سال نهم/ ویژه‌نامه/ بهار ۱۳۹۱
اولین کنفرانس ملی جلبک‌شناسی ایران
Vol.9/ Special Issue/ Spring 2012
The First National Conference of Phycology of Iran
۹-۱۶

استفاده از ساختارهای خودجور شونده سیانوباکتری *Spirulina sp.* ISC 6 برای انتقال دارو

علی حاج رفیع[۱*]، مهروز دزفولیان[۲]، ندا سلطانی[۳]، ناصر هرزندی[۲]، ساره یعقوب زاده[۱] و ندا رضوی داودی[۱]

۱- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۳- دانشیار گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی

تاریخ دریافت: ۹۰/٤/۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/٦/۱

چکیده

لایه سطحی دیواره سلولی سیانوباکتری‌ها، اس لایر می‌باشد. اس‌لایرها دارای ضخامت ۱۰-۵ نانومتر می‌باشند با منافذ یکسان و منظم به قطر ۸-۲ نانومتر. فرایند خودجور شدن اس‌لایر در سطح تماس آب با هوا رخ می‌دهد. انتقال هدفمند دارو، رساندن انتخابی دارو به بافت‌ها و یا سلول‌ها می‌باشد. انتقال هدفمند دارو سبب افزایش کارایی درمان دارویی و کاهش میزان دوز دارو و کاهش اثرات جانبی دارو می‌شود. مکانیسم اتصال دارو به موادی که دارو را به‌طور هدفمند انتقال می‌دهند بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی این مواد متنوع می‌باشد. در این مطالعه اس‌لایر سیانوباکتری *اسپیرولینا ISC6* برای انتقال داروی ضد سرطان ال-آسپاراژیناز به رده‌های سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گرفت. سیانوباکتری *اسپیرولینا ISC6* در محیط کشت زاروک کشت شد. اس‌لایر از غشای خارجی سیانوباکتری با روش‌های استاندارد استخراج گردید. اس‌لایر استخراج شده از نظر کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت و به وسیله فیلتراسیون استریل شد و غلظت‌های مختلف اس‌لایر و ال-آسپاراژیناز بر روی سل‌لاین‌های سرطانی مختلف اثر داده شد. سپس میزان مرگ سلول‌ها با سلول‌های بدون تیمار، سلول‌های تیمار شده با اس‌لایر و سلول‌های تیمار شده با ال-آسپاراژیناز مقایسه شد. نتایج نشان داد سلول‌های سرطانی که با اس‌لایر به همراه ال-آسپاراژیناز مورد تیمار قرار گرفتند بیش‌تر از سایر ترکیبات توانستند تعداد سلول‌های سرطانی را کاهش دهند.

واژه‌های کلیدی: اس‌لایر، اسپیرولینا *ISC6*، ال-آسپاراژیناز.

The Use of Self-Assembly Structures in *Spirulina ISC6* for Drug Delivery

Ali Hajrafi[1*], Mehrouz Dezfulian[2], Neda Soltani[3], Naser Harzandi[2], Sareh yaghoub zadeh[1], Neda Razavi Davoodi[1]

1-M.Sc. Microbiology Department, Islamic Azad University, Karaj Branch
2-Assistant Professor, Microbiology Department, Islamic Azad University, Karaj Branch
3-Associate Professor, Petroleum Microbiology Research Group, Research Institute of Applied Sciences (A.C.E.C.R), Shahid Beheshti University

Abstract

The S-layer is the surface cell wall layer in cyanobacteria. S-layers have a 5–10 nm thickness and identical, regularly arranged pores with diameters of 2–8 nm. The self-assembly process can occur in the air-water interface. Drug targeting is the selective delivery of drugs to particular tissues and cells and it can increase the efficiency of medical treatment, reduce the required dose and decrease the side effects of a drug. The mechanisms of attaching drugs to drug targeting materials vary according to the physicochemical properties of these materials. In this study, the S-layer of Spirulina *ISC6* cyanobacteria was used to deliver the anti-blood cancer drug L-Asparaginase to cancer cell lines. In this study the use of nano particles of the *Spirulina ISC6* S-layer for the delivery of L-Asparaginase to cancer cell lines was investigated. *Spirulina ISC6* was cultured in zarrouk media and the S-layer was extracted from the outer membrane of cyanobacteria using the standard method. Quantification and qualification of the extracted S-layer was done and it was sterilized by filtration. Different concentrations of S-layer and L-Asparaginase were tested on cancer cells. The cell mortality was compared with that of untreated cells, S-layer alone and L-Asparaginase treated cells alone. Results showed that cancer cells treated with S-layer and L-Asparaginase decreased better than cancer cells treated with other compounds.

Keywords: *Spirulina ISC6,* S-layer, L-Asparaginase, Cancer cell line.

* Corresponding author. *E-mail Address*: ali_hajrafi@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

سیانوباکتری‌ها موجوداتی پروکاریوت هستند. اسپیرولینا یک سیانوباکتر چند سلولی ریسه‌ای می‌باشد. به کمک میکروسکوپ، اسپیرولینا به صورت ریسه‌های سبز آبی متشکل از سلول‌های استوانه‌ای دیده می‌شود که به صورت ترایکوم‌هایی مارپیچ و بدون انشعاب آرایش پیدا کرده‌اند(Soltani, 1996). یکی از رایج‌ترین ساختارهای سطح آرکی‌ها و باکتری‌ها، آرایش‌های کریستالی تک مولکولی از زیر واحدهای پروتئینی (Vidgren, 1992) است که لایه‌های سطحی یا اس‌لایر نامیده می‌شود(Sleytr *et al.*, 1996). شبکه‌های اس‌لایر تقارن مورب (p1,p2)، مربعی (p4) یا هگزاگونال (p3,p6) دارند. اطلاعات نشان می‌دهند که تقارن هگزاگونال در آرکی‌ها غالب است. بر اساس نوع شبکه، یک واحد مورفولوژیکی شامل یک، دو، چهار،سه یا شش زیر واحد (گلیکو) پروتئین یکسان است به ترتیب و آنها در فواصل مرکز به مرکز در حدود ۲/۵ تا ۳۵ نانومتر هستند. اغلب لایه‌های S ۵ تا ۲۵ نانومتر ضخامت دارند و یک سطح خارجی صاف را ایجاد می‌کنند و سطوح درونی دارای چین خوردگی می‌باشد (Sa`ra and Sleytr, 1996). از آنجا که شبکه‌های اس‌لایر دارای منفذهایی با سایز و مورفولوژی یکسان در رنج ۲ تا ۸ نانومتر دارند. آنها به صورت یک غربالگر دقیق مولکولی عمل می‌کنند (Graham, 1991). این آرایش مونومولکولار پتانسیل‌های کاربردی در بیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی مولکولی دارد. بسیاری از کاربردها به توانایی پروتئین‌های اس‌لایر ایزوله شده در سرهم شدن بستگی دارد این امر در آرایش‌های منظم در سوسپانسیون یا در سطوح مناسب (مثل سطوح سیلیکونی، آهنی و پلی‌مرها) یا سطوح مشترک (مثل فیلم‌های لیپیدی و لیپیوزوم‌ها منولایرهای Langmuir لیپیدی، غشاهای لیپیدی سطحی، و لیپید پوشاننده نانوکپسول‌ها) (Sleytr *et al.*, 2007) (Schuster and Sleytr, 2000) و به محض از بین رفتن عوامل تخریب‌گری که برای ایزولاسیون آنها استفاده می‌شود رخ می‌دهد. کاربردهای متفاوتی از اتصال بیومولکول‌ها، مثل آنزیم‌ها یا آنتی بادی‌ها بر روی اس‌لایر نشان داده شده است و حتی نانو ذرات فلزی و نیمه رسانا نیز می‌توانند با آرایش منظم بر روی اس‌لایر متصل شوند (Schuster *et al.*, 2006).

مواد و روش‌ها

سویه سیانوباکتری و کشت آن

به هنگام انجام اعمال فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، کشت‌های خالص(عاری از باکتری) مورد نیاز می‌باشد. نمونه‌های اسپیرولینای مورد نظر در این پژوهش به شماره *ISC6* از مرکز ویژه کشت و تکثیر ریز جلبک‌ها واقع در پژوهشکده علوم کاربردی جهاددانشگاهی واحد شهید بهشتی فراهم آمد که به‌صورت کشت خالص آماده شده بودند.

محیط کشت اختصاصی برای اسپیرولینا محیط کشت زاروک می‌باشد. به کمک این محیط کشت اختصاصی می‌توان ضمن نگهداری اسپیرولینا بصورت زنده، توده سلولی را نیز ازدیاد کرد. محیط ابتدا اتوکلاو شد و دمای آن به دمای محیط رسید. سپس، از کشت اولیه اسپیرولینا و در زیر هود لامینار، تلقیح جلبک‌ها از محیط استوک به درون

Archive of SID
www.SID.ir

ارلن‌ها به طریقی که تراکم مورد نظر بدست آید انجام شد.

شرایط کشت

دمای۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس، شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس، به همراه هوادهی محیط کشت انجام شد. ارلن‌ها بعد از تلقیح سلول‌ها در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. بعد از اینکه میزان سلول‌های جلبک در داخل ارلن به اندازه کافی رسید و فضا برای رشد بیشتر و همچنین اضافه کردن محیط کشت برای تامین مواد غذایی مهیا نبود، توده سلولی یک ارلن بین دو ارلن تقسیم شد.

استخراج پروتئین لایه S از اسپیرولینا

به منظور استخراج پروتئین لایه S که به‌صورت شبکه منظم آرایش یافته از زیر واحدهای آن در سطح خارجی سلول جلبک است از Tris–HCl ۵۰ میلی مولار استفاده شد. محلول استخراج شده به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل شده و برای تغلیظ، پروتئین در مقابل آب به مدت ۲ ساعت در $22\ ^{\circ}C$ دیالیز گردید. وزن مولکولی محلول حاصل به‌وسیله روش SDS-PAGE در مقابل مارکر پروتئینی سنجش گردید. میکروتیوب حاوی S-layer برای انجام سایر مراحل آزمایش در یخچال در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگهداری شد.

تست برادفورد

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین در محلول از تست برادفورد استفاده شد. رقت‌هایی مشخص از BSA (Buvin Serum Albumin) تهیه شد و محلول‌های آماده از رقت‌ها داخل میکروتیوب با ۱۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد مخلوط شده سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب نوری رقت‌های تهیه شده خوانده شد و منحنی استاندارد ترسیم شد. پروتئین اس‌لایر استخراج شده با محلول معرف برادفورد مخلوط گردیده، سپس جذب نوری آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. جذب نوری خوانده با منحنی استاندارد مقایسه شد و به این ترتیب غلظت پروتئین اس‌لایر تعیین شد.

عکس‌برداری بوسیله میکروسکوپ FE_SEM

میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده از نوع گسیل میدانی FE_SEM مدل Hitachi S4160 (Japon) بود. برای عکس‌برداری، نمونه‌ها در سطح stage آماده شد سپس با لایه‌ای از گرد طلا پوشانده شد و از سلول‌های اسپیرولینا و پروتئین‌های لایه S عکس‌برداری صورت گرفت.

استریل کردن نمونه‌ها

به منظور اثر دادن پروتئین‌های لایه S استخراج شده بر روی سلول، باید پروتئین‌ها استریل و عاری از الودگی باشند. پس برای استریل کردن از فیلترهای Millipore با قطر منافذ ۰/۲ میکرون استفاده شد.

کشت سلول انسانی

برای کشت سلول از رده‌های سلولی سرطان خون انسان[1] استفاده شد. هر رده سلولی در ابتدای کار به مقدار لازم فریز و در ازت مایع ذخیره‌سازی شد و مقدار لازم از سلول‌ها در کشت مورد استفاده قرار

Archive of SID
www.SID.ir

گرفت. بر اساس دستورالعمل شرکت Gibco محیط کشت RPMI1640 آماده شد و با فیلتراسیون استریل گردید. سپس به محیط کشت پنی سیلین U/ml ۱۰۰ ، استرپتومایسین µg/ml ۱۰۰ و ٪۱۰ FBS به آن اضافه گردید .

تاثیر لایه S بر انتقال داروی ال-آسپاراژیناز

آنزیم ال-آسپار استاندارد، با اضافه کردن ml ۴ ddH2O به mg ۴۹-۴۳/۲ از پودر دارویی ال-آسپاراژیناز تهیه شد. µl ۱۵۰ از پروتئین اس‌لایر را با µl ۱۵۰ ال-آسپاراژیناز استاندارد مخلوط کرده وبعد از ۵ دقیقه بر روی سلول‌های LCL که قبلا کشت داده شده بود، µl ۵۰ از مخلوط ساخته شده اضافه شد و µl ۱۵۰ محیط کشت RPMI+FBS 10% به هر چاهک اضافه گردید. هر آزمایش با سه تکرار انجام شد و ۳ چاهک نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. مشابه همین کار برای داروی ال-آسپاراژیناز و نمونه پروتئین اس‌لایر نیز انجام گردید. بعد از ۲۴ ساعت تست MTT انجام شد.

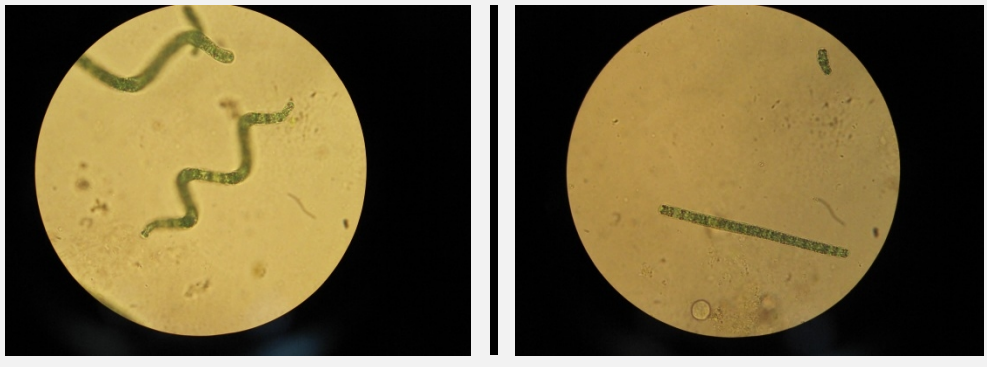
تست میزان زنده ماندن سلول ها

برای تعیین میزان کاهش سلول‌ها در اثر تیمارهای مختلف از روش رنگ‌سنجی کمی استفاده شد که در آن نمک زرد رنگ تترازولیوم[۲] به نام 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide به‌وسیله آنزیم سوکسینیک دهیدروژناز میتوکندری متابولیزه شده و به فورمازان[۳] ارغوانی رنگ تبدیل می شود . محصول فورمازان تنها در صورت سلامت میتوکندری‌ها ساخته می‌شود. میزان محصول فورمازان ساخته شده به‌وسیله دستگاه الایزا ریدر[۴] و در طول موج ۵۵۴ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

سلول‌های اسپیرولینا

اسپیرولینا به‌صورت ریسه‌های سبزآبی است و هتروسیست در آنها وجود ندارد (شکل ۱).



شکل ۱- عکس اسپیرولینا با میکروسکوپ نوری با لنز 40X

Archive of SID
www.SID.ir

SDS_PAGE

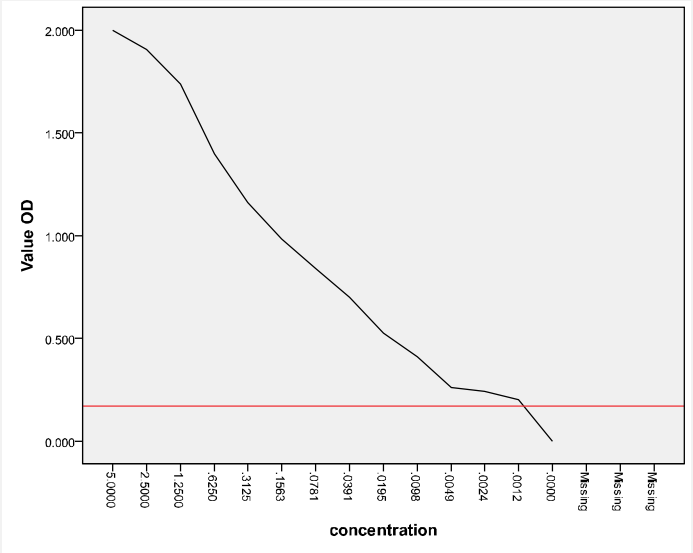
بعد از استخراج لایه S با روش‌های استاندارد، آزمایش SDS_PAGE برای پروتئین انجام شد و باند مشاهده شده در مقایسه با باندهای Ladder در حدود ۱۷۰kDa تخمین زده شد.

تست برادفورد

غلظت پروتئین با استفاده از منحنی به‌دست آمده از پروتئین استاندارد BSA (شکل۲) به‌صورت زیر محاسبه شد. نمونه تهیه شده در این مطالعه جذب نوری ۰/۱۶۹ در ۵۹۵ نانومتر را نشان داد، که با توجه به غلظت‌های پروتئین استاندارد دارای غلظت ۰/۰۰۱۲ g/ml می‌باشد.

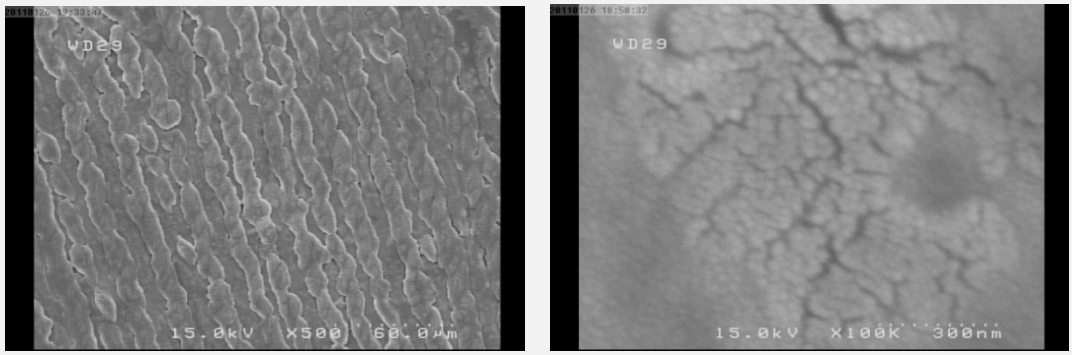
میکروسکوپ الکترونی

از پروتئین اس‌لایر استخراج شده از اسپیرولینا به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی عکس گرفته شد تا نحوه شکل‌گیری و ساختار آن مشخص گردد. در عکس‌های به‌دست آمده بر اساس مقیاس عکس‌برداری معلوم شد که پروتئین‌های اس‌لایر در اندازه‌های نانومتر توانایی خود سرهم بندی در سوسپانسیون را دارا هستند (شکل ۳).



شکل ۲- محور افقی نشان دهنده غلظت پروتئین استاندارد بر اساس گرم / میلی لیتر می باشد و محور عمودی میزان جذب نوری خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری به ازای هر غلظت را نشان می دهد.

www.SID.ir



شکل ۳- میکروگراف الکترونی پروتئین اس‌لایر سیانوباکتری *Spirulina* را نشان می‌دهد. سمت راست تجمع ذرات نانومتری در ابعادی به طول ۳۰۰ نانومتر نشان می‌دهد. سمت چپ آرایش حاصل از تجمع همان ذرات را در محدوده‌ای به طول ۶۰ میکرون نشان می‌دهد.

تاثیر برروی سلول‌های Lymphoblast Cell Line (LCL)

سلول‌های LCL به تعداد ۲۰۰۰۰۰ عدد در هر چاهک کشت شدند و مورد تیمار آنزیم ال- آسپاراژیناز استاندارد، آنزیم ال- آسپاراژیناز استاندارد و اس‌لایر و اس‌لایر به تنهایی قرار گرفتند. میزان زنده ماندن سلول‌های حاصل از تیمارهای مختلف به‌وسیله روش MTT مورد سنجش قرار گرفت. از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ($p<0.05$) مشاهده شد و کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های LCL تیمار شده با اس‌لایر و ال-آسپاراژیناز نسبت به استفاده از ال- آسپاراژیناز به تنهایی و اس‌لایر به تنهایی مشاهده شد.

بحث

از آنجا که شبکه‌های لایه S توسط نوع‌های (گلیکو) پروتئینی یکسانی سرهم‌بندی می‌شوند، این آرایش‌های کریستالی خواص فیزیکو شیمیایی تکراری را در مقیاس‌های زیر نانومتر نشان می‌دهند. مشخصه‌های تکراری لایه S به آنها این امکان را می‌دهد که به عنوان یک ماتریکس بی‌حرکت برای اتصال منولایرهای مولکول‌های کاربردی (Schuster *et al.*, 2005) (مثل آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و ایمونوژن‌ها) در یک مسیر ژئومتریک مشخص استفاده شوند این پتانسیل کاربردی برای تولید حسگرهای تجزیه زیستی[۵] (Schuster and Sleytr, 2006) تست‌های ایمونولوژی[۶]، سنتز میکروپارتیکل‌ها و انتقالات بین غشایی بکار می‌رود.

خط دیگر توسعه مرتبط است با استفاده از محصولات حاصل از سرهم‌بندی خود به خودی اس‌لایر در سوسپانسیون به عنوان سیستم ترکیبی حامل- ادجوآنت در مقابل عفونت با باکتری پاتوژن، در ایمونوتراپی سرطان‌ها و نیز در ایمونوتراپی آنتی آلرژیک، که هر کدام از این موارد دارای کاربردهای متنوع می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir

آزمـــایش هیبریداســـیون الیگونوکلئوتیـــدهای نشـــاندار فلورســـنت و بیـــوتینیلات[7] بـــا اســـتفاده از اسپکتروســـــــــــکوپی surface-plasmon-field-enhanced-fluorescence نشان داد کـه حسـگرهای کـاربردی سـطحی مـی‌تواننـد بـا موفقیـت توسـط کریستالیزاسیون هتروتترامرها روی چیپس طـلا تولیـد شوند. این ساختارها را می‌توان برای توسعه DNA یـا چیپس‌های پروتئین که بـرای بسـیاری از کاربردهـای نانوبیوتکنولوژی مورد نیاز است استفاده کرد.

در ایـن مطالعـه تـاثیر اس‌لایـر اسـتخراج شـده از سـیانوباکتری اسـپیرولینا *ISC6* بـه منظـور رسـاندن هدفمند دارو به سلول‌ها مورد بررسی قـرار گرفـت و از داروی ضـد سـرطان ال- آسـپاراژیناز اسـتاندارد اسـتفاده شـد. ال-آسـپاراژیناز آنزیمـی اسـت کـه موجب هیدرولیز آسپاراژین بـه اسـید آسـپاراتیک و آمونیاک می‌شود . نام دیگر آن ال-آسپار است . این آنزیم امروزه جهـت درمـان بیمـاری سـرطان خـون و برخی تومورها اسـتفاده مـی‌شـود. ال-آسـپاراژیناز بـا تجزیـهٔ ال-آسـپاراژین مـانع از دسترسـی سـلول‌هـای سرطانی به منابع این اسیدآمینه می‌شود . مهمترین اثـر جـانبی ایـن دارو حالـت آلـرژی یـا واکـنش افـزایش حساسیت است. این دارو به پـروتئین اس‌لایـر متصـل گردید سپس بـر روی سـلول‌هـای LCL کشـت داده شده، اثـر داده شـد. نتـایج بـه‌دسـت آمـده حاصـل از تست MTT مربوط به سلول‌های تحت تیمار بـا ال-آسـپاراژیناز/ اس لایـر و سـلول‌هـای تحـت تیمـار بـا داروی ال- آسپاراژیناز به تنهایی، نشان مـی‌دهـد کـه پـروتئین اس‌لایـر باعـث افـزایش قابـل توجـه تـاثیر داروی ال- آسپاراژیناز شده است.

نتایج حاصـل از ایـن مطالعـه نشـان داد کـه مجـزا نمودن بخشی از ساختار نمونه‌های سیانوباکتری جـدا شده از محیط دارای کاربردهـای بسـیار اثـر بخـش و متنوع می‌باشـد کـه مـی‌توانـد بـه سـهولت در اختیـار بخش‌های درمانی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

ایـن تحقیـق در گـروه میکروبیولـوژی دانشـگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام گرفته اسـت و از همکـاری صمیمانه پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشـگاهی دانشگاه شهید بهشتی که در انجام مراحل ایـن پـروژه ما را یاری داده‌اند، سپاسگزاری فراوان می‌شود.

پی‌نوشت‌ها

1- Lymphoblast Cell Line(LCL)
2- Tetrazolium
3- Formazan
4- ELIZA Reader
5- Bioanalytical sensors
6- Immunoassays
7- Biotynilated

منابع

Graham, L., N. Nanninga and T.J. Beveridge (1991). Periplasmic space and the concept of periplasm. Trends in Biochemical Sciences (Cambridge (ENG)), 16:328–329.

Sa´ra, M. and U.B. Sleytr (1996). Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from cell structure to biomimetics. Progress in Biophysics and Molecular Biology (Oxford), 65:83–111.

Schuster. B. and U.B. Sleytr (2006). Biomimetic S-layer supported lipid membranes, Current Nanoscience, 2: 143–152.

Archive of SID
www.SID.ir

Schuster. B, U.B. Sleytr, H.T. Tien and A.Ottova-Leitmannova (2005). 2D-Protein Crystals (S-layers) as Support for Lipid Membranes, Elsevier Science, Amsterdam, 247–293.

Schuster. B. and U.B. Sleytr (2000). Reviews on Molecular Biotechnology (Totowa NJ), 74: 233–254.

Sleytr, U. B., P. Messner, D. Pum and M. Sa´ra (1996). Crystalline bacterial cell surface proteins. Landes Company, Academic Press, Austin, Tex.

Sleytr, U.B, C.N. Ilk. Huber, D. Pum, E. Schuster and E. Egelseer (2007). FEMS Microbiology Letters (Amsterdam), 267: 131–144.

Soltani, N. (1996). Cultivation and harvest ion of microalgae in laboratory phase, research institute of applied science, ACECR.6-39.

Vidgren, G., I. Palva, R. Pakkanen, K. Lounatmaa and A. Palva (1992). S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of nucleotide sequence. Journal of Bacteriology (Washington DC), 174:7419– 7427.

Archive of SID

www.SID.ir