Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 4, Winter 2024 ORIGINAL ARTICLE

Investigating the effect of intramyocardial injection of DNAzyme-containing nisosome of NF-κB gene on the level of cardiac tissue NF-κB protein expression in cardiac ischemia-reperfusion of male rats

Seyede Bahar Hosseinian[1], Nahid Aboutaleb[2], Maryam Naseroleslami[3], Neda Mousavi Niri[1]
[1] Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: NF-κB factor is activated by ischemic damage and reperfusion and has a crucial role in transcription of several genes. Applying DNAzyme is one of the novel therapeutic means. Niosome is a new drug delivery system that is controllable ae used targeted. Applying DNAzyme-containing nanoniosome to diminish the expression of NF-κB protein after cardiac ischemia.
Materials and methods: In the current study, twenty-five male rats were assigned into 5 groups: 1- Control group, 2- Ischemic induced group, 3- Post ischemic DNAzyme receiving group, 4- Post ischemic DNAzyme-bearing nanoniosome receiving group, and 5- Post ischemic nanoniosome receiving group. After 72 hours, western blotting was performed on rats' hearts to assess expression of NF-κB protein in treated groups.
Results: post ischemic treatment with DNAzyme-bearing nanoniosome led to considerably decrease of NF-κB expression compared to ischemic rats ($P<0.05$).
Conclusion: Results demonstrated the efficiency of DNAzyme-containing nanoniosome on NF-κB protein after cardiac ischemia. Therefore it is propounded as a curative method for cardiac ischemia.
Keywords: *DNAzyme, NF-κB, cardiac ischemia.*

Cited as: Hosseinian SB, Aboutaleb N, Naseroleslami M, Mousavi Niri N. Investigating the effect of intramyocardial injection of DNAzyme-containing nisosome of NF-κB gene on the level of cardiac tissue NF-κB protein expression in cardiac ischemia-reperfusion of male rats. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 33(4): **338-346.**

Correspondence to: Maryam Naseroleslami, Neda Mousavi Niri
Tel: *+98 21-22006660*
E-mail: naseroleslami@gmail.com; neda.mousaviniri@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-9163-7346 & 0000-0003-0914-1881
Received: 10 Feb 2023; **Accepted:** 28 Jun 2023

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۳۳۸ تا ۳۴۶

Original Article

بررسی اثر تزریق داخل میوکاردی DNAzyme نیوزمه ژن NF-κB بر میزان بیان پروتیین NF-κB در بافت قلب در ایسکمی رپرفیوژن قلبی در موش‌های صحرایی نر

سیده بهار حسینیان[۱]، ناهید ابوطالب[۲]، مریم ناصرالاسلامی[۳]، ندا موسوی نیری[۱]

[۱] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
[۲] گروه فیزیولوژی ،دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۳] گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *فاکتور NF-κB به وسیله آسیب ایسکمی و ریپرفیوژن فعال می‌گردد و برای نسخه‌برداری ژن‌های متعددی، نقش اساسی دارد. یکی از روش‌های نوین درمانی، استفاده از DNAzyme است. نیوزوم یک سیستم تحویل دارو جدید است که به صورت کنترل شده و هدفمند می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. هدف از انجام این مطالعه استفاده از DNAzyme نانو نیوزومه به منظور کاهش میزان بیان پروتئین NF-κB پس از ایسکمی قلبی بود.*

روش بررسی: *در این پژوهش، ۲۵ سر موش رت نر به ۵ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل، ۲ - گروهی که در آن‌ها ایسکمی القا شد، ۳ - گروهی که پس از القا ایسکمی، DNAzyme دریافت کردند، ۴- گروهی که پس از القا ایسکمی، DNAyme نانونیوزومه دریافت کردند و ۵ - گروهی که پس از القا ایسکمی، نانو نیوزوم دریافت کردند. پس از ۷۲ ساعت قلب موش ها خارج شد و وسترن بلات انجام گرفت.*

یافته‌ها: *درمان صورت گرفته با DNAzyme نانونیوزومه پس از القا ایسکمی قلبی منجر به کاهش معنی‌دار بیان پروتئین NF-κB نسبت به گروه ایسکمی شد ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *نتایج حاصل از ارزیابی‌ها، موثر بودن DNAzyme نانو نیوزومه بر کاهش پروتیین NF-κB پس از ایسکمی قلبی را نشان داد؛ در نتیجه به عنوان یک روش درمانی برای ایسکمی قلبی قابل استفاده است.*

واژگان کلیدی: *دئوکسی ریبوزیم ، فاکتور هسته‌ای زنجیر سبک کاپا لنفوسیت بی، ایسکمی قلبی.*

مقدمه

ایسکمی قلبی به معنای کمبود جریان خون است که باعث می‌شود مواد مغذی و اکسیژن به صورت کافی به بافت نرسد (۱). اگر طول مدت ایسکمی کمتر از ۴۰ دقیقه باشد، تغییرات عملکردی و سلولی قابل برگشت است و می‌تواند درمان شود. اگر طول ایسکمی بین ۴۰ تا ۵۰ دقیقه باشد، یک صدمه عملکردی پیش رونده و آسیب غیرقابل برگشت را خواهیم داشت و اگر مدت ان بیش از ۵۰ دقیقه باشد، اتفاقاتی رخ می‌دهد که مشابه اسیب ریپرفیوژن و یا reoxygenation است، اگر چه مکانیسم‌های آنها به هم شباهت ندارد (۱). به طور قابل ملاحظه‌ای سطح بالای فاکتورهای نسخه برداری و سایتوکاین‌ها در بسیاری از شرایط مرتبط با التهاب مانند بیماری‌های قلبی عروقی شناسایی شده است (۲). فاکتور نسخه برداری پیش التهابی NF-κB که به طور معمول در سیتوپلاسم وجود دارد (۳) یک تنظیم کننده اساسی در پاسخ‌های التهابی و ایمنی است و اختلال در سیگنال رسانی آن با مجموعه‌ای از بیماری‌های مختلف و پاتوژنز آنها همراه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه فیزیولوژی ،دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران & گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه آزاد اسلامی، مریم ناصرالاسلامی& ندا موسوی نیری
(**email:** neda.mousaviniri@gmail.com; naseroleslami@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0001-9163-7346؛ 0000-0003-0914-1881

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۴/۷

است. بسیاری از مطالعات نقش حیاتی NF-κB را در آسیب ریپرفیوژن/ ایسکمی نشان داده‌اند (۴) ، به طوری که سطح این فاکتور در بافت‌هایی که دچار آسیب میوکاردی شده‌اند افزایش می‌یابد و در نتیجه افزایش سایتوکاین‌های التهابی را منجر می‌شود (۵). محققان استراتژی‌های مختلفی را برای هدف گیری و بلاک کردن اثر NF-κB استفاده کرده‌اند، درحالی که بیشتر عوامل مانند گلوکوکورتیکوئیدها و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بسیار غیر اختصاصی هستند، توانایی مختل کردن پروسه‌های بیولوژیکی نرمال و ایجاد سمیت را دارند و عوارض جانبی نامطلوب را می‌توانند به همراه داشته باشند (۲). به منظور جلوگیری از بیان برخی از ژن‌ها از تکنیک‌های Knockdown ژن، شامل استفاده از الیگونوکلئوتید انتی سنس (ASO)، استفاده از ریبوزیم‌ها، استفاده از DNAzyme، RNA کوچک مداخله‌گر (siRNA) و اپتامرها، بهره می‌برند (۶). DNAzymeها مولکول‌های کاتالیتیکی هستند که از یک رشته دئوکسی ریبو نوکلئوتید تشکیل شده‌اند در حالی که در سیستم‌های بیولوژی، اکثرا DNA دارای ساختار ۲ رشته‌ای است (۷). این مولکول‌ها به صورت طبیعی تشکیل نمی‌شوند (۶) و در سیستم‌های طبیعی وجود ندارند زیرا در ساختار خود گروه هیدروکسیل در موقعیت '۲ ندارند و در نتیجه مانع انعطاف ساختاری و دینامیکی آنها می‌شود (۷)، اما در طی پروسه انتخاب in vitro بدست می‌آیند (۶). به طور معمول DNAzymeها از ۳ بخش تشکیل شده‌اند: یک دومن کاتالیتیک و دو عدد بازو (۸) به طوری که در دو طرف هسته کاتالیتیکی دو عدد بازو که نقش شناسایی را دارند، وجود دارد. هر چه طول بازوهای شناسایی کننده بلندتر باشد، DNAzyme به صورت پایدارتری به سوبسترای خود به وسیله تشکیل جفت باز واتسون کریکی متصل می‌شود. سکانس اختصاصی بازوها، اختصاصیت DNAzyme و پایداری هسته کاتالیتیک آن را برای عملکرد هیدرولیز آن تعیین می‌کند (۹). نقش موتیف کاتالیتیک، برش سوبسترا به وسیله شکستن پیوند فسفو دی استر در حضور کوفاکتورها است (۸). DNAzyme در حضور یون‌های فلزی دو ظرفیتی خاص، مثل منیزیوم دو بار مثبت، سرب دو بار مثبت، منگنز دو بار مثبت، مس دو بار مثبت و یا سدیم یک بار مثبت، mRNA هدف را برش می‌دهد (۹). این فلزات به پایداری حالت انتقال در واکنش و/یا کمک به تبدیل انزیم به ساختار فعال آن کمک می‌کنند (۱۰)، در جایی که بعضی از انواع DNAzymeها به یون‌های دوظرفیتی برای فعالیت خود نیاز ندارند و برخی به اسیدآمینه‌هایی مثل هیستدین به عنوان کوفاکتور الزامی نیاز دارند (۱۰). DNAzyme در مقایسه با آنزیم‌های دیگر چندین مزیت دارد: پایداری ساختاری منحصر به فردی نسبت به ریبوزیم و پروتئین دارد، mRNA هدف را با دقت بیشتری نسبت به ریبوزیم بدون ایجاد پاسخ‌های ایمنی و سایتوتوکسیسیتی قابل توجه برش می‌دهد، هم چنین ساختار آن به این صورت است که اختصاصیت بالا دارد، به آسانی قابل تغییر است، هزینه ساخت آن کم است (۹)، وزن مولکولی پایین، تنوع، پایداری نسبی در سرم دارد (۸)، پایداری خوبی در شرایط نامتعادل دارد و در طیف‌های مختلفی از شرایط لازم برای انجام واکنش شامل دما، غلظت نمک و pH، می‌تواند فعال باشد (۹، ۸). ذرات نانو به طور گسترده‌ای در انتقال DNAzyme استفاده می‌شوند. این ساختارها به دلیل کنترل و آهسته نمودن رهش، حفاظت از مولکول DNAzyme، اندازه ذره‌ای کوچک‌تر از سلول، قابلیت عبور از موانع زیستی جهت رسانش مولکول به محل هدف، افزایش ماندگاری مولکول در جریان خون و زیست سازگاری می‌توانند به عنوان یک سیستم انتقال بسیار موثر در نظر گرفته شوند، که باعث افزایش کارایی درمانی می‌شوند. نیوزوم، وزیکولی برپایه سورفکتانت‌های غیریونیست که برای رهایش دارو، ژن، پروتئین و ... استفاده می‌شود. نیوزوم‌ها از نظر اسمزی فعال بوده و از نظر شیمیایی پایدار هستند (۱۱). بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدیم که با طراحی و سنتز نانونیوزوم‌های حاوی DNAzyme ژن NF-κB اثر درمانی این نانودارو را بر میزان پروتیین NF-κB در مدل ایسکمی قلبی رت‌های نر بررسی کنیم.

مواد و روشها

تست‌ها در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از دریافت کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.527 انجام داده شد.

طراحی NF-κB DNAzyme

برای طراحی این DNAzyme ابتدا از سایت NCBI توالی ژن NF-κB را جستجو کرده و در قسمت رونوشت‌ها، توالی واریانت Mrna را دانلود کرده و blast شدند تا توالی بخش مشترک به دست آید. سپس توالی بخش مشترک را در نرم افزار اولیگو ۷ paste کرده و بخش‌هایی که ساختار مورد نظر ما را داشتند جستجو شد. جدولی از چندین توالی مناسب تهیه شد و بر اساس میزان ΔG و تعادل بین بازوها از نظر درصد GC به آنها امتیازداده شد. این توالی‌ها درپایگاه داده NCBI، BLAST شد. در نهایت، توالی‌های با بیشترین امتیاز را از نظر ساختار دوم در نرم افزارهای آنلاین

مربوط انرژی آزاد ساختار دوم RNA چک کرده و توالی را که ساختار دوم ندارد و یا احتمال ساختار دوم آن خیلی کم است انتخاب کرده و سفارش سنتز داده شد.

سنتز نانو ذرات

برای تهیه نیوزوم و محصور کردن دارو درون آن بدین صورت عمل شد: روش ساخت نیوزوم در این پژوهش روش هیدراتاسیون لایه نازک بود که در این روش سورفکتانت غیر یونی نوع span-60 به میزان ۵۸ میلی گرم و کلسترول به میزان ۴۲ میلی گرم در مخلوطی از حلال‌های ارگانیک فرار (کلروفرم به میزان ۹ میلی گرم و متانول به میزان ۱ میلی گرم) در فلاسک ته گرد حل گردید و استیرینگ به وسیله اضافه کردن ۳۰ میلی‌لیتر پرل شیشه‌ای انجام شد. سپس محلول حاصل شده به دستگاه تبخیر کننده دوار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه منتقل گردید تا حلال آلی تبخیر گردد. پس از آن محلول آبی دارو که شامل ۱ سی سی از الیگو حل شده در ۴ سی سی بافر فسفات سالین است، اضافه شد و دوباره درون دستگاه روتاری تحت شرایط مشابه قرار گرفت. در طی تبخیر یک لایه نازک در سطح داخلی فلاسک تشکیل گردید. مرحله هیدراتاسیون با اضافه کردن بافر فسفات سالین به لایه نازک انجام شد . نیوزوم های حاصل شده به مدت ۲ دقیقه به منظور یکنواخت شدن تحت پروب سونیکاتور قرار گرفت. برای بررسی مورفولوژی نانو ذرات سنتز شده از میکروسکوپ‌های TEM استفاده شد.

انتخاب حیوان

در این پژوهش از ۲۵ سر موش رت نر نژاد ویستار که به ۵ گروه تقسیم شدند، استفاده شد: ۱- گروه کنترل، ۲ - گروهی که در آنها ایسکمی القا شد، ۳ - گروهی که پس از القا ایسکمی، DNAzyme دریافت کردند، ۴- گروهی که پس از القا ایسکمی، DNAyme نانونیوزومه دریافت کردند، و ۵ - گروهی که پس از القا ایسکمی، نانو نیوزوم دریافت کردند. پس از ۷۲ ساعت وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان پروتئین NF-κB انجام گرفت.

جراحی و تزریق

در ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال (۶۰mg/kg؛ i.p) بیهوش میشوند. ناحیه قفسه سینه آن کاملا شیو شده و بر روی تخت جراحی قرار داده شد و هپارین ((۲۰۰U/kg، i.p) دریافت کردند. گردن حیوان طوری قرار داده می‌شود تا دست یابی به نای برای انتوبه کردن تسهیل شود. بعد از انتوبه کردن، حیوان به ونتیلاتور (تعداد ۶۰-۷۰ تنفس در دقیقه) و حجم جاری ۱۵ml/kg متصل گردید. در طول کار میزان اشباع اکسیژن خون شریانی بطور متناوب با استفاده از دستگاه پالس اکسیمتر مانیتور شد و بر این مبنا و در صورت نیاز ونتیلاتور دوباره تنظیم گردید. سپس قفسه سینه در سمت چپ و در فضای بین دنده‌ای چهارم برش داده شد تا قلب در معرض دید مستقیم قرار بگیرد. لازم به ذکر است که در این مرحله باید با دقت برش اعمال گردد تا ریه چپ و یا قلب آسیب نبینند. پس از پاره کردن پریکارد، نخ سیلک ۰/۶ با دقت از زیر شریان کرونری LAD عبور داده شد. سپس دو انتهای نخ از داخل تیوب نرمی عبور داده شد. اعمال فشار بر تیوب منجر به ایسکمی موضعی و آزاد کردن آن سبب برقرای پرفیوژن مجدد می‌شود. در این دوره با بستن LAD به مدت ۳۰دقیقه ایسکمی برقرار می‌شود. بعد از پایان یافتن جراحی و برقراری پرفیوژن مجدد، قفسه سینه دوخته شد، لوله تراشه خارج شد و حیوان زیر اکسیژن خالص قرار گرفت تا به هوش بیاید. بعد از به هوش آمدن حیوان، برای کاهش درد بوپرونورفین با دوز ۰/۰۵mg/kg تزریق گردید و پماد تتراسایکلین به عنوان آنتی بیوتیک استفاده شد. بعد از به هوش آمدن کامل حیوانات در قفسه قرار گرفته و آب و غذا در اختیارشان قرارگرفت و به حیوانخانه منتقل شد. در گروه ایسکمی +DNAzyme، در ۱۰ دقیقه پایانی دوره ایسکمی، ۱۵۰µg/kg مخلوطی از DNAzymeو Mgcl2 را به صورت داخل میوکاردی تزریق کرده و سپس با باز کردن شریان LADاجازه رپرفیوژن داده شد و قفسه سینه بسته شد. در گروه ایسکمی +DNAzyme نانونیوزومه در ۱۰ دقیقه پایانی دوره ایسکمی، ۱۵۰g/kg µمخلوطی از DNAzyme و Mgcl2 را بصورت داخل میوکاردی تزریق کرده و سپس با باز کردن شریان LAD اجازه رپرفیوژن داده شد و قفسه سینه بسته شد. در گروه ایسکمی + نیوزوم در ۱۰ دقیقه پایانی دوره ایسکمی، ۱۵۰g/kg µ نیوزوم را بصورت داخل میوکاردی تزریق کرده و سپس با باز کردن شریان LADاجازه رپرفیوژن داده شد و قفسه سینه بسته شد.در تمام موارد مسایل اخلاقی براساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران رعایت گردید.

وسترن بلات

ابتدا بافت‌های قلب با فسفات بافر سالین (PBS) شست و شو داده شد و بمنظور استخراج و جداسازی پروتئین‌ها، با بافر RIPA حاوی کوکتل بازدارنده پروتئاز و فسفاتاز به مدت ۲۰ دقیقه برروی یخ هموژنیزه و لیز شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانترفیوژ گردید. مایع رویی که حاوی پروتئین های استخراج شده است، جمع آوری شد و در ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. غلظت پروتئین به روش برادفورد با استفاده از آزمون کالریمتریک (kit BC Assay) تعیین شد. سپس میزان برابر از نمونه‌ها (بر حسب میکروگرم) روی ژل ۱۰SDS-PAGE یا ۱۲ لود و جداسازی شد. بعد از آن

پروتئین‌ها به غشاء پلی‌وینیلیدین فلوراید (PVDF) منتقل شد و به مدت ۱ ساعت در بلاکینگ بافر حاوی ٪۲ شیرخشک، به منظور بلاک کردن جایگاه‌های غیر اختصاصی انکوبه گردید. سپس غشاءها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی بادی اولیه اختصاصی انکوبه شد. بعد از آن غشاءها با TBS حاوی ٪۰/۱ توئین ۲۰ شسته (TBST) شده و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با horseradish peroxidase (HRP) انکوبه شد و بعد دوباره با TBST شسته شد و در نهایت باندها با استفاده از کیت کمیلومینسانس (ECL) و با استفاده از دستگاه کمی داکت مشاهده گردید و توسط نرم افزار ImageJ آنالیز شد. سطح بیان پروتئین ها نسبت به سطح بیان ژن کنترل داخلی β-Actin نرمالایز گردید.

تحلیل آماری

نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار (SD±Mean) بیان گردید. داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۴ و Graph pad prism ورژن ۹ مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند.

توالی NF-κB DNAzyme

DNAzyme طراحی شده با خصوصیات و مشخصات موجود در جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفت.

DNAzyme: 5′ سکانس CAGATAAGCCAGGCTAGCTACAACGA .CCACATCCA 3′

یافته‌ها

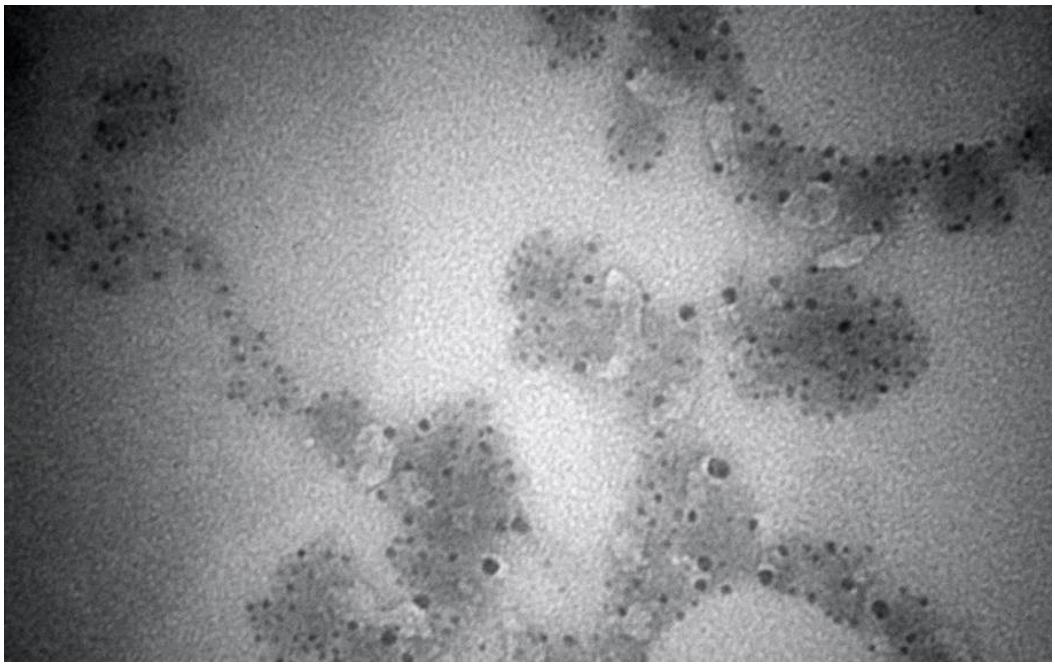
نانو ذرات

بررسی مورفولوژی میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

شکل ۱ عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوحامل-های نیوزومی بهینه حاوی داروی DNAzyme است. همان طور که مشاهده می‌شود نانو نیوزوم‌های کروی با مورفولوژی یکنواخت و سایز حدود ۲۹ نانومتر قابل مشاهده هستند.

جدول ۱. مشخصات و خصوصیات DNAzyme

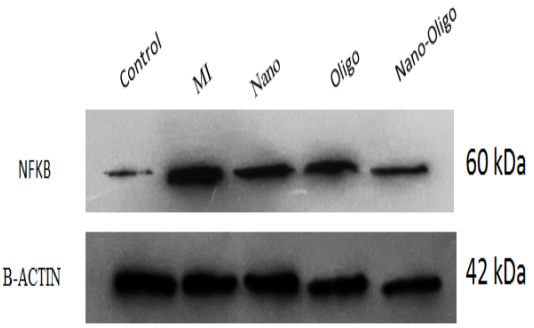
میکرولیتر مورد نیاز برای ۱۰۰ میکرومولار محلول	نانومولار	OD ۲۶۰ نانومتر	Tm (سانتی گراد)	وزن مولکولی (دالتون)	خالص سازی	تعداد جفت باز	آیدی الیگو	نام الیگو
۳۱۱	۳۱/۱	۱/۸	۷۷	۱۰/۶۷۲	نمک زدایی شده	۳۵	۲۲۰۱۲۴B۰۰۸F۳/۲۷	DNAzyme



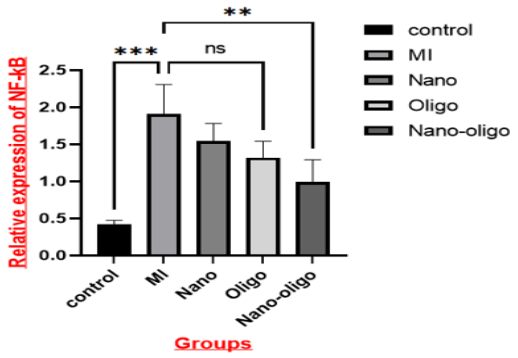
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از DNAzyme نانونیوزومه

وسترن بلات

همان طور که در شکل ۲ و نمودار ۱ نشان داده شده است، بیان پروتئین NF-κB پس از ایسکمی قلبی در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت (p<۰/۰۵). همچنین نتایج تایید کرد میزان بیان NF-Kb در تیمار سلول‌ها با DNAzyme نیوزومه در ایسکمی قلبی پس از ۷۲ ساعت درمان در مقایسه با گروه های درمان نشده کاهش یافت که این کاهش در گروه‌های تیمار شده با DNAzyme نیوزومه از DNAzyme به تنهایی بیشتر است (p<۰/۰۵).



شکل ۲. نتایج حاصل از انالیز وسترن بلات. در ردیف بالایی، میزان بیان NF-κB در ۵ گروه مورد مطالعه و در ردیف پایینی میزان بیان نرمالیزه شده با ژن کنترل داخلیB-ACTIN نمایش داده شده است.



نمودار ۱. نمودار حاصل از نتایج کمی تست وسترن بلات که حاصل از آنالیز one-way ANOVA است. این نتایج نشان می‌دهد که تیمار با DNAzyme نانونیوزومه به میزان ۱۵۰µg/kg، موجب کاهش قابل ملاحظه بیان ژن NF-κB در مقایسه با گروه ایسکمی گردید.

بحث

ایسکمی قلبی شایع‌ترین عامل آسیب است و علاوه بر مشکلات متعدد از جمله بار مالی که برای مبتلایان و جامعه دارد بر کیفیت زندگی آنها نیز تاثیر گذار است. پاتوژنز آسیب I/R شامل هایپوکسی، ROSها، فعال شدن کمپلمان و سایتوکاین‌ها است که تمام این رخدادها در بخشی از فرآیند خود به وسیله فعال شدن گروهی از فاکتورهای نسخه برداری به نام NF-κB، کنترل می‌گردند (۱۲). NF-κB به عنوان یک فاکتور مهم رونویسی هسته‌ای برای پاسخ سریع سلول‌های هسته‌دار است (۱۳). مهم‌ترین القاکننده‌های فعالیت فاکتور NF-κB در آسیب I/R شامل این موارد است: اینترلوکین ۱ آلفا (Interleukin 1 alpha :IL-1α)، IL-ß، اینترلوکین ۲ (Interleukin 2 :IL-2)، TNF-α، هایپوکسی، پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP :Heat shock Protein) و سایر لیگاندهای داخلی که به وسیله گیرنده‌های شبه Toll (Toll like Receptore :TLR) فعال می‌شوند (۱۲). DNAzyme به علت دارا بودن خصوصیات منحصر به فردی که نسبت به روش‌های دیگر برای خاموش سازی ژن دارد، مانند اختصاصیت و توانایی بالا در برش RNA ژن‌های مختلف، وزن مولکولی پایین، مقرون به صرفه بودن و پایداری نسبی در سرم، می‌تواند اثر درمانی به وسیله سرکوب بیان ژن‌هایی که از نظر پاتوفیزیولوژیکی فعال است، داشته باشد (۱۶-۱۳). نانوذرات یک رویکرد عالی در سیستم تحویل دارو با دارا بودن ویژگی‌های امید بخشی مانند محافظت دارو از برش خردن، تجزیه شدن و رها سازی کنترل شده ارائه می‌کنند (۱۱). اولین نسل نانو حامل‌ها (که شامل لیپوزوم ها ، میسل ها و طلا می‌شود)، اثر بخشی، تحویل دارو و هم چنین کنترل دوز آن را ارتقا دادند (۷). امروزه نیوزوم‌ها به عنوان یک سیستم با اهمیت تحویل دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (۹). نیوزوم‌ها وزیکول‌های دو لایه‌ای مانند لیپوزوم‌ها هستند که از سورفکتانت‌های غیر یونی تشکیل شده‌اند (۱). این نانوذرات توانایی محصور کردن طیف گسترده‌ای از داروهای لیپوفیلیک، هیدروفیلیک و آمفیلیک را در خود دارند. نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها در ساختار و حالت به دام انداختن دارو مشابه هستند، اما سورفکتانت که در تولید ساختار نیوزوم مورد استفاده قرار می‌گیرد، موجب کاهش هزینه و افزایش پایداری شیمیایی آن نسبت به لیپوزوم‌ها می‌گردد. چندین مورد از مزایای اصلی نیوزوم‌ها نسبت به لیپوزوم‌ها شامل این موارد است: قیمت کم، پایداری بالا، نگهداری و ذخیره آنها در شرایطی مخصوص الزامی و ضروری نیست. این مزایا موجب افزایش توجه به تولید و استفاده از نانوذرات نیوزوم نسبت به لیپوزوم شده است (۱). نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات در مطالعه حاضر حاکی از آن بود که میزان بیان فاکتور NF-κB

جدول ۲. نتایج کمی حاصل از تست وسترن بلات در۵ گروه مورد مطالعه.

	پروتئین مورد هدف	NFKB	B-ACTIN	NFKB
گروه کنترل	۱	۲۹۳۴	۶۰۹۵	۰/۴۸۱۳۷۸۱۸
	۲	۲۶۹۲	۶۸۱۱	۰/۳۹۵۲۴۲۹۹
	۳	۲۴۹۸	۶۴۷۵	۰/۳۸۵۷۹۱۵۱
گروه ایسکمی قلبی	۱	۹۲۹۳	۶۴۱۴	۱/۴۴۸۸۶۱۸۶
	۲	۱۳۳۳۷	۶۴۶۲	۲/۰۶۳۹۱۲۱
	۳	۱۴۲۶۵	۶۴۶۰	۲/۲۰۸۲۰۴۳۳
گروه دریافت کننده نانو	۱	۱۰۰۲۲	۶۶۰۳	۱/۵۱۷۷۹۴۹۴
	۲	۱۰۸۶۴	۶۰۴۹	۱/۷۹۵۹۹۹۳۴
	۳	۸۸۶۳	۶۶۹۶	۱/۳۲۳۶۲۶۰۵
گروه دریافت کننده الیگو	۱	۸۳۴۳	۵۹۱۱	۱/۴۱۱۴۳۶۳۱
	۲	۸۰۳۰	۵۴۰۹	۱/۴۸۴۵۶۲۷۷
	۳	۸۰۹۹	۷۵۷۸	۱/۰۶۸۷۵۱۶۵
گروه دریافت کننده نانوDNAzyme	۱	۷۸۸۶	۶۰۲۰	۱/۳۰۹۹۶۶۷۸
	۲	۶۳۳۴	۶۶۱۴	۰/۹۵۷۶۶۵۵۶
	۳	۴۵۴۵	۶۳۵۹	۰/۷۱۴۷۳۵۰۲

به عنوان یکی از فاکتورهای رونویسی در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارد؛ بنابراین یکی از فاکتورهای مهمی به حساب می‌آید که در ایسکمی قلبی بیان آن افزایش می‌یابد. هم چنین درمان با DNAzyme نانونیوزمه منجر به کاهش معنی دار بیان پروتئین NF-κB در گروهی که این دارو را دریافت کردند، نسبت به گروه ایسکمی شد. Fatemeh Farrrokhi و همکارانش در سال ۲۰۱۸ DNAzyme علیه فاکتور c-Myc طراحی کردند تا تاثیر آن را بر سرطان سینه ارزیابی کنند و مطالعات آنها حاکی از این بود که این نوع DNAzyme دارای اثر مهاری بر بیان ژن c-Myc است که منجر به اثرات درمانی بر این نوع سرطان می‌گردد (۱۷). مشابه با کار ما از سیستم دارو رسانی بر پایه نانو استفاده کردند، اما نوع حامل نانو آنها متفاوت بود و از حامل‌های نانو پلیمر بتا سیکلو دکسترین بهره بردند. به منظور بررسی میزان بیان c-Myc پس از ترنسفکشن سلول با DNAzyme از تکنیک RT-PCR استفاده شد و کاهش ۵۰ ٪ بیان آن مشاهده گردید. در مقایسه با پژوهش ما که از DNAzyme که هدف آن فاکتورNF-κB بود استفاده کردیم و مشاهده کردیم که احتمال دارد که کاهش بیان آن منجر به کاهش بیان فاکتورهای التهابی، کاهش آپوپتوز سلول‌های قلبی شود و از این رو منجر به افزایش عملکرد قلب گردید نشان می‌دهد که DNAzyme می‌تواند بر بیان فاکتور مورد هدف خود تاثیر گذار باشد. Xiangbo Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به وسیله طراحیDNAzyme فاکتور DNMT-1 را در سرطان مثانه مورد بررسی قرار دادند (۱۳)، مشابه با کار ما از DNAzyme به عنوان مهار کننده ژن مورد نظر و روش درمانی استفاده شد. به منظور بررسی تاثیر گذاری DNAzyme بر بیان ژن DNMT-1 از RT-PCR کمی استفاده شد و نتایج آن نشان داد که در سلول‌های درمان شده کاهش قابل توجه بیان ژن نسبت به گروه کنترل وجود دارد و در نتیجه استفاده از DNAzyme منجر به مهارپیشرفت سرطان گردید. همان طور که در مقایسه با کار ما به کارگیری DNAzyme منجر به کاهش فاکتور رونویسی دخیل در التهاب گردید و می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مورد استفاده قرار گیرد. در مقایسه با پژوهش Inthiria Somasuntharam و همکارانش در سال ۲۰۱۵ که از DNAzyme کونژوگه شده با نانوحامل طلا برای خاموش سازی فاکتور TNF-α در مدل موشی سکته قلبی استفاده کرده بودند (۲)، انتخاب فاکتور TNF-α به عنوان یک فاکتور التهابی مشابه انتخاب فاکتورNF-κB توسط ما به عنوان فاکتور التهابی مورد هدف بود، با این تفاوت که علاوه بر آن که NF-κBدر التهاب نقش دارد در پروسه های دیگر دخیل در ایسکمی قلبی نیز نقش دارد؛ در نتیجه انتخاب این فاکتور توسط ما می‌تواند گزینه بهتری باشد. علاوه بر آن سیستم دارورسانی مورد استفاده در پژوهش ما نانوذره نیوزوم است، در حالی که در پژوهش آنها از نانوذرات طلا بهره گرفته شده بود. در مقایسه با پژوهش Guosheng Xiang و همکارانش که DNAzyme طراحی شده برای فاکتور PAI-1 را به مدل ایسکمی موشی تزریق کردند (۱۸)، مشابه به کار ما در موقع

جراحی و در زمان بستن رگ، DNAzyme تزریق شد، به منظور آنالیز بیان فاکتور مورد هدف، ایمونوهیستوشیمی انجام شد، با این تفاوت که در ۴۸ ساعت بعد از جراحی بود، اما در نتیجه هر دو پژوهش کاهش بیان فاکتور مورد هدف پس از تزریق DNAzyme دیده شد. در مقایسه با پژوهش Tiechao Jiang و همکارانش که در سال ۲۰۲۰ از miR-1275 mimic برای مهار فاکتور NF-κB در مدل موشی ایسکمی قلبی استفاده کردند (۱۹)، فاکتور مورد هدف قرار داده شده مشابه با پژوهش ما بود. در این پژوهش از آنالیز ایمونوهیستوشیمی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت و نتایج حاصل از آنالیز بدین صورت بود که افزایش بیان این فاکتور در بافت‌های گروهی که دچار ایسکمی شدند نسبت به گروه شم دیده شده و نشان دهنده اهمیت این فاکتور در آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن است، هم چنین کاهش بیان آن در گروهی که miR-1275 mimic دریافت کردند نسبت به گروه ایسکمی دیده شد. این محققان تاثیر گذاری miR-1275 mimic در مهار ایسکمی قلبی به وسیله تنظیم مسیر NF-κB را نشان دادند.

با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که استفاده از DNAzyme نیوزومه اثر بخشی بیشتری در کاهش بیان پروتیین NF-κB نسبت به استفاده از DNAzyme بدون حامل دارد که در نهایت می‌تواند منجر به کاهش اثرات مضر پس از آسیب ایسکمی / ریپرفیوژن گردد. بنابراین استفاده از سیستم دارورسانی بر پایه نیوزوم برای تاثیر گذاری بیشتر داروها پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه تحت عنوان بررسی اثرات درمانی DNAzyme بر بیان ژن NF-κB در مدل ایسکمی قلبی در موش های رت نر در مقطع کارشناسی ارشد است که با حمایت مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران اجراشد.

REFERENCES

1. Amoabediny G, Haghiralsadat F, Naderinezhad S, Helder MN, Akhoundi Kharanaghi E, Mohammadnejad Arough J, et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. Int J Polym Mater 2018;67:383-400.

2.Somasuntharam I, Yehl K, Carroll SL, Maxwell JT, Martinez MD, Che P-L, et al. Knockdown of TNF-α by DNAzyme gold nanoparticles as an anti-inflammatory therapy for myocardial infarction. Biomaterials 2016;83:12-22.

3.Benson VL, Khachigian LM, Lowe HC. DNAzymes and cardiovascular disease. Br J Pharmacol 2008;154:741-8.

4.Schreiber T, Salhöfer L, Quinting T, Fandrey J. Things get broken: the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases in ischemic heart disease. Basic Res Cardiol 2019;114:16.

5.Frantz S, Tillmanns J, Kuhlencordt PJ, Schmidt I, Adamek A, Dienesch C, et al, Bauersachs J. Tissue-specific effects of the nuclear factor kappaB subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury. Am J Pathol 2007;171:507-12.

6.Skourtis D, Stavroulaki D, Athanasiou V, Fragouli PG, Iatrou H. Nanostructured Polymeric, Liposomal and Other Materials to Control the Drug Delivery for Cardiovascular Diseases. Pharmaceutics 2020;12:1160.

7.Lu D, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2019;16:661-674.

8.Sala V, Bergerone S, Gatti S, Gallo S, Ponzetto A, Ponzetto C, Crepaldi T. MicroRNAs in myocardial ischemia: identifying new targets and tools for treating heart disease. New frontiers for miR-medicine. Cell Mol Life Sci 2014;7:1439-52.

9.Parlakpinar H, Orum M, Sagir M. Pathophysiology of myocardial ischemia reperfusion injury: a review. Med Sci 2013;2:935-54.

10.Zimmermann AC, White IM, Kahn JD. Nucleic acid-cleaving catalytic DNA for sensing and therapeutics. Talanta 2020;211:120709.

11.Ag Seleci D, Seleci M, Walter J-G, Stahl F, Scheper T. Niosomes as nanoparticular drug carriers: fundamentals and recent applications. J Nanomater 2016;2016.

12. Latanich CA, Toledo-Pereyra LH. Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. J Invest Surg 2009;22301-15.

13. Wang X, Zhang L, Ding N, Yang X, Zhang J, He J, et al. Identification and characterization of DNAzymes targeting DNA methyltransferase I for suppressing bladder cancer proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2015;461:329-33.

14 Zhao L, Yang XR, Han X. MicroRNA-146b induces the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway to reduce vascular inflammation and apoptosis in myocardial infarction by targeting PTEN. Exp Ther Med 2019;17:1171-1181.

15. Lake RJ, Yang Z, Zhang J, Lu Y. DNAzymes as Activity-Based Sensors for Metal Ions: Recent Applications, Demonstrated Advantages, Current Challenges, and Future Directions. Acc Chem Res 2019;52:3275-3286.

16. Pardakhty A, Moazeni E. Nano-niosomes in drug, vaccine and gene delivery: a rapid overview. Nanomed J 2013;1:1-12.

17. Farrokhi F, Karami Z, Esmaeili-Mahani S, Heydari A. Delivery of DNAzyme targeting c-Myc gene using β-cyclodextrin polymer nanocarrier for therapeutic application in human breast cancer cell line. J Drug Deliv Sci Technol 2018;47:477-84.

18. Xiang G, Schuster MD, Seki T, Witkowski P, Eshghi S, Itescu S. Downregulated expression of plasminogen activator inhibitor-1 augments myocardial neovascularization and reduces cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2005;46:536-41.

19. Jiang T, You H, You D, Zhang L, Ding M, Yang B. A miR-1275 mimic protects myocardiocyte apoptosis by regulating the Wnt/NF-κB pathway in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. Mol Cell Biochem 2020 ;466:129-137.