مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال ششم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۲

ساخت کمپلکس نانوذره ویروسی/ هرسپتین با استفاده از لینکرهای شیمیایی و ویروس ایکس سیب‌زمینی

ندا اسفندیاری*: دانشجو دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران
مینا کوهی حبیبی: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران
مسعود سلیمانی: دانشیار، گروه هماتولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
محسن کریمی ارزنانی: استادیار، گروه پزشکی مولکولی انیستیتو پاستور ایران
غلامحسین مصاحبی: استاد، گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

Archive of SID

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر نگرشی نو در جهتی غیر از بیماری زایی در ویروس‌ها سبب شد، که از این ذرات در علم نانوتکنولوژی استفاده شود. به منظور کاهش عوارض جانبی دارو و کاهش هزینه‌های درمانی، استفاده از نانوذرات در هدفمند کردن مسیر اثر دارو وارد علوم پزشکی شده و جایگاه ویژه‌ای را در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان به خود اختصاص داد. از جمله مزایای نانوذرات ویروسی می‌توان به سازگاری طبیعی، استراتژی تکثیر خودکفا و بهینه، قابلیت تجزیه و بالاخص قابلیت خالص‌سازی ارزان آن‌ها اشاره کرد. یکی از موارد استفاده از این نانوذرات ساخت کمپلکس نانوذره ویروسی/هرسپتین است. هرسپتین دارویی است که در درمان گروهی از بیماران مبتلا به سرطان پستان (+HER2) استفاده می‌شود.

روش بررسی: در این تحقیق هرسپتین با کمک لینکر شیمیایی EDC/Sulfo-NHS به نانوذرات رشته‌ای ویروس ایکس سیب زمینی متصل گردیده و نانوذره ویروسی دارویی ساخته شده با استفاده از تکنیک‌های SDS-PAGE، Western blot، ELISA، Zetasizer و میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

یافته‌ها: در آزمون SDS-PAGE و Western blot تشکیل باند ۸۲ کیلودالتون دال بر اتصال پروتئین پوششی ۲۷ کیلودالتونی ویروس ایکس سیب‌زمینی با باند سنگین آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون بود. آزمون الیزای طراحی شده اتصالات نانوذره ویروسی به آنتی‌بادی هرسپتین را نشان داد. در بررسی بار الکتریکی ذرات بوسیله دستگاه Zetasizer، ذرات کنژوگه بار الکتریکی ۷/۰۵- ، ذرات ویروس ایکس سیب‌زمینی ۲۱/۴- و هرسپتین ۱/۴۸- را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که نانوذره ویروس/ هرسپتین بعد از تهیه، ساختار رشته‌ای خود را حفظ کرد. استفاده از این ذرات قادر به کاهش دوز مصرفی دارو و در نتیجه کاهش اثرات جانبی ناشی از دارو می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، نانوذرات ویروسی، ویروس ایکس سیب‌زمینی، هرسپتین، لینکرهای شیمیایی.

*نشانی نویسنده مسئول : دانشگاه تهران، دانشکده گیاه‌پزشکی، ندا اسفندیاری.
نشانی الکترونیک: neda.esfandiari@yahoo.com

D.ir

مقدمه

نانوتکنولوژی یکی از علوم نوپایی است که جایگاه ویژه‌ای را در درمان به خود اختصاص داده است. ذرات نانویی، ذراتی با قطر ۱۰۰-۱۰ نانومتر هستند که منشا شیمیایی و یا زیستی دارند. هدف‌گیری دقیق نقطه اثر دارو، آزاد شدن کنترل شده دارو، افزایش قابلیت انحلال داروها، کاهش عوارض جانبی و سمیت دارویی، جذب بهتر، هدف قرار دادن اختصاصی بافت یا توده بدخیم، طولانی بودن مدت زمان تاثیر دارو، کاهش دفعات تجویز دارو، کاهش سمیت دارویی به دلیل نیاز کمتر به مصرف دارو و کاهش هزینه‌های درمانی از مهم‌ترین مزایای استفاده از نانوذرات در درمان است. از مهم‌ترین نانوذرات شیمیایی می‌توان به نقاط کوانتومی (Quantumdots)، وزیکول‌های پلی‌مری (PolymerVesicles)، لیپوزوم‌ها (Liposomes)، دندیمرها (Dendrimers) و پروتئین‌هایی با ساختار نانو اشاره کرد. عدم سازگاری بهینه‌زیستی و سمیت نانوذرات شیمیایی (۱۰-۱) سبب گردید که استفاده از نانوذرات زیستی مورد توجه قرار گیرد. نانوذرات ویروسی از گیاهان و یا حیوانات مشتق می‌شوند. نانوذرات ویروسی مشتق از گیاهان احتمال بیماری‌زایی کمتری را برای انسان داشته و نیز عوارض جانبی آن نسبت به نانوذرات ویروسی مشتق از حیوانات، کمتر است. تحقیقات نشان داد که می‌توان از کپسید ویروس‌های میله‌ای یا ایزومتریک با واحدهای ساختاری چند بعدی به عنوان ذرات نانوزیستی در نانوتکنولوژی دارویی استفاده کرد (۱۲ و ۱۳). نانوذرات ویروسی میله‌ای و ایزومتریک فاقد قدرت بیماری‌زایی با ساختارهای هندسی منحصر به فرد، منظم و یکنواخت به عنوان ناقلین پروتئین و یا سایر مولکول‌ها توجه محققین را به خود جلب نمود. یکی از مزایای این ساختارها اتصالات موثرتر و محکم‌تر این نانو ذرات با داروها یا سایر مولکول‌ها می‌باشد. دست‌کاری راحت ژنتیکی این ویروس‌ها سبب تولید گونه‌های جهش یافته گردیده است. در نوع جهش یافته مهندسی شده این کپسیدها لیزین و سیستئین در سطح قابل دسترس کپسید پروتئینی واقع شده و اتصال به کمک لینکرهای شیمیایی دو عملکردی هم‌سو و غیر هم‌سو (homo or hetero-biofunctional) امکان پذیر است (۱۴و۱۵). یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از نانوذرات ویروسی به جای نانو ذرات شیمیایی امکان اتصال مولکول‌ها با دقت بالا در مقیاس کم با پروتئین کپسید این ذرات است. استفاده از ذرات ویروس‌های میله‌ای شکل به دلیل دارا بودن سطح محیطی بیشتر نسبت به پارتیکل‌های ایزومتریک و همچنین پتانسیل بالا برای جایگاه‌های اتصال از توجه ویژه برخوردار بوده و بیشتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این دسته از ویروس‌ها به علت مسطح بودن ذره ویروسی، پیوندها به روش موثرتری تشکیل می‌گردند و در نتیجه حساسیت و اختصاصیت اتصال افزایش می‌یابد (۱۰).

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها بوده که تشخیص به موقع و یا زودهنگام آن درمان را امکان‌پذیر می‌نماید (۱۶). بر طبق آمار انیستیتو ملی سرطان ایالت متحده آمریکا، شیوع این سرطان در زنان یک به ازای هر هشت نفر زن است. آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین با نام تجاری تراستوزوماب در درمان نوع متاستاتیک سرطان پستان استفاده می‌شود. این دارو جهت درمان بیمارانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، که در بررسی‌های آزمایشگاهی HER2/neu بوده و میزان پروتئین her2 بالایی را دارا می‌باشند.

در این تحقیق نانوذره ویروس گیاهی به عنوان ناقل داروی هرسپتین با اهداف ذکر شده، جهت استفاده در فاز درمانی سرطان پستان در بیماران +HER2 ساخته شد. جهت ساخت این نانوذره از ویروس گیاهی رشته‌ای انعطاف پذیر(Filamentous) ایکس سیب‌زمینی (Potato virus X) با ابعاد ۱۲×۵۱۵ نانومتر و وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون (Accession no.FH461343) و لینکر شیمیایی EDC/Sulfo-NHS استفاده شد. ویروس ایکس سیب‌زمینی در راسته Tymovirales و خانواده Alphaflexiviridae و جنس Potexvirus است (۱۹-۱۷).

مواد و روش‌ها

تهیه ویروس خالص:

برگ گیاهان *N.rustica , Nicotiana glutinosa* با ویروس ایکس سیب زمینی مایه زنی شده و به مدت ۲۰-۱۵روز در گلخانه نگهداری شد. ۶۰-۵۰ گرم برگ گیاهان آلوده شده درون هاون چینی با افزودن ازت مایع

Archive of SID

خرد شد. عصاره‌گیری با افزودن ۱۲۰-۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH =۸، ۰/۱ مولار، ۲- مرکاپتواتانل ۰/۰۲، ۱۰٪ اتانل) عصاره‌گیری شد. محلول به‌دست آمده با سرعت g ۷۸۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در 4^oC سانتریفوژ گردید. به فاز رویی به دست آمده ترایتون اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در4^oC انکوبه گردید. مجدداً با سرعت g ۵۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حذف و بسته به حجم فاز روئی به دست آمده ۰/۲ مولار کلرید سدیم (Nacl) و ۴٪ پلی اتیلن گلیکول (۸۰۰۰ تا ۶۰۰۰ PEG) اضافه شده، به مدت ۱ ساعت در 4^oC انکوبه گردید. با سرعت g ۷۸۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شده و فاز روئی حذف شد. رسوب حاصل در ۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH=۸ حاوی ترایتون ۱٪ حل شده و با بالشتک سوکروز ۳۰٪ (w/v) در سرعت g ۷۲۵۰۰ به مدت ۱۵۰ دقیقه سانتریفوژ و فاز رونی حذف گردید. رسوب حاصل در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵مولار (pH= ۷/۲) حل شده و جذب ویروس در طول موج ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بعد از حصول اطمینان از کیفیت ویروس خالص شده و عدم وجود پروتئین‌های ناخواسته با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، ویروس خالص‌شده در دمای -20^oC ذخیره شد (۲۰).

اتصال آنتی بادی هرسپتین به ویروس با کمک لینکرهای شیمیایی:

آنتی بادی هرسپتین قابل تزریق از شرکت Roche، لینکر شیمیایی EDC (۱- اتیل-۳ (۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی آمید هیدروکلراید از شرکت Merck و لینکر Sulfo-NHS (Sulfo-N-hydroxysuccinimide) از شرکت Thermo خریداری شد.

به منظور بهینه‌سازی پروسه اتصال دو پروتئین هرسپتین و ویروس به لینکرهای شیمیایی، غلظت‌های متفاوت لینکرهای شیمیایی EDC و Sulfo-NHS با نسبت ۱ به ۲/۵ مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های به کار رفته در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است نتایج به دست آمده در بهینه‌سازی غلظت‌های به کار رفته با دستگاه زتاسایزر و روش وسترن بلات تائید شد. قابل ذکر است که نسبت هرسپتین به نانوذره ویروسی ۱ به ۱۰ بوده و هم‌زمان بهینه‌سازی زمان انکوباسیون لینکر و پروتئین‌های نانوذره ویروسی و هرسپتین انجام گرفت. از ۲ مرکاپتواتانل و ستون Spin Column Biogel p-10 (BioRad) به منظور توقف واکنش لینکر و نانوذره ویروسی و حذف نانوذرات و لینکرهای آزاد در مرحله اول (مرحله انکوباسیون نانوذره ویروس و لینکر) استفاده شد. در شکل شماره ۱ مراحل اتصال لینکر به ویروس و اتصال هرسپتین به آن مجموعه نشان داده شده است.

جدول ۱: مقادیر به کار رفته نانوذره ویروسی، هرسپتین و لینکرها در بهینه سازی واکنش

Herceptin	Virus	EDC linker	Sulfo NHS linker
50 µg/µl	5 µg/µl	2mM	5 mM
50 µg/µl	5 µg/µl	4 mM	10 mM
50 µg/µl	5 µg/µl	8 mM	20 mM

مراحل انجام کار:

- اضافه کردن لینکرهای EDC/Sulfo-NHS به نسبت ۱ به ۲/۵ با غلظت‌های متفاوت در زمان‌های انکوباسیون مختلف به ویروس به منظور بهینه سازی غلظت لینکرها و زمان مناسب در محیط بافری (MES M=0.1, NaCL M=0.5, pH=6)
- توقف مرحله اول واکنش با استفاده از ۲ مرکاپتواتانل و حذف لینکرها و نانوذرات آزاد با گذراندن از ستون‌های spin column Biogel P-10 (BioRad)
- اضافه کردن آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین به میزان ده برابر محصول مرحله اول (نانوذره ویروس لینکر) با زمان‌های انکوباسیون مختلف جهت بهینه سازی واکنش در محیط بافری فسفات سدیم (0.1M, NaCl 0.1M, pH=7.5)
- حذف هرسپتین‌های آزاد در محیط با گذراندن از ستون‌های spin column Biogel P-10 (BioRad)

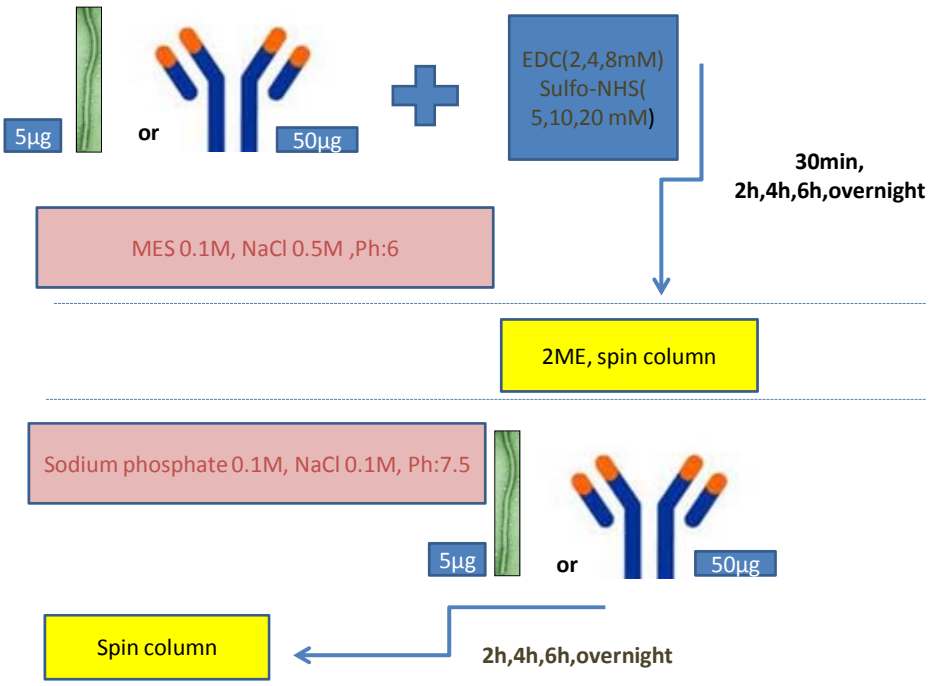
بررسی کارایی اتصال:

بررسی اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین به ذرات ویروسی PVX با استفاده از روش‌های ELISA Sandwich، SDS- PAGE، Western blot و Zetasizer انجام گرفت.

الف) ELISA: نانو پارتیکل‌های ساخته شده به وسیله آزمون الیزای ساندویچی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. الیزا به گونه‌ای طراحی گردید که آنتی بادی اختصاصی

Archive of SID

www.SID.ir

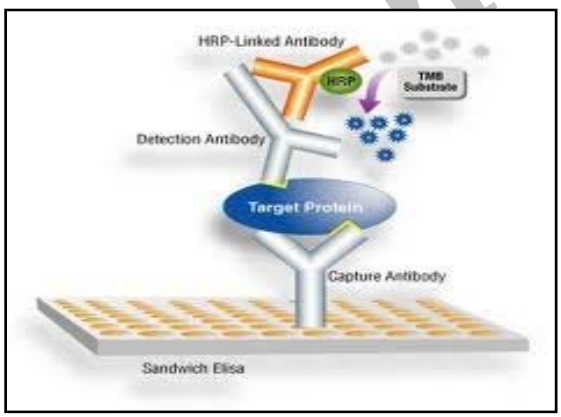


شکل ۱: مراحل گنژوگه شدن نانوذره ویروسی و آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین با استفاده از لینکرهای EDC/Sulfo-NHS در محیط بافری. زمان‌های انکوباسیون و غلظت‌های متفاوت لینکرهادر شکل نشان داده شده است.

ویروس PVX (DSMZ,PV-0027) با غلظت ۱:۱۰۰۰ در بافر پوشش (pH=۹/۶) در کف پلیت الیزا ۹۶ خانه‌ای (Nunk Denmark) پوشش داده شده و آنتی بادی‌هایی که به ته چاهک نچسبیده بودند با شستشو حذف شد. فضاهای خالی بین آنتی‌بادی‌های چسبیده به ته چاهک با استفاده از ۲٪ PVP و ۱/۵٪ BSA در بافر PBST. بلوکه گردید. نانوذرات ویروسی حاوی مولکول‌های هرسپتین که در مرحله قبل ساخته شده بود به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. نانوذرات ویروسی متصل به هرسپتین آزادی که به آنتی-بادی پوشش داده شده در کف خانه‌ها متصل نشده بودند با شستشو حذف شد.

آنتی بادی پلی کلونال ثانویه انسانی متصل به HRP (secondary antibody to Goat polyclonal human IgG-HRP) ساخت شرکت abcam با غلظت ۱:۲۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شده و مدت یک ساعت انکوبه شد. آنتی‌بادی پلی‌کلونال ثانویه انسانی آزاد با شستشو حذف شد.

سوبسترای TMB (Tetrametyhl Benzidine, Sigma) اضافه گردید و پس از گذشت مدت زمانی واکنش با اضافه کردن بافر متوقف کننده که حاوی اسید کلریدریک است توقف واکنش انجام شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام گرفت. مراحل انجام الیزا ساندویچی در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: تصویر شماتیک اساس کار ساندویچ الیزا

ب) ژل SDS- PAGE و Western blot: SDS- (Ready Gel Tris-Hcl gel-161-1394) 8%-16% Biorad PAGE به صورت آماده از شرکت Biorad خریداری شد. نمونه‌های گنژوگه شده ویروس/ هرسپتین، هرسپتین (به‌عنوان کنترل)، ویروس (به‌عنوان کنترل) و مارکرپروتئینی (prestained

www.SID.ir

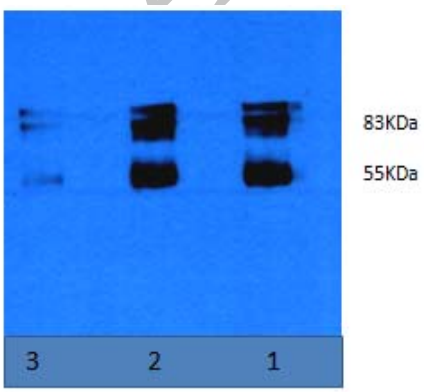
protein ladder, Thermo) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت زمان ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. الکتروفورز نمونه‌ها هم-زمان بر روی دو ژل با شرایط کاملا یکسان صورت گرفت. عمل انتقال باندهای پروتئینی الکتروفورز شده از داخل ژل‌های SDS-PAGE به غشاهای نیتروسلولزی با ولتاژ ۳۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۹۰ دقیقه در بافر مخصوص انتقال انجام گرفت. از رنگ Panceau S جهت رنگ‌آمیزی غشاهای نیترو سلولزی و قابل رویت شدن باندهای پروتئینی استفاده شد. بعد از حصول اطمینان از وجود باند پروتئنی مورد نظر، رنگ بری به وسیله بافر انتقال صورت گرفته و غشاها با استفاده از شیر خشک بدون چربی و بافر PBS در دمای محیط بلوکه شد. یکی از غشاهای نیتروسلولزی حاوی باندهای نانوذره ویروسی/ هرسپتین، نانوذره ویروسی و هرسپتین با آنتی بادی اختصاصی ویروس PVX (DSMZ,PV-0027) (غلظت ۱:۵۰۰) در طول یک شب مجاور گردید. این آنتی‌بادی قدرت اتصال به نانوذرات ویروسی با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون و نانوذرات ویروسی/هرسپتین با وزن مولکولی ۸۳ کیلودالتون را دارا است. به منظور قابل رویت کردن باندها ازآنتی بادی ثانویه خرگوشی متصل به HRP (Goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG-HRP) ساخت abcam با غلظت ۱:۲۰۰۰ استفاده شد. باندهای اختصاصی نانوذره ویروسی (۲۷کیلودالتون) و نانوذره ویروسی/ هرسپتین (۸۳ کیلودالتون) با استفاده از کیت سوبسترای تجاری ECL مورد شناسایی قرار گرفت. مشاهده نتیجه آزمایش با قرار گرفتن غشا روی فیلم عکاسی به مدت یک دقیقه و ظهور فیلم انجام شد. غشا نیتروسلولزی حاوی باندهای نانوذره ویروسی/ هرسپتین، نانوذره ویروسی و هرسپتین با آنتی‌بادی اختصاصی انسانی متصل به HRP (ساخت شرکت abcam) (غلظت ۱:۱۵۰۰۰) به مدت ۲ ساعت مجاور شد. این آنتی‌بادی قابلیت اتصال به مولکول هرسپتین با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون و نانوذره ویروسی/هرسپتین با وزن مولکولی ۸۳ کیلودالتون را دارا است. رنگ آمیزی با کیت ECL انجام گرفته و باندها با قرار گرفتن غشا روی فیلم عکاسی به مدت یک دقیقه و ظهور فیلم قابل رویت شدند.

ج) مشاهده با میکروسکوپ الکترونی: به منظور مشاهده ساختارهای دست نخورده نانوذرات ویروس رشته‌ای با ابعاد ۱۲×۵۱۵ پس از سپری شدن پروسه‌های کنژوگاسیون، از محلول اورانیل استات ۱٪ استفاده شد. ۴ میکرولیتر از محلول اورانیل استات ۱٪ به هم حجم آن از سوسپانسیون نمونه حاوی نانوذرات ویروسی/هرسپتین اضافه گردیده و بر روی گرید میکروسکوپ الکترونی انتقال داده شد. بعد از خشک شدن نمونه، گرید در زیر میکروسکوپ الکترونی 80 VJEM 1010 TEM (DSMZ,Germany) مورد بررسی قرار گرفته و عکس‌برداری شد.

چ) zetasizer: از دستگاه زتاسایزر Malvern, NanoS ZEN 3600 به منظور بررسی بار الکتریکی و اندازه ذرات در رنج ۰/۶ نانومتر تا ۶ میکرون استفاده می‌شود. از این دستگاه در سنجش بار الکتریکی نانوذرات ویروسی/ هرسپتین، هرسپتین و نانوذرات ویروسی استفاده شد. قابل ذکر است که اندازه‌گیری بار الکتریکی نانوذرات/هرسپتین در بهینه‌سازی غلظت لینکرهای EDC/ Sulfo- NHS با نسبت ۱ به ۲/۵ نیز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

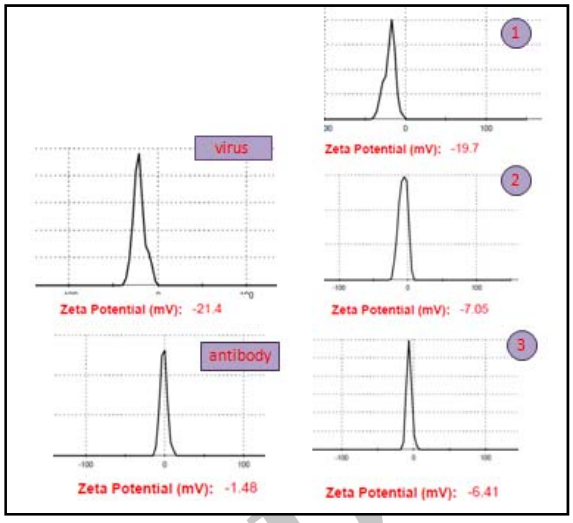
نانوذره ویروسی تخلیص شده از برگ‌های آلوده با استفاده از SDS- PAGE مورد بررسی قرار گرفت که باندی معادل ۲۷ کیلو دالتون را نشان داد. این وزن معادل وزن مولکولی پوشش پروتئینی این ویروس است. در بررسی غلظت مناسب لینکر و مدت زمان مناسب انکوباسیون لینکر و نانوذره ویروسی، وسترن بلات و بررسی بار الکتریکی با دستگاه زتاسایزر انجام شد. نتایج وسترن بلات نشان داد که نسبت غلظت مناسب EDC/Sulfo-NHS معادل ۴/۱۰ است که در شکل‌های ۳ تا ۵ نشان داده شده است.



شکل ۳: تصویر به دست آمده از وسترن بلات با آنتی‌بادی انسانی به منظور تعیین غلظت بهینه EDC/Sulfo-NHS. ردیف ۱ EDC/Sulfo-NHS معادل ۲ به ۵، ردیف ۲ معادل ۴ به ۱۰ و ردیف ۳ معادل ۸ به۲۰ است.

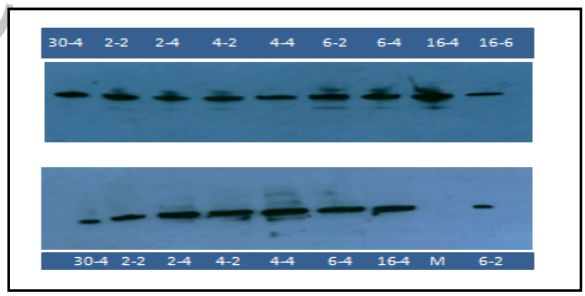
Archive of SID

www.SID.ir



شکل۴: تعیین بار الکتریکی ذرات به کمک دستگاه زتاسایزر به منظور تعیین غلظت بهینه EDC/Sulfo-NHS

۱: غلظت EDC/Sulfo-NHS معادل ۲ به ۵ با بار التریکی ۱۹/۷- (SD= ۱/۰۴)، ۲: معادل ۴ به ۱۰ با بار الکتریکی ۷/۰۵- (SD=۰۱/۰۳)، ۳: معادل ۸ به ۲۰ با بار التریکی ۶/۴۱- (SD=۰/۲۶) است. بار التریکی آنتی‌بادی هرسپتین و ویروس به تنهایی، به ترتیب ۱/۴۸- (SD=۰/۳۰) و ۲۱/۴- (SD= ۱/۳۲) به‌دست آمد.



شکل۵: بهینه سازی مدت زمان انکوباسیون مرحله اول و دوم اتصال لینکر EDC/Sulfo-NHS با استفاده از تکنیک وسترن بلات در زمان‌های مختلف که زمان مرحله اول از مدت زمان انکوباسیون مرحله دوم با خط تیره جدا گردیده است.

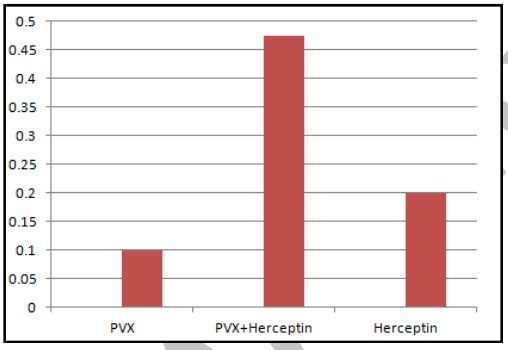
ردیف بالا وسترن بلات نانوذره-لینکر با آنتی‌بادی انسانی در زمان‌های مختلف انکوباسیون مرحله اول و دوم را نشان می‌دهد. ردیف پائین وسترن بلات نانوذره-لینکر با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس می باشد.

در بررسی بار الکتریکی هرسپتین و نانو ذرات ویروسی با زتاسایزر، بار الکتریکی هرسپتین ۱/۴۸- (با ضریب خطا۰/۳۰) و بار الکتریکی نانوذرات ویروسی ۲۱/۴- (با ضریب خطا ۰/۳۲) به دست آمد، در حالی‌که بار الکتریکی نانوذره ویروسی/هرسپتین بسته به غلظت هر کدام از لینکرها با حفظ نسبت ۱(EDC) به ۲/۵-Sulfo) (NHS، بارهای الکتریکی متفاوتی را نشان داد که در جدول شماره ۲ آورده شده است. گراف‌های به دست آمده از دستگاه زتاسایزر در شکل ۴ نشان داده شده‌است.

جدول ۲: بارالکتریکی کنژوگه نانوذره ویروسی/ هرسپتین با غلظت‌های مختلف لینکر در بررسی با دستگاه زتاسایز

بار الکتریکی	EDC/ Sulfo-NHS
-۱۹/۷	۲/۵
-۷/۰۵	۴/۱۰
-۶/۴۱	۸/۲۰

خوانش الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر صورت گرفت. در آزمون الیزای ساندویچی چاهک‌هایی که حاوی کنژوگه نانوذره ویروسی/ هرسپتین بودند جذب نوری بالاتری را در مقایسه با کنترل‌های هرسپتین و ویروس به تنهایی نشان دادند که در نمودار شماره ۱ آورده شده است.

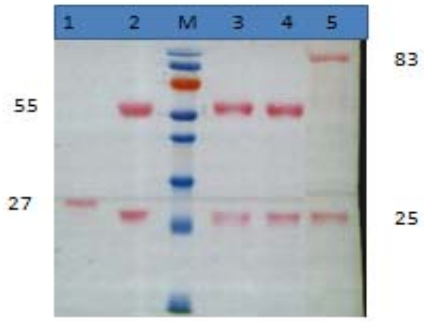


نمودار ۱: نتایج آزمون آلیزا. ستون اول بیانگر جذب ویروس به تنهایی، ستون دوم کمپلکس نانوذره ویروس/هرسپتین و ستون سوم هرسپتین به تنهایی است.

در نتایج آزمون SDS-PAGE با استفاده از رنگ آمیزی پانسیو-اس در چاهک مربوط به هرسپتین دوباند ۲۵ کیلودالتون و ۵۵ کیلودالتون دیده شد که بیانگر حضور زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین بود. در چاهک مربوط به ویروس تخلیص شده از برگ‌های آلوده (ویروس خالص) باند ۲۷ کیلودالتونی مربوط به پوشش پروتئینی ویروس دیده شد. در چاهک حاوی کنژوگه نانوذره ویروس/ هرسپتین باند ۸۳ کیلودالتون

Archive of SID

دیده شد. این باند بیانگر اتصال پوشش پروتئینی ویروس با زنجیره سنگین آنتی‌بادی هرسپتین است. نتایج SDS-PAGE در شکل شماره ۶ نشان داده شده است.



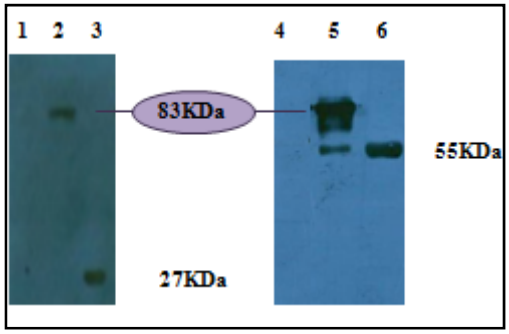
شکل۶: اتصال و تغییر وزن پروتئین‌ها در ژل-SDS PAGE با استفاده از رنگ‌آمیزی پانسیو اس

ردیف ۱: پوشش پروتئینی ویروس خالص با وزن مولکولی ۲۷ کیلو دالتون.

ردیف‌های ۴،۳،۲: آنتی بادی مونوکلونال هرسپتین که شامل زنجیره سنگین با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون و زنجیره سبک با وزن ۲۵ کیلودالتون.

ردیف ۵: ویروس کنژوگه شده با هرسپتین و مشاهده باند ۸۳ کیلودالتون.

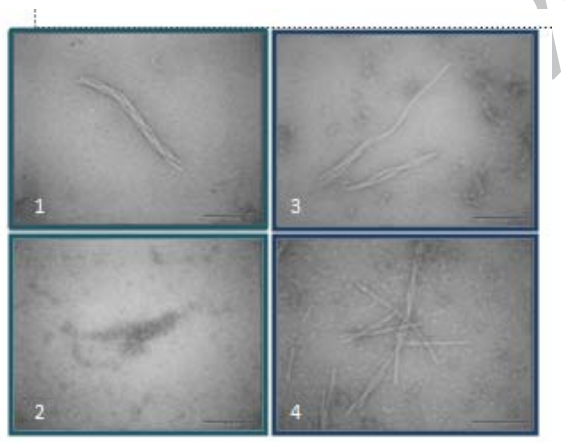
نتایج به دست آمده از وسترن بلات دو غشا نیتروسلولزی دقیقا با نتایج حاصل از SDS-PAGE هم‌خوانی داشت. وسترن بلات غشا نیتروسلولزی که در معرض آنتی‌بادی انسانی قرار گرفته بود، در چاهک مربوط به هرسپتین باند ۵۵ کیلودالتون و در چاهک مربوط به کنژوگه نانوذره/ هرسپتین باند ۸۳ کیلودالتون را نشان داد. وسترن بلات غشا نیتروسلولزی که در معرض آنتی‌بادی اختصاصی ویروسی قرار گرفته بود. در چاهک مربوط به ویروس خالص باند ۲۷ کیلودالتون و در چاهک مربوط به کنژوگه نانوذره ویروسی/ هرسپتین باند ۸۳ کیلودالتون نشان داد. نتایج حاصل از وسترن بلات در شکل شماره ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷: تصویر به‌دست آمده از آزمون وسترن بلات

شکل سمت چپ با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس و سمت راست با آنتی‌بادی انسانی: چاهک ۱ مربوط به هرسپتین خالص که با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس باندی مشاهده نمی‌شود. چاهک ۲ ویروس کنژوگه شده با هرسپتین با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ایکس سیب‌زمینی و مشاهده باندی معادل ۸۳ کیلودالتونی مشابه وسترن بلات با آنتی‌بادی انسانی. چاهک ۳ ویروس خالص شده ایکس سیب‌زمینی و مشاهده تک باند معادل ۲۷ کیلودالتون که موید وزن پوشش پروتئینی این ویروس است. چاهک ۴ ویروس خالص که در برخورد با آنتی‌بادی انسانی باندی مشاهده نمی‌شود. ردیف ۵ ویروس کنژوگه شده با هرسپتین و مشاهده باند ۸۳ کیلودالتونی ناشی کنژوگه شدن ویروس و هرسپتین. باند ۵۵ کیلودالتونی مربوط به زنجیره سنگین آنتی‌بادی با مقدار بسیار کمتر از ۸۳ کیلودالتونی در محیط مشاهده می‌شود. چاهک ۶ آنتی‌بادی هرسپتین به تنهایی. این آنتی‌بادی فقط قادر به شناسایی زنجیره سنگین است بنابراین در وسترن بلات فقط باند ۵۵ کیلودالتونی از هرسپتین قابل جداسازی است.

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که ساختار ویروس میله‌ای ایکس سیب‌زمینی بعد از کنژوگه شدن با هرسپتین با استفاده از لینکرهای شیمیایی، همچنان محفوظ باقی ماند. نتایج حاصل از این بررسی در شکل ۸ آورده شده است.



شکل ۸:

۱: مرفولوژی نانو ذره ویروس با استفاده از میکروسکوپ TEM و مشاهده پیکره رشته‌ای ویروس ایکس سیب زمینی با اندازه ۵۱۵×۱۲نانومتر.

۲: عکس مولکول‌های هرسپتین.

۴ و ۳: نمونه‌های حاصل از کنژوگاسیون ویروس و هرسپتین و مشاهده حفظ ساختار ذرات میله‌ای ویروس پس از کنژوگه شدن.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

دارودرمانی یکی از مهم‌ترین مسائلی است که از دیرباز توجه دانشمندان و محققان را به خود جلب نموده است. هزینه‌های بالای درمانی ناشی از مصرف زیاد دارو از یک سو و عوارض جانبی مصرف دارو از سویی دیگر محققان را بر آن داشت تا با هدف‌گیری موثر دارو بر روی نقطه مورد نظر از مصرف دارو بکاهد. در این میان نقش حاملین یا ناقلین دارو که خود بر روی سلول‌های انسانی عوارض و یا بیماری نداشته باشند احساس شد. علم نانوتکنولوژی روزنه امیدی در درمان ایجاد کرد. ساخت نانوذرات شیمیایی و یا کشف نانوذرات بیولوژی مانند ویروس‌های گیاهی، اتصال دارو با واسطه لینکر شیمیایی به نانوذره مربوطه و استفاده از کمپلکس ایجاد شده در هدف‌گیری موثر درمان سبب کاهش بسیاری از عوارض جانبی داروها گردید.

آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین قابلیت شناسایی و اتصال به رسپتورهای سطحی سلول‌های HER2+ سرطان پستان را دارا است و لذا از آن در درمان این نوع از سرطان استفاده می‌شود. هدف‌گیری هم‌زمان مولکول‌های هرسپتین متصل شده بر روی نانوذره ویروس نه تنها سبب کاهش دوز مصرفی مورد نیاز در درمان شده بلکه پایداری هرسپتین به دلیل کاهش تجزیه شدن آن را نیز افزایش می‌دهد. مهم‌ترین نتیجه به دست آمده در هدف‌گیری موثر دارو علاوه بر کاهش هزینه‌های درمانی، کاهش عوارض جانبی دارو است.

علی‌رغم گزارش لوئیس و همکاران در سال ۲۰۰۶ مبنی بر سمیت آدنوویروس برای سلول‌حیوانی (۱۱)، یوکیانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ از نانوذره ویروسی آدنوویروس ولینکر EDC/Sulfo-NHS برای اتصال هرسپتین به آن استفاده کردند (۲۱). استینمتز و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ویروس رشته‌ای ایکس سیب‌زمینی به عنوان نانوذره استفاده کرده و نشان دادند که تعداد مولکول‌های فلورسانس متصل شده به سطح خارجی کپسید ویروسی افزایش یافته است (۲۲). آنان این خصوصیت را ناشی از سطح صاف پیکره ویروس رشته‌ای ایکس سیب‌زمینی در مقایسه با ویروس‌های ایزومتریک مانند ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی دانستند. این گروه با تحقیقات خود نشان دادند که در ویروس‌های رشته‌ای و یا میله‌ای شکل به دلیل وجود پیکره‌ای باسطح صاف نسبت به ویروس‌های ایزومتریک نه تنها امکان اتصال افزایش می‌یابد بلکه پیوندها نیز موثرتر خواهد بود.

مکانیسم اثر لینکرهای EDC/Sulfo-NHS اتصال عامل آمین به عامل کربوکسیل است. در این تحقیق از لینکر ذکر شده استفاده شد تا عامل کربوکسیل زنجیره سنگین هرسپتین به عامل آمین نانوذره ویروسی ایکس سیب-زمینی اتصال داده شود. لینکرهای شیمیایی EDC/Sulfo-NHS با غلظت ۴ به ۱۰ و مدت زمان چهار ساعت در مرحله اول (انکوباسیون ویروس و لینکر) و دو ساعت (انکوباسیون ویروس- لینکر و هرسپتین) جهت اتصال مولکول‌های آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین به کپسید نانوذرات رشته‌ای ویروس ایکس سیب‌زمینی استفاده گردید. نسبت غلظت لینکر EDC به Sulfo-NHS، ۱ به ۲/۵ بود (۲۳). مقدار لینکرهای به کار گرفته شده با حفظ نسبت غلظت آنها و مدت زمان به کار رفته جهت اتصال هرسپتین به نانوذره ویروس رشته‌ای سیب-زمینی برای اولین بار در این تحقیق انجام گرفت. انتخاب غلظت ۴ به ۱۰ لینکرهای EDC/Sulfo-NHS بر اساس نتایج زتاسایزر و وسترن بلات آورده شده در نتایج انتخاب گردید. در بررسی نتایج وسترن بلات، باندهای نمایان شده در رقت اول و دوم سریالی تفاوتی نشان نداد در حالی‌که در نتایج زتا سایزر رقت سریالی دوم و سوم تفاوت چندانی نداشتند. با مقایسه این دو نتیجه ترجیح داده شد که از رقت سریالی دوم با نسبت ۴ به ۱۰ استفاده گردد.

به منظور بررسی خاصیت بیماری‌زایی کمپلکس نانوذره ویروس/هرسپتین در گیاه N. rustica، کمپلکس حاصله بر روی برگ گیاه محک N. rustica تلقیح شد. پس از گذشت ۲۰-۱۵ روز هیچ‌گونه علائم بیماری ویروسی در این گیاه مشاهده نگردید. این احتمال وجود دارد که به دلیل پوشیده شدن سطح ویروس با لینکرهای متصل به ذرات هرسپتین RNA ویروسی در داخل کپسید محبوس شده که حاصل آن عدم امکان تکثیر ویروس و انتقال آن به سلول‌های مجاور می‌باشد. بررسی بیماری‌زایی نانوذره ویروس گیاهی بعد از اتصال آن به لینکرها بر روی گیاهان تاکنون گزارش نشده است.

ویروس به کار رفته در این تحقیق ویروس رشته‌ای خمش‌پذیر سیب‌زمینی که از گیاه نخودفرنگی در سال ۲۰۰۷ توسط اسفندیاری و همکاران برای اولین بار گزارش

Archive of SID

شده بود استفاده گردید (۲۴). این ویروس شامل ۱۲۷۰ زیر واحد پروتئینی به وزن ۲۷ کیلودالتون است. جهت بررسی تاثیر تقدم و تاخر اضافه کردن نانوذره ویروس و هرسپتین به لینکر شیمیایی، وسترن بلات‌های کمپلکس نانوذره ویروسی/ هرسپتین حاصل از ویروس- لینکر- هرسپتین و هرسپتین- لینکر- ویروس با هم مقایسه شد که باندهای حاصله تفاوتی را نشان نمی‌داد. زتا سایزر و آزمون الیزای ساندویچی برای بررسی دو کمپلکس فوق انجام نشد اما بنا به آگاهی از ساختار آنتی‌بادی‌های مونوکلونال لذا ترجیح داده شد که جهت تشکیل کمپلکس نانوذره ویروس/ هرسپتین ترتیب ورود مولکول‌ها به صورت ویروس- لینکر- هرسپتین باشد.

از کمپلکس ویروس-گلوتارآلدئید-هرسپتین به عنوان کنترل استفاده شد. گلوتارآلدئید لینکر شیمیایی بوده که سبب اتصال پایانه‌های آمین می‌شود. این اتصالات غیراختصاصی سبب تشکیل باند پروتئینی سنگینی در ژل SDS-PAGE شده که با توجه به مکانیسم عمل گلوتارآلدئید این نتیجه قابل پیش‌بینی بود.

از آنجایی‌که آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین قابلیت شناسایی و اتصال به رسپتورهای سطحی سلول‌های +HER2 سرطان پستان را دارا هستند اتصال چندین مولکول هرسپتین به نانوذره ویروسی به واسطه لینکرهای شیمیایی سبب هدف‌گیری و جذب هم‌زمان تعداد زیادی از مولکول‌های هرسپتین متصل به پیکره ویروس ایکس سیب زمینی به سطح سلول‌های +HER2 شده که این امر کاهش دوز مصرفی داروی هرسپتین را به همراه خواهد داشت.

در نتایج به دست آمده در آزمون الیزای ساندویچی به دلیل حضور آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ایکس سیب زمینی پوشش داده شده در کف چاهک‌ها و سپس اضافه کردن آنتی‌بادی انسانی در آخرین مرحله، فقط کمپلکس‌های حاوی نانوذره ویروسی/ هرسپتین قابل شناسایی است. تاکنون از آزمون الیزا جهت شناسایی و جداسازی نانوذرات ویروسی استفاده نگردیده و طراحی الیزا توسط اسفندیاری و همکاران صورت گرفته است.

در نتایج حاصل از SDS-PAGE اضافه شدن پوشش پروتئینی ۲۷ کیلودالتونی نانو ذره ویروس خالص شده ایکس سیب‌زمینی به زنجیره سنگین ۵۵ کیلو دالتونی آنتی‌بادی هرسپتین سبب ایجاد پروتئین ۸۳ کیلو دالتون گردید. آزمون وسترن بلات به کمک آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس و هرسپتین مهر تائیدی دال بر این قضیه می‌باشد. ایده استفاده از تکنیک وسترن بلات در این تحقیق از مطالعه استیمنز حاصل شد. مطالعه استینمتز و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنها تحقیق انجام گرفته در زمینه استفاده از ویروس ایکس سیب‌زمینی به عنوان نانوذره است. استیمنز و همکاران در مطالعه خود از این ویروس استفاده کردند و با اتصال OregonGreen 488 و AlexaFluor 647 به ویروس باندهای پروتئینی ویروس ایکس سیب زمینی و باندهای پروتئین ناشی از کنژوگاسیون ویروس و فلورسنت را با تکنیک وسترن‌بلات مشاهده کردند. قابل ذکر است که نوع ویروس سیب زمینی به کار رفته در تحقیق ایشان از استرین دیگری بود که با نانوذره به کار رفته در این تحقیق بود.

در بررسی با زتاسایزر باراالکتریکی کمپلکس نانوذره/ هرسپتین ۷/۰۵- (با ضریب خطا ۰/۰۳) به دست آمد که نسبت به بار الکتریکی ویروس (۲۱/۴-) مثبت‌تر و نسبت به بار الکتریکی هرسپتین (۱/۴۸-) منفی‌تر بود. بار الکتریکی ۷/۰۵- نشان داد اتصال بین ویروس و هرسپتین رخ داده که منجر به ایجاد ذره جدید با بار الکتریکی متفاوتی شده است. نتایج میکروسکوپ الکترونی موید حفظ ساختار رشته‌ای کمپلکس نانوذره ویروسی/هرسپتین بود. این داده‌ها نشان دادند که لینکرهای شیمیایی به کار رفته و مواد شیمیایی در محیط واکنش هیچ‌کدام ساختار رشته‌ای ویروس را تخریب نکرده و نانوذره بودن ویروس حفظ شده است.

نانوذرات ویروسی گیاهی به دلیل اندازه کوچک، غیر بیماری‌زا بودن در سلول‌های حیوانی، خالص سازی ارزان و حفظ ساختار پیکره‌ای بعد از اتصال به لینکرهای شیمیایی وارد عرصه نانوتکنولوژی شده و توجه ویژه‌ای را به خود اختصاص دادند به گونه‌ای که از آنها در هدف‌گیری موثر دارو در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به علت فراهم آوردن بودجه این طرح تحقیقاتی و از شرکت فناوری بن‌یاخته به علت همکاری‌های همه جانبه در جهت پیشبرد این تحقیق نهایت سپاس و امتنان را دارم. از

Archive of SID

www.SID.ir

سرکار خانم دکترکمالی به پاس محبت بی‌دریغشان سپاسگزارم.

References

1. Brown WL, Mastico RA, Wu M, Heal KG, Adams CJ, Murray JB, Stockley PG. RNA bacteriophage capsid- mediated drug delivery and epitope presentation. Intervirology 2003; 45(4-6): 371-80.
2. Doronina S, Toki B, Torgov M, Mendelsohn B, Cerveny C, Chace D, DeBlanc R, Gearing R, Bovee T, Siegall C, Francisco J, Wah A, Meyer D, Senter P. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nat Biotechnol 2003; 21: 778- 84.
3. Douglas T, Young M. Viruses: making friends with old foes. Science 2006; 312 (5775): 873-5.
4. Kukowska-Latallo J, Candido K, Cao Z, Nigavekar S, Majoros I, Thomas T, Balogh L, Khan M, Baker J. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. Cancer Res 2005; 65: 5317-24.
5. Medina O, Zhu Y, Kairemo K. Targeted liposomal drug delivery in cancer. Curr Pharm Des 2004; 10: 2981-9.
6. Muldoon L, Neuwelt E. BR96-DOX immunoconjugate targeting of chemotherapy in brain tumor models. J Neurooncol 2003; 65: 49-62.
7. Okuda T, Kawakami S, Akimoto N, Niidome T, Yamashita F, Hashida M. PEGylated lysine dendrimers for tumor-selective targeting after intravenous injection in tumor- bearing mice. J Control Release 2006; 116: 330-6.
8. Park J, Kirpotin D, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen U, Marks J, Papahadjopoulos D, Benz C. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. J Control Release 2001; 74: 95-113.
9. Pattenden L, Middelberg A, Niebert M, Lipin D. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. Trends Biotechnol 2005; 23: 523-9.
10. Singh P, Gonzalez M, Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology. Drug Development Research 2006; 67: 23-41.
11. Lewis J, Destito G, Zijlstra A, Gonzalez M, Quigley J, Manchester M, Stuhlmann H. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging . Nature Medicine 2006; 12(3): 354-60.
12. Klem MT, Willits D, Young M, Douglas. T. 2-D array formation of genetically engineered viral cages on Au surfaces and imaging by atomic force microscopy. J Am Chem Soc 2003; 125: 10806-7.
13. Brumfield S, Willits D, Tang L, Johnson JE, Douglas T, Young M. Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. J Gen Virol 2004; 85:1049-53.
14. Brown WL, Mastico RA, Wu M, Heal KG, Adam CJ, Murray JB, Simpson JC, Lord JM, Taylor-Robinson AW, Stockley PG. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. Intervirology 2002; 45:371-80.
15. Wang Q, Lin TW, Tang L, Johnson JE, Finn MG. Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks. Angew. Chem Int Ed 2002; 41:459-62.
16. Germershaus O, Merdan T, Bakowsky U, Behe M, Kissel T. Bioconjug Chem 2006; 17:1190-9.
17. Tran T, Engfeldt T, Orlova A, Sandstro M, Feldwisch J, Abrahmse L, Wennborg A, Tolmachev V, Karlstro A. Bioconjug Chem 2007; 18:1956-64.
18. Hilger I, Leistner Y, Bernd A, Fritsche C, Haas K, Kosmehl H, Kaiser W. Eur Radiol 2006; 14: 1124-9.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Shukla R, Thomas T, Peters J, Desai A, Kukowska-Latallo J, Patri A, Kotlyar A, Baker J. Bioconjug Chem 2006; 17: 1109-15.

20. Jayasinghe U, Salazar L. Manual de tecnicas en virologia de plants. Unidad Tecnica de Capacitation (TTU). CIP Lima Peru 1993.

21. Yukyung J, Hyo-Jin P, Pyung-Hwan K, Jaewon L, Woochan H, Jaemoon Y, Hyunju K, Joo-yuk S, Joo-Hang K, Yong-Min H, Chae-Ok Y, Seungjoo H. Retargeting of adenoviral gene delivery via Herceptin–PEG– adenovirus conjugates to breast cancer cells. Journal of Controlled Release 2007; 123:164-71.

22. Steinmetz NF, Mertens ME, Taurog R E, Johnson JE, Commandeur U, Fischer R, Manchester M. Potato Virus X as a nover platform for potential biomedical applications. Nano Lett 2010; 10: 305-12.

23. Greg T, Hermanson. Bioconjugate Techniques, First Edition, Academic Press 1996; 801.

24. Esfandiari N, Kohi-Habibi M, Hohn T, Pooggin M. Complete genome sequence of an Iranian isolate of Potato virus X from the legume plant Pisum sativum. Virus Genes 2009; 39:141-5.

Archive of SID

www.SID.ir