مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره دوازدهم، اسفند ۱۳۹۷

تاریخ دریافت:۱۳۹۵/۱۰/۲۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۴/۱۸

فرمولاسیون کمپلکس کاتیونی لیپوزوم– siRNA درمانگر جهت توسعه برای مقابله با استئوسارکوما

بی بی فاطمه حقیرالسادات[۱]، قاسم عموعابدینی*[۲]، سمیرا نادری‌نژاد[۳]، فرزانه مرتضی‌رتکی[۴]
بهروز زندیه دولابی[۵]

مقاله پژوهشی

مقدمه: لیپوزوم‌های کاتیونی به‌عنوان جایگزینی برای حامل‌های ویروسی برای رسانش ژن مطرح شده اند. چالش عمده در رسانش siRNA، ناپایداری لیپوزوم است که هم چنان به عنوان یک مساله جدی است. هدف از این مطالعه ارائه فرمولاسیون لیپوزومی مناسب به‌منظور غلبه بر این ناپایداری است.

روش بررسی: در پژوهش حاضر (علمی-بنیادی به روش تجربی-آزمایشگاهی)؛ فرمولاسیون لیپوزومی حاوی فسفاتیدیل کولین سویا، فسفولیپید کاتیونی DOTAP، کلسترول و پلی اتیلن گلیکول را از طریق روش آب‌پوشانی لایه نازک سنتز شده و siRNA را از طریق انکوباسیون بر روی لیپوزوم‌ها بارگذاری گردید. در ادامه؛ بهینه‌سازی بارگذاری siRNA در دستور کار قرار گرفت. سپس پارامترهایی مربوط به سایز، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی، پایداری طولانی مدت کمپلکس لیپوزوم- siRNA گزارش شد. داده‌ها به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism ورژن ۷ آنالیز شدند. تمامی داده‌ها با سه مرتبه تکرار همراه بوده و به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شدند.

نتایج: در این مطالعه موفق به تولید لیپوپلکس siRNA با راندمان بالای بارگذاری siRNA گردیده‌ایم. نانوذرات تولید شده کلوخه‌ای نبوده و به مدت ۳ ماه در دمای ۴ °C پایدار بوده است. این نانوسامانه توانسته است با موفقیت siRNA را به سلول‌های سالم استخوانی برساند. بررسی‌ها نشان از عدم سمیت سامانه خالی (بدون ژن) داشته است.

نتیجه‌گیری: لیپوزوم پگیله تهیه شده پتانسیل بالایی برای رسانش siRNA به سلول‌های استخوان دارد.

واژه‌های کلیدی: لیپوپلکس siRNA، مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی، جذب درون سلولی، زنده‌مانی سلولی.

ارجاع: حقیرالسادات بی‌بی فاطمه، عموعابدینی قاسم، نادری نژاد سمیرا، مرتضی رتکی فرزانه،بهروز زندیه دولابی. **فرمولاسیون کمپلکس کاتیونی لیپوزوم-siRNA درمانگر جهت توسعه برای مقابله با استئوسارکوما.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶(۱۲): ۳۷-۱۰۲۷.

۱- دکتری نانو بیوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۲- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴- مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۵- گروه زیست شناسی مولکولی و آناتومی کاربردی،دانشگاه وریج آمستردام، آمستردام ،هلند.
*(نویسنده مسئول)؛تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی:amoabediny@ut.ac.ir , کدپستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

مقدمه

در سال ۲۰۱۲، بیش از ۱۴/۱ میلیون فرد مبتلا به سرطان شناسایی شد و در حدود ۸/۲ میلیون فرد در آن سال در اثر سرطان مرده اند (۱). آمار رو به رشد سرطان معضلات پزشکی ایجاد می‌کند نه تنها از نظر سلامتی و کیفیت زندگی، بلکه از نظر اقتصادی که در نهایت می‌تواند کشورها رو به سمت ورشکستگی کامل سوق دهد (۲). متاسفانه، در بسیاری از بیماران، سرطان تنها وقتی که قبلا به مرحله متاستاتیک رسیده است شناسایی می‌شود و بعد از این تنها یکی از پنج بیمار برای بیش از ۵ سال زنده خواهند ماند (۳,۴). ژن درمانی پتانسیل جدیدی در درمان سرطان و سایر بیماری‌های صعب العلاج معرفی کرده است. RNA مداخله‌گر (RNAi) یکی از جدیدترین فن‌آوری ژن درمانی است که خاموش سازی ژن را در مرحله ترجمه mRNA قادر می‌سازد. siRNA (RNA کوچک مداخله گر) درون کمپلکس خاموش سازی RNA-القاگر (RISC) گنجانده شده است، جایی که mRNA نشاندار شده با Argonaute2 (Ago2)، ترکیب کاتالیستی کمپلکس RISC، شکافته می‌شود که در پس-رونویسی باعث خاموشی ژن می‌شود. تعداد زیادی از مطالعات نشان می‌دهد که استراتژی خاموش سازی RNAi ممکن است به وسیله حساس سازی مجدد سلول‌ها به عامل شیمی درمانی یا رادیوتراپی باعث غلبه بر مقاومت در رادیو تراپی و شیمی درمانی شود و تکثیر سلول‌ها را سرکوب کند و باعث افزایش مرگ سلولی شود (۸–۵).

استفاده از siRNA برای درمان سرطان بر عوامل شیمی درمانی به خاطر مزایای متعدد ارجح است: ۱) siRNA در مرحله پس- ترجمه بیان ژن فعالیت می‌کند و با DNA تداخل ندارد، ۲) بازده بالاتر برای اثر گذاری بر روی ژن در مقایسه با دیگر فن آوری های آنتی سنس مبتنی بر اسید نوکلئیک انجام می‌دهد (۸)، و ۳) فن‌آوری siRNA بدون محدودیت در انتخاب هدف‌هایش است و می‌تواند بر اساس تنها سکانس mRNA طراحی گردد (۹). در حالی که عیب اصلی siRNA نیمه عمر پایین آن (بین چند دقیقه تا یک ساعت) در سرم است (۱۰). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که استفاده از دوز بالای siRNA ایمن نیست، پاسخ ایمنی فعال می‌کند و اثرات "خارج از هدف" (غیر اختصاصی) را اعمال می‌کند بنابراین به کارگیری دوز بالای siRNA برای جبران هدر رفت منطقی نیست (۱۱). بنابراین نیاز است حامل‌های رسانش ژن که جذب درون سلولی را افزایش می‌دهند استفاده شوند تا سبب فرار اندوزومی و مانع تجزیه زود siRNA شوند. حامل‌های غیر ویروسی ظرفیت محدودی برای بارگذاری ژن دارند، تولید دشوار در مقیاس بالا و از همه مهم‌تر، در بردارنده خطرات ایمنی زیاد وابسته به انکوژن بودن بالقوه و اثرات التهابی و ایمونوژنیک هستند که از به‌کار گیری مجدد آن‌ها جلوگیری می‌کند (۱۲). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، حامل‌های غیر ویروسی به عنوان یک جایگزین امیدوار کننده برای رسانش ژن ظهور کردند. در این میان، نانو ذرات لیپوزومی کاتیونی پتانسیل بالایی نشان می‌دهند. که اصلی‌ترین امتیاز آن‌ها امکان انتقال هم زمان ژن و دارو به بدن توسط تنها یک حامل و هم چنین عدم سمیت و ایمنی‌زایی آن‌هاست. siRNA می تواند وابسته به فعل و انفعلات الکتروستاتیک بین لیپوزوم‌های با شارژ مثبت و نوکلئیک اسید با شارژ منفی بر روی لیپوزوم بارگذاری شود. استفاده از فسفولیپید کاتیونی با سمیت پایین یک ایده مناسب برای بهبود راندمان بارگذاری siRNA می‌باشد.

در مطالعه حاضر، ما فرمولاسیون زیست سازگاری لیپوزومی سنتز کردیم و از نظر پتانسیل زتا، قطر ذرات و پایداری مشخصه کردیم. هم چنین میزان بارگذاری ژن بر روی وزیکول های لیپوزومی را بررسی کردیم. فرمولاسیون تهیه شده را از نظر زنده‌مانی و بازده ترانسفکشن و جذب سلولی بر روی سلولی سالم استخوان بررسی نموده‌ایم تا از این طریق هم زیست سازگاری فرمولاسیون و هم موفقیت حامل در انتقال به سلول را آزموده باشیم. پژوهش حاضر، فرآیند تجربی سنتز سامانه حاوی ژن، روش‌های مختلف

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

بررسی کیفیت و مشخصه یابی فرمولاسیون رسانش ژن را برای دیگر پژوهش‌گران معرفی می‌کند.

روش بررسی

مطالعه پژوهش یک مطالعه بنیادی-کاربردی است که با روش‌های تجربی-آزمایشگاهی به انجام رسیده است. مراحل صورت پذیرفته به شرح ذیل است.

مواد

فسفولیپید ۱و ۲ دی استرول-فسفاتیدیل اتانول آمین-متیل پلی اتیلن گلیکول کانژوگه شده ۲۰۰۰ (DSPE-mPEG 2000)، فسفولیپید دانه سویا همراه با فسفاتیدیل کولین ۷۵٪ (SPC80) از شرکت لیپوپید (Ludwigshafen, Germany) تهیه شد، کلسترل از شرکت سیگما –آلدریچ (St. Louis, MO, USA) و ان- (۱- (۲و ۳ دی اولیول اوکسی) پروپیل) ان، ان، ان- تری متیل آمونیوم متیل- سولفات (DOTAP) از آونتی پولار (Alabaster, AL) خریداری شد. برچسب فلورسنت (Dil) هم چنین از شرکت سیگما –آلدریچ (St. Louis, MO, USA) خریداری شد. رشته‌های siRNA از آزمایشگاه RNA مداخله‌گر کاربردی آنکوژنومیکس مرکز سرطان دانشگاه VUmc آمستردام، با استفاده از یک پلت فرم خودکار و پروتئین کیناز انسانی ON-TARGETplus از کتابخانه siRNA از دارماکون علمی ترمو فیشر (Lafayette, CO) تهیه شد (۱۳). siRNA رنگی از یوروجنتک (Liège, Belgium) بود. همه مواد دیگر مورد استفاده در این مطالعه از درجه تحلیلی و بدون خالص‌سازی بیشتر استفاده شدند. محیط کشت DMEM از شرکت گیبکو این ویترو جن (Karlsruhe, Germany) تهیه شد. ۴ و ۶ دیامیدینو-۲ فنیلیندول (DAPI)، محلول پارافرمالدئید ۴ درصد و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از موسسه علمی ترمو فیشر (Waltham, Massachusetts, USA) و سیگما –آلدریچ (St Louis, MO) بودند.

روش‌ها

آماده سازی لیپوزوم کاتیونی و لیپوپلکس siRNA

وزیکول‌های لیپوزومی با استفاده از نسبت مولی ۲۵:۳۰:۷۰ از SPC80: Cholesterol: DOTAP در حضور ۵ درصد DSPE-mPEG تهیه گردید. روش به‌کار گرفته شده روش به‌کار گرفته شده، بر اساس مطالعات پیشینمان، روش آبپوشانی لایه نازک است (۲). روش استفاده شده در ادامه به تفصیل معرفی می‌شود:

مرحله اول-اختلاط فاز لیپیدی و تشکیل فیلم نازک

فاز لیپیدی به کلرفرم اضافه و حل گردید. سپس فاز آلی محلول حاصل با استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوار در دمای حدود ۵۵ درجه برای کلروفرم و با دور تقریبی ۱۵۰ rpm، حذف گردید 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 می‌گیرد.

مرحله دوم- هیدراته کردن فیلم لیپیدی

فاز آبی برای هیدراته کردن فیلم نازک، PBS (نمک فسفات) با pH= ۷/۴ می‌باشد. برای تهیه این محلول، نمک فسفات تهیه شده در آب دیونیزه حل شد. ۳ سی سی از بافر PBS (نمک فسفات) به فیلم نازک اضافه شد و به‌صورت سونیکیت حمامی و هم زمان چرخش روتاری به مدت یک ساعت و دور تقریبی ۱۵۰ rpmو در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درهمان دقایق اول مایع شیری رنگ تشکیل می شود که همان لیپوزوم‌های MLV می باشد.

مرحله سوم- کاهش سایز

برای کاهش اندازه لیپوزوم های MLV و تشکیل SUV از روش سونیکاسیون استفاده گردید. برای کاهش اندازه لیپوزوم‌های MLV و تشکیل SUV از روش سونیکاسیون استفاده گردید، پروب دستگاه سونیکاسیون در داخل محلول کلوئیدی لیپوزوم ها که داخل ظرف یخ بودند، قرار داده شد.

مرحله چهارم- تهیه کمپلکس لیپوزوم و siRNA

توالی siRNA نشان دار شده برای MAPK8IcKP1/JIP1 به این صورت است: رشته سنس (کد کننده): 5'-GUA-CGA-GGC-CUA-CAA-CAU-G99-3-3' و رشته آنتی سنس (غیر کد کننده): 5'- CAU-GUU-GUA-GGC-CUC-GUA-C99-3' می باشد. به‌منظور بارگذاری و تهیه کمپلکس لیپوزوم و ژن، بعد از آماده شدن لیپوزوم‌های SUV، براساس نسبت‌های

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

متفاوت از siRNA به لیپوزوم (۱-۱۶۰ میلی‌گرم لیپید بر میکروگرم siRNA) در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. برای افزایش پایداری و یکنواختی اندازه لیپوزوم ها، با دستگاه اکسترودر ۵ مرتبه فیلتر گردید.

مشخصه‌یابی فیزیکو شیمایی کمپلکس

تعیین سایز و اندازه

برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری، ابتدا با آب دو بار تقطیر رقیق شدند. غلظت نهایی لیپوزوم‌ها برای سنجش اندازه در حدود ۰/۰۲۵ mg/ml بود. در این غلظت، اندازه لیپوزوم‌ها متأثر از غلظت نبود. در غلظت‌های بالاتر و یا خیلی پایین‌تر اندازه لیپوزوم‌ها دقیق محاسبه نمی‌شد و خطا ایجاد می‌کرد به همین دلیل رقیق سازی صورت گرفت. پتانسیل سطحی زتا، قطر هیدرودینامیکی و شاخص پراکندگی (PDI) به وسیله افتراق نور دینامیکی (DLS) بر روی دستگاه Brookhaven Corp (USA) در دمای اتاق، رقیق شده با آب دیونیزه تعیین شد. همه اندازه‌گیری‌ها چهار مرتبه صورت گرفت.

بهینه سازی بارگذاری siRNA با ژل آگارز الکتروفورز

غلظت‌های مختلف siRNA لیپوزومه (نمونه لیپوپلکس) برای ژل آگارز الکتروفورز (۲درصد) اتیدیوم برماید (۳۰ دقیقه الکتروفورز در ۸۰ ولت) برای تعیین میزان بارگذاری siRNA با لیپوزوم کاتیونی به‌کار گرفته شد. به‌طور خلاصه، ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون با ۱۵ میکرولیتر لودینگ بافرDNA ۴x (Biolabs) ترکیب شد. نسبت‌های غلظتی مختلف از siRNA و لیپوزوم آنالیز شد تا بیش‌ترین توانایی بارگذاری siRNA در لیپوزوم تعیین شود. لدر DNA (Biolabs) به‌عنوان مارکر استفاده شد. تصاویر بعد از در معرض قرار دادن با UV در سیستم Gel-doc (UVP, Cambridge, UK) به دست آمد.

پایداری فیزیکی وزیکول‌ها و siRNA

توانایی ساختار siRNA لیپوزومی برای نگه داشتن ژن محصور شده به مدت ۳ ماه در شرایط ۴ °C با استفاده از تعیین میزان نشت siRNA از کمپلکس siRNA لیپوزومه به وسیله الکتروفورز ارزیابی شد.

بررسی ماندگاری سلولی و زنده‌مانی سلولی

سلول‌های سالم استخوانی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی سیلین- استرپتومایسین (Gibco) در دمای ۳۷ °C و ۵ درصد کربن دی اکسید در انکوباتور مرطوب رشد داده شدند. میزان سلول سالم استخوانی زنده‌مانده به وسیله آزمون MTT تعیین شد که در آن سلول‌ها در تماس مستقیم با محلول تیمار بودند. سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند تا سلول‌ها به کف پلیت به چسبند. سپس محیط کشت با محیط کشت تازه (کنترل)، کمپلکس لیپوزوم siRNA، siRNA آزاد و غلظت‌های مختلف لیپوزوم‌های خالی تهیه شده به مدت ۴۸ ساعت عوض شد. پس از آن، سلول‌ها با PBS شسته شدند و MTT رقیق شده با محلول PBS به هر خانه اضافه شد. به طوری که سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با MTT در تماس باشند تا اجازه داده شود کریستال‌ها فورمازان تولید شود. به دنبال آن ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفواکسید برای حل کردن کریستال‌ها اضافه شد. سمیت از مقدار دانسیته نوری به وسیله میکروپلیت خوان SynergyTMHT (Biotek Instruments Inc.) با اندازه‌گیری شد.

پروتکل ترنسفکشن سلولی لیپوزوم القا شده با siRNA

رده سلولی سالم استخوانی برای مطالعه ترنسفکشن استفاده شد. سلول‌ها در پلیت ۶-خانه‌ای (۵×۱۰^{۵} سلول در هر خانه) کشت داده شدند و در محیط کشت سلولی DMEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C تحت ۵ درصد کربن دی اکسید در انکوباتور مرطوب رشد کردند. سپس محیط کشت DMEM تعویض شد و سلول‌ها با FAM-siRNA لیپوزومه شده (۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) رقیق شده با محیط کشت تیمار شدند. و به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. سلول‌ها سه بار با بافر PBS شسته شدند و با محلول پارافرمالدئید ثابت شدند. محلول DAPI (۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه به‌منظور رنگ‌آمیزی هسته سلول

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

به‌کار گرفته شد. راندمان ترنسفکشن سلولی siRNA با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها سه بار تکرار صورت گرفتند. برای مقایسه گروه‌ها از نظر مقادیر عددی، آزمون ANOVA یک طرفه به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism ورژن ۷ استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه تهران تایید شده است.

نتایج

مشخصه یابی فیزیکوشیمایی کمپلکس

وزیکول‌های لیپوزومی با SPC80، کلسترل، DOTAP و در حضور DSPE-mPEG تهیه شدند و مشخصه‌یابی گردیدند. (جدول ۱).

سایز ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی به ترتیب ۹۸/۱ نانومتر، ۲۴/۵۵+ میلی ولت و ۰/۲۹۷ است. در همه موارد، شاخص پراکندگی کمتر از ۰/۳ است که نشان دهنده اگلومره نبودن است و پتانسیل زتا مقدار مثبت دارد که با انکوباسیون با siRNA کاهش کرده است (۱۴). پگیلاسیون باعث هم چنین 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. بنابراین، پگیلاسیون، پتانسیل زتا را بهبود داده است و ذرات را با تجمع کم حفظ کرده است. انکوبه کردن siRNA با لیپوزوم، اندازه ذرات را به میزان ۲۸ درصد به طور معناداری ($p< 0.05$) افزایش داده است و پتانسیل زتا را بالای ۴۵ درصد کاهش داده است.

جدول ۱: مشخصه‌یابی لیپوپلکس آماده شده

فرمولاسیون	پتانسیل زتا(mv)	سایز (nm)	شاخص پراکندگی
لیپوزوم خالی	+۲۴/۵۵ ±۰/۳۷	۹۸/۱±۱ /۵	۰/۲۹۷
لیپوزوم + siRNA	+۱۳/۳۷ ±۰/۵۶	۱۲۵/۵±۱/۲	۰/۲۹۲

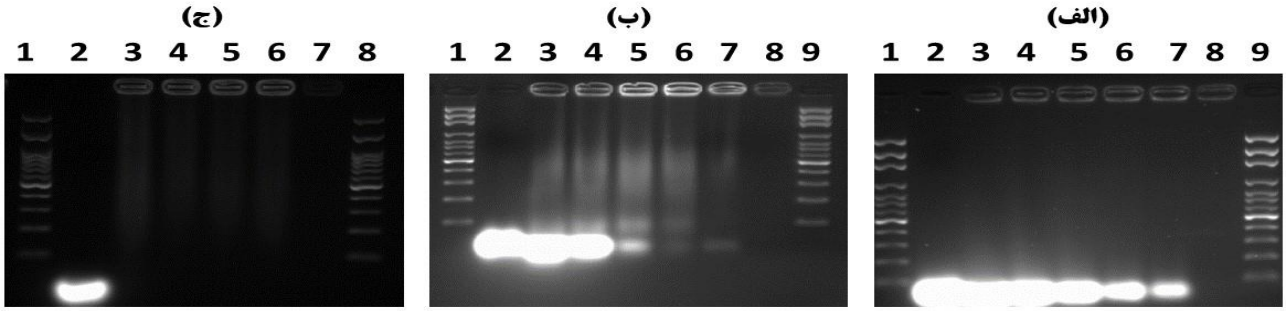
بهینه سازی بارگذاری *siRNA* با ژل آگارز الکتروفورز

همان طور که دیده می‌شود بهینه سازی غلظت siRNA بارگذاری شده بر روی لیپوزوم در محدوده برای ۱-۱۶۰ میلی‌گرم از لیپید بر ۱ میکرو گرم siRNA صورت گرفته است. همان طور که در شکل ۱-الف دیده می‌شود در لیپوپلکس در تمامی غلظت‌ها در طول ژل حرکت کرده است در شکل۱- ب غلظت siRNA را کاهش دادیم و این بار مشاهده گردید که غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم لیپید بر میکرو گرم siRNA تا حدودی در چاهک مانده است و حرکتی نکرده است.

بنابراین این بار مجدداً غلظت را کاهش داده و نهایتاً در شکل ۱-ج مشاهده می‌شود که غلظت ۱۳۰ میلی‌گرم لیپید بر میکروگرم siRNA بارگذاری شده بیش‌ترین غلظتی است که به تمامی در چاهک مانده است و هیچ گونه حرکتی در طول ژل نداشته است. علاوه بر شارژ مثبت لیپوزوم کاتیونی و ایجاد پیوند فیزیکی بین ژن و لیپوزوم، احتمالاً حضور پلی اتیلن گلیکول در ساختار لیپوزوم هم تا حدودی در عدم حرکت siRNA در طول ژل تاثیرگذار بوده است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

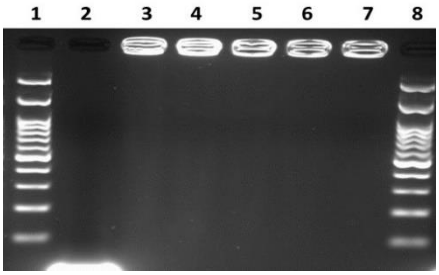
[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]



شکل ۱: تعیین و بهینه‌سازی بارگذاری siRNA به وسیله ژل آگارز الکتروفورز برای تعیین بیش‌ترین ضریب موثر لیپوزوم (میلی‌گرم):siRNA (میکروگرم) (الف): مرحله اول بهینه‌سازی (از چپ به راست): ردیف ۱ لدر DNA، ردیف ۲ siRNA آزاد، ردیف ۳ لیپوپلکس (۱/۱ μg/mg)، ردیف ۴ لیپوپلکس (μg/mg ۲۰/۱)، ردیف ۵ لیپوپلکس (μg/mg ۳۰/۱)، ردیف ۶ لیپوپلکس (μg/mg ۴۰/۱)، ردیف ۷ لیپوپلکس (μg/mg ۵۰/۱)، ردیف ۸ لیپوزوم خالی و ردیف ۹ لدر DNA. (ب): مرحله دوم بهینه‌سازی (از چپ به راست): ردیف ۱ لدر DNA، ردیف ۲ siRNA آزاد، ردیف ۳ لیپوپلکس (۱/۱ μg/mg)، ردیف ۴ لیپوپلکس (μg/mg ۳۰/۱)، ردیف ۵ لیپوپلکس (μg/mg ۶۰/۱)، ردیف ۶ لیپوپلکس (μg/mg ۹۰/۱)، ردیف ۷ لیپوپلکس (μg/mg ۱۲۰/۱) و ردیف ۸ لیپوزوم و ردیف ۹ لدر DNA. (ج): مرحله سوم بهینه‌سازی (از چپ به راست): ردیف ۱ لدر DNA، ردیف ۲ siRNA آزاد، ردیف ۳ لیپوپلکس (μg/mg ۱۳۰/۱)، ردیف ۴ لیپوپلکس (μg/mg ۱۴۰/۱)، ردیف ۵ لیپوپلکس (μg/mg ۱۵۰/۱)، ردیف ۶ لیپوپلکس (μg/mg ۱۶۰/۱) و ردیف ۷ لیپوزوم و ردیف ۸ لدر DNA.

پایداری فیزیکی وزیکول‌ها و *siRNA*

به منظور تحلیل اثر نگهداری بلند مدت بر روی نشت siRNA از لیپوپلکس siRNA، کمپلکس در دمای ۴ °C به مدت ۳ ماه نگهداری شد و به وسیله ژل الکتروفورز همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده، تایید شدند. همان‌طور که از نتایج بر می‌آید سامانه سنتز شده پس از ۳ ماه هم چنان پایدار است و نشت siRNA توسط ژل الکتروفورز مشاهده نمی‌شود



شکل ۲: ژل آگارز الکتروفورز siRNA آزاد و siRNA بارگذاری شده بر روی وزیکول‌های لیپوزومی (μg/mg ۱۳۰) برای آزمون پایداری ۳ ماهه در دمای ۴ °C (از چپ به راست): ردیف ۱ لدر DNA، ردیف ۲ siRNA آزاد، ردیف ۳ لیپوپلکس- بلافاصله پس از آماده سازی، ردیف ۴ لیپوپلکس- پس از یک هفته، ردیف ۵ لیپوپلکس- پس از دو هفته، ردیف ۶ لیپوپلکس- پس از چهار هفته، ردیف ۷ لیپوپلکس- پس از سه ماه، ردیف ۸ لدر DNA.

زنده‌مانی سلول

همان طور که در شکل۳ نشان داده شده است، زنده‌مانی سلولی بعد از در معرض قرار دادن لیپوزوم خالی، لیپوزوم خالی سمیت کمی در همه غلظت‌ها دارد. این نتایج مطالعات پیشین را تایید می‌کند. PEG زنجیره‌ها را متصل می‌کند که باعث بهبود ترنسفکشن لیپوزوم‌ها می‌شود (۱۵)

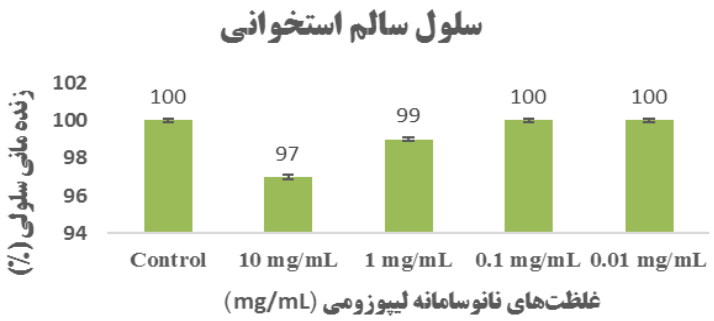
ترنسفکشن درون سلولی لیپوزوم –siRNA

در شکل ۴، ترنسفکشن و تعیین مکان لیپوپلکس در محیط سلول‌های سالم استخوانی با بزرگ‌نمایی 100x نشان داده شده است. ترنسفکشن سلولی به وسیله رسانش لیپوزومی siRNA موفقیت‌آمیز می‌باشد، آزمون میکروسکوپی نشان داد بیشتر siRNA تجمع یافته در سیتوپلاسم می‌باشد.

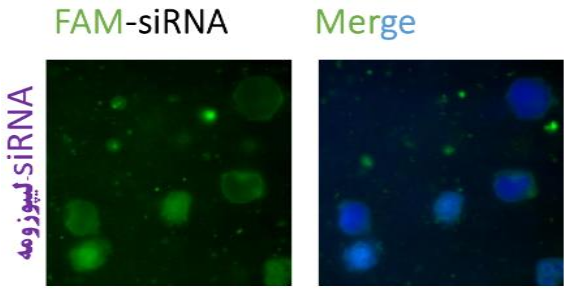
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

شکل ۵، رسانش موفقیت‌آمیز وزیکول‌های لیپوزومی به سلول را نشان داده است. با در نظر گرفتن نتایج، ما می‌توانیم توضیح دهیم که لیپوزوم به طور موفقیت‌آمیزی به سلول‌های سالم استخوان رسیده است و siRNA در سیتوپلاسم اطراف هسته تجمع کرده است. هم چنین فلورسانس سبز مشاهده شده اطراف هسته در شکل ۴ احتمالاً مربوط به لیپوپلکس است و نه siRNA که قبلاً از لیپوزوم رها شده است.

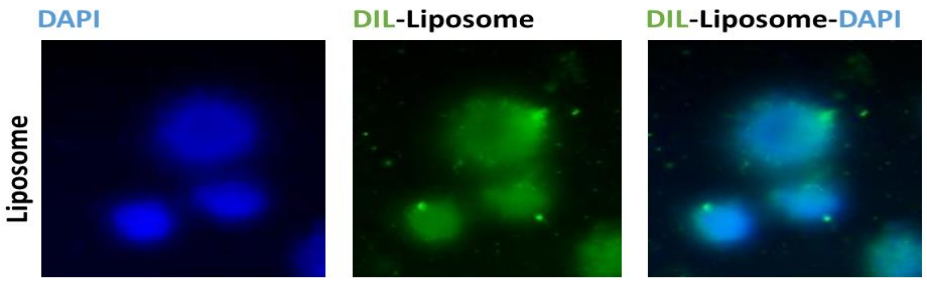
گرچه در پژوهش های پیشین انتقال موفق ژن به سلول‌ها را نشان داده است ولی مشخص نشده است که انتقال ژن به سلول مربوط به ژنی است که پیشتر در تماس با محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رها شده است و یا مربوط به انتقال سامانه حاوی ژن است (۱۶). در شکل ۵ پژوهش حاضر روش انتقال ژن به سلول تعیین شده است.



شکل ۳: درصد زنده‌مانی سلول‌های سالم استخوانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف لیپوزوم خالی (غلظت‌های ۱۰ – ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر): افزایش غلظت تاثیر معناداری بر روی تغییر سمیت لیپوزوم خالی نداشته است ($p> 0.05$)



شکل ۴: ترنسفکشن سلولی siRNA لیپوزومه به سلول‌های سالم استخوانی. سلول‌ها با لیپوزوم بارگذاری شده با siRNA تیمار شد. هسته سلول با رنگ DAPI رنگ آمیزی شد. siRNA لیپوزومه در سیتوپلاسم تجمع یافته است.



شکل ۵: ترنسفکشن سلولی لیپوزوم خالی. وزیکول‌های لیپوزومی با افزودن ۰/۱ درصد مول Dil دارای خاصیت فلورسانس شدند و حضور لیپوزوم خالی اطراف هسته سلول شناسایی شد. براساس تصاویر وزیکول‌ها با موفقیت وارد هسته سلول شده‌اند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

بحث

همان گونه که انتظار می‌رود حرکت siRNA بارگذاری شده بر روی لیپوزوم در طول ژل آگارز الکتروفورز کمتر از siRNA آزاد بوده است (شکل ۱). رمضانی و همکاران در سال ۱۳۹۱، در نسبت ۲۰۰ میکروگرم ژن بر یک میلی‌گرم لیپید (معادل ۵ میکروگرم لیپید بر ۱ میکروگرم ژن) توانستند با موفقیت ژن را بارگذاری کنند. ذرات تهیه شده آنیونی بوده و سایز ذرات از ۹۳- ۱۴۹ نانومتر متغیر است. گرچه در انکپسولیشن ژن موفق‌تر بوده‌اند ولی به دلیل بزرگ بودن سایز ذرات در صورت بارگذاری دارو در فرمولاسیون و یا ایجاد عامل هدفمندی باعث هرچه بزرگ‌تر شدن سایز می‌شود که استفاده از فرمولاسیون در کاربرد درمانی را با محدودیت روبرو می‌سازد (۱۶). در پژوهش دیگری سایز ذرات در حدود ۱۳۵ نانومتر است که پس از لود ژن به ۳۱۵ نانومتر می‌رسد و براساس اختلاف پتانسیل زتا قبل و بعد از بارگذاری در می‌یابیم که در بارگذاری ژن موفق‌تر عمل کرده‌اند. احتمالاً دلیل این اتفاق سایز بزرگ‌تر وزیکول‌ها است که فضای بیشتری برای لود ژن فراهم کرده است. هم چنین امکان لود ژن بین دو لایه وزیکول‌های نیوزومی منجر به بهبود بارگذاری ژن شده است (۱۵). اصلاح سطحی با PEG، هم چنین زیست سازگاری بیومواد و پایداری درون تن اولیگونوکلئوئیدها را بهبود می‌بخشد (۱۷،۱۸). هم چنین PEG یک سپر در مقابل شکاف لیپوپلکس کاتیونی توسط سیستم ماکروفاژی و حذف شدن از محیط مائی بدن فراهم می‌کند (۱۹،۲۰). طول زنجیره PEG باید برای غلبه بر مشکلات مربوط داخل شدن و هم چنین فرار موانع مربوط به فرار اندوزومی بهینه شود تا سپر پلی اتیلن گلیکولی ایجاد شود. مقایسه حیات سلولی فرمولاسیون خالی با پژوهش های مشابه، گواه زیست سازگاری بیشتر فرمولاسیون حاضر در مقایسه با پژوهش‌های مشابه (لیپوفکتامین و ساختار حاوی فسفاتیدیل کولین DMPC) یافت می‌شود که احتمالا به دلیل پگیله بودن ساختار می‌باشد که امکان توسعه فرمولاسیون دارویی را فراهم می‌سازد (۱۶). در حال حاضر هیچ پژوهشی مبنی بر انتقال موفق siRNA به سلول‌های سرطان استخوان وجود ندارد. گرچه پیش‌تر انتقال موفق siRNA به سلول‌های سرطانی کولون و انتقال اولیگونوکلئوتید به سلول‌های فیبروبلاست میمون نشان داده شده بود (۱۵،۲۱،۲۲).

نتیجه گیری

ناپایداری فیزیولوژیکی و تجزیه موانع اصلی برای کاربرد موفقیت آمیز siRNA در زمینه درمان است. این مساله اهمیت اساسی دارد که بازده siRNA به وسیله طراحی سیستم رسانش بهبود یافته، افزایش یابد. برای رویارویی با این مساله نسبت به طراحی فرمول لیپوزومی حاوی پلی‌اتیلن‌گلیکول و مشخصه‌یابی آن اقدام شد. فرمولاسیون لیپوزومی از جهت پارامترهای پایداری ۳ ماهه، سایز، پتانسیل زتا و راندمان بارگذاری ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، قادر به تولید لیپوپلکس siRNA گردیده‌ایم که به طور موثری بارگذاری شده و اگلومره نشده است. نگاه‌داری فرمولاسیون در دمای $^{\circ}C$ ۴ به مدت ۳ ماه بدون نشت اساسی siRNA بوده است. علاوه بر افزایش رسانش درون سلولی siRNA؛ در مقابل سلول‌های سالم نیز زیست‌سازگاری مناسبی را از خود نشان داده است. در نتیجه، فرمولاسیون لیپوزومی پگیله پتانسیل بالایی برای رسانش سیستماتیک siRNA داشته است و می‌تواند پایداری درون-تن siRNA آزاد و فرمولاسیون لیپوزومی را بهبود بخشید.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان‌نامه خانم بی‌بی فاطمه حقیرالسادات دانشجوی رشته دکتری نانوبیوتکنولوژی است. شایسته است از همکاری گران‌قدر خانم دکتر فاطمه حکیمیان، پژوهش‌گران موسسه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران و هم چنین همکاری علمی سرکار خانم دکتر فاطمه منتظری از مرکز سقط مکرر، موسسه علوم تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهیدصدوقی یزد در طول این پروژه سپاس‌گزاری نماییم. لازم به توضیح آن‌که منابع مالی این مطالعه توسط نویسنده اول تأمین گردیده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

References:

1- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. ***Global Cancer Statistics, 2012***. CA Cancer J Clin 2015; 65(2): 87-108.

2- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. ***New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity.*** Chem Biol Drug Design 2017; 90(3): 368-79.

3- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. ***Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008.*** International J cancer 2013;132(5):1133-45.

4- Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, et al. ***A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. Gastroenterology***. Gastroenterology 2006; 131(3): 830-40.

5- Xu C, Wang J. ***Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy***. Asian J Pharmaceutical Sci Elsevier 2015;10(1):1-12.

6- Fateme Haghiralsadat, Ghasem Amoabediny, Behrouz Zandieh-doulabi, Tymour Forouzanfar MNH. ***Co-Delivery of Doxorubicin and MAP-kinases siRNA by novel targeting pegylated cationic liposomes for overcome osteosarcoma multidrug-resistant***. Int J Nanomedicine 2018; 13: 3853-3866. [Persian]

7- 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 Advances***. RSC 2017; 7(48): 30008-19.

8- Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. ***Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo.*** Biochemical Biophysical Research Communications. Elsevier 2002; 296(4):1000-4.

9- Gavrilov K, Saltzman WM. ***Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. The Yale journal of biology and medicine***. Yale J Biol Med 2012; 85(2):187-200.

10- Behlke MA. ***Progress towards in vivo use of siRNAs. Molecular Therapy***. Nature Publishing Group 2006;13(4): 644-70.

11- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. ***Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA***. Nat biotechnol. 2005; 23(4): 457-62.

12- Gao K, Huang L. ***Nonviral methods for siRNA delivery***. Mol pharm 2009; 6(3): 651-58.

13- De Boer JP, van Egmond PW, Helder MN, de Menezes RX, Cleton-Jansen A-M, Beliën JAM, et al. ***Targeting JNK-interacting protein 1 (JIP1) sensitises osteosarcoma to doxorubicin***. Oncotarget 2012; 3(10): 1169-81.

14- Bao Y, Jin Y, Chivukula P, Zhang J, Liu Y, Liu J, et al. ***Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

siRNA/lipid nanoparticle complexes. Pharmaceutical Res. Springer 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 Material Sci: Materials in Med 2008; 19(2): 607-14.

16- Sadeghizadeh M, Behmanesh M. ***Gene transfer to eukaryotic cells by a virus-like liposomal nano-system***. J Police Med. J Police Med 2012;1(2):71-80.

17- 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.

18- Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'emanuele A. ***The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers.*** Int J pharm 2003; 252(1): 263-6.

19- Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, Wagner E. ***Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes***. J Control Release 2003; 91(1):173-81.

20- Merdan T, Kunath K, Petersen H, Bakowsky U, Voigt KH, Kopecek J, et al. ***PEGylation of poly (ethylene imine) affects stability of complexes with plasmid DNA under in vivo conditions in a dose-dependent manner after intravenous injection into mice***. Bioconjug Chem 2005;16(4):785-92.

21- Fathi M, Taghikhani M, Ghannadi Maragheh M, Yavari K. ***Lutetium labeled-siRNA Delivery into Colon Cancer Cells Using Liposomes: A Comparative Study***. New Cellular and Molecular Biotechnology J. NCMBJ 2012; 2(6): 17-25.

22- Yavari K, Taghikhani M, Maragheh MG, Mesbah-Namin SA, Babaei MH. ***Downregulation of IGF-IR expression by RNAi inhibits proliferation and enhances chemosensitization of human colon cancer cells. International journal of colorectal disease***. Springer 2010; 25(1): 9-16.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 12 | Mar 2019

Received: 17 Jan 2017
Accepted: 9 Jal 2017

Formulation of a therapeutic cationic liposome-siRNA complex for development to fight osteosarcoma

Bibi Fatemeh Haghiralsadat[1], Ghasem Amoabediny[*2], Samira Naderinezhad[3], Farzane Morteza-Ratki[4], Behrouz Zandieh Doulabi[5]

Original Article

Introdution: Cationic liposomes have been presented for gene delivery as an alternative vector instead of viral vectors. A major challenge associated with siRNA delivery is the instability of liposomes, which is still a serious problem. The aim of this study was to provide an appropriate formulation to overcome this instability.

Methods: In the present study (Scientific-Fundamental, Experimental-Laboratory Study), liposomal formulation containing soy phosphatidylcholine, cationic DOTAP, cholesterol and polyethylene glycole was synthesized by thin-film hydration method and the siRNA were loaded on liposomes through incubation. In the following; the optimization of siRNA loading was on the agenda. Then the parameters related to size, zeta potential, polydispersity index and lon-term stability of siRNA-liposomes complex were reported. The Data were analyzed by GraphPad Prism version 7 Software. All data were repeated three times and reported as mean±standard deviation.

Results: In this study we were able to produce siRNA lipoplex with high loading efficiency of siRNA. The produced nanoparticles did not agglomerate and were stable at 4 ^{o}C for 3 months. This nanosystem could successfully deliver siRNA to normal bone cells. Studies have shown that the blank system (no gene) had no toxicity.

Conclusion: The prepared PEGylated liposomes have a great potential for delivery of siRNA to bone cells.

Keywords: SiRNA lipoplex, Physico-chemical characterization, Intracellular uptake, Cellular viability.

Citation: Haghiralsadat BIF, Amoabediny GH, Naderinezhad S, Morteza-Ratki F, Zandieh Doulabi B. **Formulation of a therapeutic cationic liposome-siRNA complex for development to fight osteosarcoma.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(12): 1027-37.

[1]Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
[2]Department of life science engineering, Faculty of New sciences & technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
[4]Department of Molecular Genetics, Yazd University, Yazd, Iran
[5]Department of Oral Cell Biology and Functional Anatomy, Vrije University, Netherlands.
Corresponding Author: Department of Nano Biotechnology, Research center for new technologies in life science engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09132507158, **email:** amoabediny@ut.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i12.660]