



# Optimization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Trimethyl Chitosan (SPION-TMC) as a siRNA Carrier to Inhibit HIV-1 *nef*

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Kamalzare S.<sup>1</sup> PhD,  
Noormohammadi Z.<sup>1</sup> PhD,  
Rahimi P.<sup>2</sup> PhD,  
Atyabi F.<sup>3</sup> PhD,  
Irani Sh.<sup>1</sup> PhD,  
Mirzazadeh Tekie F.S.<sup>4</sup> PhD,  
Mottaghtalab F.<sup>4</sup> PhD

### How to cite this article

Kamalzare S, Noormohammadi Z, Rahimi P, Atyabi F, Irani Sh, Mirzazadeh Tekie FS, Mottaghtalab F. Optimization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Trimethyl Chitosan (SPION-TMC) as a siRNA Carrier to Inhibit HIV-1 *nef*. Pathobiology Research. 2020;23(2):109-119.

## ABSTRACT

**Aims** Despite the efficacy of current therapies against HIV-1 infection, these methods are not a permanent treatment because they cannot prevent the return of viremia from latent cell reservoirs. On the other hand, the virus may become resistant to these drugs. Therefore, providing safer and more effective therapeutic strategies, such as inhibition of genes by siRNA, is essential. The successful therapeutic application of siRNAs requires an efficient delivery system to target cells.

**Materials & Methods** In this study, a specific siRNA was designed against the HIV-1 *nef* gene. Then a stable HEK293 cell line expressing HIV-1 *nef* was developed and after fabrication and evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) coated with trimethyl chitosan, the efficiency of nanoparticles for delivering siRNA into the cells and inhibition of *nef* gene was investigated.

**Findings** Iron oxide nanoparticles (spherical-shaped with an average size of 85nm and the average zeta potential of +29mV) were significantly effective in transporting siRNA into HEK293 cells compared to control groups and at the same time had low toxicity to the cells. In addition, SPION-TMC containing anti-*nef* siRNA inhibited about 85% of the expression of this gene in stable cells (compared to control cells).

**Conclusion** The optimized SPION-TMC nanocarriers can be used as a promising approach in HIV-1 infection therapy. However, pre-clinical *in vivo* evaluation of the drug/siRNA delivery system efficiency remains to be conducted.

**Keywords** HIV-1 *nef*; siRNA Delivery; SPION Carriers; Chitosan

<sup>1</sup>Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University (IAU), Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>"Nanotechnology Research Centre" and "Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy", Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Nanotechnology Research Centre, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### \*Correspondence

Address: Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Phone: +98 (21) 66953323

Fax: +98 (21) 66953323

prahimi@pasteur.ac.ir

### Article History

Received: March 02, 2020

Accepted: July 22, 2020

ePublished: August 10, 2020

## CITATION LINKS

[1] Lead poisoning outbreak among opium ... [2] Human immunodeficiency virus ... [3] Activated peripheral CD8 lymphocytes ... [4] Update of the drug resistance mutations ... [5] Insights into RNA interference as antiviral ... [6] Carboxymethyl dextran-trimethyl chitosan ... [7] RNA interference approaches for treatment ... [8] Peptide-based inhibition of miRNA ... [9] Comparison of the suppressive effects of ... [10] siRNA delivery system based on ... [11] Application of magnetic field hyperthermia ... [12] Effect of the type of base and number of ... [13] BLOCK-iT™ RNAi ... [14] Recent advances in RNAi-based strategies ... [15] Optimization of chitosan nanoparticles as an ... [16] Nanotechnology approaches for the delivery of ... [17] Polyethylenimine-coated SPION exhibits potential intrinsic ... [18] Superparamagnetic iron oxide ... [19] Folic acid-functionalized polyethylenimine ... [20] Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ... [21] Dextran-benzoporphyrin derivative (BPD) ... [22] Polyethylenimine-coated superparamagnetic ... [23] Assessment of superparamagnetic iron oxide ... [24] A new catechol-functionalized polyamidoamine ... [25] Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly ... [26] SPION loaded poly (L-lysine)/hyaluronic acid micelles ... [27] Preparation and characterization of biocompatible ... [28] Cationic polymer based nanocarriers for ... [29] Use of experimental design methodology for the development ... [30] Preparation and assessment of chitosan-coated ... [31] Magnetic responsive of paclitaxel delivery ... [32] The relationship between pH and zeta potential ... [33] Antimicrobial applications of nanotechnology ... [34] Development of phosphorylated nanoparticles as zeta ... [35] Preparation of chitosan hydrogel and its solubility ... [36] Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: A ... [37] Synthesis, characterisation and preliminary investigation ... [38] Biological properties of superparamagnetic iron ... [39] Magnetic polyion complex micelles as therapy and ... [40] Preparation, optimization and toxicity evaluation of ...

## بهینه‌سازی نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامغناطیس- تری متیل کیتوزان (SPION-TMC) به عنوان ناقل siRNA به منظور مهار HIV-1 nef

سارا کمال زارع PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

زهرا نورمحمدی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پونه رحیمی\* PhD

بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

فاطمه اطمینی PhD

"مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی" و "گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

شیوا ایرانی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

فرناز سادات میرزازاده تکیه PhD

مرکز تحقیقات نانو فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

فاطمه متقی طلب PhD

مرکز تحقیقات نانو فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** با وجود اثربخشی درمان‌های دارویی رایج در کاهش بار ویروس HIV-1 در بدن، این روش‌ها درمان قطعی محسوب نمی‌شوند، زیرا نمی‌توانند ذخایر ویروسی پنهان را نابود کنند و از طرفی، امکان مقاوم شدن ویروس به این داروها نیز وجود دارد. بنابراین، ارایه راهکارهای درمانی ایمن‌تر و موثرتر ضروری است که از آن جمله می‌توان به مهار ژن‌ها توسط siRNA اشاره کرد و خود نیازمند روش‌های ایمن و موثر انتقال به درون سلول‌های هدف است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، یک ساختار اختصاصی siRNA بر علیه ژن *HIV-1 nef* طراحی و سنتز شد و سپس اقدام به توسعه یک رده سلولی پایدار HEK293 بیان‌کننده *HIV-1 nef* شد. در ادامه، پس از ساخت و ارزیابی SPION (نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامغناطیس) با پوشش تری متیل کیتوزان، مهار (خاموش سازی) ژن *nef* در رده سلولی پایدار فوق با کمک نانوذرات مذکور (به عنوان حامل siRNA) مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نانوذرات اکسید آهن (کروی شکل با اندازه میانگین ۸۵ نانومتر و پتانسیل سطحی برابر ۲۹+ میلی ولت) در انتقال siRNA به درون سلول‌های HEK293 در مقایسه با گروه‌های کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای موثر بوده‌اند و در عین حال دارای سمیت پایین برای سلول‌ها بودند. همچنین، استفاده از نانوذرات دارای siRNA بر علیه ژن *nef* منجر به مهار حدود ۸۵٪ بیان ژن مذکور در سلول‌های پایدار (نسبت به سلول‌های کنترل) شد.

**نتیجه‌گیری:** نانوذرات بهینه SPION با پوشش تری متیل کیتوزان می‌توانند به عنوان یک روش کارآمد در اهداف درمانی HIV-1 مورد استفاده قرار گیرند. با این وجود، بررسی سودمندی این نانوذرات (حامل دارو و یا siRNA) در شرایط در محیط زنده برای اهداف بالینی ضروری است.

**کلیدواژه‌ها:** *HIV-1 nef*، انتقال siRNA، نانوذرات SPION، کیتوزان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۱

\*نویسنده مسئول: prahimi@pasteur.ac.ir

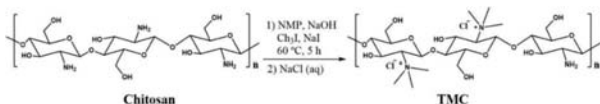
### مقدمه

HIV (ویروس نقص ایمنی انسانی) نوعی رتروویروس (ویروس‌هایی که ژنوم آنها از RNA تشکیل شده است) و متعلق به خانواده لنتی ویروس‌ها است. تاکنون دو نوع از این ویروس به نام‌های HIV-1 و HIV-2 شناخته شده است که HIV-1 عامل بیشتر عفونت‌های HIV در جهان است<sup>[1]</sup>. عفونت ایجاد شده به وسیله HIV-1 منجر به کاهش تدریجی عملکرد سیستم ایمنی به ویژه به دلیل کاهش جمعیت لنفوسیت‌های T کمکی CD4+ می‌شود که در نهایت منجر به بیماری ایدز می‌شود<sup>[2]</sup>. ایدز یا سندروم نقص ایمنی اکتسابی یک بیماری همه‌گیر در جهان و ناشی از HIV است. طبق آمار WHO (سازمان بهداشت جهانی) در سال ۲۰۱۷، حدود ۳۸ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به HIV بوده‌اند که حدود ۲۶ میلیون نفر از این افراد در قاره آفریقا زندگی می‌کنند. طبق آمار همین سازمان، تعداد مبتلایان به ویروس HIV در سال ۲۰۱۷ در ایران به ۶۰ هزار نفر رسیده است که از این میان ۷۰۰ نفر افرادی با سن کمتر از ۱۴ سال هستند<sup>[3]</sup>.

اگرچه درمان‌های رایج ضد ویروسی می‌توانند همانند سازی HIV-1 را به تاخیر بیندازند، این روش‌ها درمان قطعی برای بیماری محسوب نمی‌شوند و نمی‌توانند ذخایر پنهان ویروسی را نابود کنند. علاوه بر این، امکان مقاوم شدن ویروس به این داروها نیز وجود دارد<sup>[4]</sup>. به دلایل ذکر شده، ادامه تحقیقات برای یافتن راه‌های جدید و موثر به منظور محدود کردن همانند سازی ویروسی، ضروری است. در این زمینه، مهار بیان ژن‌های ویروسی توسط تکنیک تداخل RNA (RNAi) می‌تواند راهکاری موثر و مفید در مهار همانند سازی و تولید HIV-1 باشد. RNAi فرآیندی بیولوژیکی است که در آن مولکول‌های RNA کوچک دورشته‌ای مانند siRNA به طور اختصاصی، توالی خاصی از رونوشت ژن مورد نظر را شناسایی می‌کنند و در نهایت باعث مهار بیان پروتئین مورد نظر می‌شوند. بنابراین، هدف قراردادن توالی اختصاصی ژن‌های مورد نظر می‌تواند منجر به افزایش اهداف درمانی HIV-1 علاوه بر درمان‌های رایج ضد ویروسی شود<sup>[5]</sup>.

از میان پروتئین‌های کد شده توسط HIV-1، پروتئین Nef (با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون) نقش مهمی در بیماری‌زایی ویروس ایفا می‌کند و در مراحل اولیه بیان ژن‌های ویروسی سنتز می‌شود. پروتئین Nef که محصول یک ژن (*nef*) با ساختار بسیار حفظ شده است دارای نقش‌های متعددی است که از آن جمله می‌توان به همانند سازی ژنوم ویروس، کاهش بیان گیرنده‌های سطحی سلول، فعال سازی لنفوسیت‌های T و تنظیم آپوپتوز سلولی اشاره کرد<sup>[6]</sup>. بنابراین، با توجه به اهمیت این ژن در فعالیت HIV-1، مهار بیان آن با استفاده از تکنیک RNAi (برای مثال توسط siRNA) می‌تواند در کنترل ویروس موثر واقع شود. همچنین، از آنجایی که ژن *nef* در انتهای ۳' ژنوم HIV-1 قرار دارد، هدف قراردادن بیان این ژن می‌تواند بر بیان برخی دیگر از ژن‌های مهم ویروسی تاثیرگذار باشد<sup>[7]</sup>.

بهینه‌سازی شد [12]. ۵/۵ گرم کیتوزان (وزن مولکولی ۱۱۰ تا ۱۵۰ کیلو دالتون و درجه داستیلاسیون ۹۵٪) و ۱/۲ گرم سدیم‌یدید (مرک: آلمان) در ۲۰ میلی‌لیتر حلال N-متیل-۲-پیرولیدون (NMP؛ مرک: آلمان) پراکنده شدند و دمای مخلوط به ۶۰°C رسانده شد. سپس به آن ۲/۷۵ میلی‌لیتر محلول ۱۵٪ سدیم‌هیدروکساید اضافه و ۲۰ دقیقه هم زده شد و به مخلوط واکنش ۳ میلی‌لیتر متیل‌یدید اضافه و واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۶۰°C انجام شد. پس از این مدت با اضافه کردن استون، محصول رسوب کرد و رسوب حاصل توسط سانتریفیوژ جدا شد. رسوب حاصل مجدداً در ۲۰ میلی‌لیتر حلال NMP حل و تمامی مراحل انجام‌شده در واکنش مجدداً تکرار شد و محصول پس از یک ساعت واکنش با اضافه کردن استون رسوب کرد و توسط سانتریفیوژ جدا شد. رسوب حاصل نمک یدیدتری‌متیل‌کیتوزان است که در مرحله بعد، جایگزینی یون‌های یدید با یون‌های کلرید در ساختمان پلیمر از طریق حل کردن رسوب در ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم کلرید ۱۰٪ انجام شد و محصول نمک کلریدتری‌متیل‌کیتوزان به دست آمد. محلول حاصل توسط کیسه دیالیز با اندازه وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون در آب دیونیزه به مدت ۲۴ ساعت دیالیز و سپس لیوفیلیزه شد. شمای سنتز TMC در شکل ۱ نشان داده شده است. در ادامه، بررسی ساختمان شیمیایی و تعیین گروه‌های متیل متصل به گروه‌های آمین در ساختمان پلیمر TMC توسط HNMR (طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون) انجام شد.



شکل ۱) طرح شماتیک از سنتز پلیمر N, N, N-تری‌متیل‌کیتوزان (TMC)

نانوذرات اکسید آهن با پوشش TMC به واسطه برهمکنش‌های الکترواستاتیک بین TMC با بار مثبت و نانوذرات اکسید آهن با بار منفی تهیه شدند. بدین منظور، ابتدا ۵ میلی‌گرم نانوذرات اکسید آهن در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه توسط حمام اولتراسونیک کاملاً پراکنده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر محلول TMC در آب دیونیزه با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر به آن اضافه و به مدت ۲۴ ساعت توسط شیکر هم زده شد. پس از گذشت این زمان، نانوذرات پوشش‌داده‌شده با TMC (SPION-TMC) توسط سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه در زمان ۱۵ دقیقه از مخلوط واکنش جدا و پس از خالی کردن مایع رویی (سوپرناتانت)، نانوذرات مجدداً ۲ مرتبه با آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند.

siRNA ضد *HIV-1 nef* (GenBank KM390026.1) به همراه siRNA کنترل (Scrambled siRNA) متصل به رنگ فلورسنت زرد TAMRA با استفاده از نرم‌افزار آنالین (Invitrogen) Designer [13] و سپس از نظر ویژگی‌های ترمودینامیکی و BLAST بررسی و تایید شدند (جدول

مطالعات نشان داده‌اند که مولکول‌های siRNA می‌توانند به‌عنوان یک عامل خارجی به درون سلول‌ها وارد شوند و برای خاموش‌سازی ژن‌های مورد نظر در شرایط در شیشه و در محیط زنده مورد استفاده قرار گیرند [8]. خاموش‌سازی ژن‌ها می‌تواند با استفاده از مقدار نسبتاً پایین siRNA در سلول‌های هدف انجام پذیرد و عمل خاموش‌سازی دارای اختصاصیت بالا برای mRNA هدف است. همچنین، مولکول‌های siRNA در صورت طراحی صحیح و دقیق، فعال‌کننده سیستم ایمنی نخواهند بود [9]. با وجود مزایای ذکرشده برای siRNA، کاربردهای بالینی آن به دلیل ورود سلولی پایین و پایداری بیولوژیکی کم همچنان محدود است، بنابراین توسعه ناقل‌های مناسب siRNA در درون بدن برای غلبه بر مشکلات فوق ضروری است.

در سال‌های اخیر، استفاده از ناقل‌های غیروبروسی (به‌صورت نانوذرات) به دلیل سمیت پایین و خطر کم برای انتقال siRNA (و یا ژن مورد نظر) به درون سلول‌ها در بدن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این بین، استفاده از SPION (نانوذرات اکسید آهن پارامغناطیسی) به دلیل ویژگی‌های مناسب مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت پایین و قابلیت کاربرد در تصویربرداری مغناطیسی، کاربردهای فراوانی در سیستم‌های انتقال سلولی و ژن‌درمانی و به‌ویژه در درمان سرطان یافته‌اند [10]. علاوه بر این، استفاده از SPION در درمان HIV به دلیل خاصیت گرم‌درمانی مغناطیسی که می‌تواند منجر به فعال‌شدن CTLs (لنفوسیت‌های T کشنده) و کمک به مقابله بیشتر با HIV-1 در بدن شود، می‌تواند سودمند باشد [11].

بنابراین، در مطالعه حاضر، بررسی سودمندی استفاده از نانوذرات SPION (بهینه‌شده با کمک تری‌متیل‌کیتوزان) که ناقل siRNA اختصاصی ضد *HIV-1 nef* بودند بر میزان خاموش‌سازی ژن مذکور در رده سلولی پایدار HEK293 (بیان‌کننده ژن HIV-1 *nef*) مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس (SPIONs) توسط روش هم‌رسوبی سنتز شدند. ۲/۶ گرم کلرید آهن III آبه ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) و ۰/۹۶ گرم کلرید آهن II آبه ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) با نسبت مولی ۲:۱ تحت اتمسفر نیتروژن در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه در دمای ۷۰°C حل شدند. سپس به این محلول به‌صورت قطره‌قطره هیدروکسید آمونیوم ۲۵٪ اضافه شد تا pH محلول به ۱۱ افزایش یابد و مخلوط سیاه‌رنگ به دست آمده به مدت یک ساعت در این دما هم زده شد. نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) توسط یک آهن‌ربای دائمی ته‌نشین و چندین مرتبه با آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند تا pH محلول به ۷ برسد. نانوذرات به دست آمده در آن خلا در دمای ۴۰°C خشک شدند.

مشقت محلول در آب N, N, N-تری‌متیل‌کیتوزان (TMC) که در محدوده وسیعی از pH در آب محلول است، در این مرحله سنتز و

را در خود حفظ کند، siRNA را در چاهک رها و siRNA آزاد از درون چاهک به سمت پایین حرکت می‌کند.

به‌منظور ارزیابی اثر مهاری مولکول‌های siRNA بر علیه nef HIV-1 ابتدا نیاز به ساخت یک رده سلولی پایدار بیان‌کننده ژن nef بود که برای این منظور از سلول‌های HEK293 استفاده شد. در اینجا، وکتور نوترکیب بیانی pEGFP-Nef توسط ساب‌کلونینگ ژن nef HIV-1 (GenBank: KM390026.1؛ حدود ۶۲۱ جفت باز) بین جایگاه‌های برشی NheI و PstI از وکتور pEGFP-N1 (به‌منظور بیان پایدار پروتئین HIV-1 Nef در سلول‌های HEK293) ساخته شد. رده سلولی HEK293 از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت DMEM (Gibco؛ ایالات متحده) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco؛ FBS؛ ایالات متحده) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین و در دمای ۳۷°C در اتمسفر حاوی ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> کشت داده شد. ترنسفکشن سلول‌های HEK293 با وکتور نوترکیب pEGFP-Nef توسط عامل ترنسفکشن توربوفکت (Life Technologies؛ ایالات متحده) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سلول‌های ترنسفکت‌شده تحت فشار آنتی‌بیوتیک G418 (۱/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) برای مدت سه هفته قرار گرفتند و در نهایت یک تک‌کلون پایدار از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت انتخاب و به‌عنوان رده سلولی پایدار (بیان‌کننده ژن nef)، توسعه داده شد. بیان سلولی Nef-GFP (بعد از حداقل بیست پاساژ سلولی) توسط میکروسکوپ فلورسنت و Real time PCR تایید شد (داده‌ها نشان داده نشده است).

به‌منظور سنجش سمیت نانوذرات حامل siRNA از کیت XTT (Roche؛ آلمان) استفاده شد. ابتدا سلول‌های HEK293 به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل (DMEM دارای ۱۰٪ FBS) در هر چاهک، در دو پلیت ۹۶ خانه جداگانه (پلیت‌های ۱ و ۲) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، محیط سلولی از همه چاهک‌ها خارج و نانوذرات با غلظت‌های مختلف (۲۵-۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر در محیط سلولی) به سلول‌ها اضافه و حجم نهایی هر چاهک توسط محیط کشت تازه (فاقد سرم) به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و سلول‌ها دوباره به انکوباتور منتقل شدند. پس از گذشت ۴ ساعت (برای پلیت سلولی شماره ۱) و ۲۴ ساعت (برای پلیت سلولی شماره ۲)، محیط سلول‌ها با محیط سلولی کامل (حاوی ۱۰٪ FBS) تعویض شد و سلول‌ها به مدت حدود ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفتند و در نهایت، سلول‌ها مورد آزمون XTT (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) قرار گرفتند. قابل ذکر است که در اینجا از یک گروه کنترل مثبت که شامل سلول‌های تیمار شده با معرف تجاری ترنسفکشن لیپوفکتامین RNAiMAX (Invitrogen؛ ایالات متحده) حامل siRNA ضد nef بود (مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده) و همچنین، از دو گروه سلولی کنترل منفی که شامل سلول‌های

(۱) همچنین غلظت بهینه siRNA برابر ۱۰۰ پیکومول بر میلی‌لیتر تعیین شد. در ادامه، به‌منظور بارگذاری siRNA بر روی SPION-TMC، نانوذرات SPION-TMC با نسبت بهینه N به P (نسبت مولی گروه‌های آمین در پلیمرهای کاتیونی به گروه‌های فسفات در siRNA) برابر ۴ تهیه شدند. برای این منظور، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر siRNA (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) در حجم ۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر دیونیزه (RNase free) حل شد (غلظت نهایی siRNA برابر ۲۰۰ نانومولار) و سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر نانوذرات SPION-TMC با غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، به این محلول اضافه و محتویات میکروتیوب بلافاصله به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه بر روی ورتکس مخلوط و در پایان به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.

جدول ۱) توالی‌های siRNA و Scrambled siRNA طراحی‌شده توسط BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer

| نوع ساختار <sup>a</sup> | موقعیت <sup>b</sup><br>(جفت باز) | توالی                      | تغییرات  |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------|
| <b>ضد-nef-siRNA</b>     |                                  |                            |          |
| سنس                     | ۱۲۴-۱۴۲                          | 5'-GCAAUCACAAGUAGCAAUA-3'  | ندارد    |
| آنتی‌سنس                |                                  | 5'-UAUUGCUACUUGUGAUUGC-3'  | ندارد    |
| <b>Scrambled siRNA</b>  |                                  |                            |          |
| سنس                     | فاقد موقعیت بر                   | 5'-GCCGAUCUAAUAGAGUUA-3'   | 3' TAMRA |
| آنتی‌سنس                | روی mRNA                         | 5'-UAACUCUGAUUAGAUCCGGC-3' | ندارد    |

<sup>a</sup>: توالی‌های siRNA ضد ژن nef (ضد-nef-siRNA) و کنترل منفی (Scrambled siRNA)؛ <sup>b</sup>: موقعیت siRNA بر روی mRNA ژن nef

برای تعیین توزیع اندازه هیدرودینامیکی و بار سطحی نانوذرات در محلول از DLS (دستگاه پراکندگی دینامیکی نور) استفاده شد. همچنین، بررسی شکل و اندازه نانوذرات با روش تصویربرداری توسط SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی) صورت گرفت. بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط نانوذرات بر روی یک لام تمیز شیشه‌ای در محیط خلا خشک و تصویربرداری از نانوذرات با بزرگنمایی ۶۰ هزار برابر انجام شد.

ساختار شیمیایی SPION-TMC و SPION-TMC توسط FTIR (طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز) در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm<sup>-1</sup> بررسی شد. برای این منظور، نانوذرات پس از سنتز و خالص‌سازی، برای تهیه پودر خشک لیوفیلیزه شدند و طیف‌سنجی FTIR توسط مخلوط پودر نانوذرات و نمک پتاسیم‌برماید انجام شد.

به‌منظور بررسی عملکرد نانوذرات در حفظ siRNA، آزمون بازداري siRNA در ژل آگارز ۲٪ انجام گرفت. بدین منظور، نانوذرات حامل siRNA در یک چاهک جداگانه از ژل آگارز بارگذاری شدند و یک چاهک برای مارکر (لدر RNA) و یک چاهک نیز به‌عنوان کنترل مثبت (فقط siRNA با همان غلظت به‌کاررفته در نانوذرات) در نظر گرفته شد و الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت یک ساعت انجام گرفت. به‌طور معمول، نانوذرات تشکیل‌شده نمی‌توانند از درون منافذ این ژل عبور کنند. بنابراین، اگر نانوذره نتواند siRNA

CGGCTGTCAAACCTCCACTC-3 و با استفاده از سایبرگرین صورت گرفت. به علاوه، ژن *HPRT1* نیز به‌عنوان ژن رفرنس در نظر گرفته شد<sup>[۶]</sup>. همچنین، آنالیز تغییرات بیان ژن با استفاده از روش دلتا دلتا سی‌تی برای نمونه‌های تیمار و کنترل (پس از نرمال‌سازی با کمک ژن رفرنس) انجام شد. برای هر نمونه (تیمارهای نانوذره و کنترل‌ها) از سه تکرار استفاده و میانگین آماری نتایج این سه تکرار به‌عنوان نتیجه هر تیمار در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16.0 انجام شد. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تی مورد بررسی قرار گرفتند و مقادیر *p-value* کوچکتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

طیف HNMR از پلیمرهای کیتوزان و TMC در نمودار ۱ نشان داده شده است. در طیف HNMR پلیمر کیتوزان، پیک‌های موجود در ۲/۱۱ و ۲/۱۳ppm به ترتیب مربوط به پروتون‌های متیل در گروه‌های استامید و استیک‌اسید باقیمانده در نمونه است. سیگنال موجود در ۳/۲۲ppm پیک مربوط به هیدروژن متصل به کربن شماره ۲ (H<sub>2</sub>) است. مجموعه پیک‌ها در ۳/۴-۶/۰ppm هیدروژن‌های H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub> موجود در کیتوزان را نشان می‌دهند. در طیف HNMR مربوط به TMC، سیگنال‌های ۲/۸۵ و ۳/۰۶ppm، گروه‌های N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> و N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> را نشان می‌دهند. همچنین، سیگنال‌ها در ۲/۰۴، ۳/۷۸-۴/۵۷ و ۵/۵-۱۱/۴۳ppm مربوط به پروتون‌های متیل در گروه‌های استامید، H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub> و H<sub>1</sub> ساختار کیتوزان هستند. سیگنال در ۳/۳۳ppm در طیف‌های کیتوزان و TMC می‌تواند به H<sub>2</sub> در مونومرهای داستیل کیتوزان و پروتون‌های OCH<sub>3</sub> در TMC مرتبط باشد.

شکل و اندازه نانوذرات SPION-TMC با روش تصویربرداری توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). نانوذرات SPION-TMC دارای ساختاری کروی شکل و با اندازه تقریبی ۶۰ تا ۸۰ نانومتر مشاهده شدند. علاوه بر این، قطر هیدرودینامیکی شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتای نانوذرات در محیط آبی توسط دستگاه DLS اندازه‌گیری شد که این مقادیر برای SPION-TMC به ترتیب ۴۸/۲±۳/۷ نانومتر، ۱۵۷/۰ و ۱/۵۶- میلی‌ولت و برای SPION-TMC به ترتیب ۸۵/۱±۴/۳ نانومتر، ۲۴۹/۰ و ۲۹/۴+ میلی‌ولت تعیین شد.

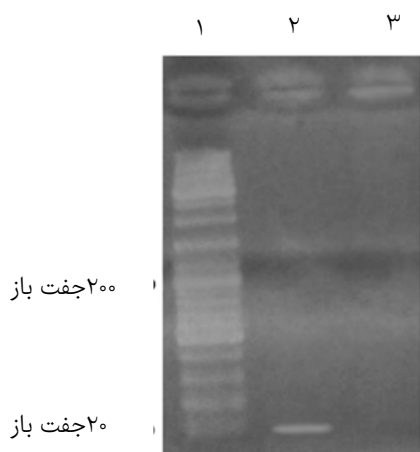
ساختار شیمیایی نانوذرات SPION و SPION-TMC و همچنین پلیمر TMC توسط روش طیف‌سنجی FTIR ارزیابی شدند. در طیف FTIR نانوذرات اکسید آهن (SPION) پیک در ناحیه ۵۸۴<sup>۱</sup> بیانگر ارتعاش کششی پیوند Fe-O و تشکیل ساختار کریستالی نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> است. پیک پهن در ناحیه ۳۰۰-۳۰۰۰cm<sup>-1</sup> مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H است. ارتعاش کششی در ۱۶۳۴cm<sup>-1</sup> گروه کربونیل آمیدی در گروه‌های استیل

ترنس‌فکت نشده و سلول‌های تیمار شده با naked siRNA (siRNA برهنه ضد *nef*) بود، استفاده شد. برای هر نمونه (تیمارهای نانوذره و کنترل‌ها) از سه تکرار (سه چاهک) استفاده و میانگین نتایج این سه تکرار به‌عنوان نتیجه هر تیمار در نظر گرفته شد.

به‌منظور بررسی ورود نانوذرات حامل siRNA به درون سلول‌های HEK293، جذب سلولی نانوذرات SPION-TMC توسط میکروسکوپ کانفوکال A1 (Nikon Inc.; سوئیس) مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های HEK293 در پلیت‌های شش‌خانه‌ای و در محیط کشت کامل کشت داده (۵۰ هزار سلول در هر چاهک) و یک شب در دمای ۳۷°C در اتمسفر حاوی ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با PBS شسته شدند و ابتدا به مدت یک ساعت در محیط DMEM فاقد سرم قرار گرفتند و پس از آن، نانوذرات حامل scrambled siRNA (متصل به رنگ فلورسنت TAMRA) در محیط DMEM (دارای ۲۰٪ FBS) به سلول‌ها اضافه و ۴ ساعت در دمای ۳۷°C (۵٪ CO<sub>2</sub>) انکوبه شدند. در نهایت، سلول‌ها با PBS شسته، با پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت و توسط رنگ Hoechst 33342 (به‌منظور آبی‌کردن هسته سلول‌ها) رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت توسط میکروسکوپ کانفوکال مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش مهار ژن *nef* HIV-1 توسط siRNA اختصاصی (انتقال یافته توسط نانوذرات بهینه)، توسط qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در اینجا از سلول‌های HEK293 پایدار (بیان‌کننده *nef*) استفاده شد. ابتدا سلول‌های HEK293 پایدار در یک پلیت ۶ خانه به تعداد ۱۵۰ هزار سلول در هر چاهک در محیط کشت کامل (DMEM دارای ۱۰٪ FBS) برای ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، محیط سلول‌ها تخلیه و غلظت‌های مشخصی از نانوذرات بهینه (حامل siRNA ضد *nef*) به هر چاهک اضافه شد. همچنین، گروه کنترل مثبت شامل سلول‌های تیمار شده با معرف لیپوفکتامین RNAiMAX حامل siRNA ضد *nef* بود. علاوه بر این، از دو گروه کنترل منفی شامل سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر نانوذره بهینه (حامل scrambled siRNA) و سلول‌های تیمار شده با naked siRNA (siRNA برهنه ضد *nef*) نیز استفاده شد. غلظت siRNA در همه گروه‌ها برابر با ۱۰۰ پیکومول بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. تمامی چاهک‌ها با استفاده از محیط DMEM کامل (دارای ۲۰٪ FBS) به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شدند. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت به انکوباتور (دمای ۳۷°C و ۵٪ گاز CO<sub>2</sub>) منتقل شدند و پس از آن، محیط سلول‌ها با محیط سلولی کامل (حاوی ۱۰٪ FBS) تعویض شد و سلول‌ها به مدت حدود ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفتند. در پایان، mRNA سلول‌ها استخراج شد و پس از ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (یک‌تأجیهز آرما؛ ایران)، آنالیز qRT-PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (پرایمر ۳؛ نسخه ۰/۴/۰) برای ژن *nef* HIV-1 (فروارد: 5'-CACTGACCTTTGGATGGTGCT-3 معکوس: 5'-

کیتوزان را نشان می‌دهد. در طیف FTIR ترکیب SPION-TMC، حضور پیک‌های شاخص SPION و TMC در آن بیان‌کننده پوشش‌دهی موفق نانوذرات SPION توسط پلیمر TMC است. نانوذرات SPION-TMC بارگذاری‌شده با siRNA مورد آزمون تاخیر حرکت siRNA در ژل آگارز ۲٪ قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۳ مشخص است، SPION-TMC بهینه‌شده قادر به نگهداری siRNA در ساختار خود بود و بنابراین، قابلیت انتقال مناسب siRNA توسط آنها وجود دارد.

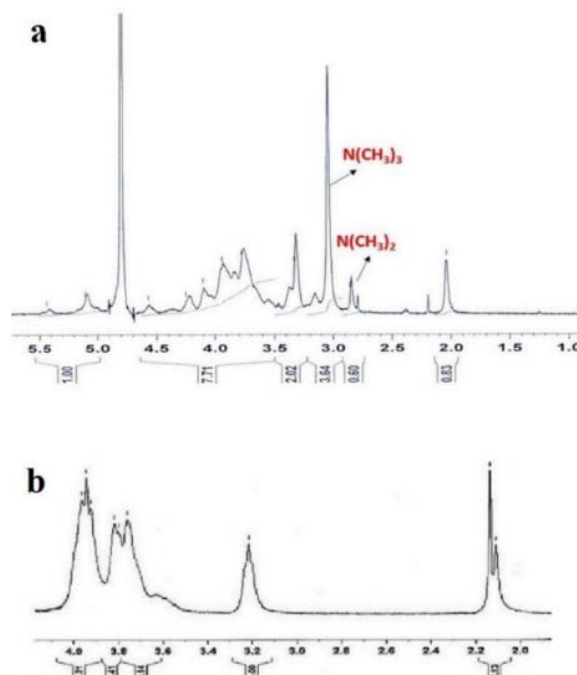


شکل ۳ آزمون تاخیر حرکت نانوذره SPION-TMC حامل siRNA در ژل آگارز ۲٪: چاهک ۱: مارکر (لدر RNA)؛ چاهک ۲: گروه کنترل فاقد نانوذره، چاهک ۳: SPION-TMC بهینه‌شده حامل siRNA

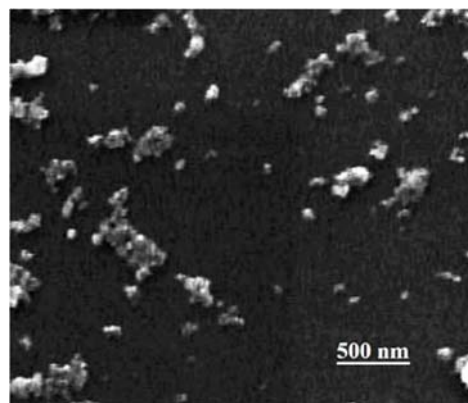
نتایج آزمون XTT (جذب نوری حاصل از الیزا ریدر) حاصل از ترنسکشن غلظت‌های مختلف نانوذره بهینه SPION-TMC حامل siRNA برای دو زمان انکوبه‌شدن ۴ و ۲۴ ساعت در نمودار ۲ آمده است. دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره بهینه SPION-TMC که در آنها بیش از ۸۰٪ سلول‌های HEK293 (برای دو زمان انکوبه‌شدن ۴ و ۲۴ ساعت) زنده مانده بودند، به‌عنوان غلظت‌های مناسب نانوذره برای سلول‌ها در نظر گرفته شدند.

بررسی ورود نانوذرات بهینه به درون سلول‌های HEK293 با کمک رنگ فلورسنت نارنجی TAMRA (در انتهای ۳' رشته سنس scrambled siRNA) انجام گرفت. بنابراین، پس از ساخت غلظت مناسب (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذره بهینه SPION-TMC (حامل scrambled siRNA)، ورود موفق آن به درون سلول‌های HEK293 در مقایسه با گروه کنترل، توسط میکروسکوپ کانفوکال مورد بررسی و تایید قرار گرفت (شکل ۴).

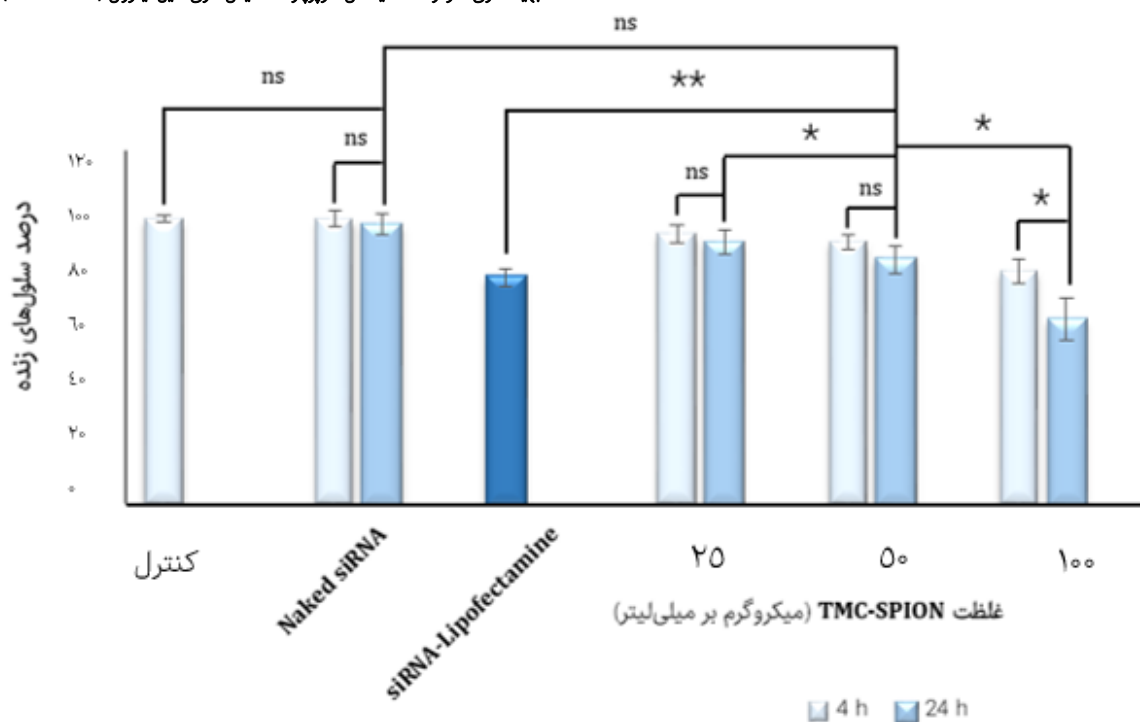
با توجه به نتایج qRT-PCR، بیان ژن *nef* (پس از نرمال‌سازی توسط ژن رفرنس *HPRT1*) در گروه‌های سلولی HEK293 پایدار تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره بهینه حامل siRNA ضد *nef*، نسبت به گروه‌های کنترل منفی (سلول‌های تیمار شده با نانوذره بهینه حامل scrambled siRNA و سلول‌های تیمار شده با siRNA برهنه ضد *nef*) کاهش معنی‌دار نشان داد ( $p < 0.01$ ؛ نمودار ۳). همچنین، محاسبات نشان دادند که میزان بیان ژن *nef* در سلول‌های پایدار تحت تیمار ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره بهینه SPION-TMC (دارای ۱۰۰ پیکومول بر میلی‌لیتر از siRNA ضد *nef*) در مقایسه با میزان بیان ژن در گروه سلولی تیمار شده با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره ذکر شده دارای تفاوت معنی‌دار بود ( $p < 0.01$ ).



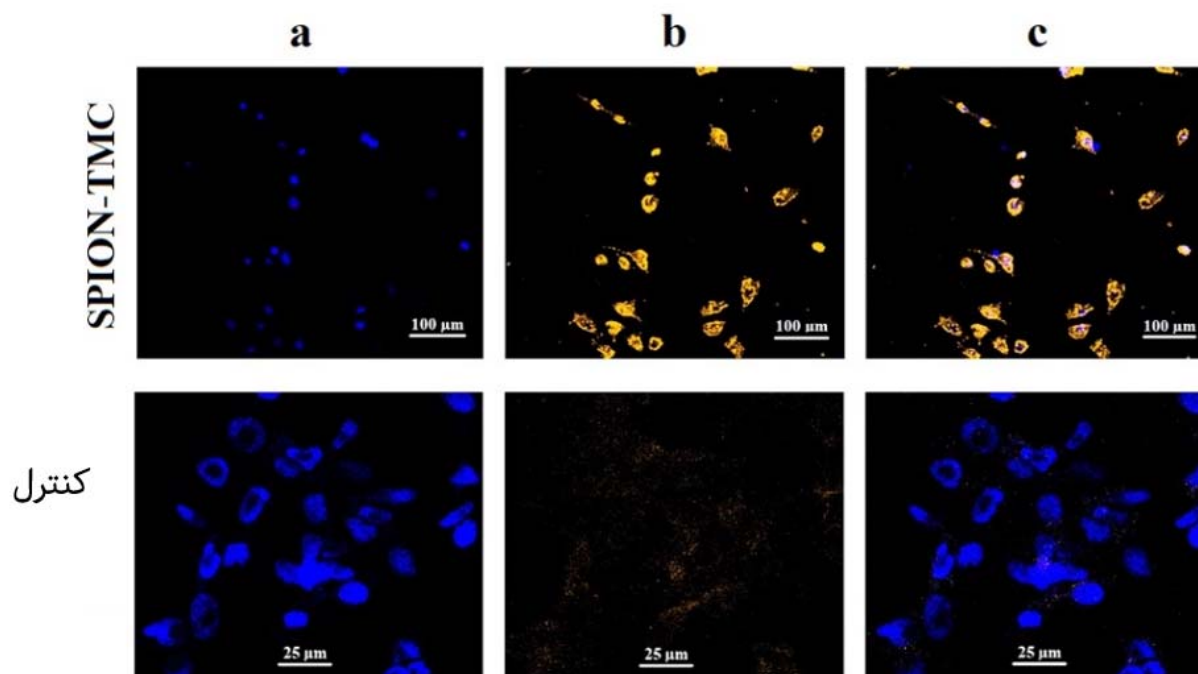
نمودار ۱) طیف HNMR از پلیمرهای TMC (a) و کیتوزان (b): a: در طیف HNMR مربوط به TMC، سیگنال‌های ۲/۸۵ و ۳/۰۶ ppm، گروه‌های  $N(CH_3)_2$  و  $N(CH_3)_3$  را نشان می‌دهند. همچنین، پیک‌ها در ۲/۰۴، ۳/۷۸-۴/۵۷ و ۵/۱۱-۵/۴۳ ppm نشان‌دهنده پروتون‌های متیل در ساختمان کیتوزان هستند. b: در طیف HNMR پلیمر کیتوزان، پیک‌های موجود در ۲/۱۱، ۲/۱۳ و ۳/۲۲ (در مقیاس ppm) و همچنین، مجموعه پیک‌ها در ۳/۴-۶/۰ ppm مربوط به هیدروژن‌های گروه‌های موجود در کیتوزان هستند.



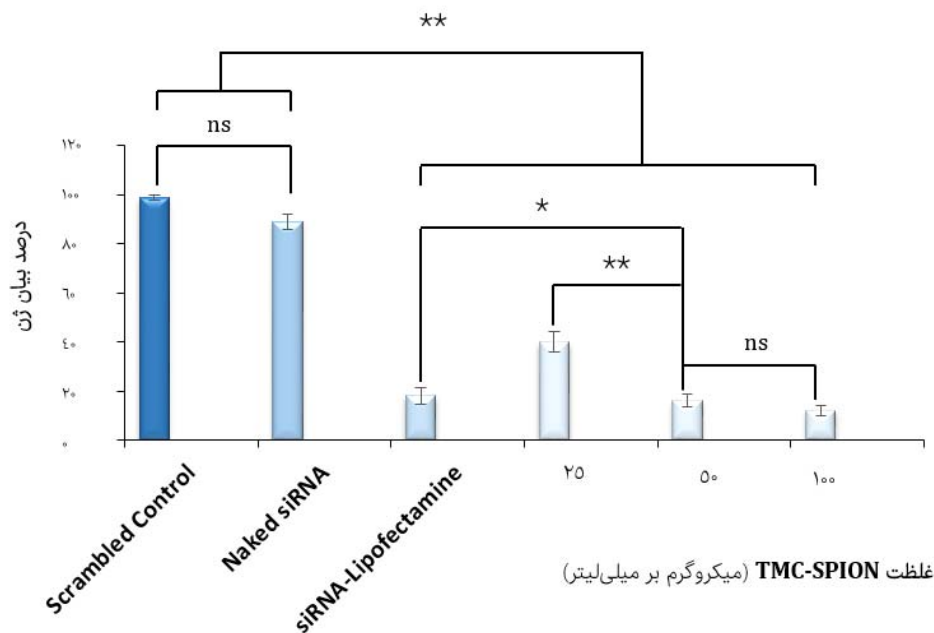
شکل ۲) تصویر SEM از نانوذرات SPION-TMC



**نمودار ۲)** میزان سمیت غلظت‌های مختلف نانوذره بهینه دارای siRNA بر روی سلول‌های HEK293 در مقایسه با گروه‌های کنترل مثبت و منفی (در دو دوره زمانی ۴ و ۲۴ ساعت): TMC-SPION: سلول‌های ترنسفکت‌شده با نانوذره بهینه حامل siRNA ضد nef; لیپوفکتامین siRNA: گروه کنترل مثبت (siRNA ضد nef ترنسفکت‌شده با کمک معرف تجاری لیپوفکتامین); Naked siRNA: گروه سلول‌های تیمار شده با siRNA برهنه ضد nef; کنترل: گروه سلول‌های تیمار نشده; ns:  $p > 0.05$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$



**شکل ۴)** تصویر میکروسکوپ کانفوکال از سلول‌های HEK293 ترنسفکت‌شده با نانوذرات بهینه متصل به رنگ TAMRA (نارنجی) پس از ۴ ساعت؛ گروه کنترل منفی (کنترل) مربوط به سلول‌های HEK293 دریافت‌کننده scrambled siRNA (دارای رنگ TAMRA) بدون استفاده از نانوذره (scrambled siRNA برهنه) است؛ a: هسته‌های سلولی رنگ شده توسط Hoechst 33342 (آبی)؛ b: سلول‌های تیمار شده با siRNA نشان‌دار شده توسط TAMRA (نارنجی)؛ c: ادغام شکل‌های a و b



**نمودار ۳)** نتایج تجزیه و تحلیل آماری qRT-PCR بیان ژن *nef* در سلول‌های پایدار HEK293 (بیان‌کننده ژن *nef*) تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره بهینه حامل siRNA ضد *nef* پس از ۴۸ ساعت؛ TMC-SPION: سلول‌های ترنسفکت شده با نانوذره بهینه حامل siRNA ضد *nef*؛ لیپوفکتامین siRNA: گروه کنترل مثبت (siRNA ضد *nef* ترنسفکت شده با کمک معرف تجاری لیپوفکتامین)؛ Naked siRNA: گروه سلول‌های تیمار شده با siRNA برهنه ضد *nef*؛ Scrambled control: سلول‌های تیمار شده با نانوذره بهینه حامل scrambled siRNA. ns:  $p > 0.05$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$

## بحث

به‌منظور مهار موثر عفونت HIV-1 علاوه بر روش‌های مرسوم (استفاده از داروهای ضد ویروسی)، توسعه روش‌های جایگزین شامل خاموش‌سازی ژن‌ها به نظر ضروری می‌رسد [14]. در این میان، کاربرد siRNA به‌دلیل مزایایی مانند اختصاصیت بالا برای ژن هدف می‌تواند برای مقابله با جهش‌های ویروسی سودمند باشد [15]. با این وجود، معایبی مانند پایداری پایین siRNA در اثر آنزیم‌های نوکلئاز موجود در سرم و همچنین میزان کم ورود آنها به درون سلول‌های هدف (به‌دلیل وجود بار منفی بالا)، کاربرد بالینی آنها را محدود کرده است [16]. بنابراین، استفاده از ناقل‌های مناسب برای حفاظت و حمل siRNA در جریان خون و ورود آن به درون سلول‌های هدف، ضروری است. در مطالعه حاضر، به‌دلیل اهمیت و نقش ژن *nef* HIV-1 در بیماری‌زایی HIV-1، این ژن با siRNA اختصاصی مورد هدف قرار گرفت و در این راستا از یک نانوذره بهینه‌شده (SPION با پوشش تری‌متیل‌کیتوزان) برای حفظ و انتقال siRNA به درون سلول‌های HEK293 پایدار (بیان‌کننده *nef*) استفاده شد. لازم به ذکر است که دلیل انتخاب رده سلولی HEK293 در این مطالعه، سهولت ایجاد سلول‌های پایدار از آنها برای بیان ژن مورد نظر بوده است که آن را مناسب تحقیقات مربوط به مهار ژن‌ها کرده است [17]. علاوه بر این، در مطالعه حاضر، استفاده از سلول‌های پایدار به جای استفاده از سلول‌های آلوده به HIV-1 (نوع وحشی) به‌دلیل اجتناب از

خطرات بالقوه احتمالی در جهت پیشبرد تحقیقات اولیه راهگشا بوده است.

در زمینه استفاده از SPION (نانوذرات اکسید آهن پارامغناطیسی)، اگرچه مزایای گوناگون کاربرد این نانوذرات در تحقیقات مشهود است ولی تکرارپذیری پایین سنتز و خاصیت انباشتگی این نانوذرات باعث محدودیت در استفاده از آنها شده است [18]. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که برای غلبه بر مشکلات فوق استفاده از پوشش‌های پلیمری طبیعی و یا سنتزی بر روی SPION می‌تواند سودمند باشد [6]. برای مثال، در مطالعه‌ای با استفاده از یک سیستم انتقال siRNA بر علیه ژن *PD-L1* (که در سرطان معده نقش دارد) بر پایه SPION با پوشش PEI (پلی‌اتیلن‌ایمین) موفق به مهار ژن فوق شدند [19]. همچنین، بهینه‌سازی SPION با گالاکتوز و پلی‌اتیلن‌ایمین منجر به ایجاد یک سیستم موفق انتقال siRNA در درمان تومور شده است [20]. در تحقیقی دیگر، پوشش SPION به وسیله ترکیبی از دکستران و تزریق آن به درون تومورهای بافت پستان در موش باعث افزایش معنی‌دار کیفیت تصاویر MRI حاصل از تومورها و در نهایت بهبود معنی‌دار فرآیند درمانی (کاهش نرخ رشد تومورها) شد [21]. علاوه بر این، تحقیقات بسیار دیگری در ارتباط با بهبود خواص SPION با کمک پلیمرهای گوناگون، به‌عنوان ناقل دارو در تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف انجام شده و یا در حال انجام است [22-26]. بنابراین در این مطالعه، به‌منظور بهینه‌سازی خواص SPION، از

نکته قابل توجه آن است که در این مطالعه، تست بررسی ترنسفکشن سلولی نانوذرات و همچنین تست بررسی خاموش سازی ژن *nef* در محیط دارای ۲۰٪ سرم انجام شد که با توجه به بازده بالای نانوذرات بهینه در انتقال siRNA به درون سلول‌ها (شکل ۴) و مهار موثر ژن هدف (نمودار ۳)، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات بهینه شده SPION-TMC دارای پایداری مناسبی بوده‌اند. ارزیابی بیان ژن توسط qRT-PCR نشان داد که غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره بهینه باعث افزایش قابل توجه ورود siRNA به درون سلول‌ها و از این طریق منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن *nef* در سطح رونویسی در مقایسه با گروه‌های کنترل از جمله در مقایسه با گروه سلول‌های تیمار شده با معرف تجاری ترنسفکشن لیپوفکتامین RNAiMAX شد. در مطالعه حاضر، اگرچه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره بهینه، مهار بالای بیان ژن *nef* مشاهده شد ولی با توجه به سمیت معنی‌دار نانوذره در این غلظت نسبت به غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از SPION-TMC برای ترنسفکشن سلولی انتخاب نشد.

### نتیجه‌گیری

غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر SPION-TMC حامل ۱۰۰ پیکومول بر میلی‌لیتر siRNA ضد *nef* می‌تواند به‌طور موثر باعث مهار بیان ژن مذکور در سلول‌های مورد بررسی شود و در عین حال برای سلول‌ها نیز غیرسمی باشد. بنابراین، این سیستم می‌تواند به‌عنوان یک روش کارآمد در انتقال siRNA به درون سلول‌های هدف (ازجمله در درمان عفونت HIV-1) مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، بررسی سودمندی این نانوذرات حامل siRNA در شرایط در محیط زنده برای اهداف بالینی ضروری است.

**تشکر و قدردانی:** بدین وسیله از تمامی همکاران و مسئولین بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران به‌دلیل حمایت و پشتیبانی ارزشمند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین، از آقای دکتر وحید / ایران‌پور مبارکه سپاسگزاری می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

**تعارض منافع:** هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** سارا کمال‌زارع (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ زهرا نورمحمدی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۸٪)؛ پونه رحیمی (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۱۸٪)؛ فاطمه اطیابی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۵٪)؛ شیوا ایرانی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛ فرناز سادات میرزآزاده تکیه (نویسنده ششم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۷٪)؛ فاطمه متقی‌طلب (نویسنده هفتم) نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲٪)

**منابع مالی:** این مطالعه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران (طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۷۷۱) انجام شده است.

پوشش کاتیونی تری متیل کیتوزان (TMC) بر روی SPION استفاده شد (از طریق نیروی الکتروستاتیک بین گروه‌های آمین با بار مثبت در TMC و نانوذرات SPION دارای بار منفی) که علاوه بر افزایش قابلیت انحلال نانوذره در آب و کاهش اثر انباشتگی SPION، باعث افزایش ظرفیت پذیرش siRNA توسط نانوذره شد<sup>[18]</sup>. در اصل، کیتوزان یک پلیمر طبیعی کاتیونی است که از استیل‌زدایی کیتین (یک پلی‌ساکارید طبیعی در پوشش سخت‌پوستان) تهیه می‌شود و به‌طور گسترده‌ای در انتقال ژن و siRNA کاربرد داشته است. این پلیمر، به واسطه گروه‌های مثبت آمین خود در محلول‌های اسیدی ضعیف (pH کمتر از ۶) محلول است و بسیار زیست‌سازگار (فاقد واکنش‌های آلرژیک و یا پس‌زدن) و زیست‌تخریب‌پذیر (قابل تجزیه به قندهای آمینی غیرسمی در بافت‌ها) است<sup>[27, 28]</sup>. در زمینه بهینه‌سازی خواص SPION با استفاده از ترکیبات گوناگون کیتوزان به‌عنوان ناقل درون سلولی، نیز پژوهش‌های فراوانی انجام شده است<sup>[29-31]</sup>. در مطالعه حاضر، نتایج تست FTIR نشان‌دهنده پوشش‌دهی موفق نانوذرات SPION توسط پلیمر TMC بود.

پتانسیل زتای محاسبه شده برای SPION-TMC برابر ۲۹+ میلی‌ولت بود که این زتای مثبت در نتیجه وجود کیتوزان در سطح نانوذرات حاصل شد. زتای مثبت و بزرگ باعث پایداری بیشتر کلویید و مانع از تجمع نانوذرات و بهبود PDI می‌شود<sup>[32]</sup>. از طرفی این بار مثبت، با واکنش با غشای منفی سلول‌ها، به انتقال نانوذره به درون سلول کمک می‌کند و به علاوه در اتصال نانوذره به پروتئین‌هایی مانند آنتی‌بادی‌ها که در اتصال هدفمند نانوذره نقش دارند نیز تاثیر مثبتی دارد<sup>[33]</sup>. با این حال، بار مثبت بسیار زیاد می‌تواند برای سلول‌ها دارای اثرات سمی نیز باشد<sup>[34]</sup>. اندازه نانوذرات بهینه SPION-TMC در تصویر SEM (نانوذره خشک‌شده بر روی لام) حدوداً برابر ۶۰ تا ۸۰ نانومتر دیده شد، در حالی که این مقدار در نتایج حاصل از DLS کمی بزرگتر (در حدود ۸۰ تا ۹۰ نانومتر) به دست آمد (شکل ۲) که این می‌تواند به‌دلیل ماهیت هیدروژلی کیتوزان باشد که در محیط‌های آبدار، با جذب آب متورم می‌شود<sup>[35]</sup>. در مجموع، اندازه کوچک (کوچکتر از ۹۰ نانومتر) به همراه پتانسیل زتای مثبت نانوذرات بهینه مورد استفاده در این مطالعه، انتقال این ساختارها را به درون سلول‌های هدف تسهیل کرد که این موضوع در تایید نتایج دیگر محققان نیز بوده است<sup>[36, 37]</sup>.

همچنین، نتایج تست XTT (نمودار ۲) حاکی از عدم سمیت قابل توجه نانوذره بهینه حامل siRNA در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای دو زمان انکوبه شدن ۴ و ۲۴ ساعت (با بیش از ۸۰٪ سلول‌های زنده) بود که نشان‌دهنده زیست‌سازگاری مناسب SPION-TMC است. نتایج پژوهش‌های گذشته نیز تاییدکننده سمیت پایین انواع نانوذرات اکسید آهن برای سلول‌های هدف بوده است<sup>[38-40]</sup>.

inhibiting migration and invasion of pancreatic tumor cells. *J Control Release*. 2015;216:78-92.

18- Sharifi S, Seyednejad H, Laurent S, Atyabi F, Saei AA, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2015;10(5):329-55.

19- Luo X, Peng X, Hou J, Wu S, Shen J, Wang L. Folic acid-functionalized polyethylenimine superparamagnetic iron oxide nanoparticles as theranostic agents for magnetic resonance imaging and PD-L1 siRNA delivery for gastric cancer. *Int J Nanomed*. 2017;12:5331-43.

20- Yang Z, Duan J, Wang J, Liu Q, Shang R, Yang X, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with polyethylenimine and galactose for siRNA targeted delivery in hepatocellular carcinoma therapy. *Int J Nanomed*. 2018;13:1851-65.

21- Yan L, Luo L, Amirshaghghi A, Miller J, Meng C, You T, et al. Dextran-benzoporphyrin derivative (BPD) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) micelles for T2-weighted magnetic resonance imaging and photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem*. 2019;30(11):2974-81.

22- Mulens-Arias V, Rojas JM, Sanz-Ortega L, Portilla Y, Pérez-Yagüe S, Barber DF. Polyethylenimine-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair in vitro and in vivo angiogenesis. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2019;21:102063.

23- Meisel CL, Bainbridge P, Mulkern RV, Mitsouras D, Wong JY. Assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticle poly (ethylene glycol) coatings on magnetic resonance relaxation for early disease detection. *IEEE Open J Eng Med Biol*. 2020;1:116-22.

24- Galli M, Rossotti B, Arosio P, Ferretti AM, Panigati M, Ranucci E, et al. A new catechol-functionalized polyamidoamine as an effective SPION stabilizer. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;174:260-9.

25- Jeon H, Kim J, Lee YM, Kim J, Choi HW, Lee J, et al. Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly for magnetically guided drug delivery system. *J Control Release*. 2016;231:68-76.

26- Thomas RG, Muthiah M, Moon M, Park IK, Jeong YY. SPION loaded poly (L-lysine)/hyaluronic acid micelles as MR contrast agent and gene delivery vehicle for cancer theranostics. *Macromol Res*. 2017;25(5):446-51.

27- Yemisci M, Caban S, Fernandez-Megia E, Capan Y, Couvreur P, Dalkara T. Preparation and characterization of biocompatible chitosan nanoparticles for targeted brain delivery of peptides. In: Skaper SD, editor. *Neurotrophic factors*. New York: Humana Press; 2018. pp. 443-54.

28- Nimesh S, Gupta N, Chandra R. Cationic polymer based nanocarriers for delivery of therapeutic nucleic acids. *J Biomed Nanotechnol*. 2011;7(4):504-20.

29- David S, Marchais H, Hervé-Aubert K, Bedin D, Garin AS, Hoinard C, et al. Use of experimental design methodology for the development of new magnetic siRNA nanovectors (MSN). *Int J Pharm*. 2013;454(2):660-7.

30- Mohammadi-Samani S, Miri R, Salmanpour M, Khalighian N, Sotoudeh S, Erfani N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. *Res Pharm Sci*. 2013;8(1):25-33.

31- Mansouri M, Nazarpak MH, Solouk A, Akbari S, Hasani-Sadrabadi MM. Magnetic responsive of paclitaxel delivery system based on SPION and palmitoyl chitosan. *J Magn Magn Mater*. 2017;421:316-25.

1- Ghane T, Zamani N, Hassanian-Moghaddam H, Beyrami A, Noroozi A. Lead poisoning outbreak among opium users in the Islamic Republic of Iran, 2016-2017. *Bull World Health Organ*. 2018;96(3):165-72.

2- Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*. 2002;83(6):1253-65.

3- Imlach S, McBreen S, Shirafuji T, Leen C, Bell J, Simmonds P. Activated peripheral CD8 lymphocytes express CD4 in vivo and are targets for infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2001;75(23):11555-64.

4- Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. *Top Antivir Med*. 2013;21(1):6-7.

5- Narute P. Insights into RNA interference as antiviral defense. *J AIDS Clin Res*. 2016;7(8):1000598.

6- Kamalzare S, Noormohammadi Z, Rahimi P, Atyabi F, Irani S, Tekie FS, et al. Carboxymethyl dextran-trimethyl chitosan coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: An effective siRNA delivery system for HIV-1 Nef. *J Cell Physiol*. 2019;234(11):20554-65.

7- Bobbin ML, Burnett JC, Rossi JJ. RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection. *Genome Med*. 2015;7(1):50.

8- Danner J, Pai B, Wankerl L, Meister G. Peptide-based inhibition of miRNA-guided gene silencing. In: Schmidt MF, editor. *Drug target miRNA*. New York: Humana Press; 2017. pp. 199-210.

9- Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2003;13(1):1-7.

10- Abdelrahman M, Eyrolles LD, Alkarib SY, Hervé-Aubert K, Djemaa SB, Marchais H, et al. siRNA delivery system based on magnetic nanovectors: Characterization and stability evaluation. *Eur J Pharm Sci*. 2017;106:287-93.

11- Williams JP, Southern P, Lissina A, Christian HC, Sewell AK, Phillips R, et al. Application of magnetic field hyperthermia and superparamagnetic iron oxide nanoparticles to HIV-1-specific T-cell cytotoxicity. *Int J Nanomed*. 2013;8:2543-54.

12- Hamman JH, Kotze AF. Effect of the type of base and number of reaction steps on the degree of quaternization and molecular weight of N-trimethyl chitosan chloride. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001;27(5):373-80.

13- Thermo Fisher Scientific. BLOCK-iT™ RNAi Designer. Online Version [software]. 2009 [cited 2018 May 10]. Available from: <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress>

14- Swamy MN, Wu H, Shankar P. Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;103:174-86.

15- Mobarakeh VI, Modarressi MH, Rahimi P, Bolhassani A, Arefian E, Atyabi F, et al. Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *Int J Biol Macromol*. 2019;129:305-15.

16- Adesina SK, Akala EO. Nanotechnology approaches for the delivery of exogenous siRNA for HIV therapy. *Mol Pharm*. 2015;12(12):4175-87.

17- Mulens-Arias V, Rojas JM, Pérez-Yagüe S, del Puerto Morales M, Barber DF. Polyethylenimine-coated SPION exhibits potential intrinsic anti-metastatic properties

subsequent immunological properties. *Mol Immunol*. 2017;91:123-33.

37- Liu X, Mo Y, Liu X, Guo R, Zhang Y, Xue W, et al. Synthesis, characterisation and preliminary investigation of the haemocompatibility of polyethyleneimine-grafted carboxymethyl chitosan for gene delivery. *Mater Sci Eng C*. 2016;62:173-82.

38- Lindemann A, Pries R, Lüdtke-Buzug K, Wollenberg B. Biological properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *IEEE Trans Magn*. 2015;51(2):1-4.

39- Nguyen VT. Magnetic polyion complex micelles as therapy and diagnostic agents [Dissertation]. Waterloo: UWSpace; 2015.

40- Hamzian N, Hashemi M, Ghorbani M, Bahreyni Toosi MH, Ramezani M. Preparation, optimization and toxicity evaluation of (SPION-PLGA)±PEG nanoparticles loaded with Gemcitabine as a multifunctional nanoparticle for therapeutic and diagnostic applications. *Iran J Pharm Res*. 2017;16(1):8-21.

32- Berg JM, Romoser A, Banerjee N, Zebda R, Sayes CM. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology*. 2009;3(4):276-83.

33- Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *Int J Nanomed*. 2012;7:2767-81.

34- Perera G, Zipser M, Bonengel S, Salvenmoser W, Bernkop-Schnürch A. Development of phosphorylated nanoparticles as zeta potential inverting systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;97(Part A):250-6.

35- Furuike T, Komoto D, Hashimoto H, Tamura H. Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids. *Int J Biol Macromol*. 2017;104(Part B):1620-5.

36- Ahmad S, Zamry AA, Tan H-TT, Wong KK, Lim J, Mohamud R. Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: A review on the cellular uptake and