بسم الله
الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

ساخت و بررسی اثر نانوپارتیکل‌های پلی‌اتیلن گلیکول – پلی‌آمیدوآمین (PAMAM) هدفمند شده با نانوبادی علیه TAG72 و حامل سازه کدکننده پروتئین کشنده (t-Bid)

نگارش

فاطمه صفریان

استاد راهنما

دکتر فاطمه رهبری زاده

زمستان ۱۳۸۹

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم فاطمه صفریان رشته بیوتکنولوژی پزشکی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان ساخت و بررسی اثر نانوپارتیکلهای پلی اتیلن گلیکول – پلی آمیدوآمین (PAMAM) هدفمند شده با نانوبادی علیه TAG72 و حامل سازه کدکننده پروتئین کشنده (t-Bid) در تاریخ ۸۹/۱۲/۱۶ ارائه کردند. بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر فاطمه رهبری زاده (استاد راهنما)

دکتر افشین محسنی فر (استادناظر)

دکتر بهرام کاظمی (استاد ناظر)

دکتر حسین عبدل تهرانی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فاطمه صفریان** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی پزشکی است که در سال **۱۳۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر فاطمه رهبری زاده** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **فاطمه صفریان** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از:

پدرو مادر و خانواده عزیزم که همواره در طول سختیهای راه صبورانه حمایتم کردند

و

دوستان مهربانم، خانمها یزدان بخش، هنرمند، شهریاری، شاملو و رسولی.

و با سپاس فراوان از:

استاد راهنمایم سرکار خانم دکتر رهبری زاده

و

استاتید محترم گروه بیوتکنولوژی پزشکی: دکتر رسایی، دکتر فروزنده و دکتر تهرانی.

چکیده

ژن درمانی یک راهکار انقلابی جدید در درمان سرطان است. ساخت حامل ژنی کارآمد و ایمن به سبب تأثیر در موفقیت انتقال ژن بسیار حائز اهمیت است. تاکنون حاملین ژنی متعددی، که به طور کلی در دو دسته حاملین ژنی ویروسی و غیرویروسی قرار میگرند، ساخته و بررسی شده اند. اگرچه حاملین ژنی ویروسی، هم در انتقال و هم تضمین بیان ژن انتقالی بسیار کارآمد هستند ولی مشکلات مربوط به ایمنی زیستی و هزینه های بالا برای شرایط خاص تولید آنها محققان را برآن داشته که به سیستمهای غیرویروسی توجه بیشتری کنند. در میان پلیمرهای کاتیونی به عنوان حاملین ژنی غیروویروسی، دندریمرهای PAMAM کلاس جدیدی از نانو پلیمرها با ساختار سه بعدی پرانشعاب و بسیار یکنواختی هستند که قابلیت زیادی در بسته بندی مولکولهای دیگر در فضای درونی اشان را دارند. آنها با داشتن گروههای آمین باردار مثبت در سطحشان میتوانند با مولکولهای دارای بارمنفی DNA واکنش داده و آنها را در درون خود فشرده ساخته و ساختارهایی به نام پلی پلکس را ایجاد کنند که به عنوان ابزارهای زیست سازگار و کارآمد انتقال DNA به کار میروند. با تعدیل بارهای مثبت سطحی این دندریمر با افزودن زنجیرهای PEG به سطح آن و هدفمند سازی این حامل با افزودن مولکولهای هدف گیرنده سلول، حاملین ژنی ساخته شده است که هم کارایی بالاتری در انتقال ژن هدف به سلول و هم سمیت سلولی کمتری را هم در محیط آزمایشگاه و هم بدن موجود زنده نشان داده است. مزایای کاربرد نانوبادی (آنتی بادی تک دومینی شتری) در هدفگیری آنتی ژنهای سطحی سلولها توجه زیادی را به کاربرد عملی این مولکولها به همراه داشته است. در این تحقیق نانو بادی علیه TAG72 (آنتی ژن توموری بیان شونده در سطح سلولهای تومور کولون) پس از تولید، تخلیص و تعیین خصوصیات، به واسطه زنجیره های PEG به نانوذرات PAMAM متصل شد وبه این ترتیب نانوحاملهایی برای انتقال سازه درمانی (کد کننده ژن کشنده t-Bid تحت هدایت رونویسی پروموتر pMUC1 وعناصر افزاینده HRE/ERE) ساخته و بررسی شد. نتایج تعیین میزان مرگ و میر سلولی و نیزreal time PCR کارآیی انتقال و بیان ژن با این نانوحامل به سلولهای سرطانی را تأیید می کند.

کلید واژگان : نانوذرات PAMAM، پلی اتیلن گلیکول، نانوبادی علیه TAG72.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. ژن درمانی ۳

۱-۳. حامل ها ۵

۱-۳-۱. حامل های بیولوژیکی (ویروسی) ٦

۱-۳-۱-۱. مزایا و معایب سیستمهای بیولوژیکی ٦

۱-۳-۲. حامل های غیربیولوژیکی (غیرویروسی) ۷

۱-۳-۲-۱. روشهای فیزیکی ۷

۱-۳-۲-۱-۱. مزایا و معایب روشهای فیزیکی انتقال ژن ۸

۱-۳-۲-۲. روشهای شیمیایی (نانوحامل ها) ۹

۱-۳-۲-۲-۱. انتقال ژن باکمک لیپوزومها و لیپیدهای کاتیونی ۱۱

۱-۳-۲-۲-۲. انتقال ژن با کمک پلیمرهای کاتیونی ۱۳

۱-۳. موانع اصلی در کاربرد نانوسیستم های کاتیونی ۲۵

۱-٤. پوشاندن سطح نانوذره با پلی اتیلن گلیکول (PEG) ۲۷

۱-۵. هدفمند کردن نانوحامل ها ۳۰

۱-۵-۱. هدفگیری غیرفعال ۳۱

۱-۵-۲. هدفگیری فعال ۳۲

۱-۵-۲-۱. انواعی از مولکولهای هدف گیرنده: ۳۳

۱-۵-۲-۱-۱. هدفگیری با واسطه فولات ۳۳

۱-۵-۲-۱-۲. هدفگیری به واسطه کربوهیدراتها ۳٤

۱-۵-۲-۱-۳. هدفگیری با واسطه آنتی بادی و قطعات آنتی بادی ۳٤

۱-۵-۲-۲. انواعی از مولکولهای هدف ۳۷

فصل دوم : مواد و روشها ٤٠

۲-۱. مواد ٤١

۲-۱-۱. بافرها ٤١

۲-۱-۱-۱. بافر فسفات سالین ٤١

۲-۱-۱-۲. بافرهای تخلیص سیتوپلاسمی ٤٢

۲-۱-۱-۳ بافرهای SDS-PAGE ٤٢

۲-۱-۱-٤. بافر وسترن بلاتینگ ٤٤

۲-۱-۱-۵. بافر بلاکر الایزا ٤٤

۲-۱-۱-٦. بافر متوقف کننده واکنش الایزا ٤٥

۲-۱-۱-۷. معرف برادفورد ٤٥

۲-۱-۲. محیطهای کشت ٤٥

۲-۱-۲-۱. SOB medium ٤٥

۲-۱-۲-۲. Lauria Bertoni (LB) و Lauria Bertoni Agar (LB Agar) ٤٥

۲-۱-۲-۳. 2XYT medium ٤٦

۲-۲. تجهیزات مورد نیاز ٤٦

۲-۳. روش کار ٤٦

۲-۳-۱. ساب کلونینگ ژن Anti-TAG72 VHH در وکتور بیانی ٤٦

۲-۳-۱-۱. تکثیر ژن نانوبادی ٤٦

۲-۳-۱-۲. ساب کلونینگ ٤٧

۲-۳-۱-۳. هضم تأییدی پلاسمید ساب کلون شده استخراجی از کلون منتخب ٤٨

۲-۳-۲. تولید و تخلیص نانوبادی علیه TAG72 ..... ٤٨

۲-۳-۲-۱. کشت انبوه باکتری حاوی پلاسمید ساب کلون شده ٤٨

۲-۳-۲-۲. جداسازی پروتئین از سیتوپلاسم باکتری ٤٨
۲-۳-۲-۳. تخلیص پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون نیکل..... ۵۰
۲-۳-۲-٤. وسترن بلاتینگ ۵۰
۲-۳-۲-۵. تعیین غلظت نانوبادی ۵۱
۲-۳-۲-٦. الایزا ۵۱
۲-۳-۳. تهیه نانوپلکسها ۵۱
۲-۳-۳-۱. تهیه نانوکمپلکسهای PAMAM /DNA ۵۲
۲-۳-۳-۲. پوشاندن سطح نانوذرات PAMAM با پلی اتیلن گلیکول..... ۵۳
۲-۳-۳-۳. اتصال نانوبادی Anti-TAG72 به نانوذرات PAMAM_PEG..... ۵٤
۲-۳-۳-٤. تعیین خصوصیات نانوذرات..... ۵۵
۲-۳-۳-۵. تست تأیید حضور DNA در کمپلکسهای نانوذرات (DNA Retardation Assay) ۵۵
۲-۳-٤. ترانسفکشن سلولهای یوکاریوتی..... ۵۵
۲-۳-٤-۱. انتقال سازه کد کننده t-Bid با نانوذرات آماده شده به سلولهای هدف و کنترل کشت شده..... ۵٦
۲-۳-٤-۲. شمارش سلولهای زنده و مرده ۵۷
۲-۳-٤-۳. انجام semiquantitative RT_PCR برای تأیید ورود ژن t-Bid به سلولها ۵۷
۲-۳-٤-٤. انجام Real time PCR برای بررسی کمی بیان ژن t-Bid در سلولها..... ۵۷
فصل سوم : نتایج و یافته ها..... ۵۹
۳-۱. ساب کلونینگ ژن Anti-TAG72 VHH در وکتور بیانی..... ٦۰
۳-۱-۱. تکثیر ژن نانوبادی..... ٦۰
۳-۱-۲. تخلیص پلاسمید بیانی pSJ..... ٦۰
۳-۱-۳. gel extraction ژن نانوبادی و پلاسمید بیانی pSJ پس از برش آنزیمی..... ٦۱
۳-۱-٤. ساب کلونینگ..... ٦۲
۳-۱-۵. هضم تأییدی پلاسمید ساب کلون شده..... ٦۳

۳-۱-٦. نتیجه توالی خوانی ٦٣
۳-۱-۷. بیان و تخلیص پروتئین نانوبادی ٦٤
۳-۱-۸. وسترن بلاتینگ ٦٦
۳-۱-۹. تعیین غلظت نانوبادی ٦٦
۳-۱-۱۰. نتایج الیزا ٦٦
۳-۲. ساخت و بررسی نانوذرات ٦٧
۳-۳. تست تأیید حضور سازه در نانوذرات بهروشDNA Retardatioan Assay ٦٨
۳-٤. ترانسفکشن سلولهای هدف و شاهد با پلی پلکسهای آماده شده ٦٩
۳-۵. تایید عملکرد نانوذرات حاوی سازهی ژنی ٦٩
۳-۵-۱. شمارش سلول ها ٦٩
۳-۵-۲. نتیجه بررسی عملکرد نانوذرات حاوی سازه درمانی در سطح رونویسی (نتایج Real time PCR) ۷۲
فصل چهارم : بحث، نتیجهگیری و پیشنهادها ۷۹
٤-۱. بحث و نتیجه گیری ۸۰
٤-۲. پیشنهادها ۸٦
فهرست منابع ۸۷
ضمیمه ۱۰۵
چکیده انگلیسی ۱۰۷

فهرست جداول

جدول ۲-۱ برنامه تکثیر ژن Anti-TAG72 VHH توسط PCR. ٤٧

جدول ۲-۲. مقادیر مورد استفاده برای Real Time PCR ژن هدف و کنترل..... ۵۸

جدول ۳-۱. نتایج بررسی نسبت بیان ژن t-Bid ۷۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. مکانیسمهای مختلف سنتز دندریمرها..... ۲۱

شکل ۱-۲. مقایسه شباهت شکل و اندازه دندریمرهای PAMAM با برخی پروتئینهای طبیعی. ۲۲

شکل ۱-۳. هدفگیری غیرفعال تومور با کمک اثر EPR. ۳۲

شکل ۱-٤. نمایی از انواع آنتی بادیها. ۳۵

شکل ۱-۵. هدفگیری فعال. ۳۸

شکل ۱-٦. نمایش شماتیک هدف مطالعه..... ۳۹

شکل ۳-۱. نتایج تکثیر ژن VHH..... ٦۰

شکل ۳-۲. نتایج تخلیص پلاسمید بیانیpSJ ٦۱

شکل ۳-۳. نتایج تخلیص از ژل پس از هضم آنزیمی..... ٦۱

شکل ۳-٤. نتایج کلونیPCR روی کلونهای ترانس فورم شده..... ٦۲

شکل ۳-۵. نتیجه تخلیص پلاسمید pSJ-TAG-10. ..... ٦۲

شکل ۳-٦. نتیجه هضم تأییدی. ٦۳

شکل ۳-۷. نتیجه توالی خوانی پلاسمید pSJ-TAG-10 . ..... ٦٤

شکل ۳-۸. SDS – PAGE اولیه. ٦۵

شکل ۳-۹. SDS – PAGE پس از شتستشوی پروتئین از ستون نیکل. ٦۵

شکل ۳-۱۰. وسترن بلاتینگ..... ٦٦

شکل ۳- ۱۱. نتایج زتا سایزینگ..... ٦۷

شکل ۳-۱۲. نتایج بررسی اندازه ذرات. ٦۸

شکل ۳-۱۳. نتایج Gel Retardation Assay. ٦۹

شکل ۳-۱٤. تعداد سلولهای زنده و مرده روی رده سلولی LS174T. ۷۰

شکل ۳-۱۵. تعداد سلولهای زنده ومرده روی رده سلولی HT29..... ۷۱

شکل ۳–۱۶. تعداد سلولهای زنده ومرده روی رده سلولی NIH3T3. ۷۱
شکل ۳–۱۷. نمودار استاندارد ژن بتا اکتین. ۷۲
شکل ۳–۱۸. نمودار تکثیر منحنی استاندارد ژن بتا اکتین. ۷۳
شکل ۳–۱۹. نمودار ذوب (Melt) منحنی استاندارد ژن بتااکتین. ۷۳
شکل ۳–۲۰. نمودار استاندارد ژن t-Bid. ۷٤
شکل ۳–۲۱. نمودار تکثیر منحنی استاندارد ژن t-Bid . ۷٤
شکل ۳–۲۲. نمودار ذوب (Melt) منحنی استاندارد ژن t-Bid. ۷۵
شکل ۳–۲۳. نمودار تکثیر ژنی در رده سلولی LS174T. ۷۵
شکل ۳–۲٤. نمودار تکثیر ژنی در رده سلولی HT29. ۷٦
شکل ۳–۲۵ نمودار تکثیر ژنی در رده سلولی NIH3T3. ۷٦
شکل ۳–۲٦ مقایسه نتایج نسبت بیان (ER) ژن t-Bid. ۷۸

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

سرطان، دومین عامل مرگ در سراسر جهان می باشد واز ۵۸ میلیـون مـرگ در سـال ۲۰۰۵ در جهان، ۷/۶ میلیون (۱۳٪ ~) مورد آن ناشی از سرطان بوده است. میزان مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان رو به افزایش است به نحوی که برآورد شده است که تا پایـان سـال ۲۰۱۵ ایـن عـدد بـه ۹ میلیون و تا سال ۲۰۳۰ به ۱۱/۴ میلیون نفر خواهد رسید. در میان سرطانها، تومورهای کولورکتال در جایگاه سوم شیوع در میان زنان و مردان (هر دو جـنس) در جهـان قراردارنـد [Internet base cancer facts & figures]. در حال حاضر درمان سرطان با راهکارهای درمانی متعددی مانند جراحـی، شـیمی درمانی، رادیو درمانی و ... انجام می شود، ولی به دلیل رشد بدخیم و مکانیسم های پیچیده دخیل در تکثیر و تهاجم تومورها، روشهای درمـانی سـنتی در بسـیاری از مـوارد ناکارآمـد هسـتند، لـذا ایجـاد روشهای درمانی کارآمدتر بسیار ضروری می باشد. در طی ۳۰ سال گذشته تحقیقات گسترده منجر به درک بهتر مکانیسم های دخیل در شروع و پیشرفت بدخیمی ها و در نتیجه بهبود و ارتقـاء روشـهای درمانی قدیمی و نیز گسترش هرچه بیشتر روشهای درمـانی جدیـد، ماننـد ژن درمـانی، شـده اسـت. توسعه راهکارهای درمانی روی یافتن اهداف درمانی جدید مانند عروق خـونی تغذیـه دهنـده تومـور، ابداع و تکامل روشهای جدید انتقال دارو/ ژن درمانگر و نیز کـاربرد درمانگرهـای هدفمنـد کـه بسـیار اختصاصیتر عمل کنند متمرکز بوده است. که در این فصل به تشریح برخی از این موارد می پـردازیم. فن آوری نانوعرصه نوینی است که اولین بار توسط پروفسور فین من[1] در ۱۹۵۹ مطرح شـد، و سـپس در دهه ۱۹۸۰ واژه "نانوتکنولوژی" توسط K. Eric Drexler ابداع و همگانی شد. تمرکز نـانوتکنولوژی

[1] - Professor Richard P. Feynman

روی نانوذرات است که به دلیل ویژگیهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاص و امکان دست ورزی راحت، در طی سالهای اخیر امیدهای بسیاری را در زمینه تشخیص و درمان بیماریها و بالاخص سرطان ایجاد کرده اند. در این فصل به بررسی مهمترین دست آورد این فن آوری که ابداع نانوحاملها می باشد می پردازیم[۱].

۱-۲. ژن درمانی

ژن درمانی، انتقال انتخابی یک ژن یا محصول ژنی به یک سلول یا بافت، با کمترین سمیت می باشد. اولین مطالعه بالینی ژن درمانی توسط دکتر اندرسون در سال ۱۹۹۰، روی دختری ۴ ساله که دارای بیماری تک ژنی نقص ایمنی مرکب شدید و وابسته به کروموزوم X (X-SCID)[1] بود، به شیوه ex vivo انجام شد[۲]. از آنجا که سرطان به دلیل فقدان وقایع تنظیمی کنترل کننده رشد و تقسیم سلولی به وجود می آید و این فقدان کنترل نیز ناشی از جهش در ژنهای کدکننده محصولات دخیل در این فرآیندهای تنظیمی است، لذا تمرکز ژن درمانی سرطان روی این جهش ها میباشد. به طور کلی این جهش ها یا از نوع جهش های مغلوب مربوط به از دست دادن عملکرد محصول ژنی مانند ژنهای سرکوبگر تومورند و یا از جهشهای غالب همراه با کسب عملکردند مانند افزایش بیان اونکوژنی که به طور طبیعی خاموش است (در هر دو حالت جهش رشد سلولی را از کنترل خارج می کند). هدف از ژن درمانی سرطان دست ورزی این جهش ها و ارتقاء عملکردهای طبیعی سلول است[۳].

برای ژن درمانی سرطان استراتژی های متفاوتی نیز به کار گرفته می شوند که در زیر به آنها اشاره می شود:

۱. جایگزینی ژن بازدارنده تومور[۴].
۲. تکنولوژی آنتی سنس و سرکوب اونکوژن ها[۵و۶].
۳. ژن درمانی سرطان بر اساس خودکشی سلول سرطانی[۷].
۴. ژن درمانی سرطان با کمک مهار رگ زایی [۸و۹].

[1]- X-linked Severe Combined Immunodeficiency

۵. ژن درمانی سرطان با استراتژی پیش آپوپتوزی، که این مورد به سبب ارتباط موضوعی در اینجا بیشتر شرح داده می شود:

در استراتژی اخیر از اعضاء خانوادهBCL2 برای القاء مرگ در سلول سرطانی استفاده می شود. خانواده BCL2، یک خانواده بزرگ از پروتئینهای تنظیم کننده مرگ سلولی هستند و شامل هم اعضاء القاگر آپوپتوز (مانند Bim،Bid و Bak) و هم بازدارنده آپوپتوز (مانند BCL2وBcl-XL) می باشند. اعضای القاگر آپوپتوز، اونکوپروتئینهای بالقوه هستند در حالیکه بازدارنده های آپوپتوز نوعی پروتئین سرکوبگر تومورند. این پروتئینها دارای دومین های همولوژی BCL2 می باشند که تاکنون ۴ دومین BH شناسایی شده است. پروتئینهای دارای دومین های ۲و۱BH با هترودایمر شدن با Bax امکان مهار مرگ سلولی را فراهم می کنند. پروتئینهای دارای دومین BH۳ یا دومین مرگ با ایجاد امکان هترودایمریزاسیون BCL2 و Bcl-XL با اعضاء پیش آپوپتوزیی مانند Bax و Bak سبب ایجاد مرگ می شوند. دومین BH۴ در آنتاگونیست های Bcl-XL امکان اتصال آنها به پروتئینهای تنظیمی مرگ مانند Bad وApaf1 را فراهم می آورد[۱۰]. پروتئین Bid یک پروتئین KDa ۲۱ است که با ایجاد کانال یونی در غشاء میتوکندری میتواند آپوپتوز را القاء کند. در مسیر سیگنالینگ CD95/TRAIL/TNF-R، فعال شدن کاسپاز ۸ منجر به برش پروتئولیتیکی Bid و در نتیجه شکل گیری فرم کوتاه شده آن یعنی t-Bid[1] (۱۵ KDa) می شود. t-Bid از سیتوزول به میتوکندری رفته و در آنجا با تحریک اولیگومریزاسیون پروتئینهای Bax وBAK در غشاء خارجی میتوکندری سبب آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول می شود. سیتوکروم C سپس Apaf1 را فعال کرده و آنهم کاسپاز ۹ را فعال می سازد و در نهایت مرگ سلولی (آپوپتوز) رخ می دهد. راهکارهایی برای خاموش کردن اعضاء سرکوبگر آپوپتوز و یا تحریک اعضاء القاگر آپوپتوز میتواند در درمان سرطان مفید واقع شود. برای مثال کاربرد وکتور آدنوویروسی کد کننده BAX، مهار واضح رشد سلولهای توموری کولون و معده را در محیط آزمایشگاه و بدن موجود زنده[2] نشان داده است[۱۱و۱۲].

[1]- truncated Bid
[2] - in vivo

گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (دکتر رهبری زاده) نیز در سال ۱۳۸۵ سازه ژنی مبتنی بر این استراتژی به نام HRE/ERE-pMUC1-t-Bid را ساخت. از آنجاکه ژن MUC1 در بسیاری از رده های سلولهای سرطانی مانند کارسینومای کولون، پستان و تخمدان به شدت بیان می شود، از پروموتور قوی آن برای بیان بالای پروتئین القاگر آپوپتوز یعنی t-Bid در این سازه استفاده شده است تا بیان بالای این پروتئین را با حضور عناصر کنترلی HRE/ERE در سلولهای سرطانی بیان کننده این موسین تضمین کند. کارآیی القاء آپوپتوز این سازه نیز روی چندین رده سلولی بررسی و گزارش کرده است[۱۳].

بدون در نظر گرفتن استراتژی کاربردی، بزرگترین معضل در راه ژن درمانی، بخصوص در اصلی ترین کاربردش یعنی ژن درمانی سرطان، رسیدن به یک روش موثر و بی خطر برای انتقال ژن است[۱۴]. طراحی حاملی کارآمد و مطمئن برای انتقال ژن درمانی از اصلی ترین زمینه های تحقیقات بیوتکنولوژی بوده است. در ادامه شرح حامل ها خواهد آمد.

۱-۳. حامل ها

برای اینکه یک حامل ژن به عنوان حاملی خوب و کارآمد در نظرگرفته شود باید ویژگیهایی داشته باشد مانند:

۱. توانایی انتقال اختصاصی و مؤثر ژن به بافت هدف را داشته باشد.
۲. ژن انتقالی با آن حامل، از بین نرود و بیان پایداری از محصول را در سلول تضمین کند.
۳. عوارض جانبی برای موجود زنده نداشته باشد که دراین راستا غیرسمی بودن، غیرایمونوژنیک بودن، تجزیه پذیری و سازگاری زیستی داشتن از جمله خصوصیاتی هستند که بررسی می شوند.
۴. به علاوه ظرفیت بالا برای حمل ماده ژنتیکی و قابلیت تولید انبوه با کمترین هزینه را داشته باشد.

سیستمهای انتقالی ژن را میتوان در دو گروه حامل های بیولوژیکی و غیربیولوژیکی طبقه بنـدی کرد[۱۵]:

۱-۳-۱. حامل های بیولوژیکی (ویروسی)

گزارشات تأثیر عفونت ویروسی در بهبود تومور منجر به بررسی توانایی ویروسها در سرکوب رشد تومور و درمان سرطان شد. درک مکانیسم های دخیل در توانایی ذاتـی ویروسـها بـرای آلـوده کـردن سلول میزبان منجر به کاربرد گسترده آنها برای انتقال ژن خارجی به سلول شد. به طورکلی وکتورهای ویروسی را براساس توانایی آنها برای جایگزینی در ژنوم میزبان به دو گروه اصلی تقسیم می کننـد: ۱. ویروسهای ادغام شونده در ژنوم میزبان مانند لنتی ویروس ها و رتروویروسها و ۲. ویروسهای غیر ادغام شونده در ژنوم (یا ویروسهای اپی زومی) مانند آدنوویروس، آدنواسوشییتد ویـروس و ویـروس هـرپس سیمپلکس[۱۶]. در زیر به بررسی برخی از و مزایا و معایب وکتورهای ویروسی می پردازیم.

۱-۳-۱-۱. مزایا و معایب سیستمهای بیولوژیکی

اگرچه وکتورهای ویروسی جزء کارآمدترین سیستمهای انتقال ژن هستند و چه در محیط کشت سلول و چه در in vivo می توانند تعداد زیـادی از سـلوها را ترانسـفکت کننـد، ولـی کـاربرد آنهـا بـا مشکلات زیادی همراه است. به طور مثال ویروسهای ادغام شونده در ژنوم مانند لنتی و رتروویروسـها، بیان پایدار ژن انتقالی را ممکن میسازند ولـی ورود بـه جایگاههـای تصـادفی در ژنـوم میزبـان خطـر اونکوژنیک بودن آنها را مطرح می کند[۱۷]. از سوی دیگر ویروسهای غیر ادغام شونده در ژنوم ماننـد آدنوویروسها بیان موقت و کوتاه مدت از ژن هدف را ایجاد می کنند، که این، تکرار تجویز برای رسیدن به اثرات درمانی بلندمدت را ضروری میسازد ولی همچنین تکرار تجویز واکنشهای ایمنـی نسـبت بـه ویروس را تشدید می کند[۱۸]. نکته دیگر تأثیر نوع سلول (به لحاظ تقسیم شونده یا نشـونده بـودن) روی توانایی وکتورهای ویروسی در ترانسفکت کردن آنهاست، به طور مثال رتروویروسها تنهـا توانـایی ترانسفکت کردن سلولهای تقسـیم شـونده را دارنـد. بنـابراین سـلولهای طبیعـی کـه اکثـرا" درحـال