

## تأثیر مهاري نانوالیگونو کلتوتیدها به عنوان یکی از روش های جدید نانوتکنولوژی در ژن درمانی لوسمی در شرایط *In Vitro*

نوشین نقی<sup>۱</sup>، منصور صالحی<sup>۲</sup>، محمد ربانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.

<sup>۲</sup>دانشیار ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۳</sup>استادیار 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 تلومرها در سطوح مختلف می باشد. تلومرها یک آنزیم ریبونو کلتوپروتئینی است که توالی های هگزانو کلتوتیدی TTA GGG را به انتهای کروموزوم خطی یوکاریوتی می افزاید. فعالیت تلومرازی در ۹۰-۸۵٪ کل سلول های سرطانی انسان یافت می شود. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر مهاري نانوالیگونو کلتوتیدها 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 تلومرها 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 تلومرها در 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 تلومرها در مقایسه با گروه کنترل گردید. در ضمن، گروه الیگومرهای تصادفی تأثیر چندانی بر روی فعالیت تلومرها نداشت.

**نتیجه گیری:** یکی از دلایل مهار تلومرها به واسطه آنتی سنس های مزبور، اتصال آنها به RNA تلومری به نام hTR و جلوگیری از عملکرد این آنزیم می باشد. با انجام این امر در واقع hTR تلومرها 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؛ الیگونو کلتوتیدها؛ تلومرها.

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 هگزانو کلتوتیدی TTA GGG تکراری را به انتهای کروموزوم خطی یوکاریوت ها می افزاید. الیگونو کلتوتیدهای DNA تلومری غنی از نو کلتوتیدهای گوانین می باشند. این ترادف ها کوتاه و به شکل ۴ رشته ای داخل مولکولی در می آیند.

تلومراز یک آنزیم ریبونو کلتوپروتئینی است که در واقع یک DNA پلیمراز وابسته به RNA می باشد. تنظیم طول تلومر در سلول های نامیرا به وسیله تلومراز انجام می شود. این آنزیم

شستشو داده شدند و پس از سانتریفوژ لوله محتوی سلول‌ها، محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل از سانتریفوژ ۹۰٪ FCS و ۱۰٪ DMSO افزوده گردید. سوسپانسیون ایجادشده به ویال‌های استریل مخصوص فریز (ویال‌های اپندروف) انتقال داده شد. (در مورد سلول‌های شناور مثل رده سلولی K562 نیز باید سوسپانسیون سلولی حاصل از ویال‌های خریداری‌شده از انستیتو پاستور را سانتریفوژ کرد و سلول‌ها را در ۱۰cc محیط کشت تازه وارد نمود، سپس به فلاسک منتقل کرد. پس از دریافت سلول‌ها باید در کوتاهترین زمان ممکن آنها را پاساژ داده و به انکوباتور حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> و شرایط دمایی ۳۷°C منتقل نمود). در ادامه، سلول‌های زنده با روش تریپان بلو و لام هماسیتومتر شمارش شدند. سلول‌های زنده به تعداد ۵×۱۰<sup>۴</sup> در چاهک‌های ۹۶ خانه انتقال یافته و الیگونوکلئوتیدها به شیوه زیر به آنها افزوده شد (۹،۸). به‌منظور مهار اختصاصی تلومراز تعداد، ترادف و تعدیل نانوالیگونوکلئوتیدهای مختلف با بررسی مقالات متعدد و مقایسه آنها جهت یافتن بهترین نانوالیگونوکلئوتید انجام گرفت. ترادف‌هایی با ۱۹ نوکلئوتید و تعدیل فسفورامیداتی مکمل ناحیه تلومری RNA (hTR) سنتز شدند. (تعدیل انجام‌شده، نانوالیگومرها را در مقابل هضم آنزیمی ریبونوکلئازها مقاوم می‌سازد). در ادامه ۳ ترادف به عناوین سنس، آنتی‌سنس و تصادفی طراحی گردید (۹،۶).

جهت تسهیل ورود نانوالیگونوکلئوتیدها به درون سلول‌ها می‌توان از انواع مواد جاذب سلولی مثل Transfection Agents استفاده نمود. که یکی از این مواد FuGENE6 می‌باشد 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 نرم‌افزار SIGMASTAT™ (Jandel Software, San Raphael, CA)، صورت گرفت. جهت مقایسه فعالیت تلومراز در گروه‌های لوسمی و کنترل، با توجه به غلظت‌های الیگونوکلئوتیدهای موردنظر در گروه‌های مختلف، میانگین تهیه شد و آزمون مقایسه میانگین‌ها با روش آماری تی‌تست انجام گردید. حد معنی‌دار بودن تفاوت بین نمونه‌ها ۱٪ و ۵٪ در نظر گرفته شد. جهت تعیین ارتباط بین اثرات مهاری تلومراز با دوز الیگونوکلئوتیدها از آزمون عدم همبستگی پیرسون استفاده گردید. نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نانوتکنولوژی یکی از شیوه‌های جدید و تخصصی درمان بیماری‌ها است. محققان نانوتکنولوژی با ابعاد وسیعی از کاربردهای نانوذرات آشنا شده‌اند که ممکن است نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری‌ها و تولید دارو داشته باشد (۲،۱). رشته‌های 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 می‌دهند. سلول‌های بنیادی انسان دارای فعالیت کمی از تلومراز می‌باشند (۳). تلومراز در بیشتر سلول‌های نامیرا و سرطانی انسان فعالیت دارد، به طوری که فعالیت تلومرازی در ۹۰-۸۵٪ کل سلول‌های سرطانی انسان یافت شده است. این آنزیم در سلول‌های نامیرایی مثل رده پرومیلوسیتی HL60، در تمام مراحل چرخه سلولی فعالیت دارد. از طرفی، در دنیای امروز سرطان علت عمده مرگ و میر است (۳،۴). استفاده از روش‌های شیمی‌درمانی ترکیبی (Compound Chemotherapy) به‌علت غیراختصاصی بودن و تأثیر بر روی کلیه سلول‌های در حال تقسیم، باعث عوارض جانبی زیاد می‌شود. بنابراین، شناسایی و وجه تمایز بین سلول‌های سرطانی و نرمال، کاربرد روندهای درمان سرطان را به‌صورت اختصاصی‌تر مطرح می‌سازد. کشف داروهای جدید و بازدارنده‌های تلومراز یک هدف تخصصی برای شیمی‌درمانی سرطان است. الیگونوکلئوتیدهای سنتزی که به‌طور مکمل با توالی m-RNA ساخته می‌شوند، آنتی‌سنس (Antisense) نامیده می‌شوند (۵). آنتی‌سنس‌ها به‌عنوان عوامل ضد تلومرازی (Anti-Telomerase Agents) موجب کوتاه شدن تلومر و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (Apoptosis) می‌شوند. از این جهت تلومراز یک هدف مناسب برای طراحی نانوالیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس است. لذا در این مطالعه، عملکرد یک نوع آنتی‌سنس جدید در مهار اختصاصی فعالیت تلومراز در یک رده سلولی لوسمی به‌نام K562 بررسی گردید (۷،۶).

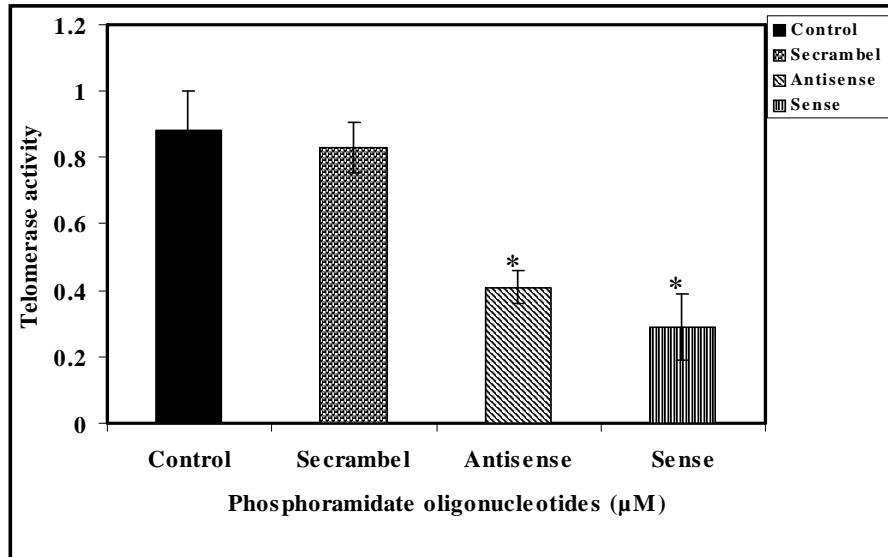
## روش بررسی

سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640، در درون فلاسک‌های مخصوص کشت سلولی به‌صورت پاساژ یافته و در فاز لگاریتمی رشد خود قرار داده شدند. ابتدا یک سوسپانسیون سلولی در لوله‌های استریل از سلول‌های موجود در فلاسک تهیه، سپس سلول‌ها با استفاده از هموسایتومتر شمارش شدند. سلول‌ها با PBS

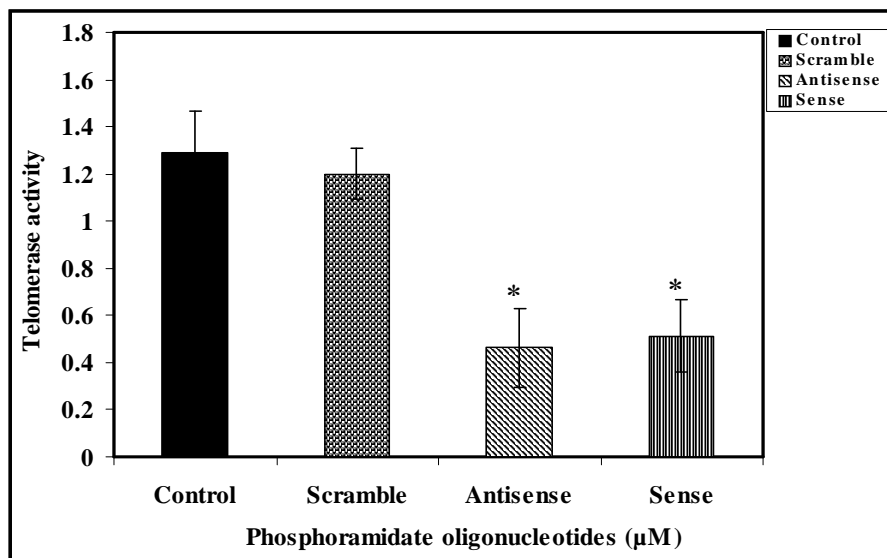
## یافته‌ها

در این تحقیق نانوانتی‌سنس‌های 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 نانوانتی‌سنس  $0.48 \pm 0.20$  و  $0.358 \pm 0.12$  و  $0.88 \pm 0.10$  در غلظت  $0.5 \mu\text{M}$  از نسبت به گروه کنترل  $0.88 \pm 0.10$  در غلظت  $0.5 \mu\text{M}$  از نانوایگونوکلئوتیدها، کاهش معنی‌داری داشته است ( $p < 0.05$ ).



نمودار شماره ۱: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت  $0.5 \mu\text{M}$  از نانوایگونوکلئوتیدها 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 ( $n=9$ ).



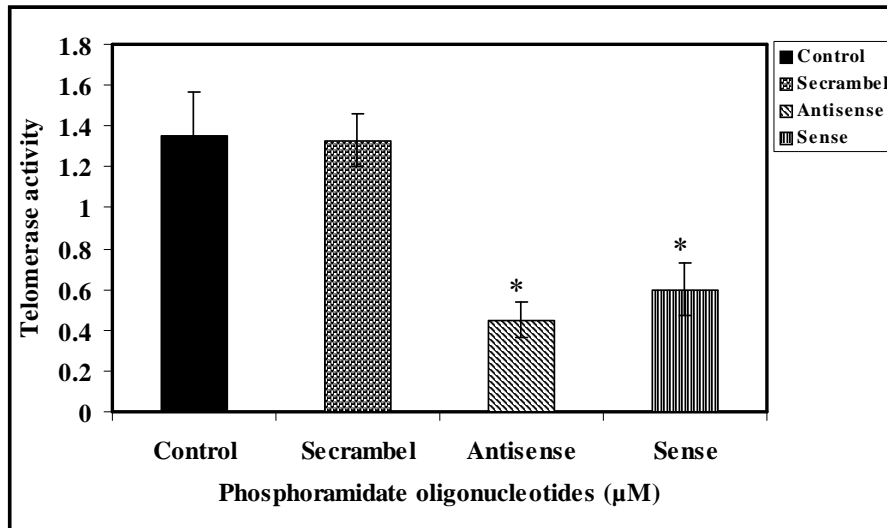
نمودار شماره ۲: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت  $1 \mu\text{M}$  از نانوایگونوکلئوتیدها بر روی رده سلولی K562 هر ستون نمودار معرف میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است ( $n=9$ ).

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 نانوایگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه

غلظت  $2\mu\text{M}$  از نانوالیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می باشد. طبق نمودار شماره ۳، فعالیت تلومرازی گروه های نانوانتی سنس  $0.49 \pm 0.20$ ، و نانوسنس  $0.68 \pm 0.22$  نسبت به گروه کنترل  $1.39 \pm 0.20$  در غلظت  $2\mu\text{M}$  از نانوالیگونوکلئوتیدها کاهش معنی داری یافته است ( $p < 0.05$ ).

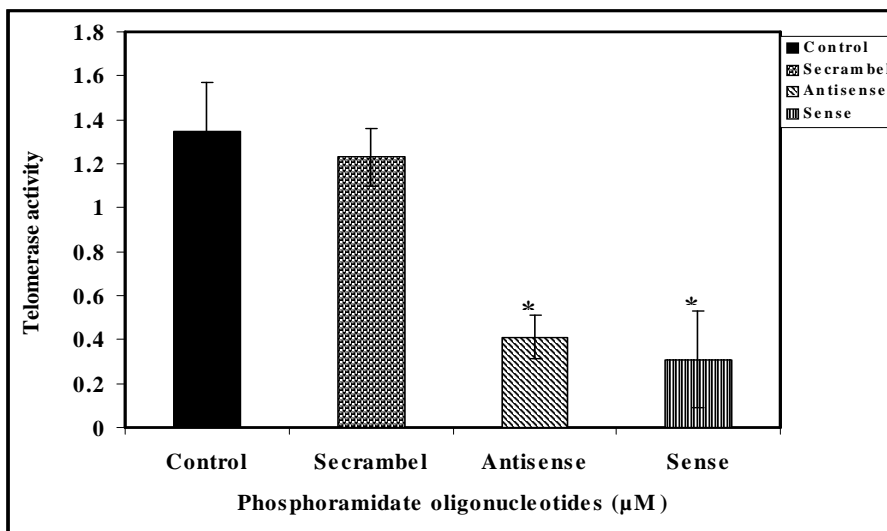
ندارد. فعالیت تلومرازی گروه های نانوانتی سنس،  $0.52 \pm 0.20$  و نانوسنس  $0.68 \pm 0.10$  نسبت به گروه کنترل  $1.28 \pm 0.20$  از نانوالیگونوکلئوتیدها، کاهش معنی داری یافته است ( $p < 0.05$ ) تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل ندارد. نمودار شماره ۳ نیز، نشان دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در



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

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

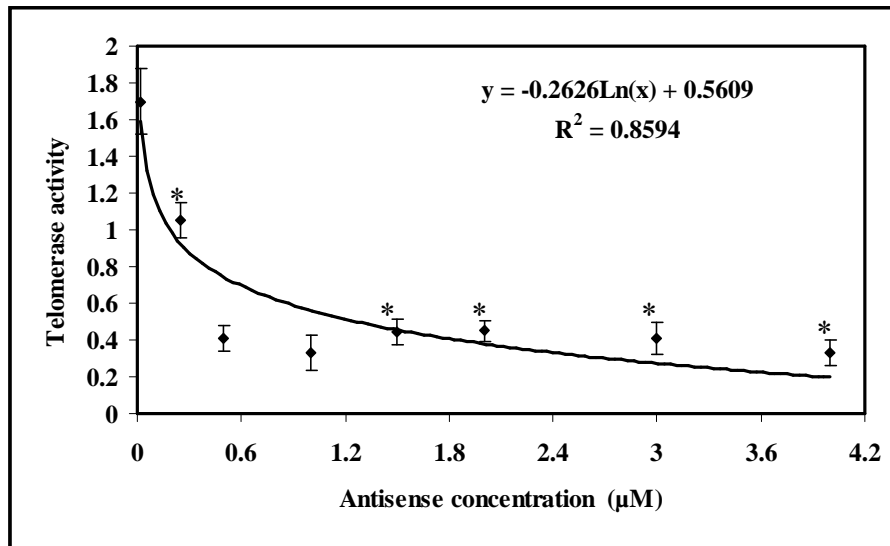
نمودار شماره ۴، نشان دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت  $3\mu\text{M}$  از نانوالیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می باشد. طبق نمودار شماره ۴، میانگین فعالیت تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل ندارد. فعالیت تلومرازی گروه های



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

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، 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



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 آنتی‌تلومرازها 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 (۱۰،۸). این تأثیرات در دسته مکانیسم‌های وابسته به ترادف و تخصصی آنتی‌تلومرازها قرار می‌گیرد (۶،۴). 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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.