

Comparison of the transfection efficiency of cationic virosome derived from vesicular stomatitis virus and the two commercial transfection reagents in HEK-293 and Vero cell lines

Delaram Ahmadi¹, Mohsen Zargar^{1*}, Mohammad Reza Zolfaghari¹, Monireh Kazemimanesh², Amir Ghaemi^{3*}

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

2. Virology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Aims and Background: Successful delivery of a gene to a target cell requires the development of a safer and more efficient gene transfer system. This study aimed to evaluate the transfection efficiency of cationic virosome derived from vesicular stomatitis virus (VSV) as a hybrid nano-carrier compared to two commercial transfection reagents including Lipofectamine™ 2000 and, GenJet™ in HEK-293 and, Vero cell lines.

Material and Methods: The transfection efficiency of VSV cationic virosome, Lipofectamine™ 2000, and GenJet™ was evaluated in HEK-293 and Vero cell lines using pEGFP-N1 plasmid transfection, fluorescent microscopy, and flow cytometry methods. Also, the toxicity of cationic virosome and commercial transfection reagents was investigated by the MTT test. The inhibitory effect of NH₄Cl on virosome transfection efficiency was analyzed by fluorescent microscopy and flow cytometry.

Results: Our findings showed that the highest level of EGFP expression was obtained in cells transfected with Lipofectamine™ 2000. Transfection efficiency was significantly increased in both cells transfected with virosome/pEGFP-N1 compared to pEGFP-N1/GenJet™ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, the results of cell viability analysis by MTT were consistent with the results obtained from the evaluation of transfection efficiency. Cells transfected with lipofectamine™ 2000 showed the highest survival rate. Cell viability was significantly higher in cells transfected with VSV cationic virosomes compared to cells transfected with GenJet™ ($P < 0.05$). The results showed that transfection was inhibited in HEK-293 cells treated with NH₄Cl.

Conclusion: VSV-derived cationic virosome containing VSV-G is an efficient hybrid nanocarrier with broad cellular tropism, which provides new insight into its application as a gene delivery system in gene therapy studies.

Keywords: Virosome, Transfection, Nanocarrier, Vesicular stomatitis virus, Gene therapy, Lipofectamine™ 2000, GenJet™, Iau Science.

Corresponding author1:

Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Corresponding author2:

Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Email 1: zargar@qom-iau.ac.ir

Email 2: ghaem_amir@yahoo.com

مقایسه بازدهی ترانسفکشن وایروزام کاتیونیک مشتق شده

از ویروس وزیکولار استوماتیتیس و دو معرف

ترانسفکشن تجاری در رده‌های سلولی HEK-293 و Vero

دلارام احمدی^۱، محسن زرگر^{۱*}، محمدرضا ذوالفقاری^۱، منیره کاظمی منش^۲، امیر قائمی^{۳*}

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

۲. بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. بخش آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تحویل موفقیت آمیز یک ژن به سلول هدف مستلزم ایجاد یک سیستم انتقال ژن ایمن تر و کارآمدتر است. این مطالعه با هدف ارزیابی کارایی ترانسفکشن وایروزام کاتیونیک مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSV) به عنوان یک نانوحامل هیبریدی در مقایسه با دو معرف ترانسفکشن تجاری از جمله لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ در دو رده سلولی HEK-293 و Vero انجام شد.

مواد و روش‌ها: بازدهی ترانسفکشن وایروزام کاتیونیک VSV، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ در دو رده سلولی HEK-293 و Vero با استفاده از ترانسفکشن پلاسمید pEGFP-N1، میکروسکوپ فلورسنت و تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، میزان سمیت وایروزام کاتیونیک و معرف های تجاری ترانسفکشن به وسیله آزمون MTT بررسی گردید. اثر مهاری NH₄Cl بر روی بازده ترانسفکشن وایروزام به وسیله میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری آنالیز گردید.

یافته‌ها: یافته‌های ما نشان داد که بالاترین سطح بیان EGFP در سلول های ترانسفکت شده با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بدست آمد. بازده ترانسفکشن در هر دو رده سلولی ترانسفکت شده با وایروزام/ pEGFP-N1 در مقایسه با pEGFP-N1/GenJet™ افزایش معنی داری داشت ($P < 0.01$ ، $P < 0.05$). به علاوه، نتایج آنالیز زنده مانی سلولی به وسیله MTT با نتایج بدست آمده از ارزیابی بازده ترانسفکشن تطابق داشت. سلول های ترانسفکت شده با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بالاترین میزان زنده مانی را از خود نشان دادند. زنده مانی سلولی در سلول های ترانسفکت شده با وایروزام کاتیونیک VSV در مقایسه با سلول های ترانسفکت شده با GenJet™ به طور قابل توجهی بالاتر بود ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که در سلول های HEK-293 تیمار شده با NH₄Cl، ترانسفکشن مهار گردید.

نتیجه‌گیری: وایروزام کاتیونیک مشتق شده از ویروس VSV حاوی VSV-G یک نانوحامل هیبریدی کارآمد با تروپیسیم سلولی وسیع است که بینشی جدید در مورد کاربرد به عنوان یک سیستم تحویل ژن در مطالعات ژن درمانی ارائه می دهد.

واژگان کلیدی: وایروزام، ترانسفکشن، نانوحامل، ویروس وزیکولار استوماتیتیس، ژن درمانی، لیپوفکتامین ۲۰۰۰، GenJet™. Iau Science

مقدمه

تحقیقات پزشکی به لطف پیشرفت در فناوری نانو به سمت فرآیند تحویل موثر ژن از طریق نانوحامل ها سوق داده شده است (۱). حامل های تحویل ژن موثرتر و ایمن تر منجر به توسعه یک روش تحویل ژن موفق می‌شوند (۲). به طور

نویسنده مسئول:

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی،

قم، ایران

۲. بخش آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع، انستیتو پاستور ایران، تهران،

ایران

پست الکترونیکی ۱: zargar@qom-iau.ac.ir

پست الکترونیک ۲: ghaem_amir@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱

غشای پلاسمایی، مثل فسفاتیدیل سرین (PS)، گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین^۵ (LDL-R) و خانواده‌های آن، احتمالاً گیرنده‌های سطحی VSV خواهند بود (۱۳، ۱۴). در نتیجه، بیان وسیع این گیرنده‌ها بر روی سطوح اکثر سلول‌ها، می‌تواند پانتروپیسم بودن VSV را توضیح بدهد (۱۳). تمامی این ویژگی‌های ذکر شده به تحویل ژن بیشتر وایروزم VSV به طیف وسیعی از سلول‌های هدف نسبت به سایر وایروزم‌ها کمک می‌کند. در مطالعه حاضر، با توجه به اهمیت روزافزون ژن درمانی برای درمان و یا جلوگیری از برخی بیماری‌ها و همچنین با هدف ارزیابی و ساخت حامل‌های تحویل ژن موثرتر و ایمن‌تر که قادر به غلبه بر موانع ناقلین ویروسی و غیر ویروسی باشند، برای اولین بار به بررسی و مقایسه بازدهی ترانسفکشن وایروزم کاتیونیک مشتق شده از ویروس VSV به عنوان یک نانوحامل سنتتیک هیبرید و دو معرف ترانسفکشن تجاری از جمله لیپوفکتامین ۲۰۰۰^۶ و GenJet™ جهت تحویل DNA پلاسمیدی (pDNA) به رده‌های سلولی HEK-293^۷ و Vero با منشاءهای مختلف پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها

معرف‌های ترانسفکشن لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA) و GenJet™ (SignaGen® Laboratories) خریداری شدند. همچنین رنگ (MTT (Sigma) Aldrich, Germany^۸ تهیه گردید. آنزیم تریپسین، محیط کشت سلولی DMEM^۹ و سرم جنین گاوی (FBS)^{۱۰} از شرکت Gibco آمریکا خریداری شدند.

کشت سلول

برای انجام این مطالعه تجربی سلول‌های کلیوی جنینی انسانی (HEK-293) و سلول‌های کلیه میمون سبز آفریقایی (Vero cells) از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده و در محیط کشت سلولی DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰ U/mL) / استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL)، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

کلی، ناقل‌های ویروسی و غیر ویروسی دو نوع اصلی سیستم‌های تحویل هستند (۳). اگرچه ناقلین ویروسی منجر به بازده ترانسفکشن و انتقال بالایی در طیف وسیعی از سلول‌ها می‌شوند، اما توسعه آن‌ها به طور قابل توجهی به دلیل کاستی‌های متعدد، از جمله ایمنی زایی و جهش القایی، متوقف می‌شود (۱، ۴). در مقابل، ناقلین غیر ویروسی به دلیل زیست سازگاری، سمیت سلولی کم، سادگی تولید انبوه و هزینه تولید کم، نظرات قابل توجهی را به عنوان جایگزین امیدوارکننده‌ای برای ناقل‌های ویروسی به خود جلب کرده‌اند. با این حال، راندمان پایین تر سیستم‌های غیر ویروسی، کاربرد آن‌ها را به عنوان ناقلین تحویل موثر محدود کرده است (۳، ۵). به منظور غلبه بر این مشکلات، توسعه سیستم‌های وایروزمی با مزایای هر دو سیستم ویروسی و غیر ویروسی می‌تواند انتخاب ایده آلی باشد (۶). وایروزم‌ها نانوحامل‌های هیبرید غیر سمی و زیست تجزیه پذیری هستند که در ساختار مشابه ویروس‌های پوشش دار اما فاقد نوکلئوکپسید هستند (۷). این وزیکول‌های تک لایه نیمه سنتتیک، که به عنوان حاملین برای مولکول‌های بیولوژیکی فعال عمل می‌کنند، می‌توانند از طریق گلیکوپروتئین سطحی غشاء خود به صورت اختصاصی به گیرنده‌های سلولی متصل و با غشاءهای هدف ادغام شوند (۸). وایروزم اولین بار توسط Almeida و همکارانش از طریق وارد کردن پروتئین‌های اسپایک ویروس آنفلوانزای تخلیص شده به درون لیپوزوم ساخته شد (۹). پس از آن، آماده سازی طیف وسیعی از پوشش‌های ویروسی از جمله ویروس آنفلوانزا^۱، Semliki Forest Virus (SFV)، ویروس سندا^۲، VSV^۳ و ویروس سیندبیس^۴ با راندمان-های متفاوت انجام شد (۹). ویروس وزیکولار استوماتیتیس یک ویروس پوشش دار متعلق به خانواده رابدوویروس‌ها است (۱۰). این ویروس پتانسیل بالقوه‌ای را در عفونت زایی به واسطه گلیکوپروتئین سطحی خود به نام Vesicular stomatitis virus (G) یا VSV-G از خود نشان می‌دهد (۱۱). همچنین، نشان داده شده است که VSV-G از طریق تغییرات کانفورماسیون قابل برگشت، در فیوژن غشائی در شرایط اسیدی دخالت دارد که پس از این فرآیند در محیط‌های خنثی، به حالت اولیه خود باز می‌گردد (۱۲). تا به امروز، تلاش‌ها برای شناسایی گیرنده‌های سلولی VSV ادامه دارد. برخی مطالعات نشان دادند که محتویات لیپیدی

⁷ Human Embryonic Kidney 293

⁸ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl tetrazoliumbromide

⁹ Dulbecco's modified eagles' medium

¹⁰ Fetal bovine serum

¹ Influenza Virus

² Sendai Virus

³ Vesicular Stomatitis Virus

⁴ Sindbis Virus

⁵ low density lipoprotein receptor

⁶ Lipofectamine™ 2000

وایروزوم کاتیونی

در این مطالعه از وایروزوم کاتیونیک مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس سنتز و تایید شده در مطالعه قبلی (۱۵) استفاده گردید.

تکثیر و استخراج پلاسمید

به منظور تکثیر پلاسمید pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, USA)، ابتدا باکتری *Escherichia coli* DH5 α (انستیتو پاستور، ایران) با استفاده از روش شوک گرمایی و به وسیله روش شیمیایی کلرید کلسیم (CaCl₂) ترانسفورم شد (۱۶). باکتری‌های ترانسفورم شده در پلیت LB Agar (Luria Bertani agar) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شده و به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از انکوباسیون، تک کلونی‌هایی از باکتری-های ترانسفورم شده در محیط کشت LB Broth (Luria Bertani Broth) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین در داخل شیکر انکوباتور به مدت ۱۶-۱۲ ساعت کشت داده شدند. در نهایت باکتری‌های رشد کرده از انکوباتور خارج شده و پس از رسوبگیری با سانتریفیوژ در دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (Qiagen, Endo-Free Plasmid Maxi Kit Germany) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد.

ترانسفکشن

در مطالعه حاضر، بازده ترانسفکشن وایروزوم کاتیونیک VSV و دو معرف تجاری ترانسفکشن لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ در دو رده سلولی HEK-293 و Vero مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن تعداد ۱۰^۵×۲۶ سلول HEK-293 و Vero در دو پلیت ۲۴ خانه و در محیط کشت سلولی DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و دی اکسید کربن ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. با رسیدن تراکم سلولی به ۷۰-۶۰ درصد، ترانسفکشن انجام شد. جهت آماده سازی کمپلکس وایروزوم/pEGFP-N1، ۵ میکروگرم از پلاسمید pEGFP-N1 با ۵ میکروگرم از وایروزوم کاتیونیک VSV در محیط کشت سلولی DMEM به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. از سوی دیگر، کمپلکس‌های لیپوفکتامین

pEGFP-N1/ GenJet™ و pEGFP-N1/۲۰۰۰ طبق

دستورالعمل سازنده آماده شدند. در مرحله بعد، محیط‌های کشت درون چاهک‌ها با ۳۰۰ ماکرولیتتر محیط کشت سلولی تازه و فاقد FBS جایگزین شده و کمپلکس‌های آماده شده به صورت قطره قطره به هر چاهک اضافه شدند. پلیت‌ها برای ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. همچنین، هر دو رده سلولی با پلاسمید pEGFP-N1 به تنهایی نیز ترانسفکت گردیدند. در این مطالعه، سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند. ۴ ساعت پس از ترانسفکشن، ۵۰۰ ماکرولیتتر از محیط کشت سلولی DMEM تازه به همراه ۱۰ درصد FBS به هر چاهک اضافه شده و پلیت‌ها برای ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند.

پس از این مدت زمان، تجزیه و تحلیل بیان EGFP در هر دو رده سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس (INVERSO TC100 Epi Fluor, UK) انجام شد. متعاقباً، سلول‌ها دو مرتبه توسط بافر فسفات سالین (PBS) ۱۱ استریل شسته شده و با آنزیم تریپسین-EDTA ۰/۲۵ درصد، تریپسینه شدند. در نهایت آنالیز کمی درصد بازده ترانسفکشن (سلول‌های GFP مثبت) هر گروه به روش فلوسایتمتری و با استفاده از دستگاه Partec Cyflow counter انجام شد. تمامی آنالیزها به صورت تکرارهای سه تایی انجام شدند.

اثر مهارکنندگی NH₄Cl بر روی بازده ترانسفکشن وایروزوم کاتیونی

NH₄Cl یک عامل لیزوزوموتروپیک شناخته شده برای جلوگیری از اسیدی شدن اندوزوم است (۱۷). به منظور بررسی اینکه آیا ترانسفکشن به واسطه وایروزوم کاتیونیک VSV وابسته به pH است یا خیر، سلول‌های HEK-293 حدود ۲۰ دقیقه قبل از ترانسفکشن با NH₄Cl ۲۰ مولار پیش تیمار شدند. یک گروه بدون تیمار نیز در این مرحله در نظر گرفته شد. ۲۰ دقیقه پس از تیمار، ترانسفکشن سلول‌های HEK-293 توسط وایروزوم کاتیونیک VSV به همان صورت که در بالا توضیح داده شد، صورت گرفت. با گذشت ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت، سلول‌ها برای ارزیابی کمی میزان بیان EGFP در

سلول‌های HEK-293 به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. هر تست به صورت تکرارهای سه تایی انجام شد.

سنجش سمیت سلولی با تست MTT

به منظور بررسی اثر وایروزم کاتیونیک VSV، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ بر رشد و تکثیر سلول‌های HEK-293 و Vero، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. اساس این روش، شکسته شدن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. در این روش، مقدار دانسیته نوری هر چاهک نشان دهنده میزان تغییر رنگ زرد به بنفش ناشی از فعالیت دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده است (۱۸). به طور خلاصه، سلول‌های HEK-293 و Vero با تراکم سلولی 3×10^4 سلول به ازای هر چاهک در دو پلیت ۹۶ خانه برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شدند. قبل از ترانسفکشن، محیط کشت سلولی داخل چاهک‌ها با ۱۰۰ ماکرولیتر محیط کشت DMEM رابطه (۱):

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول های ترانسفکت شده}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های کنترل}} = \text{درصد زنده مانی سلول}$$

GenJet™ با استفاده از پلاسمید pEGFP-N1 و بر روی دو رده سلولی HEK-293 و Vero صورت گرفت. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، ارزیابی‌های کیفی و کمی به ترتیب به وسیله میکروسکوپ فلورسنت و روش فلوسایتومتری انجام شد (شکل ۱). نتایج میکروسکوپ فلورسنت که در شکل 1A نشان داده شده است، بیان EGFP در گروه‌های ترانسفکت شده هر دو رده سلولی HEK-293 و Vero می‌باشد. با این حال، سلول‌های ترانسفکت نشده و سلول‌هایی که با پلاسمید تنها ترانسفکت شده بودند، هیچ گونه بیان EGFP از خود نشان ندادند. از سوی دیگر، درصد بیان EGFP (بازده ترانسفکشن)، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و آزمون آماری واریانس (ANOVA) و متعاقب آن تست توکی (Tukey) آنالیز گردید (شکل 1B). نتایج بیانگر تفاوت‌های آماری معنی داری بین گروه‌های ترانسفکت شده در مقایسه با گروه کنترل در هر دو رده سلولی بود: گروه کنترل و وایروزم/pEGFP-N1 ($P < 0.0001$)، گروه کنترل و pEGFP-N1/GenJet™ ($P < 0.0001$) و گروه کنترل و لیپوفکتامین pEGFP-N1/۲۰۰۰ ($P < 0.0001$) در رده سلولی

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم نسخه ۸ (Graph Pad Prism version 8.0) انجام شد. جهت بررسی و آنالیز آماری داده‌ها از روش آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) به دنبال آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post-hoc Test) و آزمون تی-استیودنت (Student t-test) استفاده گردید. کلیه نتایج بدست آمده به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) گزارش گردید. مقادیر $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ ، $P < 0.0001$ به عنوان سطح معنی داری نتایج در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

ارزیابی بازدهی ترانسفکشن

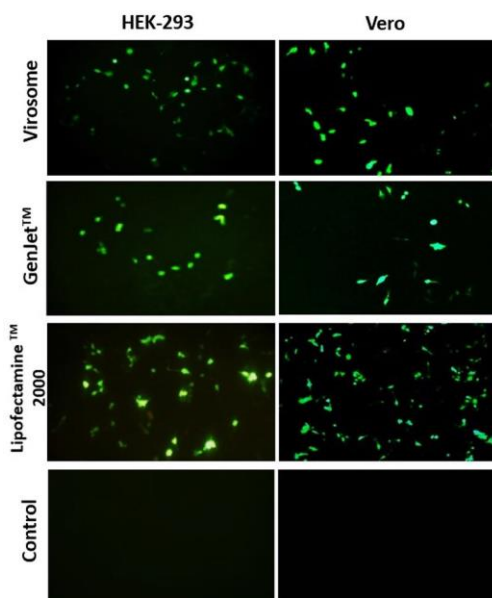
به منظور بررسی بازده ترانسفکشن وایروزم کاتیونیک VSV به عنوان یک حامل ژن هیبرید، یک مطالعه مقایسه‌ای با دو معرف ترانسفکشن تجاری لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و

Vero از خود نشان نداد ($P > 0.05$). همان طور که در شکل 1B مشخص شده است، وایروزم VSV، بازده ترانسفکشن چشمگیر بالاتری نسبت به GenJet™ در سلول‌های HEK-293 ($P < 0.05$) و Vero ($P < 0.01$) نشان داد. براساس این یافته‌ها، وایروزم کاتیونیک VSV سنتز شده در این مطالعه می‌تواند یک سیستم تحویل ژن موثر در سلول‌های با منشأ مختلف باشد. علاوه بر این، این وایروزم کاتیونیک می‌تواند یک نانوحامل قابل مقایسه با معرف‌های ترانسفکشن تجاری موجود از جمله GenJet™ باشد.

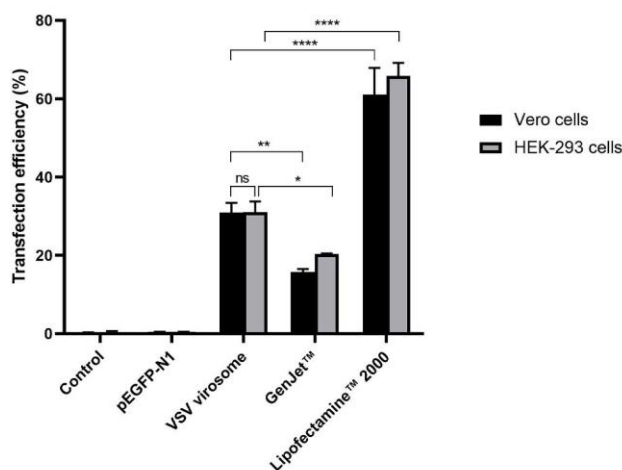
HEK-293 و همچنین گروه کنترل با وایروزم pEGFP- N1 ($P < 0.0001$)، گروه کنترل با pEGFP-N1/ GenJet™ ($P < 0.01$) و گروه کنترل با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ / pEGFP-N1 ($P < 0.0001$) در رده سلولی Vero.

نتایج مطالعه ما همچنین نشان داد که لیپوفکتامین ۲۰۰۰ منجر به بیان EGFP بالاتری در هر دو رده سلولی در مقایسه با وایروزم کاتیونیک VSV شد ($P < 0.0001$) (شکل 1B). وایروزم VSV هیچ اختلاف معنی داری را در میزان بازده ترانسفکشن دو رده سلولی HEK-293 و

(A)



(B)



شکل ۱) ترانسفکشن سلول‌های HEK-293 و Vero توسط وایروزم کاتیونیک VSV، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ پس از گذشت ۴۸ ساعت. (A) تصاویر میکروسکوپ فلورسنت، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با وایروزم کاتیونیک VSV، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™. (B) تجزیه و تحلیل فلوسایتمتری بازده ترانسفکشن وایروزم کاتیونیک VSV، لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ در دو رده سلولی HEK-293 و Vero. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن. هر ستون بیانگر میانگین و انحراف معیار در نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.0001$ ، $***P < 0.001$ ، $**P < 0.01$ ، $*P < 0.05$ بیانگر تفاوت‌های معنی دار بین گروه‌ها می‌باشند).

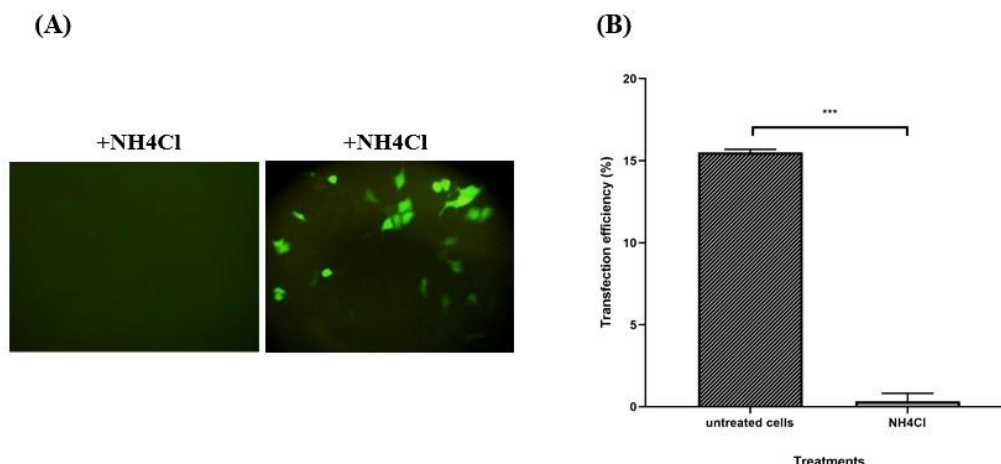
ورود ویروس‌های پوشش دار را به سلول‌های میزبان مهار می‌کند، در لیزوزوم‌ها تجمع یافته و pH داخلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۷). همان طور که انتظار می‌رفت، در طول ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با وایروزم pEGFP- N1 هیچ فلورسنسی در سلول‌های پیش تیمار شده با ۲۰ NH₄Cl میلی مولار رویت نگردید. با این حال، بیان

ارزیابی اثرات شرایط اسیدی بر بازده ترانسفکشن وایروزم

در این مطالعه به منظور بررسی اثر NH₄Cl بر روی فعالیت انتقال ژن وایروزم کاتیونیک VSV سلول‌های HEK-293، ۲۰ دقیقه قبل از ترانسفکشن با NH₄Cl ۲۰ میلی مولار تیمار شدند. این عامل اسیدی شدن اندوزومی، راه

چشمگیری بیان EGFP بالاتری را در مقایسه با سلول‌های پیش تیمار شده با NH_4Cl نشان دادند (شکل 2B) ($P < 0.001$). این داده‌ها قویا نشان می‌دهند که وابستگی فعالیت فیوژن غشایی VSV-G به pH اسیدی در تحویل کارآمد pDNA به وسیله وایروزم کاتیونیک VSV نقش بسزایی دارد.

EGFP در سلول‌هایی که با NH_4Cl تیمار نشده بودند، مشاهده شد (شکل 2A). به منظور بررسی‌های کمی بیشتر، سلول‌ها جمع‌آوری و به وسیله تکنیک فلوسایتومتری ارزیابی شدند. نتایج مقایسه بین سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده با NH_4Cl با استفاده از آزمون استیودنت تی تست (Student's t-test) در سطح $P < 0.001$ اثر معنی داری را نشان دادند. سلول‌های تیمار نشده به طور

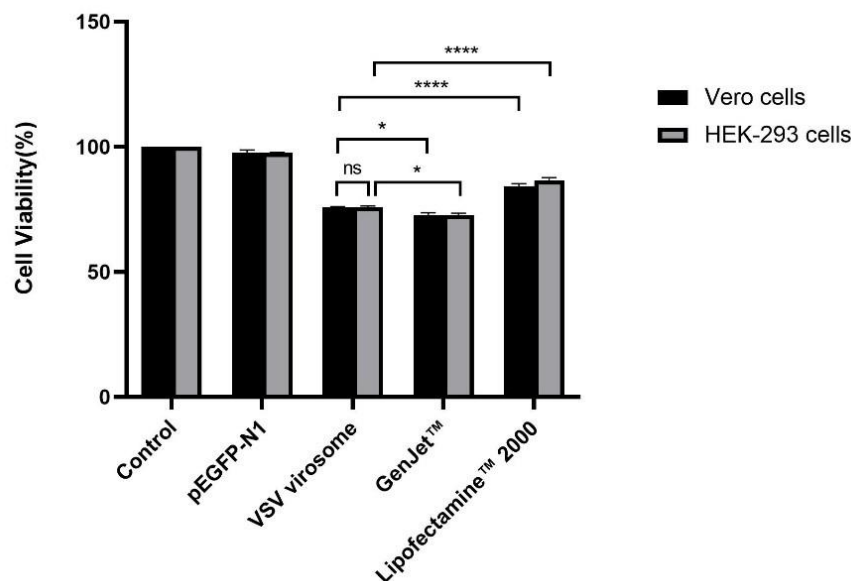


شکل ۲) تاثیر شرایط اسیدی بر بازده ترانسفکشن وایروزم کاتیونیک VSV در رده سلولی HEK-293. (A) تصاویر میکروسکوپ فلورسنت، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن رده سلولی HEK-293 تیمار شده و تیمار نشده با NH_4Cl ۲۰ میلی مولار. (B) تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری بازده ترانسفکشن در سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده HEK-293، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن به وسیله وایروزم pEGFP-N1. هر ستون بیانگر میانگین و انحراف معیار در نمونه‌ها می‌باشد. $P < 0.001$ بیانگر تفاوت آماری معنی دار بین بازده ترانسفکشن سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با NH_4Cl می‌باشد.

(P). به علاوه، درصد زنده‌مانی سلولی در گروه ترانسفکشن شده با وایروزم pEGFP-N1 به طور چشمگیری در هر دو رده سلولی در مقایسه با گروه pEGFP-N1/GenJet™ بالاتر بود ($P < 0.005$). در دو رده سلولی HEK-293 و Vero، هیچ اختلاف معنی داری بین زنده‌مانی سلول‌ها در گروه ترانسفکشن شده با وایروزم pEGFP-N1 مشاهده نشد. از سوی دیگر، سلول‌های ترانسفکشن شده با پلاسמיד به تنهایی هیچ سمیت قابل ملاحظه‌ای را نشان ندادند. در این مطالعه، زنده‌مانی سلول‌های کنترل ترانسفکشن نشده، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمون، به نظر می‌رسد که وایروزم کاتیونیک VSV سنتز شده در مقایسه با معرف‌های ترانسفکشن تجاری مانند GenJet™، یک نانوحامل ایمن و کارآمد برای سلول‌های با منشاء مختلف باشد.

ارزیابی سمیت سلولی

درصد زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 و Vero در مدت زمان ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با وایروزم pEGFP-N1، لیپوفکتامین pEGFP-N1/۲۰۰۰ و pEGFP-N1/GenJet™ با استفاده از تست MTT و آنالیز آزمون‌های آماری واریانس (ANOVA) و متعاقب آن تست توکی (Tukey) در شکل ۳ نشان داده شده است. تمام گروه‌های ترانسفکشن شده بیش از ۷۰ درصد زنده‌مانی سلولی را از خود نشان دادند. نتایج ما تفاوت‌های چشمگیری را بین تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل در هر دو رده سلولی مورد مطالعه نشان داد ($P < 0.001$). همچنین، لیپوفکتامین pEGFP-N1/۲۰۰۰ منجر به افزایش قابل توجه زنده‌مانی سلولی به نسبت وایروزم pEGFP-N1/۲۰۰۰ در هر دو رده سلولی شد ($P < 0.001$).



شکل ۳) درصد زنده‌مانی سلولی در دو رده سلولی HEK-293 و Vero. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با وایروزم/pEGFP-N1، لیپوفکتامین pEGFP-N1/۲۰۰۰ و pEGFP-N1/GenJet™ با استفاده از آزمون MTT. هر ستون بیانگر میانگین و انحراف معیار در نمونه‌ها می‌باشد. $P < 0.05$ و $****P < 0.0001$ ، بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

بحث

گیرنده‌های LDL (LDL-Rs) به عنوان گیرنده‌های VSV در نظر گرفته شده‌اند که تا به امروز بحث‌های زیادی را ایجاد کرده‌اند. در این مورد، پانتروپیسم VSV احتمالاً ناشی از بیان شایع اعضای خانواده LDL-R است (۲۳). از این رو، وایروزم کاتیونیک مشتق شده از VSV می‌تواند به عنوان یک سیستم انتقال ژن کارآمد برای انواع مختلف سلول‌ها در نظر گرفته شود. لذا در مطالعه حاضر سعی بر آن شد تا برای اولین بار بازده ترانسفکشن وایروزم کاتیونیک مشتق شده از وایروس VSV به عنوان یک نانوحامل هیبریدی جهت غلبه بر موانع ناقلین ویروسی و غیر ویروسی و دو معرف ترانسفکشن تجاری، از جمله لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ در دو رده سلولی HEK-293 و Vero با منشاء مختلف به طور مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از وایروزم کاتیونیک VSV سنتز شده در مطالعه قبل (۱۵) و معرف‌های لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و GenJet™ جهت انتقال پلاسمید pEGFP-N1 به سلول‌های هدف استفاده گردید. مطالعات متعددی در زمینه کاربرد وایروزم مشتق شده از وایروس VSV جهت انتقال موثر ژن‌های مختلف به رده‌های سلولی با منشاءهای مختلف صورت گرفته‌اند. در مطالعه Shoji و همکارانش، از VSV-G جهت آماده‌سازی وایروزم به عنوان مدلی برای انتقال pEGFP-N1 به سلول‌های BHK-21 استفاده گردید. نتایج حاصل از مطالعه آنها، بیانگر سطوح مشابهی

در میان سیستم‌های تحویل ژن مختلف، ناقلین ویروسی منجر به بازدهی ترانسفکشن بالاتری می‌شوند اما به دلیل سمیت و محدودیت‌های تولید در مقیاس بالا، هنوز هم با مشکلاتی مواجه هستند. ناقلین غیر ویروسی سمیت کمتری داشته و مقرون به صرفه‌تر می‌باشند. با این حال، بازدهی ترانسفکشن کمتری را از خود نشان داده‌اند. در نتیجه، برای غلبه بر این موانع، نیاز مبرم به توسعه سیستم‌های تحویل ژن موثرتر و ایمن‌تر در زمینه ژن درمانی وجود دارد (۲۰، ۲۱). وایروزم‌ها، غشاءهای بازسازی شده ویروس‌های پوشش دار، نانوحامل‌های هیبریدی امید بخشی هستند که ویژگی‌های ناقل‌های ویروسی و غیر ویروسی را ترکیب کرده تا به عنوان یک سیستم انتقال موثر برای انواع مختلف سلول‌ها عمل کنند. این ترجیح به دلیل توانایی اتصال طبیعی به گیرنده‌های سطح سلول، اندوسیتوز، گلیکوپروتئین‌های غشایی با خاصیت فیوژن بالا، زیست سازگاری و سمیت کم است (۲۲). در میان ویروس‌های متعدد، تروپیسم سلولی گسترده وایروس VSV به دلیل گیرنده‌های VSV-G در همه جا موجود در تمام غشاهای بیولوژیکی، آن را به یک کاندید مناسب برای سنتز یک وایروزم کاتیونیک تبدیل کرده است (۱۴). گیرنده‌های مختلفی مانند فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اینوزیتول و

ترانسفکشن، سلول‌های HEK-293 با NH_4Cl ۲۰ میلی مولار پیش تیمار شدند. نتایج ما هیچ بیان EGFP را در سلول‌هایی که از قبل با NH_4Cl تیمار شده بودند نشان نداد که این نتایج همسو با نتایج بدست آمده از مطالعه Mohammadzadeh و همکارانش بود. آنها نیز نشان دادند که در حضور NH_4Cl ، حتی ۴۵ دقیقه پس از ترانسفکشن، هیچ فلورسنتی در سلول‌های ترانسفکت شده مشاهده نشد (۲۵). همچنین در مطالعات دیگر (۱۷،۲۶)، نیز اثبات گردید که ترانسفکشن سلول‌ها توسط وایروزم، با پیش تیمار سلول‌ها به وسیله NH_4Cl ۲۰ میلی مولار مهار میگردد که این نتایج مهار اسیدی شدن اندوزوم با استفاده از NH_4Cl را تایید کرد. مقایسه بازدهی ترانسفکشن وایروزم و معرف‌های تجاری که در این مطالعه به صورت همزمان بر روی دو رده سلولی مختلف انجام شد، از جمله مزایای مطالعه ما نسبت به دیگر مطالعات ذکر شده میباشد، چرا که با این مقایسه نشان دادیم وایروزم کاتیونیک VSV با ارائه ویژگی‌های ناقلین ویروسی و غیر ویروسی به عنوان یک نانوحامل هیبریدی عمل کرده و راندمان و بازدهی ترانسفکشن قابل قبولی در مقایسه با معرف‌های تجاری موجود در بازار از خود نشان داده است. از طرفی، ارزیابی انجام شده در این مطالعه صرفاً در شرایط آزمایشگاهی (In-Vitro) و تنها با پلاسمید بیان کننده EGFP بوده است. در نتیجه مطالعات و بررسی‌های بیشتری در این زمینه در داخل بدن (In-Vivo) و با ژن‌های متعددی باید صورت پذیرد تا بتوان به یک ارزیابی کامل دست پیدا کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایشگاهی این مطالعه مقایسه‌ای شواهدی از ویژگی‌های غیر سیتوتوکسیک و کارایی وایروزم کاتیونیک VSV برای تحویل pDNA به سلول‌های با منشأ مختلف ارائه می‌کند. همچنین نتایج نشان داد که کارایی انتقال ژن وایروزم کاتیونیک VSV به طور قابل توجهی بالاتر از GenJet™ در هر دو رده سلولی بود، در حالی که لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بیشترین کارایی ترانسفکشن را در بین تمام گروه‌های مورد آزمایش نشان داد. در این مطالعه، گام مهمی در جهت توسعه یک سیستم انتقال ژن نوآورانه و ایمن برای رده‌های سلولی مختلف برداشته شده است. با این حال، ارزیابی‌های بیشتری در زمینه کاربرد وایروزم کاتیونیک VSV به عنوان یک ناقل هیبریدی جهت انتقال موثر ژن در داخل بدن مورد نیاز است.

از ترانسفکشن به وسیله وایروزم‌ها در مقایسه با لیپوزوم-های کاتیونیک (لیپوفکتامین) بود (۲۴). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Mohammadzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد، وایروزم کاتیونیک VSV جهت انتقال بکمید بیان کننده GFP به سلول‌های حشرات (Sf9) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنها قابلیت و توانایی وایروزم VSV را در انتقال pDNA به سلول حشرات نشان داد (۲۵). در مطالعه دیگری از Mohammadzadeh و همکارانش در سال ۲۰۱۶، وایروزم کایمیک آنفلوانزا حاوی VSV-G با هدف ارتقای بازده ترانسفکشن سنتز گردید. آنها از این وایروزم جهت انتقال pEGFP-N1 به رده سلولی HEK-293 استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که وایروزم کایمیک بازده ترانسفکشن بالاتری را در مقایسه با وایروزم آنفلوانزا به تنهایی از خود نشان داده است (۲۶). همراستا با مطالعات انجام شده، داده‌های حاصل از مطالعه حاضر نشان دهنده عملکرد موفق و موثر وایروزم کاتیونیک مشتق شده از ویروس VSV در انتقال pEGFP-N1 و بیان EGFP در سلول‌های با منشأ مختلف بود. بالاترین سطوح ترانسفکشن با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بدست آمد. از سوی دیگر، بیان EGFP در هر دو رده سلولی ترانسفکت شده توسط وایروزم VSV و GenJet™ به طور چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. با توجه به نتایج بدست آمده، بازده ترانسفکشن بالاتر وایروزم VSV در مقایسه با معرف تجاری GenJet™ در هر دو رده سلولی احتمالاً به دلیل وجود گیرنده‌های VSV-G در اکثر غشاهای سلولی است که به طور قابل توجهی مکان‌های اتصال وایروزم کاتیونی را افزایش می‌دهند (۲۶). علاوه بر این، VSV-G میتواند آزادسازی اندوزومی را نیز در pH اسیدی افزایش دهد (۲۷). از سوی دیگر، نتایج سنجش سمیت سلولی وایروزم/pEGFP-N1، لیپوفکتامین pEGFP-N1/GenJet™ و pEGFP-N1/۲۰۰۰ در سلول‌های HEK-293 و Vero با نتایج به دست آمده از بازدهی انتقال ژن سازگار بود. بیشترین تعداد سلول‌های زنده در سلول‌های ترانسفکت شده با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ مشاهده شد. همچنین، زنده مانی سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده با وایروزم کاتیونیک VSV در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت شده با GenJet™ به طور قابل توجهی بالاتر بود. با توجه به این یافته‌ها، وایروزم کاتیونیک VSV دارای خواص غیر سیتوتوکسیک قابل قبولی برای عمل به عنوان یک سیستم انتقال ژن هیبریدی می‌باشد. در نهایت در این مطالعه، به منظور ارزیابی بازده ترانسفکشن وایروزم در شرایط اسیدی، قبل از

منابع

1. Amani A, Kabiri T, Shafiee S, Hamidi A. Preparation and characterization of PLA-PEG-PLA/PEI/DNA nanoparticles for improvement of transfection efficiency and controlled release of DNA in gene delivery systems. *Iran J Pharm Res.* 2019;18 (1):125.
2. Yamano S, Dai J, Moursi AM. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. *Mol Biotechnol.* 2010;46 (3):287-300.
3. Asadikaram G, Poustforoosh A, Pardakhty A, Torkzadeh-Mahani M, Nematollahi MH. Niosomal virosome derived by vesicular stomatitis virus glycoprotein as a new gene carrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;534 980-7.
4. Wu P, Chen H, Jin R, Weng T, Ho JK, You C, Zhang L, Wang X, Han C. Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration. *J Transl Med.* 2018;16 (1):1-20.
5. Medina-Kauwe L, Xie J, Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* 2005;12 (24):1734-51.
6. Kalra N, Dhanya V, Saini V, Jeyabalan G. Virosomes: as a drug delivery carrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;1 (1):29-35.
7. Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Palese P, Poland GA. Current challenges in vaccinology. *FRONT IMMUNOL.* 2020;11:1181.
8. Shaikh SN, Raza S, Ansari MA, Khan G, Athar SHM. Overview on virosomes as a novel carrier for drug delivery. *J drug deliv ther.* 2018;8 (6-s):429-34.
9. Almeida J, Edwards DC, Brand C, Heath T. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet.* 1975;306 (7941):899-901.
10. Ge P, Tsao J, Schein S, Green TJ, Luo M, Zhou ZH. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science.* 2010;327 (5966):689-93.
11. Roche S, Albertini A, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65 (11):1716-28.
12. Ci Y, Yang Y, Xu C, Shi L. Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Sci Rep.* 2018;8 (1):1-11.
13. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110 (18):7306-11.
14. Hastie E, Cataldi M, Marriott I, Grdzlishvili VZ. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* 2013;176 (1-2): 16-32.
15. Ahmadi D, Zargar M, Zolfaghari MR, Kazemimanesh M, Ghaemi A. Construction of Cationic Virosome Derived from Vesicular Stomatitis Virus as a Promising Candidate for Efficient Gene Delivery to the Central Nervous System. *Neurosci J Shefaye Khatam.* 2020;8 (2):72-81.
16. Prather P, McGinn T, Claude P, Liu-Chen L, Loh HH, Law P-Y. Properties of a κ -opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual $G\alpha$ subunit and is similar to that of other opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;29 (2):336-46.
17. Ohkuma S, Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci.* 1978;75 (7):3327-31.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65 (1-2):55-63.

19. Mehrbod P, Abdalla MA, Njoya EM, Ahmed AS, Fotouhi F, Farahmand B, Gado DA, Tabatabaian M, Fasanmi OG, Eloff JN. South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18:1-10.
20. Manjila SB, Baby JN, Bijin EN, Constantine I, Pramod K, Valsalakumari J. Novel gene delivery systems. *Int J Pharm Investig*. 2013;3 (1):1.
21. Zu H, Gao D. Non-viral vectors in gene therapy: Recent development, challenges, and prospects. *The AAPS journal*. 2021;23 (4):78.
22. Cech PG, Aebi T, Abdallah MS, Mpina M, Machunda EB, Westerfeld N, Stoffel SA, Zurbriggen R, Pluschke G, Tanner M. Virosome-formulated Plasmodium falciparum AMA-1 & CSP derived peptides as malaria vaccine: randomized phase 1b trial in semi-immune adults & children. *PloS one*. 2011;6 (7):e22273.
23. Finkelshtein D, Werman A, Novick D ,Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110 (18):7306-11.
24. Shoji Ji, Tanihara Y, Uchiyama T, Kawai A. Preparation of virosomes coated with the vesicular stomatitis virus glycoprotein as efficient gene transfer vehicles for animal cells. *Microbiology and immunology*. 2004;48 (3):163-74.
25. Mohammadzadeh Y, Gholami S, Rasouli N, Sarrafzadeh S, Seyed Tabib NS, Samiee Aref MH, Abdoli A, Biglari P, Fotouhi F, Farahmand B. Introduction of cationic virosome derived from vesicular stomatitis virus as a novel gene delivery system for sf9 cells. *J Liposome Res*. 2017;27 (2):83-9.
26. Mohammadzadeh Y, Rasouli N, Aref MHS, Tabib NSS, Abdoli A, Biglari P, Saleh M, Tabatabaeian M, Kheiri MT, Jamali A. A novel chimeric influenza virosome containing vesicular stomatitis G protein as a more efficient gene delivery system. *Biotechnol Lett*. 2016;38 (8):1321-9.
27. Barsoum J, Brown R, McKee M, Boyce FM. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum Gene Ther*. 1997;8 (17):2011-8.