مقاله پژوهشی

Design and construction of recombinant oncolytic adenoviruses for the treatment of gastric cancer cell lines: a viral vector-based approach

Najmeh Yarkeh Salkhori[1], Taghi Naserpour Farivar[2*], Jamileh Noroozi[1], Reza Najafipour[2], Parviz Pakzad[1], Safar Ali Alizadeh[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, IR Iran.
2. Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, IR Iran

Abstract

Aim and Background: Oncolytic viral therapy is known as promising approach for cancer treatment. Oncolytic viruses like adenoviruses can proliferate in cancerous cell and disintegrated these cells. Serotype 5 adenovirus attached on surface of host cell via coxsackie-adenovirus receptors. The expression rate of this receptor is highly variable in surface of cancerous cells. The aim of the present study was production of an oncolytic adenoviruses with high selectivity feature for gastric adenocarcinoma cells (AGS) that can proliferate in this cell and destroy them.

Material and methods: In this experimental study, the octreotate sequence was cloned into HI-loop of the adenovirus fiber. Thus, the pAd5TATE (wt) and pAd5TATE (ΔE1, ΔE3) recombinant vectors were constructed. pAdZ-TATE (wt) vector was synthesized using pADZ cloning system. Ad5TATE (wt) and Ad5TATE (ΔE1, ΔE3) recombinant viral particles were synthesized and propagated in HEK293 cells. Using the calcium phosphate procedure, the HEK293 cell line was transfected with the recombinant vectors and the new virus particles were produced. The AGS cell line was transfected by the Ad5 (wt) and Ad5TATE (wt) and the cell destruction of these cells were investigated in different times. Using the MTT test the cell surveillance rate was evaluated in AGS cell line that treated with recombinant vector. Cell destruction effects (CPE) started in less than 18 hours and were completed 72 hours after infection.

Results: The titer of recombinant viruses was calculated by the TCID50 method as 107 (for 100 Lμ of viral solution). Also, Ad5TATE (ΔE1, ΔE3) virus titer was 107 TCID50/ml by the TCID50 method. The results showed that Ad5TATE (wt) could infect AGS cells compared to Ad5(wt). The results of the MTT test showed that with the increase in the concentration of viral particles and storage time, the number of live AGS cells decreased significantly.

Conclusion: The findings of this research showed that the Ad5TATE (wt) recombinant virus could specifically infect gastric adenocarcinoma (AGS) cancer cells and destroy them after replication. Therefore, the Ad5TATE (wt) virus can be used as an oncolytic agent against gastric adenocarcinoma (AGS) cancer cells.

Keywords: adenovirus, oncolytic octreotate, gastric adenocarcinoma virus, cell line, Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

Corresponding author:
Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, IR Iran.
Email: biopromeda@gmail.com

طراحی و ساخت آدنوویروس های نوترکیب انکولیتیک به منظوردرمان رده‌های سلولی سرطان معده: رویکرد مبتنی بر وایرال وکتور

نجمه یارکه سلخوری [۱]، تقی ناصرپور فریور [۲*]، جمیله نوروزی [۱]، رضا نجفی پور [۲]، پرویز پاکزاد [۱]، صفرعلی علیزاده [۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس درمانی انکولیتیک به‌عنوان راهکاری نویدبخش برای درمان سرطان شناخته می‌شود. ویروس‌های انکولیتیک مانند آدنوویروس‌ها قادرند در سلول‌های سرطانی تکثیر و آن‌ها را متلاشی کنند. آدنوویروس سروتیپ ۵ ازطریق گیرنده کوکساکی-آدنوویروس به سطح سلول‌های میزبان متصل می‌شود. میزان بیان این گیرنده در سطح سلول‌های سرطانی بسیار متغییر است. هدف از این مطالعه، ساخت آدنوویروس انکولیتیک با ویژگی انتخابی بالا برای سلول‌های آدنوکارسینومای معده(AGS) بوده که قادرند در این سلول‌ها تکثیر و آن‌ها را تخریب کنند.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، توالی اکتروتات در ناحیه HI-loop فیبرآدنوویروس کلون گردید و بدین ترتیب وکتورهای نوترکیب pAd5TATE(wt) و pAd5TATE(ΔE1,ΔE3) ساخته شدند. وکتور pAdZ-TATE(wt) با استفاده از سیستم کلونینگ pADZ سنتز شد. ذرات ویروسی نوترکیب Ad5TATE(wt) و Ad5TATE(ΔE1,ΔE3) سنتز شد و در سلول‌های HEK293 تکثیر شد. با استفاده از روش کلسیم فسفات، وکتورهای نوترکیب به رده سلولی HEK293 منتقل و بدین ترتیب ذرات ویروسی جدید تولید شد. رده سلولی AGS با ویروس Ad5(wt) و Ad5TATE(wt) آلوده شدند و در زمان‌های مختلف، بروز اثرات تخریب سلولی در این سلول‌ها بررسی شد. با استفاده از آزمونMTT، میزان بقای سلولی در رده سلولی AGS تیمار شده با ویروس نوترکیب بررسی گردید.

یافته‌ها: اثرات تخریب سلولی(CPE) در کمتر از ۱۸ ساعت شروع و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی کامل گردید. تیتر ویروس‌های نوترکیب با روش TCID50 برابر$۱۰^{۷}$ (برای µL ۱۰۰ از محلول ویروسی) محاسبه شد. همچنین تیتر ویروس Ad5TATE(ΔE1,ΔE3) با روش TCID50 برابر $۱۰^{۷}$ TCID50/ml بود. نتایج نشان‌داد، Ad5TATE(wt) در مقایسه با Ad5(wt)، توانایی آلوده‌سازی سلول-های رده AGS را دارد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد، با افزایش غلظت ذرات ویروسی و زمان نگهداری، تعداد سلول‌های زنده AGS به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد، ویروس نوترکیبAd5TATE(wt) قادر است به صورت اختصاصی سلول‌های سرطانی رده سلولی آدنوکارسینوما معده (AGS) را آلوده و پس از تکثیر، آن ها را متلاشی کند. لذا می‌توان از ویروس Ad5TATE(wt) به‌عنوان عامل انکولیتیک علیه سلول‌های سرطانی رده سلولی آدنوکارسینوما معده(AGS) استفاده کرد.

واژگان‌کلیدی: آدنوویروس، ویروس انکولیتیک، اکتروتات، رده سلولی آدنوکارسینوما معده، Iau Science.

نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین ، قزوین ، ایران
پست الکترونیکی: biopromeda@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

مقدمه

سرطان نوعی بیماری ژنتیکی بوده که می‌تواند به شکل خوش‌خیم و بدخیم باشد و عوامل متعددی در بروز آن نقش دارند (۱،۲). سرطان معده به عنوان سومین عامل مرگ حاصل از سرطان در جهان محسوب می‌شود (۳). در ایران سرطان معده در مردان پس از پوست در رتبه دوم قرار دارد و در زنان در رتبه چهارم است (۴). آدنوکارسینوما، شایع‌ترین نوع سرطان معده بوده و مسئول ۹۵-۹۰ درصد از سرطان‌های معده است (۵). سرطان معده ممکن است با یکی از روش‌های جراحی، شیمی-درمانی و پرتودرمانی یا به صورت ترکیبی با سایر روش ها درمان شود (۶)؛ اما اشکال اصلی این درمان‌ها، اثرات جانبی و همچنین ناکارآمدی در درمان برخی از انواع سرطان‌ها می‌باشد (۷). بنابراین نیاز به روش‌های درمانی جدید با اثرات جانبی کمتر و سمیت بیشتر بر سلول های سرطانی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به ژن‌درمانی، حرارت درمانی، انکوتراپی یا ویروس-درمانی با تأثیری اختصاصی بر سلول‌های سرطانی اشاره کرد (۸،۹). استفاده از ویروس‌های انکولیتیک، راهکاری نوین در درمان سرطان‌های انسانی است (۱۰). ویروس‌های انکولیتیک قادرند به‌طور ویژه در سلول‌های سرطانی، تکثیر و آن‌ها را تخریب نمایند و از سوی دیگر اثر ناچیزی بر سلول‌های طبیعی داشته باشند (۱۱،۱۲). به انواع مختلفی از ویروس‌های انکولیتیک مثل آدنوویروس‌ها، ویروس *هرپس‌سیمپلکس*، سرخک، رئوویروس و لنتی‌ویروس می‌توان اشاره کرد (۱۶-۱۳). آدنوویروس‌ها، ویروس‌های DNA دار دو رشته‌ای خطی با تقارن بیست‌وجهی و بدون پوشش لیپیدی می‌باشند (۱۷). همانندسازی DNA ویروس در هسته سلول میزبان انجام می‌گیرد (۱۸). آدنوویروس تیپ۵ به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان عامل انکولیتیک جهت درمان سرطان استفاده می‌شود (۱۹). یکی از عوامل محدوده کننده استفاده از این ویروس در درمان سرطان آن است که، عفونت ویروس به سطح بیان گیرنده CAR بر روی سلول‌های هدف وابسته می‌باشد (۲۰). این گیرنده در سطح سلول‌هایی مانند سلول‌های اپی‌تلیال، نورون‌ها و استروسیت‌ها به میزان بالایی بیان می‌شوند؛ درحالی که میزان بیان این گیرنده در سطح سلول‌های سرطانی بسیار متغییر است. بسیاری از سلول‌های سرطانی،گیرنده CAR را به میزان کمی بیان می‌کنند. برای رفع این مشکل، می توان آدنوویروس‌ها را به نحوی دستکاری ژنتیکی کرد که از طریق مکانیسمی مستقل از گیرنده CAR، قادر به آلودگی سلول‌های سرطانی باشد. برای رفع این مشکل، ناحیه فیبر آدنوویروس را می‌توان به گونه‌ای تغییر داد که از مسیری مستقل از گیرنده CAR، قادر به آلوده کردن سلول‌های هدف باشد(۲۰-۱۷). اکتروتات، یکی از مکمل‌های سوماتوستاتین است که توانایی اتصال به گیرنده-های سوماتوستاتین خصوصاً گیرنده‌های SSTR2، SSTR5 را دارد. این گیرنده‌ها در انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی بیان می‌شوند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که این گیرنده‌ها باعث مرگ سلولی و فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در سلول‌های سرطان معده می‌گردد (۲۰). راهکارهای مختلفی نظیر شیمی درمانی، تخلیه لنفوسیت‌های T، آنتی بادی های مونوکلونال، کورتیکواستروئیدها و سایر داروهای سرکوبگر ایمنی به منظور کاهش بروز علایم سرطان استفاده می‌شوند که عموماً موجب افزایش احتمال عود سرطان و بروز عفونت‌های مختلف در بیماران می‌شوند. مطالعات اخیر، ویروس درمانی با ویروس‌های انکولیتیک را به عنوان راهکاری امیدبخش در زمینه جلوگیری از بروز بیماری سرطان و تقویت اثرات واکنش پیوند علیه تومور معرفی کرده اند. ویروس های انکولیتیک ویروس‌های غیر بیماری زایی هستند که قادر به لیز انتخابی سلول های سرطانی می باشند. این دسته از ویروس‌ها قادر به تفکیک اختصاصی میان لنفوسیت‌های T آلوژن و سلول‌های بنیادی خون‌ساز بوده و سبب ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های T آلوژن می‌شوند (۲۱). ویروس‌های انکولیتیک، درون سلول سرطانی فقط تکثیر می‌شوند (۲۲) و یا به‌طور طبیعی این توانایی را دارند و یا به واسطه مهندسی ژنتیک، این توانایی در آن‌ها ایجاد شده است (۲۳،۲۴). هدف از این پژوهش، ساخت آدنوویروس نوترکیب بود که به طور اختصاصی قادر به آلوده کردن و تخریب سلول‌های رده AGS بودند. بدین منظور، توالی اکتروتات که آنالوگ پپتیدی از سوماتوستائین می‌باشد و در شرایط بیولوژیکی، ثبات بیشتر و میل ترکیبی بالایی به زیرتیپ ۲ گیرنده سوماتوستائین ازخود نشان می دهد، در ناحیه HI-loop برآمدگی فیبر کلون شد و بدین ترتیب آدنوویروس نوترکیب توانست از مسیری مستقل از گیرنده Coxsackie-Adenovirus Receptor (CAR؛ که اتصال آدنوویروس به سلول‌ها از طریق گیرنده CAR صورت می‌گیرد) سلول‌های رده AGS را آلوده کند و سپس آن‌ها را تخریب نماید. در واقع، هدف از این مطالعه، طراحی و ساخت آدنوویروس نوترکیبی بود که از مسیری مستقل از گیرنده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

CARقادر به آلوده کردن و تخریب رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS) باشد.

مواد و روش‌ها

۲-۱. تهیه سازواره ها

در این مطالعه آدنوویروس تیپ ۵ به صورت هدیه از دکتر بابک نگاهداری دانشگاه تهران، پلاسمیدpFiber و وکتور pAdEasySceI از طرف دکتر PJ.Bosma دانشگاه آمستردام، هلند به صورت هدیه دریافت شد. اکمید-pAdZ CV5-E3+ و باکتری SW102 به صورت هدیه از دکتر Richard James Stanton دانشگاه کاردیف انگلستان تهیه شد. پلاسمیدpAdIRES-GFP و باکتری BJ5183 به صورت هدیه از دکتر صبا، دانشگاه تربیت مدرس و باکتری Steller به صورت هدیه از دکتر صفرعلی علیزاده دانشگاه علوم پزشکی قزوین تهیه شد.

ساخت قطعه اکتروتات

از آنجایی که قطعه اکتروتات حدود ۲۴ جفت باز (۸ اسیدآمینه) است، لذا به کمک PCR قابل تکثیر نمی‌باشد. بنابراین، جهت کلون کردن قطعه مورد نظر از روش ساخت مصنوعی قطعه DNA (ساخت دایمر) استفاده شد. پرایمر F: 5′-CGAATTTTGCTATTGGAAAACCTGCACCAT-3′ و R: 5′-CGATGGTGCAGGTTTTCCAATAGCAAAATT-3′ به اندازه طول کامل قطعه مورد نظر همراه با جایگاه‌های برش آنزیم‌های BstBI و ClaI طراحی و سنتز شد (پیشگام، ایران). آب دوبار تقطیر با هم مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. سپس در گستره دمایی ۲۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس، کاهش دما به میزان ۰/۱ درجه به ازای هر ثانیه، انجام شد. دایمر نهایی ایجاد شده بدون نیاز به انجام هضم، به عنوان قطعه وارد شونده، استفاده شد.

۲-۲. کلون کردن توالی اکتروتات (TATE) به درون وکتور pFiber

جهت کلون کردن قطعه اکتروتات، ابتدا پلاسمید pFiber با استفاده از آنزیم BstBI خطی شد. میکروتیوب به مدت ۱ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. محصول هضم آنزیمی روی ژل ۱ درصد آگاروز، الکتروفورز و بررسی گردید. پلاسمید خطی شده با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگاروز (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) تخلیص و غلظت آن با دستگاه نانودراپ تعیین شد. به منظور اتصال قطعه TATE به پلاسمید، بر اساس فرمول زیر نسبت وکتور خطی شده به قطعه وارد شونده (مقدار نانوگرم موردنیاز برای قطعه وارد شونده) محاسبه گردید.

فرمول ۱: Insert (ng) = 3 × [insert (bp)/vector (bp)] × vector (ng)

با توجه به دستورالعمل کیت T4 DNA Ligase شرکت پرومگا، عمل اتصال مطابق با جدول ۱ انجام گردید. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس جهت غیرفعال شدن آنزیم لیگاز نگهداری شد. محصول حاصل به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* سویه شایسته شده Steller وارد گردید. بعد از کشت بر روی پلیت‌های LB آگار حاوی آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین، پلیت‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جدول ۱. کلونینگ قطعه TATE در پلاسمید خطی pFiber.

مواد	مقدار
قطعه اکتروتات (دایمر ساخته شده از قطعه مورد نظر)	۱ میکرولیتر
پلاسمید pFiber خطی و خالص‌سازی شده	۳ میکرولیتر
بافر آنزیم لیگاز 10x	۲ میکرولیتر
آنزیم لیگاز	۱ میکرولیتر
آب دوبار تقطیر	۱۳ میکرولیتر
حجم کل	۲۰ میکرولیتر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

۲-۳. تأیید حضور توالی TATE در پلاسمید

در این روش پس از استخراج DNA پلاسمیدی، آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه، چند کلنی از پلیت حاوی آمپی‌سیلین انتخاب و هر یک به‌صورت جداگانه در محیط LB مایع، کشت داده شد. ابتدا از هر یک از لوله‌های کشت، نمونه پشتیبان تهیه گردید. لوله‌های کشت به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۸۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی حذف و رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و استخراج DNA پلاسمیدی از نمونه‌ها با استفاده از کیت Favergen (تایوان) انجام شد. برای ردیابی توالی مذکور واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۱۳ میکرولیتر مسترمیکس (یکتاتجهیزآزما، ایران)، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهایF و R، ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه و ۹ میکرولیتر آب مقطر استریل تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر قطعات ژنی فوق شامل یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪، الکتروفورز و بررسی شد. سپس با روش توالی‌یابی وجود قطعه TATE در پلاسمید pFiber تأیید نهایی گردید.

۲-۴. تکثیر قطعه ژنی E1، کاست ژنی als و قطعه حاوی توالی اکتروتات

برای تکثیر قطعه ژنی E1 توسط واکنش PCR، از پرایمرهای F:3′-GATTTGGCCATTTTCGCGGG-5′ و R:3′-GGCGGCTGCTGCAAAACAGAT-5′. و ویروس Ad5(wt) استفاده شد. پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪، الکتروفورز و بررسی شدند و مناسب‌ترین شرایط PCR انتخاب گردید. همچنین برای تکثیر کاست ژنیals از باکمید+pAdZ-CV5-E3 به عنوان DNA الگو و از پرایمرهای als-F:ACTAAACCTGTAACACTAACCATTACACTAAACGGTACACCCTGTGACGGAAGATCACTTCG و als-R:GGATGTGGCAAATATTTCATTAATGTAGTTGTGGCCTGAGGTTCTTATGGCTCTTG که در انتهاهای خود دارای نواحی مشابه به طول ۵۰ جفت باز با ناحیه HI–loop برآمدگی فیبر هستند، استفاده شد. واکنش مولکولی PCR انجام گردید و سپس قطعه ژنی تکثیر یافته با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگاروز تخلیص گردید. برای تأیید صحت تکثیر، قطعه ژنی با شش پرایمر طراحی شده در جدول ۲ تعیین توالی گردید.

جدول ۲. پرایمرهای مورداستفاده در تعیین توالی قطعه als.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (۳′-۵′)
ALS-F-1	ACTAAACCTGTAACACTAAC
ALS-F-2	CTTACTTCTGAC AACGATC
ALS-F-2	CTTTACACTTTATGCTTCC
ALS-F-3	GTTATCCGCTC ACAAT
ALS-F-3	CTGTCTGATGCTGATACG
ALS-F-4	AC GGCAAACAAA CACTGAC
ALS-F-4	GGATGTGGCAAATATTTC

برای تکثیر قطعه حاوی توالی اکتروتات (TATE) در ناحیه HI-loop، از پلاسمید pFiber-TATE به عنوان الگو و از پرایمرهای طراحی‌شده TATE-F/R استفاده گردید. واکنش PCR با استفاده از پرایمر Oct-F:5′-GCAGCGGATAAGGCAATT-3′ و Oct-R:5′-CGATCTACTCTACAGTGTAATT-3′ مطابق با

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

پروتکل های فوق انجام شد. سپس قطعه تکثیر یافته از روی ژل برش و با استفاده از کیت استخراج از ژل تخلیص شد.

۲-۵. ساخت وکتور آدنوویروسی توسط سیستم کلونینگ ADZ

۲-۵-۱. مرحله اول نوترکیبی

شایسته کردن سلول‌های SW102، طبق روش ارائه شده توسط دکتر Richard James Stanton و همکاران (۳۶ و ۳۷) انجام شد. برای تأیید حضور ژن E1 در کلنی‌های سفید، واکنش کلنی PCR انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ٪۱، الکتروفورز گردید. جهت تأیید نهایی، کلنی‌های سفید بر روی محیط کشت LB دارای آمپی‌سیلین کشت داده شدند. از کلنی-های مثبت حاوی pAdZ(wt) نمونه ذخیره در گلیسرول تهیه و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۵-۲. مرحله دوم نوترکیبی

در این مرحله کاست ژنی als (مقاومت به آمپی‌سیلین (amp_r)، β-گالاکتوزیداز (lacZα) و حساسیت به ساکروز (sacB)) در ناحیه HI-Loop برآمدگی فیبر باکمیدpAdZ(wt) قرار داده شد. بدین ترتیب، باکتری حاوی pAdZ(wt) شایسته گردید. سپس در مرحله بعد، محصول PCR (کاست ژنی als) از طریق الکتروپوریشن به سلول‌های شایسته شده منتقل شد. بعد از اتمام الکتروپوریشن، ۱میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع به کووت اضافه گردید و سپس محتویات کووت به میکروتیوب منتقل شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۲ درجه در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. مقدار۵۰ میکرولیتر باکتری ترانسفورم شده به درون پلیت LB آگار حاوی ٪۵ ساکاروز، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین کشت داده شد و به مدت ۴۸-۳۰ ساعت در دمای ۳۲ درجه سلسیوس نگهداری شد. در نهایت، برای تأیید حضور کاست ژنی als واکنش PCR انجام گردید. با استفاده از کیت استخراج DNA باکمید نوترکیب pAdTATE(wt) از باکتری استخراج شد. تخلیص DNA باکمید با روش ایزوپروپانول انجام گردید. در نهایت، باکمید pAdTATE(wt)در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

۲-۵-۳. مرحله سوم نوترکیبی

در این مرحله، توالیTATE جایگزین کاست ژنی als در ناحیه HI-loop فیبر pAdZ(als HI-Loop) شد. بدین ترتیب، باکتری‌های نوترکیب مرحله دوم شایسته شدند. سپس محصول PCR توالی TATE از طریق الکتروپوریشن به سلول‌های شایسته شده منتقل گردید. پس از انجام ترانسفورماسیون، ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB به کووت اضافه شد. محتویات کووت به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB انتقال یافت. فالکون به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۲ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر باکتری به درون پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل ریخته و به مدت ۴۸-۳۰ ساعت در دمای ۳۲ درجه نگهداری شد. کلنی‌های سفید در بین کلنی‌های آبی‌رنگ مشاهده گردید. جهت تأیید صحت کلونینگ، باکتری‌های مثبت بر روی محیط کشت LB آگار دارای آمپی‌سیلین کشت داده شدند. همچنین واکنش PCR انجام گردید.

۲-۶. ساخت وکتور(ΔE3 وΔE1)-pAdEasy-Sce TATE با استفاده از سیستم کلونینگ pAdEasy-Sce

برای شایسته کردن باکتری *E. coli* سویه Steller از کلسیم کلراید استفاده شد. سپس مقدار ۲ میکرولیتر DNA پلاسمیدی به ۵۰ میکرولیتر از باکتری شایسته شده، افزوده و پس از مخلوط کردن آن‌ها، DNA پلاسمیدی به روش شوک حرارتی وارد سلول باکتری شد. حاصل ترانسفورماسیون در پلیت های LB آگار حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های شایسته به عنوان نمونه کنترل منفی به محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین و محیط LB فاقد آنتی-بیوتیک منتقل شد.

۲-۷. تولید ذرات ویروسی در سلول‌های HEK293

آلوده سازی رده سلولی HEK293 با وکتورهای آدنوویروسی نوترکیب و تولید اولیه ذرات ویروسی با استفاده از تکنیک کلسیم فسفات انجام شد. به طور خلاصه، تعداد ۲×۱۰۶ سلول به درون فلاسک حاوی محیط DMEM کامل منتقل گردید و در انکوباتور۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO2 نگهداری شد. تراکم سلولی در زمان انتقال حدود ۷۰ درصد بود. ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۱۰ میکرولیتر کلسیم فسفات ۲ مولار به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

درون میکروتیوب استریل ریخته و سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از DNA ویروسی قطره قطره به محلول اضافه شد. ۵۲ میکرولیتر کلسیم فسفات۲ مولار به مخلوط افزوده و با چند بار پی‌پتاژ محلول به خوبی مخلوط گردید. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول HBS2X به لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و سپس مخلوط حاصل از مرحله قبل قطره قطره به آن اضافه گردید. پس از چند مرتبه پی‌پتاژ (۵ ثانیه) به طور کامل مخلوط شد. کلسیم فسفات/ DNA قطره قطره به فلاسک حاوی سلول سریع اضافه شد. سپس فلاسک به آرامی تکان داده و DNA ویروسی در تمام فلاسک پخش شد. فلاسک به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵٪ CO2 نگهداری شد. محیط کشت فلاسک با محیط کشت DMEM کامل تازه تعویض شد و حدود ۱۵-۱۲روز پس از ترانسفکشن با استفاده از میکروسکوپ معکوس، اثرات آسیب سلولی (CPE) در فلاسک کشت بررسی گردید. پس از مشاهده اثرات آسیب سلولی، سلول‌ها با ضربه آرام دست جمع‌آوری شده و محیط کشت همراه با سلول‌های آلوده به درون لوله ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. به منظور متلاشی شدن سلول‌های آلوده، ۴ بار چرخه انجماد-ذوب- ورتکس به ترتیب، انجماد سلول‌ها در حمام یخ خشک/ متانول، ذوب در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ورتکس (۳۰ ثانیه) انجام گردید. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت g ۵۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی که دارای ذرات ویروسی بود به لوله جدید منتقل و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در این شرایط ویروس نوترکیب به مدت طولانی‌تری پایدار خواهد بود.

۲-۸. تعیین ضریب آلودگی بهینه (MOI)

ضریب آلودگی بهینه (MOI: Multiplicity of infection)، در واقع نسبت تعداد ذرات ویروسی به ازای یک سلول را نشان می‌دهد (۳۸). از این رو، حجم مناسب ویروس جهت آلوده نمودن سلول‌های رده HEK293 بر مبنای ضریب آلودگی تعیین شد. به طور خلاصه، سلول‌های HEK293 به میزان ۲×۱۰^{۶} در هر چاهک پلیت شش‌خانه کشت داده شد. روز آلوده‌سازی، محیط کشت تخلیه و ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به هر چاهک اضافه گردید. مقادیر ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی حاوی ویروس به چاهک‌ها اضافه گردید. یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. فلاسک به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO2 نگهداری شد. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت جدید به هر چاهک اضافه گردید و پلیت به مدت ۴-۳ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO2 نگهداری گردید. هر روز با استفاده از میکروسکوپ معکوس، اثرات سیتوپاتیک سلول‌ها در هر چاهک بررسی شد. برای هر ضریب آلودگی، ۳ چاهک با شرایط یکسان در نظر گرفته شد. سپس، سرعت تخریب سلول‌ها به واسطه تکثیر ویروس در زمان‌های مختلف برای تعیین ضریب آلودگی مناسب ارزیابی گردید.

۲-۹. تعیین تیتر ویروس‌های نوترکیب با روش TCID50

TCID50 (Median Tissue Culture Infectious Dose) ، مقدار ویروسی (در واحد میلی‌لیتر) که توانایی ایجاد اثرات سیتوپاتیک در ۵۰ درصد سلول‌های تلقیح شده را دارد، اطلاق می‌گردد (۳۸-۳۵). به بیان دیگر، این روش مقدار ویروس مورد نیاز برای از بین بردن ۵۰ درصد سلول‌های آلوده را تعیین می‌کند. برای محاسبه TCID50 ویروس‌های نوترکیب از روش Karber استفاده گردید. سلول‌های HEK293 به مقدار ۲×۱۰^{۶} سلول در هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد. رقت‌های متوالی از ۱-۱۰ تا ۹-۱۰ برای ویروس نوترکیب تهیه گردید. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO۲ نگهداری شدند. بعد از گذشت حدود ۴ تا ۱۰ روز با استفاده از میکروسکوپ معکوس، اثرات CPE در پلیت‌ها بررسی گردید. چاهک‌های حاوی CPE، مثبت و چاهک‌های فاقد CPE، منفی گزارش شدند و با استفاده از فرمول Karber تعداد کل ویروس‌های موجود در نمونه ذخیره تعیین گردید.

فرمول ۲. فرمولKarber برای محاسبه تیتر ویروس

$$T= 101+D (S - 0.5)$$

D= log 10 of the dilution

S=حاصل جمع نسبت‌ها

۲-۱۰. تأیید وجود توالی اکتروتات در ویروس Ad5TATE(wt) و Ad5TATE(ΔE1,ΔE3)

برای تأیید وجود توالی اکتروتات در ویروس‌های نوترکیب، واکنش PCR انجام شد. ابتدا توسط کیت High Pure Viral nucleic acid Kit، DNA ویروس از نمونه‌ها تخلیص شد. در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

این روش، ابتدا سلول‌ها متلاشی شده و در حضور غلظت بالا از نمک‌های کائوتروپیک و pH کمتر از ۷/۵، DNA ویروس به غشاء سیلیکا ژل متصل می‌شود و مواد اضافی از ستون عبور می‌کند. سپس DNA ویروس خالص توسط آب از سلیکاژل جدا و تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شود. تخلیص DNA ویروس طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. واکنش PCR جهت تأیید حضور توالی TATE انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل ۱٪ آگاروز، الکتروفورز شد.

۲-۱۱. تعیین تیتر ویروس به کمک Real-Time PCR

DNA با وزن مولکولی کم از ۱۰۰ میکرولیتر ویروس استخراج شد و در ۷۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت محلول درآمد. از پلاسمید تخلیص شده با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به عنوان استاندارد استفاده شد و تعداد ذرات ویروس با در نظر گرفتن تعداد جفت بازهای تشکیل دهنده آن محاسبه شد. طول وکتور نوترکیب اصلی ویروس Ad5TATE(wt) با سایز 45230 و ویروس Ad5TATE(ΔE1&ΔE3) با سایز 38000 جفت باز است. تعداد ذرات ویروس در پلاسمید تخلیص شده با استفاده از فرمول ژنوم کپی نامبر و سایت بیوانفورماتیکی https://www.technologynetworks.com محاسبه شد (۳۵-۳۸). نهایتا واکنش Real-Time PCR با استفاده از کیت YTA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای اختصاصی تهیه شده انجام شد. حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتر شامل 0.5 میکرولیتر DNA، 0.5 میکرولیتر پرایمر فوروارد و 0.5 میکرولیتر پرایمر برگشت، ۷,۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۶ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی واکنش شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۵ سیکل در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت دمای MELT از ۵۳ تا ۹۵ درجه بود. برای هر نمونه، واکنش دو مرتبه انجام گرفته و میانگین مقادیر به دست آمده به عنوان مقدار (کمیت) تکثیر برای آن نمونه در نظر گرفته شد. آنالیز آماری با استفاده از آزمون t-test محاسبه گردید.

۲-۱۲. بررسی اثرات ویروس Ad5(wt) و Ad5TATE(wt) بر رشد و تکثیر رده سلولی AGS

جهت بررسی اثر ویروس نوترکیب Ad5TATE (wt) بر روی رشد و تکثیر سلول‌های AGS، از روش رنگ سنجی MTTاستفاده شد. به طور خلاصه، ۲×۱۰۵ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMIبا ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. پلیت کشت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول، ویروس نوترکیب با MOI های مختلف۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ به سلول‌ها اضافه گردید. سپس پلیت داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت از تیمارکردن سلول‌ها با ویروس نوترکیب، محیط کشت داخل هر چاهک دور ریخته و هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شد. به هر چاهک از پلیت کشت، ۱۵۰ میکرولیتر محیط تازه و۱۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. پس از پایان ۴ ساعت، محتوای پلیت دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. پس از۱۰ دقیقه نگهداری، مجدد پلیت به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. سپس جذب نوری توسط دستگاه Elisa reader درطول موج۵۷۰ نانومتر قرائت شد. سلول‌های تیمار نشده با ویروس به عنوان کنترل به‌کار برده شدند.

۲-۱۳. تجزیه و تحلیل آماری نتایج

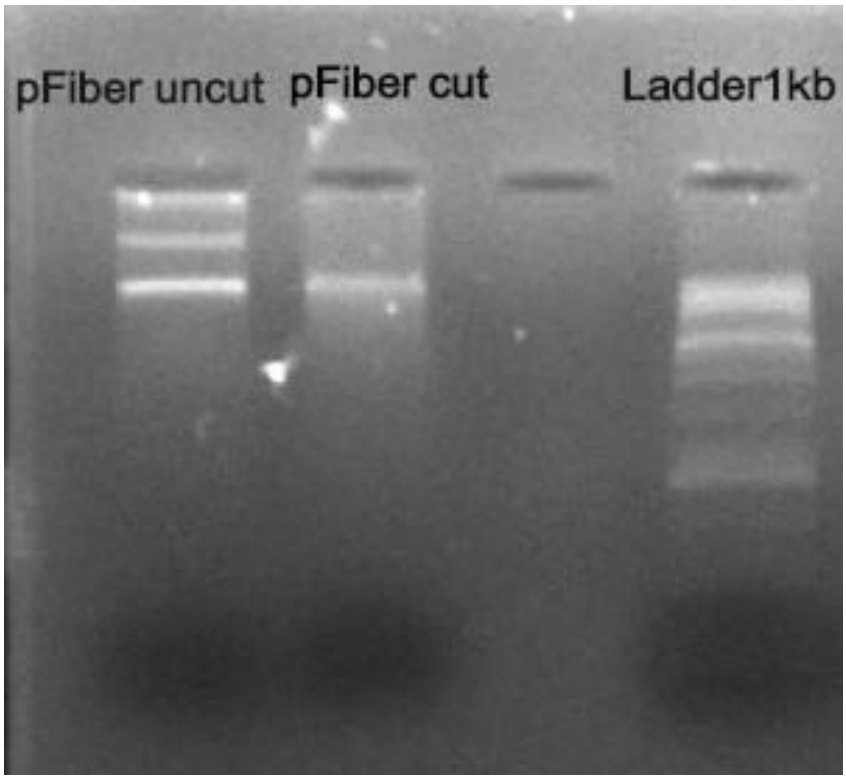
داده‌های حاصل از نتایج به دست آمده در این مطالعه با نرم افزار آماری SPSS ver.16 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد تحلیل شد.

۱. یافته‌ها

۱-۳. نتایج کلون کردن توالی اکتروتات در پلاسمید pFiber

پلاسمید pFiber با فرآیند هضم توسط آنزیم BstBI خطی شد و برای فرآیند الحاق آماده گردید. نتایج الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از تایید خطی شدن پلاسمید، واکنش الحاق توالیTATE در پلاسمید انجام گردید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

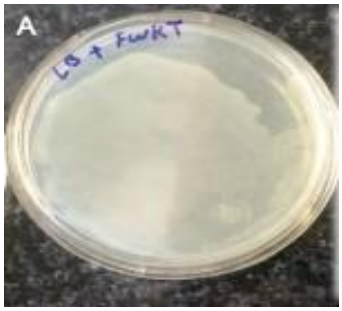
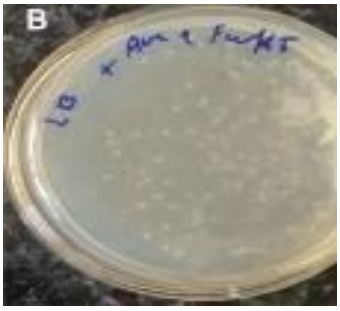
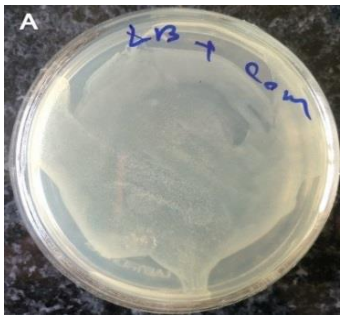
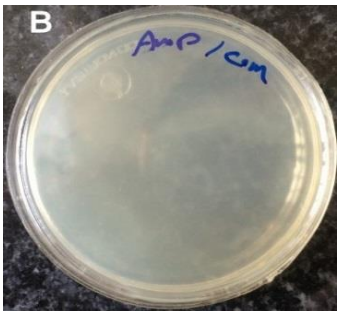


شکل۱. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید pFiber توسط آنزیم BastBI.

۳-۲. نتایج انتقال محصول واکنش الحاق به سلول‌های شایسته شده Steller

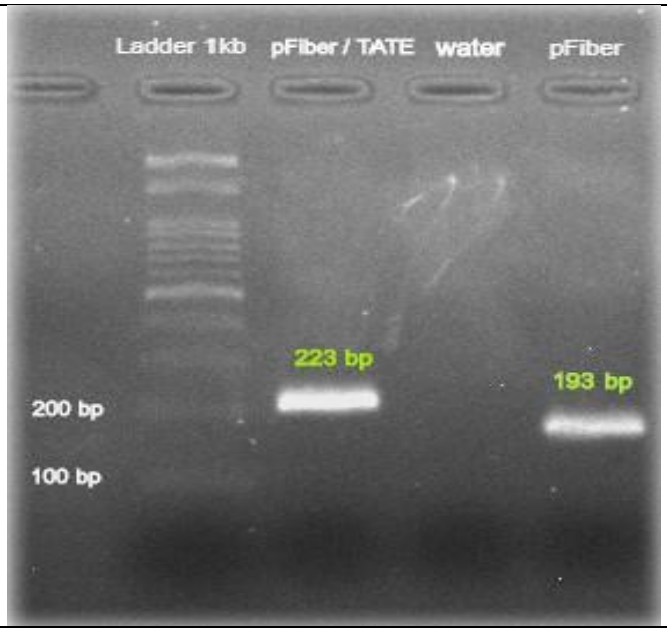
پلاسمید و توالی TATE طبق واکنش الحاق تحت اثر آنزیم لیگاز قرارگرفتند و بعد از اتمام واکنش الحاق، محصول به سلول-های شایسته Steller منتقل گردید. محصـول ترانسـفورم بـرروی پلیـت LB حـاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. از باکتری حاوی پلاسمید pFiber خطی به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. نتایج کشت باکتری حاوی محصول الحاق، ظهور کلنی‌های مقاوم به آمپی‌سیلین بود (شکل ۲).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

	LB آگار	LB آگار+ آمپی‌سیلین
سلول شایسته Steller + محصول الحاق (pFiberTATE)		
سلول شایسته Steller + pFiber خطی		

شکل ۲. نتایج انتقال محصول واکنش الحاق (pFiberTATE) و پلاسمید pFiber خطی شده به سلول‌های شایسته Steller. ردیف اول: رشد باکتری حاوی pFiberTATE. ردیف دوم: عدم رشد باکتری حاوی pFiber خطی در محیط کشت دارای آمپی‌سیلین.

با استفاده از واکنش PCR، ورود توالی TATE در پلاسمید pFiber تأیید شد. صحت کلونینگ با مشاهده باند وزن مولکولی بیشتری نسبت به نمونه شاهد (pFiber) انجام گرفت (شکل۳). جهت تائید نهایی، پلاسمید نوترکیب pFiberTATE استخراج شده، تعیین توالی شد و نتیجه حاصل از آن، کلون شدن توالی اکتروتات در پلاسمید را تایید کرد.

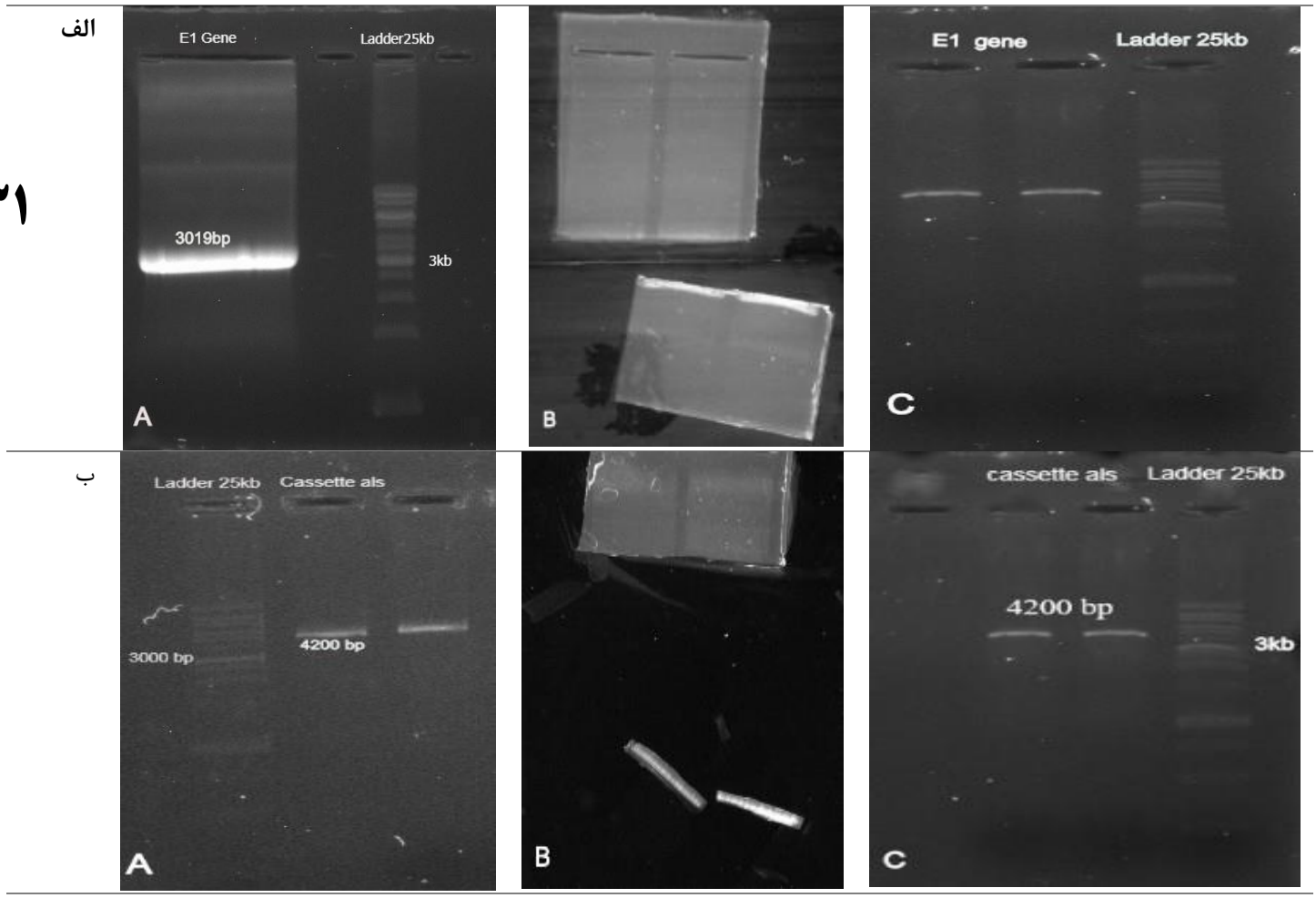


شکل۳. الکتروفورز محصولPCR بر روی ژل آگاروز ۱٪. ستون۱: نشانگر ۱Kb، ستون۲: محصولPCR . کلنی‌های نوترکیب (۲۲۳bp)، ستون۳: نمونه کنترل منفی (آب مقطر) و ستون۴: محصول PCR pFiber (۱۹۳bp)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

۳-۳. نتایج تکثیر قطعه E1 و کاست ژنی als

تکثیـر قطعـهE1 به وسیله واکـنش PCR انجام گردید. نتایج الکتروفورز محصـول PCR، حضور قطعه‌ای بـه طول ۳۰۱۹ جفت باز را نشان داد، این یافته، دلیل بر صحت انجام واکنش PCR و تکثیر قطعه ژنی مورد نظر بود. با اسـتفاده از کیـت تخلیص از ژل فرمنتاز، قطعـه ژنی مورد نظر استخراج شد. پس از تأیید نتیجه تخلیص، قطعه تعیین توالی شد و نتایج حاصل از آن، صحت تکثیـر قطعـه ژنیE1 را تایید کرد (شکل ۴ الف). تکثیـر کاست ژنی als نیز توسط واکنش PCR انجام شد. نتایج الکتروفورز محصـول PCR، بانـدی بـه اندازه ۴۲۰۰ جفت باز را نشان داد. قطعه مورد نظر با اسـتفاده از کیـت تخلیص از ژل استخراج گردید. پس از تأیید نتیجه تخلیص، قطعه تعیین توالی و نتایج حاصل از آن، تکثیـر کاست ژنی als را تایید کرد (شکل ۴ ب).



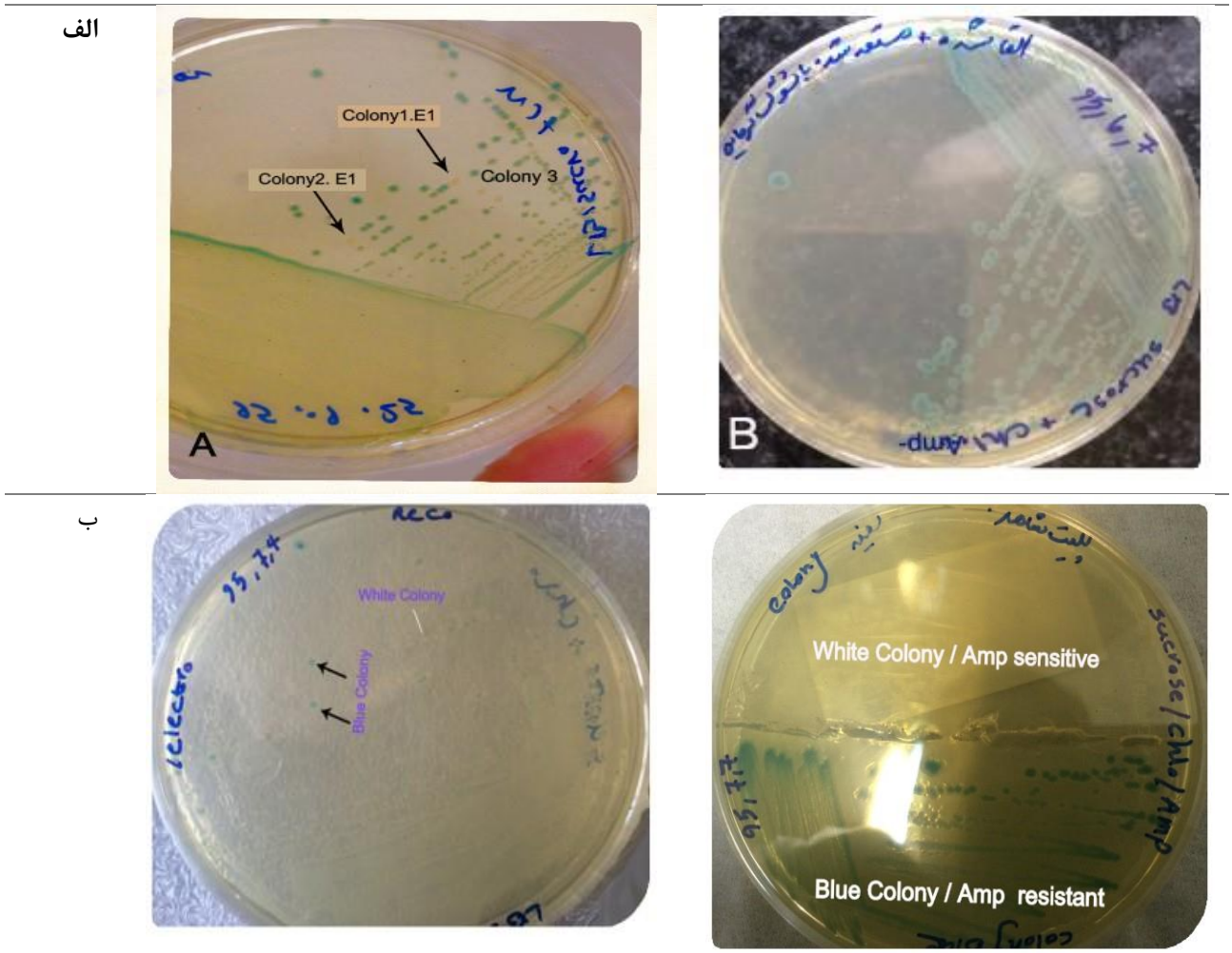
شکل **۴. الف)** الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر قطعه E1 بـر روی ژل آگاروز ۱٪. A) نشانگر ۲۵kb و باند ۳۰۱۹bp قطعه ژنیE1، B) برش ژل جهت تخلیص قطعه ژنی، C) نتیجه تخلیص قطعه ژنیE1 .

ب) الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر کاست als. A) ستون۱: نشانگر ۲۵kb، ستون۲ و۳: قطعـه ۴۲۰۰ جفت بازی کاست ژنی als، B) برش ژل جهت تخلیص قطعه ژنی، C) نتیجه تخلیص قطعه همراه با نشانگر ۲۵kb.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

۴-۳. نتایج ساخت وکتور pAdZ-TATE(wt) با استفاده از سیستم کلونینگ pADZ

جهت ساخت وکتور pAdZ-TATE(wt)، ابتدا قطعه ژنیE1 به سلول‌های SW102 شایسته شده حاوی pAdZ-CV5-E3+ منتقل شد. سلول‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت LB حاوی ساکاروز+ X-gal و IPTG کشت داده شدند و پس از رشد، دو نوع کلنی سفید و آبی بر روی پلیت محیط کشت مشاهده شد (شکل ۵ الف). ظهور کلنی‌های سفید در محیط کشت حاکی از آن بود که قطعه ژنی حاصل از PCR توسط باکمید pAdZ-CV5-E3+ دریافت شده و باکمید نوترکیب pAd5(wt)تشکیل شده است. سپس با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن، کاست als به سلول‌های شایسته شده حاوی باکمید نوترکیب pAd5 (wt) انتقال یافت. کاست als از طریق فرایند نوترکیبی مشابه، در ناحیه HI-loop برآمدگی فیبر کلون گردید. سلول‌های ترانسفورم بر روی پلیت LB ساکاروز + کلرامفنیکل + Xgal وIPTG کشت داده شدند. پس از رشد، دو نوع کلنی آبی و سفید رنگ روی پلیت مشاهده شد. تشکیل کلنی‌های آبی‌رنگ نشانه‌ی ورود کاست als درون باکمید pAd5(wt) بود (شکل ۵ ب). جهت تأیید صحت کلون کاست ژنی als، کلنی آبی رنگ همراه با یک کلنی سفید به عنوان نمونه کنترل انتخاب و بر روی محیط LB حاوی ساکاروز + کلرامفنیکل+ Xgal+ IPTG و آمپی‌سیلین کشت داده شد. نتایج کشت نشان داد، تنها کلنی آبی رنگ قادر به رشد در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین بود، که نشان‌دهنده کلون شدن کاست als در باکمید بوده است.



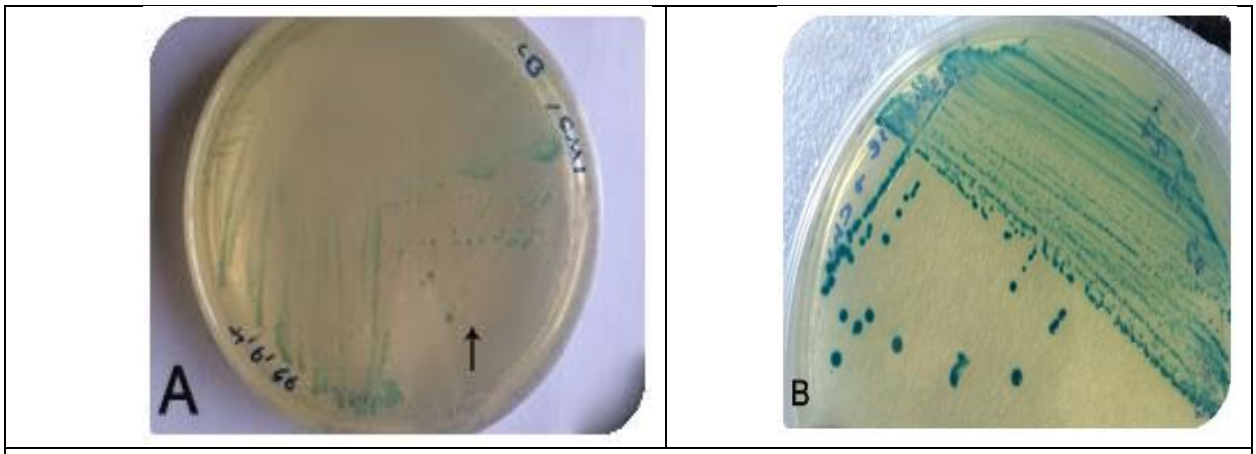
شکل **۵. الف)** نتیجه حاصل از کلونینگ ژنE1. A) کلنی‌های سفید رنگ، نشانه کلونینگ قطعه ژنیE1 در باکمید، B) کنترل منفی، باکتری SW102 شایسته شده.

ب) نتیجه حاصل از کلون کاست ژنی als در باکمید pAd5(wt)، نتایج کشت کلنی‌های آبی و سفید در محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

۳-۵. نتایج ورود توالی اکتروتات به وکتور pAd5 (alsHI-Loop)

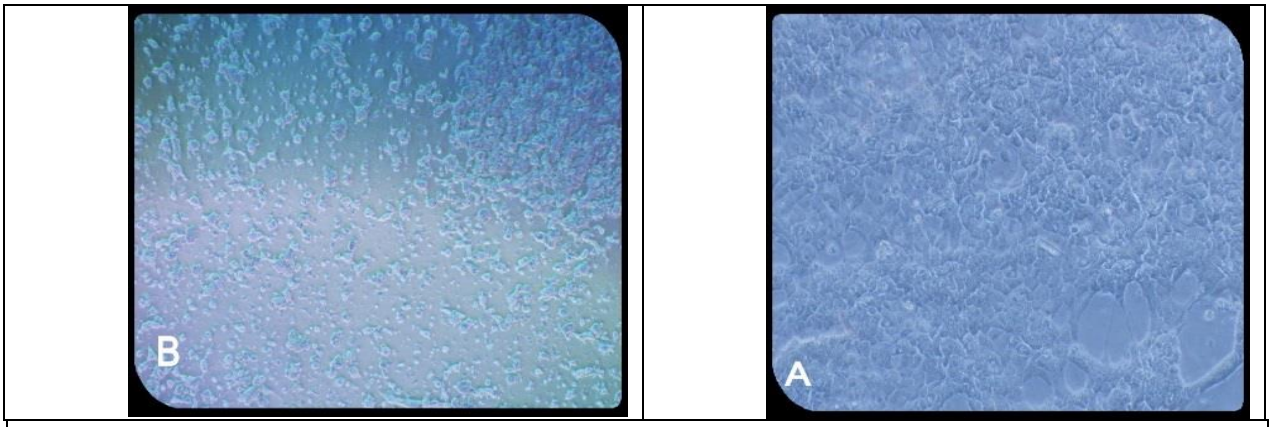
با استفاده از روش الکتروپوریشن، قطعه TATE به سلول‌های شایسته شده SW102 حاوی باکمید pAd5 (als**HI-Loop**) منتقل شد. قطعه مورد نظر از طریق نوترکیبی مشابه جایگزین کاست als در ناحیه HI-loop برآمدگی فیبر باکمید شد.سلول-های ترانسفورم شده روی پلیت کشت LB حاوی ساکاروز + کلرامفنیکل + Xgal و IPTG کشت داده و پس از رشد، دو نوع کلنی آبی و سفید رنگ روی محیط کشت مشاهده شد. تشکیل کلنی‌های سفید، کلون شدن قطعه TATE در باکمید را تایید نمود (شکل ۶). نتایج کشت کلنی‌های آبی و سفید در محیط آمپی‌سیلین نشان داد، کلنی‌های آبی مقاوم به آمپی‌سیلین و کلنی‌های سفید نوترکیب به آن حساس بودند.



شکل۶. نتایج کشت باکتری‌های ترانسفورم شده. A) تشکیل کلنی‌های آبی و سفید، B) سلول‌های شایسته شده حاوی pAd5 (alsHI-Loop) به عنوان نمونه شاهد

۳-۶. تولید ذرات ویروسی نوترکیب Ad5TATE(wt) و Ad5TATE(ΔE1,ΔE3)در رده سلولی HEK293

برای ترانسفکشن وکتورهای نوترکیب و تولید ذرات آدنوویروس در رده سلولیHEK293، از روش کلسیم فسفات استفاده گردید. برای بررسی روند تولید آدنوویروس نوترکیب، سلول‌های ترانسفکت شده در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. ۱۳ روز بعد از ترانسفکشن، اکثر سلول‌ها گرد و از سطح فلاسک جدا شدند (شکل۷).



شکل ۷. اثـرات آسـیب سـلولی (CPE) ناشـی از تکثیر ویروس نوترکیب در رده سـلولی HEK293. A) سلول‌های سـالم بعد از ۱۳روز B) مشاهده CPE در سلول های آلوده بعد از ۱۳روز از ترانسفکشن.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

۳-۷. نتایج تعیین تیتر ویروس Ad5TATE(wt) و Ad5TATE(ΔE1,E3) با روش TCID50

اثرات تخریب سلولی(CPE) در کمتر از ۱۸ ساعت شروع و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی کامل گردید. تیتر ویروس‌های نوترکیب با روش TCID50 با فرمول T= 101+D(S-0.5) برابر $۱۰^{۷}$ (برای ۱۰۰ µL از محلول ویروسی) محاسبه شد که برابر $۱۰^{۸}$ TCID50/ml بود (جدول ۳). همچنین تیتر ویروس Ad5TATE(ΔE1,ΔE3) با روش TCID50 برابر ۱۰۷ TCID50/ml بود (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج تعیین تیتر ویروس Ad5TATE(wt) وAd5TATE(ΔE1,ΔE3) با روش TCID50 در رقت‌های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۹}$.

D	$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{-۵}$	$۱۰^{-۶}$	$۱۰^{-۷}$	$۱۰^{-۸}$	$۱۰^{-۹}$
۱	+	+	+	+	+	−	−	−	−
۲	+	+	+	+	+	−	−	−	−
۳	+	+	+	−	+	+	−	−	−
۴	+	+	+	−	−	+	−	−	−
۵	+	+	−	+	−	−	+	−	−
۶	+	+	+	+	−	−	−	−	−
شاهد	−	−	−	−	−	−	−	−	−
مجموع	۶	۶	۵	۴	۳	۲	۱	۰	۰
S	۱	۱	۱	۰/۸۳	۰/۶۶	۰/۵	۰/۳۳	۰	۰

۳-۸. تیتراسیون ذرات ویروس به دست آمده به روش Real time PCR با استفاده از آغازگرهای تشخیصیویروس Ad5TATE(wt):

Real time PCR با استفاده از دستگاه corbett Rotor Gene انجام پذیرفت. بدین ترتیب که با تخمین 4.68×10^{9} ذره ویروس در میکرولیتر از پلاسمید تخلیص شده و با استفاده از رقت های لگاریتمی آن نمودار استاندارد آن رسم شد. در Real time PCR هر چه میزان CT کمتر باشد میزان تکثیر و یا بیان بیشتر است. بر همین اساس مطابق با نتایج به دست آمده جدول ۴ بیشترین میزان کپی نامبر ویروس (2.007×107) در کمترین CT (CT4) به دست آمد که متعاقبا بیانگر تیتر بالای ویروس می باشد. نتایج نانودراپ نیز جذب نوری 0.98 را در CT4 به ثبت رساند که بیانگر غلظت بالای ویروس نسبت به CT های دیگر می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

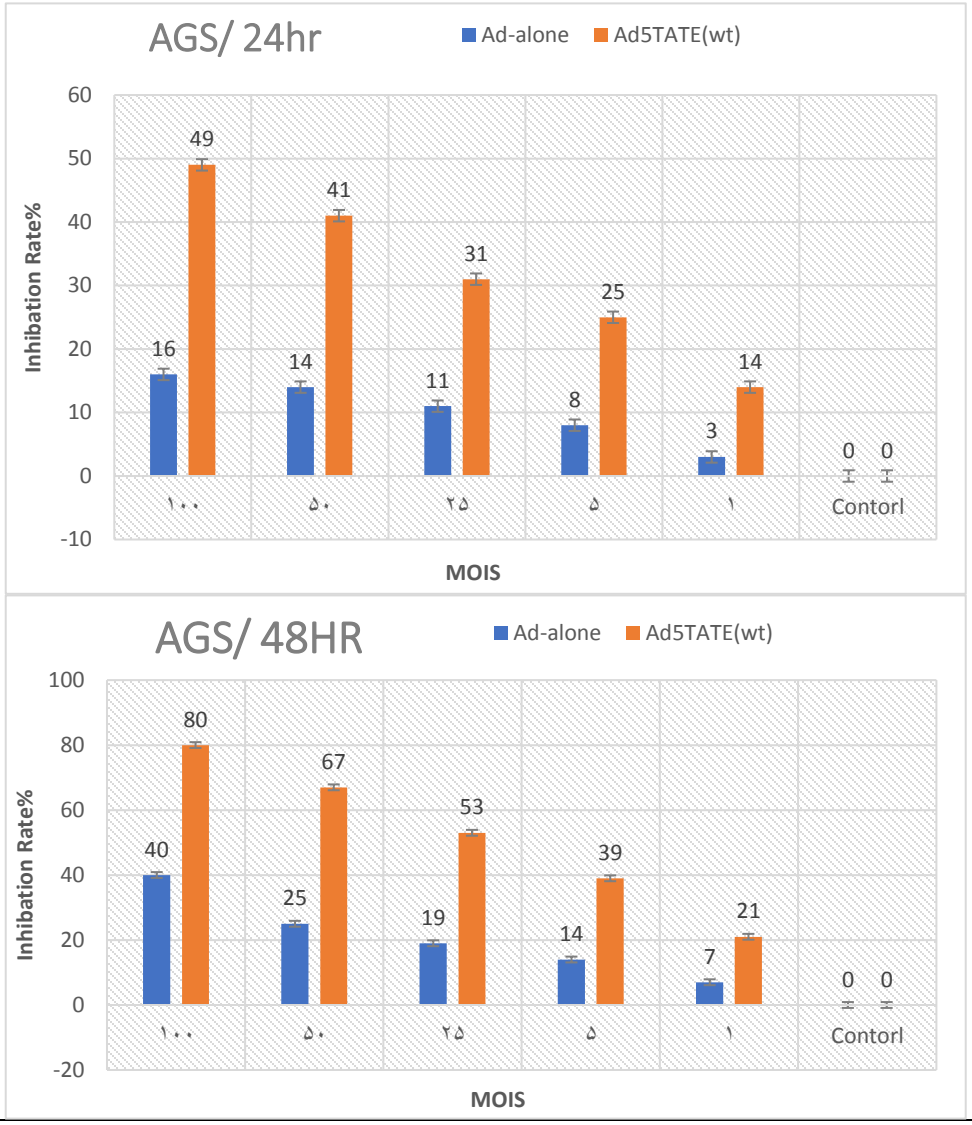
جدول ۴. نتایج CT های حاصل از Real time PCR و محاسبه تیتر ویروس

ردیف	مقدار CT	مقدار OD	کپی نامبر ویروس	تیتر ویروس	تعداد سلول های کشت شده	MOI (µL)
نمونه ۴	10.73	0.98	2.007×10^{7}	$\sim4.68\times10^{9}$	2×10^{5}	100
نمونه ۵	11.22	0.47	9.62×10^{6}	$\sim2.24\times10^{9}$	2×10^{5}	50
نمونه ۱۶	12.50	0.21	4.30×10^{6}	$\sim1.00\times10^{9}$	2×10^{5}	25
نمونه ۱۳	17.41	0.04	8.19×10^{5}	$\sim9.54\times10^{7}$	2×10^{5}	5
نمونه ۱۵	17.83	0.001	2.04×10^{4}	$\sim4.76\times10^{6}$	2×10^{5}	1
تیتر ویروس = ضریب رقت (تعداد کپی ویروس / ۳) × ۱۰ × ۷۰						

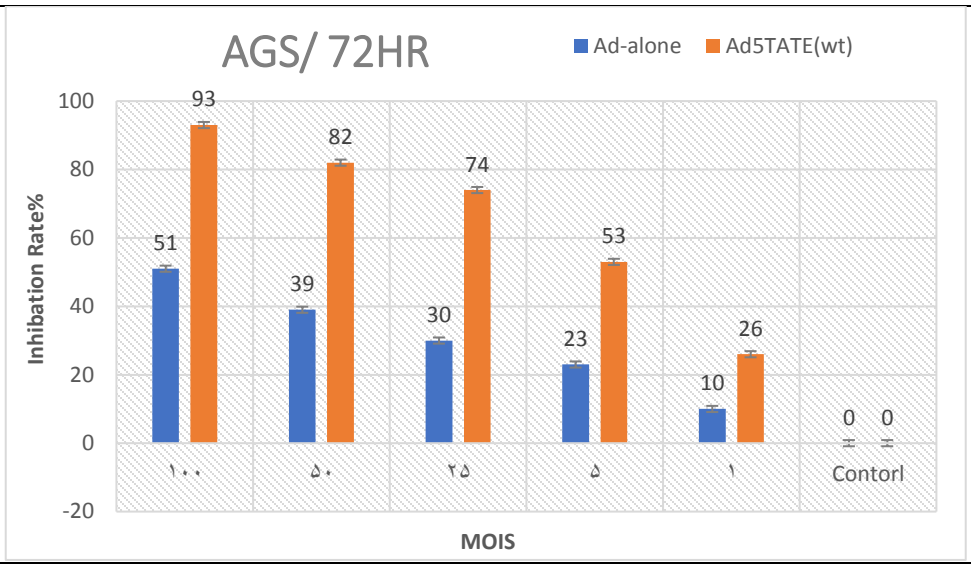
۳-۹. نتایج آزمون MTT

جهت بررسی نتایج آزمون MTT از دستگاه Elisa reader استفاده شد. نتایج زنده مانی سلول‌های AGS تحت تیمار با ویروس Ad5TATE(wt) و گروه شاهد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح ویروس، در شکل ۸ نشان داده شده است. بررسی نتایج این آزمون نشان داد، افزایش مقدار ویروس نوترکیب موجب کاهش میزان بقای سلولی رده AGS در مواجهه با ویروس گردید. افزایش زمان نگهداری از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت، به‌طور قابل‌توجهی موجب کاهش درصد بقای سلولی در مواجهه با غلظت‌های مختلف ویروس نوترکیب شد. پس در غلظت MOIs=5 با گذشت ۷۲ ساعت از زمان تلقیح، سمیت سلولی ویروس نوترکیب افزایش یافته و در نتیجه باعث مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها رده AGS گردید. در کمترین غلظت (MOI=1) پس از ۷۲ ساعت میزان مرگ ۲۶درصدی داشتیم که نسبت به ۲۴ ساعت تقریبا رشد ۲ برابری مرگ سلولی را شاهد بودیم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]



[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]



شکل ۸. نتایج آزمون MTT سلول‌های رده سلولی AGS تیماره شده با ویروس نوترکیب و نمونه شاهد طی زمان‌های نگهداری ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

بحث

ویروس درمانی انکولیتیک، یکی از روش‌های نوین برای درمان سرطان است که به‌واسطه توانایی ویروس برای آلوده، تکثیر و متلاشی کردن سلول‌های هدف انجام می‌گردد (۲۵). امروزه بسیاری از ویروس‌های انکولیتیک توجه پژوهشگران را برای درمان سرطان به خود جلب کرده است (۲۶). از بین آن‌ها، آدنوویروس‌ها خصوصاً آدنوویروس سروتیپ ۵ به طور گسترده به عنوان عامل انکولیتیک برای درمان سرطان مطالعه شده‌اند (۲۷). در این مطالعه وکتور آدنوویروس نسل دوم Ad5TATE(ΔE1,ΔE3)ساخته شد که قادر است سلول-های سرطانی بیان کننده گیرنده‌های SSTR2 وSSTR5 را آلوده کند. از این وکتور می‌توان برای انتقال ژن‌های ضدتوموری به سلول‌های سرطانی استفاده کرد. Kuhlmann و همکاران در سال ۲۰۰۹، با کلون پپتید Tyr-Ser-Ala در HI-Loop برآمدگی فیبر، آدنوویروس نوترکیبی را ساختند که قادر به آلوده کردن سلول‌های سرطانی لوزالمعده از طریق گیرنده EphA2 بود (۲۸). نتایج بررسی‌های این پژوهش با یافته‌های Kuhlmann و همکاران در یک راستا بود، با این تفاوت که در مطالعه حاضر، پپتید اکتروتات در ناحیه HI-loop فیبر کلون شده بود. ویروس نوترکیب Ad5TATE(wt) قادر بود با استفاده از گیرنده‌های سوماتوستاتین سلول‌های رده AGS را آلوده نماید.

Naser pour Farivar و همکاران در سال ۲۰۱۷، به منظور هدف‌گیری اختصاصی ویروس BTV (bluetongue viruses) برای آلوده نمودن رده سلولی AGS، توالی اکتروتات را در ناحیه VP2 کپسید ویروس، کلون کردند. بدین ترتیب ویروس نوترکیب BTV از طریق گیرنده‌های سوماتوستاتین وارد سلول‌های سرطانی رده AGS شد. آن‌ها رده سلولی AGS را تحت تیمار با ویروس BTV نرمال و اصلاح‌شده قرار دادند. نتایج آنها نشان داد، ویروس نوترکیب پس از تکثیر، از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی باعث تخریب رده سلولی AGS شده است درحالی‌که BTV طبیعی قادر به ورود به سلول‌های AGS نبود (۲۹). نتایج بررسی‌های این تحقیق با یافته‌های pour Naser Farivar و همکارانش در یک راستا بوده با این تفاوت که آن‌ها در مطالعه خود از ویروس RNA دار BTV استفاده کرده بودند، درحالی‌که در مطالعه حاضر از آدنوویروس سروتیپ ۵ استفاده شد. Mizuguchi.H و Hayakawa. T به‌منظور توسعه روشی مؤثر در ژن‌درمانی سرطان، وکتور آدنوویروسی نوترکیب حاوی پپتید RGD در برآمدگی فیبر را ساختند. این اصلاح فیبر، اتصال وکتور به سلول‌های سرطانی که مقادیر نسبتاً کمی گیرنده CAR را بیان می‌کند را افزایش داد. آن‌ها ژن HSVtk را در ناحیه E1 وکتور نوترکیب قرار دادند. نتایج آنها نشان داد، بازده انتقال ژن به سلول‌های سرطانی ملانوم B16، فاقد گیرنده CAR، به‌طور چشمگیری در شرایط آزمایشگاهی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

و در داخل بدن، توسط وکتور آدنوویروسی نوترکیب افزایش داشت که منجر به افزایش فعالیت سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی و افزایش اثر ضد توموری علیه سلول‌های سرطانی ملانوما B16 از طریق تحویل ژن HSVtk در داخل بدن گردید (۳۰). مطالعه آنها از نظر ساخت وکتور آدنوویروسی با ناحیه اصلاح‌شده در برآمدگی فیبر با مطالعه حاضر هم سو بود. با این تفاوت که گیرنده مورد استفاده وکتور ویروسی Ad5TATE(ΔE1,ΔE3)، گیرنده‌های سوماتوستاتین بود.

Hulin-Curtisو همکاران در سال ۲۰۱۶، آدنوویروس نوترکیبی را ساختند که با استفاده از گیرنده CD46 به سلول-های سرطانی متصل شد. بدین صورت ژن فیبر آدنوویروس سروتیپ ۳۵ جایگزین ژن فیبر آدنوویروس سروتیپ ۵ شد و آدنوویروس کایمریک Ad5/35 ساخته شد. یافته های آن‌ها نشان داد، Ad5/35 در مقایسه با آدنوویروس وحشی با کارایی بالا قادر به آلوده کردن رده‌های سلولی سرطان تخمدان بود. بررسی نتایج آنها نشان داد، Ad5/35، رشد تومورها را به طور قابل‌توجهی مهار نموده و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را افزایش داده است (۳۱) . نتایج بررسی‌های حاضر با یافته‌های Hulin-Curtis و همکاران هم سو بود با یک تفاوت عمده که ویروس نوترکیب Ad5/35 از طریق تعویض ناحیه فیبر با فیبر سروتیپ ۳۵ ساخته شده بود، در حالی که ویروس (wt) Ad5TATE ساخته شده در این پژوهش از کلون توالی اکتروتات در ناحیه HI–Loop برآمدگی فیبر به‌دست آمده بود. در مطالعه حاضر، آدنوویروس نوترکیبی ساخته شد که دارای توالی اکتروتات در ناحیه HI-loop برآمدگی فیبر بود. این ویروس نوترکیب از طریق اتصال به گیرنده‌های سوماتوستاتین، قادر به آلوده و متلاشی کردن سلول‌های سرطانی رده AGS بوده است. با استفاده از آزمون MTT، میزان زنده‌مانی سلول‌ها (روش رنگ سنجی بر مبنای نمک تترازولیوم) بررسی گردید. نتایج نشان داد، میزان بقای سلول‌های سرطانی AGS در گستره‌ی MOI 1-50 ویروس Ad5TATE(wt)، با افزایش زمان نگهداری و مقدار ویروس، به طور چشمگیری کاهش یافت. نتایج به دست آمده از آزمون کمّیMTT به‌صورت آزمایشگاهی نشان داد که آدنوویروس تیپ وحشی Ad5(wt) تاثیری بر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی AGS ندارد. Uusi-Kerttula و همکاران در سال ۲۰۱۶، آدنوویروس نوترکیب Ad5/kn48 را طراحی و ساختند به طوری که فقط ناحیه برآمدگی فیبر آن از ناحیه برآمدگی فیبر آدنوویروس سروتیپ ۴۸ گرفته شده بود و به‌وسیله شبه سروتیپ Ad5 همراه با دمین را ساختند. این ویروس نوترکیب از طریق گیرنده CAR وارد سلول شد، بنابراین آن‌ها پپتید ۲۰ آمینواسید NAVPNLRGDLQVLAQKVART(A20)، از پروتئین کپسیدی VP1 ویروس بیماری پا و دهان با میل ترکیبی بالا به اینتگرین ۶ را به منظور افزایش انتخاب سرطان‌های بیان‌کننده اینتگرین ۶ به‌کار بردند. آن‌ها A20 را در ناحیه HI-Loop آدنوویروس سروتیپ ۵(Ad5 HI/A20) وAd5/kn48 DG-Loop (Ad5/kn48. DG. A20) قرار دادند. ویروس‌های نوترکیب حاصل با استفاده از اینتگرین ۶ سلول‌های سرطانی را هدف قرار دادند. نتایج آنها نشان داد، انتقال این ویروس‌های نوترکیب به سلول‌های سرطان پستان BT-20(αvβ6 high) به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۳۲). مطالعه آن‌ها از نظر تغییر در ناحیه HI-loop برآمدگی فیبر و استفاده از مسیری مستقل از گیرنده CAR برای آلوده کردن سلول‌های سرطانی با پژوهش حاضر هم سو بوده با این تفاوت که گیرنده مورد استفاده در مطالعه حاضر، گیرنده‌های سوماتوستاتین بود. همچنین آن‌ها ویروس نوترکیب Ad5/kn48 DG.A20 را ساختند که پپتید در ناحیه DG-Loop کلون شده بود که با مطالعه حاضر تفاوت داشت. Coughlan و همکاران در سال ۲۰۰۹، پپتید A20 FMDV2 (مشتق شده از پروتئین کپسیدی VP1 ویروس بیماری دهان و پا، با میل ترکیبی بالا برای اینتگرین ۶) را در ناحیه HI-loop برآمدگی آدنوویروس سروتیپ ۵ قرار دادند. اینتگرین ۶ سلول اپی‌تلیال، هدفی مناسب برای درمان سرطان است زیرا فقط در سلول‌های سرطانی بیان می‌گردد، به طوری که میزان بیان آن در پیشرفت تومور نقش دارد. نتایج آنها نشان داد، Ad5-EGFP.A20 در مقایسه با تیپ وحشی آدنوویروس، توانایی انتقال و سمیت سلولی خیلی بالاتری در رده‌های سلول‌های سرطانی اینتگرین مثبت داشت (۳۳). نتایج بررسی‌های حاضر با یافته‌های Coughlan و همکاران در یک راستا بوده با این تفاوت که هر دو ویروس نوترکیب از گیرنده‌های متفاوتی برای آلوده کردن سلول‌های هدف استفاده کردند. یکی از محدودیت‌های استفاده از Ad5 برای درمان سرطان این است که گیرنده CAR در سطح سلول‌های توموری ضعیف بیان می‌شود. بنابراین برای حل این مشکل، اصلاحات مختلف ژنتیکی در قسمت فیبر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

آدنوویروس انجام شده تا ویروس قادر باشد سلول‌های سرطانی را از طریق مکانیسمی مستقل از گیرنده CAR آلوده کند (۳۴). اکتروتات یکی از مکمل‌های سوماتوستاتین است که توانایی اتصال به گیرنده‌های سوماتوستاتین، به‌ویژه گیرنده‌های SSTR2 و SSTR5 را دارد (۳۵). این گیرنده‌ها در سطح سلول‌های مختلف سرطانی مانند تومورهای عصبی و غدد درون‌ریز به میزان زیادی بیان می‌شوند. مطالعات حاضر نشان داد این گیرنده‌ها باعث مرگ سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۳۶).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ناحیه اتصال آدنوویروس به گیرنده CAR اصلاح شد تا ویروس بتواند از طریق گیرنده‌های سوماتوستاتین که در سطح سلول‌های سرطانی AGS بیان بالایی دارد، متصل شود. برای تحقق در این امر، توالی اکتروتات در ناحیه HI-loop فیبر، کلون شد و در نهایت، با استفاده از تکنیک های مختلف کلونینگ، ویروس‌های نوترکیب شده که به طور اختصاصی قادر بودند سلول های رده سلولی AGS را، از طریق اتصال به SSTR2 آلوده کنند ساخته شدند. این ویروس نوترکیب با تکثیر در سلول ها AGS باعث القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد، ویروس Ad5TATE(wt) ساخته شده برخلاف ویروس نوع وحشی Ad5(wt)، توانایی بالایی برای آلوده کردن سلول‌های AGS دارد. از آنجایی که سطح بالایی از گیرنده‌های سوماتوستاتین در سطح بسیاری از سلول‌های سرطانی بیان می‌شود، می‌توان از این ویروس نوترکیب به‌عنوان عامل انکولیتیک برای درمان انواع سرطان های بروز دهنده گیرنده سوماتوستاتین استفاده کرد. در این مطالعه، همچنین وکتور آدنوویروسی Ad5TATE(ΔE1,ΔE3) نیز با هدف انتقال ژن به سلول های سرطانی SSTR مثبت ساخته شد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری مؤثر کارکنان دانشگاه آزاد جهت راهنمایی در انجام این پروژه، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

منابع

1. Aldrak N, Alsaab S, Algethami A, Bhere D, Wakimoto H, Shah K, Alomary MN, Zaidan N. Oncolytic Herpes Simplex Virus-Based Therapies for Cancer. Cells. 2021;10(6):1541.
2. Oh CM, Chon HJ, Kim C. Combination immunotherapy using oncolytic virus for the treatment of advanced solid tumors. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(20):7743.
3. Nguyen HM, Guz-Montgomery K, Saha D. Oncolytic virus encoding a master pro-inflammatory cytokine interleukin 12 in cancer immunotherapy. Cells. 2020 Feb;9(2):400.
4. Macedo N, Miller DM, Haq R, Kaufman HL. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. Journal for immunotherapy of cancer. 2020;8(2).
5. Olagnier D, Alain T. Oncolytic viral immunotherapy in the time of COVID-19. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2020; 56:1.
6. Kumar U, Singh S. Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity. International journal of molecular sciences. 2020;21(7):2568.
7. Pittaluga A, Roggeri A, Vallarino G, Olivero G. Somatostatin, a Presynaptic Modulator of Glutamatergic Signal in the Central Nervous System. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(11):5864.
8. Kántás B, Börzsei R, Szőke É, Bánhegyi P, Horváth Á, Hunyady Á, Borbély É, Hetényi C, Pintér E, Helyes Z. Novel drug-like somatostatin receptor 4 agonists are potential analgesics for neuropathic pain. International journal of molecular sciences. 2019;20(24):6245.
9. Eychenne R, Bouvry C, Bourgeois M, Loyer P, Benoist E, Lepareur N. Overview of Radiolabeled Somatostatin Analogs for Cancer Imaging and Therapy. Molecules. 2020;25(17):4012.
10. Mansi R, Abid K, Nicolas GP, Del Pozzo L, Grouzmann E, Fani M. A new 68 Ga-labeled somatostatin analog containing two iodo-amino acids for dual somatostatin receptor subtype 2 and 5 targeting. EJNMMI research. 2020;10(1):1-0.
11. Paragliola RM, Salvatori R. Novel somatostatin receptor ligands therapies for acromegaly. Frontiers in endocrinology. 2018; 7; 9:78.
12. Piri-Gharaghie T, Beiranvand S, Riahi A, Shirin NJ, Badmasti F, Mirzaie A, Elahianfar Y, Ghahari S, Ghahari S, Pasban K, Hajrasouliha S. Fabrication and characterization of thymol-loaded chitosan nanogels: Improved antibacterial and anti-biofilm activities with negligible cytotoxicity. Chemistry & Biodiversity. 2022 Mar;19(3):e202100426.
13. Piri-Gharaghie T, Jegargoshe-Shirin N, Saremi-Nouri S, Khademhosseini SH, Hoseinnezhad-Lazarjani E, Mousavi A, Kabiri H, Rajaei N, Riahi A, Farhadi-Biregani A, Fatehi-Ghahfarokhi S. Effects of Imipenem-containing Niosome nanoparticles against high prevalence methicillin-resistant Staphylococcus Epidermidis biofilm formed. Scientific reports. 2022 Mar 24;12(1):1-3.
14. Piri Gharaghie T, Hajimohammadi S. Comparison of anti-candida effects of aqueous, ethanolic extracts and essential oil of E. angustifolia with fluconazole on the growth of clinical strains of Candida. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2021 Jul 10;11(43):25-38.
15. Piri-Gharaghie T. Polycystic ovary syndrome and genetic factors influencing its development: A review article. Personalized Medicine Journal. 2021 Dec 1;6(23):25-9.
16. Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Identification of Antigenic Properties of Acinetobacter baumannii Proteins as Novel Putative Vaccine Candidates Using Reverse Vaccinology Approach. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2022 Jun 7:1-23.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

17. Piri Gharaghie T, Beiranvand S, Doosti A, Ghadiri AH, Haji Mohammadi S. A review of the epidemiology and clinical signs of SARS-COV-2. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2020 Nov 10;11(41):103-20.
18. Piri Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Detection of T6SS secretory system and membrane purine involved in antibiotic resistance in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates. Journal of Microbial World. 2021 May 22;14(1).
19. Zarinnezhad A, Shahhoseini MH, Piri Gharaghie T. Evaluating the Relative Frequency of Fungal Infections in the Serum of Patients with Multiple Sclerosis and Healthy Subjects Using PCR. Biological Journal of Microorganism. 2021 Mar 21;10(37):37-50.
20. Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Fabrication and Characterization of pcDNA3. 1 (+) Location within Chitosan/Nanoparticles Complexes for Enhanced Gene Delivery. Iranian Journal of Biotechnology. 2022 Jul 2.
21. Piri Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Prevalence and antibiotic resistance pattern of Acinetobacter spp. infections in Shahrekord medical centers. Developmental Biology. 2021 Nov 22;13(4):35-46.
22. Azadbakht N, Doosti A, Jami MS. CRISPR/Cas9-mediated LINC00511 knockout strategies, increased apoptosis of breast cancer cells via suppressing antiapoptotic genes. Biological Procedures Online. 2022 Dec;24(1):1-5.
23. Beiranvand S, Doosti A, Mirzaei SA. Putative novel B-cell vaccine candidates identified by reverse vaccinology and genomics approaches to control Acinetobacter baumannii serotypes. Infection, Genetics and Evolution. 2021 Dec 1;96:105138.
24. Bambhroliya Z, Sandrugu J, Lowe M, Okunlola O, Raza S, Osasan S, Sethia S, Batool T, Hamid P. Diabetes, Polycystic Ovarian Syndrome, Obstructive Sleep Apnea, and Obesity: A Systematic Review and Important Emerging Themes. Cureus. 2022 Jun 25;14(6).
25. Dude I, Zhang Z, Rousseau J, Hundal-Jabal N, Colpo N, Merkens H, Lin KS, Bénard F. Evaluation of agonist and antagonist radioligands for somatostatin receptor imaging of breast cancer using positron emission tomography. EJNMMI radiopharmacy and chemistry. 2017 ;2(1):1-6.
26. Kouroumalis E, Samonakis D, Notas G. Somatostatin in hepatocellular carcinoma: experimental and therapeutic implications. Hepatoma Research. 2018; 11;4.
27. Gomes-Porras M, Cárdenas-Salas J. Somatostatin analogs in clinical practice: a review. International journal of molecular sciences. 2020; 21(5):1682.
28. Kuhlmann K, Van Geer M, Bakker C, Dekker J, Havenga M, Elferink RO, et al. Fiber-chimeric adenoviruses expressing fibers from serotype 16 and 50 improve gene transfer to human pancreatic adenocarcinoma. *Canc Gene Ther*., 2009;16(7):585.
29. Farivar TN, Najafipour R, Alizadeh SA, Azimi SM, Johari P. Capsid Modified Bluetongue Virus 16 (BTV16) as a Virulytic Oncotherapy Agent. *Biotech Health Sci*., 2017; e45667.
30. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*., 2001; 8(9):730.
31. Hulin-Curtis, S.L., Uusi-Kerttula, H., Jones, R., Hanna, L., Chester, J.D., Parker, A.L.,. Evaluation of CD46 re-targeted adenoviral vectors for clinical ovarian cancer intraperitoneal therapy. Cancer Gene Ther. 2016; 23, 229-234
32. Uusi-Kerttula, H., Jones, R., Hanna, L., Chester, J.D., Parker, A.L.,. Evaluation of CD46 re-targeted adenoviral vectors for clinical ovarian cancer intraperitoneal therapy. Cancer Gene Ther. 2016; 23, 229-234
33. Coughlan L, Alba R, Parker AL, Bradshaw AC, McNeish IA, Nicklin SA, et al. Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors. *Viruses*., 2010; 2(10):2290-2355.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

34. Howells A, Marelli G, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic viruses—interaction of virus and tumor cells in the battle to eliminate cancer. Frontiers in oncology. 2017 Sep 8;7:195.
35. Gao J, Zhang W, Ehrhardt A. Expanding the spectrum of adenoviral vectors for cancer therapy. Cancers. 2020 May;12(5):1139.
36. Gallo P, Dharmapuri S, Cipriani B, Monaci P. Adenovirus as vehicle for anticancer genetic immunotherapy. Gene therapy. 2005 Oct;12(1):S84-91.
37. Yang P. *Romance of the three unions: A comparative study of the identity discourses of three Indian maritime trade unions* (Doctoral dissertation, Cardiff University).2010.
38. Hu Z, Chen X, Chen W, Li P, Bao C, Zhu L, Zhang H, Dong C, Zhang W. Siphoviridae phage PH669 capable of lysing some strains of O3 and O4 serotypes in Vibrio parahaemolyticus. Aquaculture. 2021 Dec 15;545:737192.
39. Asadipour E, Asgari M, Mousavi P, Piri-Gharaghie T, Ghajari G, Mirzaie A. Nano-Biotechnology and Challenges of Drug Delivery System in Cancer Treatment Pathway. Chemistry & Biodiversity. 2023 Mar 1:e202201072.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]