



วารสาร ไทยไคยชัยนิพนธ์

ปีที่ 6 เดือนมกราคม 2554

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ (on-line)



การบำบัดโรคด้วย RNA interference (RNAi)

ณยา วงษ์พูน

เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภ.บ.)

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ หลักสูตรนานาชาติ สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (วท.ม.)

เภสัชกรชำนาญการ สำนักยา กลุ่มงานกำหนดมาตรฐาน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

รหัส 1-000-SPU-000-1108-01

จำนวนหน่วยกิต 2.0 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง: 1 สิงหาคม พ.ศ. 2554

วันที่หมดอายุ: 1 สิงหาคม พ.ศ. 2556

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. สามารถเข้าใจถึงความสำคัญของกระบวนการ RNAi ในสิ่งมีชีวิต
2. สามารถอธิบายถึงกลไกการทำงานของ RNAi และแยกความแตกต่างระหว่าง siRNA และ miRNA
3. สามารถยกตัวอย่างอุปสรรคและวิธีแก้ไขในการนำกระบวนการ RNAi ไปใช้เพื่อรักษาโรค
4. สามารถยกตัวอย่างกลุ่มโรคที่เป็นเป้าหมายในการรักษาด้วยกระบวนการ RNAi

บทคัดย่อ

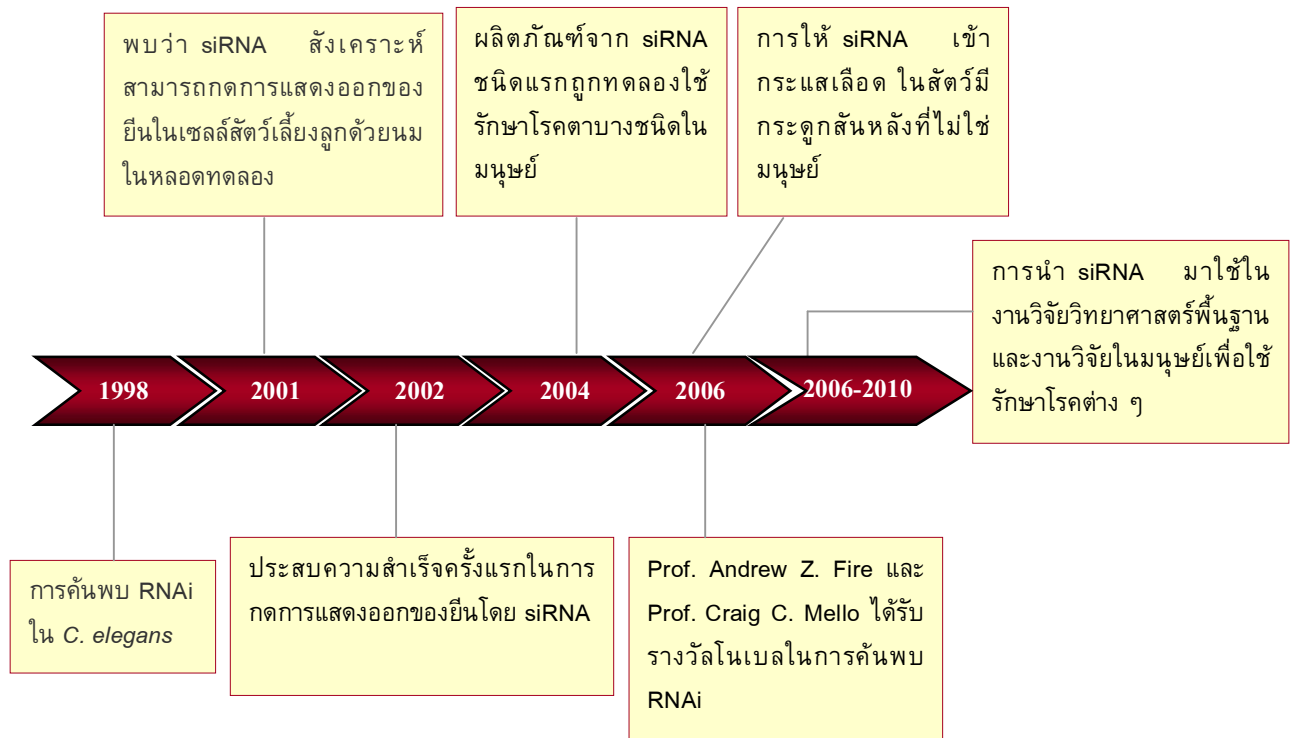
หนึ่งในการค้นพบทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานด้านชีววิทยาที่สร้างประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาต่อยอดสู่วิทยาศาสตร์ประยุกต์คือ การค้นพบกระบวนการ RNA interference (RNAi) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกยีน สามารถป้องกันการบุกรุกของไวรัสโดยเฉพาะในเซลล์พืช และยับยั้งการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายได้ (transposon) โดยผ่านการทำงานของอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก เช่น siRNA miRNA หรือ shRNA ซึ่งสามารถกดหรือทำลายการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ณ ระดับที่แตกต่างกัน เช่น ระดับการถอดรหัส หลังการถอดรหัส (post-transcription) หรือ การแปลรหัส หลักการดังกล่าวถูกนำมาประยุกต์ใช้เกี่ยวกับ (1) การศึกษาหน้าที่ของยีน (2) การนำมาใช้เป็นยา เรียกว่า “ยีนเทอราปี” โดยมีกลุ่มโรคเป้าหมาย เช่น โรคติดเชื้อไวรัส โรคมะเร็ง โรคทางพันธุกรรม โรคตา และโรคหัวใจ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม

แม้ว่าการรักษาโรคด้วยวิธี RNAi จะมีข้อเด่นในเรื่องความจำเพาะในการรักษา แต่ยังมีปัญหาที่สำคัญคือ การนำส่งยาเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ความคงตัวและความปลอดภัย ซึ่งยังคงต้องมีการพัฒนาให้เกิดผลสัมฤทธิ์สูงสุดในการนำไปใช้ ต่อไป

คำสำคัญ: RNA interference, siRNA, miRNA, RNAi application

1. บทนำ

นับตั้งแต่มีการค้นพบกระบวนการ RNAi ในสัตว์ประเภทหนอน *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) เมื่อปี ค.ศ. 1998 โดย ศาสตราจารย์ Andrew Z. Fire และศาสตราจารย์ Craig C. Mello¹ ซึ่งต่อมาได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาในปี ค.ศ. 2006 การศึกษาได้สรุปถึงบทบาทสำคัญของกระบวนการ RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนใน *C. elegans* โดยการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ซึ่งส่งผลให้มีการแสดงออกทางกายภาพของ *C. elegans* เปลี่ยนแปลงไป จากข้อสรุปนี้ทำให้มีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องโดยส่วนใหญ่มีทิศทางการทดสอบผลของกระบวนการ RNAi ต่อเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตที่มีความสลับซับซ้อนที่สูงขึ้นใกล้เคียงมนุษย์ เช่น ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น และช่วงห้าปีที่ผ่านมา มีความชัดเจนจากการศึกษาวิจัยว่า หลักการของกระบวนการ RNAi สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อ (1) เป็นเครื่องมือในการศึกษาหน้าที่ของยีนและ (2) เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ ซึ่งจัดเป็นการรักษาโรคด้วยยีนจึงเรียกว่า “ยีนเทอราปี” (gene therapy) คาดว่าในอนาคต RNAi จะถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นทางเลือกของการรักษาโรคในมนุษย์ที่สำคัญอีกวิธีหนึ่ง ช่วงเวลาของวิวัฒนาการศึกษากลไกกระบวนการ RNAi แสดงไว้ตามรูปที่ 1 ซึ่งจะเห็นภาพหลังจากที่มีการค้นพบ RNAi ไม่นานนัก ก็ได้นำไปสู่การประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางและรวดเร็วยิ่งนัก



รูปที่ 1 แสดงช่วงเวลาของวิวัฒนาการศึกษากระบวนการ RNAi²

2. กระบวนการ RNAi มีความสำคัญอย่างไร

RNAi เป็นกระบวนการตามธรรมชาติที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตประเภทยูแคริโอตทุกชนิด การผลการค้นพบกระบวนการ RNAi ใน *C. elegans* สามารถสรุปถึงบทบาทสำคัญได้เป็นสองหลักการใหญ่ คือ 1) บทบาทของ RNAi ตามธรรมชาติ กล่าวคือ 1.1) เป็นกลไกในการป้องกันเซลล์จากการบุกรุกของไวรัสโดยเฉพาะใน พืช^{3,4} สัตว์ประเภทหนอน และแมลงวัน 1.2) สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนสัญจร (jumping genes) หรือ ทรานสโพซอน (transposons) จึงอาจช่วยป้องกันความเสียหายของจีโนมอันเนื่องมาจากยีน transposons ได้^{5,6} 1.3) เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ กระบวนการตายของเซลล์ และควบคุมพัฒนาการของสิ่งมีชีวิต⁷⁻⁹ และ 2) บทบาทในการนำไปประยุกต์ใช้ เช่น 2.1) ใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน โดยใช้กระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษาแล้วสังเกตผลทางกายภาพที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เช่น ยับยั้งการแสดงออกของยีน OCT4 และ NANOG แล้วสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด¹⁰ เป็นต้น 2.2) ใช้เป็นยารักษาทางการแพทย์ในกลุ่มยีนเทอราปี¹¹⁻¹⁵ ด้วยหลักการ การยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนั้นไว้ โดยมีกลุ่มโรคที่เป็นเป้าหมาย เช่น โรคติดเชื้อ จากไวรัส เช่น โรคเอดส์ และไข้หวัดใหญ่ (Influenza A) จากแบคทีเรีย พาราสิต เช่น โรคมาลาเรีย และจากเชื้อรา หรือ โรคไม่ติดเชื้อ เช่น โรคมะเร็ง โรคทางพันธุกรรม โรคหัวใจ โรคตา โรคทางช่องปาก หรือ ใช้รักษาร่วมกับการรักษาโรคด้วยเซลล์ต้นกำเนิด¹⁶ (รูปที่ 3) เป็นต้น

3. กลไกของ RNAi (Mechanism of RNAi)

RNAi เป็น “ชื่อ” ของกระบวนการ ซึ่งเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการทำงานของกรดนิวคลีอิกประเภท อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก (small RNA) เช่น siRNA (small interfering RNA) miRNA (micro RNA) หรือ shRNA (short hairpin RNA) ร่วมกับโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม RNase III ชื่อว่า “Dicer” และโปรตีนกลุ่ม “Argonate” กลไกของ RNAi ที่เกิดจากการทำงานของ siRNA และ miRNA เป็นดังนี้

3.1 siRNA (small interfering RNA): เกิดจาก การใส่อาร์เอ็นเอเส้นคู่ยาว (long dsRNA) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเข้าไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่อเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมแล้วอาร์เอ็นเอเส้นคู่ยาวจะถูกตัดให้มีขนาดสั้นลงโดย RNA specific endonuclease (Dicer) เหลือความยาวประมาณ 21-25 คู่เบส¹⁷ โดยที่ปลายด้าน 3' ทั้งสองข้างจะมีนิวคลีโอไทด์ยื่นเหลื่อมออกมา

2 นิวคลีโอไทด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า “small interfering RNA หรือ siRNA” จากนั้น siRNA จะเข้าจับกับโปรตีนกลุ่ม Argonaute¹⁸ (ในมนุษย์เป็น AGO2) แล้วรวมเป็นโครงสร้างเชิงซ้อน เรียกว่า RNA-induced silencing complex (RISC)¹⁹ ซึ่งเอนไซม์ RNA helicase ที่อยู่ใน RISC จะใช้แยก siRNA จากเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยเส้นที่มีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเรียกว่าเส้น “Antisense” หรือ “Guide strand” ส่วนเส้นที่เหลือเรียกว่าเส้น “Sense” หรือ “Passenger strand” ซึ่งจะถูกตัดทิ้ง ต่อมา Guide strand ที่อยู่ใน RISC จะพา RISC เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย^{20, 21} อย่างจำเพาะเจาะจงตามหลักการเข้าคู่กันของคู่เบส จากนั้น Argonaute จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่ 10 และ 11 บนเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเมื่อนับจากปลาย 5' ของเส้น Guide strand^{22,23} ทำให้เส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายสลายตัวอย่างรวดเร็วเนื่องจากเมื่อตัดแล้วที่ปลายทั้ง 5' และ 3' ไม่มี Cap (m⁷G) และ Poly A ตามลำดับ ช่วยในการป้องกันการสลายตัวอีกต่อไป²⁴ (รูปที่ 2a)²⁵ ดังนั้นจึงเป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีน ณ ระดับหลังการถอดรหัส (post-transcriptional level) โดยการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายก่อนที่จะถูกแปลรหัส

3.2 miRNA (micro RNA): จัดเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กชนิดหนึ่งที่มีชีวิตผลิตขึ้นมาได้เอง โดยเริ่มจากยีนที่มีหน้าที่ผลิต miRNA ถูกถอดรหัสให้ miRNA เริ่มต้น (pri-miRNA) โดยเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ที่มีรูปร่างผสมกันระหว่างก้านและปวง (stem-loop) ความยาวประมาณ 65-70 นิวคลีโอไทด์ จากนั้น pri-miRNA จะถูกเอนไซม์ในกลุ่ม RNase III ชื่อว่า “Drosha”²⁶ ในนิวเคลียสตัดให้มีขนาดสั้นลงแล้วส่งออกมาสู่ไซโตพลาสซึม เรียกว่า Pre-miRNA เอนไซม์ Dicer จะตัด Pre-miRNA เหลือความยาวประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า miRNA (ประกอบด้วยเส้น Guide strand และเส้น Passenger strand เช่นเดียวกัน) miRNA จะเข้าจับกับโปรตีน Argonaute เกิดเป็น RISC จะกำจัดเส้น Passenger strand ออกเหลือแต่เส้น Guide strand อยู่ใน RISC เท่านั้น จากนั้น Guide strand จะพา RISC ไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย แต่เนื่องจากโดยโครงสร้างของ miRNA มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เข้าคู่กับ RNA เป้าหมายได้ทั้งหมด (loop) ทำให้นิวคลีโอไทด์ระหว่าง miRNA และเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายจับกันเป็นบางส่วนเท่านั้น เชื่อว่าการจับกันเป็นบางส่วนนี้ทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายไม่ถูกตัดโดยโปรตีน Argonaute แต่ miRNA จะไปกีดการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (translation repression) หรือการสังเคราะห์โปรตีน^{8,27,28} (รูปที่ 2b)

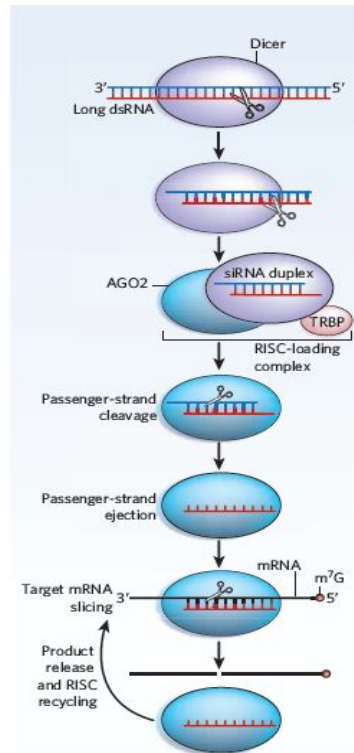
4. ข้อดีและสิ่งที่ท้าทายในการพัฒนาเพื่อนำ RNAi ไปประยุกต์ใช้ (Advantage and Challengess of RNAi application)

4.1 ข้อดี:

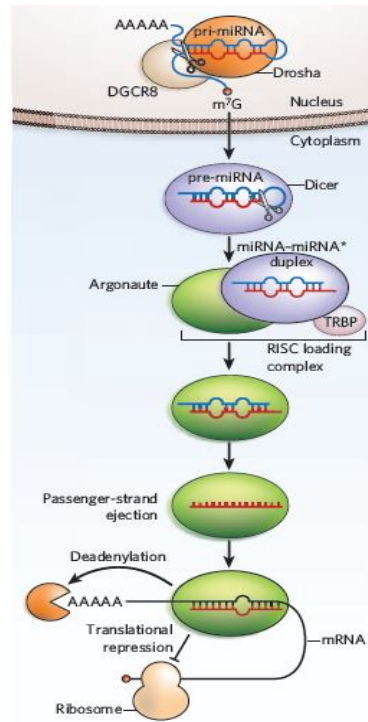
1. มีความจำเพาะสูง (Specificity): เนื่องจาก RNAi เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายตามหลักการเข้าคู่กันของคู่เบส¹⁵ ทำให้การรักษาโรคด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะสูง ทำให้ถูกนำมาศึกษาวิจัยในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็งและโรคทางระบบประสาท²⁹⁻³² เป็นต้น

2. มีฤทธิ์สูง (Potency): มีหลายงานวิจัยกล่าวว่า เทคโนโลยี RNAi มีฤทธิ์สูงกว่าการรักษาด้วยยีนแบบ antisense oligonucleotide³³ โดยสามารถใช้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าได้^{34,35} ทำให้สามารถลดขนาดและความถี่ในการใช้ จึงลดโอกาสการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ และเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาในผู้ป่วย

(a) siRNA (human)



(b) miRNA (human)



รูปที่ 2 แสดงกลไกของกระบวนการ RNAi ที่เกิดจากการทำงานของ (a) siRNA และ (b) miRNA ในเซลล์มนุษย์²⁵

4.2 สิ่งที่ทำลายในการพัฒนา:

4.2.1 การนำส่ง (Delivery) การนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์เป็นปัญหาหลักของการนำ RNAi ไปใช้ในการรักษา สาเหตุหนึ่งมาจาก siRNA เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และมีประจุลบเช่นเดียวกับพลาสมาเมมเบรนของเซลล์จึงทำให้ siRNA ผ่านพลาสมาเมมเบรนเข้าสู่เซลล์ได้น้อย ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหาว่าทำอย่างไรจะให้ siRNA ถูกนำส่งไปยังเซลล์เป้าหมายได้อย่างเฉพาะเจาะจง และไม่ถูกทำลายด้วย Rnase ในเลือดและในเนื้อเยื่อ จึงมีการพัฒนารูปแบบของการนำส่ง siRNA ดังนี้

(1) การนำส่งเฉพาะที่ (Local delivery)^{36,37} เช่น 1) การฉีด siRNA แบบเปลือย (naked siRNA) เข้าดวงตาโดยตรงในการรักษาโรคจอประสาทตาเสื่อม (Age-related Macular Degeneration, AMD)³⁸ 2) การฉีด siRNA เข้าสู่ก้อนเนื้องอกในการรักษามะเร็งเต้านมในหนู³⁹ 3) การใช้กระแสไฟฟ้าช่วยนำส่ง siRNA เข้ากล้ามเนื้อ⁴⁰ 4) การฉีด siRNA เพื่อให้มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ฉีดเข้าทางไขสันหลัง⁴¹ ฉีดเข้าสมองส่วนไฮโปทาลามัส⁴² หรือฉีดเข้าก้านสมอง⁴³ เป็นต้น 5) การให้ siRNA ทางจมูกในการรักษาโรคหอบหืด⁴⁴ โรคซิสติกไฟโบรซิส และโรคติดเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจ⁴⁵⁻⁴⁷ เป็นต้น

(2) การนำส่งเข้าสู่กระแสเลือด (Systemic delivery) เช่น 1) การฉีด siRNA เข้ากระแสเลือดอย่างรวดเร็วในปริมาณมาก ซึ่งพบว่าวิธีนี้ไม่มีความเหมาะสมที่จะใช้ในเซลล์มนุษย์⁴⁸⁻⁵⁰ 2) การเชื่อมปลาย 3' ของเส้น sense ด้วยคลอเลสเทอรอล^{51,52} เพื่อช่วยป้องกันการทำลายจาก Rnase และการหุ้ม siRNA ด้วยโมเลกุลที่มีประจุบวก^{12,53-59} ซึ่งสามารถนำส่งได้ทั้งแบบเฉพาะที่และเข้าสู่กระแสเลือด เป็นต้น

4.2.2 ความคงตัว (Stability) จากการต้องนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้แล้ว siRNA ที่ถูกนำส่งนั้นต้องมีความสมบูรณ์และทำงานในเซลล์เป้าหมายได้ด้วย แต่เนื่องจากในซีรัมหรือเนื้อเยื่อมีเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่สามารถทำลาย siRNA แบบเปลือย ซึ่งเป็นสาเหตุให้ siRNA แบบเปลือยสลายตัวอย่างรวดเร็ว มีค่าครึ่งชีวิตสั้น ถูกขับออกทางไตเร็ว เหล่านี้ล้วนมีผลสัมพันธ์กับระยะเวลาในการออกฤทธิ์¹⁴ ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อพัฒนาเพิ่มความคงตัวของ siRNA แบบเปลือยโดยป้องกันการทำลายจากเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสด้วยการใช้สารเคมีเข้ามาปรับแต่งโครงสร้างของ siRNA แบบเปลือยที่ตำแหน่งต่าง ๆ เช่น ที่พันธะไรโอเอท (Thioate linkage, P-S linkage) หรือ ที่ตำแหน่ง 2' -OH^{60,61} เป็นต้น

4.2.3 ความปลอดภัย (Safety) มีการพัฒนาการใช้ RNAi เพื่อการรักษาในด้านความปลอดภัยดังนี้ (1) การจับยีนเป้าหมายผิดพลาด (Off-target effects)^{2,37,62-64} ซึ่งไม่ได้เกิดจากการใช้ปริมาณ siRNA ที่มากเกินไปแต่อาจเกิดจากการออกแบบ siRNA ที่ยังไม่จำเพาะเจาะจงเท่าที่ควร (2) การเกิดผลที่ไม่ต้องการ (Non-specific effects) คือการที่ siRNA เข้าจับยีนถูกเป้าหมายแต่เกิดผลอย่างอื่นซึ่งไม่ใช่ผลที่ต้องการ เช่น กระตุ้นอินเตอร์เฟียร์รอน^{2,65,66} เป็นต้น (3) การอ้อมตัวของโปรตีนสำคัญ Dicer และ RISC ในกระบวนการ RNAi ซึ่งอาจมีผลต่อความสมดุลของการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เช่น ยีนมะเร็ง ซึ่งมีส่วนควบคุมโดย miRNA ซึ่งใช้ Dicer และ RISC ร่วมกันกับ siRNA ดังนั้นการอ้อมตัวของ Dicer และ RISC อันเนื่องมาจากการมี siRNA เพิ่มเข้ามาในเซลล์จึงอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง⁶⁷⁻⁶⁹

4.2.4 ประสิทธิภาพ (Efficacy) ประสิทธิภาพของการรักษาด้วย RNAi เป็นเรื่องที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะ (1) การติดต่อ RNAi ในโรคติดเชื้อไวรัส เนื่องจากไวรัสมีความสามารถในการกลายพันธุ์ยีนของตัวเองได้ตลอดเวลาอย่างรวดเร็วซึ่งอาจทำให้การใช้ RNAi ในครั้งต่อไปไม่ได้ผล^{70,71} อาจแก้ปัญหาโดยออกแบบให้ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลาย ๆ ยีนหรือการใช้ร่วมกับการรักษาแบบอื่น⁶⁶ (2) ระยะเวลาในการ

ออกฤทธิ์สั้น ในกรณีที่ใช้รักษาโรคเฉียบพลันการออกฤทธิ์สั้นอาจไม่เป็นปัญหาในการรักษา แต่ ถ้าเป็นโรคเรื้อรังที่ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาและการออกฤทธิ์นาน เช่น โรคเอดส์ อาจเกิด ความไม่สะดวก เพราะจำเป็นต้องให้ siRNA บ่อยขึ้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาขึ้นอีกขั้นโดยการ สร้างพลาสมิดที่ผลิตอาร์เอ็นเอขนาดเล็กอีกชนิดหนึ่ง เรียกว่า short hairpin (shRNA) ซึ่ง สามารถออกฤทธิ์ได้ต่อเนื่องและยาวนานในเซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น

5. การประยุกต์ใช้ RNAi เพื่อนำมาศึกษาในโรคต่าง ๆ (RNAi and human diseases)

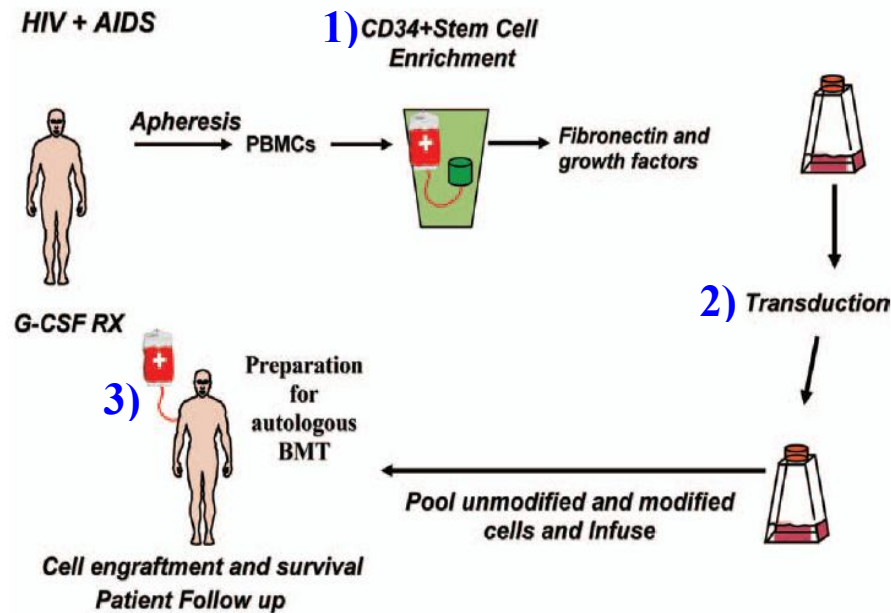
1. โรคติดเชื้อ (Infectious) การใช้ RNAi ในการรักษาโรคติดเชื้อโดยเฉพาะจากโรคเชื้อ ไวรัสกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก หลังจากมีรายงานการวิจัยในปี ค.ศ. 2001 ที่พบว่า กระบวนการ RNAi สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส “Respiratory Syncytial Virus” (RSV) ได้^{44,72-74} ทำให้มีการนำหลักการนี้ไปพิสูจน์ในเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสอินฟลูเอนซา (Influenza virus)⁷⁵⁻⁷⁸ ไวรัสเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV)^{14,37,79-84} ไวรัสเฮปาทาไทซิส (Hepatitis)^{85,86} และไวรัสซาร์ (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)^{87,88} เป็นต้น นอกจากนี้ โรคติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อวัณโรค⁸⁹ และ *Pseudomonas aeruginosa*⁹⁰ โรคติดเชื้อปรสิต เช่น มาเลเรีย^{91,92} และที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Entamoeba histolytica*⁹³

2. โรคมะเร็ง (Cancer) กระบวนการ RNAi สามารถรักษาโรคมะเร็งโดย 1) ยับยั้งการ ทำงานของยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง (Oncogenes) โดยตรง^{29, 94-96} 2) ยับยั้งการ ทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดเพื่อทำให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้น^{97,98} 3) ยับยั้งการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญหรือ แพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง^{99,100} และ 4) ยับยั้งการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ เซลล์มะเร็งหลบระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย^{101,102}

3. โรคทางพันธุกรรม (Genetic diseases) มีการศึกษาพบว่า RNAi สามารถนำมาใช้ในการ รักษาโรคทางพันธุกรรมที่มียีนที่ผิดปกติแล้วแสดงออกที่ทำให้เกิดโรคหรือโรคที่เกิดจากความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวของยีนเดียวกันระหว่างกลุ่มประชากรหรือที่ เรียกว่า “สแน็ปส์” (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) ได้ เช่น โรค Sickle cell anemia³⁷ โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease (AD))¹⁰³ โรค Huntington’s disease (HD) โรค Machado-Joseph disease (MJD) และโรค Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) เป็นต้น¹⁰⁴⁻¹⁰⁵

4. การนำมาศึกษาวิจัยร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) มีศึกษาวิจัยโดยการนำ RNAi ที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนไวรัสโรคเอดส์ ใส่ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (Hematopoietic stem cells, HSCs) ของคนไข้โรคเอดส์เพื่อให้ HSCs ผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ต้านทานการเพิ่มจำนวนไวรัสได้¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ (รูปที่ 3) นอกจากนั้นยังนำ RNAi มาใช้ศึกษาหน้าที่ ของ ยีนในเอ็มบริโอเนกสเต็มเซลล์ของมนุษย์ (human Embryonic stem cells, hESCs) โดย

หลักการคือ ใช้ siRNA หรือ shRNA กดการทำงานของยีนที่ต้องการจะศึกษา เช่น OCT3 หรือ SOX2 เป็นต้น แล้วสังเกตผลที่เกิดขึ้น¹⁰



รูปที่ 3 แสดงโครงร่างการศึกษาวิจัยในมนุษย์ในการนำ RNAi และเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ร่วมกันในผู้ป่วยโรคเอดส์¹⁰⁶

1) เก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากเส้นเลือดแขนของผู้ป่วยโรคเอดส์เองก่อนลงไขกระดูก

2) ให้ไวรัสที่เป็นพาหะนำ shRNA ที่ออกแบบมาเพื่อยับยั้งการทำงานของยีนของไวรัสเอดส์เข้าไปในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด

3) ถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ได้ให้ผู้ป่วยโรคเอดส์ที่ถูกกดการสร้างไขกระดูกแล้ว

5. โรคตา (Ocular diseases) มีงานวิจัยที่นำ RNAi มาประยุกต์ใช้ในสัตว์ทดลองเพื่อรักษาโรคตาเช่น รักษาอาการอักเสบของตา¹¹⁰ โรคจอประสาทตาเสื่อม¹¹¹ (Age-related Macular Degeneration, AMD) และโรคตาชนิดอื่น^{112,113}

6. โรคหัวใจ (Cardiac diseases) มีการศึกษาพบว่า กระบวนการ RNAi สามารถนำมาใช้รักษาโรคหัวใจวาย โดยมีเป้าหมายที่ยีน “ฟอสโฟแลมเบิน” (Phospholamban, PL)¹¹⁴⁻¹¹⁶ ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อกลไกการเกิดโรคหัวใจวาย นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยพบว่าเมื่อ

ใช้กระบวนการ RNAi ยับยั้งการทำงานของยีน Arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5) แล้วสามารถป้องกันการเกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง¹¹⁷

6. สรุป

จากจุดเริ่มต้นในอดีตของการค้นพบกระบวนการ RNAi ใน *C. elegans* จนถึงการพัฒนาสู่งานหลักการเพื่อนำไปใช้ในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง ทำให้ ณ ปัจจุบันนี้มีความชัดเจนแล้วว่า กระบวนการ RNAi สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนและถูกนำมาศึกษาวิจัยในมนุษย์ (clinical trial) โดยส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่ 1 หรือ 2 อย่างไรก็ตามยังมีสิ่งที่ท้าทายต่อการพัฒนาในการนำกระบวนการ RNAi มาใช้รักษาโรคในมนุษย์ให้เกิดประโยชน์สูงสุดคือ การพัฒนาระบบนำส่ง ความคงตัว ความปลอดภัย และประสิทธิภาพของการรักษา คาดว่าในอนาคต RNAi จะเป็นวิธีการรักษาโรคในมนุษย์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นทางเลือกสำคัญอีกวิธีหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998; 391: 806-811.
2. Kim SS, Garg H, Joshi A, et al. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs *in vivo*. Trend in Molecular Medicine 2009; 15(11): 491-500.
3. Covey S, Al-Kaff N, Langara A, et al. Plants combat infection by gene silencing. Nature 1997; 385: 781-782.
4. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. Science 1997; 276: 1558-1560.
5. Ketting RF, Haverkamp TH, Luenen HG, et al. *mut-7* of *C. elegans*, Required for Transposon Silencing and RNA Interference, Is a Homolog of Werner Syndrome Helicase and RNaseD. Cell 1999; 99: 133-141.
6. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, et al. The *rde-1* Gene, RNA Interference and Transposon Silencing in *C. elegans*. Cell 1999; 99: 123-132.
7. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. Current Opinion in Genetics & Development 2005; 15: 410-415.
8. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell 2004; 116: 281-297.
9. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science 2001; 294: 858-862.

10. Rassouli FB, Matin MM. Gene silencing in human embryonic stem cells by RNA interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 2009; 1106-1110.
11. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-377.
12. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nature biotechnology* 2005; 23(8): 1002-1007.
13. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update. *The Journal of Gene Medicine* 2007; 9: 833-842.
14. Dykxhoorn DM, Palliser D, Lieberman J. *The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs*. *Gene Therapy* 2006; 13: 541-552.
15. Pushparaj PN, Aarthi JJ, Manikandan J, et al. siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo Applications. *Journal of Dental Research* 2008; 84(11): 992-1003.
16. Cheng JC, Moore TB and Sakamoto KM. RNA interference and human disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 80 2003; 121-128.
17. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role of bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
18. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-296.
19. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins key players in RNA silencing. *Nature Review Mol. Cell Biol.* 2008; 9: 22-32.
20. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-574.
21. Schwarz DS and Hutvagner G, et al. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Molec Cell* 2002; 10: 537-548.
22. Elbashir SM, Lendeckel W and Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes Development.* 2001; 15: 188-200.
23. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNA in *Drosophilla melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888.
24. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-1441.
25. Jinek M and Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009; 457: 405-412.

26. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
27. Pillai RS, Bhattacharyya SN and Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trend in Cell Biology* 2007; 17: 118-6126.
28. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, et al. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. *Science* 2007; 317: 1764-1767.
29. Brummelkamp T, Bernards R and Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002; 2(3): 243-247.
30. Miller V, Xia H, Marrs G, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100(12): 7195-7200.
31. Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002; 21(37): 5716-5724.
32. Gonzalez-Alegre P, Miller V, Davidson B, et al. Toward therap for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann. Neurol* 2003; 53(6): 781-787.
33. Achenbach T, Brunner B and Heermeier K. Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. *Chembiochem* 2003; 4(10): 928-935.
34. Bertrand J, Pottier M, Vekris A, et al. Comparison of antisense oligonucleotide and siRNA in cell culture and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2002; 296(4): 1000-1004.
35. Miyagishi M, Hayashi M and Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotide and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13(1): 1-7.
36. Akhtar S and Benter I. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 3623-3632.
37. Lopez-Fraga M, Martinez T and Jimenez A. RNA Interference Technologies and Therapeutics. *Biodrug* 2009; 23(5): 305-332.
38. Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, et al. Intravitreal infection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate,laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24(1): 132-138
39. Pille JY, Denoyelle C, Varet J, et al. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Molecular Therapy* 2005; 11: 267-274.

40. Golzio M, Mazzolini L, Moller P, et al. Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. *Gene Therapy* 2005; 12: 246-251.
41. Tan PH, Yang LC, Shih H, et al. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Therapy* 2005; 12: 59-66.
42. Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, et al. Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neuroscience* 2002; 3:18
43. Shiskina GT, Kalinian TS and Dygalo NN. Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood. *Neuroscience* 2004; 129: 521-528.
44. Huang HY and Chiang BL. siRNA as a therapy for asthma. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11(6): 652-663.
45. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine* 2005; 11: 50-55.
46. Li BJ, Tang Q, Cheng D, et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nature Medicine* 2005; 11:944-951.
47. Vincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral research* 2008; 77(3): 225-231.
48. Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine* 2003; 9: 237-248.
49. Sebestyen MG, Budler VG, Budker T, et al. A Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein infection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *Journal Gene Medicine* 2006; 8:852-873.
50. Lewis DL, Wolff JA. Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection. *Advance Drug Delivery Review* 2007; 59: 115-123.
51. Ambardekar VV, Han HY, Varney ML, et al. The modification of siRNA with 3' cholesterol to increase nuclease protection and suppression of native mRNA by select siRNA polyplexes. *Biomaterials* 2011; 32(5): 1404-1411.
52. Kim WJ, Christensen LV, Jo S, Yockman JW, et al. Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. *Molecular Therapy* 2006; 14(3): 343-350.

53. Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, et al. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2004; 101: 8682-8686.
54. Pardridge WM. shRNA and siRNA delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59: 141-152.
55. Aigner A. Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006; 2006: 71659.
56. Kawakami S and Hashida M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007; 22: 142-151.
57. Gilmore IP, Fox SP, Hollins AJ, et al. The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J. Drug Targeting* 2004; 12: 315-340.
58. Vangasseri DP, Han SJ, Huang L, et al. Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2: 401-406.
59. Kim WJ, Lane V, Christensen, et al. Cholesteryl oligoarginine delivery vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol. Ther.* 2006; 14: 343-350.
60. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.* 2002; 32: 107-108.
61. Chiu YL and Rana TM. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 2003; 9: 1034-1048.
62. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, et al. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 2006; 12: 1188-1196.
63. Kim DH and Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8: 173-184.
64. Jackson AL, Burchard DL, Reynolds A, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA* 2006; 12: 1197-1205.
65. Hornung V, Guenther M, Bouquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 2005; 11: 263-270.
66. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, et al. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 2003; 5(9): 835-839.
67. Davis BN and Hata A. microRNA in Cancer---The involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways. *Genes Cancer* 2010; 1(11): 1100-1114.

68. Hutvagner G and Zamore P. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297(5589): 2056-2060.
69. Lu J, Getz G, Miska E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 839-843.
70. Boden D, Pusch O, Lee F, et al. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.* 2003; 77(21): 11531-11535.
71. Das A, Brummelkamp T, Westerhout E, et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference mediated inhibition. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2601-2605.
72. Bitko V and Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* 2001; 1: 34.
73. Monick MM, Cameron K, Staber J, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 2147-2158.
74. Zhang W, Yang H, Kong X, et al. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nature Medicine* 2005; 11: 56-62.
75. Ge Q, Filip L, Bai A, et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(23): 8676-8681.
76. Ge Q, Eisen HN and Chen J. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection. *Virus Res.* 2004; 102(1): 37-42.
77. Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, et al. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *PNAS* 2004; 101(23): 8682-8686.
78. Zhou H, Jin M, Yu Z, et al. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Res.* 2007; 76(2): 186-193.
79. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2002; 8: 681-686.
80. Banerjee A, Li MJ, Bauer G, et al. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell derived macrophages. *Molec. Ther.* 2003; 8: 62-71.
81. Philpott NJ and Thrasher AJ. Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2007; 18: 483-489.

82. Manjunath N, Wu H, Subramanya S, et al. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Advances Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 732-745.
83. Singh SK and Gaur RK. Progress towards therapeutic application of RNA interference for HIV infection. *Biodrug* 2009; 23(5): 269-276.
84. Bennasser Y, Yeung ML and Jeang KT. RNAi therapy for HIV infection. *Biodrug* 2007; 21(1): 17-22.
85. Hoofnagle JH and Lau D. New therapy for chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl. 1: 41-50.
86. Ray RB and Kanda T. Inhibition of HCV replication by small interfering RNA. *Methods Mol Biol.* 2009; 510: 251-262.
87. Zhang Y, Li T, Fu L, et al. Silencing SARS-CoV Spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett* 2004; 560(1-3): 141-146.
88. Wang Z, Ren L, Zhao X, et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J Virol* 2004; 78(14): 7523-7427.
89. Harth G, Zamecnik PC, Tang JY, et al. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97(1): 418-423.
90. Zass DW, Duncan MJ, Li G, et al. *Pseudomonas* invasion of type 1 pneumocytes is dependent on the expression and phosphorylation of caveolin-2. *J Biol Chem* 2005; 280(6): 4864-4872.
91. Kumar R, Adams B, Oldenburg A, et al. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar J* 2002; 1: 5.
92. Malaney P, Spielman A and Sachs J. The malaria gap. *Am J Trop Med Hyg* 2004; (2 Suppl.): 141-146.
93. Vayssie L, Vargas M, Weber C, et al. Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of gamma-tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 138(1): 21-28.
94. Yang G, Thompson J, Fang B, et al. Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer. *Oncogenes* 2003; 22: 5694-5701.

95. Cioca D, Aoki Y and Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10(2): 125-133.
96. Martinez L, Naguibneva I, Lehrmann H, et al. Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(23): 14849-14854.
97. Nieth C, Priebisch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 2003; 545(2-3): 144-150.
- 98.140. Yague E, Higgins C and Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* 2004; 11(14): 1170-1174.
99. Takei Y, Kadomatsu Y, Yuzawa S, et al. A small interfering RNA targetug vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res.* 2004; 64: 3365-3370.
100. Lu P, Xie F and Woodle M. Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. *Trends Mol Med.* 2005; 11(3): 104-113.
101. Gorelik L and Flavel RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001; 7: 1118-1122.
102. Yin JQ, Gao J, Shao R, et al. siRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumor cell growth. *J Exp Ther. Oncol* 2003; 3: 194-204.
103. Miller VM, Gouvion CM and Davidson BL. Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 661-668.
104. Miller VM, Xia H and Marrs GL. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 7195-7200.
105. Koutsilieri E, Rethwilm A and Scheller C. The therapeutic potential of siRNA in gene the therapy of neurogenerative disorders. *Journal of Neral Transmission* 2007; 72: 43-49.
106. Morris K and Rossi J. Lentivirus-Mediated RNA Interference Therapy for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Human Gene Therapy* 2006; 17: 479-486.
107. Kambal A, Mitchell G, Cary W, et al. Generation of HIV-1 Resistant and Functional Macrophages From Hematopoietic Stem Cell-derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Molecular Therapy* 2011; 19: 584-593.

108. Michienzi A, Castanotto D, Lee N, et al. RNA-mediated inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Ann. NY Acad. Sci.* 2003; 1002: 63-71.
109. Krishnan A, Molina A and Zaia J. Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas. *Journal of American Society Hematology* 2005; 105(2): 874-878.
110. Nakamura H, Siddiqui S, Shen X, et al. RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol. Vis.* 2004; 10(10): 703-711.
111. Reich S, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 2003; 9: 210-216.
112. Kim B, Tang Q, Biswas P, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am. J. Pathol.* 2004; 156(6): 2177-2185.
113. Lingor P, Koeberle P, Kugler S, et al. Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death *in vivo*. *Brain* 2005; 128(3): 550-558.
114. Poller W, Fechner H and Kurreck J. Nucleic acid-based modulation of cardiac gene expression for the treatment of cardiac diseases. *Z Kardiol* 2004; 93: 171-193.
115. Suckau L, Fechner H, Chemaly E, et al. Long-Term Cardiac-Targeted RNA Interference for the Treatment of Heart Failure Restores Cardiac Function and Reduces Pathological Hypertrophy. *Circulation* 2009; 1241-1252.
116. Poller W, Hajjar R, Schultheiss HP, et al. Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. *Cardiovascular Research* 2010; 86: 353-364.
117. Lisovsky OO, Dosenko VE, Nagibin VS, et al. Cardioprotective effect of 5-lipoxygenase gene (*ALOX5*) silencing in ischemia-reperfusion. *Acta Biochimica Polonica* 2009; 56(4): 687-694.

คำถาม

1. ข้อใดผิดเกี่ยวกับความสำคัญของกระบวนการ RNA interference (RNAi)
 - 1) ถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรคติดเชื้อและโรคทางพันธุกรรม
 - 2) เป็นการรักษาโรคด้วยยีนรูปแบบหนึ่ง
 - 3) เป็นการทำงานของ siRNA miRNA และ shRNA
 - 4) ช่วยเสริมความสามารถของยีนทรานสโพซอน
 - 5) ถูกนำมาใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน
2. ข้อใดผิด
 - 1) กระบวนการ RNAi ถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรคติดเชื้อจาก ไวรัส แบคทีเรีย รา โปรสิตและโรคมะเร็ง
 - 2) กระบวนการ RNAi สามารถช่วยบอกได้ว่า NANOG มีส่วนทำให้เอ็มบริโอนิกส์เต็ม เซลล์ของมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร
 - 3) การทำงานของ miRNA เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนและพัฒนา การของสิ่งมีชีวิต
 - 4) พิธีใช้กระบวนการ RNAi ในการป้องกันการบุกรุกจากไวรัสเช่นเดียวกับหนอนและ แมลงวัน
 - 5) การใช้กระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีนทรานสโพซอนเป็นสาเหตุให้ จีโนมที่ทรานสโพซอนเข้าแทรกเสียหาย
3. ข้อใดถูกต้องที่สุดเกี่ยวกับกลไกของ siRNA
 - 1) มนุษย์มียีนที่ผลิต siRNA ซึ่งมีลักษณะเป็นสายคู่ยาวขึ้นมาเองได้
 - 2) Dicer, miRNA และ Argonaute เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกลไกของ siRNA
 - 3) เมื่อเส้น Antisense หรือ Guide strand เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย แล้ว เอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายก็จะถูกตัดและสลายตัวไป
 - 4) Long dsRNA, Dicer, Argonaute, RISC, Antisense strand และ Post-transcription inhibition เกี่ยวข้องกับกลไกของ siRNA
 - 5) Post-transcription inhibition เกิดจากการทำงานของสาย siRNA ทั้งสองเส้น
4. กลไกของ siRNA กับ miRNA ต่างกันอย่างไร
 - 1) กลไก miRNA ใช้เส้น Sense หรือ Antisense ก็ได้ในการเข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ เป้าหมาย
 - 2) หลังจากที่ Drosha ตัดอาร์เอ็นเอสายคู่ยาวไม่มีบ่วงแล้วก็จะเรียกว่า “siRNA”

- 3) siRNA ยับยั้งการแสดงออกของยีน ณ ระดับหลังการถอดรหัส ส่วน miRNA มักยับยั้ง ณ หลังการถอดรหัสและระดับการแปลรหัส
- 4) miRNA ถูกผลิตจากยีนในนิวเคลียส ส่วน siRNA ถูกผลิตจากยีนในไซโตพลาสซึม
- 5) siRNA ใช้เส้น Passenger strand เข้าจับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายในระดับหลังการถอดรหัส

5. ความจำเพาะสูงของกระบวนการ RNAi มาจาก

- 1) กระบวนการทำงานเกิดขึ้นในนิวเคลียส
- 2) การมีโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้หาเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ง่าย
- 3) การเป็นอาร์เอ็นเอเหมือนเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย
- 4) การมีประจุทำให้เกิดแรงดูดต่อเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย
- 5) การจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายตามหลักการเข้าคู่กันของคู่เบส

6. ข้อได้ถูกต้องที่สุด เกี่ยวกับสิ่งที่ต้องพัฒนาในการนำ RNAi ไปใช้รักษาโรคในมนุษย์

- 1) ระบบการนำส่ง เช่น การนำส่งด้วย Peptide-based delivery
- 2) ความปลอดภัย เช่น การออกแบบ siRNA สังเคราะห์ให้มีความจำเพาะต่อเป้าหมาย
- 3) ความคงตัว เช่น การปรับโครงสร้างของ siRNA ด้วยสารเคมี
- 4) การศึกษาเรื่องขนาดยา (dose) เพื่อนำไปใช้ในการรักษา
- 5) ถูกทุกข้อ

7. ข้อได้ถูก

- 1) Off-target effects คือ การจับยีนถูกเป้าหมายของ RNAi แต่เกิดผลอย่างอื่นซึ่งไม่ใช่ผลที่ต้องการ
- 2) Non-specific effects คือ การจับยีนผิดเป้าหมายของ RNAi แล้วเกิดผลอย่างอื่นซึ่งไม่ใช่ผลที่ต้องการ
- 3) การฉีด siRNA เข้ากระแสเลือดอย่างรวดเร็วในปริมาณมากเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาการออกฤทธิ์ที่สั้นของ siRNA
- 4) การอ้อมตัวของ Dicer และ Risc อาจเกี่ยวข้องกับสมดุลการแสดงออกของยีนอื่นซึ่งควบคุมโดย miRNA
- 5) สำหรับผู้ป่วยโรคเอดส์ต้องการการออกฤทธิ์ที่สั้นของ siRNA

8. ข้อได้ถูก

- 1) siRNA มีขนาดใหญ่และมีคุณสมบัติเป็น cationic รวมถึงบริเวณ hydrophilic ของ

พลาสมาเมมเบรนเป็นอุปสรรคต่อการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์

- 2) 2' -FU, 2' -FC, 2' -OMe, 2' -OH, DAP ทั้งหมดนี้เป็นสารเคมีที่ใช้ในการพัฒนาความคงตัวของ siRNA
- 3) การหุ้ม siRNA ด้วยโพลิเมอร์ที่เป็นประจุลบและเชื่อมกับแอนติบอดีเป็นการพัฒนาระบบนำส่ง siRNA อีกวิธีหนึ่ง
- 4) การปรับแต่งโครงสร้าง siRNA ด้วยสารเคมีที่ตำแหน่ง 2' -OH หรือ พันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ สามารถช่วยป้องกันการถูกทำลายจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือ RNase ได้
- 5) Peptide-based delivery เป็นการนำกรดอะมิโนประจุลบในการช่วยนำส่ง siRNA

9. กระบวนการ RNAi ถูกนำมาศึกษาวิจัยในโรคติดเชื้อชนิดใด

- 1) โรคที่เกิดจาก “สนิปส์”
- 2) โรค Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
- 3) โรคติดเชื้อไวรัส เช่น จากเชื้อ Respiratory Syncytial Virus และ SARs corona virus ซึ่งทำให้เกิดโรค SARs
- 4) โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์
- 5) โรค Age-related Macular Degeneration (AMD)

10. ข้อใดผิด

- 1) มีการศึกษาวิจัยพบว่า ยีน Phospholamban และ Arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5) เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหัวใจบางชนิด
- 2) มีการนำ RNAi มาศึกษาวิจัยในโรคที่เกิดจาก “สนิปส์” เช่น โรคการเสื่อมของเซลล์ประสาทหรือโรคโลหิตจาง
- 3) มีรายงานการวิจัยพบว่า RNAi ช่วยให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้น
- 4) หลักการใช้ siRNA ต่อโรคติดเชื้อเอชไอวี คือ ออกแบบให้ siRNA เข้ายับยั้งเฉพาะยีนของไวรัสเอชไอวีเท่านั้นโดยไม่ยับยั้งการทำงานของยีนที่เป็นตัวรับของ host
- 5) มีการศึกษาวิจัยโดยการนำ shRNA มาใช้ร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในผู้ป่วยโรคเอดส์