

تأثیر مهاري نانوالیگونوكلئوتیدها به عنوان یکی از روش های جدید نانوتکنولوژی در ژن درمانی لوسمی در شرایط In Vitro

نوشین نقی^۱، منصور صالحی^۲، محمد ربانی^۳

^۱استادیار زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.

^۲دانشیار ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: یکی از روش های جدید و تخصصی درمان لوسمی، ژن درمانی (Gene Therapy) است. برای مهار تکثیر سلول های سرطانی می توان از یک ویژگی تخصصی این سلول ها استفاده نمود.

یکی از این روش ها، استفاده از آنتی تلو مرزاها در سطوح مختلف می باشد. تلو مرزا یک آنزیم ریبونوكلئوپروتئینی است که توالی های هگزانوكلئوتیدی TTA GGG را به انتهای کروموزوم خطی یوکاریوتی می افزاید. فعالیت تلو مرزای در ۹۰-۸۵٪ کل سلول های سرطانی انسان یافت می شود. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر مهاري نانوالیگونوكلئوتیدها به عنوان یکی از روش های جدید نانوتکنولوژی در ژن درمانی لوسمی در شرایط In Vitro صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، عملکرد نانوذرات الیگومری در مهار اختصاصی فعالیت تلو مرزا در یک رده سلولی لوسمی به نام K562 بررسی شد. بدین منظور سه گروه از نانوالیگومرهای آنتی سنس، سنس و تصادفی با غلظت های ۰/۵-۳ μM به سلول ها افزوده شدند. میانگین فعالیت آنزیم تلو مرزا گروه های فوق در ۳ آزمایش جداگانه با گروه کنترل مقایسه گردید.

یافته ها: در این پژوهش، ۳ روز بعد از تیمار با الیگومرها، غلظت ۰/۵۲ μM از سنس و آنتی سنس، تأثیری بر فعالیت این آنزیم نداشت، و غلظت های ۱-۳ μM گروه های سنس و آنتی سنس باعث کاهش معنی دار فعالیت تلو مرزا در مقایسه با گروه کنترل گردید. در ضمن، گروه الیگومرهای تصادفی تأثیر چندانی بر روی فعالیت تلو مرزا نداشت.

نتیجه گیری: یکی از دلایل مهار تلو مرزا به واسطه آنتی سنس های مزبور، اتصال آنها به RNA تلو مری به نام hTR و جلوگیری از عملکرد این آنزیم می باشد. با انجام این امر در واقع hTR تلو مرزا تجزیه می شود. با استفاده از روش اخیر درمان در In Vitro، زمینه برای درمان لوسمی در انسان فراهم می شود.

کلید واژه ها: دی ان آ؛ آنتی سنس؛ الیگونوكلئوتیدها؛ تلو مرزا.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: naghsh@iaufala.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۳۲۰۰۹۲۷۶

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳۱

مقدمه

توالی های هگزانوكلئوتیدی TTA GGG تکراری را به انتهای کروموزوم خطی یوکاریوت ها می افزاید. الیگونوكلئوتیدهای DNA تلو مری غنی از نوكلئوتیدهای گوانین می باشند. این ترادف ها کوتاه و به شکل ۴ رشته ای داخل مولکولی در می آیند.

تلو مرزا یک آنزیم ریبونوكلئوپروتئینی است که در واقع یک DNA پلیمرز وابسته به RNA می باشد. تنظیم طول تلو مرز سلول های نامیرا به وسیله تلو مرزا انجام می شود. این آنزیم

شستشو داده شدند و پس از سانتریفوژ لوله محتوی سلول ها، محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل از سانتریفوژ ۹۰٪ FCS و ۱۰٪ DMSO افزوده گردید. سوسپانسیون ایجاد شده به ویال های استریل مخصوص فریز (ویال های اپندروف) انتقال داده شد. (در مورد سلول های شناور مثل رده سلولی K562 نیز باید سوسپانسیون سلولی حاصل از ویال های خریداری شده از انستیتو پاستور را سانتریفوژ کرد و سلول ها را در ۱۰ cc محیط کشت تازه وارد نمود، سپس به فلاسک منتقل کرد. پس از دریافت سلول ها باید در کوتاهترین زمان ممکن آنها را پاساژ داده و به انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂ و شرایط دمایی ۳۷°C منتقل نمود). در ادامه، سلول های زنده با روش تریپان بلو و لام هماسیتومتر شمارش شدند. سلول های زنده به تعداد ۵×۱۰^۴ در چاهک های ۹۶ خانه انتقال یافته و الیگونوکلئوتیدها به شیوه زیر به آنها افزوده شد (۹،۸). به منظور مهار اختصاصی تلومراز تعداد، ترادف و تعدیل نانوالیگونوکلئوتیدهای مختلف با بررسی مقالات متعدد و مقایسه آنها جهت یافتن بهترین نانوالیگونوکلئوتید انجام گرفت. ترادف هایی با ۱۹ نوکلئوتید و تعدیل فسفورا میداتی مکمل ناحیه تلومری RNA (hTR) سنتز شدند. (تعدیل انجام شده، نانوالیگومرها را در مقابل هضم آنزیمی ریبونوکلازها مقاوم می سازد). در ادامه ۳ ترادف به عنوان سنس، آنتی سنس و تصادفی طراحی گردید (۹،۶).

جهت تسهیل ورود نانوالیگونوکلئوتیدها به درون سلول ها می توان از انواع مواد جاذب سلولی مثل Transfection Agents استفاده نمود. که یکی از این مواد FuGENE6 می باشد و علت انتخاب این ماده در مقایسه با مواد مشابه، افزایش کارایی و سمی بودن پایین آن است (۱۰،۶).

مراحل آماری، با استفاده از نرم افزار SIGMASTATTM (Jandel Software, San Raphael, CA)، صورت گرفت. جهت مقایسه فعالیت تلومراز در گروه های لوسمی و کنترل، با توجه به غلظت های الیگونوکلئوتیدهای مورد نظر در گروه های مختلف، میانگین تهیه شد و آزمون مقایسه میانگین ها با روش آماری تی تست انجام گردید. حد معنی دار بودن تفاوت بین نمونه ها ۱٪ و ۵٪ در نظر گرفته شد. جهت تعیین ارتباط بین اثرات مهاري تلومراز با دوز الیگونوکلئوتیدها از آزمون عدم همبستگی پیرسون استفاده گردید. نمودارها به کمک نرم افزار Excel رسم شدند.

نانوتکنولوژی یکی از شیوه های جدید و تخصصی درمان بیماری ها است. محققان نانوتکنولوژی با ابعاد وسیعی از کاربردهای نانوذرات آشنا شده اند که ممکن است نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری ها و تولید دارو داشته باشد (۲،۱). رشته های غنی از گوانین بین ۲ ترادف کوتاه ۱۲ نوکلئوتیدی در داخل سلول بر روی یکدیگر تاخورد و تشکیل ساختمان هلیکس ۴ تایی گوانین داخل مولکولی را می دهند. سلول های بنیادی انسان دارای فعالیت کمی از تلومراز می باشند (۳). تلومراز در بیشتر سلول های نامیرا و سرطانی انسان فعالیت دارد، به طوری که فعالیت تلومرازی در ۹۰-۸۵٪ کل سلول های سرطانی انسان یافت شده است. این آنزیم در سلول های نامیرایی مثل رده پرومیلوسیتی HL60، در تمام مراحل چرخه سلولی فعالیت دارد. از طرفی، در دنیای امروز سرطان علت عمده مرگ و میر است (۴،۳). استفاده از روش های شیمی درمانی ترکیبی (Compound Chemotherapy) به علت غیر اختصاصی بودن و تأثیر بر روی کلیه سلول های در حال تقسیم، باعث عوارض جانبی زیاد می شود. بنابراین، شناسایی وجوه تمایز بین سلول های سرطانی و نرمال، کاربرد روندهای درمان سرطان را به صورت اختصاصی تر مطرح می سازد. کشف داروهای جدید و بازدارنده های تلومراز یک هدف تخصصی برای شیمی درمانی سرطان است. الیگونوکلئوتیدهای سنتزی که به طور مکمل با توالی m-RNA ساخته می شوند، آنتی سنس (Antisense) نامیده می شوند (۵). آنتی سنس ها به عنوان عوامل ضد تلومرازی (Anti-Telomerase Agents) موجب کوتاه شدن تلومر و مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis) می شوند. از این جهت تلومراز یک هدف مناسب برای طراحی نانوالیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس است. لذا در این مطالعه، عملکرد یک نوع آنتی سنس جدید در مهار اختصاصی فعالیت تلومراز در یک رده سلولی لوسمی به نام K562 بررسی گردید (۷،۶).

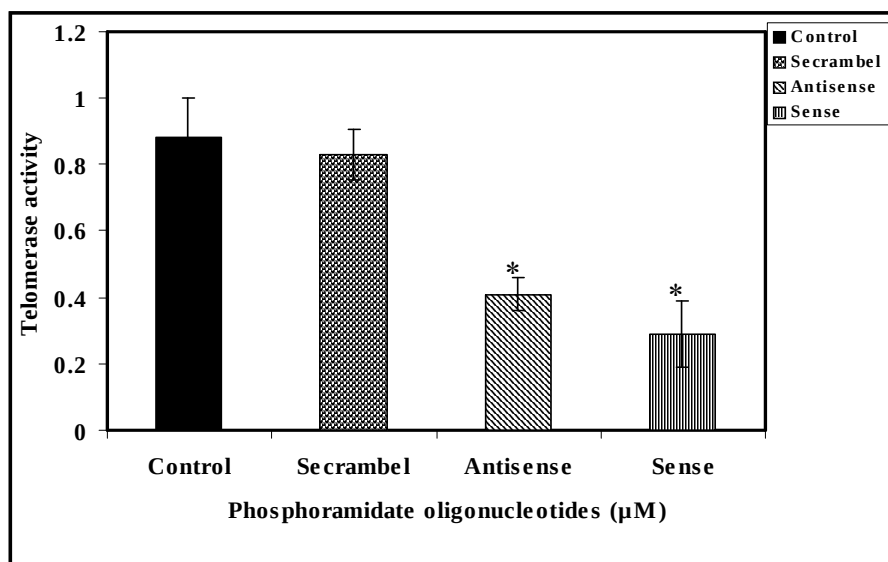
روش بررسی

سلول ها در محیط کشت RPMI-1640، در درون فلاسک های مخصوص کشت سلولی به صورت پاساژ یافته و در فاز لگاریتمی رشد خود قرار داده شدند. ابتدا یک سوسپانسیون سلولی لوله های استریل از سلول های موجود در فلاسک تهیه، سپس سلول ها با استفاده از هموسایتومتر شمارش شدند. سلول ها با PBS

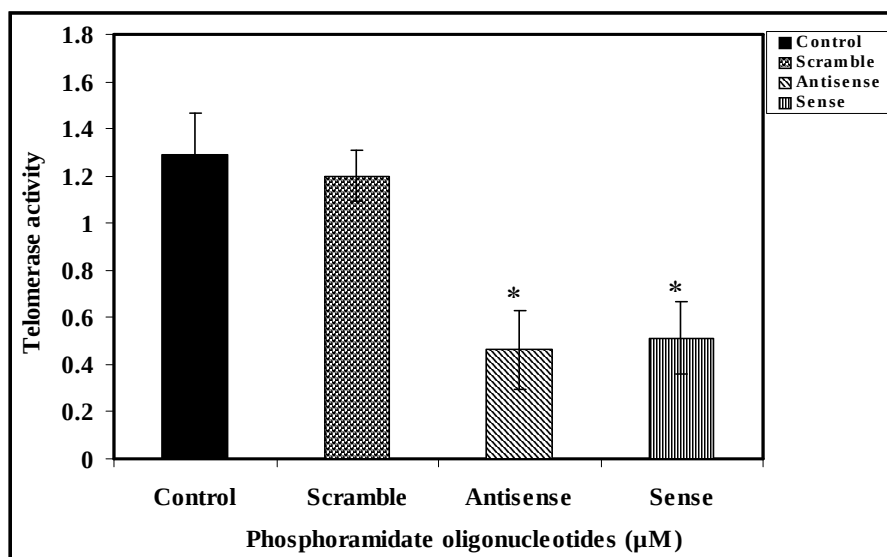
یافته‌ها

در این تحقیق نانوآنتی‌سنس‌های فسفورامیداتی در غلظت‌های $0.5-3 \mu\text{M}$ دارای اثر مهارکنندگی بر فعالیت تلومراز بودند. یافته‌های حاصل به دست آمده از مراحل آماری نشان داد غلظت $0.52 \mu\text{M}$ تأثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم ندارد. نمودار شماره ۱، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت $0.5 \mu\text{M}$ از

نانوالیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می‌باشد. بررسی نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد میانگین فعالیت تلومراز در گروه تصادفی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ندارد. فعالیت تلومرازی گروه‌های نانوآنتی‌سنس 0.48 ± 0.20 و نانو سنس 0.358 ± 0.12 نسبت به گروه کنترل 0.88 ± 0.10 در غلظت $0.5 \mu\text{M}$ از نانوآلیگونوکلئوتیدها، کاهش معنی‌داری داشته است ($p < 0.05$).



نمودار شماره ۱: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت $0.5 \mu\text{M}$ از نانوآلیگونوکلئوتیدها بر روی رده سلولی K562 هر ستون نمودار معرف میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است ($n=9$).



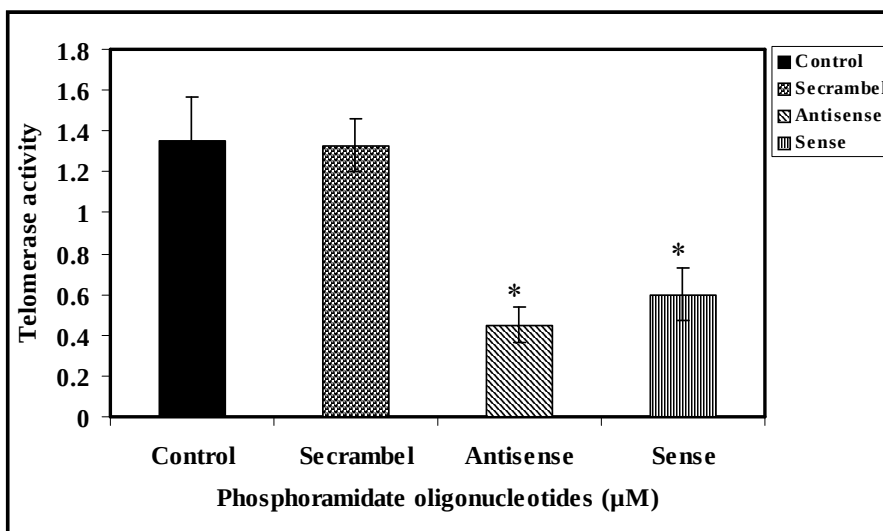
نمودار شماره ۲: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت $1 \mu\text{M}$ از نانوآلیگونوکلئوتیدها بر روی رده سلولی K562 هر ستون نمودار معرف میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است ($n=9$).

کنترل می‌باشد. طبق نمودار شماره ۲، در غلظت $1 \mu\text{M}$ میانگین فعالیت تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل

نمودار شماره ۲، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت $1 \mu\text{M}$ از نانوآلیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه

غلظت $2\mu\text{M}$ از نانوالیگونوكلتوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می‌باشد. طبق نمودار شماره ۳، فعالیت تلومرازى گروه‌های نانوالیگوسنس 0.49 ± 0.20 ، و نانوسنس 0.68 ± 0.22 نسبت به گروه کنترل 1.39 ± 0.20 در غلظت $2\mu\text{M}$ از نانوالیگونوكلتوتیدها کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.05$).

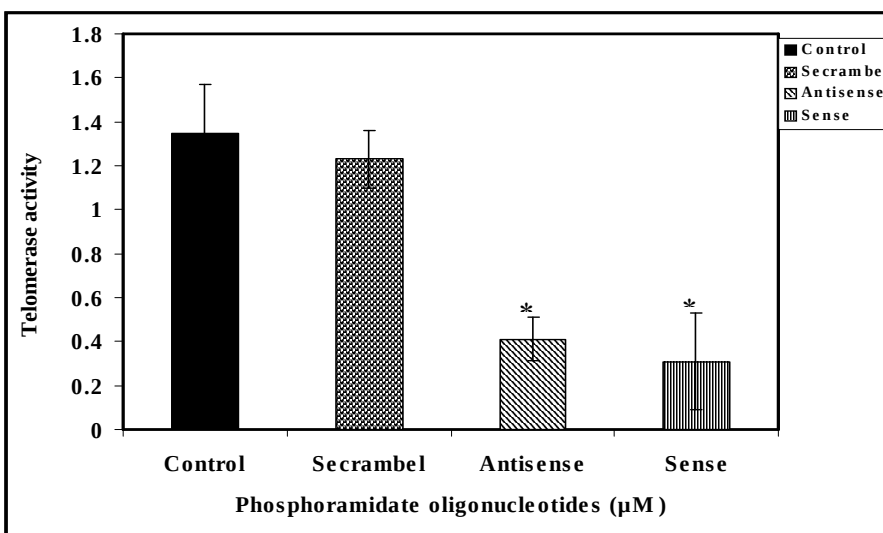
ندارد. فعالیت تلومرازى گروه‌های نانوالیگوسنس، 0.52 ± 0.20 و نانوسنس 0.68 ± 0.10 نسبت به گروه کنترل 1.28 ± 0.20 از نانوالیگونوكلتوتیدها، کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.05$) تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل ندارد. نمودار شماره ۳ نیز، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در



نمودار شماره ۳: مقایسه فعالیت تلومرازى در غلظت $2\mu\text{M}$ از نانوالیگونوكلتوتیدها بر روی رده سلولى K562 هر ستون نمودار معرف میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است ($n=9$).

نانوالیگوسنس 0.48 ± 0.20 و نانوسنس 0.34 ± 0.22 نسبت به گروه کنترل 1.28 ± 0.20 در غلظت $3\mu\text{M}$ از نانوالیگونوكلتوتیدها کاهش داشته است ($p < 0.05$).

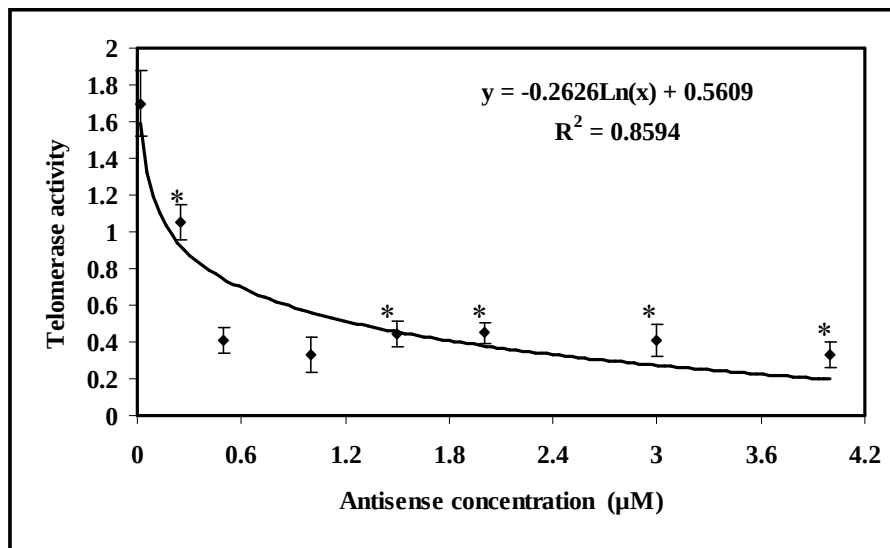
نمودار شماره ۴، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت $3\mu\text{M}$ از نانوالیگونوكلتوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می‌باشد. طبق نمودار شماره ۴، میانگین فعالیت تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل ندارد. فعالیت تلومرازى گروه‌های



نمودار شماره ۴: مقایسه فعالیت تلومرازى در غلظت $3\mu\text{M}$ از نانوالیگونوكلتوتیدها بر روی رده سلولى K562 هر ستون نمودار معرف میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است ($n=9$).

نمودار شماره ۵، برازش یک مدل رگرسیونی لگاریتمی بین غلظت نانوانتی‌سنس و میزان فعالیت تلومراز را نشان می‌دهد. هر نقطه از نمودار معرف رابطه بین میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز و غلظت آنتی‌سنس به کار رفته ۳ روز بعد از ترانسفکشن

می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه تکرار شده است ($n=9$). ضریب همبستگی پیرسون بین این دو عامل برابر با $r=-0.927$ است، که نشان‌دهنده یک همبستگی ناهم جهت می‌باشد ($p<0.05$).



نمودار شماره ۵: بررسی همبستگی غلظت نانوانتی‌سنس با فعالیت تلومرازی در رده سلولی

هر نقطه از نمودار معرف رابطه بین میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز و غلظت آنتی‌سنس به کار رفته ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه تکرار شده است. نمودار نشان‌دهنده رابطه معکوس بین غلظت نانوانتی‌سنس و فعالیت تلومراز در رده سلولی مزبور می‌باشد.

بحث

پژوهشگران، تأثیرات آنتی‌تلومرازاها را در غلظت‌های مختلف بررسی کرده‌اند به‌عنوان مثال، Koga در سال ۲۰۰۶ مکانیسم‌های متعددی را جهت نحوه عملکرد انواع الیگومرها بر میزان فعالیت تلومراز پیشنهاد نمود. این دانشمند نشان داد تنظیم فعالیت تلومراز یک مسیر چند مرحله‌ای است که با واسطه عوامل کلیدی مختلفی صورت می‌پذیرد (۹، ۸). یکی از مهم‌ترین مراحل، اتصال مستقیم آنتی‌سنس به hTR و جلوگیری از عملکرد زیرواحد hTERT یعنی نسخه‌برداری معکوس است. با این عمل hTR به‌صورت الگو برای زیرواحد کاتالیتیک عمل نکرده و سنتز واحدهای هگزامری تلومر کاهش می‌یابد (۱۱، ۱۰). به مرور زمان این امر باعث کوتاه شدن طول تلومر در سلول‌های سرطانی و القای روند پیری در آنها می‌شود. مکانیسم فوق توسط Koga در سال ۲۰۰۱ به‌عنوان یک مسیر مؤثر در ژن‌درمانی سلول‌های توموری تحت درمان با الیگومرها مطرح شد. طراحی تعداد الیگومرها با توجه به نتایج

حاصل از تحقیق Maoxuan و همکارانش در سال ۱۹۹۹ صورت پذیرفت. این دانشمندان الیگومرهایی با طول‌های ۱۵، ۱۷، ۱۹، ۲۱ و ۲۳ نوکلئوتید جهت مهار تلومراز در سلول‌های He, La طراحی کردند. این آنتی‌سنس در درمان سرطان سینه در شرایط In Vitro مؤثر بود. یکی از دلایل کاهش تلومراز توسط آنتی‌سنس‌ها، جفت شدن آنتی‌سنس با بخش hTR تلومراز و فعال شدن آنزیم‌های تجزیه‌کننده اسیدهای ریبونوکلئیک است (۱۳، ۱۲). با توجه به اینکه آنتی‌سنس طراحی شده از جنس DNA و hTR از نوع RNA می‌باشد، لذا، با اتصال این ۲ بخش به یکدیگر فعالیت آنزیمی به نام RNaseH تحریک می‌شود. آنزیم مزبور قادر است از هیبرید DNA و RNA به‌عنوان سوسترا استفاده نموده، و پیوندهای فسفو دی استر RNA را بشکند. با انجام این امر در واقع hTR تلومراز تجزیه می‌شود (۸، ۱۰). این تأثیرات در دسته مکانیسم‌های وابسته به ترادف و تخصصی آنتی‌تلومرازا قرار می‌گیرد (۴، ۶). Li در سال ۱۹۹۸ مکانیسم دیگری را در مهار تلومراز توسط آنتی‌سنس‌ها

نوکلئوتیدی و کمتر از آن، این است که قادر به انجام این روندهای غیراختصاصی نیستند (۱۴،۱۳).

نتیجه گیری

یکی از دلایل مهار تلومراز به واسطه آنتی سنس های مزبور، اتصال آنها به RNA تلومری به نام hTR و جلوگیری از عملکرد این آنزیم است. با انجام این امر در واقع hTR تلومراز تجزیه می شود. با توجه به تأثیرات این نانوالیگومرها در مهار لوسمی در شرایط In Vitro، استفاده از روش اخیر به عنوان یکی از شیوه های جدید نانوبیوتکنولوژی در درمان لوسمی در انسان پیشنهاد می گردد.

مطرح نمود. این دانشمند عامل مؤثر در این امر را کاهش تنظیم (Down-Regulation) پروتئین کیناز PKC- α دانست. محقق مزبور نشان داد تیمار یک دسته از سلول های سرطانی سینه با آنتی سنس های ۱۶ نوکلئوتیدی باعث کاهش بسیار زیاد m-RNA در این نوع پروتئین کیناز شده است. کاهش بیان این ژن فقط در طول های ۲۰-۱۶ نوکلئوتیدی الیگومرها صورت پذیرفته است و طول های ۱۵ نوکلئوتیدی و کوتاهتر فاقد اثر بازدارندگی بوده اند. مکانیسم تجزیه پروتئین کیناز PKC- α می تواند وابسته و یا مستقل از RNaseH باشد. در مسیرهای وابسته به RNaseH، در واقع این آنزیم پس از فعال شدن به طور غیراختصاصی m-RNA مربوط به PKC- α را تجزیه می کند. علت عدم تأثیر نانوالیگومرهای ۱۵

References:

1. Boxall ABA, Tiede K, Chaudry. Engineered Nanomaterials in Soils and Water: How Do They Behave and Could They Pose a Risk to Human Health. *Nanomedicine* 2007;2(6):919-927.
2. Christian P, et al. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicology* 2008;17:326-343.
3. Beltz L. The Effects of Telomerase Inhibitors on Lymphocyte Function. *Anticancer Res* 1999;19:3205-3211.
4. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* 2005;88(2):412-419.
5. Bouffler SD. Telomeric Sequences, Radiation Sensitivity and Genomic Instability. *Int J Radiat Biol* 2001;77:995-1005.
6. Brittney SH, Krisztina P, Jerry WS, Sergei MG. Oligonucleotide N3'→P5' Phosphoramidates as Efficient Telomerase Inhibitors. *Oncogene* 2002;21:638-642.
7. Hussain SM, Javorina MK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF, John J, Schlager. The Interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells Induces Dopamine Depletion. *Toxicological Sciences* 2006;92(2):456-463.
8. Koga SA. Novel Telomerase-Specific Gene Therapy: Gene Transfer of Caspase-8 Utilizing the Human Telomerase Catalytic Subunit Gene Promoter. *Hum Gene Ther* 2000;11:1397-1406.
9. Bulter M. *Animal Cell Culture and Technology*. London, New York: Bios Scientific Publisher; 2004. p. 1-99.
10. Chin DJ, Green GA, Zon G, Szoka FC Jr, Straubinger RM. Rapid Nuclear Accumulation of Injected Oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 1990;2:1091-1100.
11. Chiu CP. Differential Expression of Telomerase Activity in Hematopoietic Progenitors from Adult Human Bone Marrow. *Stem Cells* 1996;14:239-248.
12. Collins D. Fate of Cationic Liposomes and Their Complex with Oligonucleotide in Vivo. *Biochim Biophys Acta* 1996;1281:139-149.
13. Maoxuan T, Naoko MK. Specific Inhibition of Human Telomerase Activity by Transfection Reagent, Fugene6-Antisense Phosphorothioate Oligonucleotide Complex in He Lacells. *FEBS Letters* 1999;454:312-316.
14. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* 2005;88(2):412-419.