivery Systems. *Bioconjugate Chem*, 2010; 21: 994-1002.
5. Daviskas E, Anderson SD, Jaques A, and Charlton B. Inhaled mannitol improves the hydration and surface properties of sputum in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 2010; 137: 861-868.
6. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, Meyers R, Gollob J, and Vaishnaw A. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107: 8800-8805.
7. Dokka S, Toledo D, Shi X, Castranova V, and Rojanasakul Y. Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm Res*, 2000; 17: 521-525.
8. Duffy MJ, ODonovan N, and Crown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat Rev*, 2011; 37: 151-159.
9. Eckardt JR, Bentsion DL, Lipatov ON, Polyakov IS, Mackintosh FR, Karlin DA, Baker GS, and Breitz HB. Phase II study of picoplatin as second-line therapy for patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2009; 27: 2046-2051.
10. Gomes-da-Silva LC, Fonseca NA, Moura V, Pedroso de Lima MC, Simões S, and Moreira JN. Lipid-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Cancer Therapy: Paradigms and Challenges. *Accounts Chem Res*, 2012; 45: 1163-1171.
11. Griesenbach U, Kitson C, Escudero Garcia S, Farley R, Singh C, Somerton L, Painter H, Smith RL, Gill DR, Hyde SC, Chow YH, Hu J, Gray M, Edbrooke M, Ogilvie V, MacGregor G, Scheule RK, Cheng SH, Caplen NJ, and Alton EW. Inefficient cationic lipid-mediated siRNA and antisense oligonucleotide transfer to airway epithelial cells in vivo. *Resp Res*, 2006; 7: 26.
12. Groves-Kirkby CJ, Timson K, Shield G, Denman AR, Rogers S, and Phillips PS. Lung-cancer reduction from smoking cessation and radon remediation: a preliminary cost-analysis in Northamptonshire, UK. *Environ Int*, 2011; 37: 375-382.
13. He L, and Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004; 5: 522-531.
14. Herbst RS, Heymach JV, and Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*, 2008; 359: 1367-1380.
15. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D. Global cancer statistics. *CA: Cancer J Clin*, 2011; 61: 69-90.
16. Jensen DM, Cun D, Maltesen MJ, Frokjaer S, Nielsen HM, and Foged C. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *J Control Release*, 2010; 142: 138-145.

17. Katas H, and Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release*, 2006; 115: 216-225.
18. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, and Colditz GA. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control*, 2008; 17: 198-204.
19. Kim YH, and Mishima M. Second-line chemotherapy for small-Cell Lung Cancer (SCLC). *Cancer Treat Rev*, 2011; 37: 143-150.
20. Konate K, Crombez L, Deshayes S, Decaffmeyer M, Thomas A, Brasseur R, Aldrian G, Heitz F, and Divita G. Insight into the cellular uptake mechanism of a secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery. *Biochemistry*, 2010; 49: 3393-3402.
21. Kountouri MP, Mammas IN, and Spandidos DA. Human papilloma virus (HPV) in lung cancer: Unanswered questions. *Lung Cancer*, 2010; 67: 125.
22. Lam JK, Liang W, and Chan HK. Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012; 64: 1-15.
23. Lehardt T, Roesler S, Beck-Broichsitter M, and Kissel T. Polymeric nanocarriers for drug delivery to the lung. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2010; 20: 171-180.
24. Lin MM, Kim HH, Kim H, Muhammed M, and Kim DK. Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications. *Nano Rev*, 2010; 1.
25. M.J. Horner LAGR, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou and N. Howlader et al. SEER cancer statistics review. *Natl Cancer Inst*, 2009; 1975-2006.
26. Mauer AM, Cohen EE, Ma PC, Kozloff MF, Schwartzberg L, Coates AI, Qian J, Hagey AE, and Gordon GB. A phase II study of ABT-751 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2008; 3: 631-636.
27. Meade BR, and Dowdy SF. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007; 59: 134-140.
28. Merkel OM, Beyerle A, Librizzi D, Pfestroff A, Behr TM, Sproat B, Barth PJ, and Kissel T. Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Mol Pharm*, 2009; 6: 1246-1260.
29. Miele E, Spinelli GP, Di Fabrizio E, Ferretti E, Tomao S, and Gulino A. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. *Int J Nanomedicine*, 2012; 7: 3637.
30. Moschos SA, Williams AE, and Lindsay MA. Cell-penetrating-peptide-mediated siRNA lung delivery. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35: 807-810.
31. Oskuee RK, Dehshahri A, Shier WT, and Ramezani M. Alkylcarboxylate grafting to polyethylenimine: a simple approach to producing a DNA nanocarrier with low toxicity. *J Gene Med*, 2009; 11: 921-932.
32. Oskuee RK, Philipp A, Dehshahri A, Wagner E, and Ramezani M. The impact of carboxyalkylation of branched polyethylenimine on effectiveness in small interfering RNA delivery. *J Gene Med*, 2010; 12: 729-738.
33. Peng S-F, Tseng MT, Ho Y-C, Wei M-C, Liao Z-X, and Sung H-W. Mechanisms of cellular uptake and intracellular trafficking with chitosan/DNA/poly(γ -glutamic acid) complexes as a gene delivery vector. *Biomaterials*, 2011; 32: 239-248.
34. Qian Z, Zhao X, Jiang M, Jia W, Zhang C, Wang Y, Li B, and Yue W. Downregulation of Cyclophilin

- A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metalloproteinase 9. *BMC Cancer*, 2012; 12: 442.
35. Repace JL, Jiang R-T, Acevedo-Bolton V, Cheng K-C, Klepeis NE, Ott WR, and Hildemann LM. Fine particle air pollution and secondhand smoke exposures and risks inside 66 US casinos. *Environ Res*, 2011; 111: 473-484.
 36. Robbins M, Judge A, and MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides*, 2009; 19: 89-102.
 37. Rosas-Taraco AG, Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Lee EJ, Orme IM, and Gonzalez-Juarrero M. Intrapulmonary delivery of XCL1-targeting small interfering RNA in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009; 41: 136-145.
 38. Roy I, and Vij N. Nanodelivery in airway diseases: challenges and therapeutic applications. *Nanomedicine*, 2010; 6: 237-244.
 39. Rudolf S, and Rädler JO. Self-Assembly of Stable Monomolecular Nucleic Acid Lipid Particles with a Size of 30 nm. *J Am Chem Soc*, 2012; 134: 11652-11658.
 40. Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA, Bebok Z, Hong JS, Cheng SH, Meeker DP, Young KR, Schoumacher RA, Weatherly MR, Wing L, Morris JE, Sindel L, Rosenberg M, van Ginkel FW, McGhee JR, Kelly D, Lyrene RK, and Sorscher EJ. A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*, 2001; 12: 751-761.
 41. Sakagami M. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006; 58: 1030-1060.
 42. Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Devi MP, and Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *Int J Biol Macromol*, 2011; 48: 234-238.
 43. Sashital DG, and Doudna JA. Structural insights into RNA interference. *Curr Opin Struct Biol*, 2010; 20: 90-97.
 44. Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, and Kohno N. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax*, 2010; 65: 334-340.
 45. Shim MS, and Kwon YJ. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS Journal*, 2010; 277: 4814-4827.
 46. Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, Boffetta P, Buring JE, Feskanich D, Flanders WD, Jee SH, Katanoda K, Kolonel LN, Lee IM, Marugame T, Palmer JR, Riboli E, Sobue T, Avila-Tang E, Wilkens LR, and Samet JM. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med*, 2008; 5: e185.
 47. Watts JK, Deleavey GF, and Damha MJ. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today*, 2008; 13: 842-855.
 48. Xu CX, Jere D, Jin H, Chang SH, Chung YS, Shin JY, Kim JE, Park SJ, Lee YH, and Chae CH. Poly (ester amine)-mediated, aerosol-delivered Akt1 small interfering RNA suppresses lung tumorigenesis. *Am J Resp Crit Care*, 2008; 178: 60-73.
 49. Yin J, Vogel U, Ma Y, Qi R, and Wang H. Association of DNA repair gene XRCC1 and lung cancer susceptibility among nonsmoking Chinese women. *Cancer Genet Cytogen*, 2009; 188: 26-31.
 50. Zhang J, Wu L, Chan H-K, and Watanabe W. Formation, characterization, and fate of inhaled drug

nanoparticles. *Adv Drug Deliver Rev*, 2011; 63: 441-455.

51. Zhang S, Zhao Y, and Zhi D. Non-viral vectors for the mediation of RNAi. *Bioorg Chem*, 2012; 40: 10-18.