

Original Article

The Effect of Synthesis of Pegylated Nanoliposome Containing DNAi on Reduction of BCL-2 Gene Expression in DLCL2 Cell Line

Farahnaz Boozari Saravani¹, Farzaneh Tafvizi^{1*}, Mahmoud Reza Jaafari²

¹Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.

²Department of Pharmaceutics, Nano Technology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

*Corresponding Author:
Farzaneh Tafvizi;
Department of Biology,
Parand Branch, Islamic Azad
University, Parand, Iran.

Email:
tafvizi@pia.ac.ir

Received: 28 May, 2018
Accepted: 19 Aug, 2018

Abstract

Background and Objectives: Non-Hodgkin lymphoma is one of the common cancers that originates from lymphatic cells. The objective of this study was to assess the effectiveness of the DNAi containing pegylated nanoliposome (antisense drug) on decrease of BCL-2 gene expression.

Methods: In this study, to prepare DNAi containing pegylated nanoliposome, 3 formulations were prepared with 5, 10, and 15% combinations of PEG 2000 with certain ratios of phospholipid and cholesterol. After purification by a Zetasizer, the mean diameter of nanoliposome was measured. Drug efficacy was determined based on the standard curve of the drug. Cytotoxicity effect of the product was determined by treatment with 0.2, 0.5, and 0.8 µg/µl concentrations of each formulation in triplicate in vitro using MTT method. Then, BCL-2 gene expression was analyzed in DLCL2 cell line. Data were analyzed using one way ANOVA.

Results: The mean diameter of the DNAi containing pegylated nanoliposome was estimated to be 117 nm. The mean efficacy of the drug was 67%. The MTT assay on DLCL2 cell line indicated that the highest amount of cell growth inhibition was observed in treatment with pegylated nanoliposomes 10% (PEG10) and the concentration of 0.5 µg/µl. Also, BCL-2 gene expression was significantly decreased in DLCL2 cell line in all concentrations of PEG10 in 48 hours, and the lowest level of BCL-2 gene expression was observed in 0.5 µg/µl concentration.

Conclusion: PEG10 nanoliposome formulation has higher efficacy in drug preservation and release compared to other two synthesized liposomes. It seems that the synthesized nanoliposome has the potential for using in pharmaceutical industries.

Keywords: Nano; Liposomes; Genes, bcl-2; Lymphoma, Non-Hodgkin.

تأثیر سنتز نانولیپوزوم پگیده حاوی DNAi در کاهش بیان ژن BCL-2 رده سلولی DLCL2

فرحناز بوذری سراوانی^۱، فرزانه تفویضی^{۱*}، محمود رضا جعفری^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران.

^۲گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات نانو فناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لنفوم غیر هوچکین از بیماری‌های شایع با منشأ سلول‌های لنفاوی می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی میزان اثرگذاری نانولیپوزوم‌های پگیده حاوی DNAi (داروی آنتی‌سنس) بر کاهش میزان بیان ژن BCL-2 انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، برای تهیه نانولیپوزوم پگیده حاوی DNAi، سه فرمولاسیون با ترکیب‌های ۵، ۱۰ و ۱۵٪ از PEG 2000 و نسبت‌های مشخصی از فسفولیپیدها و کلسترول تهیه شد. پس از خالص‌سازی با استفاده از دستگاه زتاسایزر، میانگین قطر نانولیپوزوم محاسبه گردید. بازده دربرگیری دارو براساس منحنی استاندارد دارو تعیین شد. اثر سایتوتوکسیسیته محصول در اثر تیمار با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر از هر کدام فرمولاسیون‌ها به صورت سه بار تکرار در محیط in vitro با روش MTT ارزیابی شد، سپس بیان ژن BCL-2 در رده سلولی DLCL2 بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین قطر نانولیپوزوم پگیده حاوی DNAi، ۱۱۷ نانومتر تخمین زده شد و بازده دربرگیری دارو، ۶۷٪ بود. نتایج حاصل از تست MTT بر روی رده سلولی DLCL2 نشان داد بیشترین میزان مهار رشد سلولی مربوط به تیمار با نانولیپوزوم‌های پگیده ۱۰٪ و غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر بوده است. همچنین کاهش معنی‌داری در بیان ژن BCL-2 در رده سلولی DLCL2 تیمار شده با نانولیپوزوم‌های پگیده ۱۰٪ در تمامی غلظت‌ها در ۴۸ ساعت مشاهده گردید که بیشترین کاهش بیان ژن در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر بود.

نتیجه‌گیری: فرمولاسیون نانولیپوزوم پگیده ۱۰٪، کارایی بالاتری جهت حفظ و رهایش دارو نسبت به دولیپوزوم دیگر سنتز شده دارد. به نظر می‌رسد نانولیپوزوم سنتز شده نیز پتانسیل استفاده در صنایع داروسازی را دارد.

کلید واژه‌ها: نانو؛ لیپوزوم؛ ژن بی سی ال-۲؛ لنفوم غیر هوچکین.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

فرزانه تفویضی؛ گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

tafvizi@piaou.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۸

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Boozari Saravani F, Tafvizi F, Jaafari MR. The effect of synthesis of pegylated nanoliposome containing DNAi on reduction of BCL-2 gene expression in DLCL2 Cell Line. Qom Univ Med Sci J 2018;12(10):16-26. [Full Text in Persian]

مقدمه

لنفوم‌ها (Lymphoma)، گروهی از بیماری‌های بدخیم با منشأ سلول‌های لنفاوی (لنفوسیت‌ها) هستند که سومین تومور شایع اطفال، همچنین پنجمین تومور شایع در بالغین را تشکیل می‌دهند (۱). لنفوم غیروچکین نوعی سرطان است که سلول‌های دستگاه لنفاوی، حالتی غیرطبیعی به خود می‌گیرند؛ به‌طوری‌که بدون هیچ مهاری رشد کرده و تقسیم می‌شوند (۲). یکی از بزرگترین معضلات حوزه سلامت و بیشترین عامل مرگ‌ومیر در سراسر جهان، سرطان‌ها هستند که سالانه بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید از آن گزارش می‌شود. لذا با توجه به میزان مرگ‌ومیر بالای ناشی از سرطان‌ها، یافتن روش‌های درمانی نوین و هدفمند دارورسانی از مقوله‌های مهم پزشکی به شمار می‌رود (۳، ۴).

به‌منظور افزایش شاخص درمانی، افزایش غلظت دارو در سلول‌های توموری و کاهش در معرض قرار گرفتن بافت‌های طبیعی که نتیجه آن کاهش عوارض جانبی است، توسعه سیستم‌های هوشمند دارورسانی رو به افزایش است (۵).

از نانولیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی استفاده می‌شود که دارو داخل یک غشا قرار می‌گیرد. لیپوزوم‌ها از یک یا چند لایه چربی متحدالمرکز تشکیل شده‌اند که متشکل از محفظه‌های چربی و آبی هستند. لیپوزوم‌ها دارو را در مقابل تخریب حفاظت کرده و سبب آزادسازی دارو در سلول هدف می‌شوند که در نهایت، بیمار را در مقابل عوارض جانبی دارو محافظت می‌کنند (۶، ۷). این نانوحامل‌ها با وجود کارایی بالایی، در بدن از پایداری خوبی برخوردار نیستند (۸، ۹).

پلی‌اتیلن گلیکول ماده‌ای است که خواص مناسبی ازجمله انحلال‌پذیری کامل در آب، قابلیت حل کردن بسیاری از مواد، پایداری شیمیایی بسیار خوب، سازگاری گسترده با سایر مواد، خنثی بودن و سمیت ناچیز دارد (۱۰). بنابراین، استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول به پایداری بیشتر دارو در بدن کمک می‌کند (۱۱).

ماکرومولکول‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک، روزه جدیدی را برای توسعه درمان‌های طیف وسیعی از بیماری‌های ذاتی و اکتسابی گشوده‌اند. به‌طور کلی، داروها براساس توالی ژنتیکی ژن هدف، طراحی می‌شوند. هدف ژن‌درمانی، درمان بیماری‌ها با استفاده از ژن‌ها و اصلاح بیماری در سطح مولکول‌های DNA است که در

نتیجه بایستی به هسته سلول‌های مورد نظر منتقل شوند (۱۲). اولیگونوکلوئیدهای آنتی‌سنس (DNA تک‌ رشته‌ای کوتاه سنتزی که عملکرد آن از طریق جفت شدن به ترادف مکمل در ژن موردنظر آن است)، نویدی برای درمان بیماری‌های متعدد ناشی از بیان ژن‌های جهش‌یافته و یا عدم بیان ژن‌های طبیعی هستند. آنجا که اکثر اولیگونوکلوئیدها آنیونی هستند، به‌راحتی و به اندازه لازم از دیواره غشا عبور نمی‌کنند؛ بنابراین انواع مختلف سامانه‌های حامل معرفی شده‌اند که با اعمال تغییرات و اصلاحات مختلف، جذب و توزیع آن‌ها در سطح بافت‌ها و سلول افزایش می‌یابد. همچنین DNAi، داروی الیگونوکلوئیدی است که مستقیماً خود ژن (مولکول DNA) را هدف می‌گیرد؛ از این رو این فناوری DNAi را به‌معنی مداخله کردن با مولکول ژن، نامگذاری کرده‌اند. این دسته از الیگونوکلوئیدها، تک‌ رشته‌ای بوده و به‌راحتی در آب حل می‌شوند و در حلال‌های آلی مانند الکل‌ها نامحلول بوده و رسوب می‌کنند. DNAi دارای پایداری نسبتاً خوبی بوده و در محیط‌های آبی و در pH بیولوژیکی پایدار است (۱۳).

درمان انواع سرطان‌ها ازجمله لنفوم غیروچکین با مهارکننده‌های BCL2 می‌تواند دیدگاه مهمی را درخصوص راهبردهای ضدسرطان براساس آپوپتوز مطرح کند. با توجه به اینکه بیان ژن BCL-2 در سلول‌های رده سرطان غیروچکین DLCL2، بالا می‌باشد؛ بنابراین داروی به‌کاررفته در این پژوهش، مهارکننده ژن BCL-2 بوده و به‌عنوان آنتی‌سنس می‌تواند سبب وقوع آپوپتوز گردد. این مطالعه با هدف کاهش عوارض جانبی، افزایش کارایی درمان و بررسی اثر سایتوتوکسیک بر روی رده سلولی لنفوم غیروچکین صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، به‌منظور سنتز نانولیپوزوم‌های حاوی DNAi، سه ترکیب مختلف شامل: پلی‌اتیلن گلیکول (۵، ۱۰ و ۱۵٪)، لیپیدهای مورد نیاز (DOPE و DOTAP تهیه‌شده از شرکت Avanti)، کلسترول (شرکت Sigma) و پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ (از شرکت Avanti) در کلروفرم حل و به بالن ته‌گرد استریل و بدون پیروژن منتقل شدند (جدول شماره ۱).

کیسه دیالیز پر شده درون حمام دیالیز (حاوی بافری که می‌بایست با بافر نمونه تعویض گردد) قرار گرفت. ظرف حاوی کیسه دیالیز و بافر آن، بر روی همزن مغناطیسی و زیر هود لامینار قرار گرفت. پس از اتمام پروسه دیالیز، نمونه درون ظرف استریل، تحت گاز بی‌اثر قرار داده شد.

در این روش از دستگاه مدل Z-Sizer Nano-Zs (ساخت شرکت Malvern انگلستان) جهت تعیین سایز و پتانسیل زتای نمونه استفاده گردید.

DNAi مورد استفاده در این تحقیق با کد ردیابی CHPJ25/026 و با توالی 3' CACGCACGCGCATCGCCGGCCGTG 5' از شرکت توفیق دارو تهیه شد.

بالون به روتاری (مدل Laborota 4003 control) متصل گردید تا حلال با برقراری دما و خلأ تبخیر و یک فیلم نازک در بالون تشکیل شود. جهت تنظیم سایز و کوچک کردن لیپوزوم‌ها با استفاده از امواج فراصوت، از سونیکاسیون حمامی (Elma ساخت آلمان) استفاده شد؛ بدین صورت که نمونه به مدت ۵-۱ دقیقه در ۵۵ درجه سانتیگراد تحت آرگون یا نیتروژن در حمام آب سونیکاتور قرار گرفت. در ادامه، عمل اکستروژن، ۵-۱ بار با فیلتر ۱۰۰ نانومتر و ۱۱-۰ بار با فیلتر ۵۰ نانومتر در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انجام شد. این پروسه با دستگاه اکسترودر (Avestin ساخت کانادا) صورت گرفت. به‌منظور خروج مواد غیرلازم، داروهای اضافی و آزاد، عمل دیالیز حداکثر سه مرتبه درمقابل محلول بافر سوکروز - فسفات ۱۰ میلی‌مولار (حاوی ۹/۵٪ سوکروز با pH برابر ۷/۴ با کیسه دیالیز ۵۰ کیلودالتون) انجام شد.

جدول شماره ۱: مقادیر مواد اولیه مورد استفاده در فرمولاسیون ساخت لیپوزوم پگیده حاوی دارو

ساخت لیپوزوم پگیده حاوی دارو			ماده اولیه
(PEG 15%)	(PEG 10%)	(PEG 5%)	
۱۲۶/۵ میکرولیتر	۱۲۶/۵ میکرولیتر	۱۶۵/۵ میکرولیتر	DOPE ¹ (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر)
۱۱۷/۲ میکرولیتر	۱۱۷/۲ میکرولیتر	۱۱۷/۲ میکرولیتر	DOTAP ² (۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر)
۲۳/۲ میکرولیتر	۲۳/۲ میکرولیتر	۲۳/۲ میکرولیتر	CHOLESTEROL (۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر)
۱۷/۱ میکرولیتر	۱۱/۴ میکرولیتر	۵/۷ میکرولیتر	DSPE-mPEG2000 (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر)
۷۰۰ میکرولیتر	۷۰۰ میکرولیتر	۷۰۰ میکرولیتر	DNAi

¹DOPE: 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

²DOTAP: 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)

به‌منظور قرائت میزان داروی موجود در نمونه سل شاهد، باید از نمونه لیپوزوم بدون دارو با غلظت مشابه پر شود. عدد قرائت شده به‌وسیله دستگاه در فرمول فوق قرار گرفته و با لحاظ کردن میزان رقت، غلظت ماده به دست می‌آید. نسبت مقدار ماده محصور شده در مرحله آخر، به میزان دارویی که از ابتدا وارد سیستم شده، میزان دربرگیری را برحسب درصد تعیین می‌کند.

سلول‌های زنده سرطانی DLCL-2 (تهیه شده از بانک ذخایر سلولی DSMZ آلمان)، در محیط کشت RPMI1640 (شرکت Gibco آمریکا) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (شرکت Gibco آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در یک اتمسفر مرطوب با غلظت دی‌اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند.

مورفولوژی و ریخت‌شناسی نانولیپوزوم‌های سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مارک ۱۰۰ kev - مدل EM208 (ساخت شرکت Philips آلمان) بررسی گردید. جهت تعیین اندازه و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها، از دستگاه مدل Z-Sizer Nano-Zs (ساخت شرکت Malvern انگلستان) استفاده شد. میزان محصورسازی برطبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$OD \times DILUTION \text{ FACTOR} \times A \times B = \text{CONCENTRATION}$
OD: عدد جذب نمونه در ۲۶۰ نانومتر بوده که توسط دستگاه ارائه می‌شود.

A: ضریب تبدیل جذب به غلظت بوده که برای این دارو برابر ۲۹ می‌باشد.

B: ضریب تصحیح قطر سل دستگاه است.

سلول‌ها جهت بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد، در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. همچنین به منظور انجام تست‌های بعدی، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰٪ رشد سلولی رسیدند، جمع‌آوری و عمل سانتریفوژ در ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه گردید و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نتوبار به وسیله میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زیستایی بالای ۹۰٪ جهت انجام آزمایش استفاده گردید.

سلول‌های DLCL2 تحت تأثیر نانولیپوزوم‌های پگیده سنتز شده (۵، ۱۰ و ۱۵٪) با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دی‌اکسید کربن ۵٪ (memmert-ساخت آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از زمان ذکر شده، جهت ارزیابی اثر سائیتوتوکسیکی لیپوزوم پگیده (حاوی دارو بر روی سلول‌های سرطانی غیروچکین)، ابتدا میکروپلیت در ۴۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌ها ته میکروپلیت رسوب کنند، سپس مایع رویی برداشته شد و به آن محیط کشت RPMI بدون سرم اضافه گردید. در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از رنگ تترازولیوم MTT تترازولیوم {با فرمول شیمیایی

{3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide}

به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۴-۲ ساعت در انکوباتور با دی‌اکسید کربن ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت از درون انکوباتور خارج و مجدداً در ۴۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌ها رسوب کنند. سپس مایع رویی دور ریخته شد. کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول با اضافه شدن ۱۰۰ میکروگرم برماکرولیتر محلول DMSO (Merck آلمان) خالص، حل شدند. در این وضعیت، چاهک‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند تا رنگ کاملاً حل گردد، سپس ۳۰ میکرولیتر گلایسین اضافه شد. جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Elisa Reader Stat Fax 4200) ثبت گردید. نتایج حاصله به صورت میزان درصد زیستایی و IC50 (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی

تا میزان ۵۰٪ می‌شود) گزارش شد.

استخراج RNA با استفاده از کیت سیناژن انجام گرفت و کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمی آن‌ها با نانودراپ NanoDrop™ ND-2000 بررسی گردید. در مطالعه ژل نیز دو باند ۱۸s و ۲۸s RNA ریبوزومی مورد بررسی قرار گرفت و در مطالعه با اسپکتروفتومتری نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر نسبت به ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنتز cDNA پس از تعیین مقدار و غلظت RNA مطابق با دستورالعمل کیت

Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) به شرح ذیل انجام گرفت:

یک میکرولیتر (Random Hexamer)، یک میکرولیتر (پرایمر Oligi dT) و یک میکرولیتر (dNTP)، ۵ میکرولیتر RNA، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MMULV، ۲ میکرولیتر MMULV Buffer و ۹/۵ میکرولیتر DEPC water به هر میکروتیوب اضافه گردید؛ به طوری که حجم نهایی واکنش در نهایت، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. نمونه‌ها، ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، سپس بلافاصله در یخ گذاشته شدند و به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. تغییرات بیان ژن BCL2 در سلول‌های تیمار شده با نانولیپوزوم‌ها در غلظت‌های مختلف با استفاده از دستگاه Real time-PCR مدل AB-STEP ONE PLUS مورد بررسی قرار گرفت. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به شرح ذیل بهینه سازی شد: ۱۰ میکرولیتر از

یک SYBR™ (2X) Master Mix (Takara Company)، یک میکرومول (شرکت تکاپو زیست)، ۷ میکرولیتر از آب دیونیزه و ۲ میکرولیتر cDNA الگو.

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به وسیله نرم افزار Primer express طراحی شدند. توالی پرایمرها در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است. برنامه دمایی به شرح ذیل در دستگاه Real time-PCR مدل AB-STEP ONE انجام گرفت:

pre denaturation (قبل از واسرشتگی) در ۹۵ درجه سانتیگراد
 به مدت ۱۵ دقیقه، در پی آن ۴۰ سیکل به صورت Denaturation
 (واسرشتگی) در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، annealing
 (اتصال) در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و Extension
 (طویل شدن) در ۷۲°C درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه.

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

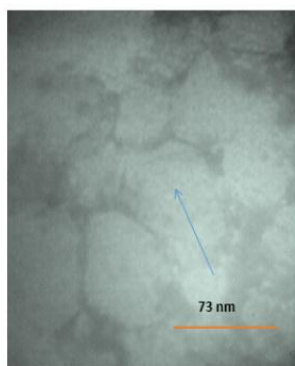
Gene	Sequence	Amplicon (bp)
BCL2	' 5' GTCTGGGAATCGATCTGGAA3:Forward	127
	5'CATAAGGCAACGATCCCATC:Reverse	
GAPDH	' 5'GGATTGCTCGTATTGGG3:Forward	205
	' 5'GGAAGATGGTGATGGGATT3:Reverse	

سطح معنی داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

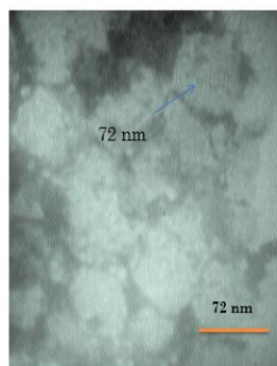
یافته‌ها

در این مطالعه، ریخت‌شناسی و سائز نانولیپوزوم پگیده سنتز شده، توزیع اندازه و پتانسیل زتا، به ترتیب ۱۱۷ نانومتر، ۰/۲۴۱ و ۰/۹۳۷- میلی‌ولت تخمین زده شد (شکل شماره ۱). میزان دربرگیری دارو، ۶۷٪ برآورد شد.

آنالیز داده‌های Real time PCR براساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با دارو) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو) تعیین گردید، همچنین با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل شدند.

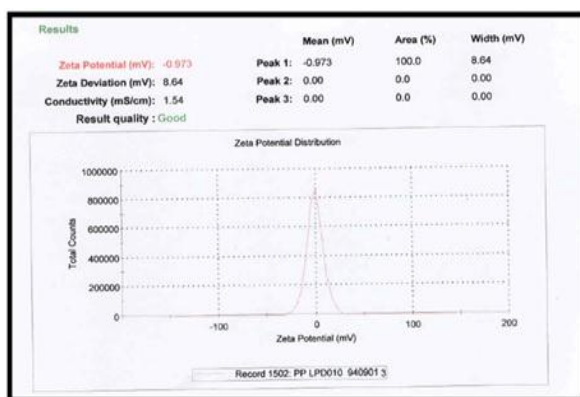


100 kx

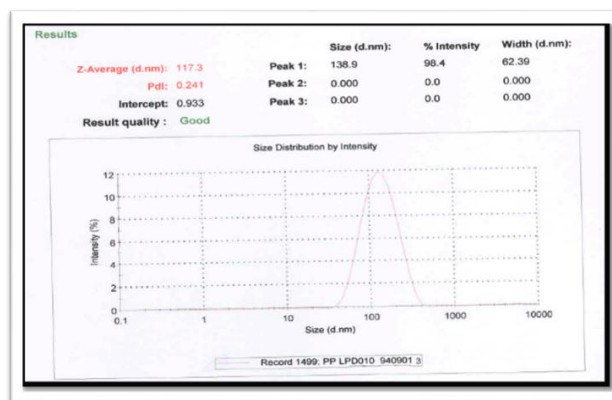


63 kx

نانومتر = nm



B



A

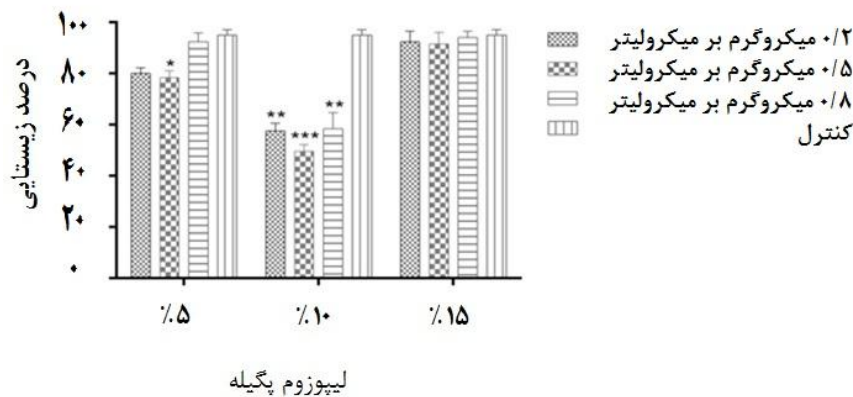
شکل شماره ۱: (A) مورفولوژی فرمولاسیون بهینه ساخت نانولیپوزوم پگیده حاوی DNAi ژن BCL2 با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM).

(B) گراف سائز فرمولاسیون بهینه ساخت لیپوزوم پگیده حاوی DNAi.

(C) گراف بار سطحی فرمولاسیون بهینه ساخت لیپوزوم پگیده حاوی DNAi.

ولی بیشترین مهار رشد سلولی در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر دیده شد. در نانولیپوزوم پگیله ۵٪، تنها در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر، ۲۲٪ مهار رشد سلولی نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p < 0.05$). در نانولیپوزوم پگیله ۱۵٪، هیچ غلظتی کاهش معنی‌دار در مهار رشد سلولی دیده نشد ($p > 0.05$) (شکل شماره ۲).

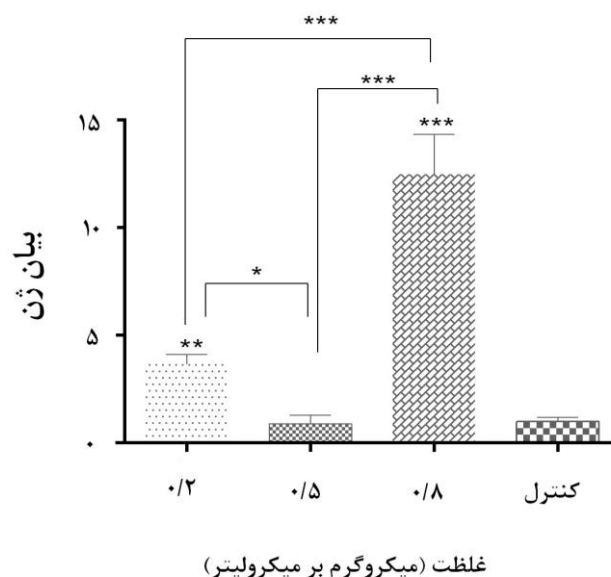
نتایج حاصل از تست MTT بر روی رده سلولی DLCL2 نشان داد بیشترین میزان مهار رشد سلولی در تیمار با نانولیپوزوم پگیله، ۱۰٪ می‌باشد و در تمامی دوزهای ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر، مهار رشد سلولی مشاهده گردید که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (به ترتیب $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.01$).



شکل شماره ۲: درصد بقای سلول‌های DLCL2 در برابر غلظت‌های مختلف لیپوزوم پگیله‌شده در مدت زمان ۴۸ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ($n=3$; $p < 0.001$ ***، $p < 0.01$ **، $p < 0.05$ *).

در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به گروه کنترل دیده نشد، ولی کاهش شدید و معنی‌داری در بیان ژن BCL2 در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به دو غلظت دیگر (۰/۲ و ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر) مشاهده گردید (شکل شماره ۳).

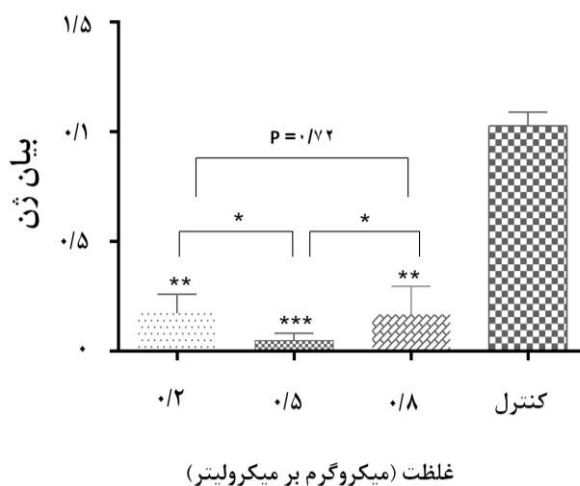
تغییر در بیان ژن‌ها در سلول‌های DLCL2 تیمار شده با نانولیپوزوم پگیله ۵، ۱۰ و ۱۵٪ بعد از ۴۸ ساعت ارزیابی شد. نتایج در شکل‌های شماره ۳-۵ نمایش داده شده است. کاهش معنی‌داری در بیان ژن BCL2 در سلول‌های تیمار شده با نانولیپوزوم پگیله ۵٪



شکل شماره ۳: بیان ژن BCL2 در نتیجه تیمار با غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم پگیله ۵٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت. نتایج به صورت بیان ژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ($n=3$; $p < 0.001$ ***، $p < 0.01$ **).

مقایسه درون گروهی جهت مقایسه تغییرات بیان ژن BCL2 در غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم پگیله ۱۰٪ نشان داد تیمار با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر از نانولیپوزوم پگیله ۱۰٪، سبب کاهش بیشتری در بیان ژن BCL2 نسبت به دو غلظت دیگر شده است.

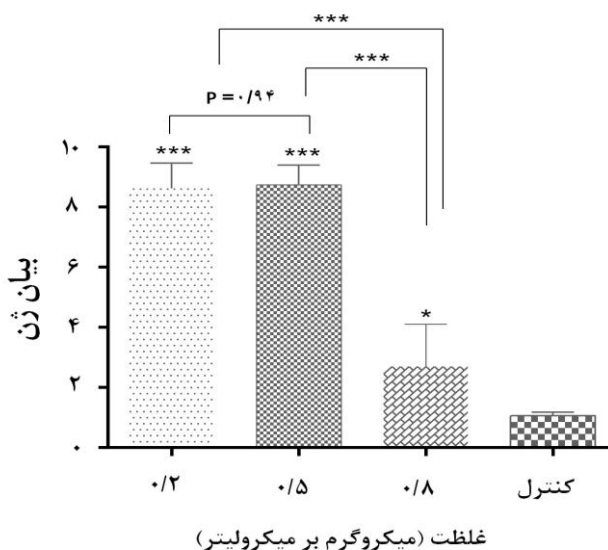
کاهش معنی‌داری در بیان ژن BCL2 در سلول‌های تیمار شده با تمامی غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر از نانولیپوزوم پگیله ۱۰٪ نسبت به گروه کنترل دیده شد. همچنین بیشترین کاهش بیان ژن BCL2 نسبت به گروه کنترل در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر مشاهده گردید (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴: بیان ژن BCL2 در نتیجه تیمار با غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم پگیله ۱۰٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت. نتایج به صورت بیان ژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (n=۳: p<۰/۰۰۱ ***، p<۰/۰۱: **).

کاهش معنی‌داری در بیان ژن BCL2 در غلظت ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به دو غلظت دیگر (۰/۲ و ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر) مشاهده گردید که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (شکل شماره ۵).

کاهش معنی‌داری در بیان ژن BCL2 در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم پگیله ۱۵٪ نسبت به گروه کنترل دیده نشد.



شکل شماره ۵: بیان ژن BCL2 در نتیجه تیمار با غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم پگیله ۱۵٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت. نتایج به صورت بیان ژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (n=۳: p<۰/۰۰۱ ***، p<۰/۰۱: **).

بحث

کاربرد بالینی بسیاری از درمان‌های معمولی به‌وسیله ناتوانی در رساندن غلظت‌های درمانی دارو به بافت‌های هدف و یا اثرات مضر سمی و شدید روی عضوها و بافت‌های معمولی، محدود شده است. رویکردهای مختلفی برای غلبه بر مشکلات، با ارائه انتخابی رساندن دارو به منطقه آسیب‌دیده با استفاده از حامل‌های مختلف دارویی به‌کار گرفته شده‌اند. در میان نانوحامل‌ها، لیپوزوم‌ها بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند. فن‌آوری نانودارورسانی لیپوزومی، یکی از روش‌های جدید در زمینه دارورسانی است که موفقیت‌های زیادی را در این عرصه کسب کرده است؛ البته محدودیت‌های الیگونوکلئوتیدها به‌عنوان ماده مؤثره بدون استفاده از حامل نانولیپوزومی وجود دارد که امکان تجمع و تأثیر بر سلول‌های غیرهدف که به نوعی سمیت محسوب می‌گردد، در این مورد دیده می‌شود. دارورسانی هدفمند نوعی از درمان نوین برای درمان انواع بیماری‌ها می‌باشد (۶).

همان‌طورکه در این پروژه مشاهده گردید داروی الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در این تحقیق به‌راحتی نمی‌تواند وارد سلول شود و برای ورود نیاز به حامل دارد.

در مطالعات نشان داده شده است وجود PEG برای اصلاح سطح حامل، برهمکنش حامل و سلول را افزایش می‌دهد که در نتیجه فرآیند انتقال دارو به سلول بهتر و بیشتر انجام می‌گیرد؛ البته میزان آن نیز مهم است زمانی میزان پایین آن اثر مطلوب را نمی‌گذارد و گاهی به‌علت زیاد بودن میزان PEG، لایه‌ایی که دور حامل تشکیل می‌شود، از برهمکنش مناسب با سلول می‌کاهد (۱۴). داروهای DNAi مستقیماً خود ژن (ملکول DNA) را نشانه می‌گیرند و بین سلول سالم و سرطانی تفاوت قائل می‌شوند؛ از این‌رو، هیچ اثری روی سلول سالم ندارند. بنابراین درمان با این داروها، چنانکه قبلاً نیز پیش‌بینی شده بود، باید بدون عوارض جانبی باشد. از طرفی، بین سلول‌های سرطانی هم تفاوت می‌گذارند؛ چون فقط ژن خاص مورد نظر را مهار می‌کنند. نانوحامل‌های لیپیدی زیست سازگار بوده و در شرایط *in vivo* سمی نیستند. این نانوحامل‌ها نه تنها باعث افزایش ماندگاری دارو در جریان خون می‌شوند؛ بلکه اثر سایتوتوکسیسیته دارو را بر روی سلول‌های غیرهدف کاهش می‌دهند (۱۳).

در مطالعه حاضر، اثر سمیت داروی DNAi نانولیپوزومه پگیله‌شده بر روی رده DLCL2 مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که پلی‌اتیلن گلیکول، نانولیپوزوم محتوی دارو را می‌پوشاند؛ لذا خروج دارو را کندتر کرده و باعث می‌گردد ماندگاری دارو بیشتر شود. به‌همین دلیل، رهایش دارو از فرمولاسیون تهیه‌شده به‌کندی صورت می‌گیرد. در مطالعه حاضر، همان‌طورکه مشاهده گردید، بیشترین میزان مهار رشد سلولی بر روی رده سلولی DLCL2 مربوط به نانولیپوزوم پگیله ۱۰٪ بود و جالب اینکه در تمامی غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، و ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر، کاهش درصد زیستایی دیده شد که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد، ولی بیشترین فعالیت ضد تکثیر و القای مرگ سلولی در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر دیده شد. در مطالعه حاضر، تیمار با نانولیپوزوم پگیله ۱۵٪، اثری در مهار رشد سلولی، القای آثار سمی و سایتوتوکسیک نداشت. همچنین کاهش قابل توجه بیان ژن BCL2 در رده سلولی DLCL2 تیمار شده در فرمولاسیون نانولیپوزوم پگیله ۱۰٪ در غلظت‌های مختلف، طی ۴۸ ساعت دیده شد. از طرفی، بیشترین کاهش بیان ژن BCL2 نسبت به گروه کنترل در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر مشاهده گردید که در واقع کاهش ۲۵ برابری بیان ژن BCL2 نسبت به گروه کنترل در همین غلظت بود؛ این در حالی است که بیان ژن BCL2 در غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به کنترل، کاهش ۵ برابری و در غلظت ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به کنترل، کاهش ۸ برابری نشان داد.

درمان سرطان در انواع سرطان‌ها با مهارکننده‌های BCL2 می‌تواند دیدگاه مهمی را درخصوص راهبردهای ضدسرطان براساس آپوپتوزیس مطرح کند (۱۵). در تحقیقی Barar و همکاران با بررسی اثرات نانوسیستم پلی‌کاتیونیک ژن‌ها در سلول‌های A549 اپی‌تلیوم آلونولار با استفاده از نانوساختارهای لیپیدی پلی‌کاتیونیک فراهم‌کننده انتقال و با پایه پلیمرهایی مثل Diaminobutane، Polyamidoamine Polyfect، Oligofectamin، به این نتیجه رسیدند که نانوسیستم‌های پلی‌کاتیونیک دارای اثرات مهمی بر بیان ژن‌ها و اعمال سلولی مانند آپیتوز می‌باشند (۱۶). همچنین در تحقیقی Vestin و همکاران، با بررسی اثرات کنترلی آپیتوز siRNA-Lipoplex بر روی ژن‌های Bcl2 و Bcl-xL در

نتایج مطالعه فوق نشان داد کپسوله کردن موجب افزایش فعالیت ضدتوموری در شرایط درون تنی و برون تنی می شود (۱۹).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد فرمولاسیون نانولیپوزوم پگیده ۱۰٪، کارایی بالاتری جهت حفظ و رهایش دارو نسبت به دو لیپوزوم دیگر سنتز شده دارد. همچنین بیشترین مهار رشد سلولی بر روی رده سلولی DLCL2 مربوط به نانولیپوزوم پگیده ۱۰٪ بوده و در تمامی غلظت های مورد آزمون، مهار رشد سلولی و کاهش بیان ژن هدف BCL2 قابل مشاهده است و بهترین غلظت مؤثر در این تحقیق، غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر می باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد که مراحل آزمایشگاهی آن در بخش بیولوژی شرکت تحقیقاتی و مهندسی توفیق دارو انجام شده است. بدین وسیله از زحمات مدیریت محترم عامل و عزیزی که در این پروژه همکاری کردند، کمال سپاس و قدردانی را داریم.

سلول های MCF-7 در کارسینومای سینه انسان، نشان دادند siRNA به لیپوزوم های کاتیونیک متصل می شود و بسته به قدرت اتصال، siRNA موجب کاهش پتانسیل زتا ذرات می گردد. همچنین مشخص گردید در تمامی توالی های siRNA که موجب مهار رشد سلولی بعد از ۲۴ ساعت می شوند؛ پروتئین های Bcl2 و Bcl-xL به طور معنی داری کاهش می یابند. از طرفی، siRNAs موجب کاهش معنی داری در بیان فعالیت کاسپاز-۷ و DNA fragmentation شده و در نتیجه، اثرات مهاری siRNAs بر مهار بیان ژن Bcl-2 در حدود ۲۰ برابر بیشتر از ODN (BCL2 Antisense Oligonucleotide) خواهد بود (۱۷). Reddy و همکاران نشان دادند استفاده همزمان از Paclitaxel و BCL2 siRNA به وسیله لیپوزوم ناقل حساس به pH، اثرات سودمندی بر درمان ملانوما دارد (۱۸)، Rodriguez و همکاران نیز با بررسی فعالیت ضدتوموری BCL2 کنترل شونده با اولیگونوکلوئید DNA، بیان کردند PNT100، الیگونوکلوئیدی است که قابلیت کنترل BCL2 را دارد که این نتایج با یافته های مطالعه حاضر همسو بود. PNT2258 نوع کپسوله شده PNT100 است که موجب افزایش ماندگاری سرمی و فعالیت ضدتوموری نانوذره می شود. PNT2258 نیز اثرات ضدتوموری قدرتمندی بر علیه BCL2 در WSU-DLCL2 لنفوما، PC-3 prostate، A375 ملانوما دارد.

References:

- Adamson P, Bray F, Costantini AS, Tao M-H, Weiderpass E, Roman E. Time trends in the registration of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas in Europe. Eur J Cancer 2007;43(2):391-401. PubMed
- Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. J Clin Oncol 17(4):1244. PubMed
- Cheong I, Zhou S. Tumor-specific liposomal drug release mediated by liposomase. Methods Enzymol 2009;465:251-65. PubMed
- Mohanty C, Das M, Kanwar JR, Sahoo SK. Receptor mediated tumor targeting: an emerging approach for cancer therapy. Curr Drug Deliv 2011;8(1):45-58. PubMed
- Purwaningsih EH, Schubert R. The preparation of liposomes derived from mixed micelles of lecithin added by sodium cholate, followed by dialysing using hemoflow high flux f60s. Makara Keshatan 2004;8(2):49-52. link
- Latif N, Bachhawat BM. Liposomes in Immunology. J Biosci 1984;6(4):491-502. link
- Li Z, Chen J, Sun W, Xu Y. Investigation of Archaeosomes as Carriers for Oral Delivery of Peptides. Biochem Biophys Res Commun 2010;394(2):412-7. PubMed

8. Sariego J. Breast Cancer in the Young Patient. Am Surg 2010;76(12):1397-400. PubMed
9. Zalipsky S, Brandeis E, Newman MS, Woodle MC: Long circulating, cationic liposomes containing Amino-PEG-phosphatidylethanolamine. FEBS Lett 1994;353(1):71-4. PubMed
10. Alcantar NA, Aydil ES, Israelachvili JN. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. J Biomed Mater Res 2000;51(3):343-51. PubMed
11. Barbeau J, Cammas-Marion S, Auvray P, Benvegna T. Preparation and characterization of stealth archaeosomes based on a synthetic pegylated archaeal tetraether lipid. J Drug Deliv 2011;2011:11. PubMed
12. Mozafari MR, Reed CJ, Rostron C, Hasirci V. Construction of gene delivery vector using anionic liposomes. Oxford: Trafford publishing Ltd; 2005. 101109.
13. Braasch, DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: Effect of mRNA target sequence and chimera design. Nucleic Acids Res 2002;30(23):5160-7. PubMed
14. Pulini S, Rupoli S, Goteri G, Pimpinelli N, Alterini R, Bettacchi A, et al. Efficacy and safety of pegylated liposomal doxorubicin in primary cutaneous B-cell lymphomas and comparison with the commonly used therapies. Eur J Haematol 2009;82(3):184-93. PubMed
15. Placzek W, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed J, Pellecchia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. Cell Death Dis 2010;1(5):e40. PubMed
16. Barar J, Hamzeiy H, Tabatabaei SM, Hashemi-Aghdam S, Omid Y. Genomic signature and toxicogenomics comparison of polycationic gene delivery nanosystems in human alveolar epithelial A549 cells. DARU J Pharm Sci 2009;17(3):139-47. link
17. Vestin A, Khazanov E, Avni D, Sergeyev V, Barenholz Y, Sidi Y, et al. siRNA-lipoplex-mediated Bcl-2 and Bcl-xL gene silencing induces apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells. Open Chem Biomed Methods J 2008;1:28-43 .link
18. Reddy TL, Garikapati KR, Reddy SG, Reddy BS, Yadav J, Bhadra U, et al. Simultaneous delivery of Paclitaxel and Bcl-2 siRNA via pH-Sensitive liposomal nanocarrier for the synergistic treatment of melanoma. Sci Rep 2016;6:35223.link
19. Rodriguez WV, Woolliscroft MJ, Ebrahim AS, Forgey R, McGovren PJ, Endert G, et al. Development and antitumor activity of a BCL-2 targeted single-stranded DNA oligonucleotide. Cancer Chemother Pharmacol 2014;74(1):151-66. link

