TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرداد ۱۳۹۹، دوره ۷۸، شماره ۵، صفحه‌های ۲۸٤ تا ۲۹۲ مقاله اصیل

بررسی لیپوپلیمرهای حاوی نانولیپوزوم و پلی‌اتیلن ایمین برای انتقال ژن به رده سلولی PC3 سرطان پروستات

محمد حسن جعفری نجف‌آبادی[۱،‡]، سعیده عسکریان[۲و۳‡]، رضا کاظمی اسکویی[۱]، بیژن ملائکه نیکویی[٤]، مهدی رضایی[۱]، سید حمید آقایی بختیاری[۱و٥*]

۱- گروه زیست فناوری و نانوفناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران.
۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران.
٤- مرکز تحقیقات نانوفناوری، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
٥- هسته تحقیقات بیوانفورماتیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
‡ محمد حسن جعفری نجف‌آبادی و سعیده عسکریان به‌صورت مشترک نویسنده اول هستند.

*نویسنده مسئول: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، طبقه سوم، گروه زیست فناوری پزشکی.
تلفن: ۳۸۰۰۲۳۰۰-۰۵۱
E-mail: Aghaeibh@mums.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۰۲ ویرایش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۳ آنلاین: ۱۳۹۹/۰۵/۳۰

زمینه و هدف: نانوحامل‌های غیرویروسی مثل لیپوزوم‌ها و پلیمرهای کاتیونی دارای قابلیت دستورزی بسیاری به منظور انتقال ژن به سلول‌ها هستند. با این وجود کارایی انتقال آن‌ها کمتر از ویروس‌ها است. هدف از این مطالعه، ترکیب لیپوزوم‌ها و پلیمرهای کاتیونی برای تهیه لیپوپلی‌پلکس و بهره‌برداری از خصوصیات مطلوب لیپوزوم و پلیمر به‌صورت هم‌زمان می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه مداخله‌ای-تجربی در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد از فروردین تا بهمن ۱۳۹٦ انجام گرفت. در این مطالعه، لیپوپلی‌پلکس‌هایی بر پایه PEI (پلی‌اتیلن ایمین) و با وزن مولکولی ۲۵ و ۱۰ کیلو دالتون و نسبت لیپوزوم به پلیمر ۱ به ۱ با استفاده از پلاسمید حاوی نشانگر GFP (پروتیین فلورسنتی سبز) تهیه گردید. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی حامل‌های سنتز شده مانند اندازه، سمیت سلولی (متغیرهای اصلی) و ارتباط آن‌ها با قابلیت انتقال ژن در سلول‌های سرطان پروستات انسانی (PC3) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: تمامی لیپوپلی‌پلکس‌ها در C/P=۰/٤ با پایه هر دو وزن مولکولی PEI (پلی‌اتیلن ایمین) قادر به افزایش ترانسفکشن نسبت به حامل‌های پایه (پلی‌اتیلن ایمین و لیپوزوم) بود (P<۰/۰۵، P<۰/۰۰۱)، درحالی‌که سمیت سلولی کمتری نیز نسبت به لیپوزوم دست ورزی نشده نشان می‌داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد لیپوپلی‌پلکس حاصل از ترکیب PEI (پلی‌اتیلن ایمین) و لیپوزوم می‌تواند در مقادیر کم به‌صورت کارآمدی ژن را به سلول منتقل نماید درحالی‌که سمیت کم سلولی و اندازه مناسبی در مقیاس نانو دارد.

کلمات کلیدی: تکنیک‌های انتقال ژنی، لیپوزوم‌ها، سلول‌های PC-3، انتقال ژنی.

مقدمه

با وجود گذشت چندین سال از ابداع روش‌های مختلف ژن درمانی و پروژه ژنوم انسان، انتقال کارآمد اولیگونوکلئوتیدها یا مواد ژنتیکی به سلول‌ها هنوز مهمترین چالش در فرآیند ژن درمانی بیماری‌های بسیاری از جمله سرطان‌ها است.[۱] حامل‌های انتقال ژنی به دو گروه اصلی حامل‌های ویروسی و غیرویروسی برای انتقال DNA پلاسمیدی، siRNA، mRNA و miRNA تقسیم می‌شوند. سیستم‌های ویروسی کارآیی بالایی دارند و قابلیت ترانسفکشن (انتقال ژنی) خوبی از خود نشان داده‌اند و چندین مطالعه کارآزمایی بالینی با استفاده از حامل‌های ویروسی در حال بررسی است.[۲و۳] با این‌حال مواردی شامل ظرفیت پایین حامل‌های ویروسی (قابلیت انتقال

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]

ژن‌های بزرگ برای کاربردهای بالینی ضروری است)، احتمال فعال کردن پروتو آنکوژن‌ها به‌دلیل ورود تصادفی به ژنوم، القا پاسخ‌های ایمنی قوی (که تزریق‌های مکرر را محدود می‌کند) و مشکلات در تولید انبوه آن‌ها مهمترین مشکل در استفاده از این نوع حامل‌ها می‌باشد.[۴] به‌عنوان مثال بیمار جوانی در سال ۱۹۹۹ به‌دلیل تزریق حامل آدنوویروسی فوت گردید و دو بیمار دیگر در سال ۲۰۰۲ با بیماری نقص ایمنی شدید (SCID)، پس از تزریق حامل رتروویروسی علایمی از لوسمی را نشان دادند.[۵و۶]

سیستم‌های انتقال ژنی لیپوپلی‌پلکس (LPP) ترکیبی از مولکول‌های پلی‌نوکلئوتیدی، لیپوزوم و پلیمر کاتیونی با اتصالات غیرکوالانسی هستند که هم خصوصیات مطلوب لیپوپلکس شامل پایداری بالا، برداشت سلولی قابل قبول و سمیت پایین و هم ویژگی‌های مناسب پلی‌پلکس از جمله قابلیت ترانسفکشن بالا، سایز کوچک و قابلیت فرار از آندوزوم برای انتقال ماده ژنتیکی به سلول را دارا می‌باشند.[۷] لیپوپلی‌پلکس افزون‌بر مزایایی که بیان شد به‌دلیل دارا بودن سطح گسترده، قابلیت اتصال گروه‌های عملکردی بسیاری را به واحد لیپوزومی یا پلیمری دارد و به‌عنوان یک واحد قابل دسترزی مطرح شده است. بنابراین با توجه به ترکیب لیپوزوم و نوع پلیمر، مدل‌های مختلفی از لیپوپلی‌پلکس برای انتقال ماده ژنتیکی ساخته شده است. به‌عنوان مثال لیپوپلی‌پلکس حاوی دگزامتازون متصل شده به پلی‌اتیلن ایمین برای انتقال ژنی به سلول‌های نوروبلاستومای موشی Neuro2A استفاده شده است.[۸]

رایجترین پلیمر مطالعه شده در ساختار لیپوپلی‌پلکس‌ها، پلی‌اتیلن ایمین (PEI) است که قابلیت انتقال ژنی این پلیمر به وزن مولکولی آن بستگی دارد. PEI با وزن مولکولی بالا قابلیت ترانسفکشن خوبی دارند اما سمیت بسیاری نیز نشان می‌دهد، بنابراین مطالعات بسیاری با اتصال عوامل مختلف به این پلیمر برای کاهش سمیت سلولی همراه با حفظ قابلیت ژن رسانی صورت گرفته است. از طرف دیگر برخی مطالعات به استفاده از PEI هایی با وزن مولکولی پایین‌تر و یا ترکیب آن‌ها با لیپوزوم‌ها پرداخته‌اند.[۹] از این‌رو با کاهش مقادیر PEI در ساختار لیپوپلی‌پلکس، سمیت کمتری نیز انتظار می‌رود.[۱۰و۱۱] هدف از این مطالعه، ترکیب پلی‌اتیلن ایمین‌های با دو وزن مولکولی متفاوت (۲۵ و ۱۰ کیلودالتون) و لیپوزوم حاوی کلسترول به‌منظور تهیه لیپوپلی‌پلکس با اندازه در مقیاس نانو بود.

روش بررسی

این مطالعه مداخله‌ای-تجربی در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد از فروردین تا بهمن ۱۳۹۶ انجام گرفت. مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل، پلی‌اتیلن ایمین شاخه‌دار (وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون)، پلی‌اتیلن ایمین شاخه‌دار (وزن مولکولی ۱۰ کیلودالتون، (Polysciences, Inc., Pennsylvania, USA)، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، معرف ۳-(٤و٥-دی‌متیل تترازولیل)-۲و٥ – دی‌فنیل تترازولیوم یا MTT (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا)، کلسترول و فسفولیپید کاتیونی ۱و۲-دی اولئیل-۳-تریمتیل آمونیوم پروپان (DOTAP)، محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی FBS، پنی‌سیلین، استرپتوماسین، گلوتامین، تریپسین (Gibco TM, Germany)، پلاسمید pEGFPN1 (Promega Corporation, Wisconsin, USA) و رده سلول PC3 و HEK-293 از انستیتو پاستور ایران می‌باشد.

روش مورد استفاده برای تولد لیپوزوم‌ها روش تبخیر حلال (Solvent evaporation) بود. فسفولیپید DOTAP و کلسترول با نسبت مولی ۱ به ۱ در حلال کلروفورم: متانول (با نسبت ۲ به ۱) حل گردید. پس از تبخیر حلال آلی با استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوّار (روتاری) لایه نازک لیپید تشکیل شده با استفاده از آب دیونیزه آبدهی شد. لیپوزوم‌های شکل گرفته به مدت دو ساعت در دمای محیط نگهداری شد و برای کاهش اندازه، لیپوزوم‌های ساخته شده از فیلترهای کربوهیدراته با اندازه‌ی ۱، ۰/۸، ۰/٤ و ۰/۱ µm عبور داده شد.

حجم مساوی از پلی‌اتیلن ایمین (غلظت ۱ mg/ml) و لیپوزوم (غلظت ٦ mg/ml) با یکدیگر در دمای محیط، ترکیب شدند تا لیپوپلیمر PEI/Liposome به‌دست آید. مقادیر مورد نیاز از لیپوپلیمرهای سنتز شده بر حسب نسبت وزنی پلیمر PEI به پلاسمید (C/P) برای مقادیر ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ در محیط کشت سلولی بدون سرم (pH 7.4) حل شد و با مقادیر مورد نیاز از پلاسمید حل شده در محیط کشت بدون سرم مخلوط گردید و برای تشکیل لیپوپلی‌پلکس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد.

اندازه ذرات برای لیپوپلی‌پلکس‌ها، با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی Dynamic light scattering (DLS) و لیزر داپلر سرعت‌سنج

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]

Laser doppler velocimeter (LDV) در Zetasizer - From Malvern Panalytical, UK و در دمای محیط اندازه‌گیری شد. مقدار مورد نظر از لیپوپلی‌پلکس‌های سنتز شده در ۱۵۰ µl آب مقطر دوبار تقطیر فیلتر شده در pH فیزیولوژیکی (pH 7.4) رقیق شد و با ۱۵۰ µl محلول pDNA (غلظت ۱ mg/ml پلاسمید) مخلوط گردید و برای تشکیل پلی‌پلکس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۷۰۰ µl آب اضافه شد و اندازه ذرات بررسی شد. مقادیر گزارش شده پس از سه بار اندازه‌گیری، به‌عنوان میانگین±SD ارایه گردیده است.

پلاسمید pEGFPN1 (کد کننده پروتیین GFP، تحت پروموتر سایتومگالوویروسی) درون باکتری *اشریشیا کلی* DH5α منتقل گردید و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید عاری از آندوتوکسین (QIAGEN, Germany) طبق دستور شرکت سازنده استخراج گردید. غلظت و درجه خلوص پلاسمیدهای حاصله در طول موج A260 و نسبت A260/280 با استفاده از اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, Pharmaspec, Shimadzu, Japan) بررسی گردید. پلاسمیدهای با خلوص بالا و در بیشترین حالت سوپرکویل پس از تایید با الکتروفورز برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

سلول‌های PC3 (سرطان پروستات انسانی) با مشخصات سلولی ATCC:CRL-1435 و رده سلولی HEK-293 (سلول‌های کلیه جنینی انسان) با مشخصات سلولی ATCC:CRL-1573 در محیط کشت DMEM (حاوی 1g/l گلوکز، ۲ mmol گلوتامین) با ۱۰٪ سرم گاوی (FBS)، محلول آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰ (واحد/میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) در دمای ۳۷ °C در انکوباتور حاوی ۵٪ CO2 کشت داده شدند. سلول‌ها به تعداد ۷۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت ۹٦ خانه کشت داده شدند و پیش از انجام تست‌های سمیت و ترانسفکشن، به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار داده شدند.

به‌منظور بررسی سمیت لیپوپلی‌پلکس‌های سنتز شده و میزان زنده ماندن سلول‌ها از آزمایش MTT با استفاده از معرف ۳-(٤و۵-دی متیل تترازولیل)-۲و۵ -دی فنیل تترازولیوم استفاده شد، MTT یک روش رنگ‌سنجی بر پایه تشکیل کریستال‌های فورمازان در سلول‌های زنده است و از قابلیت تکرارپذیری و دقت چشمگیری برخوردار است. از لیپوپلیمرهای سنتز شده بر حسب نسبت وزنی پلیمر PEI به پلاسمید (C/P) برای مقادیر ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ (w/w) به‌منظور لیپوپلی‌پلکس‌های مختلف استفاده شد. لیپوپلی‌پلکس‌ها حاوی ۰/٤ µg پلاسمید به ازای هر چاهک پلیت ۹٦ خانه در C/P های بیان شده بودند. لیپوپلی‌پلکس‌ها در محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک در حجم ۲۰ µl تهیه و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط به هر چاهک اضافه گردید. پس از چهار ساعت محیط کشت سلول‌ها خارج شد و مقدار ۱۰۰ µl محیط گرم حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک اضافه گردید. پلیت به مدت ۲٤ ساعت درون انکوباتور کشت سلول قرار داده شد. به‌منظور بررسی فعالیت متابولیک (MTT) مقدار ۲۰ µl از معرف MTT با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد و به مدت دو ساعت در ۳۷ °C انکوبه گردید. پس از آن محلول رویی را به‌طور کامل خارج نموده و مقدار ۱۰۰ µl DMSO به‌منظور حل کریستال‌های فورمازان تشکیل شده، به هر چاهک اضافه شد، پس از پنج دقیقه، جذب در طول موج ۵٤۰ nm با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (Bio Tek epoch plate reader, USA) بررسی گردید. فعالیت متابولیسم نسبی به‌صورت درصد جذب سلول‌های تیمار شده با نانوحامل نسبت به سلول‌های کنترل بیان شد.

آزمایش‌های ترانسفکشن (انتقال ماده ژنی) در شرایط مشابه با همان مقدار لیپوپلی‌پلکس‌های مورد استفاده برای آزمایش سمیت سلولی انجام گرفت. همانند آزمایش سمیت سلولی پس از مجاورت ٤ ساعته پلی‌پلکس‌ها با سلول، محیط آن‌ها با محیط کامل تعویض گردید. پس از ۲٤ ساعت محیط سلول‌ها خارج شد و سلول‌ها با استفاده از ۱۰۰ µl بافر لیزکننده (Promega GmbH, Germany) تخریب شدند تا محتوی پروتیینی آن‌ها آزاد شود. جذب فلورسنت در طول موج ۵۱۰/٤٦۰ nm با استفاده از دستگاه فلورسنت اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, PerkinElmer®, USA) مورد بررسی قرار گرفت. از سلول‌های سبز رنگی که ترانسفکت شده بودند نیز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Japan) عکسبرداری شد.

داده‌های ترانسفکشن، سمیت سلولی و سایز ذرات به‌صورت میانگین سه تکرار به‌همراه SD± بیان شده اند و مقایسه آماری توسط واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) انجام شد. جهت مشخص نمودن اختلاف بین گروه‌ها از آزمون Tukey Kramer استفاده شد. مقادیری از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد که حداقل، درجه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]

اطمینان ۹۵٪ را داشته باشند. به‌عبارت دیگر، در این پژوهش، بیشترین میزان عدم اطمینان (Probability) پذیرفته شده ۵٪ (P<۰/۰۵) می‌باشد.

نانوحامل‌هایی که ویژگی‌های فیزیکی مطلوب مانند اندازه مقیاس نانو و تایید اتصال PEI را داشته باشند وارد مطالعه شده و قابلیت ترانسفکشن و سمیت نانوحامل‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نانوساختارهای بزرگتر از ۲۰۰ nm و پلیت سلولی آلوده از مطالعه حذف شد.

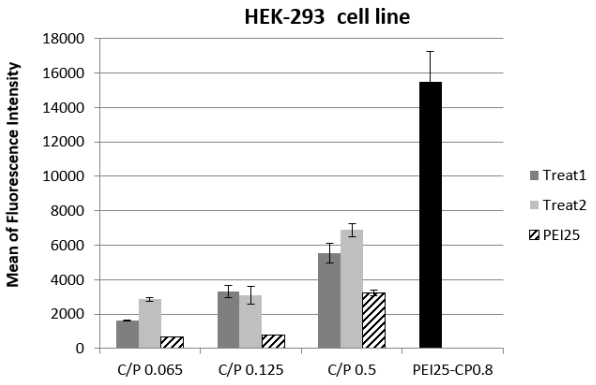
یافته‌ها

در این مطالعه، لیپوپلی‌پلکس‌هایی با ترکیب پلیمر پلی‌اتیلن ایمین و لیپوزوم با پلاسمید حاصل گردید. اندازه ذرات ۱۰٤/۱ nm به‌دست آمد. اندازه لیپوپلی‌پلکس در مقایسه با پلیمر و لیپوزوم به تنهایی ۹۸ nm افزایش را نشان می‌دهد اما قطر آن کمتر از ۲۰۰ nm می‌باشد. به‌منظور بهینه‌سازی فرایند ترانسفکشن تعدادی آزمایشات مقدماتی بر روی سلول‌های HEK-293 که به‌عنوان رده سلولی که به سهولت حامل‌های ژنی را می‌پذیرند و به‌عنوان استانداردی برای بررسی کارایی ترانسفکشن استفاده می‌شوند، صورت گرفت.[۱۲]

بیان پروتیین سبز رنگ GFP در سلول‌های ترانسفکت شده با دستگاه فلوریمتر بررسی شد. از جمله آزمایش‌های بهینه‌سازی می‌توان به بررسی زمان مناسب برای بررسی بیان ژن GFP، حضور یا عدم حضور سرم در طول چهار ساعت مجاورت لیپوپلی‌پلکس با سلول و نحوه تهیه لیپوپلی‌پلکس اشاره نمود. بهترین زمانی که سلول‌های HEK بیان ژن منتقل شده را نشان می‌دادند ٤٨ ساعت بود. گرچه به‌نظر می‌رسید سلول‌ها زمانی که در حضور سرم در مجاورت لیپوپلی‌پلکس قرار داشتند، بقا بهتری نشان می‌دهند (معنادار نبود) اما قابلیت ترانسفکشن به‌طرز چشمگیری کاهش یافت. ازاین‌رو در پژوهش‌های آتی بر روی سلول‌های PC3، لیپوپلی‌پلکس‌ها در عدم حضور سرم، به مدت چهار ساعت با سلول هدف مجاور شدند.

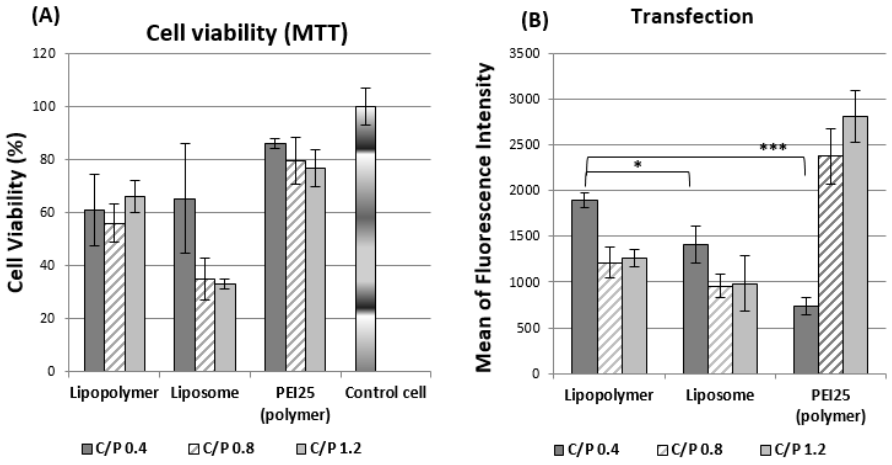
در مورد تهیه لیپوپلی‌پلکس دو حالت مورد بررسی قرار گرفت. حالت اول اینکه: "پلیمر با پلاسمید، پلی‌پلکس تشکیل بدهد و سپس در ترکیب با لیپوزوم، لیپوپلی‌پلکس ایجاد کند و یا این‌که در حالت دوم ابتدا پلیمر و لیپوزوم با یکدیگر ترکیب شده و سپس در مجاورت پلاسمید ، لیپوپلی‌پلکس تشکیل دهند (نمودار ۱). داده‌های ترانسفکشن تفاوت معناداری بین این دو روش نشان نداد و با توجه به مقالات مشابه و تجربه گذشته، روش دوم برای ادامه آزمایشات بر روی سلول‌های PC3 انتخاب گردید، پس از آزمایشات بهینه‌سازی، C/P هایی با مقادیر ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ (w/w) نیز برای ترانسفکشن سلول‌های PC3 در نظر گرفته شد.[۸]

نتایج نشان داد، لیپوپلی‌پلکس با پایه PEI با وزن ۲۵ کیلودالتون، در نسبت CP=۰/٤ افزون‌بر این‌که ترانسفکشن بهتری نسبت به پایه نانولیپوزومی (P<۰/۰۵) نشان می‌دهد بلکه میزان فلورسنت که بازتابی از انتقال ژن است، نسبت به پایه پلیمری PEI در همین CP افزایش ۲/۵ برابری داشته است. در دیگر CP ها تفاوتی ما بین لیپوپلی‌پلکس و نانولیپوزوم مشاهده نشد و لیپوپلی‌پلکس نسبت به پایه پلیمری توانایی کمتری برای ترانسفکشن نشان داد. تقریبا در تمام CPها به‌جز پایین‌ترین CP کاهش قابلیت بقا سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده با نانولیپوزوم نسبت به نانوپلیمری و لیپوپلی‌پلکس مشاهده شد (نمودار ۲B). نتایج ترانسفکشن و بررسی سمیت سلولی در لیپوپلی‌پلکس با پایه PEI با وزن ۱۰ کیلو دالتون، در نسبت CP=۰/٤ هم ترانسفکشن بهتری نسبت به پایه نانولیپوزوم و نانوپلیمر نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱) و هم میزان انتقال ژن به سلول، نسبت به پلی‌پلکس‌های PEI 25 kDa در CP=۰/۸ که به‌عنوان

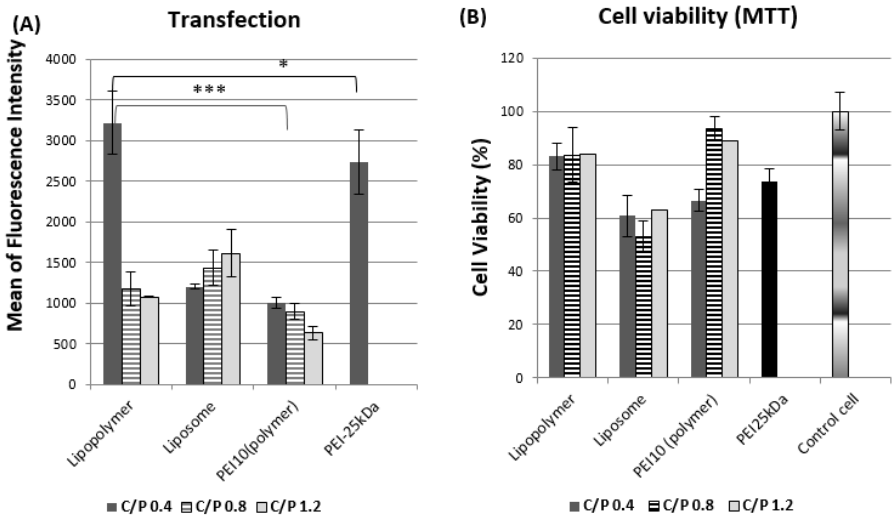


نمودار ۱: بررسی کارایی ترانسفکشن در سلول HEK-293

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]



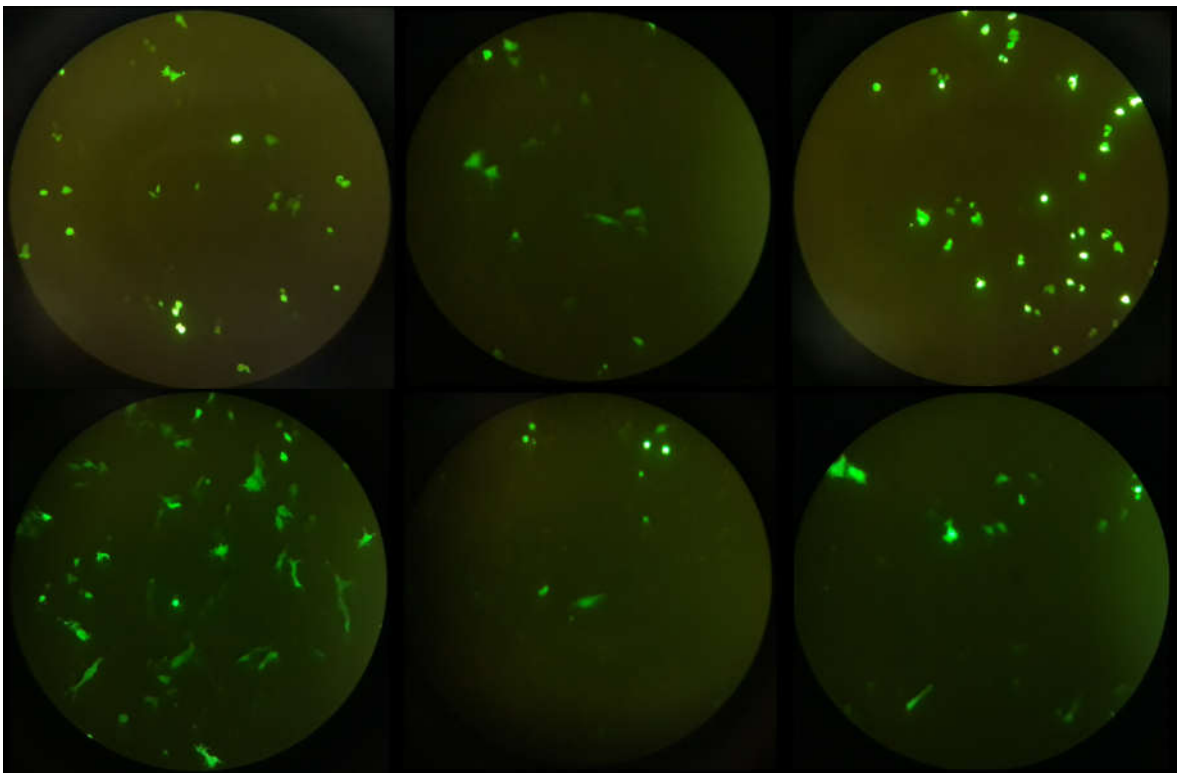
نمودار ۲: بررسی سمیت سلولی (A) و کارایی ترانسفکشن (B) در رده سلولی PC3



نمودار ۳: بررسی کارایی ترانسفکشن (A) و سمیت سلولی (B) در رده سلولی PC3

استاندارد برای آزمایش‌های ترانسفکشن در نظر گرفته می‌شود، افزایش ۱/۲ برابری داشته است (نمودار ۳A). در دیگر CPها تفاوتی ما بین لیپوپلی‌پلکس و نانولیپوزوم مشاهده نشد. بااین‌حال سمیت لیپوپلی‌پلکس‌ها نسبت به پایه نانولیپوزومی کاهش یافته است و حتی در C/P=۰/٤ نسبت به پایه پلیمری هم بقا سلولی بهتری را نشان داد (نمودار ۳B).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]



شکل ۱: تصویری از سلول‌های ترانسفکت شده با لیپوپلی‌پلکس‌های پایه PEI ۱۰و ۲۵ کیلودالتون

بحث

در مطالعه‌ای EWE و همکارانش نشان دادند، در لیپوپلی‌پلکس‌های تشکیل شده از PEI و لیپوزوم، نانوذرات شکل یکنواخت‌تری داشتند و در مقایسه با اجزای سازنده شان، به تجزیه (Aggregation) مقاومت بهتری نشان دادند. از طرف دیگر لیپوپلی‌پلکس‌ها به دستورزی‌های کمتری مثل اتصال به پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) برای بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک نیاز داشتند.[۱۰] این گروه از لیپوپلی‌پلکس‌های به‌دست‌آمده به‌منظور انتقال siRNA برای خاموش کردن ژن‌های تومور استفاده شدند درحالی‌که در این مطالعه از لیپوپلکس به‌منظور انتقال پلاسمید حاوی ژن شناساگر به سلول سرطانی استفاده شد، البته با وجود تفاوت‌هایی در بهینه‌سازی آزمایش به‌نظر می‌رسد هر دو اسید نوکلئیک از مکانیسم مشابه برای ورود به سلول استفاده می‌کنند. گرچه Haghiralsadat و همکارانش نشان دادند اتصال PEG به حامل‌های لیپوزومی به سبب بهبود پایداری ترکیب، زمان گردش خون و فعالیت زیستی پیشنهاد می‌شود اما با توجه به این‌که خود PEG سبب پاسخ‌های ایمنی می‌گردد در این مطالعه از PEG در ساختار نانوحامل استفاده نگردید.[۱۳و۱۴] در مطالعه‌ای Lee و همکارانش نشان دادند، لیپوپلی‌پلکس‌ها سبب افزایش کارایی ترانسفکشن می‌شوند و پایداری آن‌ها در ذخیره طولانی‌مدت بیشتر است. در مطالعه ایشان از PEI هایی با وزن مولکولی ۰/۸ و ۲۵ کیلودالتون و Poly-L-lysine با وزن مولکولی ۳۰-۱۵ کیلودالتون در ترکیب لیپوپلی‌پلکس مورد استفاده قرار گرفت. مشابهت این مطالعه با مطالعه حاضر در استفاده از PEI با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون است. البته نسبت ترکیبی آن با لیپوزوم و نوع سلول هدف متفاوت می‌باشد و همچنین در این مطالعه از PEI با

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]

وزن مولکولی متوسط ۱۰ کیلودالتون که سمیت کمتری نسبت به ۲۵ کیلودالتون دارد نیز استفاده شده است.[۱۵] اما باید توجه داشت که فعالیت زیستی ضعیف پلیمر در متراکم‌سازی نوکلئیک اسید نمی‌تواند توسط لیپوپلی‌پلکس جبران شود.[۱۶] همانطور که مطالعات گذشته نشان دادند، بیان بالای ژن در انتقال با لیپوپلی‌پلکس‌ها احتمالا به‌دلیل اثر افزاینده خاصیت اسفنج پروتونی و خصوصیت فرار از آندوزومی است که توسط لیپید کاتیونی و پلی‌اتیلن ایمین فراهم می‌شود.[۱۷] بااین‌حال، گرچه PEI با وزن مولکولی بالا (۲۵ کیلودالتون) به خوبی پدیده اسفنج پروتونی را فعال می‌کند اما زیست‌سازگار نیست و سمیت سلولی به‌نسبت بالایی را نشان می‌دهد.[۱۸] به‌نظر می‌رسد سمیت سلولی به وزن مولکولی PEI و نوع سلول هدف بستگی دارد.[۱۹] سمیت نانوحامل‌های سنتز شده با روش MTT و در نسبت‌های مختلف از حامل به پلاسمید (C/P) با مقادیر ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۲ (w/w) در رده سلول سرطان پروستات PC3 مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار A۲ و B۳). لیپوزوم‌ها سمیت سلولی بالایی نشان می‌دهند که احتمالا مرتبط با بار بالای آنها می‌باشد که این امر سبب برهمکنش‌های قوی با غشای سلولی و آسیب به سلول می‌شود.[۲۰] تمامی لیپوپلی‌پلکس‌ها بر پایه هردو PEI بهبودی در بقا سلول را نسبت به لیپوزوم پایه نشان می‌دهند. لیپوپلی‌پلکس‌های با پایه PEI 25 در مقایسه با PEI 10 بیشتر باعث کاهش بقا سلولی می‌شوند (نمودار B۳) که این امر به‌دلیل سمیت ذاتی PEI با وزن مولکولی بالا است.به زبان دیگر سمیت سلولی بالای PEI با بار بالای این پلیمر و وزن مولکولی آن ارتباط مستقیم دارد.[۲۱] ترانسفکشن در سلول‌های سرطان پروستات PC3 در شرایط مشابه با آزمایش سمیت سلولی انجام شد و بیان پروتیین سبز رنگ GFP در سلول‌های ترانسفکت شده با دستگاه فلوریمتر بررسی شد. لیپوپلی‌پلکس‌های سنتز شده با هر دو پایه PEI در C/P=۰/٤ بیشترین ترانسفکشن را نسبت به PEI و لیپوزوم پایه نشان داده‌اند (شکل ۱)، این امر احتمالا با کاهش سمیت لیپوپلی‌پلکس‌ها نسبت به حامل‌های پایه دست‌ورزی نشده در این غلظت، مرتبط می‌باشد. در لیپوپلی‌پلکس‌های با پایه PEI ۱۰ کیلودالتون افزون بر این‌که افزایش ترانسفکشن را نسبت به پلی‌پلکس PEI ۱۰ (خالص بدون لیپوزوم) نشان داد افزایش ۱/۲ برابری نسبت به پلی‌پلکس PEI۲۵ (که به‌عنوان گلد استاندارد در نظر گرفته می‌شود)، هم مشاهده شد. این نتایج، فرضیه مطالعه کنونی را که با کاهش سمیت، قابلیت ترانسفکشن افزایش می‌یابد تایید می‌کند. از مطالعات مشابه می‌توان به لیپوپلی‌پلکس‌هایی با پایه PEI ۱۰ کیلودالتون و لیپوزوم حاوی DOTAP، کلسترول، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و DSPE به‌منظور انتقال RNA غیر کدکننده مهندسی‌شده Bioengineered noncoding RNA agents (BERAs)، برای خاموش کردن ژن هدف GFP، در مدل برون‌تنی و موشی اشاره نمود. این مطالعه نشان داد که لیپوپلی‌پلکس‌ها سبب افزایش پایداری سرم siRNAها، انتقال کارآمد ژن خاموشگر به سلول‌های توموری و کاهش بیان آن می‌شوند.[۱۷] در مطالعه دیگری PEI با وزن مولکولی پایین (٦۰۰ دالتون) متصل به سه لینکر استروییدی در ترکیب با لیپوزوم برای انتقال ژن به رده‌های سلولی HeLa, HEK293 و MCF-7 مورد استفاده قرار گرفت. اندازه نانوحامل‌ها ۳۰۰–۲۰۰ nm تخمین زده شد که قادر بودند ژن را به سلول‌ها منتقل کنند.[۲۲]

نانوذرات حاصله دارای اندازه مناسب (۱۰٤ nm) به‌نظر می‌رسید برای انتقال ژن مناسب باشند. لیپوپلی‌پلکس ها در نسبت C/P=۰/٤ با هر دو پایه پلیمری افزایش ترانسفکشن را نسبت به PEI ۲۵ کیلودالتون (به‌عنوان استاندارد) نشان دادند که می‌تواند به علت کاهش سمیت نسبت به مواد سازنده دست ورزی نشده باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی کارایی و سمیت یک حامل لیپوپلی‌پلکس جهت ترانسفکشن رده سرطان پروستات PC3 و مقایسه با یک حامل تجاری معمول" مصوب دانشگاه علوم پزشکی مشهد در سال ۱۳۹۷ با کد ۹٦۰۰۹۵ می‌باشد که با حمایت کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد اجرا شده است.

References

1. Shim G, Kim D, Le Q-V, Park GT, Kwon T, Oh Y-K. Nonviral delivery systems for cancer gene therapy: Strategies and challenges. *Curr Gene Ther*. 2018;18(1):3-20.

2. O'Leary C, Forte G, Mitchell N, Youshani AS, Wellby M, Russell K, et al. Improving brain delivery of adeno-associated viral gene therapy vectors for the treatment of MPS IIIC. *Mol Genet Metab*. 2019;126(2):S111.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]

3. Bouquet C, Clermont CV, Galy A, Fitoussi S, Blouin L, Munk MR, et al. Immune response and intraocular inflammation in patients with Leber hereditary optic neuropathy treated with intravitreal injection of recombinant adeno-associated virus 2 carrying the ND4 gene: a secondary analysis of a phase 1/2 clinical trial. *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(4):399-406.
4. Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu Rev Biomed Eng*. 2015;17:63-89.
5. Kaiser J. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. Science. 2003;299(5606):495-.
6. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science. 1999;286(5448):2244-5.
7. Rezaee M, Oskuee RK, Nassirli H, Malaekeh-Nikouei B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *J Control Release*. 2016;236:1-14.
8. Malaekeh-Nikouei B, Gholami L, Asghari F, Askarian S, Barzegar S, Rezaee M, et al. Viral vector mimicking and nucleus targeted nanoparticles based on dexamethasone polyethylenimine nanoliposomes: preparation and evaluation of transfection efficiency. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;165:252-61.
9. Alavi SJ, Gholami L, Askarian S, Darroudi M, Massoudi A, Rezaee M, et al. Hyperbranched-dendrimer architectural copolymer gene delivery using hyperbranched PEI conjugated to poly (propyleneimine) dendrimers: synthesis, characterization, and evaluation of transfection efficiency. *J Nanopart Res*. 2017;19(2):49.
10. Ewe A, Panchal O, Pinnapireddy SR, Bakowsky U, Przybylski S, Temme A, et al. Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2017;13(1):209-18.
11. Maitani Y, Ishigaki K, Nakazawa Y, Aragane D, Akimoto T, Iwamizu M, et al. Polyethylenimine combined with liposomes and with decreased numbers of primary amine residues strongly enhanced therapeutic antiviral efficiency against herpes simplex virus type 2 in a mouse model. *J Control Release*. 2013;166(2):139-46.
12. Bollin F, Dechavanne V, Chevalet L. Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expr Purif*. 2011;78(1):61-8.
13. Haghiralsadat F, Amoabediny G, Helder MN, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Forouzanfar T, et al. A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(1):169-77.
14. Schellekens H, Hennink WE, Brinks V. The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction. *Pharm Res*. 2013;30(7):1729-34.
15. Lee C-H, Ni Y-H, Chen C-C, Chou C-K, Chang F-H. Synergistic effect of polyethylenimine and cationic liposomes in nucleic acid delivery to human cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2003;1611(1-2):55-62.
16. Song X, Yan G, Quan S, Jin E, Quan J, Jin G. MRI-visible liposome-polyethylenimine complexes for DNA delivery: preparation and evaluation. Bioscience, *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019;83(4):622-32.
17. Zhang Q-Y, Ho PY, Tu M-J, Jilek JL, Chen Q-X, Zeng S, et al. Lipidation of polyethylenimine-based polyplex increases serum stability of bioengineered RNAi agents and offers more consistent tumoral gene knockdown in vivo. *Int J Pharm*. 2018;547(1-2):537-44.
18. Günther M, Lipka J, Malek A, Gutsch D, Kreyling W, Aigner A. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(3):438-49.
19. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer H-P, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*. 1999;16(8):1273-9.
20. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol*. 2015;6:286.
21. Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly (ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther*. 2005;11(6):990-5.
22. Xun M-M, Huang Z, Xiao Y-P, Liu Y-H, Zhang J, Zhang J-H, et al. Synthesis and Properties of Low-Molecular-Weight PEI-Based Lipopolymers for Delivery of DNA. Polymers. 2018;10(10):1060.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]

TUMJ Tehran University Medical Journal, August 2020; Vol. 78, No. 5: 284-292 Original Article

Investigating lipopolymers based on polyethylenimine and nanoliposome for gene delivery to prostate cancer (PC3) cell line

Mohammad Hasan Jafari Najaf Abadi Ph.D.[1†]
Saeedeh Askarian Ph.D.[2,3†]
Reza Kazemi Oskuee Ph.D.[1]
Bizhan Malaekeh-Nikouei Ph.D.[4]
Mehdi Rezaee Ph.D.[1]
Seyed Hamid Aghaee-Bakhtiari Ph.D.[1,5*]

1- Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2- Department of Medical Biotechnology, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran.
3- Neuroscience Research Center, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran.
4- Nanotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5- Bioinformatics Research Group, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

†Mohammad Hasan Jafari Najaf Abadi and Saeedeh Askarian Contributed as Joint First Author

*Corresponding author: Department of Medical Biotechnology, Third Floor, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Azadi Sq., Mashhad, Iran.
Tel: +98-51-38002300
E-mail: Aghaeibh@mums.ac.ir

Abstract

Received: 21 Feb. 2020 Revised: 25 Feb. 2020 Accepted: 13 Aug. 2020 Available online: 20 Aug. 2020

Background: Non-viral Nano carriers such as liposomes and cationic polymers based on engineered properties are regarded in gene delivery field. Although these carriers do not have weaknesses of viral vectors, but they are less efficient than viruses and they still need to be improved as favorable gene delivery carriers. Amongst non-viral carriers, cationic liposomes have been proposed for clinical applications, but limitations such as low nucleic acid transfer and endosome escape and conduction of plasmid to the nucleus have challenged their use in clinical trials. Therefore, the combination of liposomes and cationic polymers for nucleic acid transfer has been considered because this approach makes it possible to use the desirable properties of liposomes and polymers so that it is even suggested for the gene treatment of some diseases such as Parkinson's. In this study, a combination of liposomes and cationic polymers were used for the preparation of lipopolyplexes. This approach allows simultaneous utilizing of the desirable properties of liposomes and polymers.

Methods: This interventional-experimental study was conducted in the medical faculty of Mashhad University of Medical Sciences from April 2017 to February 2018. In this study, PEI-based lipopolyplex with a molecular weight of 25 and 10 kDa and a liposome-to-polymer ratio of 1:1 were combined with plasmid containing the GFP (Green Fluorescent Protein) marker. The physicochemical properties of the synthesized carriers such as size, cytotoxicity and gene transferability in human prostate cancer (PC3) cells were evaluated.

Results: The prepared lipopolyplex were 104 nm in size and all the lipopolyplexes were able to enhance transfection in the C/P=0.4 compared with its basic carriers (PEI and liposomes) alone, while showing less cytotoxicity than not manipulated liposomes. The results of this study suggest synthesized nanoparticles as nanocomposites for gene delivery purposes to different cells and in in-body studies.

Conclusion: The results of this study show that the lipopolyplex constructed from combination of PEI and liposomes can efficiently transfer the gene to the cell, while showing low cytotoxicity and appropriate size at the nano-scale. Therefore, this lipopolymer can be suggested for gene delivery purposes to different cells and in vivo targets.

Keywords: gene transfer techniques, liposomes, PC-3 cells, transfection.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-30]