مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره سه، خرداد ۱۳۹۷
تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۱۰/۲۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۱۱/۲۱

مطالعه آزمایشگاهی: ارزیابی و مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میزان شارژسطحی و سمیت سلولی نانوکامپوزیت های لیپیدی برای حمل اسید های نوکلئیک در سرطان استخوان

فاطمه برزگری فیروزآبادی[۱]، شهربانو عریان[*۲] محمد حسن شیخها[۳]، سید مهدی کلانتر[۴]، آمنه جاوید[۵]

مقاله پژوهشی

مقدمه: هدف از این مطالعه، بررسی خواص فیزیکو شیمیایی، میزان شارژسطحی و سمیت سلولی فرمولاسیون‌های مختلف نانوکامپوزیتی جهت طراحی نانو سامانه لیپیدی با حداکثر میزان بارگیری برای اسیدهای نوکلئیک در سرطان استخوان بود.

روش بررسی: برای انجام این مطالعه، با استفاده از DPPC، کلسترول، DSPE-mPEG و DOTAP شش نوع لیپوزوم با ترکیبات متفاوت طراحی و سنتز شدند. سپس نانو سامانه‌های ساخته شده از نظر اندازه ذرات، بار سطحی، سمیت سلولی و میزان بارگیریmiRNA-143 در دو رده سلولی از رده‌های سلولی سرطان استخوان انسان ارزیابی شدند. از نرم افزار SPSS و آزمون های ANOVA و Student t-test برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آنها استفاده شد..

نتایج: تمام نانو سامانه‌ها مونودیسپرس بودند. از بین سامانه‌ها، فرمول F6 دارای کمترین میزان سمیت و بیشترین میزان بارگذاری miRNA-143 بود که به علت وجود میزان مناسبی از فسفولیپید DOTAP و DSPE-mPEG در ساختار لیپوزوم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: فرمولاسیون لیپوزومی با درصد مناسب از فسفولیپید کاتیونیDOTAP می‌تواند به عنوان یک حامل درمانی موفق برای حمل miRNA درفرایند ژن‌درمانی جهت درمان انواع سرطان ها به ویژه انواع متاستاتیک استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: miRNA، نانوکامپوزیت، ژن‌درمانی، سمیت سلولی

ارجاع: برزگری فیروزآبادی فاطمه ، عریان شهربانو، شیخها محمد حسن، کلانتر سید مهدی، جاوید آمنه. **مطالعه آزمایشگاهی: ارزیابی و مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میزان شارژسطحی و سمیت سلولی نانوکامپوزیت های لیپیدی برای حمل اسید های نوکلئیک در سرطان استخوان.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۳): ۸۵-۲۷۵

۱و ۲- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران.ایران
۳- مرکز تحقیقات زیست فناوری، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی و درمانی شهید صدوقی یزد.ایران
۴- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی و درمانی شهید صدوقی یزد، ایران
۵-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد .ایران
* (نویسنده مسئول): تلفن ۰۹۱۲۱۲۶۲۷۲۳، پست الکترونیکی: sh_oryan@yahoo.com کدپستی:۸۹۱۵۱۱۶۵۸۴

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

مقدمه

هر ساله بیش ازدوازده میلیون نفر از مردم سراسر دنیا به بیماری کشنده سرطان مبتلا شده و بیش ازهفت میلیون نفرجان خود را از دست می دهند. سرطان هزاران سال پیش شناسایی شده و بیش ازپنجاه سال است که دانشمندان به طورگسترده ای در این زمینه تحقیق می‌کنند. اما هنوز دارویی برای درمان آن به دست نیامده است. تنها در صورتی که سرطان درمراحل اولیه تشخیص داده شود تا حدودی قابل درمان وکنترل است (۱). بر اساس تخمین IARC، سرطان متداول‌ترین علت مرگ و میر هم درکشورهای پیشرفته و هم در کشورهای در حال توسعه است (۲). در کشورهای توسعه یافته، بیش از ۱۰ درصد از کل هزینه‌های مراقبت‌های پزشکی مربوط به سرطان است و بیشتر درمان‌های متداول، غیر اختصاصی است و راندمان محدودی دارد (۲،۳).

استئوسارکوم یا استئوژنیک سارکوم ,Osteosarcoma osteogenic sarcomaیکی از شایع ترین تومور ها یا سرطان های بدخیم اولیه استخوان است. سرطان استخوان زمانی اتفاق می افتد که سلول های استخوان ساز دچار مشکل شوند. هر ساله در ایالات متحده، این سرطان به شکل تومور استخوانی در بیش از دو هزار نفر تشخیص داده می‌شود. این سرطان در کودکان و نوجوانان شایع‌تر است و در افراد بزرگ سال به خصوص هرچه پیرتر می‌شوند، کمتر دیده می‌شود اما دلیل بر این نیست که اصلاً برای بزرگسالان اتفاق نیفتد. سرطان استخوان متاستاتیک در بزرگسالان شایع‌تر است. این نوع سرطان از یک ناحیه سرطانی دیگر به استخوان ها شیوع می یابد. از آن جایی که این سرطان جمعیت کودک و نوجوان جامعه را درگیر می کند لذا بررسی و درمان این بیماری حائز اهمیت خواهد بود (۴).

در حال حاضر از داروهای شیمیایی و پرتو درمانی جهت کند کردن سیر بیماری استفاده می‌شود که درمان قطعی نیست و عوارض جانبی خاص خود را دارد و بقایای سلول های سرطانی باقیمانده می توانند منجر به عود مجدد بیماری و متاستاز گردند. در روش های شیمی و پرتودرمانی علاوه بر سلول های سرطانی، سلول‌های سالم نیز از بین می‌روند (۵،۶). نقص در فرآیند آپوپتوزیس علت بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان است بنابراین به نظر می رسد دست‌یابی به روش های درمانی پروآپوپتوتیک هدفمند که فقط سلول های سرطانی را برای آپوپتوزیس هدف قرار دهد روشی مناسب برای درمان سرطان باشد (۷،۸). البته این مسیر طولانی بوده و در حال حاضر نیز بررسی‌هایی در جهت یافتن هر چه بیشتر ژن‌ها و مسیرهای درگیر در فرآیند مرگ سلولی و دست یابی به روش‌های درمانی جدیدتر ادامه دارد.

ژن‌درمانی یک روش درمانی از دسته روش های درمانی بیولوژیک است که طی آن با ترمیم و رفع عیب ژن، بیماری را درمان می‌کنند. در ژن‌درمانی سعی می‌شود با وارد کردن قطعات اولیگو یا پلی نوکلئوتید به سلول‌های بدن، درمان‌های ژنتیکی انجام دهند. در این روش باید به توان ژن را به سلامت از موانع طبیعی که در سلول وجود دارد مثل غشاء سلول، تخریب ژنوم توسط نوکلئازها و غیره عبور داده و به محل اثر آن ژن رساند. در این زمینه تحقیقات زیادی انجام شده که در هر کدام کاستی‌هایی وجود داشته است. در ژن‌درمانی انتخاب حامل با کارایی ترانسفکشن بالا و حداقل سمیت بسیار مهم می‌باشد. در گذشته از حامل‌های ویروسی جهت انتقال ژن استفاده می‌شد. هر چند این وکتورهای ویروسی کارایی بالایی برای انتقال ژن داشتند ولی به دلیل خطرات استفاده از آن ها و هم چنین احتمال آنکوژن بودن آن‌ها و هزینه بالا و محدودیت در اندازه اسید نوکلئیک قابل حمل، امروزه توجه محققان به سمت حامل‌های غیر ویروسی از جمله لیپوزوم‌ها جلب شده است که زیست سازگاری بالاتری نسبت به حامل‌های ویروسی داشته اما بیان ژن پایینی دارند(۹،۱۰).

لیپوزوم‌ها وزیکول‌هایی با دو لایه لیپید هستند که می‌توانند توسط مولکول‌های مختلف شامل miRNAها بارگیری شوند. اگر در سنتز لیپوزوم‌ها لیپیدهای کاتیونی به کار برده شوند، بار منفی اسیدهای نوکلئیک جبران شده و ذرات دارای بار خالص

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

مثبت می شوند، که جذب سلولی را تسهیل می‌کند. این استراتژی به طور موفقی استفاده می‌شود تا مقلدهای miRNA در مدلهای پرِکلینیکی سرطان و برای حمل miRNAها به منظور درمان عمل کنند (۱۱). حامل‌های لیپیدی می توانند ژن‌ها را از تجزیه حفظ و موجب افزایش ثبات آن‌ها در گردش خون شوند (۱۲). از میان انواع لیپوزوم‌ها ، لیپوزوم‌های کاتیونی به علت راندمان بالا در انتقال ژن، استفاده از ترکیبات زیست تجزیه پذیر در ساختارشان که پاسخ ایمنی بر علیه آنها را به حداقل می‌رساند و روش ساخت ساده، حامل‌های ایده الی به نظر می‌رسند (۱۰و۱۳).

در استفاده‌های کلینیکی از لیپوزوم‌های کاتیونی، محدودیت‌هایی به علت بروز سمیت وجود دارداز این رو بسیار مهم است که برای به حداقل رساندن سمیت سامانه، غلظت لیپید کاتیونی مورد استفاده و ترکیب اجزای سامانه طراحی شده جهت توانمندی بالا در بارگذاری ژن، بهینه گردد. هدف از این مطالعه، طراحی نانو سامانه لیپیدی با حداکثر میزان بارگیری برای اسیدهای نوکلئیک در سرطان مغز استخوان می‌باشد.

روش بررسی

کلسترول و DOTAP[1, 2-dioleoyl-3-trimethylammonium- propane (chloride salt)] به ترتیب از شرکت‌های Sigma Aldrich(St. Louis, MO,USA) و Avanti Polar Lipids (AL, USA) خریداری شدند. پلی‌اتیلن گلیکول /DistearoylPhosphoethanolamine (PE 18:0 -PEG2000, DSPE-mPEG 2000)) و فسفولیپید DPPC (1,2- Dipalmitoyl-sn-glycero-3 phosphocholine) از شرکت Lipoid GmbH(Germany) تهیه شدند. محیط کشت DMEM از شرکت گیبکو این ویترو جن (Karlsruhe,Germany) تهیه شد. محلول پارافرمالدئید ۴ درصد و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از موسسه علمی ترموفیشر (Waltham, Massachusetts, USA) و سیگما – آلدریچ (St Louis ,MO) بودند. تمامی مواد شیمیایی دیگر و حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید انالیتیکال بوده‌اند.

رده‌های سلولی و محیط کشت

رده‌سلولی: در این مطالعه رده های سلولیMG-63 وSaOs2 (Sarcoma osteogenic)که از رده‌های سلولی سرطان استخوان انسان هستند به عنوان سلول های هدف مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت کشت تک لایه تهیه شد. سلول‌ها در ترکیبی از محیط کشت سلولیDMEM و سرم FBS به نسبت ۹۰ به ۱۰ کشت داده شد و پس از انجام سه بار پاساژ موفقیت آمیز آزمایش‌های مورد نظر روی آن‌ها انجام گرفت.

سنتز فرمولاسیون نانو لیپوزومی یکنواخت

شش نوع لیپوزوم با ترکیبات متفاوت طراحی و سنتز شدند. فاز لیپیدی شامل: (DPPC:CHOL:DOTAP:PEG) بود. DPPC و کلسترل همراه با درصدهای مختلف DSPE-mPEG (2000) (۰ تا ۵) در مقادیر مختلف DOTAP (۰،۳۰، ۴۰و ۵۰ درصد) در کلروفرم حل گردید. سپس فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیرکننده دوار در دمای حدود ۵۵ درجه و با دور تقریبیrpm ۱۵۰، حذف و فیلم نازک لیپیدی تشکیل شد.

هم چنین جهت اطمینان از حذف کامل حلال، فیلم نازک لیپیدی چندین دقیقه با گاز نیتروژن هوادهی گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه یخچال قرار گرفت. سپس فیلم نازک با حجم مناسبی از بافر PBS هیدراته شد. برای کاهش اندازه لیپوزوم‌های MLV و تشکیلSUV از روش سونیکاسیون استفاده گردید. برای اطمینان از کاهش سایز، سامانه‌های ساخته شده سه بار به ترتیب از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ نانومتری عبور داده شدند.

تعیین سایز و اندازه

محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات با استفاده از(DLS(Dynamic Light Scattering تعیین می‌شود که بدین منظور از دستگاه نانو سایزر Brookhaven

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

Instruments Corp استفاده گردید. همه اندازه‌گیری‌ها چهار مرتبه تکرار شد.

تعیین پتانسیل زتا

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Brookhaven Instruments Corp) (Germany) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری گردید.

بررسی زنده‌مانی سلولی در اثر تماس با فرمولاسیون های مختلف نانو حامل

در این روش، تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا بررسی نتایج با فتومتر، در یک میکروپلیت ۹۶خانه ای انجام شد. لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالاست. این سنجش در دوره های زمانی ۴۸و ۷۲ ساعت انجام پذیرفت. پلیت‌های حاوی رده های سلولیMG-63 و SaOs2 در معرض تیمارهایی از شش فرمول نانولیپوزومی ساخته شده (F1-F6) قرار گرفتند. در طول تیمار تمام پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از اتمام هر دوره ۲۰میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۳ساعت انکوباسیون محلول درون چاهک‌ها به طور کامل دور ریخته شد و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری گردید .

درصد زنده مانی سلولی= (میانگین جذب نوری در محیط کشت−میانگین جذب نوری در گروه آزمون) / (میانگین جذب نوری در محیط کشت−میانگین جذب نوری در گروه کنترل) ×۱۰۰

بررسی میزان توانایی بارگیریmiRNA توسط نانوسامانه‌ها

به منظور بررسی میزان بارگذاری اسیدهای نوکلئیک توسط فرمولاسیون‌های مختلف ساخته شده (F1-F6) برای استفاده در درمان استئوسارکوما، از(Micro RNA-)miR-143 به عنوان مدل استفاده شد. بعد از اماده شدن لیپوزوم هایSUV، نسبت یکسانی از لیپوزوم‌ها به miRNA-143 (۱-۱۸۰ میکروگرم بر میلی گرم) در دمای محیط به مدت۳۰ دقیقه انکوبه گردید. جهت افزایش مدت زمان پایداری و یکنواختی بیشتر سایز محصولات، نانولیپوزوم‌ها قبل از انکوبه شدن با miRNA-143 توسط دستگاه اکسترودر (Lipex 10ml Northern Lipids Inc Canada)۵ مرتبه فیلتر گردیدند. برای تایید میزان بارگذاری از ژل آگارز الکتروفورز (۲درصد) همراه با اتیدیوم بروماید (۳۰ دقیقه الکتروفورز در ۸۰ ولت) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS(ver 21) استفاده گردید. و آزمون‌هایANOVA و Student t-test برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آنها استفاده شد. معنی داری نتایج بر حسب P-value<۰.۰۵ سنجیده شد.

ملاحظات اخلاقی

در این تحقیق ملاحظات اخلاقی مورد تایید معاونت پژوهشی پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی یزد قرار گرفته است. کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1395.5

نتایج

مشخصه یابی فیزیکوشیمیایی فرمولاسیون های لیپوزومی

وزیکول‌های لیپوزومی با استفاده از DPPC، کلسترول، DSPE-mPEG و DOTAP تهیه شدند و مشخصه‌یابی گردیدند (جدول ۱). بر طبق نتایج با افزایش میزان DOTAP شارژ سطحی نانو ذرات افزایش یافته است. مولکول DOTAP با دارا بودن گروه عاملی مثبت، موجب ایجاد شارژ مثبت در ساختار لیپوزوم می‌شود. در همه موارد، شاخص پراکندگی کمتر از۰/۳ است که نشان‌دهنده اگلومره نبودن است (۱۴). پگیلاسیون شاخص پراکندگی را کاهش داده است که به دلیل افزایش در نیروی دافعه ذرات با شارژ مثبت است.

هم چنین ممانعت فضائی ایجاد شده مانع از تجمع ذرات شده است. پگیلاسیون، پتانسیل زتا را بهبود داده است و ذرات را با تجمع کم حفظ کرده است. نتایج نشان دهنده توزیع یکسان اندازه نانوذرات ساخته شده برای هر شش فرمول است. با توجه به تاثیر پگیلاسیون بر روی سایز ذرات، فرمول F6 که حاوی ٪۳۰ DOTAP و ٪۳ PEG در ساختار خود است نسبت به فرمول F5 که حاوی ٪۳۰ DOTAP و ٪۵ PEG است از نظر اندازه ذرات بهینه ترمی باشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

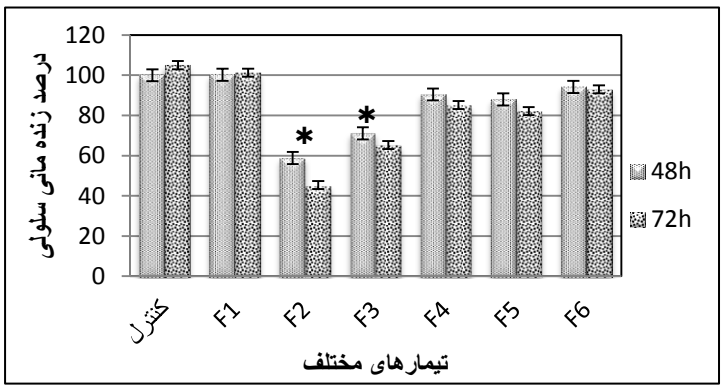
جدول ۱: مشخصه یابی فرمولاسیون های مختلف نانو سامانه

فرمولاسیون	DOTAP%	PEG%	پتانسیل زتا (mv)	سایز (nm)	شاخص پراکندگی
F1	۰	۰	-۲۴/۳۳ ± ۰/۸۳	۱۴۸/۴ ±۲/۴	۰/۲۹۷ ± ۰/۰۱
F2	۵۰	۰	+۳۸/۲۳±۰/۳۳	۱۲۵/۲۲±۲/۳	۰/۲۳۰±۰/۰۲۴
F3	۴۰	۰	+۳۴/۲۱ ± ۰/۲۳	۱۳۰ ± ۱/۳	۰/۲۰۲ ± ۰/۰۲
F4	۳۰	۰	+۲۱/۸۷±۱/۴۳	۱۱۴/۶۷±۱/۶۰	۰/۱۲۸±۰/۰۱
F5	۳۰	۵	+۲۹/۳۲±۱/۰۲	۱۱۹/۵۲±۰/۸	۰/۱۰۷±۰/۰۱
F6	۳۰	۳	+۲۷/۲۴±۰/۲۱	۱۰۰/۲۳±۰/۳۶	۰/۱۰۹±۰/۰۳

درصد زنده مانی سلولی

نتایج تست MTT در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. یافته ها نشان می دهد که هر چه میزان فسفولیپید کاتیونی DOTAP در ساختار بالاتر باشد سمیت سامانه نیز بیشتر است. ایجاد خاصیت کاتیونی لیپوزوم ها در این مطالعه مدیون حضور این فسفولیپید می باشد. میزان سمیت ایجاد شده به ترتیب F2> F3> F4, F5, F6>F1 می باشند. فرآیند پگیلاسیون باعث افزایش اندازه نانو لیپوزوم‌های ساخته شده می‌گردد (۱۵،۱۶). در نتیجه برای کنترل این امر، میزان حضور PEG در ساختار نانولیپوزوم‌ها بهینه و در حد ۳٪ نگه داشته شد.

میزان سمیت فسفولیپید کاتیونیDOTAP موجود در سامانه های ساخته شده بر روی هر دو رده سلولی مورد مطالعه نشان داد که رده سلولیSaOs2 حساسیت بیشتری دارد ($p<۰.۰۵$). این خواص در زمان ۷۲ ساعته نیز تایید شده است. طبق نتایج با در نظر گرفتن شارژ سطحی، اندازه نانو لیپوزوم های ساخته شده و میزان سمیت سامانه‌ها در هر دو رده سلولی، فرمول F6 به عنوان یک حامل غیر ویروسی، مناسب ترین سامانه جهت حمل miRNA-143 بوده و توانایی بیشتری برای حمل اسیدهای نوکلئیک در کاربردهای ژن‌درمانی برای سرطان استئوسارکوما دارد.

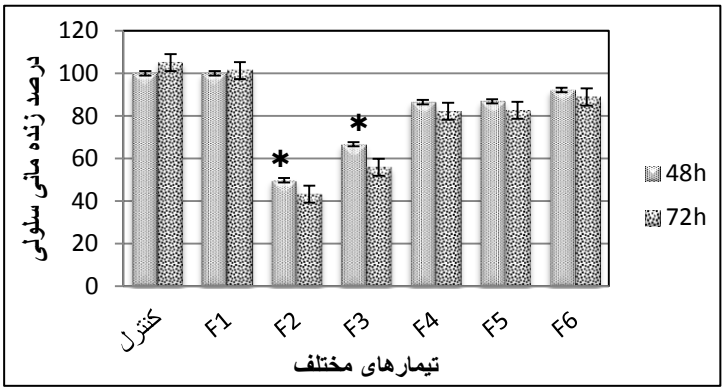


شکل ۱: مقایسه سمیت فرمولاسیون های مختلف(F1 تاF6) بر روی رده سلولیMG63 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت.

فرمول های F2 و F3که به ترتیب بیشترین میزان فسفولیپید DOTAP را در ساختار خود داشتند کمترین درصد زنده مانی را نشان می دهند. میزان سمیت سامانه با میزان فسفولیپید کاتیونیDOTAP رابطه مستقیم دارد..

✱ نشان دهنده معنی داری در سطح ۹۵٪ است ($p<۰.۰۵$)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]



شکل ۲: مقایسه سمیت فرمولاسیون های مختلف(F1 تاF6) بر روی رده سلولیSaOs2 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت.

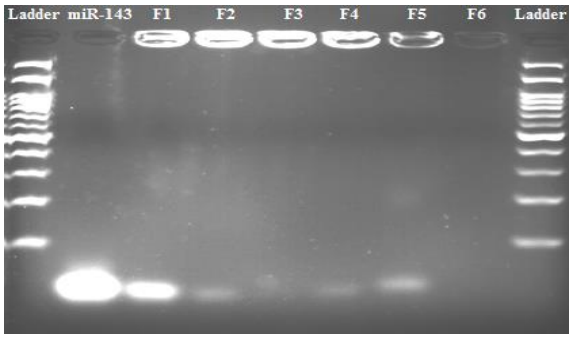
فرمول هایF2 و F3که به ترتیب بیشترین میزان فسفولیپید DOTAP را در ساختار خود داشتند کمترین درصد زنده مانی را نشان می دهند. میزان سمیت سامانه با میزان فسفولیپید کاتیونیDOTAP رابطه مستقیم دارد.

✱ نشان دهنده معنی داری در سطح ۹۵٪ است($p<۰.۰۵$).

بهینه سازی بارگذاریmiRNA با ژل آگارز الکتروفورز

با فرض این که با به دام افتادن miRNA-143 توسط نانو سامانه، توانایی حرکت miRNA بر روی ژل الکتروفورز از بین رفته و در نتیجه در چاهک بماند، لیپوزوم های سنتز شده (F1-F6) با نسبت یکسان ۱۸۰/۱با miRNA-143 (نسبت نانوسامانه به miRNA) در دمای محیط انکوبه شدند.

نمودار ۳ نشان می دهد فرمول F6 بیشترین کارایی را در بارگیریmiRNA143 - داشته است. علاوه بر شارژ مثبت لیپوزوم کاتیونی و ایجاد پیوند فیزیکی بین ژن و لیپوزوم، احتمالا حضور پلی اتیلن گلیکول در ساختار لیپوزوم هم تا حدودی در عدم حرکت miRNA در طول ژل تاثیرگذار بوده است.



شکل ۳: بهینه سازی میزان بارگذاریmiRNA توسط نانو لیپوزوم‌ها با ژل آگارز الکتروفورز

فرمول F6 به طور کامل miRNA-143 را به دام انداخته است.ردیف اول 100bp DNA Ladder، ردیف ۲ mirRNA آزاد، ردیف۳ فرمول F1، ردیف۴ فرمول F2، ردیف۵ فرمول F3، ردیف۶ فرمول F4، ردیف۷ فرمول F5، ردیف۸ فرمول F6، ردیف۹ 100bp DNA Ladder.

بحث

سرطان بیماری ای است که در آن سلولها به دلایل مختلفی شروع به رشد و تقسیم بی رویه می کنند و بی وقفه سلول غیر عادی می سازند (۱). با وجود تلاش های بی وقفه دانشمندان برای درمان سرطان هنوز دارویی برای درمان کامل سرطان به دست نیامده است و در حال حاضر هنوز یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان است. با این که بسیاری از عوامل مولکولی این بیماری شناخته شده است اما به دلیل اینکه عوامل

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

مستقیم و غیر مستقیم زیادی در ایجاد سرطان نقش دارند درمان کامل بسیار دشوار و در بسیاری از موارد غیر ممکن است (۲،۳).پزشکان سال ها قبل از اینکه مفهوم آپوپتوز را بدانند با استفاده از درمان های سنتی سبب آپوپتوز سلول های توموری می‌شده‌اند. اگرچه هر دو روش شیمی و پرتو درمانی سبب مرگ گسترده سلول های توموری می‌شوند، اما این روش ها به طور غیرقابل تشخیصی سلول های نرمال را می‌کشند. بنابراین ایجاد پروتکلهای درمانی پروآپوپتوتیک هدفمند یا توسعه داروهای القا کننده آپوپتوز که تومور را هدف قرار می‌دهند بدون این‌که سبب اختلالات شدید در ساختارهای نرمال شوند، از دهه ۱۹۹۰ در دست اقدام قرار گرفته و روش‌های جدیدی را برای درمان موفق سرطان فراهم کرده‌اند (۱۷).پیشرفت در زمینهٔ آشنایی با ژن‌ها و اعمال تغییرات در آنها این امکان را برای دانشمندان فراهم کرده است که برای مقابله یا پیش گیری از بیماری، مواد ژنتیکی فرد را تغییر دهند. ژن‌درمانی شیوهٔ درمان جدیدی است که برای مقابله با بیماری، مادهٔ ژنتیکی DNA یا RNA را به سلول‌های فرد وارد می کند.

استفاده از ژن درمانی برای درمان انواع مختلف سرطان و بیماری‌های دیگر در پژوهش‌های بالینی در دست بررسی است. در ژن‌درمانی انواع متفاوتی از اسیدهای نوکلئیک مانند پلاسمید،DNA،miRNA و یا siRNA می‌توانند استفاده شوند. در این روش باید بتوان ژن را به سلامت از موانع طبیعی که در سلول وجود دارد مثل غشاء سلول، تخریب ژنوم توسط نوکلئازها و غیره عبور داده و به محل اثر آن ژن رساند (۱،۴).امروزه بخش عظیمی از تحقیقات پزشکی، زیست شناسی و تحقیقات شیمیایی به تولید یک ساختار غیر ویروسی کارآمد برای انتقال ژن اختصاص یافته است. در میان ساختارهای موجود، لیپوزوم‌های کاتیونی به دلیل داشتن ساختاری ساده و خود سامانده از ارزش به سزایی برخوردارند. خصوصیات فیزیک و شیمیایی لیپوزوم‌های کاتیونی از قبیل سایز، شارژ سطحی و نسبت لیپید به اسید نوکلئیک می‌تواند بر میزان پایداری، درصد بارگیری ساختار لیپوزوم از اسید نوکلئیک، سهولت در ورود به سلول تاثیر بگذارد (۱۸). لذا هدف از انجام این مطالعه طراحی و سنتز نانوسامانه لیپیدی فرمول شده ای است که به تواند بیشترین بازده را در انتقال ژن در فرایند ژن‌درمانی با حداقل سمیت داشته باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فرمول F6 دارای کمترین میزان سمیت در کنار بیشترین میزان بارگذاری-143miRNA است. در راستای نتایج این مطالعه Hsu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که لیپوزوم های کاتیونی -LNP DP1 پتانسیل بالایی برای حمل miRNA در استراتژی های جدید درمانی جهت سرطان کبد در موش دارا می‌باشند(۱۹). در توافق با یافته‌های این پژوهش در مطالعه‌ای که توسط Pramanik و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، نشان داده شد که بارگیریmiRNA های مهار کننده تومور مانند miR-34a توسط لیپوزوم‌هایی مرکب از لیپیدهای کاتیونی ۲،۱- دیولئویل-۳- متیل آمونیوم پروپان (DOTAP) و لیپیدهای همکار (۲،۱- دیولئویل-sn-گلیسرو-۳-فسفواتانول آمین-N-) ، کلسترول و DSPE-PEG بسیار قابل توجه بوده است (۲۰).

در مطالعه ای Campbell و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که وجود بیش از ۱۰٪ فسفولیپید DOTAP در ساختار لیپوزوم منجر به کاهش سایز و همگن‌سازی ذرات می‌گردد (۲۱). Wu و همکاران طی تحقیق که در سال ۲۰۱۱ انجام شد، نشان دادند که لیپوپلکس‌های کاتیونی می‌توانند سیستم حمل نوید بخشی برای miRNA در درمان سرطان ریه باشند (۲۲).

تمام فسفولیپیدهای کاتیونی سمی می‌باشند (۲۳) ولی می‌توان میزان سمیت آن ها را با استفاده از فسفولیپیدهای خنثی مثل DPPC در فرمول کاهش داد به طوری که میزان سمیت کاهش یابد ولی میزان بارگیری اسیدهای نوکلئیک کاهش چشم گیری پیدا نکند (۸). در میان فسفولیپیدهای کاتیونی، DOTAP دارای کمترین سمیت است (۲۵،۲۴). که به علت وجود دو باند استری در ساختار DOTAP می‌باشد (۲۷،۲۶).

نتایج این مطالعه هم چنان نشان داد که سلول های SaOs2 در مقایسه با سلول‌های MG-63 حساسیت بیشتری

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

در مقابل سمیت ناشی از فسفولیپد کاتیونی از خود نشان دادند و بعد از تیمار با فرمول های مختلف نانو سامانه (F1-F6) درصد زنده مانی کمتری داشتند. 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 (۲۸).

در بررسی میزان بارگیریmiRNA-143 توسط فرمولاسین های مختلف نانو سامانه، نتایج نشان دهنده قابلیت بیشتر فرمول F6 در مقایسه با سایر فرمول‌ها است که به علت وجود میزان مناسبی از فسفولیپید DOTAP و PEG در ساختار لیپوزوم می باشد. هر چند میزان فسفولیپید کاتیونیDOTAP در فرمولهایF2 و F3 بیشتر و در نتیجه شارژ سطحی آنها نیز بیشتر است ولی همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد به دنبال افزایش درصد حضور این فسفولیپید در ساختار لیپوزوم میزان سمیت سامانه نیز افزایش می‌یابد در این صورت استفاده از آن ها برای کاربردهای*In vivo* با مشکل روبرو می‌شود. بنابراین بر طبق یافته ها فرمول F6 مناسب ترین میزان شارژ در کنار سمیت پایین را دارا است.

پگیلاسیون نانو سامانه زنجیره‌ها را متصل می‌کند که این امر موجب بهبود ترنسفکشن لیپوزوم‌ها شده (۲۹،۳۰) و هم چنین زیست سازگاری بیومواد و پایداری درون تن اولیگونوکلئوئیدها را بهبود می‌بخشد. پگیلاسیون میزان حذف توسط سیستم ماکروفاژی را کاهش می دهد (۱۵،۱۳) البته طول زنجیره PEG باید بهینه شود زیرا فرایند پگیلاسیون دارای خاصیت دوگانه بوده و در غلظت های بالا باعث افزایش اندازه نانو لیپوزوم های ساخته شده می‌گردد در نتیجه برای کنترل این امر، میزان حضور PEG در ساختار نانولیپوزوم‌ها بهینه و پگیلاسیون تا حد۳٪ نگه داشته شد.

نتیجه گیری

این مطالعه نانو لیپوزوم پگیله فرموله شده‌ای را پیشنهاد می‌دهد که دارای شارژ سطحی مناسب بوده و سایز نانو ذرات در محدوده ۱۰۰ نانومتر و به صورت مونودیسپرس می‌باشند. میزان دوز دارویی برای درمان سرطان را کاهش و شاخص درمانی را همراه با بهبود اثرات سمیت سلولی بروی رده سلولی های SaOs2 و MG-63 از رده های سلولی استئوسارکوما افزایش داده است. در آخر می‌توان اذعان نمود با توجه به مزایای بی شمار این سیستم نسبت به مشابه‌های کاتیونی خود می‌توان امید داشت با مطالعه بیشتر بر روی این ساختار و رفع نواقص آن در آینده‌ای نه چندان دور این ساختار یکی از ایمن‌ترین و پایدارترین ساختارهای غیر ویروسی برای انتقال ژن به شمار آید. هدف اصلی از علم نانو بیوتکنولوژی هم چیزی جز مشاهده بهتر و دقیق‌تر پدیده‌های زیستی و الهام گیری از آن‌ها در طراحی سیستم‌های کارامدتر در علم پزشکی نمی‌باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت های پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد انجام شده است، بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

تعارض در منافع: نویسندگان مقاله اظهار می دارند که در نوشتن مقاله سهم یکسا ن داشته و هیچ گونه تعارضی در منافع ندارند.

References

1- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Naderinezhad S, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-Doulabi B. P***reparation of PEGylated cationic nanoliposome-siRNA complexes for cancer therapy. Artif Cells, Nanomedicinug-gene delivery***. Artif Cells Nanomedicine Biotechnol Taylor &

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

Francis 2017; 4: 1-9.

2- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. ***Global cancer statistics***. CA Cancer J Cli 2012; 65: 87-108.

3- Naderinezhad S, Amoabediny G, Haghiralsadat F. ***Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers.*** RSC Adv 2017; **7**: 29916 - 30512.

4- Creixell M, Peppas NA. ***Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance***. Nano Today 2012; 7(4): 367-79.

5- 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.

6- Li N, Zhao L, Qi L, Li Z, Luan Y. ***Polymer assembly: promising carriers as co-delivery systems for cancer therapy***. Prog Polym Sci 2016; 58: 1-26.

7- Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, et al. ***Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy.*** Ann Oncol 2006; 17(7): 115-23.

8- Nowsheen S, Yang E. ***The intersection between DNA damage response and cell death pathways***. Exp Oncol 2012; 34(3): 243-54.

9- Hiroki T, Nanae H, Miho H, Naoko A, Nobuhiro N, Hiroaki S, et al. ***Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition.*** Oncotarget 2014; 5: 11399-412.

10- Scholz C, Wagner E. ***Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: common and different tasks for synthetic carriers***. J Control Release 2012; 161(2): 554-65.

11- Wang L, Shi ZM, Jiang CF, Liu X, Chen QD, Qian X, et al. ***MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma*** Oncotarget 2014; 5(14): 5416- 27.

12- 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.

13- Yang J, Liu H, Zhang X. ***Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers***. Biotechnol Adv 2014; 32(4): 804-17.

14- Bao Y, Jin Y, Chivukula P, Zhang J, Liu Y, Liu J, et al***. Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of siRNA/lipid nanoparticle complexes***. Pharm Res 2013; 30(2): 342-51.

15- Huang Y, Chen J, Chen X, Gao J, Liang W. ***PEGylated synthetic surfactant vesicles (Niosomes): novel carriers for oligonucleotides***. J Mater Sci Mater Med 2008; 19(2): 607-14.

16- Russ V, Günther M, Halama A, Ogris M, Wagner E. ***Oligoethylenimine-grafted polypropylenimine dendrimers as degradable and biocompatible synthetic vectors for gene delivery.*** J Control Release 2008; 132(2): 131-40.

17- Zhang S, Yin J, Li X, Zhang J, Yue R, Diao Y, et al. ***Jacarelhyperol A induced apoptosis in leukaemia cancer cell through inhibition the activity of Bcl-2 proteins***. BMC Cancer 2014; 14: 689-700.

18- Xu C, Wang J. ***Delivery systems for siRNA drug***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

development in cancer therapy. Asian J Pharm Sci 2015; 10(1): 1-12.

19- Hsu SH, Yu B, Wang X, Lu Y, Schmidt CR, Lee RJ, et al. ***Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor.*** Nanomedicine 2013; 9(8): 1169-80.

20- Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, et al. ***Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice***. Mol Cancer Ther 2011; 10(8): 1470-80.

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

22- Wu Y, Crawford M, Yu B, Mao Y, Nana-Sinkam SP, Lee LJ. ***MicroRNA delivery by cationic lipoplexes for lung cancer therapy***. Mol pharm 2011; 8(4): 1381-9.

23- Ashizawa AT, Cortes J. ***Liposomal delivery of nucleic acid-based anticancer therapeutics: BP-100-1.01.*** Expert Opin Drug Deliv 2015; 12(7): 1107-20

24- 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.

25- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-doulabi B. ***A novel approach on drug delivery: Investigation of new nano-formulation of liposomal doxorubicin and biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcomas cell lines***. Cell J 2017; 19: 55–65.

26- Amoabediny G, Haghiralsadat F, Naderinezhad S, Helder MN, Akhoundi Kharanaghi E, Mohammadnejad Arough J, et al. ***Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (noisome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review***. Int J Polym Mater Polym Biomater 2018; 67(6): 383-400.

27- Balazs DA, Godbey WT. ***Liposomes for Use in Gene Delivery***. J Drug Deliv 2011; 2011: 1-12.

28- 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 2015; 1848(10): 1996–2001.

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

30- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Helder MN, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Forouzanfar T, et al. ***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***. Artif Cells, Nanomed Biotech 2017; 4 :1-9

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]

Laboratory study: evaluation and comparison of physicochemical properties, level of surface charge and cytotoxicity of lipid nanocomposites for carrying nucleic acid in bone cancer

Fatemeh Barzegari Firouzabadi[1], Shahrbanoo Oryan[†2], Mohammad Hasan Sheikhha[3], Seyed Mehdi Kalantar[4], Ameneh Javed[5]

Original Article

Introdution: The aim of this study was to investigate the physico-chemical properties, surface charge and cytotoxicity of nanocomposite formulations for the design of lipid nano-systems with maximum loading for nucleic acids in bone marrow cancer.

Methods For this study, six types of liposomes with different compositions were synthesized using DPPC, cholesterol, DSPE-mPEG (2000) and DOTAP. Then, nanosystems were evaluated for particle size, surface charge, cytotoxicity and loading rate of miRNA in two MG-63 and SaOs2 cell lines, which are human cell bone marrow cell lines.

Results: All nano-systems were monodisperse. Among the systems, the F6 formula has the lowest toxicity and the highest load of miRNA-143, due to the presence of a suitable amount of DOTAP and PEG phospholipid in the liposome structure.

Conclusion: Liposomal formulation with a suitable percentage of DOTAP cationic phospholipid can be used as a successful carrier for the transport of miRNA in the gene therapy process for the treatment of various cancers, especially metastatic types.

Keywords: miRNA, Nanocomposite, Gene therapy, Cell cytotoxicity.

Citation: Barzegari Firouzabadi F, Oryan S, Sheikhha MH, Kalantar SM, Javed A. **Laboratory study: evaluation and comparison of physicochemical properties, level of surface charge and cytotoxicity of lipid nanocomposites for carrying nucleic acid in bone cancer.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(3): 275-85

[1,2]Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran
[3]Biotechnology Research Center, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[4]Reproductive & Genetic Unit, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University o of Medical Sciences, Yazd, Iran.
[5]Biology Department, Science Faculty, Science & Art University, Yazd, Iran
***Corresponding author: Tel:** 09121262723, **email:** sh_oryan@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-26]