مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره دوم ـ تابستان ۹۰
صفحات ۱۲ الی ۱۷

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر مهاری نانوالیگونوکلئوتیدها به‌عنوان یکی از روش‌های جدید نانوتکنولوژی در ژن‌درمانی لوسمی در شرایط In Vitro

نوشین نقش[۱]، منصور صالحی[۲]، محمد ربانی[۳]

[۱]استادیار زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.
[۲]دانشیار ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳]استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: یکی از روش‌های جدید و تخصصی درمان لوسمی، ژن‌درمانی(Gene Therapy) است. برای مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌توان از یک ویژگی تخصصی این سلول‌ها استفاده نمود.

یکی از این روش‌ها، استفاده از آنتی‌تلومرازها در سطوح مختلف می‌باشد. تلومراز یک آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی است که توالی‌های هگزانوکلئوتیدی TTA GGG را به انتهای کروموزوم خطی یوکاریوتی می‌افزاید. فعالیت تلومرازی در ۹۰-۸۵٪ کل سلول‌های سرطانی انسان یافت می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر مهاری نانوالیگونوکلئوتیدها به‌عنوان یکی از روش‌های جدید نانوتکنولوژی در ژن‌درمانی لوسمی در شرایط In Vitro صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، عملکرد نانوذرات الیگومری در مهار اختصاصی فعالیت تلومراز در یک رده سلولی لوسمی به‌نام K562 بررسی شد. بدین منظور سه گروه از نانوالیگومرهای آنتی‌سنس، سنس و تصادفی با غلظت‌های ۰/۵-۳µM به سلول‌ها افزوده شدند. میانگین فعالیت آنزیم تلومراز گروه‌های فوق در ۳ آزمایش جداگانه با گروه کنترل مقایسه گردید.

یافته‌ها: در این پژوهش، ۳ روز بعد از تیماربا الیگومرها، غلظت ۰/۵۲µM از سنس و آنتی‌سنس، تأثیری بر فعالیت این آنزیم نداشت، و غلظت‌های ۱-۳µM گروه‌های سنس و آنتی‌سنس باعث کاهش معنی‌دار فعالیت تلومراز در مقایسه با گروه کنترل گردید. در ضمن، گروه الیگومرهای تصادفی تأثیر چندانی بر روی فعالیت تلومراز نداشت.

نتیجه‌گیری: یکی از دلایل مهار تلومراز به‌واسطه آنتی‌سنس‌های مزبور، اتصال آنها به RNA تلومری به‌نام hTR و جلوگیری از عملکرد این آنزیم می‌باشد. با انجام این امر در واقع hTR تلومراز تجزیه می‌شود. با استفاده از روش اخیر درمان در In Vitro، زمینه برای درمان لوسمی در انسان فراهم می‌شود.

کلید واژه‌ها: دی ان آ؛ آنتی‌سنس؛ الیگونوکلئوتیدها؛ تلومراز.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران؛
تلفن: ۰۹۱۳۲۰۰۹۲۷۶ آدرس پست الکترونیکی: naghsh@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲۰

مقدمه

تلومراز یک آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی است که در واقع یک DNA پلیمراز وابسته به RNA می‌باشد. تنظیم طول تلومر در سلول‌های نامیرا به‌وسیله تلومراز انجام می‌شود. این آنزیم توالی‌های هگزانوکلئوتیدی TTA GGG تکراری را به انتهای کروموزوم خطی یوکاریوت‌ها می‌افزاید. الیگونوکلئوتیدهای DNA تلومری غنی از نوکلئوتیدهای گوانین می‌باشند. این ترادف‌ها کوتاه و به شکل ۴ رشته‌ای داخل مولکولی در می‌آیند.

www.SID.ir

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 تاخورده 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، به‌طوری‌که 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 (۴،۳). 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 وجوه 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 پاساژیافته 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 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_2 و شرایط دمایی $37^{\circ}C$ منتقل نمود). در ادامه، سلول‌های زنده با روش تریپان بلو و لام هماسیتومتر شمارش شدند. سلول‌های زنده به تعداد 5×10^{4} 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 کارآیی و سمی بودن پایین آن است (۱۰،۶).

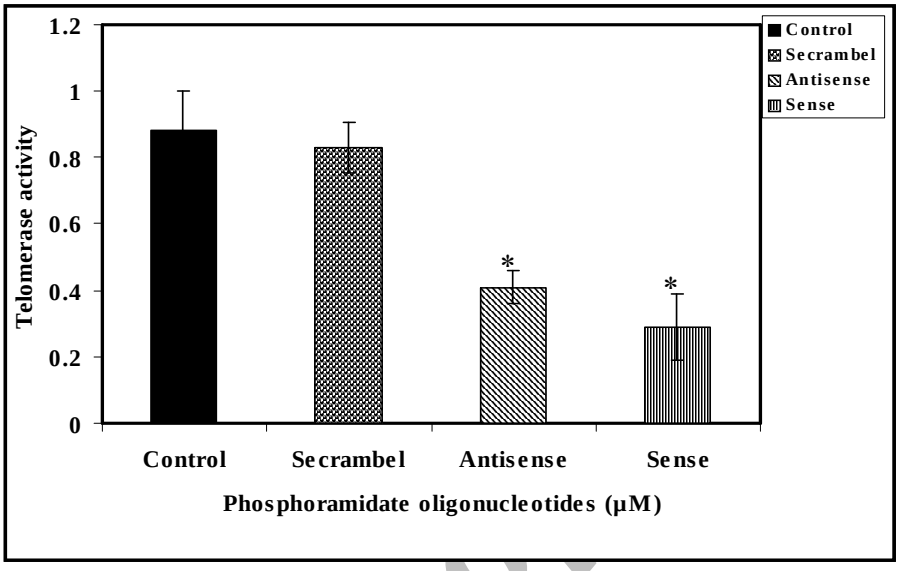
مراحل آماری، با استفاده از نرم‌افزار SIGMASTAT™ (Jandel Software, San Raphael, CA) ، صورت گرفت. جهت مقایسه فعالیت تلومراز در گروه‌های لوسمی و کنترل، با توجه به غلظت‌های الیگونوکلئوتیدهای موردنظر در گروه‌های مختلف، میانگین تهیه شد و آزمون مقایسه میانگین‌ها با روش آماری تی‌تست انجام گردید. حد معنی‌دار 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.

Archive of SID

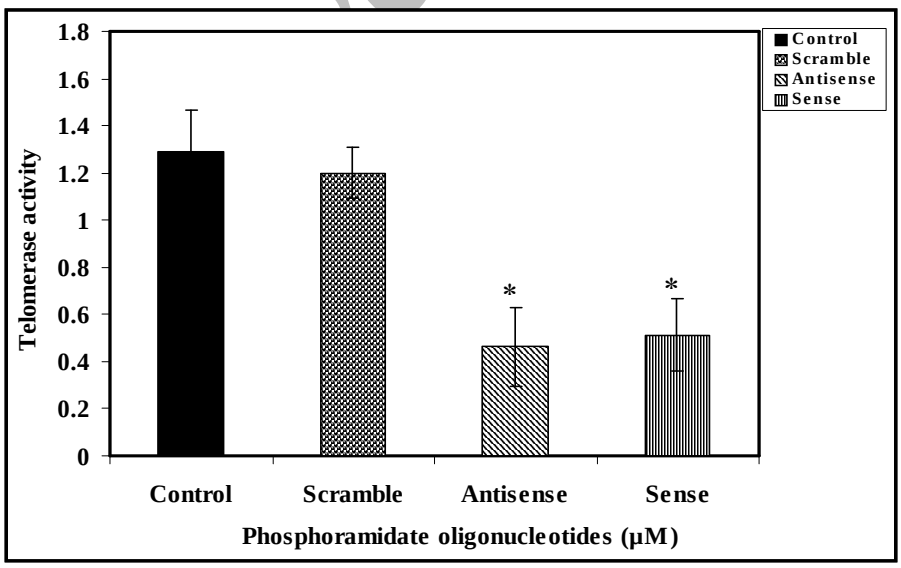
www.SID.ir

یافته‌ها

در این تحقیق نانوآنتی‌سنس‌های فسفورامیداتی در غلظت‌های ۰/۵-۳µM دارای اثر مهارکنندگی بر فعالیت تلومراز بودند. یافته‌های حاصل به دست آمده از مراحل آماری نشان داد غلظت ۰/۵۲µM تأثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم ندارد. نمودار شماره ۱، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت ۰/۵µM 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 ۰/۲۰±۰/۴۸ و نانوسنس ۰/۱۲±۰/۳۵۸، نسبت به گروه کنترل ۰/۱۰±۰/۸۸ در غلظت ۰/۵µM از نانوالیگونوکلئوتیدها، کاهش معنی‌داری داشته است (p<۰/۰۵).



نمودار شماره ۱: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت ۰/۵µM از نانوالیگونوکلئوتیدها بر روی رده سلولی K562 هر ستون نمودار معرف میانگین۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است (n=۹).

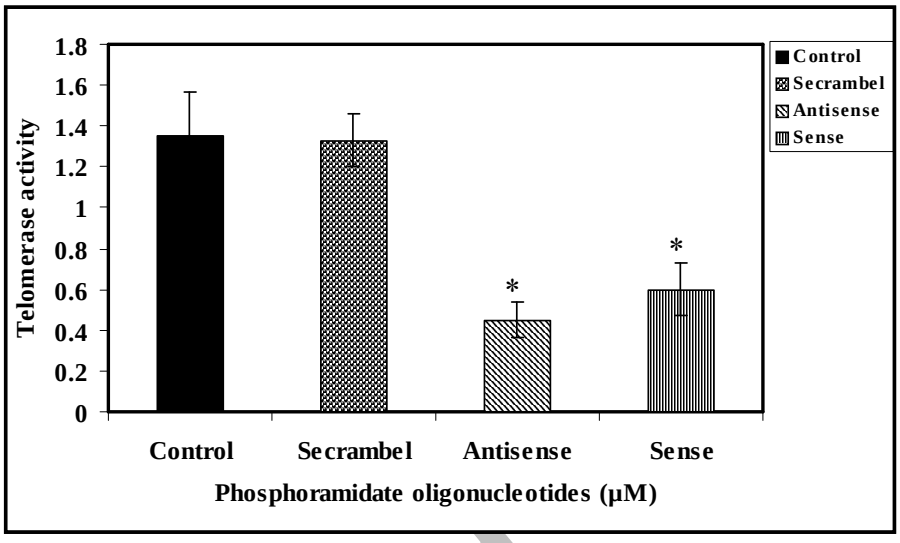


نمودار شماره۲: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت۱µM از نانوالیگونوکلئوتیدها بر روی رده سلولی K562 هر ستون نمودار معرف میانگین ۳ بار سنجش فعالیت تلومراز ۳ روز بعد از ترانسفکشن می‌باشد که در ۳ آزمایش جداگانه نیز تکرار شده است (n=۹).

نمودار شماره ۲، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت ۱µM از نانوالیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می‌باشد. طبق نمودار شماره ۲، در غلظت ۱µM میانگین فعالیت تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل

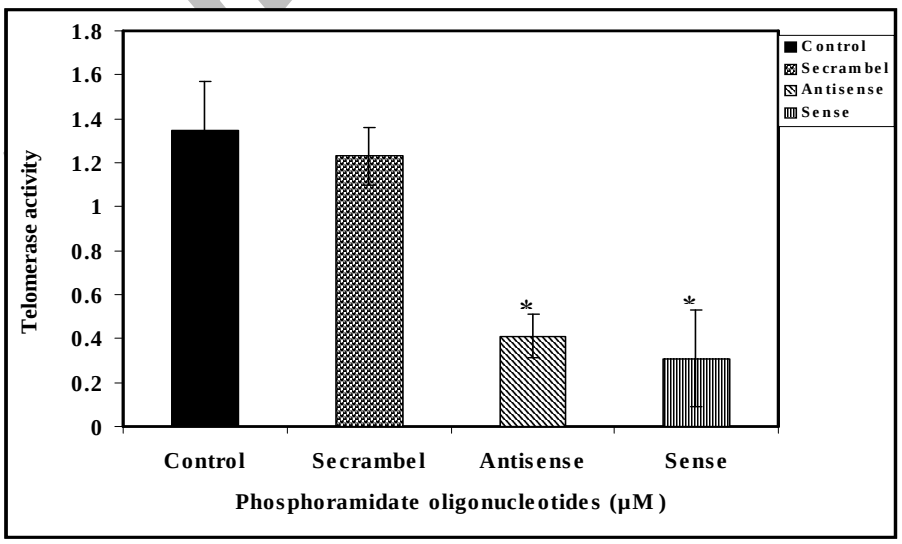
www.SID.ir

ندارد. فعالیت تلومرازی گروه‌های نانوآنتی‌سنس، ۰/۲۰±۰/۵۲ و نانوسنس ۰/۱۰±۰/۶۸ نسبت به گروه کنترل ۰/۲۰±۱/۲۸ از نانوالیگونوکلئوتیدها، 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 غلظت ۲µM از نانوالیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می‌باشد. طبق نمودار شماره ۳، فعالیت تلومرازی گروه‌های نانوآنتی‌سنس ۰/۲۰±۰/۴۹، و نانوسنس ۰/۲۲±۰/۶۸ نسبت به گروه کنترل ۰/۲۰±۱/۳۹ در غلظت ۲µM از نانوالیگونوکلئوتیدها کاهش معنی‌داری یافته است ($p<0/05$).



نمودار شماره ۳: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت ۲µM از نانوالیگونوکلئوتیدها 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=۹).

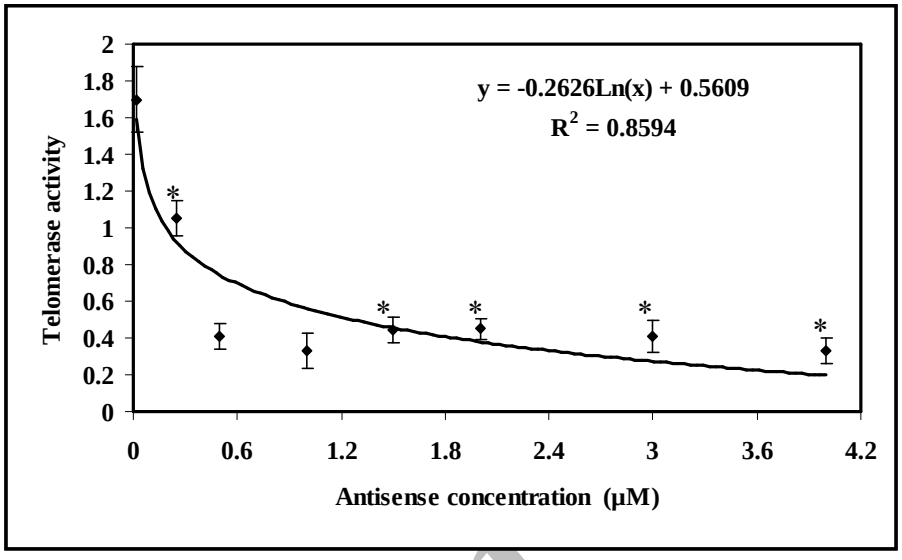
نمودار شماره ۴، نشان‌دهنده مقایسه میانگین فعالیت تلومراز در غلظت ۳µM از نانوالیگونوکلئوتیدها در سه گروه مزبور با گروه کنترل می‌باشد. طبق نمودار شماره ۴، میانگین فعالیت تلومراز در گروه تصادفی تفاوت چندانی با گروه کنترل ندارد. فعالیت تلومرازی گروه‌های نانوآنتی‌سنس ۰/۲۰±۰/۴۸ و نانوسنس ۰/۲۲±۰/۳۴ نسبت به گروه کنترل ۰/۲۰±۱/۲۸ در غلظت ۳µM از نانوالیگونوکلئوتیدها کاهش داشته است ($p<0/05$).



نمودار شماره ٤: مقایسه فعالیت تلومرازی در غلظت ۳µM از نانوالیگونوکلئوتیدها 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=۹).

www.SID.ir

نمودار شماره ۵، برازش یک مدل رگرسیونی لگاریتمی بین غلظت نانوآنتی‌سنس 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=۹). ضریب همبستگی پیرسون بین این دو عامل برابر با r=-۰/۹۲۷ است، که نشان‌دهنده یک همبستگی ناهم جهت می‌باشد (p<۰/۰۵).



نمودار شماره ۵: بررسی همبستگی غلظت نانوآنتی‌سنس 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 نانوآنتی‌سنس 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 Maoxuam 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 طراحی‌شده از جنس DNA و hTR از نوع RNA می‌باشد، لذا، با اتصال این ۲ بخش به یکدیگر فعالیت آنزیمی به‌نام RNaseH تحریک می‌شود. آنزیم مزبور قادر است از هیبرید DNA و RNA به‌عنوان سوبسترا 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 سلول‌های سرطانی سینه با آنتی‌سنس‌های ۱۶ نوکلئوتیدی باعث کاهش بسیار زیاد m-RNA در این نوع پروتئین کیناز شده است. کاهش بیان این ژن فقط در طول‌های ۲۰-۱۶ نوکلئوتیدی الیگومرها صورت پذیرفته است و طول‌های ۱۵ نوکلئوتیدی و کوتاهتر فاقد اثر بازدارندگی بوده‌اند. مکانیسم تجزیه پروتئین کیناز PKC-α می‌تواند وابسته و یا مستقل از RNaseH باشد. در مسیرهای وابسته به RNaseH، در واقع این آنزیم پس از فعال شدن به‌طور غیراختصاصی m-RNA مربوط به PKC-α را تجزیه می‌کند. علت عدم تأثیر نانوالیگومرهای ۱۵ نوکلئوتیدی و کمتر از آن، این است که قادر به انجام این روندهای غیراختصاصی نیستند (۱۴،۱۳).

نتیجه‌گیری

یکی از دلایل مهار تلومراز به‌واسطه آنتی‌سنس‌های مزبور، اتصال آنها به RNA تلومری به‌نام hTR و جلوگیری از عملکرد این آنزیم است. با انجام این امر در واقع hTR تلومراز تجزیه می‌شود. با توجه به تأثیرات این نانوالیگومرها در مهار لوسمی در شرایط In Vitro، استفاده از روش اخیر به‌عنوان یکی از شیوه‌های جدید نانوبیوتکنولوژی در درمان لوسمی در انسان پیشنهاد می‌گردد.

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. Toxocological 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. Toxocological 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. Maoxuam 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. Toxocological Sciences 2005;88(2):412-419.

Archive of SID

www.SID.ir