Journal of Police Medicine

Fall 2012; Vol. 1, No. 2: 71-80

Original Article

Gene transfer to eukaryotic cells by a virus-like liposomal nano-system

Received: 11 September 2012 **Revised:** 4 October 2012 **Accepted:** 14 October 2012

ABSTRACT

Reihaneh Ramezani
Majid Sadeghizadeh *
Mehrdad Behmanesh
Saman Hosseinkhani

Department of nanobiotechnology
School of Biological Sciences
Tarbiat Modares University
Tehran- Iran

Background: This study introduces an efficient virus-like system for gene delivery and DNA vaccine production by designing a delivery system based on membrane phosphatidylcholine. This structure would be beneficial in different branches of medicine.

Materials and Methods: In order to encapsulate plasmid DNA in a closed structure, we were able to construct a cell-like system encapsulating DNA employing two consequtive dehydration-rehydration processes. The characteristics of the obtained structure were investigated by electrophoresis, spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). After optimization of the system, they were added to CHO cells to deliver GFP reporter gene, and then its toxicity was investigated. Their transfection efficiency was studied by using fluorescence microscopy.

Results: Inspite of the fact thet the designed lipid bilayer system was neutral in terms of surface charges, it was able to encapsulate DNA with high efficiency (98%) even in the absence of cations. In addition, the resulted system was highly stable and also was able to keep the DNA molecule in its structure for more than 6 months. These virus-like lipid bilayer vesicles were able to transfect the reporter gene GFP to CHO cells.

Conclusion: Although the cationic structures are very common in DNA vaccines production now, their cytotoxic properties limit their application. New results in terms of gene delivery by neutral structures would be promising in this field and production of the efficient and safe system against viral diseases. Since the construction of this system is cost benefit, it could be used for people in deprived areas.

Keywords: Bilayer phospholipid vesicle, Neutral liposome, Artificial virus, DNA vaccine

*Corresponding Author:
Professor, Department of Nanobiotechnology
Tel: (+98) 21 8288 4409و
Fax: (+98) 411 8288 3463,
Email: sadeghma@modares.ac.ir

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۱ – شماره ۱ – مسسلسل ۲– صفحات ۸۰-۷۱
مقاله تحقیقی

انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی با واسطه نانو سامانه لیپوزومی شبه ویروسی

تاریخ دریافت: ۲۰ شهریور ۱۳۹۱ **تاریخ اصلاح:** ۱۲ مهر ۱۳۹۱ **تاریخ پذیرش:** ۲۲ مهر ۱۳۹۱

چکیده

مقدمه: این مطالعه با طراحی یک سامانه انتقالی بر مبنای فسفاتیدیل‌کولین غشایی، یک مدل شبه ویروسی کاملاً ایمن و کارآمد برای انتقال ژن و تولید واکسنهای DNA معرفی می‌کند که قابل استفاده در بسیاری از حیطه‌های علوم پزشکی خواهد بود.

مواد و روشها: به منظور ایجاد یک سامانه شبه سلولی در برگیرنده DNA، طی دو مرحله آبگیری و آب‌دهی پی‌درپی از لیپیدهای DMPC و کلسترول، DNA پلاسمیدی در یک ساختار بسته به خواهد افتاد. خصوصیات ساختار حاصل با بکارگیری الکتروفورز، اسپکتروسکوپی و پراکندگی دینامیک نور مورد بررسی قرارگرفت و پس از بهینه‌سازی خصوصیات ساختاری سامانه، جهت انتقال ژن نشانگر GFP به دودمان سلولی CHO مورد استفاده عملی قرار گرفت و خواص سمی آن بررسی گردید. میزان انتقال ژن توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: سیستم لیپیدی طراحی شده با وجود خنثی بودن از نظر بار الکتریکی سطحی، قادر بود DNA را با درصد بسیار بالا (۹۸٪) در ساختار خود به دام بیندازد. این وزیکولهای لیپیدی شبه ویروسی علاوه بر توانایی انتقال ژن GFP به سلولهای CHO، از پایداری بالایی برخوردار بوده و توانست مولکول DNA را برای مدتی بیشتر از ۶ ماه همچنان در ساختار خود حفظ کند.

نتیجه‌گیری: اگرچه امروزه ساختارهای کاتیونی در کانون توجه تولید واکسنهای DNA هستند، خواص سمی انکارناپذیر این ترکیبات، استفاده از آنها را با چالش روبرو می‌سازد. لذا نتایج امیدوارکننده انتقال ژن توسط سامانه‌های خنثی، روزنه امیدی برای ادامه تحقیقات در این حوزه خواهد بود. از آنجا که ساخت چنین سامانه‌ای هزینه چندانی ندارد، اهمیت به کارگیری چنین سامانه‌ای در همه‌گیریهای رایج در مناطق محروم می‌تواند بسیار مثمر ثمر باشد.

کلید واژه‌ها: وزیکولهای دولایه فسفولیپیدی، لیپوزوم خنثی، ویروس مصنوعی، واکسن DNA

ریحانه رمضانی
مجید صادقی زاده*
مهرداد بهمنش
سامان حسینخانی

گروه نانوبیوتکنولوژی
دانشکده علوم زیستی
دانشگاه تربیت مدرس
تهران، ایران

***نویسنده مسئول:**
استاد گروه نانوبیوتکنولوژی
تلفن: ۴۴۰۹ ۸۲۸۸ ۲۱ (۹۸+)
فکس: ۳۴۶۳ ۸۲۸۸ ۲۱ (۹۸+)
پست الکترونیک: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه حجم عظیمی از مطالعات پزشکی، زیست‌شناسی و شیمیایی به تولید ساختار غیر ویروسی کارآمد برای انتقال ژن به سلول انسانی اختصاص یافته است. با ظهور علم نانوتکنولوژی و تولید نانوساختارهای مختلف و بررسی خصوصیات این ساختارها در بدن موجودات زنده و انسان، ژن درمانی و تولید واکسنهای DNA نوترکیب هم وارد عرصه جدیدی از رشد و نوآوری شده است. در این میان علی رغم کارایی بالای وکتورهای ویروسی در انتقال ژن، به دلیل فعالیت سرطان زایی بالقوه متصور برای این ساختارها و نیز پر هزینه بودن ساخت این وکتورها در شرایط آزمایشگاه، روز به روز استفاده از آنها محدودتر شده و ساختارهای متنوعی از قبیل پلیمرها، پروتئینها، چربیها و بسیاری ساختارهای دیگر وارد این عرصه شده‌اند [۱، ۲]. لیکن این پرسش که کدامیک از این ساختارها آیندهٔ درخشانتری را برای ژن درمانی رقم خواهد زد و در نقش یک ویروس مصنوعی برای درمان بیماریها در خدمت بشریت قرار خواهد گرفت، همچنان ابهام برانگیز و بی‌پاسخ باقی است؟

قدر مسلم آن است که هر چه در ساخت یک حامل الگوبرداری دقیقتری چه از نظر ساختاری و چه عملکردی از ویروسها صورت پذیرد، نتایج درخشانتری حاصل می‌آید [۱]. بسیاری از ساختارهای گزارش شده علی‌رغم عملکرد مناسب در شرایط برون‌تن هنگامی که برای انتقال ژن در بدن موجود زنده به کار گرفته می‌شوند، نتایج رضایت بخشی ندارند [۳، ۴]. مشکل این

Journal of Police Medicine
Fall 2012; Vol. 1, No. 2: 71-80

سیستمها در چیست؟ بنا بر دانسته‌هایمان آنچه که انتقال ژن را نسبت به دارو دشوارتر می‌سازد، وجود بار منفی شدید در سطح مولکول DNA نشأت گرفته از گروهای فسفات است. سطح غشای سلولی نیز به علت برخوداری از فسفولیپیدهای آنیونی همچون سرینها دارای بار منفی است و این امر ورود DNA به سلول را بسیار دشوار می‌سازد. در اغلب تحقیقات صورت گرفته در حیطه انتقال ژن، محققین به دنبال یافتن ساختاری بوده‌اند که از یک سو توانایی برهمکنش با مولکول DNA را داشته باشد و از سوی دیگر بتواند به سد غشای سلولی نفوذ کند، به این خاطر وجود بار مثبت سطحی در اغلب سیستمهای انتقال ژن به چشم می‌خورد [۵]. هر چند که بار مثبت این سیستمها، در رفع مشکل برشمرده کاراست، با این حال مشکل جدیدی را با خود به همراه دارد. سیستم ایمنی موجود زنده به شدت به اجرام خارجی که بار مثبت دارند واکنش نشان داده و به سرعت آنها را از گردش خون خارج می‌سازد، از این رو این ساختارها پایداری بسیار پایینی در جریان خون خواهند داشت [۱، ۲]. از سوی دیگر گزارشات نشان می‌دهد که ساختارهایی با بار مثبت به شدت برای سلولهای زیستی سمی بوده و خاصیت کشندگی دارند. مکانیسم این عمل به خوبی روشن نیست ولی این طور تصور می‌شود که ادغام این ساختارها در ساختار غشای سلولی و دیگر اندامکها که دارای بار منفی هستند توازن باری این ساختارها را بر هم زده و به تدریج اثرات سمی خود را بروز می‌دهد [۲، ۳]. به جهت دلایل برشمرده گسترش مداوم تمایل در به کارگیری ساختارهای سازگارتر با محیط درونی بدن موجود زنده مشاهده می‌شود و شاید بتوان اینگونه عنوان کرد که امروزه محققین به دنبال ساختاری هستند که کاملاً منشاء زیستی داشته باشد تا در صورت رضایت بخشی نتایج در برون تن، با کمترین مشکل ممکن در به کارگیری آنها در شرایط درون تن روبرو شوند [۶، ۷]. ساخت یک ساختار شبه ویروس جهت ورود به سلول انسانی و درمان بیماری از طریق انتقال ژن و دارو به آن سلول همواره همانند رویایی شیرین در میان محققین مطرح بوده است. رویایی که تحقق آن با سرعت چشمگیری که امروزه در پیشرفت سیستمهای انتقالی مشاهده می‌شود، چندان دور از ذهن نخواهد بود[۱۰-۸].

لیپوزومها به دلیل داشتن ساختاری ساده و خودسامانده و در ضمن کم هزینه بودن ساخت آنها از ابتدا توجه اذهان را متوجه خود ساخته بودند. شباهت زیاد این ساختارها به غشای سلولی محققین را بر آن داشت تا از لیپوزومها به عنوان مدلی برای مطالعه عملکرد غشاهای سلولی بهره گیرند [۱۱]. تا کنون اطلاعات بسیار گسترده‌ای از خصوصیات و ساخت این وزیکولهای دولایه فراهم شده است که می‌توان آنها را در طراحی سیستمهای انتقالی به کار گرفت [۱۱]. نخست لیپوزومهای خنثی که عموماً از غشای سلولهای زیستی نشأت گرفته بودند، به دلیل ناتوانی در برهمکنش الکتروستاتیکی با DNA، به مرور در عرصه رقابت با ساختارهای کاتیونی و به ویژه لیپوزومهای کاتیونی به حاشیه رانده شدند. لیپوزومهای کاتیونی با وجود آنکه در شرایط برون تن خیلی موفق ظاهر شدند ولی در بدن موجود زنده سمیت زیادی از خود نشان داده و از پایداری ناچیزی برخوردار بودند [۱]. این در حالی‌است که به کارگیری کاتیونهای چند ظرفیتی نشان داد که می‌توان مشکل عدم وجود بار مثبت سطحی در لیپوزومهای خنثی را با کاتیونهایی همچون Mg^{2+} و Ca^{2+} مرتفع ساخت [۱۷-۱۲]. نتایج بسیار رضایت بخش حاصل آمده از این تحقیق مشخص ساخت که حتی وجود کاتیونها برای انتقال ژن با لیپوزومهای خنثی ضروری نیست و در صورت انتقال و محصور شدن مولکول DNA در فضای داخلی لیپوزوم، دیگر نیازی به برهمکنش سطحی بین آنها وجود ندارد. از مزایای دیگر چنین روشی آن است که از DNA در برابر آنزیمهای نوکلئاز حفاظت بعمل می‌آید.

مواد و روشها

تهیه لیپوزومهای کوچک و یکنواخت:

ابتدا کلسترول و فسفاتیدیل کولینDMPC[1] (شرکت Avanti Polar Lipids، آمریکا) را در حلال آلی کلروفرم حل کرده و بعد از تشکیل فیلم لیپیدی در اثر تبخیر حلال در دستگاه روتاری، با افزودن بافر تریس حاوی ۱۰۰ میلی مولار تره هالوز (محصول شرکت سیگما) به تدریج وزیکولهای لیپیدی تشکیل شدند. برای کوچک و یکنواخت شدن اندازه لیپوزومها از پروب سونیکاتور استفاده و طی ۵ الی ۶ سیکل سونیکاسیون، لیپوزومهایی با اندازه کوچک و منظم حاصل شد. برنامه سونیکاسیون به این شیوه تنظیم شد: ۳۰ ثانیه سونیکاسیون با شدت ۵۰ درصد و سپس ۳۰ ثانیه استراحت. برای حذف ذرات تیتانیوم آزاد شده در محیط، لیپوزومهای شکل گرفته به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی به ظرف دیگر انتقال داده شد [۱۸].

محصور کردن DNA پلاسمید در فضای داخلی لیپوزومها

بعد از تشکیل لیپوزومهای کوچک و همگن، به طور تدریجی محلول حاوی پلاسمید به آنها اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۲ ساعت یا یک شب در دستگاه روتاری خشک شد. پلاسمیدهای مستقر در بین لایه‌های لیپیدی بعد از افزوده شدن آب به تدریج داخل وزیکول‌های در حال تشکیل، محصور شدند [۲۱-۱۸]. برای افزایش پایداری لیپوزومها و همگن شدن

[1]: 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

اندازه آنها، لیپوزومها از منافذ فیلترهای پلی کربناتی که داخل دستگاه Extruder (شرکت Avanti Polar Lipids، آمریکا) تعبیه شده بود، عبور داده شدند [۲۲] و بعد از ۱۱ بار تکرار این آزمایش کاملاً به شکل یکنواخت و هم اندازه درآمدند.

بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم با استفاده از آگاروز ژل الکتروفورز

از جمله روشهای سنجش ورود پلاسمید (DNA) به داخل ساختار لیپوزوم، روش آگاروز ژل الکتروفورز یا همان Gel retardation assay است [۱۷]. در این روش بر اثر به دام افتادن در ساختار لیپوزوم، DNA توانایی حرکت بر روی ژل را از دست می‌دهد. به این ترتیب با انجام الکتروفورز می‌توان اثبات کرد که ساختار DNA یا وارد لیپوزوم شده و یا به سطح آن متصل گردیده است.
جهت انجام این تست بعد از آماده سازی لیپوزومها و مخلوط شدن با بافر loading این مواد بر روی ژل آگاروز قرار گرفتند و الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۴۰ دقیقه صورت گرفت. برای رنگ آمیزی ژل از اتیدیم برمید استفاده گردید. سپس با استفاده از دستگاه Gel doc از ژل عکسبرداری شد.

بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم با استفاده از UV اسپکتروسکوپی

از دیگر روشهای سنجش ورود پلاسمید (DNA) به داخل ساختار لیپوزوم، استفاده از اسپکتروسکوپی است [۱۸]. در این روش ابتدا لیپوزومها با استفاده از دستگاه اولتراسانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰۰ rpm رسوب داده شدند و سپس غلظت DNA در محلول رویی با استفاده از UV اسپکتروسکوپی اندازه‌گیری شد. از آنجایی که غظت اولیه DNA اضافه شده به لیپوزوم از قبل معین بود، به سادگی با محاسبه اختلاف بین این غلظت و غلظتی که از محلول رویی داشتیم، این امکان فراهم گشت تا میزان ورود DNA به لیپوزومها را برآورد کنیم.
برای محاسبه این شاخص به این ترتیب عمل شد:

$$EE\% = [C_t - C_s / C_t] \times ۱۰۰$$

که در آن EE معرف درصد مقدار DNA محصور در لیپوزوم، C_t معرف غلظت اولیه DNA (DNA افزوده شده به لیپوزوم) و C_s نشاندهنده غلظت DNA در محلول رویی بعد از سانتریفیوژ می‌باشد.

مطالعه اندازه و پتانسیل زتا لیپوزومهای ساخته شده با استفاده از دستگاه DLS

بعد از تهیه لیپوزومها و نگهداری آنها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اندازه و پتانسیل زتای آنها با استفاده از DLS مورد بررسی قرار گرفت. جهت جلوگیری از بروز خطا در اندازه‌گیری، نمونه‌ها ابتدا با آب دو بار تقطیر رقیق شده و سپس اندازه‌گیری صورت گرفت. غلظت نهایی لیپوزومها برای سنجش حدودا ۰/۰۲۵ mg/ml بود.

بررسی پایداری ساختار لیپوزومی حاوی DNA

یکی از شاخصهای پایداری سامانه‌های حمل دارو و ژن، میزان رهایش دارو از این ساختارها می‌باشد. به این خاطر میزان رها سازی DNA از ساختار لیپوزومی در زمانهای مختلف طی مدت ۶ ماه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور بعد از گذشت ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴ هفته از ساخت لیپوزومهای حاوی DNA و نگهداری آنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، میزان نشت DNA با دو روش اگاروز ژل الکتروفورز و اسپکتروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی سمیت لیپوزومهای حاوی پلاسمید بر روی سلولهای CHO

به منظور سنجش میزان سمیت از آزمون MTT[1] استفاده شد. بعد از شمارش سلولها و سنجش درصد سلولهای سالم با رنگ‌آمیزی Trypan blue تعداد مناسب سلول (۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) به خانه‌های مورد نظر از پلیت ۹۶ خانه‌ای با حجم نهایی ۲۰۰µl محیط کشت سرم‌دار منتقل شد. بعد از سپری شدن تقریبا ۲۴ ساعت، زمانی که سلولها به کف پلیت چسبیده و به مورفولوژی مناسب هم رسیدند، غلظتهای متفاوتی از لیپوزوم را در هر چاهک ریخته و خوب پیپتاژ کردیم. هر غلظت به صورت تکرار سه تایی مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ۲۰µl از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT را به هر چاهک افزوده و کاملا مخلوط کردیم تا خوب حل شود. معرف ۳-(۴و۵-دی‌متیل تترازولیل)-۲و۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید یا همان MTT که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است، جذب میتوکندری سلولهای فعال از نظر متابولیک شده و در اثر فعالیت آنزیمهای دهیدروژناز، تولید بلور فورمازون بنفش رنگ می‌کند. بعد از حدود ۳-۴ ساعت که کریستالهای بنفش رنگ تشکیل شد، محلول رویی را به طور کامل خارج کرده و ۲۰۰µl از DMSO اضافه شد. سپس بعد از ۵ دقیقه جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر (محصول شرکت Biotek) خوانده شد. در این تست از محصول تجاری

[1]: Methyl Tetrazolium

Journal of Police Medicine
Fall 2012; Vol. 1, No. 2: 71-80

لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (محصول شرکت life technologies، آمریکا) هم به عنوان کنترل استفاده گردید.

انتقال پلاسمید به سلولهای CHO با واسطه لیپوزومها

سلولهای CHO بعد از شمارش سلولی، نخست در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین به پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت سلول، انتقال داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، زمانی که سلولها به کف پلیت چسبیده و به مورفولوژی مناسب رسیدند، غلظتهای مختلفی از لیپوزومهای ساخته شده حاوی پلاسمید به آنها افزوده شد. در ساختار این لیپوزومها از DMPC به تنهایی و یا مخلوط DMPC و کلسترول (با نسبت مولی ۹:۱، ۸:۲، DMPC: Chol و ۹/۵:۰/۵) استفاده گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، کارایی تراریختی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Nikon) و دستگاه فلورسانس پلیت ریدر[1] (Biotek) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر حضور کاتیونها بر افزایش میزان انتقال ژن توسط لیپوزوم ساخته شده

از آنجایی که حضور کاتیونهای دوظرفیتی مثل Mg^{2+} و Ca^{2+} به عنوان یکی از عوامل محرک فرآیند فیوژن [۲۳، ۲۴] بین غشاءهای سلولی و لیپوزومها مطرح می‌باشد [۱۶]، تأثیر این دو کاتیون بر روند انتقال پلاسمید به داخل سلولها مورد مطالعه قرار گرفت. به این ترتیب که همزمان با افزودن لیپوزومهای حاوی پلاسمید به سلولها، غلظتهای متفاوتی از این دو کاتیون هم به محیط کشت اضافه شد. بعد از گذشت ۶ ساعت محیط کشت تعویض شده و محیط کشت تازه حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک، بدون کاتیونهای مورد نظر به سلولها اضافه گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت کارایی تراریختی برپایه بیان[2] GFP با استفاده از فلورسانس پلیت ریدر با نمونه کنترل مقایسه شد. در این آزمایش لیپوزومها بر طبق روش ۲-۲ تهیه شدند و نسبت DMPC: Chol در آنها ۱۰:۰ و ۹:۱ بود.

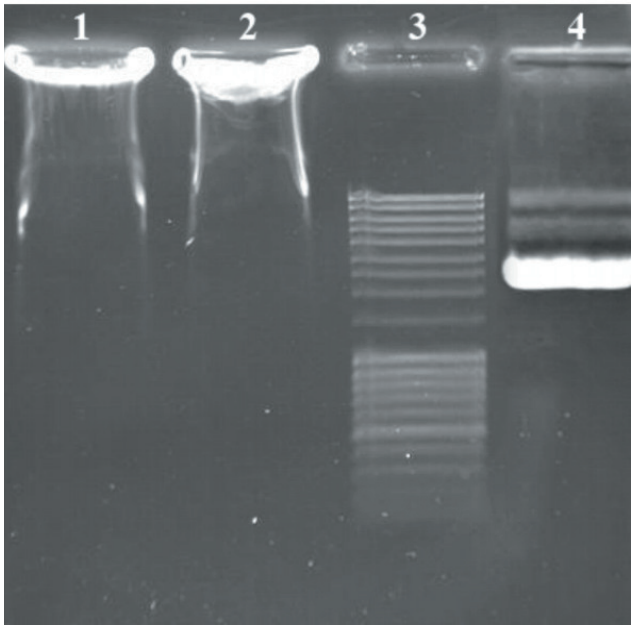
بررسی اثر حضور پلی اتیلن گلیکول بر افزایش میزان انتقال ژن توسط لیپوزوم ساخته شده

از عوامل دیگری که فرآیند فیوژن را تسریع می‌کند، پلیمر پلی اتیلن گلیکول است. نحوه تأثیر این پلیمر در فرآیند ادغام سلولی چندان روشن نیست ولی اینگونه تصور می‌شود این پلیمر با خاصیت آبزدایی بالایی که دارد، شرایط را برای نزدیک شدن غشاءها و آغاز فرآیند ادغام سلولی فراهم می‌کند. همچون کاتیونها این پلیمر هم همراه لیپوزومهای حاوی DNA، به محیط کشت سلول اضافه گردید با این تفاوت که حجم محیط کشت افزوده شده به سلول در این تست کاهش داده شد تا به این ترتیب احتمال تماس لیپوزومها با غشای سلول و آغاز پدیده فیوژن تسریع شود. به این ترتیب غلظتهای متفاوتی از محلول آماده و فیلتر شده PEG در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به سلولها اضافه و نتیجه آن توسط دستگاه فلورسانس پلیت ریدر بررسی شد. در این آزمایش لیپوزومها بر طبق روش ۲-۲ تهیه شدند و نسبت DMPC: Chol در آنها ۱۰:۰ و ۹:۱ بود.

یافته‌ها

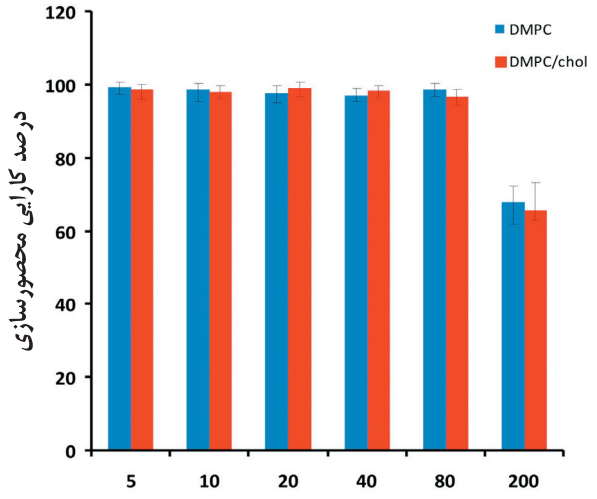
بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم

این انتظار وجود داشت که در صورت محصور شدن در لیپوزوم، پلاسمید توانایی حرکت خود را بر روی ژل در حین الکتروفورز از دست داده و داخل چاهک باقی بماند. همانطور که در شکل۱ مشخص است، پلاسمید به طور کامل داخل لیپوزوم به دام افتاده و به این خاطر نتوانسته است وارد ژل شود. نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی (شکل ۲) هم این نتایج را تاکید می‌کند. در شکل ۲ مشخص است که با افزایش غلظت پلاسمید همواره درصد بسیار بالایی از آن وارد لیپوزوم شده است و تا هنگامی که غلظت پلاسمید به ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی گرم از لیپید برسد این روند همچنان ادامه داشته است.

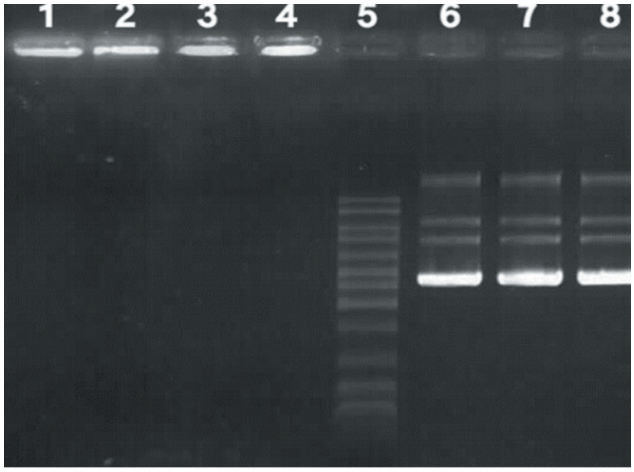


شکل ۱: بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزومهای خنثی توسط آگاروز ژل الکتروفورز.
ردیفهای ۱ و ۲: پلاسمید محصور شده در ساختار لیپوزوم، ردیف ۳: نشانگر مولکولی DNA، ردیف ۴: پلاسمید در حالت آزاد به عنوان کنترل.

[1]:Fluorescence plate reader, [2]:Green fluorescent protein



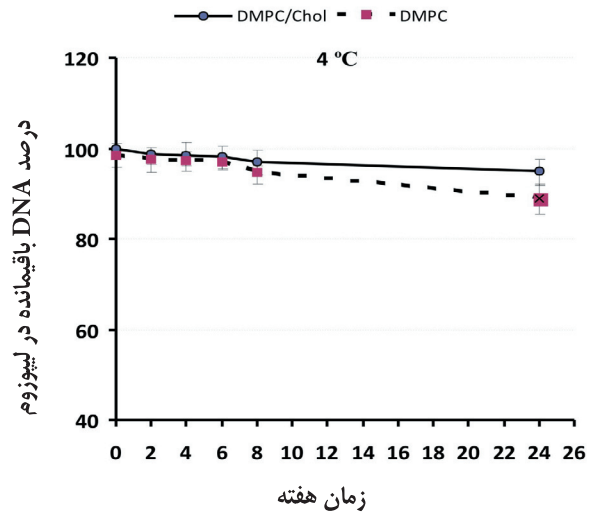
شکل ۲: بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزومهای خنثی با استفاده از UV اسپکتروسکوپی.
لیپوزومهای به کار رفته از کلسترول و DMPC با نسبتهای مولی ۱۰:۰ و ۹:۱ از DMPC:Chol تشکیل شده‌اند.



شکل ۳: بررسی رهایش DNA از لیپوزوم‌ها در طی زمان با استفاده از آگاروز ژل الکتروفورز.
ردیف ۱: لیپوزومهای حاوی DNA بعد از گذشت یک روز از ساخت آنها، ردیف ۲: بعد از یک هفته، ردیف ۳: بعد از یک ماه، ردیف ۴: بعد از ۶ ماه، ردیف ۵: نشانگر مولکولی DNA، ردیف ۶: پلاسمید تخلیص شده به عنوان کنترل، ردیف ۷: پلاسمید خالص بعد از ۱ ماه، ، ردیف ۸: پلاسمید خالص بعد از ۶ ماه. لیپوزومها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی پایداری لیپوزومهای حاوی پلاسمید

در خصوص پایداری این لیپوزومها باید گفت که با گذشت ۶ ماه از ساخت لیپوزومها و نگهداری آنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه نشت DNA از این ساختار دیده نشد. همانطور که نتایج حاصل از آگاروز ژل الکتروفورز (شکل ۳) و اسپکتروسکوپی



شکل ٤: بررسی میزان نشت DNA از ساختار لیپوزوم طی مدت ٦ ماه با استفاده از اسپکتروسکوپی.
لیپوزومها از DMPC: Chol با نسبت مولی ۱۰:۰ و ۹:۱ تشکیل شده بودند. دمای نگهداری ۴ درجه سانتی‌گراد بود. غلظت DNA افزوده شده ۱۰۰µg به ازای ۵mg لیپید بود.

(شکل ۴) نشان می‌دهد، لیپوزومهای به کار رفته در این تحقیق قادرند به خوبی در طی زمان از DNA محافظت بعمل آورده و آنها را در فضای داخلی ساختار خود نگه دارند.

مطالعه اندازه و پتانسیل زتا لیپوزومهای ساخته شده با استفاده از دستگاه DLS

مشاهده عدم تغییر در اندازه و پتانسیل زتای لیپوزومهای حاوی DNA و لیپوزومهای فاقد آن، خود مؤید این مسأله بود که مولکول DNA در داخل ساختار لیپوزوم به دام افتاده است. چون در تهیه لیپوزومها از فیلترهای پلی کربناتی با منافذ ۱۰۰ نانومتری استفاده گردید، تقریباً اندازه تمامی لیپوزومها در همین محدوده مشاهده شد (جدول ۱).

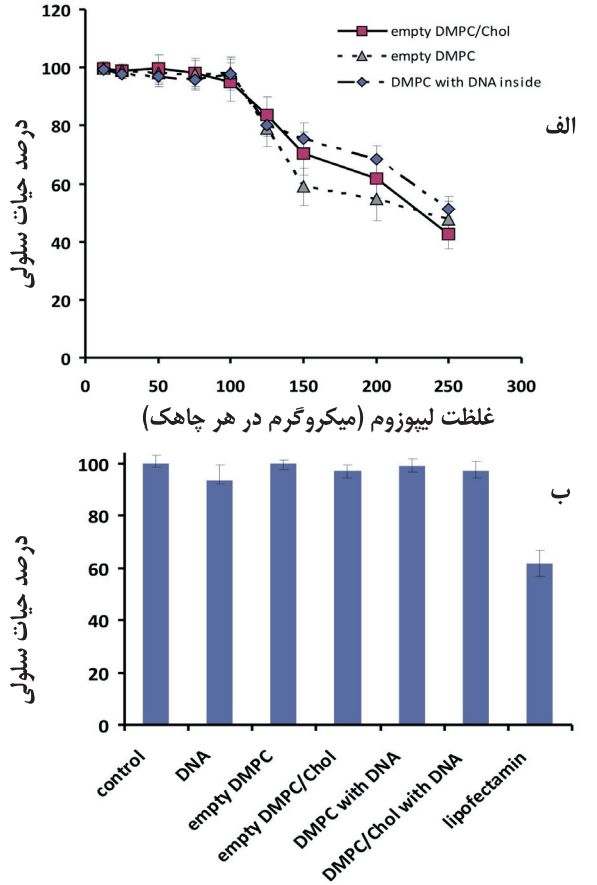
بررسی سمیت لیپوزومها

آن گونه که در شکل ۵–الف نمایان است تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم از لیپوزوم در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود، هیچ گونه سمیتی ملاحظه نمی‌شود. در حالی که لیپوزومهای کاتیونی مانند لیپوفکتامین ۲۰۰۰ با غلظتی بسیار پایینتر، سمیت بالایی از خود نشان می‌دهند. بعد از افزودن ۱ میکرولیتر از لیپوفکتامین تجاری با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر، درصد زیادی از سلولها از بین رفتند (شکل ۵–ب). این در حالی است غلظت افزوده شده از لیپوزومهای خنثی به سلولها ۱۰۰ برابر بیشتر از

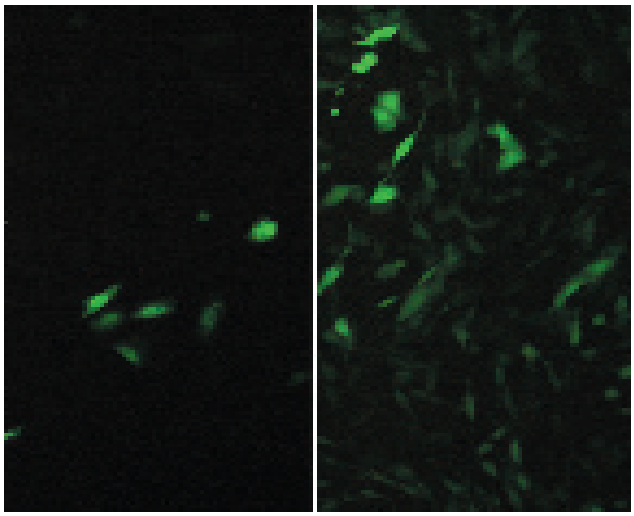
Journal of Police Medicine
Fall 2012; Vol. 1, No. 2: 71-80

نسبت مولی DMPC/Cho	اندازه (نانومتر)	پتانسیل زتا (mv)
لیپوزومهای حاوی پلاسمید		
۸ : ۲	۹۶ ± ۴/۸	−۱۰ ± ۴/۱
۹ : ۱	۹۳ ± ۷/۵	−۱۳/۷ ± ۳
۹/۵ : ۰/۵	۱۲۰ ± ۲۵/۷	−۱۳ ± ۲/۵
۱۰ : ۰	۱۴۹ ± ۱۷/۶	−۲۲/۲ ± ۳
لیپوزومهای فاقد پلاسمید		
۹ : ۱	۹۹/۸۶ ± ۵/۹	−۱۴/۳ ± ۲/۲
۱۰ : ۰	۱۳۵/۷ ± ۱۵/۴	−۱۹/۸ ± ۱/۵

جدول ۱: اندازه و پتانسیل زتای لیپوزومهای حاوی DNA و فاقد آن با استفاده از دستگاه DLS.



شکل ۵: سنجش میزان سمیت ترکیب لیپوزومی حاوی DNA.
(الف) تأثیر غلظتهای متفاوت لیپوزوم ساخته شده، (ب) مقایسه میزان سمیت ترکیبات لیپوزومی ساخته شده با نمونه تجاری (لیپوفکتامین). حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه قرار گرفت. لیپوزومها با نسبت مولی ۹:۱، ۱۰:۰، DMPC:Chol مورد استفاده قرار گرفتند. هر تست به صورت سه بار تکرار بررسی شد.



شکل ٦: بررسی کارایی تراریختی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس.
عکسبرداری بعد از گذشت ۲۴ ساعت از افزودن ترکیب لیپوزومی به سلول صورت گرفت. تصویر سمت راست، نتیجه ترسفکشن سلولهای CHO با استفاده از لیپوزوم متشکل از DMPC/Chol با نسبت مولی ۹:۱ و تصویر سمت چپ، نتیجه ترسفکشن سلولهای CHO با استفاده از لیپوفکتامین تجاری ۲۰۰۰.

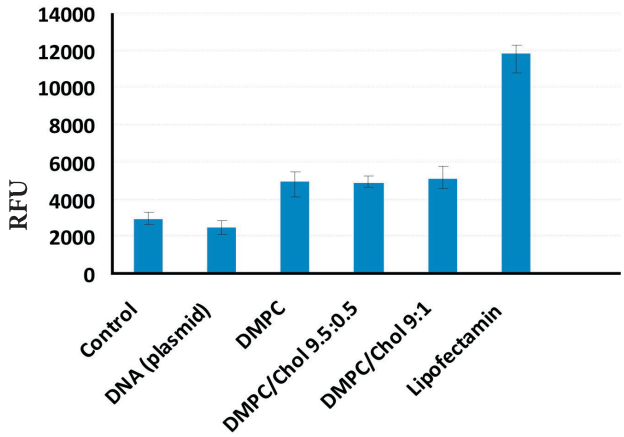
این مقدار بوده با این وجود سمیتی هم برای سلولها مشاهده نشده است.

انتقال پلاسمید محصور شده در ساختار لیپوزوم به سلولهای CHO

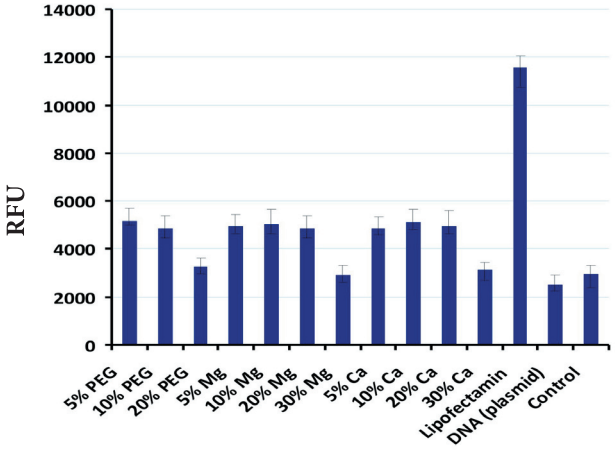
به جهت اینکه پلاسمید به کار رفته در این تحقیق (psiRNA-hH1GFP) حاوی ژن GFP تحت پروموتر CMV بود، از خاصیت فلورسانت این پروتئین برای پیگیری روند انتقال ژن استفاده شد. ۲۴ ساعت بعد از تأثیر لیپوزومها میزان انتقال ژن با استفاده از روش میکروسکوپی (شکل ۷) و اسپکتروسکوپی (شکل ۸) مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در شکل ۷ مشخص است، با آن که این وزیکولهای خنثی علی رغم تمامی موانع برای ورود به سلول، قادر به انتقال ژن به هسته سلول و بیان آن گشتند ولی این میزان در مقایسه با لیپوزومهای کاتیونی تجاری همچون لیپوفکتامین کمتر بود.

بررسی اثر حضور کاتیونهای دوظرفیتی و پلی اتیلن گلیکول بر افزایش میزان انتقال ژن توسط لیپوزوم

نتایج حاصل از فلوریمتری (فلورسانس پلیت ریدر) نشان می‌دهد که حضور کاتیونها هیچ‌گونه تأثیری در روند انتقال ژن ندارد و حتی در مواردی که غلظت بالایی از آن به سلولها افزوده شد، اثر سمیت هم از خود نشان دادند. به علاوه اینکه افزودن



شکل ۷: بررسی کارایی تراریختی با استفاده از فلورسانس اسپکتروسکوپی (فلورومتری).
بعد از گذشت ۲۴ ساعت از افزودن ترکیبات مختلف DMPC/Chol با استفاده از دستگاه فلورسانس پلیت ریدر، بیان ژن نشانگر GFP مورد بررسی قرار گرفت. (RFU: Relative fluorescence unit)



شکل ۸: بررسی اثر کاتیونهای دوظرفیتی و پلی اتیلن گلیکول بر افزایش بیان ژن توسط لیپوزومها.
لیپوزومهای به کاررفته با نسبت مولی ۹:۱ DMPC/Chol انتخاب شدند. بیان ژن GFP ۲۴ ساعت بعد از ترسفکشن با استفاده از فلورسانس پلیت ریدر مورد بررسی قرار گرفت.

پلیمر پلی اتیلن گلیکول هم نقشی در افزایش انتقال ژن به سلولها نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه محققین بر این باورند که کسب موفقیت در طراحی یک سیستم کارآمد برای انتقال ژن و رفع مشکلات مطرح در سامانه‌های انتقالی موجود، در گرو الگوبرداری هر چه بهتر و دقیقتر از ویروسها است [۱]. ایجاد یک ویروس مصنوعی نه برای کشتن انسان بلکه برای درمان بیماریها همواره چون رویایی جذاب ذهن محققین را درگیر خود ساخته است. دست‌یابی به یافته‌های جدید و بسیار متحیر کننده در خصوص منشأ حیات و ساختن سلول مصنوعی تحقق این رویا را دست‌یافتنی‌تر کرده است [۲۵]. در حال حاضر این فرضیه که ساختارهای خودسامانده دو لایه لیپیدی همان سلولهای ابتدایی هستند، به شدت حمایت می‌شود [۲۶، ۲۷]. ساختار ساده و خود سامانده لیپوزومها از دیرباز توجه محققین را به خود جلب کرده است. مزیت منحصر به فرد لیپوزومها در توانایی محصورسازی ترکیبات گوناگون اعم از ماکرومولکولهای بیولوژیکی مانند DNA, RNA, Protein و یا مواد کوچکی مثل داروها، نوکلوتیدها و یونها داخل ساختار خود خلاصه نمی‌شود بلکه آنها حتی قادرند این مواد را به طور همزمان در ساختار خود به دام بیاندازند [۲۷]. گزارشات موجود گواه این حقیقت است که توانایی قرارگیری تمامی اجزای لازم برای رونویسی، ترجمه و تولید پروتئین داخل ساختار لیپوزوم، همان سیستمی که به سلول مصنوعی معروف است، وجود دارد [۲۵، ۲۶]. این ویژگی خاص، این ساختارها را از دیگر حاملهای غیر ویروسی کاملا متمایز کرده و با به‌کارگیری آن می‌توان کار درمان بیماری را با انتقال دارو و ژن به طور همزمان دنبال کرد و به این ترتیب اثر درمان را فوق‌العاده افزایش داد.

در این تحقیق سعی بر آن بود که نشان داده شود، با استفاده از وزیکولهای دولایه فسفولیپیدی که کاملا منشاء زیستی دارند می‌توان DNA را در یک فضای بسته و محصور شده به دام انداخت. نتایج حاصل مبین آن بود که نه تنها عدم وجود بار مثبت بر سطح لیپوزومها هیچ گونه مزاحمتی بر این روند ندارد بلکه حتی وجود کاتیونها هم برای این پدیده خودساماندهی ضرورتی ندارد [۲۸، ۲۹]. ما با تولید و معرفی سیستم حاضر قصد داشتیم این حقیقت را آشکار سازیم که همچنان ساختارهایی که منشا زیستی دارند؛ می‌توانند به عنوان بهترین کاندیدا برای طراحی سیستم‌های انتقالی به حساب آیند [۳۰] و قادرند با کارایی بسیار بالا (٪۹۸) ساختار DNA را در خود جای دهند و از آنها در مقابل آنزیمهای تخریب کننده محافظت کنند. از آنجایی که لیپوزومهای خنثی منشأ گرفته از غشاء زیستی با وجود مزیتهای بسیار فراوان، به دلیل عدم توانایی ایجاد برهمکنش با اسیدهای نوکلئیک برای مدت زمان طولانی چندان مورد توجه دانشمندان در طراحی سامانه‌های انتقالی نبوده‌اند [۱]، هدف اصلی این تحقیق برآن بود با معرفی این ساختارها به عنوان یکی از پایدارترین و ایمن‌ترین سیستمهای موجود برای انتقال دارو و ژن، بار دیگر توجه محققین را به این سیستمها به عنوان حامل DNA و ژن معطوف نماید. علی رغم تمامی

تردیدهایی که در راستای ورود این سامانه فسفولیپیدی خنثی به سلولها وجود داشت، این سامانه توانست به خوبی ژن مربوط به پروتئین نشانگر GFP را به سلولهای یوکاریوتی CHO منتقل سازد. گرچه میزان این انتقال در مقایسه با لیپوزومهای کاتیونی تجاری کمتر بود ولی عدم وجود خاصیت سمی در این سامانه، استفاده از آن به عنوان جایگزینی برای سامانه‌های کاتیونی موجود را در اولیت قرار می‌دهد. هر چند دستیابی به چنین هدفی مطالعات و تحقیقات گسترده‌ای را در این راستا طلب می‌کند، اما دورنمای آن از آینده قریب‌الوقوعی خبر می‌دهد که در آن لیپوزومهای خنثی نشأت گرفته از غشای سلولی، به عنوان کارآمدترین وکتورها برای انتقال همزمان DNA, RNA, proteins و همچنین دارو به سلولهای انسانی به مجامع علمی معرفی گردند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت مالی و معنوی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است، بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع

1. Pisani M, Mobbili G, Bruni P. Neutral liposomes and DNA transfection. In: Non-viral gene therapy. Edited by Yuan X. Rijeka, Croatia. InTech, 2011; 319-348.

2. Elsabahy M, Nazarali A, Foldvari M. Non-viral nucleic acid delivery: key challenges and future directions. Curr Drug Deliv 2011; 8: 235-244.

3. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery. Chem Rev 2009; 109: 259-302.

4. MacLachlan I, Cullis PR, Graham RW. Synthetic virus systems for systemic gene therapy. In: Gene therapy: therapeutic mechanisms and strategies. Edited by Smythe-Templeton N, Lasic D. New York, Marcel Dekker, 2000, 267-290.

5. Wiethoff CM, Gill ML, Koe GS, Koe JG, Russell MC. The structural organization of cationic lipid-DNA complexes. J Biol Chem 2002; 277: 44980–44987.

6. Tresset G, Cheong WC, Tan YL, Boulaire J, Lam YM. Phospholipid-based artificial viruses assembled by multivalent cations. Biophys J 2007; 93: 637-644.

7. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. Biosci Rep 2002; 22: 129-150.

8. Deamer D. A giant step towards artificial life. Trends Biotechnol 2005; 23: 336-338.

9. Dzieciol AJ, Mann S. Designs for life: protocell models in the laboratory. Chem Soc Rev 2012; 41: 79-85.

10. Walde P. Building artificial cells and protocell models: experimental approaches with lipid vesicles. Bioessays 2010; 32: 296-303.

11. Wilschut J, Hoekstra D. Membrane fusion: from liposomes to biological membranes. Trends Biochem Sci 1984; 9: 479-483.

12. Mozafari MR, Omri A. Importance of divalent cations in nanolipoplex gene delivery. J Pharm Sci 2007; 96: 1955-1966.

13. Pisani M, Bruni P, Caracciolo G, Caminiti R, Francescangeli O. Structure and phase behavior of self-assembled DPPC-DNA-metal cation complexes. J Phys Chem B 2006; 110: 13203-13211.

14. Suleymanoglu E. Phospholipid-nucleic acid recognition: energetics of DNA-Mg^{2+}-phosphatidylcholine ternary complex formation and its further compaction as a gene delivery formulation. PDA J Pharm Sci Technol 2006; 60: 218-231.

15. Bruni P, Pisani M, Amici A, Marchini C, Montani M, Francescangeli O. Self-assembled ternary complexes of neutral liposomes, deoxyribonucleic acid, and bivalent metal cations. Promising vectors for gene transfer. Appl Phys Lett 2006; 88: 073901-073903.

16. Fraley R, Subramani S, Berg P, Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. J Biol Chem 1980; 255: 10431-10435.

17. Perrie Y, Gregoriadis G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. Biochim Biophys Acta 2000; 1475: 125-132.

18. Kudsiova L, Arafiena C, Lawrence MJ. Characterisation of chitosan-coated vesicles encapsulating DNA suitable for gene delivery. J Pharm Sci 2008; 97: 3981-3997.

19. Gregoriadis G, Saffie R, Hart SL. High yield incorporation of plasmid DNA within liposomes: effect on DNA integrity and transfection efficiency. J Drug Target 1996; 3: 469-475.

20. Gregoriadis G, Bacon A, Caparros-Wanderley W, McCormack B. Plasmid DNA vaccines: entrapment into liposomes by dehydration-rehydration. Methods Enzymol

2003; 367: 70-80.

21. Mugabe C, Azghani A, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. Int J Pharm 2006; 307: 244-250.

22. Mayer LD, Bally MB, HopeMJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. Chem Phys Lipids 1986; 40: 333-345.

23. Knoll G, Burger KN, Bron R, Van-Meer G, Verkleij AJ. Fusion of liposomes with the plasma membrane of epithelial cells: fate of incorporated lipids as followed by freeze fracture and autoradiography of plastic sections. J Cell Biol 1988; 107: 2511-2521.

24. Valenzuela SM. Liposome techniques for synthesis of biomimetic lipid membranes. In: Nanobiotechnology of biomimetic membranes. Edited by Martin D. US, Springer, 2007, 75-87.

25. Kurihara K, Tamura M, Shohda K, Toyota T, Suzuki K, Sugawara T. Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. Nat Chem 2011; 3: 775-781.

26. Maurer SE, Monnard PA. Primitive Membrane Formation, Characteristics and Roles in the Emergent Properties of a Protocell. Entropy 2011; 13: 466-484.

27. Monnard PA, Luptak A, Deamer DW. Models of primitive cellular life: polymerases and templates in liposomes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2007; 362: 1741-1750.

28. Kuvichkin VV. Investigation of ternary complexes: DNA-phosphatidylcholine liposomes-Mg^{2+} by freeze-fracture method and their role in the formation of some cell structures. J Membr Biol 2009; 231: 29-34.

29. Manavbasi Y Suleymanoglu E. Nucleic acid-phospholipid recognition: Fourier transform infrared spectrometric characterization of ternary phospholipid-inorganic cation-DNA complex and its relevance to chemicopharmaceutical design of nanometric liposome based gene delivery formulations. Arch Pharm Res 2007; 30: 1027-1040.

30. Bruni P, Francescangeli O, Marini M, Mobbili G, Pisani M, Smorlesi A. Can neutral liposomes be considered as genetic material carriers for human gene therapy. Mini Rev Org Chem 2011; 8: 38-48.