

RNA Interference: A Promising Tool in the Control of Important Vector Borne Diseases Zika, Dengue Fever, and Malaria

Jalil Nejati^{1,2}, Mona Koosha², Mohammad Ali Oshaghi^{2*}

¹Health Promotion Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

²Department of Medical Entomology & Vector Control, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**
Mohammad Ali Oshaghi,
Department of Medical Entomology & Vector Control, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
moshaghi@sina.tums.ac.ir

Received: 28 Mar, 2016

Accepted: 1 May, 2016

Abstract

Background and Objectives: RNA interference is a process, in which a molecule of double-stranded RNA prevents the expression of a particular gene and leads to its silencing. Application of this technology in the control of disease-carrying insects is rising in agriculture and medical sciences. Also, its application in control of insect-borne diseases could be considered as a new, important, and effective approach. In this article, it was attempted to study the mechanisms of RNA interference, routes of its delivery to insects, as well as its application in genetic control of disease vector insects.

Methods: In this study, 71 indexed articles in databases, such as Pubmed, SID, Scopus, Science direct, and Google scholar, were used.

Results: dsRNA could be delivered to insect body through three routes of oral, injection, and Impregnation. The mechanism of dsRNA entrance into the cells has considerable effect on the success and applicability of this technique. Identification of host-parasite relationship in the insect body is one of the important applications of RNAi in medical entomology.

Conclusion: Although, there is a considerable number of researches on RNAi in the agricultural pests field, studies on insect vectors of human diseases have been mostly in-vivo. However, application of RNAi is suggested as a new, safe and applicable approach, alone or along with other methods. Certainly, further researches in this field can pave the way for enforcement measures in the control of disease vectors, especially Zika, dengue fever, and malaria in the not so distant future.

Keywords: RNA interference; dsRNA; Gene expression; Entomology.

RNA مداخله گر: ابزاری امیدوار کننده در کنترل بیماری های مهم ناقل زاد زیکا، تب دانگ و مالاریا

جلیل نجاتی^{۱،۲}، مونا کوشا^۲، محمدعلی عشاقی^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: RNA مداخله گر، فرآیندی است که طی آن یک مولکول RNA دو رشته ای (dsRNA) از بیان ژن خاصی جلوگیری کرده و باعث خاموشی آن می شود. به کارگیری این تکنولوژی در کنترل حشرات ناقل بیماری ها می تواند به عنوان رویکردی جدید، مهم و مؤثر محسوب گردد. در این مقاله سعی گردید تا مکانیسم RNA مداخله گر، مسیرهای ارائه آن به حشرات، همچنین کاربرد آن جهت کنترل ژنتیکی حشرات ناقل بیماری مورد بررسی قرار گیرد. **روش بررسی:** در این مطالعه، از ۷۱ مقاله فارسی و انگلیسی ایندکس شده در پایگاه های اطلاعاتی مختلف همچون Pubmed، SID، Scopus، Science direct و Google scholar استفاده شد.

یافته ها: dsRNA به سه طریق خوراکی، تزریقی و آغشته سازی می تواند وارد بدن حشره گردد و نحوه ورود آن به سلول در موفقیت و کاربردی بودن این تکنیک، تأثیر به سزایی دارد. از جمله کاربردهای مهم RNAi در حشره شناسی پزشکی می توان به شناسایی ارتباط متقابل انگل و میزبان در بدن حشرات اشاره کرد.

نتیجه گیری: اگرچه تحقیقات بر روی روش RNAi، در بخش آفات کشاورزی قابل توجه است، اما مطالعات صورت گرفته بر روی حشرات ناقل بیماری های انسانی، تاکنون بیشتر جنبه آزمایشگاهی داشته است. با این حال، به کارگیری RNAi به عنوان یک رویکرد جدید، ایمن و قابل اجرا به تنهایی و یا در کنار سایر روش ها پیشنهاد می گردد. مسلماً انجام تحقیقات بیشتر در این حوزه نیز می تواند زمینه ساز اقدامات اجرایی در عرصه کنترل ناقلین بیماری ها، به ویژه بیماری های مهم ناقل زاد زیکا، تب دانگ و مالاریا در آینده نه چندان دور باشد.

کلید واژه ها: RNA مداخله گر، dsRNA؛ بیان ژن؛ حشره شناسی.

^۱مرکز تحقیقات ارتقای سلامت، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

^۲گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمدعلی عشاقی، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: moshaghi@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۸

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Nejati J, Koosha M, Oshaghi MR. RNA Interference: A Promising tool in the control of important vector born diseases zika, dengue fever, and malaria. Qom Univ Med Sci J 2017;11(3):83-94.[Full Text in Persian]

مقدمه

تنظیم بیان ژن، به عنوان یکی از نیازهای ضروری بدن موجودات زنده محسوب شده و به معنای فعال یا خاموش شدن ژنی است که از نظر توالی با RNA دو رشته‌ای، همولوگ می‌باشد (۱).

عملکرد بسیار اختصاصی این پدیده در خاموش کردن یک ژن خاص با توالی خاص، کارایی بسیار بالا، قابلیت کاربرد در مراحل پیشرفته رشد همچون بیماری سرطان و امکان انتقال خاموشی ژن به نسل بعد، ازجمله مزایای به کارگیری این روش است (۵-۱). از این پدیده در علوم مختلفی همچون ژنتیک برای تعیین عملکرد ژن و یا مسیرهای شیمیایی (۶)، در پزشکی برای درمان بیماری‌های ویروسی (۷)، سرطان‌ها و بیماری‌های عصبی (۸) و در کشاورزی برای تولید واریته‌های گیاهی مقاوم به بیماری‌ها (۹) استفاده می‌شود. امروزه، به کارگیری siRNA در حشره‌شناسی پزشکی، به منظور خاموشی ژن‌های خاص در حشرات ناقل به عنوان رویکردی نوین در کنترل آنها و نیز کاهش مصرف سموم مطرح است (۱۰، ۱۱).

کنترل شیمیایی حشرات، به خصوص در زمینه بهداشت بسیار پرهزینه بوده، به طوری که در جنوب شرق ایران نیز در برنامه‌های کنترل و حذف مالاریا، سالانه حجم گسترده‌ای از سموم استفاده می‌شود (۱۲). این هزینه بالا و گزارش موارد مقاومت ناقلین بیماری‌ها به سموم (۱۳، ۱۴) به همراه تنوع گونه‌ای و ژنتیکی آنها (۲۱-۱۵)، می‌تواند شروعی برای استفاده از روش‌های جایگزین جدید همچون RNAi باشد.

روش بررسی

در این مطالعه مروری از مطالعات توصیفی - تحلیلی و مداخله‌ای ایندکس شده در پایگاه‌های اطلاعاتی

Pubmed، SID، Scopus، Science direct و Google scholar استفاده شد. انتخاب یا حذف اولیه مقالات براساس عنوان و چکیده آنها بود. در مجموع، ۹۳ مقاله فارسی و انگلیسی مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت، نتایج ۷۱ مقاله، استخراج گردید. همچنین با هدف بررسی مطالعات جدیدتر، ۵۰٪ از مقالات مورد استفاده در بازه زمانی سال ۲۰۱۶-۲۰۱۰ بودند.

یافته‌ها

اصطلاح خاموشی ژن که می‌تواند در دو سطح رونویسی (Transcriptional Gene Silencing, TGS) و پس از رونویسی (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS) اتفاق افتد، وضعیتی را گویند که ژن در بافت‌ها و یا در زمانهای مختلف رشدی بیان نمی‌شود (۴).

در خاموشی ژن در سطح رونویسی (TGS)، تغییراتی همچون متیلاسیون پروموتور و یا تغییر ساختار کروماتینی ژن، مانع از انجام رونویسی از روی DNA می‌گردد (۸).

در سطح پس از رونویسی (PTGS) از روی ژن هدف، رونویسی انجام گرفته و mRNA ساخته شده وارد سیتوپلاسم می‌شود، اما قبل از ترجمه تخریب می‌شود.

به طور کلی به خاموشی ژن پس از رونویسی، RNA مداخله گر (RNA Interference) می‌گویند. مکانیسم عمل این پدیده بر مبنای dsRNA (double-stranded RNA) و تجزیه mRNA استوار است (۲۲، ۱). در سلول‌های موجودات زنده، ترجمه از روی RNA تک رشته‌ای انجام می‌شود و اصولاً dsRNA به صورت طبیعی در سلول‌های موجودات زنده وجود نداشته و امکان ترجمه آن نیز در سلول نمی‌باشد. حال چنانچه مولکول mRNA دو رشته‌ای شده و یا RNA دو رشته‌ای مثل RNA ویروسی وارد سلول شود، سلول آن را شناسایی و با مکانیسم خاصی خرد می‌کند. بدین ترتیب بیان ژن متوقف می‌گردد (۲۳). از سال ۱۹۹۳ تا به حال، انواع مختلفی از مولکول‌های کوچک RNA شناسایی شده‌اند که شامل

Piwi Interacting RNAs، micro RNAs (miRNAs) و Small or Short Interfering RNA (siRNAs) (piRNAs) می‌باشد. این مولکول‌ها در بیورژنر، نحوه تنظیم مولکول هدف و نیز مسیرهای بیولوژیکی که تنظیم می‌کنند با یکدیگر متفاوتند. با وجود این تفاوت‌ها، این واقعیت وجود دارد که این مولکول‌های کوچک RNA با یکدیگر در ارتباط بوده و به واسطه آن، ژنوم را از خطرات داخلی و خارجی حفظ می‌کنند. مولکول‌های piRNA، بلندترین مولکول‌های کوچک RNA هستند که به تازگی کشف شده‌اند و همان‌طور که از نامشان پیداست به پروتئین‌های Argonate شاخه piwi متصل می‌شوند.

شاخه piwi در حشرات از piwi، AUB (Aubergine) و AGO3 تشکیل شده و در موش شامل: MIWI، MIWI2 و انسان شامل: HILI، HIWI2، HIWI3 می‌باشد. مولکول‌های piRNA، اولین بار توسط Arvin و همکاران، شناسایی شدند. این مولکول‌ها از نظر اندازه از سایر مولکول‌های کوچک RNA طول‌تر بوده (تقریباً ۲۵-۳۱ نوکلئوتید) و ترانسپوزون‌ها را در سلول‌های جنینی و سلول‌های زاینده مهار می‌کنند. پیش‌سازهای piRNAs؛ مولکول‌های RNA تک‌رشته‌ای (ssRNA) Single-stranded RNA هستند که جدا از siRNAs بوده و به پروتئین‌های Argonate شاخه piwi متصل می‌شوند و برخلاف مولکول‌های siRNA و miRNA برای تولید خود نیازی به پروتئین‌های Dicer1 (DCR1) و Dicer2 (DCR2) ندارند (۲۴). مطالعات اخیر نشان داده است miRNAs که از قسمت‌های غیرکدکننده ژنوم تولید می‌شوند بسیاری از پروسه‌های حیاتی سلول را کنترل می‌کنند. بین سالهای ۲۰۱۵-۱۹۹۳، تعداد ۱۹۰۰ لوکوس مربوط به تولید miRNAs شناسایی شده و هم‌اکنون نیز یک بانک ذخیره اطلاعات miRNAs به نام miRBase ایجاد شده است. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد هر miRNA می‌تواند بیان صدها mRNA را تنظیم کند و از طرف دیگر، بیان هر mRNA می‌تواند به وسیله ده‌ها نوع miRNAs تنظیم شود (۲۵).

تاریخچه

در سلول‌های موجودات زنده قضیه‌ای به نام اصل مرکزی (Central Dogma) وجود دارد. براساس این قضیه اطلاعات وراثتی که در DNA وجود دارد به RNA منتقل و در نهایت براساس رمز آنها، به پروتئین‌های خاصی ترجمه می‌شود (۴). در ابتدا تصور بر این بود که بنابر اصل مرکزی، جریان اطلاعات یک‌طرفه است؛ چراکه پروتئین‌ها قادر به سنتز RNA نبوده و RNA نیز توانایی سنتز DNA را ندارد. اما طی مطالعه‌ای در سال ۱۹۷۰ نشان داده شد در بعضی از ویروس‌ها، جریان اطلاعات از RNA به سمت DNA است (۲۶). همچنین محققین در تحقیقات بعدی متوجه شدند RNA می‌تواند در بیان DNA نقش داشته باشد و بدین ترتیب قضیه اصل مرکزی که بر جریان یک‌طرفه اطلاعات تأکید داشت، به نوعی زیر سؤال رفت (۲۷).

این اصل بنیادین، به عنوان یک اصل مهم در زیست‌شناسی مدرن باقی مانده است، اگرچه دانش ما از نقش RNA ها همچنان رو به گسترش بوده و برخی سؤالات در این ارتباط وجود دارد (۲۷، ۲۸). خاموشی ژن در ابتدا در آزمایشهایی برای تولید گیاه اطلسی تراریخت دیده شد. گیاه اطلسی دارای ژنی موسوم به CHS است که در تولید رنگدانه دخالت می‌کند. در سال ۱۹۹۰ در مطالعه‌ای بر روی این گیاه، سعی گردید تا با انتقال این ژن، گل اطلسی تراریختی تولید شود که رنگدانه بیشتری داشته باشد، اما برخلاف انتظار مشاهده گردید گل‌های اطلسی تراریخت، نه تنها رنگدانه بیشتری تولید نکرده و به رنگ ارغوانی تیره یا قرمز تیره در نیامدند؛ بلکه کم‌رنگ‌تر و حتی سفید شده‌اند. محققین به این نتیجه رسیدند که احتمالاً ژن CHS منتقل شده در گیاه تراریخت، سرکوب شده است. آنها برای این پدیده، اصطلاح سرکوبگری مشترک (Co-suppression) را به کار بردند، اما مکانیسم مولکولی آن ناشناخته باقی ماند (۲۹).

در مطالعه دیگری (سال ۱۹۹۲) بر روی قارچ *Neurospora crassa*، پدیده مشابهی در این قارچ، مشاهده و پدیده مذکور فرونشانی (quelling) نامیده شد (۳۰، ۳۱). Fire و همکاران (سال ۱۹۹۸)، Sense RNA و Antisense را همزمان به بدن نماتود *Caenorhabditis elegans* وارد کردند و با کمال تعجب مشاهده کردند اثر بازدارندگی نسبت به زمانی که هر رشته به صورت منفرد به بدن کرم وارد می‌شود به مراتب بیشتر است. بنابراین، برای اولین بار نام این پدیده، خاموشی ژن (RNAi) یا RNA مداخله گر گذاشته شد (۲، ۳۲). Fire و Mello (سال ۲۰۰۶)، جایزه نوبل فیزیولوژی و پزشکی را دریافت کردند (۳۳). در پی کشف پدیده RNAi در نماتود مذکور، از سال ۲۰۰۳ مطالعات گسترده‌ای در راسته‌های مختلف حشرات از جمله دوبالان *Diptera* (۳۴)، پروانه‌ها *Lepidoptera*، سوسک‌ها *Coleoptera* و بال‌غشاییان *Hymenoptera* انجام شد (۳۵).

۱-۲. مکانیسم انجام RNAi

RNA مداخله گر (RNAi): یک مکانیسم دفاع سلولی از نظر تکاملی حفاظت‌شده برای کنترل بیان DNA بیگانه یا خارجی در گیاهان و حیوانات است. همچنین این پدیده در کنترل رشد و نمو نیز دخالت دارد.

جهت استفاده از این مکانیزم در کنترل حشرات، ابتدا لازم است ژن مورد هدف برای خاموش شدن، شناسایی و توالی نوکلئوتیدی آن مشخص گردد. در مرحله بعد، ساخت توالی دو رشته‌ای بخشی از اگزون آن ژن به نام dsRNAs که در ابتدای هر رشته پروموتورهای ویژه مانند T7 قرار دارد، صورت گرفته و سپس dsRNAs تولید شده وارد سلول هدف می‌شود.

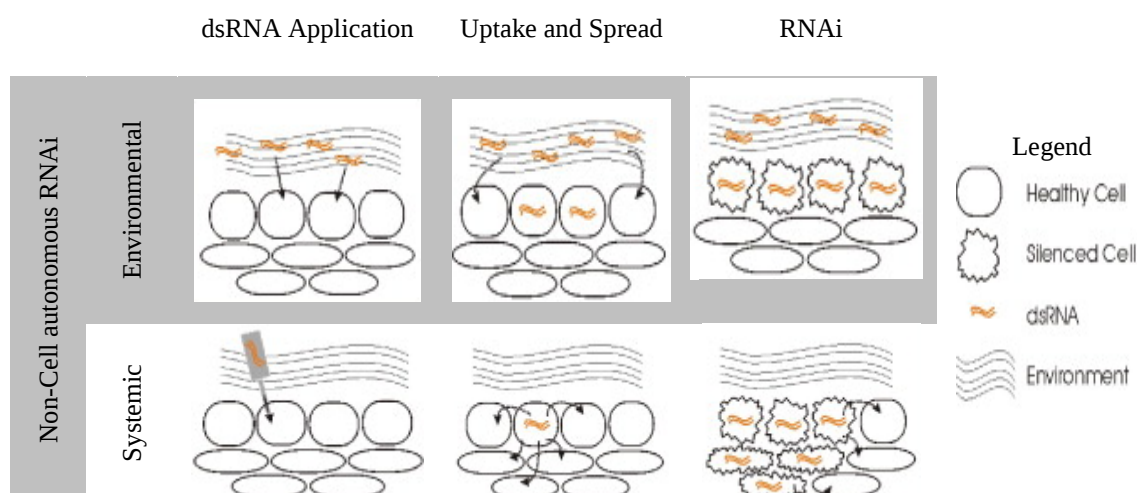
RNAهای دورشته‌ای وارد شده سپس توسط پروتئین‌هایی به نام Effector Protein، شناسایی و با آنها باند می‌شوند (۳). این عمل فعالیت آنزیم‌هایی موسوم به dicer که جزء خانواده آنزیم‌های RNaseIII هستند تسهیل می‌کند. در اثر فعالیت آنزیم اندونوکلاز Dicer، RNAهای دورشته‌ای بریده شده و به قطعات کوچکتر ۲۵-۲۱ نوکلئوتیدی شکسته می‌شوند (۳۶). به این توالی‌های دو رشته‌ای کوچک، siRNA (کوچک تداخلی) اطلاق می‌گردد. این توالی‌های کوچک بر روی اجزایی به نام کمپلکس‌های القاکننده خاموشی

(RNA Induced Silencing Complex, RISC) قرار می‌گیرند. تنها یک رشته از siRNA که مکمل رشته mRNA هدف می‌باشد، بر روی RISC باقی مانده و رشته دیگر که به آن Sense یا Passenger گفته می‌شود در فرآیند خاموشی ژن هدف نقشی ندارد. آن رشته‌ای که در RISC باقی مانده و در فرآیند خاموشی مشارکت می‌کند را اصطلاحاً رشته راهنما یا Antisense می‌گویند. جدا شدن رشته Sense در نتیجه فعالیت کاتالیکی کمپلکس RISC می‌باشد که شامل تعدادی از پروتئین‌های خانواده Argonate است (۳۷-۳۹). در پستانداران، Ago2، مسئول جداسازی رشته Passenger از کمپلکس RISC می‌باشد (۳۸، ۳۹) و رشته‌ای را که مقاومت ترمودینامیکی انتهای ۵' آن بیشتر است به عنوان رشته Passenger جدا می‌کند.

رشته راهنما که مقاومت ترمودینامیکی انتهای ۵' آن نیز کمتر است همراه با کمپلکس RISC باعث خاموشی mRNA هدف می‌شود (۳۸). در نهایت، پروتئین‌های آرگونیت موجود در این کمپلکس باعث تقسیم شدن mRNA هدف شده و قبل از اینکه اسیدهای آمینه از روی آن ترجمه گردد به قطعات کوچکی تبدیل شده و بدین ترتیب از بیان پروتئین جلوگیری می‌شود (۴۰). چنانچه توالی رشته راهنما با توالی mRNA هدف کاملاً مشابه نباشد mRNA هدف تکه تکه نمی‌شود، ولی با اتصال رشته راهنما به آن، از ترجمه mRNA جلوگیری می‌شود.

مکانیسم‌های دریافت و پراکنش dsRNA در حشرات: به دو دسته مستقل سلولی (cell-autonomous) و فراسلولی (non-cell-autonomous) تقسیم می‌شوند. در RNAi مستقل سلولی، همان‌طور که از نامش مشخص است روند آن به سلولی که dsRNA به آن معرفی و یا بیان شده، محدود و کل فرآیند RNAi در داخل یک سلول به صورت انفرادی رخ می‌دهد. مکانیسم‌های فراسلولی، بیشتر از نوع سلولی مستقل مورد مطالعه قرار گرفته و می‌توانند در بافت یا سلول‌های متفاوتی از مکان کاربرد یا تولید dsRNA اتفاق بیفتند. همچنین RNAi فراسلولی می‌تواند به RNAi محیطی (environmental RNAi) و RNAi سیستمیک (systemic RNAi) طبقه‌بندی شود (۴۱).

RNAi محیطی در شرایطی است که dsRNA توسط یک سلول از محیط بدون واسطه مانند هموسل یا روده برداشته می‌شود (۴۲). RNAi سیستمیک در ارگانسیم‌های چند سلولی رخ می‌دهد و در انتقال سیگنال‌های خاموشی از یک سلول به سلول دیگر یا از یک بافت به بافت دیگر دخالت می‌کند. RNAi سیستمیک می‌تواند RNAi محیطی را در چندین ارگانسیم دنبال کند (۴۱، ۴۳) (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. مقایسه شماتیک RNAi environmental و RNAi Systemic (۵۱)

در ضمن، اولین سوسکی بوده که تعیین توالی ژنوم آن انجام شده است (۴۸).

تزریق dsRNA به بدن این سوسک می‌تواند در تمامی مراحل زندگی شامل تخم، لارو، پوپ و بالغ انجام گیرد. در مطالعه‌ای تزریق dsRNA (Tcst) scarlet به مرحله آخر لاروی این سوسک باعث از بین رفتن پیگمان‌های بینایی و نیز تغییر رنگ بدن از حالت قهوه‌ای به سیاه در حشره بالغ شد (۴۹). سایر حشراتی که از این تکنیک برای آنها استفاده شده شامل: سوسری آلمانی *Blattella germanica* (۵۱، ۵۰)، بسیاری از عنکبوتیان از قبیل کنه‌های سخت *Ixodes scapularis* (۵۲) و مایت عنکبوتی نقطه‌دار (*Spotted Spider Mite Tetranychus urticae*) می‌باشند (۵۳، ۵۴).

شواهد تجربی نشان می‌دهد اثرات خاموشی تزریق dsRNA به‌طور کلی به زمان و مکان محدود می‌شود (۵۵، ۵۶). این روش نیز در مقایسه با سایر روش‌های تحویل RNA دو رشته‌ای دارای مزایا و معایبی است. یکی از مزایای مهم این روش این است که به محقق این اجازه را می‌دهد تا dsRNA را به سرعت وارد همولنف کرده و بنابراین از سدهایی مانند جلد یا اپی‌تلیوم میدگات حشره که در سایر روش‌ها ایجاد مشکل می‌کند عبور کند. از مزایای دیگر این روش این است که میزان مشخصی از dsRNA به ارگانیزم وارد می‌شود، برخلاف سایر روش‌های تحویل که میزان ورود dsRNA نامشخص است.

dsRNA به سه طریق خوراکی، تزریقی و آغشته‌سازی می‌تواند وارد بدن حشره شود. نحوه ورود dsRNA به سلول در موفقیت و کاربردی شدن این تکنیک، تأثیر به‌سزایی دارد (۳۵). در نهایت، dsRNA از طریق کانال‌های غشایی، آندوسیتوز یا ارتباط با سیستم ایمنی، جذب سلول می‌شود (۴۴، ۴۵).

۱-۲-۱. انتقال dsRNA با تزریق (Micro-injection)

اولین آزمایش، روش میکروانجکشن بر روی حشرات (سال ۱۹۹۸) در مگس سرکه *Drosophila melanogaster* برای کاهش بیان دو ژن *frizzled 2* و *frizzled 2* و به‌صورت تزریق به جنین در مرحله بلاستودرم به کار گرفته شد (۴۶). بعد از آن، از روش‌های ساده‌تر و ارزان‌تری از قبیل خوراکی (Feeding) و آغشته‌سازی (Soaking)، جهت ارائه RNA دو رشته‌ای به نماتودها و حشرات استفاده گردید، اما هنوز هم روش میکروانجکشن، به‌عنوان یک ابزار مفید و پرکاربرد برای معرفی RNA دو رشته‌ای به ارگانیزم‌ها (در شرایط *in vivo*) نه تنها برای نماتودها؛ بلکه برای بندپایان نیز مورد استفاده محققین قرار می‌گیرد. بعد از مگس سرکه، تعداد کمی از حشرات از قبیل زنبور عسل (*Apis mellifera*) (۴۷)، همچنین سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum*) (۴۸)، با این روش مورد مطالعه قرار گرفتند. سوسک قرمز آرد (*TriboliumCastaneum*)، یکی از آفات مهم انباری در دنیا محسوب شده که سالانه میلیون‌ها دلار خسارت وارد می‌کند (۳۵).

گرفته شده برای آغشته سازی، سلول‌های S2 تهیه شده از مگس سرکه بوده است (۳۵).

بحث

با توجه به مقاومت ناقلین به حشره کش‌ها، امروزه کنترل ژنتیکی به عنوان یک روش جایگزین و مؤثر مطرح است. در این بین، RNAi که از آن به عنوان نوعی مکانیسم دفاعی در ارگانیسم‌های یوکاریوتی یاد می‌شود، می‌تواند نقشی جدید در کنترل ناقلین بیماری‌ها برعهده داشته باشد (۶۰). از جمله کاربردهای RNAi در حشره شناسی پزشکی می‌توان به شناسایی ارتباط متقابل انگل و میزبان در بدن پشه‌ها اشاره کرد. در مطالعه‌ای (سال ۲۰۰۲)، نقش پپتید ضدباکتریایی دیفنسین (Defensin) در آنوفل گامبیه آلوده به انگل مالاریا (*Plasmodium berghei*) بررسی گردید. دیفنسین مذکور توسط یک gene-specific sRNA مورد هدف قرار گرفت. در پی انجام این روش، دیفنسین در مدت حداکثر ۱۲ روز از بین رفت و باکتری‌های گرم مثبت در بدن پشه افزایش یافتند، اما میزان انگل تغییر معنی داری نداشت. این مطالعه نشان داد از بین رفتن دیفنسین تأثیری بر پلاسمودیوم برگئی در بدن پشه ندارد (۶۱). در تحقیقات دیگری، به منظور تعیین ژن‌های مؤثر بر ایمنی آنوفل گامبیه به پلاسمودیوم برگئی، تعدادی از ژن‌های کاندید به وسیله dsRNA مورد هدف قرار گرفتند. در این مطالعه محققین نشان دادند با خاموش کردن ژن، مقدار لکترین در معده کاهش می‌یابد که باعث افزایش مقاومت پشه آنوفل به پلاسمودیوم برگئی خواهد شد (۶۲).

سرپین‌ها، به عنوان مهم‌ترین بازدارنده آنزیم‌های سرین پروتئاز، نقش‌های متفاوتی همچون ضدانعقادی، ضدالتهابی و ضدتجمع پلاکته‌ای در حشرات دارند (۶۳). تهاجم *P. berghei* به دیواره سلول‌های اپی تلیال معده *Anopheles gambiae*، منجر به افزایش بیان سرپین‌های متعددی همچون سرپین ۲، ۵، ۶ و ۱۰ می‌گردد. در مطالعه‌ای با خاموشی ژن‌های مولد سرپین، نقش عدم وجود SRPN2 در معده پشه در کاهش اوو سیست و افزایش ملانیزه شدن اوو کینت نشان داده شد (۶۴). همچنین در تحقیقی بر روی پشه‌خاکی‌های *Lutzomyia longipalpis* مشخص گردید کاهش بیان ژن تریپسین ۱ با استفاده از تکنیک RNAi می‌تواند

این روش دارای معایبی نیز می‌باشد از جمله اینکه در مقایسه با سایر روش‌ها، بسیار ظریف و وقت گیر است، همچنین نیاز به بهینه سازی دارد. فاکتورهای نظیر انتخاب سوزن، حجم مناسب برای تزریق، و مکان تزریق بسیار مهم بوده و در بین ارگانیسم‌های مختلف، متفاوت هستند (۳۵). در ضمن، به نظر می‌رسد در شرایط صحرایی، استفاده از روش تزریق برای وارد نمودن dsRNA به بدن حشرات، عملاً کارایی ندارد.

۱-۲-۱. انتقال dsRNA با تغذیه (Ingestion)

در اکثر مطالعات حشره شناسی، dsRNAs را از طریق خوراکی وارد بدن حشره می‌کنند. در حشرات، این روش ابتدا در گونه‌های پروانه *Diabrotica virgifera virgifera*، *Spodoptera exigua* و *Epiphyas postvittana* انجام گرفت (۵۷). در این روش، dsRNA مورد نظر را در داخل باکتری بیان کرده و یا در محیط آزمایشگاه، سنتز و به صورت قطرات محلول همراه غذای مصرفی وارد بدن حشرات می‌کنند. به عنوان مثال در لارو *S. exigua*، ژنی به نام SeCHSA، مسئول سنتز کیتین است. محققین این ژن را درون باکتری *E. coli* تولید و از طریق مواد غذایی وارد بدن لارو کردند. آنها مرگ و میر بالاتری را در لاروهای تغذیه شده با dsRNA گزارش کردند (۵۸). در این روش از مهندسی ژنتیک برای دستکاری باکتری‌ها استفاده شده؛ بدین ترتیب که DNA ژن مورد نظر روی پلاسمید، منتقل و سپس پلاسمید به باکتری‌های همزیست ترانسفرم شده و در نهایت، به عنوان باکتری همزیست از طریق تغذیه وارد دستگاه گوارش حشره شده و در آنجا مستقر می‌شود. این باکتری‌ها به ورود مواد غذایی مانند خون به معده حشره، به صورت تصاعدی تکثیر یافته و به مقدار بسیار زیادی dsRNA تولید می‌کنند (۵۹). به نظر می‌رسد کارایی این روش برای کنترل لارو یا بالغ حشرات مهم، از نظر پزشکی در شرایط صحرایی، از سایر روش‌های انتقال dsRNA بیشتر باشد.

۱-۲-۳. انتقال dsRNA با آغشته سازی (Soaking)

به نظر می‌رسد آغشته سازی حشره به dsRNA در شرایط صحرایی کمتر قابل استفاده است. از این روش بیشتر برای مطالعات آزمایشگاهی و در بحث رده‌های سلولی cell line در حشرات استفاده می‌کنند، به عنوان مثال اولین رده‌های سلولی به کار

افزایش تعداد انگل لیثمانیا در معده پشه خاکی آلوده را در پی داشته باشد (۶۵).

بیماری تب دانگ از جمله بیماری‌های مهم ویروسی منتقله به وسیله پشه‌های جنس آدس محسوب گردیده که در سالهای اخیر طغیان‌های متعدد آن در کشورهای مختلف از جمله در پاکستان همسایه شرقی ایران رخ داده است (۶۶). این ویروس دارای پنج سروتایپ مختلف (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, DEN-5) می‌باشد (۶۷). امروزه، محققین با استفاده از تکنیک RNAi توانسته‌اند پشه‌های آدسی اجیتی ترانسژنیک مقاوم به سروتایپ نوع ۲ ویروس تب دانگ را تولید کنند. در این روش، مسیر طبیعی RNAi ضد ویروسی در معده پشه، با ساخت یک ژن مؤثر مورد استفاده قرار گرفته است. این ژن یک RNA معکوس تکراری (Inverted-Repeat, IR) را بیان می‌کند که مشتقی از ژنوم سروتایپ نوع ۲ ویروس تب دانگ محسوب می‌گردد. همچنین از یک کربوکسی پپتیداز به عنوان پروموتور در بیان این RNA معکوس تکراری در سلول‌های اپی تلیال می‌دگات پشه، بعد از خونخواری استفاده شده است. پروموتور و ژن مؤثر مذکور، در ژنوم پشه آدس اجیتی وارد شده که نتیجه آن، بیان RNA معکوس تکراری در معده پشه‌های ترانسژنیک حاصل موسوم به carb77 است و کاهش قابل توجه آنتی ژن ویروسی را در معده و غدد بزاقی پس از دریافت ویروس نشان می‌دهد (۶۸). در سایر بندپایان نیز از RNAi استفاده شده است، به عنوان مثال در کنه‌های *Ixodes scapularis* که از آفات مهم دامی محسوب می‌شوند، در نتیجه به کارگیری تکنیک RNAi و خاموش کردن ژن *isac*، نمف‌ها وزن کمتری داشته و میزان آلودگی آنها به اسپیروکت‌های *Borrelia burgdorferi*، کاهش یافته است (۶۹).

کنه *Rhipicephalus microplus*، از دیگر آفات مهم دامپزشکی است و می‌تواند با انتقال عوامل بیماریزا همچون *Anaplasma marginale*، خسارات اقتصادی زیادی را به صنعت دامداری وارد کند. محققین با شناسایی و خاموش کردن ژن مولد *Varisin* (یکی از انواع دیفنسین) به وسیله تزریق dsRNA، موفق به کاهش توانایی کنه در آلودگی آنپلازما مارژینال شدند (۷۰). اخیراً محققین موفق شدند با تکنیک RNAi و با خاموش کردن ژن تعیین جنسیت Nix در پشه‌های *Aedes aegypti* (مهم‌ترین ناقل آربوویروسی در دنیا)، موجب مرگ نوزادان ماده و نر زایی (تولید فقط حشرات نر) شوند که امید بسیار زیادی جهت کنترل آربوویروس‌های مختلف از جمله ویروس زیکا، تب دانگ و چیکن گونیا ایجاد شده است (۷۱).

نتیجه گیری

اگرچه تحقیقات به دست آمده در روش RNAi، در بخش آفات کشاورزی قابل توجه است، اما مطالعات صورت گرفته بر روی حشرات ناقل بیماری‌ها، تاکنون بیشتر جنبه آزمایشگاهی داشته است. شاید دلیل عمده این مسئله را بتوان در ناکافی بودن اطلاعات و نبود روش‌های مناسب جهت ورود dsRNA به حشرات هدف دانست. مصرف گسترده سموم و بروز مقاومت در بین ناقلین، لزوم جایگزینی روش‌های جدید کنترلی را بیشتر از پیش نمایان ساخته است، لذا به کارگیری RNAi به عنوان یک رویکرد جدید، ایمن و قابل اجرا به تنهایی و یا در کنار سایر روش‌ها پیشنهاد می‌گردد. مسلماً انجام تحقیقات بیشتر در این حوزه نیز می‌تواند زمینه‌ساز اقدامات اجرایی در عرصه کنترل ناقلین بیماری‌ها، به ویژه بیماری‌های مهم ناقل زاد زیکا، تب دانگ و مالاریا در آینده نه چندان دور باشد.

References:

1. Ravari SZ, Jalali M, Ravari M. Gene silencing by RNA interference. 12th Iranian Genetic Congress. 2012. p. 1-6. [Text in Persian]
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998;391(6669):806-11.
3. Fire A. Gene silencing by double-stranded RNA. Cell Death Differ 2007;14(12):1998-2012.

4. Yazdi Samadi B, Valizadeh M. Genetics A molecular approach: Tehran: Tehran Univercity Pub; 2009. [Text in Persian]
5. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet* 2015;16(9):543-52.
6. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(4):1844-8.
7. Radhakrishnan SK, Layden TJ, Gartel AL. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology* 2004;323(2):173-81.
8. Mohammadi H, Moradi Shahrababak M, Sadeghi M, Moradi Shahrababak H, Ghadimi H. The role of untranslated rnas in regulation of gene expression and disease. *G3M* 2011;8(4):2190-202.
9. Guo C, Li L, Wang X, Liang C. Alterations in SiRNA and MiRNA Expression Profiles Detected by Deep Sequencing of Transgenic Rice with SiRNA-Mediated Viral Resistance. *PloS one* 2015;10(1):e0116175.
10. Lopez-Martinez G, Meuti M, Denlinger DL. Rehydration driven RNAi: A novel approach for effectively delivering dsRNA to mosquito larvae. *J Med Entomol* 2012;49(1):215-8.
11. Diosa-Toro M, Urcuqui-Inchima S, Smit JM. Arthropod-borne flaviviruses and RNA interference. Seeking new approaches for antiviral therapy. *Adv Virus Res* 2013;85:91-111.
12. Nejati J, Mahjoob M, Kiyani M, Keyhani A, Hasanzehi A. Status of indoor residual spraying by deltamethrin in malaria elimination program, southeastern Iran. *Iranian J Toxicol* 2012;6(16):600-4.
13. Nejati J, Vatandoost H, Oshghi MA, Salehi M, Mozafari E, Moosa-Kazemi SH. Some ecological attributes of malarial vector *Anopheles superpictus* Grassi in endemic foci in southeastern Iran. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3(12):1003-8.
14. Vatandoost H, Hanafi-Bojd AA. Indication of pyrethroid resistance in the main malaria vector, *Anopheles stephensi* from Iran. *Asian Pac J Trop Med* 2012;5(9):722-6.
15. Oshaghi M, Sedaghat M, Vatandoost H. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2003;9(4):659-66.
16. Oshaghi M, Shemshad K, Yaghoobi-Ershadi M, Pedram M, Vatandoost H, Abaie M, et al. Genetic structure of the malaria vector *Anopheles superpictus* in Iran using mitochondrial cytochrome oxidase (COI and COII) and morphologic markers: A new species complex? *Acta Trop* 2007;101(3):241-8.
17. Oshaghi M, Vatandoost H, Gorouhi A, Abai M, Madjidpour A, Arshi S, et al. Anopheline species composition in borderline of Iran–Azerbaijan. *Acta Trop* 2011;119(1):44-9.
18. Oshaghi M, Yaghoobi F, Vatandoost H, Abai M, Akbarzadeh K. *Anopheles stephensi* biological forms, geographical distribution, and malaria transmission in malarious regions in Iran. *Pak J Biol Sci* 2006;9(2):294-8.
19. Naddaf S, Oshaghi M, Vatandoost H, Assmar M. Molecular characterization of *Anopheles fluviatilis* species complex in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2003;9(3):257-65.
20. Dezfouli SN, Oshaghi M, Vatandoost H, Assmar M. rDNA-ITS2 based species-diagnostic polymerase chain reaction assay for identification of sibling species of *Anopheles fluviatilis* in Iran. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34(Suppl 2):56-60.
21. Naddaf SR, Oshaghi MA, Vatandoost H. Confirmation of two sibling species among *Anopheles fluviatilis* Mosquitoes in south and southeastern Iran by analysis of cytochrome oxidase I gene. *J Arthropod Borne Dis* 2012;6(2):144-50.
22. Eamens A, Wang M-B, Smith NA, Waterhouse PM. RNA silencing in plants: Yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol* 2008;147(2):456-68.

23. Jana S, Chakraborty C, Nandi S. Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. *Electronic J Biotechnol* 2004;7(3):15-6.
24. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nature Rev Gen* 2009;10(2):94-108.
25. Stein RA. MicroRNAs rise from trash to treasure. *GEN* 2016;36(4).
26. Rissland OS, Lai EC. RNA silencing in Monterey. *Development* 2011;138(15):3093-102.
27. Shapiro JA. Revisiting the central dogma in the 21st century. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1178:6-28.
28. Mattick JS. Deconstructing the dogma. *Ann N Y Acad Sci* 2009 Oct;1178:29-46.
29. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990;2(4):279-89.
30. Romano N, Macino G. Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 1992;6(22):3343-53.
31. Decker LM, Boone EC, Xiao H, Shanker BS, Boone SF, Kingston SL, et al. Complex formation of RNA silencing proteins in the perinuclear region of *Neurospora crassa*. *Genetics* 2015;199(4):1017-21.
32. Rankin CH. A review of transgenerational epigenetics for RNAi, longevity, germline maintenance and olfactory imprinting in *Caenorhabditis elegans*. *J Experiment Biol* 2015;218(1):41-9.
33. Pushparaj P, Aarthi J, Manikandan J, Kumar S. siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Dent Res* 2008;87(11):992-1003.
34. Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, et al. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* 2003;299(5615):2039-45.
35. Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. *Insect Sci* 2013;20(1):4-14.
36. Yu R, Jih G, Iglesias N, Moazed D. Determinants of heterochromatic siRNA biogenesis and function. *Mol Cell* 2014;53(2):262-76.
37. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinak S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m 7 G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 2007;129(6):1141-51.
38. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 2006;7(3):314-20.
39. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005;123(4):607-20.
40. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431(7006):343-9.
41. Huvenne H, Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J Insect Physiol* 2010;56(3):227-35.
42. Whangbo JS, Hunter CP. Environmental RNA interference. *Trends Genet* 2008;24(6):297-305.
43. Gu L, Knipple DC. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection* 2013;45:36-40.
44. Saleh MC, Tassetto M, Van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, et al. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature* 2009;458(7236):346-50.

45. Jose AM, Smith JJ, Hunter CP. Export of RNA silencing from *C. Elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(7):2283-8.
46. Yates AD. RNA interference as a tool for the functional analysis of genes in the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Diss Stud Res Entomol* 2014.
47. Weinstock G, Robinson G, Gibbs R, Worley K, Evans J, Maleszka R, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 2006;443(7114):931-49.
48. Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R, Beeman RW, et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 2008;452(7190):949-55.
49. Aronstein K, Oppert B, Lorenzen MD. RNAi in agriculturally-important arthropods. *InTech Open Access*; 2011.
50. Huang JH, Lee HJ. RNA interference unveils functions of the hypertrehalosemic hormone on cyclic fluctuation of hemolymph trehalose and oviposition in the virgin female *Blattella germanica*. *J Insect Physiol* 2011;57(7):858-64.
51. Bellés X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annu Rev Entomol* 2010;55:111-28.
52. Narasimhan S, Montgomery RR, DePonte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson JF, et al. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(5):1141-6.
53. Khila A, Grbić M. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene. *Dev Genes Evol* 2007;217(3):241-51.
54. Grbić M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouzé P, Grbić V, et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 2011;479(7374):487-92.
55. Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 1998;95(7):1017-26.
56. Misquitta L, Paterson BM. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(4):1451-6.
57. Surakasi VP, Mohamed AA, Kim Y. RNA interference of $\beta 1$ integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol* 2011;57(11):1537-44.
58. Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, et al. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One* 2009;4(7):e6225.
59. Taracena ML, Oliveira PL, Almendares O, Umaña C, Lowenberger C, Dotson EM, et al. Genetically modifying the insect gut microbiota to control chagas disease vectors through systemic RNAi. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9(2):e0003358-e.
60. Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, et al. RNA interference in *Lepidoptera*: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J Insect Physiol* 2011;57(2):231-45.
61. Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: Targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* 2002;3(9):852-6.
62. Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 2004;303(5666):2030-2.
63. Gulley MM, Zhang X, Michel K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *J Insect Physiol* 2013;59(2):138-47.
64. Michel K, Budd A, Pinto S, Gibson TJ, Kafatos FC. *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* 2005;6(9):891-7.

65. Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Mubarak M, Dillon RJ, Bates PA. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasit Vectors* 2009;2:62.
66. Mukhtar F, Salim M, Farooq A. Outbreak of Dengue fever in Lahore: Study of risk factors. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2012;24(2):99-101.
67. Mustafa M, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* 2015;71(1):67-70.
68. Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(11):4198-203.
69. Soares C, Lima C, Dolan M, Piesman J, Beard C, Zeidner N. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the *isac* gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol Biol* 2005;14(4):443-52.
70. Kocan KM, De la Fuente J, Manzano-Roman R, Naranjo V, Hynes WL, Sonenshine DE. Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Exp Appl Acarol* 2008;46(1-4):17-28.
71. Gene drive seen as promising way to attack spread of mosquito-borne diseases. Available From: <http://www.genengnews.com/gen-news-highlights/gene-drive-seen-as-promising-way-to-attack-spread-of-mosquito/81252379/?kwrd=Mosquito-Borne>. Accessed Feb 18, 2016.