مقاله مروری:

مقایسه انواع سیستم های غیر ویروسی به عنوان ابزار انتقال ژن

دکتر کیانوش خسروی دارانی*، مجید صادقی زاده**

* انستیتو تحقیقات ملی تغذیه و علوم غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت مقاله : ۸۴/۳/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۴/۵/۴

مقدمه

پس از انتشار تحقیقات اولیه در مورد استفاده از لیپوزم‌ها به عنوان ابزار انتقال ژن، سیل تحقیقات در مورد ژن درمانی بیماری‌های ژنتیکی توسط حامل‌های مختلف صورت گرفته است. این مقاله مروری است بر انواع سیستم‌های انتقال ژن، با نگاهی ویژه بر سیستم‌های غیرویروسی که در آن کاربرد انواع پلیمرهای معمول معرفی و با یکدیگر مقایسه شده اند. در پایان کوپلیمر حساس به دما[1] به عنوان موفق‌ترین حامل پلیمری به تفصیل توضیح داده شده است.

انتقال مواد ژنتیکی به عنوان ژن درمانی بسیاری از بیماری‌ها، سه دهه قدمت دارد و توجه بسیاری از محققین را در رشته های مختلف بیوشیمی، شیمی فیزیک، مهندسی شیمی، مهندسی پزشکی و مهندسی ژنتیک به خود معطوف کرده است. روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی مختلفی در این زمینه وجود دارند. می‌توان انواع حامل‌های ژنی را به دو گروه ویروسی و غیرویروسی طبقه بندی کرد. یکی از سیستم‌های غیرویروسی معمول برای انتقال ژن به سلول‌های زنده استفاده از روش کلسیم فسفات است. در سیستم‌های شیمیایی این روش موفق نشان داده و انتقال ژن شماره ۶۲ ویروس واریسلا زوستر با پروموتور قوی CMV به داخل سلول‌های فیبروبلاست انسانی HFF توسط رسوب کلسیم فسفات انجام گرفته است. دندریمر نیز به عنوان یکی دیگر از سیستم‌های غیرویروسی معرفی شده و به پلیمرهای مصنوعی کروی و به شدت شاخه دار اطلاق می‌شود.[۱] دندریمرها علاوه بر شرایط آزمایشگاهی[۲] در بدن موجود زنده هم مورد بررسی قرار گرفته‌اند.[۳] لیپوزم‌های کاتیونی[۴و۵]، ذرات لیپید[۶و۷]، لیپو پلی آمین‌ها[۸] و سایر پلی کاتیون‌ها[۹-۱۱] مانند پلی لایزین[۱۲-۱۵] و پلی آمیدوآمین[۱۶-۱۸]، پپتیدهای کاتیونی یا آمفی پاتیک[۱۹و۲۰] و یا ترکیبی از آن‌ها[۲۱] با هدف انتقال ژن در مقالات مختلفی گزارش شده اند. انواع لیپوزم های آنیونی نیز قادر به انتقال ژن به درون بدن موجود زنده هستند. اخیرا خسروی و همکار کاربرد لیپوزم‌های آنیونی و نقاط ضعف و قوت هر یک را مورد مقایسه قرار داده‌اند.[۲۲]

۱- پلیمرهای معمول در انتقال ژن

جدول ۱ انواع معمول سیستم‌های غیرویروسی انتقال ژن را نشان می‌دهد. پلیمرهایی که به طور معمول برای این هدف استفاده می شوند عبارتند از: ۱- پلی L لایزین ۲- پلی اتیلن ایمین(PEI) ۳- PEI خطی ٤- کاتیوزان ٥- پلی وینیل پیرولیدین (PVP) ٦- دندریمر پلی آمیدوآمین (PAMAM) یا استاربرست[2]

[1] *Thermosensitive*

[2] *Starburst*

آدرس نویسنده مسئول: انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور Email: kiankh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. نمونه سیستم‌های انتقال DNA به روش غیر ویروسی

سیستم انتقال DNA	ساختمان	فوائد	معایب
کمپلکس لیپوزم کاتیونی و DNA	ساختار نامشخص، هتروژن، تجمع به‌صورت ورقه یا رشته ای	بالاترین کارایی در حامل‌های غیرویروسی، تنوع‌زیاد لیپیدهای موجود، سهولت آماده سازی	مشکل بودن کنترل تشکیل کمپلکس، انتقال با کارایی و تکرارپذیری کم
ذرات لیپیدهای کاتیونی و DNA	ذرات ریز متراکم (DNA نیز متراکم)	قابل کنترل بودن تشکیل ذرات، امکان طراحی سیستم هدف دار	کارایی انتقال کمتر از لیپوزم‌های کاتیونی، امکان وقوع تجمع ذرات
کمپلکس پلی‌لایزین و DNA	ذرات مارپیچی و DNA متراکم	ساختار کاملا معین، امکان‌طراحی‌سیستم هدف دار	کارایی و سمیت
کمپلکس پلیمرهای استاربرست و DNA	دندریمر شبه کروی و به شدت شاخه دار	خواص سطحی قابل تغییر، کارایی مشابه کمپلکس لیپوزمی	سمیت نامشخص، لزوم استفاده از تحریک کننده انتقال

در سیستم‌های پلیمری انتقال ژن از بعضی جهات مانند تحریک پاسخ ایمنی، کاهش سمیت و افزایش بیان ژن موفقیت‌هایی کسب شده است. این پلیمرها از نظر توزیع بار سطحی، آب‌گریزی و ساختمان، خصوصیات جالب توجهی دارند.

۱-۱) پلی L - لایزین

PLL برای متراکم کردن DNA پلاسمید در شرایط مختلف نمکی استفاده می شود. لیگاند گیرنده های مختلف به طور کوولان با این پلیمر ترکیب شده و انتقال ژن هدف دار صورت می گیرد. PLL گالاکتوزیله[1] (Gal-PLL) برای انتقال و بیان ژن به هپاتوسیت خرگوش ساخته شده است. ۶ نوع ترکیب مختلف Gal-PLL در ترکیب با وزن مولکول‌های مختلف و نسبت های متفاوت گالاکتوز از طریق باند کووالان ۲- ایمینو-۲- متیل ۱- تیوگالاکتوزیدید[2] در محلول سدیم متوکسید تهیه شده است. [۲۳] به طور مشابه ترکیب PLL مانوزیله (Man-PLL) با PLL (۲۰ کیلودالتونی) و آلفا D- نانو پیرانوزیل فنیل ایزوتیوسیانات، در ماکروفاژ موش انتقال ژن موثری نشان داده است.[۲۴] از آنجا که کمپلکس PLL و DNA در شرایط فیزیولوژیک ناپایدار است، برای کاهش تجمع[3] کمپلکس‌ها پلیمرهای لاکتوز- پلی (اتیلن گلیکول) پلی - L - لایزین -Lac) (PEG-PLL ساخته شده [۲۵]، خواص حلالیت جالب‌تری نیر پیدا کرده است. لاکتوز به عنوان جزء هدف یاب برای گیرنده های آسیلوگلیکوپروتئین سلول‌های هپاسیت عمل می‌کند. این کمپلکس‌ها کاملا اختصاصی عمل می کنند. تغییر بعدی سیستم PLL براساس استئاریل - پلی (L - لایزین) (Stearyl-PLL) و لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDL) صورت گرفته است. این حامل‌ها از PLL (۵۰ کیلو دالتونی) و استئاریل بروماید با تری اتیل آمین ساخته شدند.[۲۵] در این ترکیبات سه تایی[4] اندرکنش‌های آب گریزی و الکترواستاتیکی بین استئاریل- PLL، LDL و DNA متعادل می شود. نسبت PLL و نیمهٔ هیدروفوبیک LDL برای بهینه کردن کارایی انتقال مورد مطالعه قرار گرفته است.[۲۶]

۱-۲) دندریمرها

استاربرست[5] پلی آمید و آمین گروهی از پلیمرهای کروی بسیار شاخه دار هستند که بار سطح و قطر آنها از تعداد مراحل تولید کمپلکس قابل تعیین است[۲۷]، برای مثال ۵ زنجیره

[1] *Galactosylated*
[2] *2-Imino-2-methyl-1-thiogalactosidade*
[3] *Aggregation*
[4] *Terplex*
[5] *Starburst*

www.SID.ir
Archive of SID

پلیمریزاسیون منجر به تولید پنجمین نسل دندریمر می شود. اختلاف ساختمانی اصلی در دندریمرهای PAMAM بر اساس وجود آمونیا یا اتیلن دی آمین و چگونگی فرایند پلیمریزاسیون است. پلیمریزاسیون شکل نهایی، دانسیته و شارژ سطحی مولکول را مشخص می کند. دندریمرها ممکن است دست نخورده و یا شکسته باشند. در یک دندریمر دست نخورده در هر نقطه انشعاب دو بازوی کشیده وجود دارد اما در دندریمر شکسته در هر نقطه می تواند بین صفر تا ۲ بازو وجود داشته باشد.[۲۸] اندازه ذره، شارژ سطحی و کارایی انتقال ژن کمپلکس پلاسمید دندریمر (نسل پنجم) تابعی از نسبت غلظت دندریمر در کمپلکس است.

۱-۳) پلی اتیلن ایمین

پلی اتیلن ایمین یک پلیمر کاتیونی شاخه دار است و پلاسمیدها را به ذرات کلوئیدی تبدیل می کند که در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده کارایی انتقال ژن بالایی دارند.[۲۹] در نسبت ۰/۳۳ درصد وزنی - وزنی پلیمر به DNA ذرات به شدت متراکم شده و پراکندگی کمی دارند. شکل شبه کروی ذرات و طیف محدود در اندازه ذرات، باعث افزایش جذب این پلاسمیدها توسط سلول و نهایتا افزایش کارایی انتقال می‌شود[۳۰]PEI علاوه بر افزیش جذب پلاسمیدها با مکانیسم جذب غیراختصاصی، تردد داخل سلولی پلاسمید را از طریق بافر کردن ساختمان اندوزمی تسهیل می کند و ضمن تورم اسمزی لیزوزمی و پارگی آن‌ها، پلاسمید را از هضم لیزوزمی نجات می دهد. PEI خطی ۲۲ کیلو دالتونی سمیت کمتری دارد و انتقال موثری در ریه های نوزاد و بالغ نشان داده است.

اتصال لیگاندهای هدف دار مانند ترانسفرین یا آنتی - CD3 - آنتی بادی به PEI ۳۰ تا هزار برابر جذب PEI را توسط سلول‌های تومری افزایش می دهد، البته در نسبت شارژ کم PEI/DNA کارایی انتقال کاهش پیدا می کند.[۳۱] برای کاهش سمیت PEI ترکیب پگیله آن ارائه شده است.[۳۲] خسروی به تازگی مروری بر شیمی PEI و مشخصات ترکیب PEI/DNA انجام داده و ابزارهای انتقال ژن با لیگاندهای هدف یاب سلولی را معرفی کرده است.[۳۳]

۱-۴) کاتیوزان

کاتیوزان یک پلی ساکارید زیست تخریب پذیر است که از پیوند[۴و۱] β گلیکوزیدزی دو زیر واحد D گلوکوزامین N- استیل- D گلوکزآمین تشکیل شده است.[۲۸] این حامل با گروه فسفات DNA واکنش داده و پلاسمیدها را به ذرات کروی و مارپیچی[1] تبدیل می‌کند. خواص کلوئیدی و سطحی کمپلکس‌های کاتیوزان/پلاسمید به وزن مولکول کاتیوزان، نسبت کاتیوزان به DNA و محیط آماده سازی بستگی دارد. توسط این کمپلکس‌ها تاکنون به خطوط سلولی متعددی انتقال ژن صورت گرفته است.[۳۳] گروه‌های آمینو آزاد کاتیوزان به طور کووالان با فروکتوز اصلاح شده و بهبود یافته است.[۳۴]

۱-۵) پلی (۲- دی متیل آمینو) اتیل مت اکریلات (PDMAEMA)

کارایی انتقال ژن بهینه در نسبت پلاسمید /PDMAEMA درصد وزنی - وزنی ۰/۲۵ حاصل می شود و کمپلکس‌های همگن با قطر تقریبی ۱۵۰ mm تشکیل شده اند. جالب اینجاست که وجود پروتئین‌های سرم که بر روی کارایی انتقال ژن در انواع سیستم‌های انتقال تاثیر می گذارند، روی سیستم PDMAEMA تغییری ایجاد نمی کنند.[۳۵]

۱-۶) پلی وینیل پیرولیدین

پلیمرهای حاوی یون مانند پلیمرهای پلی وینیل با جفت بازهای DNA پیوند هیدروژنی ایجاد کرده و پوشش هیدروفوبیک در اطراف پلاسمید DNA ایجاد می کند.[۳۶] پلی وینیل پیرولیدین (PVP) باعث افزایش پراکندگی پلاسمیدها در ماتریس خارج سلولی شده و در پی تزریق عضلانی این حامل‌ها افزایش قابل توجهی در تعداد و توزیع سلول‌های دریافت کننده

[1] *Toroidal*

Archive of SID
www.SID.ir

DNA مشاهده می‌شود.[۳۷] کابانف پیشنهاد کرد که کمپلکس‌های اینترپلی الکترولیت متراکم بین PVP و DNA تشکیل می شود که می تواند باعث حفاظت DNA از هضم نوکلئازی و نیز تسهیل جذب سلولی از طریق واکنش‌های هیدروفوبیک با غشاء سلولی شود.[۳۸]

۱-۷) پلیمرهای زیست تخریب پذیر

به منظور کاهش سمیت سلولی و هضم زیستی و افزایش کارایی انتقال PLL پلی (α - ۴- آمینو بوتیل) - L گیلولیک اسید (PAGA) ساخته شد.[۴۰] کربوبنزوکسی L اکسی لایزین از طریق پوشش گروه آمین L-C BZ لایزین به گروه هیدروکسیل ساخته شده و با کاتالیزور پالادیوم به PAGA پلیمریزه می شود. PAGA یک مشابه زیست تخریب پذیر PLL است که در محلول آبکی سریع هضم شده و L - اکسی لایزین را به عنوان محصول انتهایی تولید می کند. این پلیمر به طور کارا پلاسمید را متراکم کرده و کارایی انتقال بیشتری نسبت به PLL دارد. پلیمر زیست تخریب پذیر دیگر پلی (۴- هیدروکسی- L - پرولاین استر) نیز از CBZ - ۴- هیدروکسی - L - پرولین ساخته می‌شود.

۲) فاکتورهای موثر در انتقال ژن پلیمری

فاکتورهای مختلفی وجود دارد که بر دخول کمپلکس پلیمر- پلاسمید به سلول، حرکت، توزیع داخل سیتوپلاسم و نهایتا تردد داخلی سلولی DNA اثر می‌گذارند. یک سیستم ایده‌آل باید DNA را در سیتوپلاسم پراکنده کرده و مستقیما به طرف هسته حمل کند. کلید موفقیت در تردد داخل سلولی و بیان ژن به نوع حامل، ساختار، عملکرد، توانایی اتصال آن به DNA پلاسمید، اندازه کمپلکس، زمان و مکانیسم تجزیه DNA از کمپلکس بستگی دارد.[۳۰]

۲-۱) اندازه کمپلکس

نفوذ DNA در سیتوپلاسم به اندازه کمپلکس DNA - پلیمر و نفوذ DNA به داخل سلول به اندازه پلاسمید بستگی دارد. انتقال قطعات DNA دو رشته ای نشاندار (فلورسین) با اندازه ۲۱ تا ۶۰۰۰ جفت باز از طریق ریزتزریقی[1] به سیتوپلاسم و هسته سلول‌های هلا مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان می دهد که محدودیت نفوذ DNA به هسته به علت اتصال به پروتئین‌های سیتوپلاسمی و کاهش قدرت تحرک آنهاست. بنابراین برای حامل‌های غیرویروسی مرحله محدود کننده سرعت نفوذ DNA در سیتوپلاسم است.[۴۱]

۲-۲) ساختار پلیمرهای کاتیونی

اختلاف عمده بین پلیمرهای کاتیونی نوع و تعداد نسبی آمین‌های قابل پروتونه شدن آنهاست. پلیمرهای کاتیونی آمین گروه اول دارند و در pH خنثی پروتونه می شوند. اندازه کمپلکس در سلول برای PLL و دندریمر دست نخورده زیادتر از دندریمرهای شکسته یا PEI است. در مورد همه پلیمرها حداکثر کارایی انتقال با افزایش نسبت بار آمین گروه اول به فسفات DNA حاصل می‌شود. علی‌رغم وجود بعضی از اختلافات بین کمپلکس‌های پلیمری از لحاظ شکل ظاهری مارپیچی مشابهی دارند. قطر مارپیچ با پلیمر کاتیونی تغییر می‌کند، اگرچه این تغییر به اندازه فیزیکی پلیمر کاتیونی ارتباط ندارد. برای مثال دندریمرهای دست نخورده نسبت به انواع خردشده، قطر مارپیچ کمتری دارند اما وزن مولکولی دندریمر خردشده، دو برابر انواع دست نخورده است.[۴۲]

۲-۳) سمیت

سمیت پلیمرها به دانسیته بار، نوع کاتیون‌ها و وزن ملکولی پلیمر بستگی دارد. اثرات سیتوتوکسیک آن‌ها در تجمع و تغییر ریخت شناسی اریتروسیت‌ها[۴۷]، گسیختگی غشاء سلول‌ها، افزایش تفوذ پذیری و از دست رفتن پروتئین‌های سیتوپلاسمی ظاهر می شود. PLL با وزن مولکولی کم ۴ کیلو داتسون در غیاب سرم غیرسمی است اما در وزن‌های بیشتر سمی بوده و زمان تاخیر کمتری دارد. سمیت پلیمرها با افزایش غلظت آنها زیاد می شود.

[1] *Microinjection*

Archive of SID
www.SID.ir

به علاوه PEI خطی نسبت به انواع انشعابی و دندریمرهای پلی آمید با شارژ یکسان سمیت کمتری دارند.

۲- ۴) هدف یابی اختصاصی

پلیمر کاتیونی در انتقال سیتوپلاسمی DNA موثر است اما وجود بار مثبت اضافی کمپلکس قبل از ورود به غشاء سلولی باعث پیوند غیر اختصاصی با ترکیبات خونی می شود.[۴۳] هدف‌یابی اختصاصی با اتصال کووالان لیگاند به پلیمر کاتیونی صورت می گیرد. اما اگر بار کاتیونی برای اتصال به DNA کافی نباشد وجود قسمت هدف یاب تاثیر در کارایی کل ندارد.

۲-۵) رهایش اندوزمی

رهایش کمپلکس پلیمر- پلاسمید از اندوزوم مانع اصلی در فرآیند انتقال ژن است. برای تسریع این پدیده، استراتژی‌های مختلفی مانند افزودن مواد لیزوزموتروپیک[۱] به محیط کشت، افزودن ذرات غیر فعال کننده یا پپتیدهای اندوزمولیتیک[۲] به کمپلکس‌هایDNA صورت می‌گیرد.[۴۳] برای افزایش کارایی باید کمپلکس بتواند به راحتی از اندوزم رها شود. رهایش از اندوزم به شدت به pH وابسته است و ترکیب با پلیمری که ظرفیت بافری زیادی داشته باشد برای کنترل رهایش DNA مناسب‌تر است. عوامل لیزوموتروپیک مختلف مانند کلروکین[۳] باعث آزاد شدن DNA در سیتوزل می شوند، اما این عوامل سمی هستند و برای استفاده در بدن موجود زنده کارایی ندارند.

استفاده از عوامل تحریک کننده ادغام مانند پلی هیستیدین باعث تسهیل رهایش وابسته به pH می شوند.[۴۴] پلیمرهای کاتیونی مانندPEI خطی دندریمرهای پلی آمیدوآمین نیز به علت خاصیت بافری زیاد و توانایی پروتونه شدن گروه‌های آمین کارایی انتقال ژن را افزایش می دهند.[۴۲]PLL در طی تشکیل کمپلکس با DNA پروتونه شده و در مرحله آخر اندوزسیتوز نمی تواند از محیط اندزوم پرتون جذب کند.[۴۳]

برای افزایش هرچه بیشتر کارایی انتقال، پپتیدهای ادغام زا[۴] که از منابع ویروسی مشتق می شوند، به صورت کووالان به کمپلکس‌ها متصل می شوند. یک پپتید آمفی پاتیک یا ادغام زا با ۳۰ اسید آمینه حاوی ترادف تکراری از GALA[۵] باعث افزایش رهایش اندوزمی می شود.[۴۵] این ترادف در pH خنثی ساختار آلفا هلیکس پیدا می‌کند. روی هلیکس گلوتامین (قسمت باردار ملکول) و دنباله های هیدروفوبیک در جهت عکس هم قرار دارند و ساختار آمفی پاتیک به وجود می آورند. در پی وارد کردن ترادف GALA به محیط مایع در pH اسیدی رهایش اندوزمی DNA تسهیل می شود.[۴۵] زیر واحد ۲ هم آگلوتینین که از ویروس آنفولانزا گرفته شده و زنجیره های پپتیدی آن از سایر وکتورهای ویروسی متفاوت است، در رهایش DNA از اندوزم و جلوگیری از هضم آن موفق بوده اند.[۴۶]

۳) پلیمرهای حساس به دما به عنوان حامل های انتقال ژن

کوپلیمر دی متیل آمینو اتیل مت اکریلات (DMAEMA) و N ایزوپروپیل اکریل آمید (NIPAAm) در نسبت‌های مونومری و وزن مولکولی های مختلف به عنوان سیستم حامل در انتقال ژن گزارش شده اند. نسبت پلاسمید - کوپلیمر که منجر به تولید کمپلکس‌های ۲۰۰ نانومتری می شود، با افزایش محتوای NIPAAm در کوپلیمر، افزایش یافته و مستقل از وزن مولکولی است. به هر حال کمپلکس‌های حاوی کوپلیمرهای با وزن مولکولی کم یا مقدار زیاد NIPAAm، که در C ° ۲۵ تهیه شده‌اند با افزایش دما تا C ° ۳۷ بلافاصله تجمع می یابند. این در حالی است که کمپلکس‌های حاوی کوپلیمر با وزن مولکولی زیاد یا مقدار کم NIPPAAm در C ° ۳۷ تقریبا مقاوم هستند. پتانسیل زتا کمپلکس‌ها مستقل از وزن مولکولی کوپلیمر بوده و

[1] *Lysosomotropic*
[2] *Endosomolytic*
[3] *Chloroquine*

[4] *Fusogenic*
[5] *Glutamic acid-Alanine – Leucine-Alanine*

Archive of SID
www.SID.ir

با افزایش نسبت پلاسمید به کوپلیمر افزایش یافته و به مقدار ثابت می رسد. نسبت پلاسمید - کوپلیمر برای رسیدن به این مقدار ثابت با افزایش محتوای NIPAAm افزایش می یابد و مستقل از وزن مولکولی کوپلیمر است.

به طور کلی کمپلکس‌های ناپایدار در مقایسه با انواع پایدار، کارایی انتقال ژن به سلول کمتری دارند. کارایی انتقال برحسب نسبت پلاسمید- کوپلیمر منحنی زنگوله ای شکل ایجاد می کند. با افزایش محتوای NIPAAm، نسبت پلاسمید به کوپلیمر (با کارایی انتقال حداکثر) افزایش اما کارایی انتقال و سمیت با کاهش پتانسیل زتا کاهش می یابد. بنابراین علاوه بر اندازه، پتانسی زتا مشخصه ای است که رفتار این نوع کمپلکس‌ها رادر انتقال ژن پیش بینی می‌کند. کوپلیمر DMAEMA و NIPAAm، سیستم حامل مناسبی برای تحویل ژن هستند زیرا قادرند DNA را به صورت ذرات کوچک متراکم کنند و کمپلکس‌های حاصله سمیت کم و انتقال غیراختصاصی را در بدن نشان می دهند.

یک گروه حامل‌های غیرویروسی پلیمرهای کاتیونی محلول در آب مانند پلی- L لایزین هستند.[۴۸-۵۳] کاربرد پلیمر کاتیونی ساختگی (پلی دی متیل آمینواتیل متیل اکریلات) Pol/DMAEMA نیز به عنوان حامل ژن مورد بررسی است. کارایی انتقال کمپلکس پلاسمید -Poly DMAEMA / pCMV lacz به سلول‌های ۳- OVCAR و Cos-V در شرایط آزمایشگاه نسبت به کمپلکس پلاسمید به پلیL - لیزین و DEAE، دکستران بیشتر است.[۴۳]

کوپلیمر DMAEMA و اتوکسی تری اتیلن گلیکول متیل اکریلات یا N وینیل پرولیدن نیز به عنوان عوامل انتقال گزارش شده است.[۵۴-۵۵] عوامل مهم در تعیین کارایی انتقال و سمیت سلولی، دما و پتانسیل زتا کمپلکس‌ها است.

پلی NIPAAm پلیمری است خنثی و حساس به حرارت که در دمای کم به شدت در آب محلول است اما در دمای C°۳۲- ۳۱ رسوب می‌کند.[۴۳] این دما به عنوان حد پائینی دمای بحرانی محلول (LCST)[1] شناخته می شود. LCST کوپلیمرهای حاوی NIPAAm به طبیعت کومونومرها، ترکیب کوپلیمر و معماری آن بستگی دارد. همان طور که انتظار می رود تغییر در نسبت DMAEMA/NIPAAm بر اندازه کمپلکس اثر می گذارد زیرا یک جزء حساس به حرارت در ترکیب وجود دارد و اندازه کمپلکس وابسته به دما است.

تغییر در این نسبت بر شارژ کمپلکس اثر دارد و تغییر در اندازه و شارژ کمپلکس بر کارایی انتقال و سمیت آن اثر می گذارد. با افزایش نسبت کوپلیمر به پلاسمید حداکثر کارایی انتقال افزایش می یابد اما در نسبت‌های خیلی زیاد در اثر افزایش کوپلیمرهای آزاد سمیت زیاد می شود. بنابراین حداکثر کارایی انتقال جایی است که پلاسمید با حداکثر کوپلیمرها پوشیده شود اما کوپلیمرهای آزاد حداقل باشند.

گزارش ها نشان می دهند که علاوه بر اندازه ذره، پتانسیل زتا نیز نقش مهمی در انتقال بازی می کند. با کاهش پتانسیل زتا هم کارایی انتقال و هم سمیت سلولی کاهش می یابد (زیرا مانند سایر پلیمرهای کاتیونی پلی (DMAEMA) سمی است). از آنجا که بین بار مثبت کمپلکس‌ها و بار منفی غشاء سلولی اتصال الکتروستاتیک ایجاد شده، سپس اندوسیتوز رخ می دهد، نتیجه کاهش پتانسیل زتا (با افزایش محتوای NIPAAm)، اتصال نسبتا ضعیف با سلول‌هاست که این پدیده منجر به کاهش جذب کمپلکس‌ها و در نتیجه کاهش کارایی انتقال می شود.

بحث

ژن درمانی وعده های بزرگی برای درمان انواع بیماری‌های ژنتیکی و حتی اکتسابی داده است. در مراحل اولیه عمده روش‌های انتقال ژن براساس حامل‌های ویروسی بود. امروزه اطلاعات روزافزونی در مورد روش‌های غیرویروسی جمع‌آوری شده است و کنترل موضع و عملکرد ژن در موجود زنده ممکن

[1] *Lower Critical Solution Temprature*

Archive of SID
www.SID.ir

شده‌است. جالب‌تر اینکه سیستم‌های تحویل داروی پیشرفته متعددی که در چند ساله اخیر توسعه یافته است، مصرف مستقیم و شتاب دهنده در توسعه سیستم های انتقال ژن غیر ویروسی دارند.

منابع References

1. Sadeghizadeh M, Ling P. Transcription from Varicella-zoster virus gene 67. J Virol 1992; 66: 3690-8.

۲. مجید صادقی‌زاده، مجید رضا ذوالفقاری،حوریه سلیمان‌جاهی و محمدنبی سربلوکی. انتقال ژن به داخل سلول‌های پستانداران با استفاده از دندروزوم‌ها، اولین کنگره بیوشیمی فیزیک ایران (IBB). سال ۱۳۷۹

3. Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M. Dendrosomes: a novel family vehicle for transfection and therapy. J Chem Technol Biotechnol 2000; 75: 919-22.
4. Lars H, Roland L, Donna B, et al. Structural variation of cationic lipids: minimum requirement for improved oligonucleotide delivery into cells. Journal of Controlled Release2006; 110: 444-56.
5. Caplen NJ. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. Gene Ther 1995; 2: 603-13.
6. Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by Polycations. Biochemistry1996; 35: 1027-36.
7. Zhang YP. Self assembling DNA-lipid particles for gene transfer. Pharmaceut Res1996; 14: 190-6.
8. Escriou V, Ciolina C, Lacroix F, et al. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes 1998; 1368: 276-88.
9. Wolfer MA. Characterization of vectors for gene therapy formed by self assembly of DNA with synthetic block co-polymers. Hum Gene Ther 1996; 717: 2123-33.
10. Barthel F. Gene transfer optimization with lipospernine coated DNA. DNA Cell Biol 1993; 12: 553-60.
11. Kabanov AV, Kabonov VA. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic materials into cells. Bioconj Chem 1995; 6: 7-20.
12. Zhou X. Lipophile polysine mediate efficient DNA transfection in mammalian cells. Biochim Biophys Acta 1991; 1065: 8-14.
13. Kircheis R, Blessing T, Brunner S, et al. Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes. Journal of Controlled Release 2001; 72:165-70.
14. Wagner E, Curiel D, Cotton M. Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis. Adv Drug Deliv Rev 1994; 14: 113-35.

Archive of SID
www.SID.ir

15. Felzmann T, Buchberger M, Jechlinger M, et al. Xenogenization by tetanus toxoid loading into lymphoblastoid cell lines and primary human tumor cells mediated by polycations and liposomes. Cancer Letters2000; 161: 241-50.
16. Tang MX. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. Bioconj Chem 1996; 7: 703-14.
17. Bielinska A. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisene expression plasmids transfection using PAMAM dendrimers. Nucl Acids Res 1996; 24: 2176-82.
18. Haensler J, Szoka FC. Polymidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. Bioconj Chem 1993; 4: 5372-9.
19. Kato T. Synthetic cationic amphiphyle for liposome-mediated DNA transfection with less cytotoxicity. Biol Pharmaceut Bull 1996;19: 860-3.
20. Legndore JY. Dioleoylmlittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mamalian cells. Bioconj Chem 1997; 8: 57-63.
21. Hong K. Stabilization of cationic liposome plasmid DNA complexes by polyamines and poly (ethylene glycol) phospholipid conjngates for efficient in vivo gene delivery. FEBS Lett 1997; 400: 233-7.

۲۲. خسروی دارانی کیانوش ، مظفری محمد رضا. نسل دوم سامانه لیپوزم آنیونی برای ژن درمانی. مجله علمی پژوهشی طبیب شرق. سال هفتم، شماره ۱، سال ۱۳۸۴، ص ۹-۷۱.

23. Michael SI, Curiel DT. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway. Gene Ther 1994; 1: 223-32.
24. Chiu HC. Lyosomal degradability of poly (α-amino acids). J Biomed Mater Res1997; 34: 381-92.
25. Choi YH, Liu F, Park JS, Kim SW. Lactose-poly (ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-tapgeted gene carrier. Bioconjugate Chem 1998; 9: 708-18.
26. Maruyama A, Ishihara T, Kim JS, et al. Design of multilayered nano particles as a DNA carrier. Colloids Sur A: Physioco Eng Asp 1999; 153: 439-43.
27. Kim HJ, Kwon MS, Choi JS, et al. Highly effective and slow-biodegradable network-type cationic gene delivery polymer: Small library-like approach synthesis and characterization. Biomaterials 2006; 27:2292-301.
28. Kabanov AV, Seymour LW, Felgner PL, et al. Self-Assembling Complexes for Gene Delivery from Chemistry to Clinical Trial. New York: John Wiley & Sons; 1997.PP.43-70.
29. Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7297-301.
30. Hill IRC, Garnett MC, Bignotti F, Davis SS. In vitro cytotoxicity of poly (amidoamines): relevance to DNA delivery. Biophys Biochim Acta 1999; 1427: 161-74.

Archive of SID
www.SID.ir

31. Ferrari S, Pettenazzo A, Garbati N, et al. Poly ethylenimine shows properties of interest for cystic fibrosis gene therapy. Biochim Biophys Acta 1999; 1447:219-25.
32. Kircheis R, Kichler A, Wallner G, et al. Coupling of cell-binding ligands to poly ethylenimine for targeted gene delivery. Gene Ther 1997; 4: 409-18.
33. Khosravi K. Poly ethilenimine and its role in gene transfer. Iran Chem Eng J 2006. (Submitted).
34. Zelphati O, Uyerchi LS, Barron LG, Szaka FCJ. A survey on polymeric gene delivery. Biochim Biophys Acta 1998; 1390: 119-33.
35. Stolinik SB, Daudali B, Arien A, et al. The effect of surface coverage and conformation of poly (ethylene oxide) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carrier drug carrier. Biochim Biophys Acta 2001; 1514: 261-79.
36. Li S, Mac Laughlin FC, Fewell JG, et al. Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. Gene Ther 2001; 8: 494-7.
37. Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, et al. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. Pharm Res 1995; 13: 201-9.
38. Mumper RJ, Wang J, Klakamp SL, et al. Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. J Controlled Rel 1998; 52: 191-203.
39. Licciardi M, Campisi M, Cavallaro G, et al. Synthesis and characterization of polyaminoacidic polycations for gene delivery. Biomaterials2006; 27: 2066-75.
40. Munier S, Messai I, Delair T, et al. Cationic PLA nano particles for DNA delivery: Comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces2005; 43: 163-73.
41. Licciardi M, Campisi M, Cavallaro G, et al. Novel cationic polyaspartamide with covalently linked carboxypropyl-trimethyl ammonium chloride as a candidate vector for gene delivery. European Poly J. In Press, Available online 2005.
42. Kabanov AV, Seymour LW, Felgner PL, et al. Self Assembling Complexes for Gene Delivery from Chemistry to Clinical Trial. New York: John Wiley & Sons; 1997.PP.1-79.
43. De Smedt SC, Remaut K, Brackman K, et al. Studying biophysical barrier to DNA delivery by advanced light microscopy. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57: 141-210.
44. Benns JM, Choi JS, Mahato RI, et al. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: *N*-Ac-poly (L-histidine)-graft-poly (L-lysine) comb shaped polymer. Bioconjug Chem 2000; 11: 637–45.
45. Zelezetsky I, Pag U, Sahl HG, Tossi A. Tuning the biological properties of amphipathic α-helical antimicrobial peptides: Rational use of minimal amino acid substitutions. Peptides 2005; 26: 2368-76.
46. Taanam JM, Schrage C, Bokman E, et al. Nucleotide sequence of the last exon of the gene for human cytochrome c oxidase subunit VIb and its flanking regions. Biochim Biophys Acta 1991; 1089: 283-5.

Archive of SID
www.SID.ir

47. Zheng YP, Shi J, Qin L, et al. Dynamic depth-dependent osmotic swelling and solute diffusion in articular cartilage monitored using real-time ultrasound. Ultrasound in Medicine & Biology 2004; 30: 841-9.
48. Xauner W. Polylysine, based transfection system utilizing receptor mediated delivery. Adv Drug Delivery Rev1998; 30:97-113.
49. Mashid M. Targeted delivery of plasmid DNA complexes with galactosylated poly (lysine). J Control Release 1998; 53: 301-10.
50. Erbacher P. The reduction of positive charges of polylysine by partial gluconolnylation increases the transfection efficiency of poly-lysine/DNA complexes. Biochim Biophys Acta 1997; 1324: 27-36.
51. Remy JS. Gene transfer with lipospermines and poly ethylenimines. Adv Drug Delivery Rev1998; 30:85-97.
52. Toncheva V. Novel vectors for gene delivery formed by self assembly of DNA with poly lysine grafted with hydrophilic polymers. Biochim Biophys Acta 1998; 1380:345-68.
53. Boussif O. A versatile vector for gene and oligoneucleotide transfer into cells in culture and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7297-301.
54. Wetering PV. Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of PDMAEMA/plasmid. J Control Release1997; 49: 59-69.
55. Wetering PV. DMAEMA based copolymer as gene transfer agent. J Control Release 1998; 53: 145-53.

Archive of SID

www.SID.ir