

## توسعه و یافتن الیگونوکلتوتیدها برای مارکرهای گلبول قرمز تیپ B با هدف کاربرد در انتقال دارویی

• کمال رحیمی‌زاده

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• غلامرضا هاشمی تبار (نویسنده مسئول)

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• محمدرضا باسامی

پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• علیرضا حق‌پرست

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

• مجتبی سنکیان

مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

• راکش ان. ویدو

مرکز ژنومیکس مقایسه‌ای، دانشگاه مرداک، پرت ۶۱۵۰، استرالیا

• راکش ان. ویدو

مرکز ژنومیکس مقایسه‌ای، دانشگاه مرداک، پرت ۶۱۵۰، استرالیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۴-۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۵-۱۴

Email: hashemit@um.ac.ir



### چکیده

آپتامرها با جنسی از الیگونوکلتوتید به دلیل توانایی در اتصال به اهداف مختلف با اختصاصیت و ویژگی بسیار بالا، می‌توانند برای انتقال دارو بصورت اختصاصی به ملکول هدف به کار گرفته شوند. پاکسازی سریع کلیوی داروهای بر پایه نوکلئیک‌اسید که توسط عروق خونی منتقل می‌شوند، یکی از مشکلات اساسی برای انتقال این گونه داروها توسط سیستم قلبی عروقی می‌باشد. برای حل این مسئله در این مطالعه یافتن و توسعه آپتامر برای گلبول‌های قرمز خون مینا قرار گرفت زیرا گلبول‌های قرمز به راحتی در طول سیستم قلبی و عروقی جابجا می‌شوند. گلبول‌های قرمز با دارا بودن ویژگی‌های خاص، گزینه بسیار مناسبی به عنوان انتقال‌دهنده فیزیولوژیک داروها در بدن می‌باشند. بدین منظور با استفاده از گلبول‌های قرمز و هدف قرار دادن  $4-O-((2-O-(\beta-D-fucopyranosyl)-3-O-(\alpha-D-galactopyranosyl))-\beta-$  galactopyranosyl)-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside در سطح گلبول قرمز سلکس سلولی (Cell-SELEX) انجام شد. بعد از ۱۵ دور از سلکس، با سکانس کردن محصول نهایی، آپتامرهای RNV543 و RNV544 شناسایی گردید که گزینه‌های مناسبی برای هدف قرار دادن گلبول‌های قرمز می‌باشند. میزان اتصال با استفاده از فلوسایتومتری برای RNV543 و RNV544 تایید شد. نتیجه این مطالعه یافتن آپتامرهایی بود که توانایی اتصال اختصاصی به گلبول‌های قرمز تیپ B را دارند.

کلمات کلیدی: نوکلئیک اسید کاربردی، سل سلکس، الیگونوکلتوتیدها، گلبول قرمز، انتقال دارو

• Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 45-53

### Development of novel oligonucleotides targeting erythrocyte type B markers for drug delivery applications

By: Rahimizadeh, K., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Hashemi Tabar, Gh., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Bassami, M., Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Haghparast, A., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Sankian, M., Immunobiochemistry laboratory, Immunology Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad, Iran. and Veedu, R. N., Center for Comparative Genomics, Murdoch University, Perth 6150, Australia.

Received: 2020-06-27

Accepted: 2020-08-04

Email: hashemit@um.ac.ir

Nucleic acid aptamers have been emerged as potential molecules for target-specific drug delivery because of their ability to bind targets with very high affinity and specificity. Rapid renal clearance is one of the major issues associated with the vascular delivery of nucleic acid-based drugs. To circumvent this problem, this study was designed to envision the development of nucleic acid aptamers specific to human erythrocyte as erythrocytes travel through the cardiovascular system. Erythrocytes have special properties which make them peculiar and specific as a physiological carrier for drug delivery. For this purpose, we have performed Cell-SELEX procedure using human erythrocytes containing 4-O-((2-O-( $\beta$ -D-fucopyranosyl)-3-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl))- $\beta$ -galactopyranosyl)-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside on the surface as a model target. After completing 15 rounds of selection, sequencing of the product identified RNV543 and RNV544 as potential oligonucleotides specific to the target human erythrocyte. The binding affinity of both RNV543 and RNV544 was confirmed by flow cytometry. This study showed there is Aptamers which can have specific binding to erythrocyte type B.

**Keyword:** Functional nucleic acids; Cell-SELEX; oligonucleotides; erythrocyte; drug delivery

### مقدمه

ایجاد پاسخ ایمنی در بدن اشاره کرد (۱۳، ۲۳). در راستای مزایای ذکر شده برای آپتامرها، به نظر می‌رسد که آپتامرها با توجه به پیش‌بینی بازار ۲۴۴ میلیون دلاری در سال، گزینه بسیار مناسبی برای رقابت با آنتی‌بادی‌ها می‌باشند (۱۱). در سال ۲۰۰۴ داروی Macugen که بر پایه آپتامر و هدف قرار دادن فاکتور رشد اندوتلیوم عروق (Vascular endothelial growth factor) ساخته شده بود، توانست تاییدیه سازمان غذا دارو (Food and Drug Administration) در ایالات متحده را برای استفاده درمانی بگیرد (۱۵). انتقال دارو به صورت اختصاصی به سلول‌های خاص در حال حاضر یکی از چالش‌های پیش‌رو در درمان اختصاصی بافت هدف بیماری می‌باشد. هر چند که بسیاری از آنتی‌بادی‌ها برای درمان اختصاصی و انتقال دارو استفاده می‌شوند ولی محدودیت‌هایی نیز وجود دارند، از جمله: اندازه بزرگ آنتی‌بادی‌ها، قیمت به نسبت بالاتر آنها و همچنین تفاوت بین دسته‌های (batch) مختلف تولید شده در میزان ایجاد پاسخ ایمنی. آپتامرها می‌توانند راهبرد جایگزین برای انتقال اختصاصی دارو به سلول‌ها باشند (۴، ۵، ۲۵، ۳۱). آپتامرهای بسیاری در سال‌های اخیر به صورت اختصاصی برای سلول‌های سرطانی مختلف با استفاده از تکنیک سلکس سلولی (شکل یک) پیدا شده‌اند (۱۲، ۱۶، ۲۷، ۲۸، ۳۶). بر خلاف انتقال دارو به صورت غیراختصاصی و کلی در بدن با استفاده از روش‌های متداول مانند نانو ذرات پلی‌مریک، لیپوزوم‌ها، آنتی‌بادی‌ها

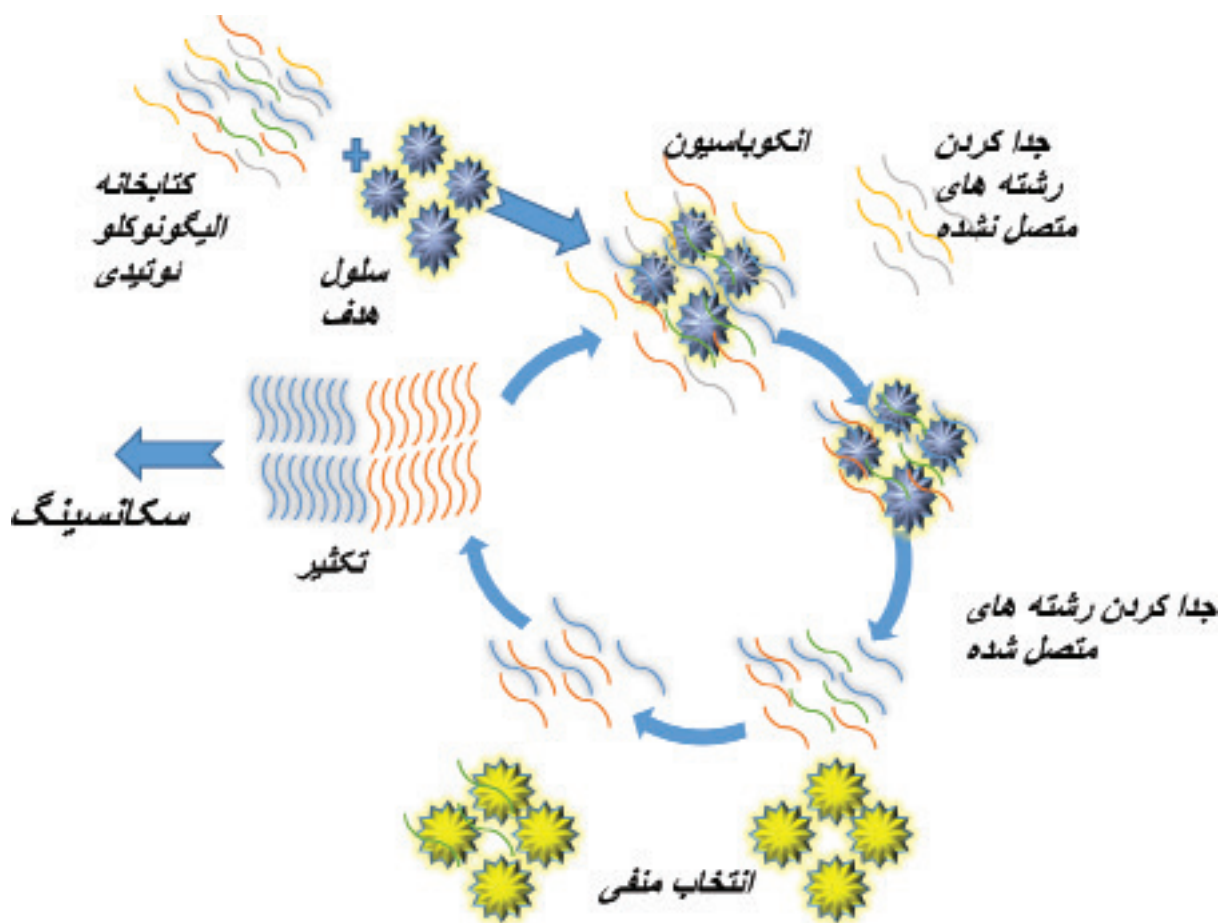
فناوری‌های مبتنی بر نوکلئیک اسید در سال‌های اخیر توجهات زیادی را در زمینه‌های درمانی، تشخیص و همچنین انتقال دارو به خود جلب کرده است (۱۸). آپتامرها یکی از کلاس‌های برجسته در مولکول‌های نوکلئیک اسیدی هستند که می‌توانند به صورت کاملاً اختصاصی به مولکول هدف خود متصل شوند (۹، ۱۴، ۱۷، ۲۱، ۲۲، ۲۴، ۳۲). آپتامرها تک رشته‌های کوچکی از DNA یا RNA هستند که می‌توانند با شکل سه بعدی خود با اختصاصیت و ویژگی بسیار بالا به هدف چسبیده و در راستای اهداف تحقیقاتی و تشخیصی و درمانی بکار روند. آپتامرها به صورت روتین طی فرآیند سیستماتیک تکامل یافته‌اند (systematic evolution by exponential enrichment) که به اختصار SELEX نامیده می‌شود انتخاب می‌گردند (۱۰، ۱۷، ۲۹). همچنین آپتامرها به عنوان آنتی‌بادی‌های شیمیایی نیز شناخته می‌شوند، زیرا دارای عملکرد مشابه آنتی‌بادی‌ها هستند. آنتی‌بادی‌ها نیز برای اهداف مختلفی مانند اهداف درمانی، تشخیصی و همچنین انتقال دارو بکار می‌روند. آپتامرها مزایایی نسبت به آنتی‌بادی‌ها دارند که می‌توان به تولید آسان آنها در آزمایشگاه در مقادیر زیاد، ثبات بالای مولکولی، مدت زمان زیاد نگهداری (۳۷)، قیمت پایین، امکان تعبیه تغییرات شیمیایی بر روی آپتامرها بدون ایجاد تغییر در کارایی آنها با توجه به ساختار سه بعدیشان، همچنین غیرسمی بودن یا سمیت بسیار پایین آپتامرها و عدم

داشته باشد که تولید کایمیریک این داروها با آپتامر در یک مرحله توسط سنتزکننده‌های الیگونوکلئوتیدی قابل انجام است (۱). در مطالعه پیش‌رو یافتن آپتامر به صورت اختصاصی برای گلبول‌های قرمز دارای آنتی‌ژن B با استفاده از تکنیک سلکس سلولی گزارش شده است.

### مواد و روش کار لاین سلولی

گلبول‌های قرمز انسانی شامل آنتی‌ژن‌های مختلف 5-Aminopentyl 4-O-((2-O-(β-D-fucopyranosyl)-3-O-(α-D-galactopyranosyl))-β-galactopyranosyl)-2-acetamido-2-deoxy-α-D-glucopyranoside (آنتی A با شماره کاتالوگ ۲۴۷۱۰۰۱) و همچنین 5-Aminopentyl 4-O-((2-O-(β-D-fucopyranosyl)-3-O-(2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl))-β-galactopyranosyl)-2-acetamido-2-deoxy-

یا سایر مولکول‌های بیولوژیک، گلبول‌های قرمز حامل‌های بسیار مناسبی برای ارائه دارو به صورت عروقی و اختصاصی می‌باشند (۲۶). قطر گلبول‌های قرمز حدود شش میکرومتر می‌باشد که این توانایی را به آنها می‌دهد تا بتوانند در عروق بسیار ریز نیز حرکت کنند. همچنین تعداد چهار تا شش میلیون عدد گلبول قرمز در هر میلی‌متر مکعب از خون بستر مناسبی برای انتقال دارو را ایجاد کرده است (۸). گلبول‌های قرمز پستانداران فاقد هسته و مقعرالطرفین هستند (۶). معمولا برای انتقال دارو با گلبول‌های قرمز از روش‌هایی همچون دیالیز هایپوتونیک و یا اتصال و رها شدن از سطح آن استفاده می‌شود. گلبول‌های قرمز در تمام طول دستگاه قلبی عروقی حرکت می‌کنند و ظرفیت و طول عمر مناسبی نسبت به سایر سیستم‌های انتقالی دارند. یافتن آپتامر اختصاصی برای گلبول قرمز می‌تواند پتانسیل بزرگی برای انتقال داروهای اسیدنوکلئیکی مانند الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس، siRNA، antimirs و DNAzymes



شکل ۱- تصویر شماتیک از پروسه سلکس سلولی.

داخل یک تیوب 1/15 m به سلولها اضافه شد و بر روی دستگاه مخلوط کننده چرخشی (rotary mixer SBS 550-3, Select BioProducts) برای یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت.

در مرحله بعد لوله برای 1 دقیقه با دور  $g \times 5000$  سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. سپس سلولها دو بار و هر بار با 1 ml از بافر شستشو شسته شدند. پلت سلولی به دست آمده پس از دو بار شستشو در 150  $\mu$ l آب (از آب فقط در دور اول استفاده می شود و در تمامی مراحل بعدی سلکس از بافر اتصال استفاده شد) حل گردید و در 95 درجه سانتی گراد به مدت 7 دقیقه حرارت داده شد تا آپتامرها از سلولها جدا شوند. مرحله قبل با سانتریفوژ کردن به مدت 7 دقیقه در  $g \times 15000$  ادامه یافت. مایع رویی که حاوی آپتامرهای جدا شده از سلولها بود به لوله جدید انتقال یافت و پلت سلولی دور ریخته شد. آپتامرهای به دست آمده از این مرحله به عنوان الگو برای تکثیر توسط واکنش زنجیره ای بسپارش (Polymerase Chain Reaction) استفاده شدند. از مرحله 4 سلکس، انتخاب منفی یا سلکس منفی انجام شد که این بدین معنی است که از سلولهای مشابهی که فقط در آنتیژن مورد نظر متفاوت بودند، استفاده گردید.

سلولهای استفاده شده در سلکس منفی، گلبولهای قرمز دارای آنتیژن O و A بودند. انتخاب منفی برای کنار رفتن آپتامرهایی بود که توانایی اتصال به هر دو گروه انتخابی مثبت و منفی سلولها را داشتند. انتخاب منفی قبل از انتخاب مثبت انجام می شد. بدین گونه که آپتامرها با سلولهای منفی انکوبه شده و سپس سانتریفوژ گشتند و مایع رویی که حاوی آپتامرهایی که به سلولها متصل نشده بودند به مرحله بعد که انتخاب مثبت است انتقال می یافت.

برای تکثیر ابتدایی آپتامرهای متصل شده و انتخاب شده در انتهای هر چرخه سلکس، 10 دور PCR ابتدایی انجام شد. مراحل PCR به شرح زیر انجام گردید:

98 درجه سانتی گراد به مدت 10 ثانیه، 55 درجه سانتی گراد به مدت 20 ثانیه، 72 درجه سانتی گراد به مدت 40 ثانیه و در انتها به مدت دو دقیقه در 72 درجه سانتی گراد.

در ادامه این مطالعه تعداد دور PCR ابتدایی کاهش یافت بدین صورت که در پنج چرخه اول سلکس 10 سیکل PCR، در چرخه پنج تا 10 سلکس، هشت دور PCR ابتدایی و در پنج چرخه سوم، شش دور PCR ابتدایی انجام شد. کاهش سیکل های PCR ابتدایی بصورت متوالی برای جلوگیری از تکثیر سکانس های غیر اختصاصی و همچنین نشان دادن حضور آپتامرهای

$\alpha$ -D-glucopyranoside (آنتی ژن B با شماره کاتالوگ 2345) از شرکت Seqirus خریداری شد. گلبول قرمز با آنتی ژن 2- O-((2- 5-Aminopentyl 4-O-((2- O-( $\beta$ -D-fucopyranosyl)- $\beta$ -galactopyranosyl)-2-acetamido-2-de-Red cross blood service از Oxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (آنتی ژن O) Perth, Australia دریافت شد. تمامی سلولها در 4 درجه سانتی گراد نگه داری شدند. قبل و بعد از پروسه سلکس سلولها با بافر شستشو، شستشو شدند، این بافر شامل 0.45 gr گلوکز (Sigma-Aldrich) و یک میلی لیتر  $MgCl_2$  یک مولار (chem-supply, Australia) بود که در 100 ml از 100 (PBS) Gibo, UK حل شده بود. بافر اتصال (binding) شبیه بافر شستشو بود با این تفاوت که 10 میلی گرم tRNA در آن وجود داشت. تمامی بافرها در pH 7.4 تهیه شدند. tRNA از کمپانی سیگما تهیه شد (R8759-500UN, USA).

کتابخانه 66 نوکلئوتید و پرایمرهای مورد استفاده که کد توالی آنها در ذیل ذکر شده توسط Coralville, USA (IDT) سنتز شده بود. پرایمرها و کتابخانه استفاده شده در این مطالعه توسط تیم محقق طراحی و سپس سفارش ساخت داده شد.

آنزیم پلی مراز استفاده شده در این تحقیق از نوع Phusion High-Fidelity از شرکت Thermo Fisher scientific و همچنین deoxynucleoside triphosphates از شرکت Bionline واقع در استرالیا خریداری شد.

### روند و مراحل سلکس سلولی

سلکس سلولی با الهام گرفتن از مطالعه Sefah و همکاران (1) به صورت ذکر شده انجام گردید: در ابتدا 1000 pmol، از کتابخانه الیگونوکلئوتیدی با 350  $\mu$ l از بافر اتصال در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه حرارت داده شد و بلافاصله بر روی یخ به مدت دو دقیقه سرد گردید. برای انتخاب مثبت (positive selection) که به منظور انتخاب آپتامر برای مولکول هدف بر سطح سلول است، میزان 10,000,000 سلول گلبول قرمز انسانی که دارای آنتی ژن B هستند را با 1 ml از بافر شستشو دوبار شستشو داده شد و با سانتریفوژ در  $g \times 5000$  پلت ایجاد گشت. این مرحله برای اطمینان از سالم بودن گلبولهای قرمز انجام گرفت. بدلیل غشای حساس و آسیب پذیر گلبولهای قرمز، سلولهای آسیب دیده لیز شده و در نتیجه در دو شستشو از سایر سلولها جدا می شوند و پلت سلولی بدست آمده حاوی سلولهای سالم می باشد. سپس مایع رویی رسوب (supernatant) دور ریخته شد و پلت به دست آمده در 100  $\mu$ l از بافر اتصال دوباره حل شد. کتابخانه پس از سرد شدن سریع در

جدول 1- کتابخانه نوکلئوتیدی و پرایمرهای مورد استفاده.

5'-GGA CAG GAC CAC ACC CAG CG-25nt- GGC TCC TGT GTG TCG CTT TGT-3'	کتابخانه الیگونوکلئوتیدی
5'-TTT TTT TTTTTTTTTTTT TT/isp3/ A CAA AGC GAC ACA CAG GAG C-3'	پرایمر رفت
5'GGA CAG GAC CAC ACC CAG CG-3'	پرایمر برگشت

قرار داشتند با بافر اتصال مخلوط و با دستگاه اسپکتوفتومتر ماورابنفش اندازه‌گیری شدند. میزان ۱۰۰ pmol از آپتامرهای تک‌رشته‌ای خالص‌سازی شده برای چرخه بعدی سلکس مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که شستشو پس از هر چرخه سلکس و همچنین قدرت آن در هر چرخه نسبت به چرخه قبل افزایش می‌یافت و در نهایت به هشت بار شستشو در مرحله نهایی رسید.

### تعیین توالی نسل جدید (Next Generation Sequencing)

محصول DNA تکثیر شده حاصل از PCR بعد از چرخه‌های سلکس سوم و پانزدهم با استفاده از Nucleospin® Gel و PCR Clean-up kit (MACHERY-NAGEL GmbH & Co. Germany) بر اساس پروتکل شرکت سازنده خالص‌سازی شد. سپس مرحله سکانسینگ توسط انستیتو بیماری‌های عفونی و ایمونولوژیک (Institute for Immunology and Infectious Diseases) انجام شد (illumine®MiSeq, 2\*75 bp paired reads in the 150V3 chemistry).

### فلوسایتومتری

آپتامرهای RNV-543 و RNV-544 که با FAM (Fluorescein amidites) نشان دار شده بودند به صورت شیمیایی توسط شرکت IDT برای ادامه تحقیقات سنتز شدند. سلول‌های مثبت و منفی با آپتامرهای نشان دار شده با FAM در بافر اتصال بصورت جداگانه در لوله‌های دارای کاور انکوبه شدند. استفاده از کاور بر روی لوله‌ها به دلیل ممانعت از رخ دادن photo-bleaching صورت گرفت. سپس تمامی سلول‌ها دو بار با بافر شستشو شسته شدند و پلت به دست آمده پس از سانتریفوژ در PBS حل شد. نمونه‌ها در دستگاه فلوسایتومتری (Gallios™ flow instrument Beckman Coulter, Inc) بررسی شد. اطلاعات بدست آمده با نرم‌افزار

اختصاصی که دارای تعداد فراوان‌تری نسبت به سایر سکانس‌های موجود در PCR بودند، انجام شد.

پس از پایان هر PCR ابتدایی با استفاده از محصول همان PCR، یک PCR در مقادیر کم انجام شد تا بهترین تعداد سیکل واکنش برای PCR اصلی در مقادیر زیاد تعیین گردد. بدین صورت که از محصول PCR در دوره‌های چهار، شش، هشت، ۱۰ و ۱۲ نمونه‌ای برداشته شد و با استفاده از ژل ۱۲٫۵ درصد دناتوره کننده پلی‌آکریل‌آمید آنالیز گردید. پس از یافتن بهترین تعداد دور برای PCR یک PCR بزرگ با مقدار نهایی یک میلی‌لیتر انجام شد. سپس محصول PCR بر روی ژل هفت مولار اوره و ۱۲٫۵ درصد دناتوره کننده آکریل‌آمید به میزان یک ساعت الکتروفورز شد. با توجه به استفاده دو پرایمر با طول‌های متفاوت، در نتیجه دو باند مجزا بر روی ژل قابل مشاهده بودند. باند پایین که حاوی آپتامرهای مورد نظربود از روی ژل با استفاده از تیغ بریده شد و در لوله‌های الکتروالویشن (Pu0-A-Lyzerim Midi 3500 dialysis kit, Sigma-Aldrich) قرار گرفت تا آپتامرها از ژل جدا شوند. در مرحله بعد برای خالص‌سازی بیشتر از رسوب‌گذاری با اتانول استفاده گردید. در رسوب‌گذاری با اتانول تمام محصول بدست آمده از مرحله قبل با ۲ MgCl یک مولار به نسبت یک درصد از حجم نهایی که ۱۰۰ Iμ بود و سدیم استات سه مولار به نسبت یک دهم حجم نهایی همراه با سه برابر حجم نهایی معادل ۳۰۰ μl اتانول ۹۶ یا ۱۰۰ درصد ترکیب گردید. لوله حاوی این ترکیب یک شب در ۲۰- قرار داده شد. سپس با دور ۱۵۰۰۰ gx و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس سوپرناتانت دور ریخته شد. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب اضافه و با دور ۱۵۰۰۰ gx در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس سوپرناتانت حذف و رسوب حاصله به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط زیر هود جهت خشک شدن قرار داده شد. آپتامرهایی که در رسوب کف لوله

جدول ۲- تنظیمات فلوسایتومتری.

500 :Forward scatter voltage and gain
500 :Side scatter Voltage and gain
550 :FAM detector: Voltage
nm 20/525 fluorescence signal was detected within the

جدول ۳- آپتامرهای منتخب پس از ۱۵ چرخه سلکس سلولی.

آپتامر	میزان تکثیر	سکانس
RNV543	۴۲۷۲۰	5'AATCGCAGTATCCGAGTATTTGTCT3'
RNV544	۳۷۸۰۸	5'CGCCCATCGTGTGTCGTACGGGTTA3'

Kaluza 1.3 آنالیز شد. تنظیمات فلوسایتومتری در جدول دو آمده است.

### نتایج

در این مطالعه، ۱۵ چرخه سلکس سلولی با هدف مولکول آنتی ژن B انجام شد. DNA دو رشته‌ای به دست آمده از PCR پس از چرخه شماره ۱۵ به NGS فرستاده شد و نتایج سکانسینگ دریافت گردید. علاوه بر این، DNA دو رشته‌ای که از چرخه سوم نیز به دست آمد برای سکانسینگ فرستاده شد تا نتایج آن با چرخه ۱۵ مقایسه شود. پس از مشاهده نتایج NGS و بررسی آنها دو گزینه RNV543 و RNV544 به عنوان آپتامرهای دارای پتانسیل اتصال با اختصاصیت بالا به گلوبولهای قرمز دارای آنتی ژن B شناخته شدند (جدول سه). دلیل انتخاب این دو آپتامر بر اساس تعداد آپتامر موجود در چرخه نهایی سلکس و همچنین بررسی ساختار ترمودینامیک با استفاده از الگوریتم mfold (۱) در مقایسه با سایر آپتامرهای موجود در چرخه نهایی بود. در راستای گزارشات گذشته از الگوریتم mfold (۳۸) برای پیش‌بینی ساختارهای ثانویه دو آپتامر RNV543 و RNV544 استفاده شد. (عکس ۲A).

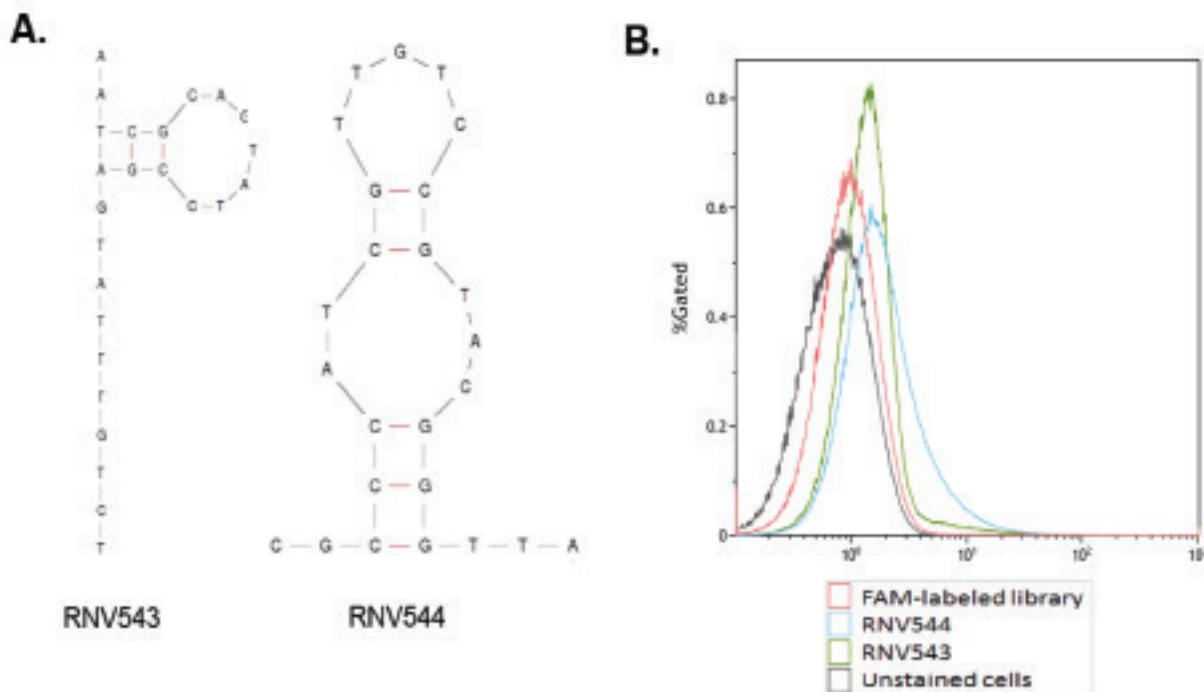
در مرحله بعد آپتامرهای RNV543 و RNV544 بدون ناحیه اتصال پرایمر که در دوطرف آپتامر قرار داشت به صورت شیمیایی سنتز شد و نشانگر FAM در انتهای ۵' آنها متصل گردید تا بدین وسیله میزان اتصال

آپتامرهای منتخب به سلول هدف بررسی گردد. آنالیزهای فلوسایتومتری بر این امر دلالت داشت که دو آپتامر RNV543 و RNV544 نشان‌دهنده یک shift است که ناشی از اتصال آپتامرهای نشان‌دار شده به سلولهای گلوبول قرمز دارای گروه آنتی ژنی B بود. در حالی که کتابخانه اولیه نشان‌دار شده مورد استفاده طبق انتظار هیچ گونه shift معنی‌داری نداشت. (عکس 2 B).

برای نشان دادن اختصاصیت آپتامر RNV543 و RNV544، آزمایش اتصال (binding) با استفاده از فلوسایتومتری سه بار برای هر کدام از آپتامرها انجام شد و نتایج یکسان به دست آمد. در ادامه با استفاده از سلولهای منفی گروه‌های خونی A و O با آپتامرهای منتخب فلوسایتومتری انجام شد و هیچ اتصال معنی‌داری دیده نشد. این نشان‌دهنده اتصال اختصاصی RNV543 و RNV544 به گلوبولهای قرمز دارای آنتی ژن B می‌باشد (عکس ۳). آزمایش مربوط به سلولهای منفی دو بار انجام شد و نتایج یکسان به دست آمد.

### بحث

سلکس سلولی، راهبردی بسیار قوی در به دست آوردن آپتامرهایی برای گستره زیادی از سلولهاست که تاکنون برای سلولهای سرطانی مختلف پیدا شده و توسعه پیدا کرده است (۴، ۵، ۷، ۲۵، ۳۱). موریس و همکاران



شکل ۲- A: الگوریتم mfold آپتامرهای منتخب برای بررسی ساختار آپتامر و همچنین بررسی ترمودینامیک. B: فلوسایتومتری آپتامرهای منتخب به همراه سلولهای دارای آنتی ژن B و مقایسه با سلولهای unstained و کتابخانه اولیه.

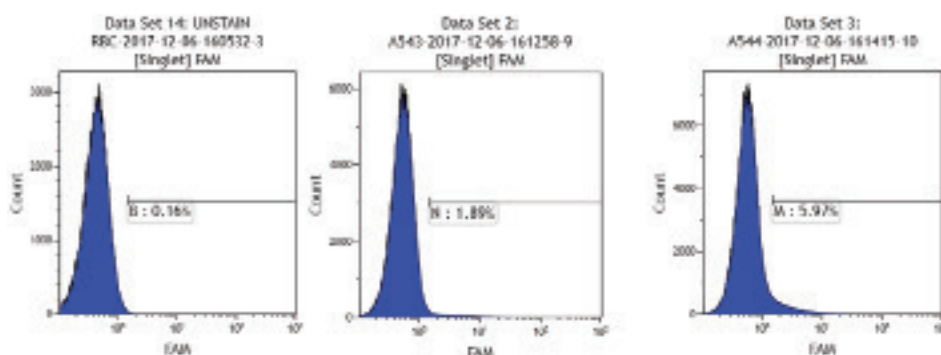
DNA دو رشته‌ای بدست آمده پس از چرخه ۱۵ سلکس با تعیین توالی نسل جدید سکانسینگ شد. برای بررسی اینکه چه مقدار افزایش در تعداد آپتامرهای موجود در چرخه ۱۵ نسبت به کتابخانه اولیه وجود داشت از چرخه سوم نیز نمونه‌گیری شد و NGS انجام شد. بدین ترتیب با بررسی‌های نرم‌افزاری نتایج، مشخص شد آپتامری که در چرخه سوم انتخاب شده و حضور داشته به دلیل ساختمان سه‌بعدی مناسب و اختصاصیت بالا در تمامی مراحل حداکثر میزان تکثیر را داشته باشد که موجب شده تا در چرخه ۱۵ نیز جزء بیشترین مقادیر باشد. همچنین برخی از آپتامرهایی که در چرخه ۱۵ وجود داشتند ولی در چرخه سوم نبودند جزء گزینه‌های مناسب برای آزمایش اتصال با فلوسایتومتری نبودند، به این دلیل که گاهی در پروسه PCR جهش‌هایی صورت می‌گیرد و توالی‌هایی بوجود می‌آیند که راحت‌تر از بقیه به آنزیم متصل شده و تکثیر می‌یابد. بنابراین با بررسی چرخه سوم و پانزدهم اطمینان در مورد اینکه کاندیدهای مناسبی برای ادامه آزمایش انتخاب شود، حاصل شد.

از آنجایی که ساختمان اصلی آپتامر برای اتصال به هدف قسمت اتفاقی (Randominal) میانی می‌باشد، دو قسمت اطراف که محل اتصال پرایمر بودند حذف شدند تا در مراحل اتصال (Binding) فقط قسمت اصلی آپتامر مورد بررسی قرار گیرد. از سوی دیگر با توجه به هدف مطالعه که استفاده از آپتامر به عنوان حامل دارویی داخل عروق می‌باشد، هرچه تعداد نوکلئوتید به کار رفته شده در آپتامر کمتر باشد، در نتیجه انتقال و بارگذاری دارو تسهیل می‌شود. در ادامه آزمایش دو آپتامر RNV۵۴۳ و RNV۵۴۴ توسط فلوسایتومتری که یکی از بهترین تکنیک‌ها برای بررسی میزان اتصال مولکولی می‌باشد (۲۵) بررسی گشت. هر دو گزینه انتخاب شده میزان اتصال قابل توجهی را به سلول‌های گلبول‌های قرمز دارای آنتی‌ژن B نشان دادند. البته میزان shift در RNV544 بیشتر دیده شد. با توجه به اینکه در سطح هر گلبول قرمز ۸۰۰۰۰۰ تا یک میلیون آنتی‌ژن کربوهیدراتی وجود دارد (۶) تخمین و به دست آوردن kd به صورت

با استفاده از گلبول‌های قرمز برای یافتن و توسعه لیگندهایی به اهداف پروتئینی چندگانه استفاده کردند (۲۰). بیرچ و همکاران با تکنیک i-selex (inertial micro-fluidic SELEX) و با استفاده از گلبول‌های قرمز آلوده شده با *plasmodium falciparum*، آپتامرهایی که اختصاصیت اتصال به سطح را دارند پیدا کرده‌اند (۲).

در راستای تحقیقات انجام شده هدف مطالعه بر اساس پیدا کردن آپتامرهایی که بتوانند به صورت اختصاصی به برخی گلبول‌های قرمز متصل شوند و قابلیت انتقال دارو را داشته باشند، بنا نهاده شد. بدین منظور از سلول‌های خونی تجاری که دارای آنتی‌ژن B هستند به عنوان انتخاب با سلول مثبت استفاده گردید و همچنین از گلبول‌های قرمز با گروه‌های A و O نیز به عنوان سلول‌های منفی استفاده شد. لازم به ذکر است که با توجه به تحقیقات موجود کلیه سلول‌های استفاده شده دارای Rh منفی بودند تا عامل مداخله کننده کمتری در مطالعه حضور داشته باشد (۱۹، ۳۰).

کتابخانه اولیه مورد استفاده در این مطالعه دارای ۶۶ نوکلئوتید بود که در وسط آن یک توالی ۲۵ نوکلئوتیدی اتفاقی وجود داشت. توالی وسط که نشانگر آپتامر می‌باشد توسط دو ناحیه ۲۰ و ۲۱ نوکلئوتیدی احاطه شده که محل اتصال پرایمرها می‌باشد. برای به دست آوردن آپتامرها بعد از هر چرخه و همچنین تبدیل آنها از محصول دو رشته‌ای PCR به تک رشته مورد نیاز برای چرخه بعد از یک پرایمر رفت بزرگتر که در انتهای خود دارای ۲۰ عدد نوکلئوتید T بود استفاده شد. این دنباله به وسیله spacer-C۳ مانع از حرکت آنزیم در ادامه و بر روی دم پلی T می‌شود. با استفاده از این تکنیک و در نتیجه استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید دو محصول بر روی ژل قابل مشاهده بودند که یکی از آنها ۸۶ باز و دیگری ۶۶ باز داشت. باند ۸۶ بازی به دلیل حضور دنباله poly T در ادامه پرایمر رفت است. اختلاف تعداد باعث ایجاد فاصله بین باند ۶۶ تایی و ۸۶ تایی می‌شود که در نتیجه می‌توان باند ۶۶ تایی را براحتی از ژل جدا نمود.



شکل ۳- A: فلوسایتومتری آپتامرهای منتخب با گروه خونی B. A: فلوسایتومتری آپتامرهای منتخب با گروه خونی O. در هر دو تصویر، شکل سمت چپ نشان دهنده سلول‌های گلبول قرمز بدون آپتامر می‌باشد. تصویر وسط مربوط به RNV543 و شکل سمت راست RNV544 است. اعداد و میزان شیفت دیده شده در این تصاویر حاکی از عدم اتصال این سلول‌ها به گلبول قرمز دارای آنتی‌ژن B است.

and its application in cancer diagnosis and therapy. *International journal of molecular sciences* 17: 2079.

5- Chen, Z., Z. Ali, S. Li, B. Liu and N. He. 2016. Aptamers generated from cell-systematic evolution of ligands through exponential enrichment and their applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16: 9346-9358.

6- Cooling, L. 2015. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clinical microbiology reviews* 28: 801-870.

7- Daštjerdi, K., G. H. Tabar, H. Dehghani and A. Haghparast. 2011. Generation of an enriched pool of DNA aptamers for an HER2-overexpressing cell line selected by Cell SELEX. *Biotechnology and applied biochemistry* 58: 226-230.

8- Dean, L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 2, Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane.

9- Famulok, M., J. S. Hartig and G. Mayer. 2007. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chemical reviews* 107: 3715-3743.

10- Gopinath, S. C. B. 2007. Methods developed for SELEX. *Analytical and bioanalytical chemistry* 387: 171-182.

11- <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/aptamer-technology.asp> and 2014. MarketsandMarkets,.

12- Hung, L.-Y., C.-H. Wang, K.-F. Hsu, C.-Y. Chou and G.-B. Lee. 2014. An on-chip Cell-SELEX process for automatic selection of high-affinity aptamers specific to different histologically classified ovarian cancer cells. *Lab on a Chip* 14: 4017-4028.

13- Jayasena, S. D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry* 45: 1628-1650.

14- Keefe, A. D., S. Pai and A. Ellington. 2010. Aptamers as therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 9: 537.

15- Kourlas, H. and D. S. Schiller. 2006. Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review. *Clinical therapeutics* 28: 36-44.

16- Li, W.-M., T. Bing, J.-Y. Wei, Z.-Z. Chen, D.-H. Shangguan and J. Fang. 2014. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells. *Bio-materials* 35: 6998-7007.

17- Lipi, F., S. Chen, M. Chakravarthy, S. Rakesh and R. N. Veedu. 2016. In vitro evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies. *RNA biology* 13: 1232-1245.

18- Lundin, K. E., O. Gissberg and C. E. Smith. 2015. Oligonucleotide therapies: the past and the present. *Human gene therapy* 26:

دقیق قابل انجام نبود. میزان اختصاصیت و همچنین اتصال دو گزینه انتخاب شده در آپتامرها با انجام فلوسایتومتري با گروه‌های خونی A و O ادامه پیدا کرد که این دو آپتامر اتصال را نشان ندادند که نشانگر اختصاصیت آن برای گروه B می‌باشد، بدین صورت که آپتامرهای منتخب با سلول‌های دارای آنتی ژن A و O انکوبه شده و در فلوسایتومتري شرایطی دقیقاً مشابه سلول‌های دارای آنتی ژن B با آپتامرها را داشتند. اما در نتایج فقط اتصال به گروه دارای آنتی ژن B دیده شد. کتابخانه مورد استفاده در این تحقیق نیز با سلول‌ها انکوبه شد و فلوسایتومتري بر روی آن انجام گردید که اتصال دیده شده در فلوسایتومتري معنی‌دار نبود.

### نتیجه‌گیری کلی

به صورت خلاصه در این مطالعه دو آپتامر برای گروه خونی B انسان شناخته شدند که اختصاصیت بالایی نسبت به هدف خود دارند. لازم به ذکر است که این مطالعه مقدمه‌ای بر مراحل بعدی است که نیاز به شناسایی آپتامر برای سایر گروه‌های خونی و همچنین بررسی شرایط حضور آپتامرها در خون دارد. البته با توجه به نتایج به دست آمده این اعتقاد وجود دارد که دو آپتامر RNV543 و RNV544 می‌توانند به دارو متصل گشته و به عنوان حامل مناسب در سیستم قلبی عروقی به کار روند. برای این هدف نیاز به ایجاد برخی تغییرات شیمیایی بر روی آپتامرها (۳۷) می‌باشد که ایجاد تغییر در ساختار آنها، مانع از بین رفتن این مونومرهای نوکلئوتیدی در خون شود. از نمونه تغییرات شیمیایی انجام شده برای ایجاد مقاومت و پایداری در آپتامر LNA (locked nucleic acid) (۳۳-۳۵) یا استفاده از inverted dt nucleotide cap (۳) می‌باشد. هر چند که بدین منظور باید یک سیستم بازنگری سیستماتیک برای بررسی تغییرات ایجاد شده در ساختمان آپتامر و همچنین کارایی آپتامر طراحی گردد. با توجه به عملکرد مناسب RNV544 در فلوسایتومتري، امید است در آینده‌ای نزدیک این آپتامر به عنوان یک حامل دارویی برای تحقیقات در مراحل بعدی بکار گرفته شود.

### منابع مورد استفاده

1- Aaldering, L. J., H. Tayeb, S. Krishnan, S. Fletcher, S. D. Wilton and R. N. Veedu. 2015. Smart functional nucleic acid chimeras: enabling tissue specific RNA targeting therapy. *RNA biology* 12: 412-425.

2- Birch, C. M., H. W. Hou, J. Han and J. C. Niles. 2015. Identification of malaria parasite-infected red blood cell surface aptamers by inertial microfluidic SELEX (I-SELEX). *Scientific reports* 5: 11347.

3- Chakravarthy, M., M. T. Aung-Htut, B. T. Le and R. N. Veedu. 2017. Novel Chemically-modified DNase targeting Integrin alpha-4 RNA transcript as a potential molecule to reduce inflammation in multiple sclerosis. *Scientific reports* 7: 1613.

4- Chen, M., Y. Yu, F. Jiang, J. Zhou, Y. Li, C. Liang, L. Dang, A. Lu and G. Zhang. 2016. Development of cell-SELEX technology



475-485.

- 19- Mitra, R., N. Mishra and G. P. Rath. 2014. Blood groups systems. *Indian journal of anaesthesia* 58: 524.
- 20- Morris, K. N., K. B. Jensen, C. M. Julin, M. Weil and L. Gold. 1998. High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 2902-2907.
- 21- N.Veedu, R. 2015. Editorial Medicinal Chemistry of Aptamers. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15.
- 22- Nimjee, S. M., C. P. Rusconi and B. A. Sullenger. 2005. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* 56: 555-583.
- 23- Ohno, Y., K. Maehashi and K. Matsumoto. 2010. Label-free biosensors based on aptamer-modified graphene field-effect transistors. *Journal of the American Chemical Society* 132: 18012-18013.
- 24- R Kanwar, J., K. Roy, N. G Maremanda, K. Subramanian, R. N Veedu, R. Bawa and R. K Kanwar. 2015. Nucleic acid-based aptamers: applications, development and clinical trials. *Current medicinal chemistry* 22: 2539-2557.
- 25- Rahimzadeh, K., H. AlShamaileh, M. Fratini, M. Chakravathy, M. Stephen, S. Shigdar and R. N. Veedu. 2017. Development of Cell-Specific aptamers: Recent advances and insight into the selection procedures. *Molecules* 22: 2070.
- 26- Rossi, L., S. Serafini, F. Pierigé, A. Antonelli, A. Cerasi, A. Fraternali, L. Chiarantini and M. Magnani. 2005. Erythrocyte-based drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* 2: 311-322.
- 27- Sefah, K., Z. Tang, D. Shangguan, H. Chen, D. Lopez-Colon, Y. Li, P. Parekh, J. Martin, L. Meng and J. Phillips. 2009. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* 23: 235.
- 28- Souza, A. G., K. Marangoni, P. T. Fujimura, P. T. Alves, M. J. Silva, V. A. F. Bastos, L. R. Goulart and V. A. Goulart. 2016. 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. *Experimental cell research* 341: 147-156.
- 29- Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz. 2007. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering* 24: 381-403.
- 30- Storry, J. and M. L. Olsson. 2009. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* 25: 48.
- 31- Thiel, W. H., K. W. Thiel, K. S. Flenker, T. Bair, A. J. Dupuy, J. O. McNamara, F. J. Miller and P. H. Giangrande. Section. 2015. Cell-internalization SELEX: method for identifying cell-internalizing RNA aptamers for delivering siRNAs to target cells. 187-199. RNA Interference. Springer;
- 32- Veedu, R. N. 2017. Aptamers: Tools for Nanotherapy and Molecular Imaging. CRC Press.
- 33- Veedu, R. N. and J. Wengel. 2009. Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agents. *RNA biology* 6: 321-323.
- 34- Veedu, R. N. and J. Wengel. 2009. Locked nucleic acid nucleoside triphosphates and polymerases: on the way towards evolution of LNA aptamers. *Molecular Biosystems* 5: 787-792.
- 35- Veedu, R. N. and J. Wengel. 2010. Locked nucleic acids: promising nucleic acid analogs for therapeutic applications. *Chemistry & biodiversity* 7: 536-542.
- 36- Wang, Y., Y. Luo, T. Bing, Z. Chen, M. Lu, N. Zhang, D. Shangguan and X. Gao. 2014. DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer. *PLoS One* 9: e100243.
- 37- Zhou, J. and J. Rossi. 2017. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature reviews Drug discovery* 16: 181.
- 38- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31: 3406-3415.

