

سنتز و شناسایی نانوذرات زیست سازگار کیتوسان/آمینوتترازول بعنوان نانوحامل جدید جهت تحویل ژن

الهه مصدق^{۱*}، مسعود ترکزاده ماهانی^۲

۱- دانشیار، گروه مواد نو، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

کدپستی ۷۶۳۱۵-۱۱۷

*نویسنده مسئول: emosaddegh@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۳

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶

چکیده- در این مقاله تلاش شده است تا با استفاده از ۵-آمینو-۱H-تترازول و بیوپلیمر کیتوسان در جهت سنتز یک نانو حامل جدید و زیست سازگار با کارایی بسیار بالا و کمترین سمیت در انتقال ژن استفاده شود. این نانوحامل جدید، علاوه بر غیر سمی و زیست تخریب پذیر و مقرون به صرفه بودن، بسیار کارآمد و دارای توانایی بالا در محافظت از ژن می باشد. ساختار و ترکیب شیمیایی نانوحامل سنتز شده، بطور کامل توسط آنالیزهای FESEM, TEM, XRD, FTIR, Zeta potential و DLS بررسی و شناسایی شد. همچنین، جهت بررسی توانایی نانوحامل مورد نظر در انتقال ژن به داخل سلول، از رده سلولی Hek-293T استفاده گردید.

کلید واژگان: ۵-آمینو-۱H-تترازول، کیتوسان، نانو حامل، Hek-293T، ژن رسانی

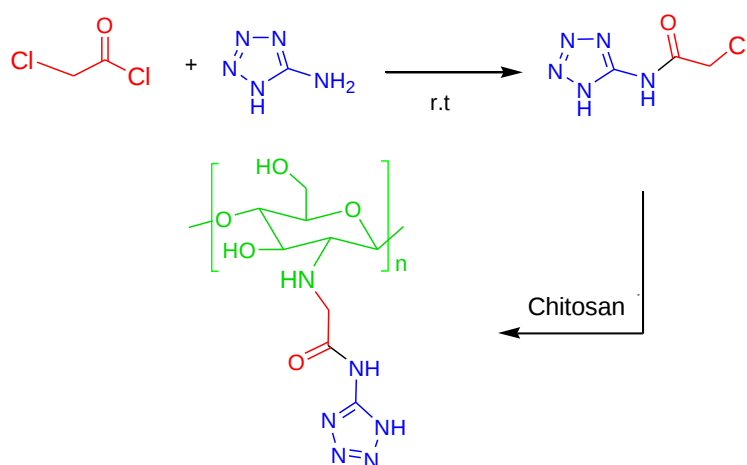
۱- مقدمه

یکی از معروفترین بیماری‌هایی که منشا آن عوامل ژنتیکی است، سرطان می باشد. ژن رسانی امیدها را برای درمان این بیماری زنده نگه داشته است. سرطان به عنوان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در جهان شناخته می شود. اکثر سرطان‌ها، درمان قطعی ندارند، اما برای جلوگیری از رشد و تکثیر آن‌ها از روش‌های جراحی، هایپرترمی،

پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و پیوند مغز استخوان، استفاده می‌شود. از اینرو، امروزه ژن درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است، به طوری که بتوان سازه‌ی ژنتیکی معیوب را بهبود داد. برای انتقال سازه‌ی ژنتیکی، سیستم ژن رسانی غیرویروسی به دلیل نواقص و کمبودهای سیستم‌های ژن رسانی ویروسی، برای مثال پکسی‌ایمنی، مورد توجه قرار دارند [۱،۲].

اخیرا، نانوذرات بر پایه‌ی بیوپلیمر کیتوسان به دلیل ویژگی‌های ذاتی بسیار مطلوب به عنوان حامل ژن رسان غیرویروسی مورد توجه قرار گرفته اند. عدم سمیت، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، عدم ایجاد حساسیت و دسترس پذیری، از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مناسب این ترکیب می‌باشد [۳]. کیتوسان همچنین دارای ویژگی هیدرولیکی بالا، نفوذ پذیری مطلوب آب و مقاومت شیمیایی خوب است. ویژگی ها و دسترس بودن آن باعث می شود که این ماده برای کاربردهای مختلف از جمله به عنوان حامل برای انتقال مولکول های درمانی، اولترا فیلتراسیون، اسمز معکوس و فرایندهای تصفیه استفاده شود. علاوه براین، کیتوسان در پزشکی و دارو سازی، به عنوان افزودنی مواد غذایی، عامل ضد میکروبی و در اصلاح محیط زیست کاربردهای عملی پیدا کرده است [۴-۶].

هنگامی که از کیتوسان به تنهایی به عنوان نانوحامل استفاده می‌شود، میزان بیان ژن در آن بسیار پایین می‌باشد. بنابراین مطالعات بر روی عامل دار کردن گروه های هیدروکسی و آمینی آن انجام می‌شود، به گونه‌ای که ویژگی‌های یک نانوحامل مناسب برای انتقال ژن در آن به وجود آیند. از آن جایی که کیتوسان ویژگی های پلیمری منحصر به فرد، ایجاد ژل و تمایل به تجزیه شدن دارد، سیستم های رهایش هدفمند و کنترل شده ی بسیاری که مبنای کیتوسانی دارند، توسعه پیدا کرده و آزمایش شده اند. [۷-۱۲]. بر همین اساس در این پژوهش تلاش شده است تا با عامل دار کردن گروه های آمینی کیتوسان توسط آمینواسید ترازول از طریق اتصال کووالانسی، ساختار بیوپلیمر کیتوسان را به روشی نوین، اصلاح کرده و بر توانایی کیتوسان در بارگیری و محافظت از ژن بطور قابل ملاحظه ای افزود (شکل ۱).



شکل ۱- طرح شماتیک سنتز نانوحامل کیتوسان/آمینوترازول

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ دستگاه‌های مورد نیاز

طیف های IR با دستگاه اسپکترومتر Bruker-TENSOR27 گرفته شده است. برای آنالیز ساختار نانوحامل، از تفرق اشعه X (XRD) دستگاه پراش بروکر DA (40kV و 40mA) با تابش $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=0.154 \text{ nm}$)

استفاده گردید. طیف های XRD در محدوده $2\theta = 20^\circ$ ثبت گردید. اندازه متوسط و توزیع اندازه ذرات کاتالیست ها توسط دستگاه پراکندگی نور لیزر دینامیک اندازه گیری (FRITSCH Analysette 22 NanoTec Laser Particle Sizer) شد. مورفولوژی سطح کاتالیست های سنتز شده با میکرو سکوپ روبش الکترونی نشر میدانی

(FESEM) انجام شد: بدین صورت که نمونه های خشک بر روی ورقه های نازک از یون های طلا در مدت زمان ۱۵۰ ثانیه پوشش داده شدند. سپس سطح ساختار توسط میکروسکوپ روبش الکترونی نشر میدانی (Hitachi S4160) با ولتاژ شتاب دهنده ی ۱۵kV مشاهده و بررسی شد. تصاویر TEM توسط میکروسکوپ انتقال الکترونی مدل LEO912-AB (LEO, Germany) با ولتاژ شتاب دهنده ی ۱۲۰ kV ثبت گردید. برای این آنالیز، ذرات پودر جامد بر روی فویل کربن ساپورت شده با مس قرار گرفتند. آنالیز تفرق انرژی اشعه X-(EDX) با استفاده از یک آشکار ساز EDS آکسفورد (انگلستان) با ولتاژ شتاب دهنده ی ۱۰/۰ کیلو ولت انجام شد.

۲-۲ سنتر ترکیب ۲-کلرواستیل کلراید اصلاح شده با ترکیب ۵-آمینو-۱H-تترازول

برای سنتر این ترکیب، ابتدا مقدار ۵ میلی لیتر اتانول بدون آب را درون یک بالن ۱۰ میلی لیتری در حمام یخ قرار داده و ۲ میلی مول از ترکیب ۵-آمینو-۱H-تترازول را به بالن اضافه و حل نمودیم. سپس ۲ میلی مول از ترکیب تری کلرو پروپیل تری متوکسی سیلان به بصورت قطره قطره و تحت شرایط هم زدن شدید به بالن واکنش اضافه گردید. فرایند تکمیل واکنش توسط TLC دنبال و تأیید شد. حدواسط حاصله، جهت ادامه سنتر نانوحامل، مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳ تهیه نانوحامل کیتوسان اصلاح شده هدفمند

جهت تهیه سامانه ی ژن رسان جدید موردنظر، ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از کیتوسان با وزن مولکولی متوسط، در محلول استیک اسید ۲٪ حل شد. با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرو، محلول کیتوسان، فیلتر شده تا ناخالصی ها و کیتوسان حل نشده از محیط حذف شود. سپس محلول کیتوسان به بالن شیشه ای دو دهانه منتقل و دمای آن به ۴۰

درجه سانتی گراد رسید. در ادامه، ۰/۱ گرم K_2CO_3 و حدواسط تترازولی تهیه شده را با سرعت ملایم به آن اضافه و در دمای $40^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت حرارت داده شد. باز اضافه شده، سبب فعال شدن گروه های آمینی و تسهیل واکنش افزایشی گروه های آمینی با گروه کربونیل استیل کلراید می شود. فرایند تکمیل واکنش، توسط TLC پیگیری شد. بعد از تکمیل واکنش، نانوحامل سنتر شده (شکل ۱)، چندین بار با آب مقطر شسته شو داده شد تا حلال آلی و مواد واکنش نداده و ناخالصی ها از محیط حذف شوند. سپس، محصول حاصل را در بالن ۱۰۰ میلی لیتری به حجم رسانده و جهت انجام تست های بیولوژیکی در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد. نانو حامل تهیه شده در غلظت ۱۰۰۰ppm دارای بیشترین پایداری بود، بنابراین، این غلظت جهت انجام تست های بیولوژیکی انتخاب شد.

۴-۲ تست MTT

اساس این تست احیای نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده و تولید بلورهای بنفش رنگ و نامحلول در آب فورمازان است. تعداد مشخصی از سلول های HEK-293T کشت داده شده در هر یک از چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه کاشته شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. غلظت برتر انتخاب شده (۱۰۰۰ppm) که توسط پارامترهای مختلفی برگزیده شده بود (به دلیل پایداری مناسب نانوحامل) به چاهک های حاوی محیط کشت و سلول اضافه شده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور CO_2 انکوبه شد. محلول استوک MTT که شامل ۵ میلی گرم پودر MTT در یک میلی لیتر بافر فسفات است، تهیه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون نانو حامل و سلول های کشت شده ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت چاهک ها

میزان پلاسمید استفاده شده) و مطالعات مربوط به محافظت عامل ژنتیکی توسط نانو حامل از آنزیم DNase صورت پذیرفت.

۶-۲ آزمایش Gel Retardation

هدف از انجام این تست تایید برهمکنش بین پلاسمید و نانو حامل می باشد. برای تهیه ی ژل آگارز یک درصد با اندازه متوسط، ابتدا مقدار ۶/۰ گرم از آگاروز در ۶۰ میلی لیتر از بافر ۱xTBE به وسیله ی حرارت حل کردیم تا محلول شفاف به دست آید. پس از تنظیم شانه ژل، محلول به دست آمده را در سینی ریخته و پس از مدتی ژل تشکیل شد و ژل حاصل را درون تانک ژل که حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از بافر ۱xTBE است، قرار داده، که با جدا کردن شانه ی ژل، چاهک ها به دست آمد.

با انکوبه کردن مقادیر مشخصی از نانو حامل و پلاسمید با غلظت های مشخص، میزان (N/P) که بیانگر نسبت نانو حامل به پلاسمید می باشد به دست آمد. برای این کار مقدار ۴ میکرولیتر از پلاسمید با غلظت ۷۰ نانوگرم بر میکرولیتر را درون ۱۰ عدد میکروتیوب ریخته و سپس مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۲ میکرولیتر از نانو حامل با غلظت ۱۰۰۰ ppm را به ترتیب به میکروتیوب های حاوی پلاسمید اضافه کردیم و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس فرمولاسیون ها را با میزان مشخصی از لودینگ دای مخلوط کرده و به درون چاهک ها انتقال داده و با ولتاژ و میلی آمپر حدود ۱۰۵ و ۵۰ به مدت ۴۵ دقیقه جریانی الکتریکی برقرار شد. چاهک های یک و دو به ترتیب به لدر DNA و پلاسمید عریان (کنترل) اختصاص یافتند.

۷-۲ آزمایش DNase protection

۸ میکرولیتر از نمونه (نانو حامل و ژن)، ۱/۲ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر DNase با هم مخلوط

تخلیه شد و ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT تهیه شده و به آنها اضافه شد. به شکلی که در هر چاهک ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT وجود داشت و سپس میکروپلیت حاوی سلول ها به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 قرار داده شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، تمامی محلول موجود در چاهک ها تخلیه شده و به هر یک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد. محلول DMSO با نفوذ پذیر کردن غشای سلولی و با انحلال فورمازان در خود سبب پخش رنگ ارغوانی در محیط چاهک ها می شود. میکروپلیت ها به آرامی به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد تا رنگ ارغوانی کاملاً در محیط چاهک ها پخش شود، سپس به کمک دستگاه الیزا ریدر میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر به دست آمد.

۲-۵ برهمکنش بین پلاسمید و نانو کامپوزیت کیتوسانی - سیلیکاتی

برای تأیید برهمکنش بین پلاسمید و نانوحامل ساخته شده از تکنیک ژل الکتروفورز استفاده شد. ژل الکتروفورز یک تکنیک آزمایشگاهی برای جدا کردن قطعات DNA بر اساس اندازه می باشد. در روش ژل الکتروفورز از یک میدان الکتریکی استفاده می شود تا DNA با بار منفی از ماتریکس ژل آگارز حرکت کرده و به سمت الکترود مثبت جابجا شوند. قطعات کوچکتر DNA نسبت به قطعات بزرگتر سریعتر از منافذ موجود در ژل عبور می کنند، بنابراین می توان طول قطعه DNA را با استفاده از ژل الکتروفورز و از روی لدر DNA (مجموعه ای از قطعات DNA با طول مشخص) تعیین کرد.

به کارگیری تکنیک ژل الکتروفورز در این پژوهش برای تایید برهمکنش های بین پلاسمید DNA و نانوکامپوزیت سنتز شده از قبیل بارگیری عامل ژنتیکی و تعیین میزان N/P (نسبت میزان نانوحامل استفاده شده به

شد و به حجم ۲۵ میکرو لیتر رسیده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه تحت انکوباسیون قرار گرفت. سپس، بلافاصله به روی یخ انتقال یافت و با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز بررسی لازم صورت پذیرفت. علاوه بر این، در یکی از چاهک های ژل، عامل ژنتیکی بدون استفاده از نانوحامل در معرض آنزیم مخرب DNA قرار گرفت.

۸-۲ آزمایش انتقال

برای انتقال ژن به درون سلول از سلول های رده -HEK293 استفاده شد. سلول ها در DMEM غنی از گلوکز محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین در رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد کربن دی اکسید در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در فلاسک کشت داده شد. لامل های استریل شده در پتری دیش های 10 cm^2 قرار داده شدند و سلول ها با آنزیم تریپسین - EDTA جدا شدند و داخل پتری دیش های که لامل در داخل آنها انتقال و کشت یافتند. بعد از ۲۴ ساعت که سلول ها به تراکم حدود ۶۰-۷۰ درصد رسیدند، انتقال ژن را به صورت زیر بر روی آن انجام گرفت. فرمولا سیون حاوی نانوحامل و پلاسمید، با توجه به میزان N/P تهیه شدند. در مرحله ی بعد این ترکیب به سلول های کشت شده اضافه شد. بعد از گذشت مدت زمان ۱۲ ساعت محیط سلول ها خارج و محیط کشت تازه DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی اضافه شد. سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت و CO_2 قرار داده، بعد از این مدت محیط کشت سلول ها خارج و سلول ها با بفر PBS شستشو داده شدند و سپس لامل ها از پتری دیش ها خارج و در زیر میکروسکوپ فلورسنت با طول موج تحریکی ۵۸۰nm میزان بیان پلاسمید مورد بررسی قرار

گرفت. با اعمال تمام شرایط ذکر شده، بیان ژن در حضور میدان مغناطیسی با شدت ۰/۳ تسلا صورت پذیرفت.

۳-۲ بحث و نتیجه گیری

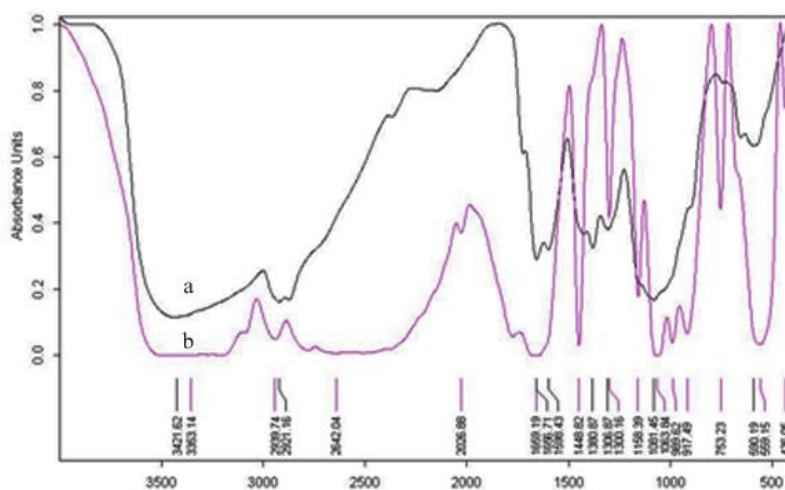
۱-۳ سنتز نانوحامل

یکی از ویژگی های مهم در سنتز نانو حامل کیتوسانی، تهیه محلول کلئیدی پایدار، با حداقل میزان سمیت و بالاترین توانایی در بارگیری ژن می باشد. از اینرو نسبت کیتوسان با وزن مولکولی متوسط و حدواسط سنتزی به کار برده شده جهت عامل دار کردن گروه های آمینی کیتوسان، مورد بهینه سازی قرار گرفت. حدواسط تترازولی، با استفاده از آمینواسید تترازول و ۲-کلرواستیل کلرید سنتز شده و جهت اصلاح ساختار شیمیایی کیتوسان، مورد استفاده قرار گرفت. از آنجائیکه سنتز حدواسط، واکنشی گرمازا است، مخلوط واکنش در حین سنتز در حمام یخ قرار داده می شود تا از تشکیل محصولات جانبی جلوگیری نماید. در نهایت، نانوحامل جدید عامل دار شده، جهت شناسایی و بررسی کاربردهای آن در سیستم انتقال ژن به سلول های رده HEK-293T، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

۲-۳ شناسایی ساختار نانو حامل

۳-۳ آنالیز FTIR

برای بررسی و اثبات ساختار نانو حامل، از تکنیک FTIR استفاده گردید (شکل ۲). الگوهای طیفی مشاهده شده در محدوده ی 3421 cm^{-1} ، نشان دهنده ی ارتعاشات کششی الگوهای طیفی O-H و N-H می باشند. پیک های جذبی مربوط به پیوندهای N-H با پیک های حاصل از ارتعاشات کششی گروه های O-H همپوشانی داشته و بصورت مشخص قابل رویت نمی باشد. پیک های جذبی در ناحیه ی 2921 cm^{-1} مربوط به باندهای ارتعاشات کششی C-H می باشند [۱۳]. پیک های جذبی ظاهر شده در ناحیه ی 1651 cm^{-1} در طیف a و b مربوط به ارتعاشات کششی گروه های آمینی آزاد هستند [۱۴].



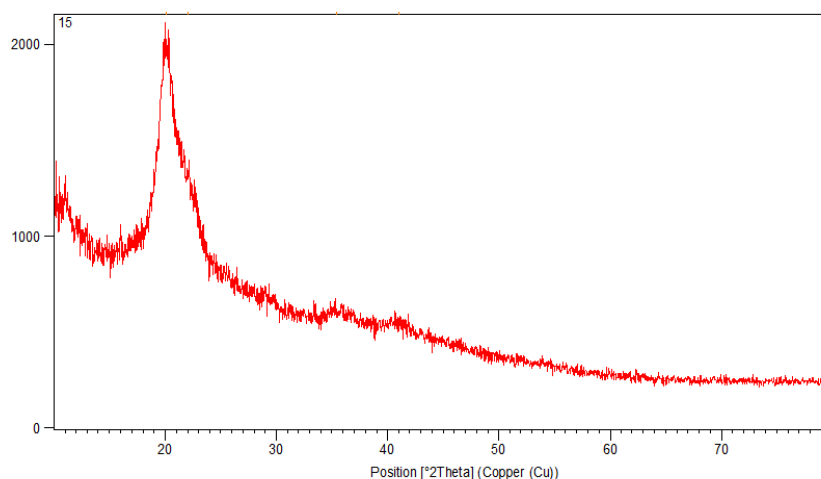
شکل ۲- طیف FTIR (a) کیتوسان خالص و (b) نانو حامل

ناشی از افزایش تعداد گروه های آمینی در ساختار نانو حامل به واسطه وجود حد واسطه تترازولی می باشد.

۳-۴ آنالیز XRD و EDX

در پژوهش حاضر به دلیل استفاده از ترکیبات پلیمری و ترکیبات آلی میزان کریستالیتی بودن در نانو حامل پایین می باشد. از مشخصه های اصلی فاز بیوپلیمر کیتوسان در ساختار نانو حامل، پیک هایی با مشخصه ای اصلی $2\theta = 11^\circ$ و $2\theta = 20^\circ$ می باشد [۲۲، ۲۳]. نتایج به دست آمده از آنالیز EDX مقادیر N (۴۰/۲۹)، O (۳۲/۳۲) و C (۲۷/۳۹) درصد را نشان می دهد.

همچنین در طیف b مشخصه های عمده کیتوسان قابل رویت می باشند. از جمله در ناحیه طیفی 1725 cm^{-1} الگوی ظاهر شده مربوط به پیوندهای ارتعاشی گروه کربونیل آمیدی می باشند [۱۵، ۱۶]. پیک ها در ناحیه ی 1081 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C-O-C و C-O هستند [۱۷-۲۱]. در مقایسه طیف های a و b، جابجایی و تغییر در شدت باندهای جذبی در ناحیه ی 1600 cm^{-1} مشاهده می شود که می توان به تشکیل پیوند کووالانسی بین گروه های آمینی مولکول کیتوسان و ترکیب حد واسطه تترازولی نسبت داد. از طرفی شدت جذب طیف b در ناحیه ی 3421 cm^{-1} در مقایسه با کیتوسان خالص نسبتاً بیشتر شده است. به نظر می رسد که ظهور این پدیده

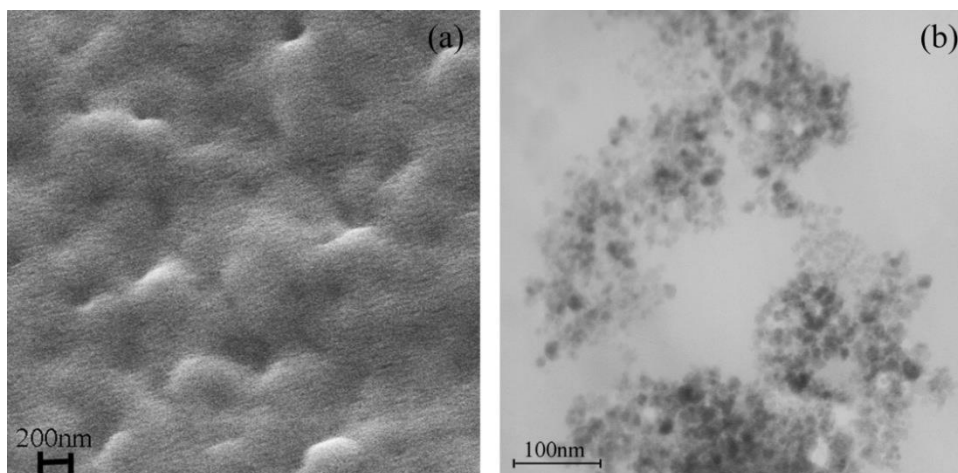


شکل ۳- نمودار الگوهای پراکندگی اشعه X نانو حامل

۳-۵ آنالیز تصاویر FESEM و TEM

برای بررسی مورفولوژی سطح از تکنیک FESEM استفاده شد. تصویر به دست آمده از سطح نانوذرات نشان داد که

سطوح، صاف و حالت کروی دارند. همچنین تصاویر به دست آمده نشان داد که بیو پلیمر کیتوسان سطحی مناسب با فضای زیاد را جهت بارگیری پلاسمید فراهم می آورد.



شکل ۴- تصاویر FESEM و TEM نانوحامل

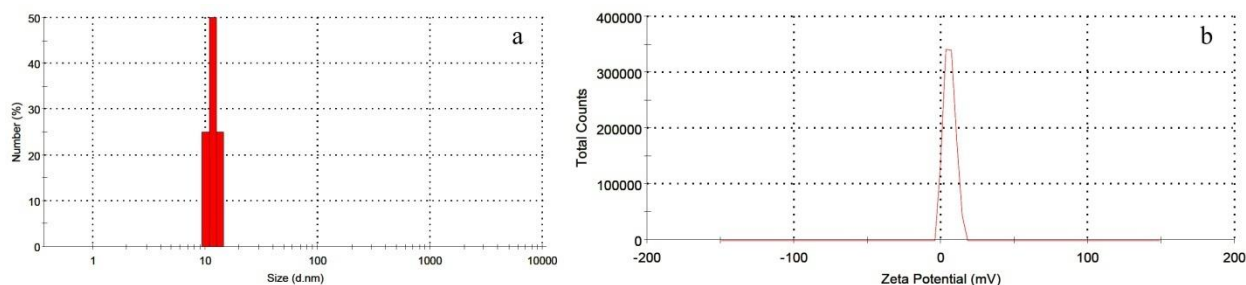
برای بررسی میانگین اندازه ذرات نانو حامل سنتز شده از تکنیک TEM استفاده گردید. میانگین اندازه ذرات به دست آمده توسط آنالیز TEM، ۵ نانومتر به دست آمد (شکل ۴). با توجه به این مقدار، به نظر می‌رسد که به راحتی طی فرآیند نفوذسلولی، نانوحامل به درون سلول نفوذ کرده و ماده ژنتیکی را از غشا سلولی عبور دهد. نتایج به دست آمده از آزمایش انتقال عامل ژنتیکی در

مرحله آزمایش‌های بیولوژیکی به خوبی نشان داد که نانو حامل مشکلی در عبور از غشای سلولی ندارد.

۳-۶ بررسی زتا پتانسیل و بار سطحی ذرات

میزان زتا پتانسیل به دست آمده نشان‌دهنده‌ی بار سطحی مثبت ذرات سنتز شده می‌باشد (شکل ۵) که این ویژگی باعث پایداری خوبی در نانوذرات کلونیدی سنتز شده از

طریق اعمال نیرو دافعه کلونی می شود. میزان بار سطحی مثبت از آنالیز زتا پتانسیل نانوذرات حامل، $5/6 \text{ mV}$ به دست آمد.



شکل ۵- (a) نمودار متوسط اندازه ذرات و (b) نمودار پتانسیل زتا نانوحامل

این نتایج نشان می دهد که ذرات نانوحامل سنتز شده در محیط آبی کاملاً پایدار بوده و با گذشت زمان، دستخوش تغییر نمی شوند. با توجه به نتایج به دست آمده و پایداری هفت ماهه سیستم کلوتیدی، به نظر می رسد حاملی مناسب برای ژن بوده و حتی برای کاربردهای درون تنی مناسب به نظر می رسند.

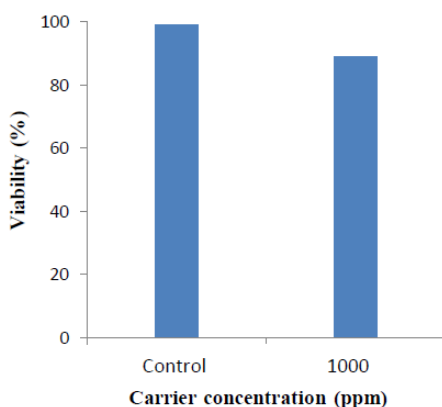
۳-۷ بررسی زنده مانایی سلول

برای بررسی زنده مانایی از تست MTT استفاده شد. درصد زنده مانایی سلول ها در شکل ۶ آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده پس از ۲۴ ساعت برای فرمولا سیون برگزیده، درصد زنده مانایی سلول ها ۸۹ درصد به دست آمد. برای محاسبه درصد زنده مانایی از رابطه ی زیر استفاده گردید.

$$\frac{\text{جذب تست}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

بار مثبت نانوذرات کلوتیدی، برخاسته از گروه های عاملی آمینی بر روی اسکلت کیتوسان و حدواسط تترازولی می باشد. در واقع ترکیب حدواسط تترازولی با این هدف در این پژوهش به کار برده شد که علاوه بر ویژگی های مطلوب بیولوژیکی و زیست سازگاری، با دارا بودن گروه های آمینی موثر باعث برهم کنش مناسب با محیط آبی و افزایش پایداری سیستم نانو حامل می شود. از طرفی با ایجاد بار مثبت ملایم بهترین برهم کنش را با پلاسמיד می تواند داشته باشد. بار مثبت به وجود آمده علاوه بر پایداری نانوحامل و بارگیری عامل ژنتیکی، در نفوذ نانوحامل به درون سلول از طریق برهم کنش های الکترواستاتیکی با عوامل دارای بار منفی موجود بر روی غشای سلول موثر می باشد.

همچنین جهت انجام آزمایش پایداری نانوحامل سنتز شده پس از هفت ماه، اندازه ذرات با استفاده از تکنیک DLS گرفته شد که تعداد ذرات به دست آمده در اندازه $11/7 \text{ nm}$ بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده بودند.

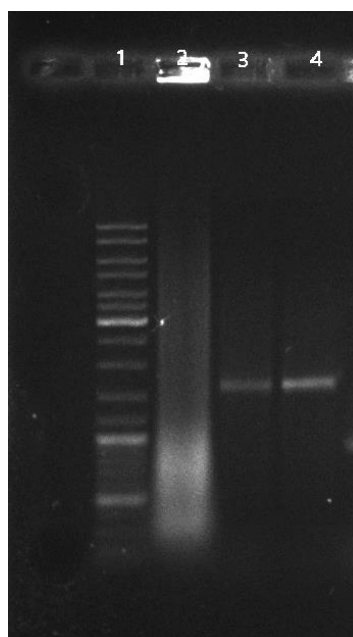


شکل ۶- نمودار بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها

حامل موفق شده بخش عمده‌ای از پلاسמיד موجود در محیط را به خود متصل نموده و آن را در چاهک محبوس نموده و مانع از حرکت آن در طول ژل شود. در توجیه این نتیجه باید اضافه شود که در تکنیک الکتروفورز ذرات بر اساس بار و اندازه جدا می‌شوند. درحالی‌که کیتوسان خالص که هیچ اصلاح ساختاری روی آن انجام نشده است قادر به حبس و به دام انداختن پلاسמיד نمی‌باشد (چاهک ۳). بنابراین نانوحامل طراحی شده که حاوی کیتوسان عامل دار شده مغناطیسی می‌باشد، مطابق تصویر ژل قادر است براحتی پلاسמיד را بارگیری و حمل نماید.

۳-۸ مطالعات Gel Retardation

در این آزمایش، برهمکنش پلاسמיד با اجزای تشکیل دهنده‌ی نانوحامل بررسی شد (شکل ۷). چاهک‌های ۱ و ۳ در تصویر ژل، مربوط به لدر DNA و پلاسמיד می‌باشد و چاهک ۲ و ۴ به ترتیب مربوط به ترکیب پلاسמיד-نانوحامل و پلاسמיד-کیتوسان خالص می‌باشد، که نشان می‌دهد کیتوسان خالص برهمکنش قابل قبولی در غلظت مورد نظر با پلاسמיד نداشته است. اما چاهک ۲ که مربوط به ساختار نانو حامل می‌باشد، برهمکنش مناسب با پلاسמיד داشته است به طوری که نانو



شکل ۷- تصویر مربوط به برهمکنش اجزا مختلف نانوحامل با پلاسמיד، چاهک ۱: لدر DNA، چاهک ۲: ترکیب پلاسמיד و نانوحامل، چاهک ۳: پلاسמיד خالص، چاهک ۴: ترکیب پلاسמיד و کیتوسان خالص (تکرار: ۳ بار)

۳-۹ مطالعات ژل الکتروفورز برای تعیین میزان N/P

برای تعیین برهمکنش پلاسמיד با نانوحامل، میزان N/P (نانوحامل / پلاسמיד) با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز به دست آمد (شکل ۸). برای این کار مقادیر مختلفی از پلاسמיד با غلظت ۷۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نانوحامل با غلظت ۱۰۰۰ ppm در دمای اتاق و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد، سپس میزان N/P به دست آمد. در تصویر ژل به دست آمده چاهک ۱ مربوط به DNA لدر و چاهک ۲، مربوط به پلاسמיד خالص به عنوان کنترل و از چاهک‌های

۳ تا ۸، مربوط به پلاسמיד و نانوحامل با نسبت‌های ۱/۴، ۲/۴، ۳/۴، ۴/۴، ۵/۴، ۶/۴ می‌باشد. برطبق نتیجه به دست آمده، حرکت با تاخیر DNA، با افزایش نسبت نانوحامل به پلاسמיד در تصویر دیده می‌شود، به گونه‌ای که در نسبت ۳ به ۱ پلاسמיד درون چاهک باقی‌مانده و قوی‌ترین برهمکنش را دارد. بنابراین میزان N/P، ۳ به دست آمد. با توجه به این‌که جداسازی ذرات در الکتروفورز بر اساس بار و اندازه می‌باشد، حرکت با تاخیر DNA در صفحه ژل نسبت به پلاسמיד کنترل تایید کننده‌ی برهمکنش پلاسמיד و نانوحامل می‌باشد.



شکل ۸- تصویر ژل الکتروفورز برای تعیین میزان N/P، چاهک ۱: لدر DNA، چاهک ۲: پلاسמיד خالص، چاهک‌های ۳ تا ۸: ترکیب پلاسמיד و نانوحامل با نسبت‌های ۱/۴، ۲/۴، ۳/۴، ۴/۴، ۵/۴، ۶/۴ (تکرار: ۳ بار)

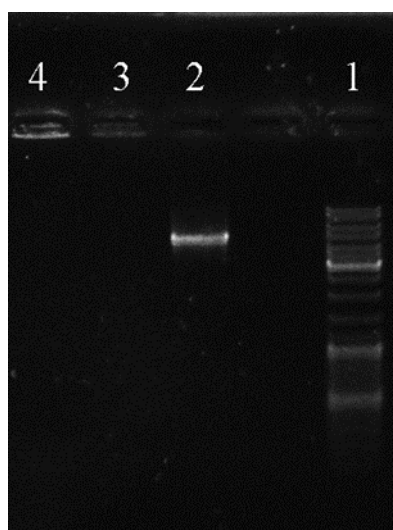
۳-۱۰ آزمایش DNase 1 Protection

یکی از ویژگی‌های نانوحامل مناسب توانایی محافظت از پلاسמיד در شرایط آنزیمی مخرب DNA است. بنابراین برای اثبات توانایی نانوحامل در محافظت از آنزیم DNase استفاده شد. برای این منظور آنزیم DNase یک بار به پلاسמיד تنها و یک بار هم به فرمولاسیون کیتوسانی که

با توجه به نتایج و نسبت به دست آمده در این آزمایش، برای انجام تمامی آزمایش‌هایی که از فرمولاسیون نانوحامل و پلاسמיד باید استفاده می‌شد، این نسبت در نظر گرفته شد.

پلاسمید در آن به دام افتاده بود، اضافه گردید (شکل ۹). چاهک‌های ۱ و ۲، مربوط به لدر DNA و پلاسمید خالص به عنوان کنترل می باشد. برای چاهک ۳، هیچ گونه بانندی مشاهده نشد، زیرا آنزیم DNase تمام پلاسمید را از بین برده ولی برای چاهک ۴، باند مشخصی مشاهده شد. مشاهده پلاسمید در حضور آنزیم DNase1 تأیید کننده این مساله است که نانوحامل به خوبی توانسته از پلاسمید در برابر آنزیم تخریب‌گر DNase محافظت

کند. این ویژگی حفاظت برای یک سیستم تحویل ژن بسیار لازم و ضروری می باشد و می تواند از تخریب سلولی پلاسمید جلوگیری کند. با محافظت از پلاسمید بوسیله نانوحامل کیتوسانی، می توان انتظار داشت که این حامل بتواند پلاسمید را بدون مزاحمت آنزیم‌های تخریب کننده به هسته سلول برساند و بیان ژن به خوبی انجام گیرد، که نتایج به دست آمده در قسمت انتقال نیز تایید کننده این موضوع می باشد.



شکل ۹- تصویر ژل الکتروفورز چاهک ۱: لدر DNA، چاهک ۲: پلاسمید، چاهک ۳: Plasmid+ DNase، چاهک ۴: نانوحامل ترکیب شده با Plasmid+ DNase

۱۱-۳ مسیر عبور نانوحامل برای تحویل ژن

سازوکار پیشنهادی برای ژن رسانی بر مبنای کیتوسان، همانند پلی اتیلن ایمین، با بر همکنش اولیه بین پلی پلکس‌های کیتوسان pDNA با بار مثبت و اجزا با بار مثبت غشا همچون پروتئوگلیکان‌های هپاران سولفات روی غشا سلولی صورت می گیرد. بعد از اتصال، پلی پلکس به وسیله عمل آندوسیتوز در یک ویزیکیول قرار می گیرد و و بعد از فرار اندوزومی، انتقال هسته‌ای صورت می پذیرد تا به این صورت بیان ژن به صورت موفقیت آمیز صورت گیرد. از مهمترین مراحل انتقال، رها شدن نوکلئیک اسیدها از کیسه‌های اندوزومی می باشد، با

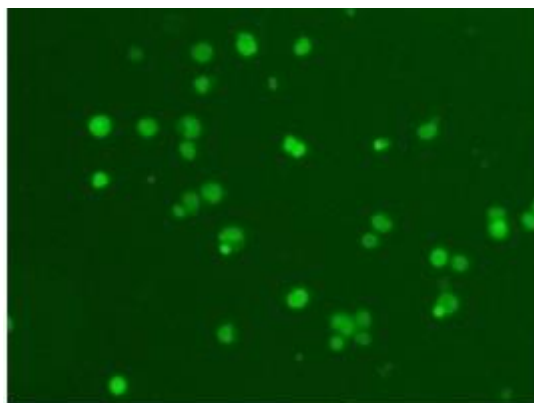
توجه به اسیدی بودن کیسه های اندوزومی، ساختارهای آمینی نانوحامل پروتونه شده و در نهایت سبب به وجود آمدن اثر اسفنجی پروتون می شوند که متعاقب آن تورم اسمزی و پارگی غشای اندوزوم و رها سازی رخ خواهد داد.

۱۲-۳ نتایج آزمون انتقال ژن

برای اثبات کارایی بیشتر نانوحامل، از آزمون انتقال ژن استفاده گردید. در این آزمایش از پلاسمید پیلاکس که حاوی توالی ژنتیکی کد کننده ی پروتئین GFP می باشد، استفاده گردید. با تاباندن نور با طول موج ۵۷۰ نانومتر به

بیان عامل ژنتیکی استفاده شد (شکل ۱۰) و پس از تماس نانو حامل کیتوسانی اصلاح شده و پلاسمید با سلول‌های HEK-293T، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد تابش قرار گرفت.

این پروتئین، نور سبز رنگ دیده می‌شود. با استفاده از این خصوصیت، از پلاسمید پیلاکس به عنوان ژن گزارش‌گر جهت تایید برهمکنش نانو حامل با غشای سلولی و ورود آن به سیتوپلاسم و رسیدن ماده‌ی ژنتیکی به هسته سلول و



شکل ۱۰- تصویر سلول‌ها در طی فرآیند انتقال ژن و تابش پرتو فرابنفش با طول موج ۵۷۰ نانومتر

هدفمند، برای درمان بیماری‌های انسان در ژن درمانی به کار برده شود. همچنین پیشنهاد می‌گردد کارایی نانوحامل طراحی شده، با توجه به زیست سازگاری بالا، در انتقال دارو نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

نتایج آزمون نشان داد نانو حامل دارای توانایی بالایی در انتقال ماده‌ی ژنتیکی به درون سلول می‌باشد.

۴- نتیجه‌گیری

نانوحامل جدید زیست سازگار و زیست تخریب پذیر با کارایی بالا برای انتقال ژن به سلول‌های HEK-293T مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق ۵-آمینو-۱H-تترازول به صورت کووالانسی با ترکیب ۲-کلرواستیل کلراید وارد واکنش شده و سپس حدواسط به دست آمده به گروه آمین آزاد بیوپلیمر کیتوسان به صورت کووالانسی متصل شد. اینکار بمنظور افزایش سازگاری و میل ترکیبی نانوحامل با پلاسمید و تشکیل کمپلکس انجام گرفت. تکنیک‌های آزمایشگاهی به کار برده شده، نشان داد که نانوحامل زیست تخریب پذیر جدید دارای کارایی بالای انتقال و محافظت ژن و پایداری زیاد، انتقال ژن هدفمند، زیست سازگاری مناسب و رهایش ژن کنترل شده می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های مطلوب مشاهده شده، نانوحامل سنتز شده بر پایه‌ی بیوپلیمر کیتوسان می‌تواند به عنوان نانوحامل زیست سازگار با قابلیت انتقال ژن بالا و

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته سپاسگذاریم (شماره طرح ۲۹۹۰).

منابع

- [1] Patil, S. D., Rhodes, D. G., and Burgess, D. J. (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* 7, E61-E77.
- [2] Nishikawa, M., and Hashida, M. (2002) Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 275-283.
- [3] George, M., and Abraham T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan. *J. Control. Release* 114, 1-14.

- E. L. W. (2012) Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites. *Infrared spectroscopy-materials science, engineering and technology*. Theophanides Theophile, InTech.
- [14] Shrifian-Esfahani, A., Salehi, M. T., Nasr-Esfahani, M., and Ekramian, E. (2015) Chitosan-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles: design, fabrication, characterization and antibacterial activity. *CHEMIK* **69**, 19–32.
- [15] Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., ArguElles-Monalc, W., DesbrieAres, J., and Rinaudo, M. (2001) An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* **42**, 3569–3580.
- [16] Ostrowska-Czubenko, J., and Pierog, M. (2009) Synthesis and characteristics of chemically modified chitosan membranes with sulfuric acid. *Polish J. Appl. Chem.* **53**, 155–160.
- [17] Kolhe, P., and Kannan, R .M. (2003) Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interaction. *Biomacromolecules* **4**, 173-180.
- [18] de Souza Costa-Junior, E., Pereira, M. M., and Mansur, H. S. (2009) Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Mater. J. Sci.: Mater. Med.* **20**, 553-561.
- [19] Krishna Rao, K. S. V., Vijaya Kumar Naidu, B., Subha Sairam M. C. S. M., and Aminabhavi, T. M. (2006) Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil. *Carbohydr. Polym.* **66**, 333-344.
- [20] Ramya, R., Sudha, P. N., and Mahalakshmi, J. (2012) FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. *J. Sci. Res.* **2**, 1-9.
- [21] Paluszkiwicz, C., Stodolak, E., Hasik, M., and Blazewicz, M. F(2011) T-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. *Spectrochimica Acta Part A.* **79**, 784-788.
- [22] Yuan, Z., Ye, Y., Gaoa, F., Yuanc, H., Lan, M., Lou, K., and Wang, W. (2013) Chitosan-graft- β -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* **446**, 191– 198.
- [23] Ding, J., Na, L., and Mao, S. (2012) Chitosan and its derivatives as the carrier for intranasal drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **7**, 349-361.
- [4] Dornish, M., Kaplan, D. S., and Arapalli, S. R. (2012) Regulatory status of chitosan and derivatives. Chapter 24. *In Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, B., Sarmiento, J. Das Neves, Eds.; Wiley, Chichester, **463- 482**.
- [5] Meyers, P. H., Cronic, F., and Nice, C. M. (1963) Experimental approach in the use and magnetic control of metallic iron particles in the lymphatic and vascular system. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.* **90**, 1068-077.
- [6] Irvani-Kashkouli, K., Torkzadeh-Mahani, M., and Mosaddegh, E. (2018) Synthesis and characterization of magnetic amino-functionalized chitosan nanoparticle as a novel nanocarrier for targeted gene delivery. *Mat. Sci. Eng. C* accepted.
- [7] Germershaus, O., Mao, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U., and Kissel, T. (2008) Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethyleneglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: establishment of structure–activity relationships in vitro. *J. Control. Release.* **125**, 145-154.
- [8] Lee, D., Zhang, W., Shirley, S. A., Kong, X., Hellermann, G. R., Lockey, R. F., and Mohapatra, S. S. (2007) Thiolated chitosan/DNA nanocomplexes exhibit enhanced and sustained gene delivery. *Pharm. Res.* **24**, 157-167.
- [9] Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., and McCarron, P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **44**, 65-73.
- [10] Qu, J-B., Shao, H-H., Jing, G-L., and Huang, F. (2013) PEG-chitosan-coated iron oxide nanoparticles with high saturated magnetization as carriers of 10-hydroxycamptothecin: preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **102**, 37-44.
- [11] dos Santos Menegucci, J., Santos, M-K. M. S., Dias, D. J. S., Chaker, J. A., and Sousa, M. H. (2015) One-step synthesis of magnetic chitosan for controlled release of 5-hydroxytryptophan. *J. Magn. Magn. Mat.* **380**, 117-124.
- [12] Li, G., Song, P., Wang, K., Xue, Q., Sui, W., and Kong, X. (2015) An amphiphilic chitosan derivative modified by deoxycholic acid: preparation, physicochemical characterization, and application. *J. Mat. Sci.* **50**, 2634-2642.
- [13] Silva, S. M. L., Braga, C. R. C., Fook, M. V. L., Raposo, C. M. O., Carvalho, L. H., and Canedo,

Synthesis and characterization of biocompatible chitosan/aminotetrazole nanoparticles as novel nanocarriers for gene delivery

Elaheh Mosaddegh,^{1,*} Masoud Torkzadeh-Mahani²

1- Associate Professor (PhD), Department of New Materials, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, PO Box 76315-117, Kerman, Iran

2- Associate Professor (PhD), Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, PO Box 76315-117, Kerman, Iran

emosaddegh@gmail.com

Received: 2019/11/4

Accepted: 2021/3/16

Abstract:

This article has been attempting to present a novel and biocompatible nanocarrier based on chitosan biopolymer with high efficiency and low toxicity for gene delivery. At the first, 5-amino-1*H*-tetrazol reacted with (3-chloropropyl)trimethoxysilane and then, the obtained organosilane intermediate was used for functionalization of chitosan amino groups. The structure and chemical composition of the synthesized nanocarrier were fully characterized by FESEM, TEM, XRD, FTIR, Zeta potential and DLS analysis. At the following, the MTT test was performed in order to investigation of the nanocarrier toxicity. Furthermore, Hek-293T cell line was used for investigation of the nanocarrier efficiency in gene transfection toward the cell. The loading capacity of plasmid was optimal at an N/P ratio of 3 with excellent protection of the plasmid. The results were shown that the novel nanocarrier is high efficient and has high potential to gene transfection and protection in addition of nontoxicity, biodegradability and cost effectively.

Keywords: 5-amino-1*H*-tetrazol, chitosan, organosilane, nanocarrier, Hek-293T, gene delivery