



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران
پردیس بین الملل - دانشکده داروسازی

پایان نامه

جهت اخذ درجه دکتری عمومی داروسازی

عنوان

ژن رسانی به سلول های سرطانی کلیه توسط پلی مری با پایه مشتقات کایتوزان

اساتید راهنما

جناب آقای دکتر مرتضی رفیعی تهرانی

جناب آقای دکتر سامان حسینیخانی

استاد مشاور

سرکار خانم دکتر زهره محمدی

همکار

سرکار خانم دکتر الهه مرتضویان

نگارش

شیرین حکیمی

ماه/ سال

شهریور/۹۴

چکیده

مقدمه و هدف: یکی از درمان های موجود در بیماری های صعب العلاج مثل سرطان، ژن رسانی می باشد. در ژن رسانی به وسیله رساندن ژن سالم و مواد ژنتیکی به سلول، اختلال ژنتیکی درمان شده و ژن سالم جایگزین ژن معیوب می گردد. در ژن رسانی برای آن که ژن به طور مؤثر به سلول هدف برسد و در برابر نوکلئاز ها تخریب نشود، نیازمند آن هستیم که از یک حامل برای رساندن ژن استفاده کنیم. امروزه حامل های ویروسی و غیر ویروسی زیادی معرفی شده اند تا ژن رسانی را بهبود ببخشند. حامل های ویروسی به خاطر ایجاد التهاب و تحریک سیستم ایمنی گزینه مناسبی نیستند. حامل های غیر ویروسی اگرچه کارایی انتقال ژن کمتری نسبت به حامل های ویروسی دارند، اما سمی نیستند و سبب تحرک سیستم ایمنی نمی شوند. در میان حامل های غیر ویروسی، کایتوزان بسیار مورد بحث و توجه قرار گرفته است. کایتوزان یک پلیمر کاتیونی و طبیعی، زیست تخریب پذیر و سازگار با محیط زیست و غیر سمی است که سیستم ایمنی را تحریک نمی کند. از این رو به یک کاندیدای مناسب به عنوان حامل در ژن رسانی تبدیل شده است. یکی از مشکلاتی که در مورد کایتوزان با آن مواجه هستیم، حلالیت پایین آن در pH های فیزیولوژیک و پایین بودن کارایی ترنسفکشن آن می باشد و برای حل این مشکل مشتقات زیادی از کایتوزان ساخته و معرفی شده است. مشتق تیوله متیله N,N دی متیل آمینوبنزالدهید کایتوزان مشتق جدیدی است که به هدف ژن رسانی به سلول های سرطانی کلیه ساخته شده است. خصوصیات آن توسط طیف NMR و معرف المان مورد بررسی قرار گرفت. ژن GFP به عنوان ژن گزارشگر از باکتری E.coli استخراج شد. نانوذرات حاوی پلیمر و ژن به روش ionic gelation تهیه شدند. خصوصیات نانوذرات تهیه شده از نظر توانایی نگهداری از ژن و محافظت از آن در برابر آنزیم DNase و اندازه و زتا پتانسیل آن ها مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی غلظت های مناسب برای انجام انتقال ژن و بررسی میزان سمیت انتخاب شد. فرآیند انتقال ژن و سمیت سلولی نیز مورد بررسی قرار گرفت تا بهترین غلظت مشخص شود. در تست ها مشخص شد تمامی غلظت ها توانایی نگهداری و محافظت از ژن را دارند. در اکثر غلظت ها اندازه ذره ای مناسب و بار مثبت ذرات به مقدار مطلوب بود. در $N/P=5$ بیشترین میزان انتقال ژن و کمترین میزان سمیت مشاهده شد. نتایج حاصل از TEM نشان داد نانوذرات تشکیل شده، کروی هستند و حالت تجمعی ندارند. بنابراین همان طور که از نتایج استنتاج می شود مشتق تیوله متیله N,N دی متیل آمینوبنزالدهید کایتوزان قابلیت این را دارد که به عنوان یک حامل مؤثر در انتقال ژن به کار رود.

کلید واژه ها: انتقال ژن، کایتوزان، نانوذره، ژن GFP ، ionic gelation

Abstract

The basic concept underlying gene therapy is that human disease may be treated by the transfer of genetic material into specific cells of a patient in order to correct or supplement defective genes responsible for disease development. Gene therapy is currently being applied in many different health problems such as cancer. The ideal gene delivery system must be capable of protecting the DNA until it reaches its target. To do so, the system must be small enough to allow internalization into cells and passage to the nucleus, it must have flexible tropisms for applicability in a range of disease targets, and it must be capable of escaping endosome–lysosome processing and of following endocytosis. Currently, transport of exogenous DNA to cells can be achieved using vectors, which can be separated into two categories: viral and non-viral vectors. Viruses present a variety of potential problems to the patients such as toxicity, immune responses, and inflammatory responses. Lastly, insertional mutagenesis and oncogenic effects can occur when used *in vivo*. The limitations of viral vectors, particularly regarding safety concerns, have led to the evaluation and development of alternative vectors based on non-viral systems. Chitosan is a non-toxic biodegradable polycationic polymer with low immunogenicity. It is a good candidate for gene delivery system because positively charged chitosan can be complexed with negatively charged DNA. The main drawback of chitosan would be the poor water solubility at physiological pH and low transfection efficiency. But several chitosan derivatives have been synthesized in the last few years in order to obtain modified carrier with altered physicochemical characteristics. In this study, we synthesized the novel water soluble chitosan derivatives: thiolated methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (DM-BZ-Cs-Cys). DM-BZ-Cs-Cys/pDNA nanocomplexes were prepared by ionic gelation method. Physical properties of the complexes were investigated. Their transfection efficiency and cytotoxicity in Human Embryonic Kidney 293 cells (Hek293 cells) were evaluated. This chitosan derivatives showed elevated potential as gene carrier by efficient DNA condensation and DNA protecting. N/P=5 mediated the highest level of gene transfection with negligible cytotoxicity in Hek293 cell line.

Keywords: gene delivery, chitosan, nanocomplexes, transfection, Hek293