مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۶، شهریور ۱۳۹۶
صفحه: ۴۵۶-۴۴۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.6, Sep 2017
Pages: 444-456

ارزیابی و مقایسه خواص فیزیکوشیمیایی، سمیت سلولی و توانایی بارگذاری miRNA درلیپوزوم‌های کاتیونی متفاوت به منظور کاربرد در ژن‌درمانی

نرگس نیکونهاد لطف آبادی[۱]، هما محسنی کوچصفهانی*[۲]، محمدحسن شیخها[۳]، سید مهدی کلانتر[۴]

چکیده

مقدمه: در پژوهش حاضر فرمولاسیون‌های متفاوتی از لیپوزوم کاتیونی با استفاده از لیپیدهای کاتیونی مختلف به منظور بررسی خواص فیزیکی وشیمیایی، توانایی به دام انداختن miRNA و میزان سمیت سلولی جهت کاربرد در ژن‌درمانی طراحی و سنتز گردید.

روش بررسی: برای انجام این مطالعه با استفاده از لیپیدهای کاتیونی DOTAP، DOTMA، DOAB و DDAB به همراه مقادیر مختلف فسفولیپید DPPC، Cholesterolو DSPE-mPEG فرمولاسیون‌های لیپوزوم کاتیونی F1-F4 سنتز شدند. سپس نانوذرات تهیه‌شده از جهت شارژ سطحی و سایز ذرات، شاخص پراکندگی، سمیت سلولی ۴۸ و ۷۲ساعته در دو رده سلولی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین لیپوزوم‌های کاتیونی سنتز شده از نظر توانایی به دام انداختن miRNA با استفاده از تست ژل الکتروفورز مقایسه شدند.

نتایج: فرمولاسیون‌ها به صورت یکپارچه بوده و میانگین قطر ذرات در لیپوزوم‌های کاتیونی دارای DOTAP از سایر فرمول‌ها کمتر و شارژ سطحی آن‌ها از سایر فرمولاسیون‌ها بیشتر بود. در بین ۴ فرمول سنتز شده لیپوزوم‌های حاوی DOTAP تقریباً فاقد سمیت قابل ملاحظه‌ای بودند. قابلیت لیپوزوم‌های حاوی DOTAP در به دام انداختن miRNA بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: لیپوزوم‌های کاتیونی بر پایه‌ی DOTAP می‌توانند به طور مؤثری در فرآیند ژن‌درمانی خصوصاً جهت انتقال miRNA به عنوان یک عامل درمانی نوین به ویژه در درمان انواع سرطان مورد استفاده واقع شوند.

واژه‌های کلیدی: میکرو RNA، لیپوزوم، سمیت سلولی، ژن‌درمانی

۲، ۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۴- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
*(نویسنده مسئول)؛تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۴۸۷۴، پست الکترونیکی: kouchesfehani@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۵

مقدمه

سرطان نوعی بیماری است که شامل رشد کنترل نشده و گسترش سلول‌های غیرطبیعی است. چنین سلول‌هایی متحمل تغییر و تحولاتی می‌گردند تا توانایی تکثیر بی‌پایان بیابند (۱). در حال حاضر سرطان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در انسان در سراسر جهان به شمار می‌رود و سالانه از هر یک‌صد هزار نفر بین صد تا سیصد نفر در اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. با توجه به گسترش رو به رشد ابتلا به سرطان، پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۰، ابتلا به آن اولین علت مرگ و میر باشد (۲,۳).

شیمی‌درمانی، با استفاده از مواد شیمیایی، به همراه جراحی و پرتودرمانی همچنان از مؤثرترین روش‌های مورد استفاده علیه سرطان در کلینیک‌ها است. متأسفانه اکثر داروهای شیمی‌درمانی به علت توزیع غیرفعال و غیراختصاصی در بدن دارای شاخص درمانی پایین و عوارض شدید می‌باشند (۴). درمان‌های متعارف تنها می‌توانند جراحت ناشی از تومور را از بین ببرند اما باقیمانده سلول‌های سرطانی می‌توانند سبب عود مجدد تومور و متاستاز شوند. به هر حال کاربردهای کلینیکی شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به واسطه سمیت و عوارض حاصله و همچنین به دلیل مقاومت چندگانه دارویی بسیار محدود شده‌اند (۲). امروزه به‌طور جهانی برای توسعه فنآوری‌های جدید تلاش می‌شود تا این فن‌آوری‌ها بتوانند بر کاستی‌های ذاتی شیمی‌درمانی فائق آمده و بدون آسیب رساندن به سلول‌های سالم، تومورها را از بین ببرند (۵). یکی از این فن‌آوری‌ها که امروزه به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است ژن‌درمانی است.

ژن‌درمانی درمان بیماری‌های انسان از طریق ورود مواد ژنتیکی به سلول‌های معینی از بیمار است، جایی که تولید پروتئین کد شده رخ خواهد داد. ژن‌درمانی به طور شایعی در بسیاری از امراض بکار می‌رود. تعداد زیادی از محققین در زمینه انتقال ژن کار می‌کنند تا حامل‌های ایده‌آلی را برای حمل ژن ایجاد کنند. ژن‌درمانی شامل انتقال اسیدهای نوکلئیکی نظیر پلاسمید، اولیگو نوکلئوتیدهای آنتی سنس و انواع RNA به درون هسته یا سیتوزول است. این فرآیند می‌تواند در کاهش بیان ژن‌های دخیل در بیماری در هر دو شرایط in vitro و in vivo مؤثر باشد. انواع گسترده‌ای از وکتورها برای حمل ژن‌های درمانی به سلول‌های هدف مطالعه شده‌اند (۶). وکتورهای انتقال ژن عموماً به دو دسته تقسیم می‌شوند: وکتورهای ویروسی و وکتورهای غیرویروسی. وکتورهای غیر ویروسی دارای بازده ترانسفکشن کمتری نسبت به وکتورهای ویروسی هستند، اما بطور وسیعی مطالعه شده‌اند زیرا به مراتب ایمن‌تر هستند. سیستم‌های حمل نانوذره‌ای دسته عمده‌ای از وکتورهای غیرویروسی هستند که مزایا و بازده بارگیری قابل‌ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند (۷,۸). کاربرد نانوتکنولوژی در پزشکی فرصت‌های بی‌نظیر و دیدگاه‌های تازه‌ای را برای درمان‌های جدید و مؤثر در بسیاری از بیماری‌ها فراهم می‌کند. نانو پزشکی می‌تواند به عنوان طراحی و تکوین عوامل درمانی و یا تشخیصی در اندازه نانو (با قطری در محدوده ۱ تا ۱۰۰۰ نانومتر) تعریف شود که قابلیت حرکت درون سیستم‌های بیولوژیک را دارند (۹). استفاده از نانوذرات برای کاربردهای پزشکی یک زمینه تحقیقاتی است که به سرعت در حال رشد می‌باشد (۱۱). اخیراً، مطالعات بر روی سیستم‌های حمل ژن و دارو به منظور پیشبرد رسانش و توزیع انتخابی دارو و ژن به محل بیماری برای ایجاد اثربخشی بیشتر، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، امکان ایجاد انواع مختلفی از سیستم‌های ذره‌ای نظیر لیپوزوم‌ها، امولسیون‌ها، میکروسفرهای لیپیدی و نانو ذرات پلیمری به عنوان سیستم‌های مؤثر حمل دارویی فراهم شده است (۱۲). لیپوزوم‌ها سیستم‌های حامل غیر سمی هستند که بطور گسترده در حمل ژن و دارو به کار برده می‌شوند. لیپوزوم‌ها حامل‌های جذابی برای حمل ژن هستند چرا که می‌توانند به صورت ذرات تقریباً ۱۰۰ نانومتری دارای محصولات غیر سمی فرموله شوند (۱۳,۱۴). لیپیدها نظیر لیپیدهای کاتیونیک، آنیونیک، خنثی یا ترکیبی می‌توانند برای تشکیل لیپوپلکس‌هایی برای حمل ژن استفاده شوند. حامل‌های لیپیدی می‌توانند ژن‌ها را از تجزیه حفظ کرده و ثبات آن‌ها را

در گردش خون تأمین کنند (۱۶). در دهه‌ی ۱۹۶۰ لیپوزوم‌ها برای اولین بار به عنوان حامل‌های غیر ویروسی برای انتقال داروهای ضد سرطان بکار برده شدند. Felgner و همکاران (۱۹۸۷) از نوعی لیپید کاتیونی به منظور انتقال DNA به صورت in vitro و تسهیل الحاق سامانه حاوی ژن با غشای پلاسمایی سلول‌ها استفاده نمود (۱۷). وقتی که ژن‌ها با لیپیدهای کاتیونیک فرموله می‌شوند، ژن هیدروفیلیک که به طور منفی شارژ شده به لیپیدهای با شارژ مثبت متصل می‌شود که این ترکیبات سبب افزایش جذب ژن و راندمان حمل آن می‌شوند (۱۶). در میان حامل‌های غیرویروسی برای ژن‌درمانی، لیپیدهای کاتیونی به دلیل راندمان بالای انتقال ژن، عدم ایجاد پاسخ ایمنی، عدم محدودیت در اندازه اسید نوکلئیک بارگذاری شده، توانمندی بالا در بارگذاری ژن و سهولت در ایجاد ترکیبات زیست تجزیه‌پذیر، حامل‌های ایده آلی هستند. اگرچه برای استفاده کلینیکی محدودیت‌هایی در کاربرد آن‌ها وجود دارد و همچنین سبب بروز سمیت در سامانه طراحی‌شده می‌شوند. به همین دلیل بسیار مهم است که نوع لیپید کاتیونی به کار برده شده و غلظت آن در طراحی لیپوزوم برای ژن‌درمانی مورد بررسی قرار گیرد (۱۸،۱۹).

با نظر به اهمیت ایجاد نانوحامل‌های مناسب جهت ژن‌درمانی، هدف از انجام این تحقیق مقایسه لیپیدهای کاتیونی متفاوت در طراحی و ساخت نانو حامل‌های لیپوزومی و تأثیر آن بر خصوصیات فیزیکو شیمیایی، میزان به دام انداختن miRNA و میزان سمیت سلولی این ناقل‌ها برای کاربرد در ژن‌درمانی می‌باشد.

روش بررسی

مواد شیمیایی

مواد مورد استفاده شامل فسفولیپید کاتیونی DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium- propane (chloride (salt))، فسفولیپید (1,2- Dipalmitoyl-sn-glycero-3 phosphocholine) DPPC و پلی‌اتیلن گلیکول DistearoylPhosphoethanolamine (PE 18:0/ 18:0 -) (PEG2000, DSPE-mPEG 2000) متعلق به شرکت Lipoid (Germany) GmbH و فسفولیپید کاتیونی (1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (chloride (salt) DOTMA و کلسترول به ترتیب متعلق به شرکت‌های Avanti Polar Lipids (AL, USA) و Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) بودند که از طریق شرکت آریا دارو خریداری شدند. فسفولیپیدهای کاتیونی DOAB (dioctadecyldimethylammonium bromide) و DDAB (Didodecyldimethylammonium bromide) نیز تهیه شدند. تمامی مواد شیمیایی دیگر و حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید آنالیتیکال (Analytic grade) بوده‌اند.

رده‌های سلولی و محیط کشت

سلول‌های مورد مطالعه عبارت‌اند از سلول مغز استخوان انسانی، رده HBMF-SPH که از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و فیبروبلاست پوست انسانی، YHFF (Yazd Human Foreskin Fibroblast) که از مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تهیه گردید. هر دو رده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط ۵٪ CO_2 با محیط کشتهای RPMI 1640 و DMEM نگهداری شدند. در این تحقیق هر دو سلول پس از سه دوره پاساژ موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفتند.

طراحی و سنتز لیپوزوم‌های کاتیونی با روش فیلم نازک (Thin film)

در این مطالعه ۴ نوع لیپوزوم کاتیونی با استفاده از لیپیدهای کاتیونی متفاوت طراحی و سنتز شدند. لیپوزوم‌های کاتیونی با فرمول‌های F1 (DPPC: Chol: DOTAP: DSPE-PEG) (۲۰)، F2 (DPPC: Chol: DOTMA: DSPE-PEG)، F3 (DPPC: Chol: DOAB: DSPE-PEG) و F4 (DPPC: Chol: DDAB: DSPE-PEG) با نسبت مولی (۵:۲۰:۳۰:۷۰) طراحی و سنتز شدند. برای ساخت لیپوزوم‌های کاتیونی متعلق به هر فرمولاسیون از مقدار کافی حلال کلروفرم استفاده شد. با حذف حلال بوسیله دستگاه تبخیرکننده دوار (روتاری)، فیلم نازک لیپیدی تشکیل و با حجم مناسبی از بافر PBS آبدهی

شد. برای کاهش اندازه و تشکیل لیپوزومهای کوچک تک لایه از روش سونیکاسیون استفاده گردید. برای اطمینان از کاهش سایز، لیپوزوم‌های ساخته شده به ترتیب از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ عبور داده شدند.

تعیین سایز و محدوده توزیع اندازه نانو لیپوزوم‌های کاتیونی

محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین قطر نانو ذرات با استفاده از (Dynamic Light Scattering) DLS تعیین می‌شود که بدین منظور از دستگاه نانو سایزر Brookhaven Instruments Corporation (Germany) استفاده گردید.

تعیین شارژ سطحی نانو لیپوزوم‌های کاتیونی

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Brookhaven Instruments Corporation (Germany) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید.

درصد زنده‌مانی سلولی

آزمایش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) یک روش رنگ سنجی است که از تکرارپذیری، دقت و حساسیت بالا برخوردار است.

این سنجش با هر دو رده سلولی HBMF-SPH و HFF به ازای 10^4 سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، انجام پذیرفت. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌های کشت داده شده در معرض تیمارهایی از ۴ لیپوزوم‌های کاتیونی سنتز شده (F1-F4) قرار گرفتند. آزمایش MTT پس از ۴۸ و۷۲ ساعت پس از انکوباسیون انجام شد. پس از افزایش محلول MTT به هر چاهک و انجام مراحل بعدی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزا ریدر اندازه‌گیری گردید. سپس، میزان درصد زنده‌مانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد زنده مانی سلولی} = \frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت–میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت–میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \times ۱۰۰$$

به این ترتیب درصد زنده‌مانی سلولی حاصل از فرمولاسیون‌های متفاوت لیپوزوم‌های کاتیونی تعیین و مقایسه شد.

بررسی میزان بارگیری miRNA توسط لیپوزوم‌های کاتیونی

برای اطمینان از توانایی فرمولاسیون‌های (F1-F4) سنتز شده در به دام انداختن اسیدهای نوکلئیک جهت کاربرد در ژن‌درمانی، از miR-101 (Micro RNA- 101) به عنوان مدل استفاده شد. برای تهیه و مقایسه لیپوزوم‌های حاوی میکرو RNA (F1-miR، F2-miR، F3-miR و F4-miR)، نسبت لیپید به اسیدنوکلئیک (N/P) یکسانی (۱۶۰/۱) برای تمام فرمولاسیون‌ها استفاده شد. برای تأیید بارگذاری miRNA-101 توسط لیپوزوم‌های کاتیونی از ژل الکتروفورز با استفاده از ژل آکارز ۲٪ استفاده گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

به منظور بررسی آماری نتایج از نرم افزار SPSS (ver. 22) استفاده گردید. جهت آنالیز آماری نتایج از تست‌های آماری ANOVA و Student's T-test استفاده گردید و معناداری نتایج بر حسب P-value < ۰/۰۵ سنجیده شد.

نتایج

مشخصه یابی فرمولاسیون‌های لیپوزوم کاتیونی

جدول ۱، خصوصیات فیزیکو شیمیایی فرمولاسیون‌های مختلف سنتز شده که حاوی فسفولیپیدهای کاتیونی متفاوت می‌باشند را نشان می‌دهد. طبق نتایج به دست آمده، در لیپوزوم کاتیونی حاوی فسفولیپید DOTAP میانگین قطر از سایر فرمولاسیون‌ها کوچک‌تر و معادل ۲/۱ ± ۱۱۹/۶ بوده و شارژ سطحی این گروه از نانوذرات از سایر فرمول‌ها مثبت‌تر و معادل ۰/۴۴ ± ۱۹/۰۲+ شده است. نتایج نشان می‌دهند که توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده بر اساس هر چهار فرمولاسیون یکنواخت بوده است.

جدول ۱: مشخصه‌یابی فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزوم کاتیونی

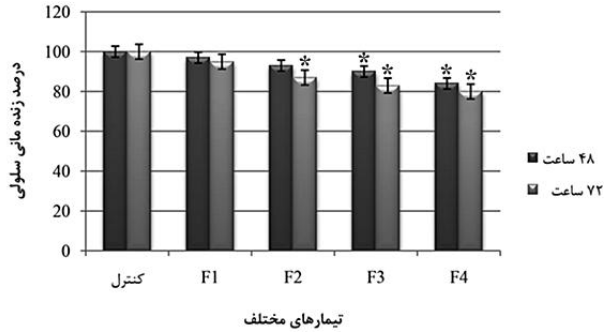
کد فرمول	فرمولاسیون	سایز ذرات	پتانسیل زتا	شاخص پراکندگی
F1	(DPPC:Chol:PEG:DOTAP)	۱۱۹/۶ ± ۲/۱	+۱۹/۰۲ ± ۰/۴۴	۰/۲۰۳ ± ۰/۰۱
F2	(DPPC:Chol:PEG:DOTMA)	۱۲۷/۷ ± ۰/۷	+۱۵/۱۴ ± ۱/۶۷	۰/۲۴۴ ± ۰/۰۱
F3	(DPPC:Chol:PEG:DOAB)	۱۴۲/۱ ± ۱/۳	+۱۴/۲ ± ۱/۷۳	۰/۲۰۸ ± ۰/۰۱
F4	(DPPC:Chol:PEG:DDAB)	۱۷۲/۲ ± ۲/۱	+۱۳/۳۸ ± ۰/۳۱	۰/۱۴۷ ± ۰/۰۳۶

این یافته‌ها نشان می‌دهند که لیپوزوم‌های سنتز شده مطابق با فرمول F1 که حاوی فسفولیپید کاتیونی DOTAP می‌باشند از نظر سایز و بار به طور معنی‌داری از فرمولاسیون‌های دیگر بهتر بوده و می‌توانند قابلیت بیشتری در کاربرد به عنوان حامل‌های غیرویروسی اسیدهای نوکلئیک در فرآیند ژن‌درمانی از خود نشان دهند.

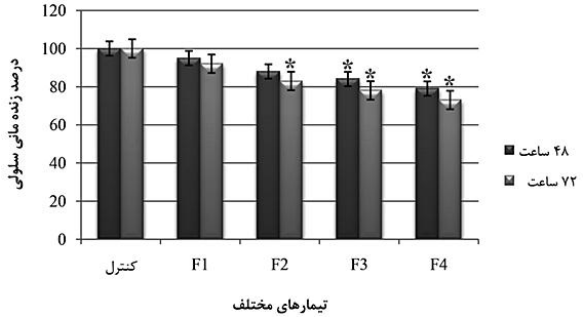
بر طبق نتایج شاخص پراکندگی هر سه فرمولاسیون مناسب می‌باشد که حاکی از مونو دیسپرس بودن ذرات است. در واقع ذرات با بار همنام یکدیگر را دفع کرده و مانع از تجمع آن‌ها می‌شود.

بررسی سمیت سلولی و میزان زنده‌مانی سلول‌ها

بررسی نتایج حاصل از تست MTT نشان می‌دهد (نمودار ۱و ۲) از میان فرمولاسیون‌های مختلفی که با استفاده از فسفولیپیدهای کاتیونی مختلف طراحی و سنتز شده‌اند، میزان سمیت ایجاد شده به ترتیب F4>F3>F2>F1 می‌باشد. به این ترتیب فرمولاسیون F1 یعنی لیپوزوم‌های حاوی فسفولیپید DOTAP نسبت به لیپوزوم‌های F3 و F4 به طور معنی‌داری سمیت کمتری را از خود نشان می‌دهند ($P < ۰/۰۵$). البته لیپوزوم‌های حاوی فسفولیپید DOTMA (F2) نیز نسبت به F1 سمیت بیشتری دارند اما این تفاوت در زمان ۴۸ ساعت معنی‌دار نیست در حالی که در زمان ۷۲ ساعت در هر دو رده سلولی کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده مشاهده می‌گردد ($P>۰/۰۵$). همان‌طور که از نتایج بر می‌آید فرمولاسیون F1 کم‌ترین سمیت و فرمولاسیون F4 بیشترین سمیت را دارد. این وضعیت در خصوص تیمارهای ۷۲ ساعته نیز صادق است. البته این نکته نیز حائز اهمیت است که ظاهراً تیمارها وابسته به زمان هستند چرا که با افزایش طول مدت تیمار از ۴۸ به ۷۲ ساعت، سمیت به طور قابل‌ملاحظه‌ای، خصوصاً در لیپوزوم‌های F2-F4، افزایش‌یافته است. علاوه بر این، یافته‌ها نشان دهنده حساسیت بیشتر سلول‌های HBMF-SPH نسبت به سمیت ناشی از فسفولیپیدهای کاتیونی در مقایسه با سلول‌های HFF می‌باشند (نمودار ۲) ($P <۰/۰۵$). از آنجا که ایجاد خاصیت کاتیونی وابسته به حضور فسفولیپیدهای DOTAP، DOTMA، DOAB و DDAB می‌باشد، ایجاد سمیت نیز وابسته به حضور این فسفولیپیدها است. در نهایت آنچه از نتایج برمی‌آید این است که لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون F1 در هیچ یک از زمان‌ها و در هیچ یک از دو رده سلولی، سمیت مشهود و قابل ملاحظه‌ای نشان نداده‌اند.



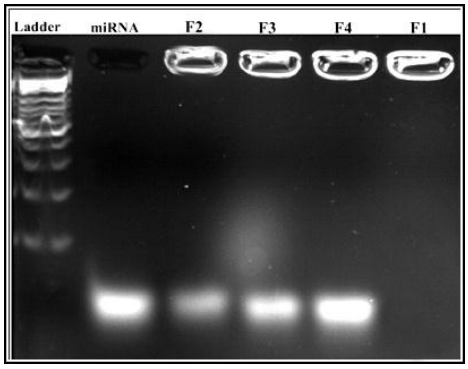
شکل نمودار۱: مقایسه سمیت لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون‌های F1-F4 در رده سلولی HFF پس از ۴۸ و ۷۲. بر اساس یافته‌ها فرمولاسیون‌های F3 و F4 در هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بطور معنی‌داری سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها شدند. فرمولاسیون F2 تنها در زمان ۷۲ ساعت سمیت معنی‌داری نشان داد. * نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد می‌باشد ($P<0.05$).



شکل نمودار ۲: مقایسه سمیت لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون‌های F1-F4 در رده سلولی HBMF-SPH پس از ۴۸ و ۷۲. بر اساس یافته‌ها فرمولاسیون‌های F3 و F4 در هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بطور معنی‌داری سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها شدند. فرمولاسیون F2 تنها در زمان ۷۲ ساعت سمیت معنی‌داری نشان داد. * نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵).

بررسی میزان بارگیری miRNA توسط لیپوزوم

این انتظار وجود داشت که در صورت به دام افتادن miRNA-101 توسط لیپوزوم، miRNA توانایی حرکت خود را بر روی ژل در حین الکتروفورز از دست داده و داخل چاهک باقی بماند. بدین منظور لیپوزوم‌های سنتز شده (F1-F4) با نسبت N/P معادل ۱۶۰/۱ (این نسبت نشان‌دهنده نسبت لیپوزوم به اسیدنوکلئیک می‌باشد) با miRNA-101 در دمای محیط انکوبه شدند. همان‌طور که در نمودار ۳ مشخص است، miRNA-101 به طور کامل توسط لیپوزوم‌های حاصل از فرمول F1 به دام افتاده و هیچ‌گونه حرکتی روی ژل ندارند. این در حالی است که سایر فرمولاسیون‌ها که دارای شارژ مثبت کمتری بودند، بر اساس بار مثبت متفاوتی که داشتند، مقادیر متفاوتی از miRNA را به دام انداخته‌اند و miRNA آزاد روی ژل حرکت نموده است (نمودار ۳).



شکل نمودار ۳. بررسی میزان بارگیری miRNA-101 توسط لیپوزوم‌های کاتیونی با فرمولاسیون‌های متفاوت با نسبت N/P ثابت (۱۶۰/۱) توسط آگاروز ژل الکتروفورز. بر اساس یافته‌ها لیپوزوم حاوی DOTAP توانایی به دام انداختن miRNA-101 را بطور کامل داشته است در حالی که سایرین این قابلیت را نداشته‌اند. به نظر می‌رسد این توانمندی ناشی از وجود بیشترین مقدار شارژ مثبت در این فرمولاسیون می‌باشد که سبب اتصال و الحاق بیشتر آن با miRNA دارای بار منفی می‌شود.

بحث

سرطان که به معنای رشد بی‌رویه سلول‌ها به همراه توانایی تهاجم به سایر نقاط بدن تعریف می‌شود، دومین عامل مرگ و میر در سراسر دنیاست و تنها در سال ۲۰۱۵ سبب ۸/۸ میلیون مرگ شده است (۲۱). متأسفانه تاکنون درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده است و درمان‌های رایج نیز تنها عوارض ناشی از بیماری را تسکین می‌دهند. یکی از موضوعاتی که بسیار حائز اهمیت است جایگزینی روش‌های سنتی درمان سرطان با روش‌های نوین است. زیرا درمان‌های متداول موجود سبب عوارض خطرناک بسیاری برای بدن می‌شوند (۲۲). یکی از متدهای جدید درمانی که بسیار مورد توجه واقع شده است، ژن‌درمانی است. ژن‌درمانی شامل هرگونه روش درمانی به وسیله تعدیل و مدیفیکاسیون ژنتیکی در سلول‌ها می‌باشد.

موادی که در این روش می‌توانند مورد استفاده واقع شوند ممکن است شامل انواع متفاوتی از اسیدهای نوکلئیک مانند پلاسمید، miRNA و یا siRNA باشد (۷،۲۳). یکی از چالش‌های مهم در کاربرد اسیدهای نوکلئیکی نظیر miRNA به عنوان عوامل درمانی در فرآیند ژن‌درمانی، این است که چگونه این مولکول‌ها به سلول وارد شوند. نظر به اینکه عبور این مولکول‌ها به تنهایی از غشای پلاسمایی فرآیندی بسیار دشوار است، ضروری است که حامل‌هایی با هدف انتقال ژن به سلول‌ها توسعه یابند (۲۴). در میان حامل‌های غیرویروسی، لیپوزوم‌های کاتیونی به عنوان حامل‌هایی برای انتقال انواع اسیدهای نوکلئیک به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۵). راندمان ترانسفکشن لیپوزوم‌های کاتیونی تحت کنترل برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها شامل سایز، شارژ و کل نسبت لیپید به ذرات می‌باشد. این پارامترها می‌توانند پایداری و تکرارپذیری لیپوزوم‌ها را در ورود به سلول‌ها تحت تأثیر قرار دهند (۲۶). هدف از انجام این مطالعه طراحی و سنتز لیپوزوم کاتیونی با خصوصیات فیزیکوشیمیایی مناسب جهت انتقال ژن در فرآیند ژن‌درمانی و با حداقل سمیت سلولی می‌باشد.

در لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون‌های متفاوتی که در این پژوهش طراحی و سنتز شدند از فسفولیپیدهای کاتیونی مختلفی با نسبت‌های مساوی در فرمول‌های (F1-F4) استفاده شد. نتایج نشان دادند که فرمول F1 که حاوی فسفولیپید کاتیونی DOTAP می‌باشد خصوصیات فیزیکوشیمیایی بهتری (سایز و بار مثبت) در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها از خود نشان می‌دهد. در راستای نتایج حاصل از این مطالعه، Samadikhah و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که زمانی که کمپلکس‌های لیپوزوم کاتیونی دارای بار مثبت بیشتری باشند، نیروهای الکترواستاتیک مانع از تشکیل توده و اجتماعاتی از ذرات شده و درنهایت منجر به تشکیل کمپلکس‌های کوچکتری می‌شوند (۲۶). در توافق با یافته‌های این مطالعه، Campbell و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که وجود بیش از ۱۰٪ فسفولیپید DOTAP در ساختار لیپوزوم منجر به کاهش سایز و همگن‌سازی ذرات می‌گردد (۲۷). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۳ لیپوزوم کاتیونی حاوی DOTMA با فرمولاسیونی مشابه این مطالعه طراحی و سنتز نمودند. نتایج نشان داد که لیپوزوم سنتز شده دارای سایزی حدود ۴۰ نانومتر و شارژی حدود ۱۵+ میلی ولت بود که از نظر پتانسیل مشابه با نتایج این مطالعه و از نظر سایز کوچک‌تر از لیپوزوم‌های سنتز شده در این پژوهش بودند (۲۸). در سال ۲۰۱۵، Hattori و همکاران لیپوزوم‌های کاتیونی دارای فسفولیپیدهای DOTAP و DDAB طراحی کردند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد که لیپوزوم‌های دارای DOTAP از سایز و میانگین قطر مناسب‌تری برخوردار بودند که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲۹). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که لیپوزوم‌های کاتیونی می‌توانند به واسطه بار مثبتی که دارند با بار منفی گروه فسفات در اسید نوکلئیک واکنش داده و بر هم کنش‌های الکترواستاتیک را ایجاد نمایند و بنابراین قابلیت بیشتری در انتقال اسید نوکلئیک از خود نشان می‌دهند. به علاوه، لیپوپلکس‌های کاتیونی در مقایسه با خنثی، می‌توانند به علت داشتن بار مثبت و برهم کنش با بار منفی غشای پلاسمایی سلول، جذب سلولی و ورود کمپلکس را به درون سلول‌ها تسهیل کنند (۳۰). این مطالعات در توافق با یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد که نشان داد لیپوزوم‌های دارای بار مثبت بیشتر بهتر با اسیدنوکلئیک واکنش داده و تشکیل لیپوپلکس می‌دهند.

بر اساس نتایج این مطالعه، لیپوزوم کاتیونی F1 که دارای فسفولیپید کاتیونی DOTAP می‌باشد سمیت بسیار ناچیزی در مقایسه با سایر لیپوزوم‌ها از خود نشان داد. مطالعات محققین مختلف نشان داده‌اند که تمام لیپیدهای کاتیونی سمی هستند (۳۱) ولی می‌توان از طرق مختلف سمیت را کاهش داد. استفاده از لیپیدهای خنثی در ترکیب لیپوزوم یکی از روش‌های کاهش سمیت می‌باشد. Shim و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که استفاده از فسفولیپید خنثی، DPPC، در لیپوزوم‌های کاتیونی حاوی DOTAP سمیت را می‌کاهد (۸). مطابق با نتایج به دست آمده از این مطالعه، Khatri و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که لیپوزوم‌های دارای DOTAP نسبت به

لیپوزوم‌هایی که در ترکیب خود DOTMA دارند، سمیت کمتری از خود نشان می‌دهند (۳۲). Balazs و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که یکی از دلایل بروز سمیت کمتر در لیپوزوم‌های کاتیونی حاوی DOTAP در مقایسه با لیپوزوم‌های حاوی DOTMA وجود دو باند استری در ساختار DOTAP است (۳۳). نتیجه مطالعه Wang و همکاران در سال ۲۰۱۳ طراحی و سنتز سامانه‌ای لیپوزومی حاوی DOTMA بود که برخلاف نتایج این پژوهش سمیت سلولی از خود بروز نداد (۲۸). Samadikhah و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که لیپوزوم کاتیونی که در ترکیب خود دارای DOAB و DPPC بود، سمیت قابل‌ملاحظه‌ای نشان نداد که عکس نتایج حاصل از این مطالعه بود (۳۴).

به علاوه، نتایج این پژوهش نشان دادند که سلول‌های مغز استخوان (HBMF-SPH) در مقایسه با سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان (HFF) حساسیت بیشتری در مقابل سمیت ناشی از فسفولیپیدهای کاتیونی از خود بروز داده و پس از تیمار با لیپوزوم‌ها (F1-F4) در اثر سمیت لیپوزوم‌ها، درصد زنده‌مانی کمتری نشان دادند. این نتایج با یافته‌های Kim و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطابقت دارد که نشان داد ورود لیپوزوم‌ها به سلول و بازده ترانسفکشن علاوه بر ترکیب لیپیدی لیپوزوم به رده سلولی که در معرض آن قرار گرفته نیز بستگی دارد (۳۵).

در مطالعه حاضر بررسی میزان بارگیری miRNA توسط لیپوزوم‌های سنتز شده (F1-F4) بررسی شد. نتایج نشان دهنده قابلیت بیشتر لیپوزوم F1 برای اتصال به miRNA بود که احتمالاً به علت شارژ مثبت بیشتری است که این لیپوزوم در مقایسه با سایر لیپوزوم‌ها دارد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که لیپوزوم‌های بر پایه‌ی DOTAP توانایی بهتری در اتصال و انتقال miRNA دارند. Hattori و همکاران در سال ۲۰۱۵ به این نتیجه رسیدند که لیپوزوم کاتیونی حاوی DOTAP بهتر از لیپوزوم کاتیونی دارای DDAB در به دام انداختن siRNA عمل می‌کند (۲۹). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که DOTAP و DOTMA در مقایسه با سایر لیپیدهای کاتیونی، توانایی بیشتری در به دام انداختن انواع اسیدهای نوکلئیک به خصوص miRNA و siRNA دارند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (۳۶,۳۷). اگرچه مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ساختار لاملار DOTAP می‌تواند سبب ترانسفکشن بسیار مؤثرتری شود (۳۵). در این راستا Hattori و همکاران در سال ۲۰۱۵ نتیجه گرفتند که لیپوپلکس‌های حاوی DOTAP می‌توانند به عنوان حاملی برای انتقال siRNA در شرایط in vivo مفید بوده و سبب القای خاموشی ژن در تومورهای متاستاتیک ریه شوند (۲۹). همچنین Hattori و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که لیپوزوم‌های حاوی DOTAP/Chol که برای انتقال siRNA مورد استفاده قرار گرفتند جذب سلولی بیشتری را از خود نشان می‌دهند (۳۸). در برخی از مطالعات نیز گزارش شده است که حامل‌های لیپوزومی حاوی DOTAP نسبت به سایر ترکیبات از پایداری بیشتری برخوردارند که سبب بهبود عملکرد آن‌ها به عنوان حامل‌هایی برای انتقال ژن به سلول‌ها می‌شود (۴۳).

Mel'nikov و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Mizuarai و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که لیپوزوم کاتیونی حاوی DDAB می‌تواند به طور چشمگیری در به دام انداختن و انتقال پلاسمید (DNA) ایفای نقش کند (۳۹,۴۰). البته Peng و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ طی پژوهشی به همین نتیجه رسیدند (۴۱).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که لیپوزوم‌های کاتیونی حاوی فسفولیپید DOTAP (F1) از خصوصیات فیزیکو شیمیایی بهتری نسبت به سایرین برخوردار هستند. بنابراین می‌توان با توجه به مطالعات پیشین نتیجه گرفت که این نتایج ناشی از مجموعه‌ی پارامترهایی است که فسفولیپید کاتیونی DOTAP از خود نشان می‌دهد شامل تجزیه زیستی، توزیع زیستی و سمیت (۴۲).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۴ فرمولاسیون لیپوزوم کاتیونی به منظور امکان کاربرد در ژن‌درمانی طراحی و سنتز شدند. تفاوت فرمول‌های مختلف تنها در فسفولیپید کاتیونی مورد استفاده در آن‌ها بود تا بدین وسیله بتوان فرمولاسیونی را که لیپوزوم‌هایی

با خواص فیزیکوشیمیایی بهتر و سمیت کمتری تولید می‌کنند به دست آورد تا در مراحل بعدی برای فرآیند ژن‌درمانی مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس یافته‌های به دست آمده از این پژوهش، لیپوزوم کاتیونی دارای DOTAP خواص فیزیکو شیمیایی یعنی سایز و شارژ مناسب‌تری را نشان داده است. به‌علاوه بررسی سمیت سلولی فرمولاسیون‌های طراحی شده نشان داد که این لیپوزوم (F1) سمیتی در سلول‌ها ایجاد نمی‌کند. در سنجش میزان توانمندی لیپوزوم‌های مختلف در به دام انداختن miRNA نیز این فرمولاسیون بیشترین میزان miRNA را به دام انداخت. از مجموع این یافته‌ها چنین بر می‌آید که لیپوزوم‌های کاتیونی بر پایه DOTAP حامل‌های توانمندی برای کاربرد در ژن‌درمانی می‌باشند. البته لازم است مطالعات بیشتری در خصوص کارآیی این حامل‌ها در برنامه‌های درمانی بر مبنای مدیفیکاسیون‌های ژنتیکی انجام گردد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت‌های مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد انجام گرفته است، بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند. از خانم دکتر فاطمه حقیرالسادات جهت مساعدت‌های علمی تقدیر می‌گردد.

References:

1-Mitra AK, Agrahari V, Mandal A, Cholkar K, Natarajan C, Shah S, et al. ***Novel delivery approaches for cancer therapeutics.*** J Control Release 2015; 219: 248–68 .

2-Sun N, Liu Z, Huang W, Tian A, Hu S. ***The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy.*** Crit Rev Oncol Hematol 2014; 89(3): 352–7 .

3-Sperber GH, Sperber SM. ***Thompson and Thompson Genetics in Medicine.*** Cleft Palate-Craniofacial J 2008; 45(1): 106 .

4-Li N, Zhao L, Qi L, Li Z, Luan Y. ***Polymer assembly: promising carriers as co-delivery systems for cancer therapy.*** Prog Polym Sci 2015; 58: 1–26 .

5-del Burgo LS, Pedraz JL, Orive G. ***Advanced nanovehicles for cancer management.*** Drug Discov Today 2014; 19(10): 1659–70 .

6-Jayakumar R, Chennazhi KP, Muzzarelli RAA, Tamura H, Nair SV, Selvamurugan N. ***Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy.*** Carbohydr Polym 2010; 79(1): 1–8 .

7-Husain SR, Han J, Au P, Shannon K, Puri RK. ***Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval.*** Cancer Gene Ther 2015; 22(12): 554-63.

8-Shim G, Kim M-G, Park JY, Oh Y-K. ***Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids.*** Asian J Pharm Sci 2013; 8(2): 72–80 .

9-Sanna V, Pala N, Sechi M. ***Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer.*** Int J Nanomedicine 2014; 9: 467-83.

10- Caruso F, Hyeon T, Rotello V**.** ***Nanomedicine themed issue.*** Chem Soc Rev 2012; 41(7): 2537-2538.

11- Hull LC, Farrell D, Grodzinski P**.** ***Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research—View from NCI Alliance for nanotechnology in cancer.*** Biotechnol Adv. 2014; 32(4): 666–78 .

12- Yoshino K, Taguchi K, Mochizuki M, Nozawa S, Kasukawa H, Kono K. ***Novel analytical method to evaluate the surface condition of polyethylene glycol-modified liposomes.*** Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 2012; 397: 73–9 .

13- Sabnani MK, Rajan R, Rowland B, Mavinkurve V, Wood LM, Gabizon AA, et al. ***Liposome promotion of tumor growth is associated with angiogenesis and inhibition of antitumor immune responses.*** Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med 2015; 11(2): 259–62 .

14- Kesharwani P, Gajbhiye V, Jain NK. ***A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA.*** Biomaterials 2012; 33(29): 7138–50 .

15- Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. ***Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.*** Nat Nanotechnol 2007; 2(12): 751–60 .

16- Chen Y, Gao D-Y, Huang L. ***In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies.*** Adv Drug Deliv Rev 2015; 81: 128–41 .

17- Yang J, Liu H, Zhang X**.** ***Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers.*** Biotechnol Adv 2013; 32(4): 804–17 .

18- Bose J, Arai Y, Chan Ahn J, Park H, Lee S-H. ***Influence of cationic lipid concentration on properties of lipid–polymer hybrid nanospheres for gene delivery.*** Int J Nanomedicine [Internet] 2015; 10: 5367–82.

19- Mady MM. ***Cationic liposomes as gene delivery system.*** African J Pharm Pharmacol 2011; 5(17): 2007–12

20- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Helder MN, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Zandieh-doulabi B. ***A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery***. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 2017; 4: 1-9.

21- WHO. Cancer [Internet]. ***World Health Organization. 2017.*** Available from: http://www.who.int/cancer/en/.

22- Cross D, Burmester JK. ***Gene therapy for cancer treatment: past, present and future.*** Clin Med Res 2006; 4(3): 218–27.

23- Amer MH. ***Gene therapy for cancer: present status and future perspective.*** Mol Cell Ther 2014; 2: 27.

24- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Ghaemi N. ***A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells.*** Cytotechnology. 2012; 64(5): 523–40 .

25- Cui S, Wang B, Zhao Y, Chen H, Ding H, Zhi D, et al. ***Transmembrane routes of cationic liposome-mediated gene delivery using human throat epidermis cancer cells.*** Biotechnol Lett. 2014; 36(1): 1–7 .

26- Samadikhah HR, Nikkhah M, Hosseinkhani S. ***Enhancement of cell internalization and photostability of red and green emitter quantum dots upon entrapment in novel cationic nanoliposomes.*** Luminescence 2017; 32(4): 517–28 .

27- Campbell RB, Balasubramanian S V., Straubinger RM. ***Phospholipid-cationic lipid interactions: Influences on membrane and vesicle properties.*** Biochim Biophys Acta-Biomembr 2001; 1512(1): 27–39 .

28- Wang X, Yu B, Ren W, Mo X, Zhou C, He H, et al. ***Enhanced hepatic delivery of siRNA and microRNA using oleic acid based lipid nanoparticle formulations.*** J Control release. 2013; 172(3): 690–8 .

29- Hattori Y, Nakamura A, Arai S, Kawano K, Maitani Y, Yonemochi E. ***siRNA delivery to lung-metastasized tumor by systemic injection with cationic liposomes.*** J Liposome Res [Internet]. Informa Healthcare USA, Inc 2015; 25(4): 279–86.

30- Al-Husaini K. ***Therapeutic Potential of CPP (NP1) Mediated siRNA Delivery: Evidence in 3D Spheroids of Colon Cancer Cells (HCT 116)*** (Master's thesis, University of Waterloo).

31- Ashizawa AT, Cortes J. ***Liposomal delivery of nucleic acid-based anticancer therapeutics: BP-100-1.01. Expert Opin Drug Deliv [Internet.*** 2015; (January 2013):1–14.

32- Khatri N, Baradia D, Vhora I, Rathi M, Misra A. ***Development and Characterization of siRNA Lipoplexes: Effect of Different Lipids, In Vitro Evaluation in Cancerous Cell Lines and In Vivo Toxicity Study.*** Aaps Pharmscitech 2014; 15(6): 1630–43 .

33- Balazs DA, Godbey WT**.** ***Liposomes for Use in Gene Delivery.*** J Drug Deliv [Internet] 2011; 2011: 1–12.

34- Samadikhah HR, Majidi A, Nikkhah M, Hosseinkhani S. ***Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes.*** Int J Nanomedicine 2011; 6: 2275–83 .

35- Kim BK, Hwang GB, Seu YB, Choi JS, Jin KS, Doh KO. ***DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet].*** Elsevier B.V. 2015; 1848(10): 1996–2001.

36- Ren T, Song YK, Zhang G, Liu D. ***Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse.*** Gene Ther 2000; 7(9): 764–8 .

37- Antimisiaris S, Mourtas S, Papadia K. ***Targeted si-RNA with liposomes and exosomes (extracellular vesicles): How to unlock the potential.*** International J Pharmaceutics. Elsevier B.V 2017; 525(2): 293-312.

38- Hattori Y, Yoshiike Y, Honda M, Ohno H, Onishi H. ***Evaluation of Small Interfering RNA Delivery into Cells by Reverse Transfection in Suspension with Cationic Liposomes.*** Pharmacol Pharm 2017; 8(5): 129–39 .

39- Mel'nikov SM, Lindman B. ***Solubilization of DNA-cationic lipid complexes in hydrophobic solvents.*** A single-molecule visualization by fluorescence microscopy. Langmuir 1999; 15(6): 1923–8 .

40- Mizuarai S, Ono K, You J, Kamihira M, Iijima S. ***Protamine-modified DDAB lipid vesicles promote gene transfer in the presence of serum.*** J Biochem 2001; 129(1): 125–32 .

1.Peng Z, Fang E, Wang C, Lu X, Wang G, Tong Q. ***Construction of Novel Thermosensitive Magnetic Cationic Liposomes as a Drug and Gene Co-Delivery System.*** J Nanosci Nanotechnol 2015; 15(5): 3823–33 .

41- Spring BQ, Sears RB, Zheng LZ, Mai Z, Watanabe R, Sherwood ME, et al. ***A photoactivable multi-inhibitor nanoliposome for tumout control and simultaneous inhibition of treatment escape pathways. Nat Nanotechnol [Internet].*** Nature Publishing Group 2016; 11(4): 378–89.

42- Ziraksaz Z, Nomani A, Soleimani M, Bakhshandeh B, Arefian E, Haririan I, et al***. Evaluation of cationic dendrimer and lipid as transfection reagents of short RNAs for stem cell modification. Int J Pharm [Internet].*** Elsevier B.V.; 2013;448(1):231–8.

Evaluation and comparison of physicochemical properties, cytotoxicity and the ability of miRNA loading of different cationic liposomes for gene therapy application

Narges Nikoonahad Lotfabadi [1,2], Homa Mohseni Kouchesfehani [*3], Mohammad Hasan Sheikhha[4], Seyed Mehdi Kalantar[5]

[1] Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran
[2] Biology Department, Science faculty, Science and Art University, Yazd, Iran
[3] Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran
[4,5] Reproductive & Genetic Unit, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: 21 Aug 2017 **Accepted:** 16 Sep 2017

Abstract

Introduction: In the present study, various formulations of cationic liposomes were designed and prepared using different cationic lipids. It was performed to assess the physicochemical properties, miRNA loading ability and cellular toxicity rates of liposomes in order to use in gene therapy.

Methods: Different cationic liposome formulations (F1-F4) containing various cationic lipids, DOTAP, DOTMA, DOAB and DDAB with DPPC, cholesterol and phospholipid DSPE-mPEG were synthesized. Prepared nanoparticles were evaluated in term of particle size, polydisparity index, surface charge and cytotoxicity for 48 and 72 h in two cell lines. By using gel electrophoresis, the ability of synthesized cationic liposomes to entrap miRNA was also compared.

Results: All formulations were mono-dispersed. The particle size in F1, which contained DOTAP was lower than others (F2-F4) and its surface charge was more than them. Cationic liposomes based on DOTAP had no significant cytotoxicity as compared to other formulations. Also, F1 formulation was more capable to entrap miRNA than other formulas.

Conclusion: DOTAP-based cationic liposomes can be used efficiently in the gene therapy process, especially for the transfer of miRNA as a new therapeutic agent in cancer therapy.

Keywords: miRNA, liposome, cytotoxicity, gene therapy

This paper should be cited as:
Nikoonahad Lotfabadi N, Mohseni Kouchesfehani H, Sheikhha MH, Kalantar SM. **Evaluation and comparison of physicochemical properties, cytotoxicity and the ability of miRNA loading of different cationic liposomes for gene therapy application.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(6): 444-56.

***Corresponding author: Tel: 09123844874, email: kouchesfehani@yahoo.com**