

کاربردهای تکنیکی نوین لکتین در تشخیص و درمان بیماری

فاطمه زهرا، دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی

چکیده

لکتین‌ها گلیکوپروتئین‌های غنی از سیستمین هستند که خصوصیت بخش قندی آن‌ها موجب تمایزشان از یکدیگر می‌شود و این قابلیت را دارند که به‌طور برگشت‌پذیر و اختصاصی به مونوساکارید یا الیگوساکارید متصل گردند. لکتین در جانوران در تنظیم چسبندگی سلول، سنتز پروتئین‌ها، کنترل میزان پروتئین در خون و اتصال گلیکوپروتئین داخل سلولی و خارج سلولی به سطح سلول نقش دارد. طراحی تکنیک‌های بهبودیافته برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها بر مبنای تشخیص اختصاصی تغییرات سطح سلول توسط لکتین با وجود مقادیر کم نمونه، زمینه بسیاری از پژوهش‌های در حال انجام است تا تکنیک‌های مقرون به صرفه نسبت به تکنیک‌های مبتنی بر استفاده از آنتی‌بادی طراحی گردد که در عین حال اختصاصیت و حساسیت لازم را نیز داشته باشد.

مقدمه

در سال 1888 پیتر هرمان، لکتین را برای اولین بار کشف کرد. پس از او در سال 1890 آقای ارلیش، ریسین را در دانه کرچک کشف و معرفی نمود. (ریسین سمی قوی است که قادر است به گالاکتوزیل سطح سلول بچسبد، وارد سلول شود و با تأثیر بر فاکتور طولیل‌کننده در فرایند پروتئین‌سازی، مانع از پروتئین‌سازی سلول می‌گردد که امروزه به‌عنوان یک سلاح بیولوژیک مطرح است). در سال 1926 آنزیمی از گیاه لگومینه‌ی *Dcanavaliesiformis* بدست آمد که کانوالین A نام گرفت. برخی لکتین‌های گیاهی می‌توانند باعث آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز شوند که به همین علت هم‌آگلوتینین (Hemagglutinin) نامیده می‌شوند. برای این پروتئین ناشناخته در سال 1954 واژه Lectin توسط آقای Boyd مطرح گردید که از کلمه لاتین leger به معنای متصل‌شونده مشتق می‌شود. لکتین‌ها گلیکوپروتئین‌های غنی از سیستمین هستند؛ که خصوصیت بخش قندی آن‌ها موجب تمایزشان از یکدیگر می‌شود. آن‌ها حداقل یک دومین کاتالیتیک دارند که این قابلیت را دارد که به‌طور برگشت‌پذیر و اختصاصی به مونوساکارید یا الیگوساکارید متصل گردد. اتصال لکتین به کربوهیدرات‌ها برگشت‌پذیر است. پیوندها غالباً هیدروژنی یا واندروالس است و افینیتی پایینی دارد اما به علت اویدیتی بالا و واحدهای باندشونده متعدد اتصال مناسب صورت می‌گیرد. در اتصال لکتین به کربوهیدرات، کلسیم نقش دارد. کلسیم باعث فولدینگ صحیح در ساختمان سوم یا چهارم لکتین می‌گردد و همچنین بار منفی کربوهیدرات را برای اتصال به لکتین خنثی می‌کند.

انواع لکتین

- لکتین گیاهی
- لکتین حیوانی
- لکتین قارچی
- لکتین باکتریایی

لکتین در گیاهان وزنی حدود 30 کیلودالتون دارد و معمولاً 2 تا 4 زیرواحد دارد که هرکدام از این زیرواحدها منطقه‌ای برای اتصال به کربوهیدرات دارد. لکتین در گیاهان نقش دفاعی دارد و می‌تواند به‌عنوان سم ضدحشره بکار رود؛ مثلاً لکتین (*Galanthus nivalis* (GNA) به‌عنوان ضدشته مورد استفاده قرار می‌گیرد. لکتین موجب افزایش فعالیت استرازاها و کاهش فعالیت فسفاتازها و آلکان فسفاتازها در لارو حشرات می‌گردد، همچنین در رابطه همزیستی برخی گیاهان با باکتری‌ها نیز نقش دارد. لکتین در گیاهان لگومینه در جذب باکتری‌های نیتریفیکان (تولیدکننده نیترات) نقش دارد و به‌این ترتیب در تغذیه گیاهان نیز مؤثر است.

نقش لکتین در بدن

لکتین در تنظیم چسبندگی سلول، سنتز پروتئین‌ها، کنترل میزان پروتئین در خون، اتصال گلیکوپروتئین داخل سلولی و خارج سلولی نقش دارد. لکتین با اتصال سلول‌ها یا ذرات موجود در بدن جانداران باعث اتصال ویروس به سطح سلول میزبان می‌شود و به عفونت‌زایی ویروس کمک می‌کند. اثر نامساعد لکتین بیشتر بر روی دستگاه گوارش است؛ غذاهای با مقدار زیاد لکتین باعث ایجاد واکنش‌های آلرژیک و واکنش‌های سیستم ایمنی می‌گردند و همین‌طور به علت ترکیب و چسبندگی با موکوس دیواره روده موجب صدمه زدن به سلول‌های دیواره روده می‌گردند و در نتیجه اثر سوء بر جذب مواد مغذی دارد. این لکتین‌ها در مقابل اسید معده و پروتئینازها مقاوم هستند. لکتین‌ها با اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده موجب رشد غیرطبیعی آن‌ها می‌شوند که می‌تواند جنبه منفی عملکرد لکتین در بدن محسوب شود. برخی لکتین‌ها نقش مهمی در سیستم ایمنی دارند؛ مثلاً لکتین‌های متصل‌شونده به مانوز، لکتین فعال‌کننده سیستم کمپلمان و لکتین‌هایی که با شناسایی کربوهیدرات‌های عامل عفونی در ایمنی تأثیرگذارند. لکتین‌ها در ذخیره و انتقال کربوهیدرات‌ها نقش دارند و در کنترل سیکل سلول، ایمنی ذاتی، بازگردش سلول‌های ایمنی و لقاح اسپرم و تخمک تأثیرگذارند. از اثرات پاتولوژیک کاهش سطح انسولین خون، ممانعت از فعالیت دی‌ساکاریدازها و پروتئینازها در روده، تغییرات تخریبی در کبد و کلیه و تداخل در جذب آهن غیر هم می‌باشد.

تولید، جداسازی و خالص‌سازی لکتین

لکتین‌ها را می‌توان از منابع طبیعی‌شان بدست آورد. غالباً میزان لکتین حاصل از منابع حیوانی در مقایسه با لکتین گیاهی بسیار کمتر است، همچنین با استفاده از تکنولوژی ریکامیننت نیز می‌توان لکتین‌ها را تولید کرد. *Ecoli* یکی از معروف‌ترین سیستم‌های بیانی برای لکتین می‌باشد. سویه‌های مختلف این باکتری این توانایی را دارند که به‌عنوان میزبان مناسب برای تولید لکتین مورد استفاده قرار گیرند. زمانی که این باکتری توسط یک وکتور بیانی ترانسفورم گردید در محیط کشت استریل‌شده مانند لوریا برتانی (*luria bertani*) کشت داده می‌شود و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آمپی‌سیلین برای کاهش آلودگی احتمالی ممکن است اضافه شود. شرایط فرماتور از نظر میزان PH، دما و زمان و... تنظیم می‌گردد و نیز از ایزوپروپیل D-B تیوگالاکتوز به‌عنوان Inducer استفاده می‌شود. پس از بیان ژن لکتین توسط میزبان باکتری، لکتین توسط امواج فراصوت یا به کمک محلول‌های خاصی رها می‌گردد و در نهایت مراحل کروماتوگرافی برای خالص‌سازی لکتین ضروری می‌باشد. تولید لکتین با روش تکنولوژی ریکامیننت بسیار هزینه‌بر و کم بازده است. جداسازی لکتین‌ها می‌تواند به‌وسیله ترکیبی از تکنیک‌های خالص‌سازی صورت بگیرد؛ برای جداسازی اولیه در سال 2007 از اسیدها مانند اسیداستیک استفاده گردید. در سال 2010 از نمک‌ها مانند سولفات آمونیوم برای پرسپیتاسیون لکتین‌ها استفاده گردید و امروزه روش‌های مختلف کروماتوگرافی مانند:

- Affinity chromatography
- Ion exchange chromatography
- Hydrophobic interaction chromatography

و نیز Gel filtration، می‌تواند برای خالص‌سازی آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. بسیاری از هم‌گلویتینین‌ها به وسیله کروماتوگرافی به واسطه سفاروژها جداسازی شده‌اند. به نظر می‌رسد تولید لکتین‌ها از منابع گیاهی توسط روش‌های کروماتوگرافی عملی‌تر باشد.

کاربرد لکتین در تشخیص و درمان

کاربرد لکتین‌ها بسیار متنوع می‌باشد. کاربردهایی براساس ویژگی لکتین‌ها، مانند ویژگی‌های آنتی‌توموری‌شان، تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی، خاصیت ضدقارچی، مهارکننده رونویسی در HIV-1، فعالیت ضدحشره و همین‌طور ویژگی آنتی‌باکتریال یا آنتی‌نماتد که در آن‌ها به اثبات رسیده است، وجود دارد. لکتین‌ها قابلیت اتصال به قندهای انتهایی گلیکونژوگه‌های سلولی را دارند. از آنجاکه در مسیر تغییرات نفوپلازی، قندهای انتهایی گلیکونژوگه‌های سلولی تغییرات کمی و کیفی فراوان پیدا می‌کنند، الگوی واکنش سلول‌ها به لکتین‌ها به شدت تغییر می‌کند و شناسایی این تغییرات به کمک لکتین‌ها می‌تواند مبنایی برای شناسایی سلول‌های با پتانسیل بالا برای حرکت به سمت نفوپلازی باشد. مطالعات نشان داده است که قابلیت واکنش سلول‌های نفوپلاستیک به لکتین‌ها در کارسینومای پستان، معده، تخمدان، مری، و کولون متفاوت از سلول طبیعی است. بیشترین واکنش به لکتین‌ها در سلول‌های مخاطی دیده شده است. با استفاده از روش‌های هیستوشیمیایی و لکتین‌های مختلف مثل PNA و MPA که ویژه تشخیص دادن قندهای انتهایی و ماقبل انتهایی گالاکتوز و گالاکتوز آمین سطوح خارج سلولی هستند، محل و شیوه توزیع این قندها در سلول‌ها مشخص می‌شود، بنابراین امروزه از لکتین‌ها به‌عنوان مارکر استفاده می‌گردد.

تکنیک‌هایی براساس لکتین

تکنیک‌هایی براساس لکتین طراحی شده است:

1. لکتین افینیتی کروماتوگرافی

که در آن لکتین به بیدهای ژل ایموبلیز یا تثبیت شده است و گلیکوپروتئین‌ها توسط لکتین جذب شده و جدا می‌شوند، که این روش براساس طرح اختصاصی اتصال گلیکوپروتئین‌ها، برای جداسازی و خالص‌سازی آن‌ها بکار گرفته می‌شود. ستون‌های کروماتوگرافی حاوی لکتین برای جداسازی دقیق مقادیر بسیار کم نمونه (گلیکوپروتئین) بسیار کارا می‌باشد، به‌عنوان مثال با ایموبلیز کردن کانوالین A، ساختارهای گلیکوپروتئینی موجود در سطح استم‌سل‌های جنینی قابل جداسازی است.

2. لکتین میکرواری

در این روش پنل‌هایی از لکتین بر روی چیپ‌های Array، ایموبلیز می‌شود، سپس نمونه تارگت فلورسنته هیبرید می‌شود و در نهایت براساس الگوی اتصالشان اسپات‌هایی خواهیم داشت و به‌این ترتیب اطلاعاتی از ساختار کربوهیدرات بدست می‌آید، حتی اگر گلیکوزیلاسیون نمونه ما بسیار کم باشد. این روش در بسیاری از تحقیقات در مورد سلول‌های پستانداران که با پارازیت‌های داخل سلولی آلوده شده‌اند، بکار گرفته می‌شود که در واقع یک سیگنال کاملاً متفاوت از بیان بیش از حد گلیکوپروتئین بر روی سلول‌های آلوده خواهیم داشت. با ترکیب این روش با سایر تکنیک‌های جداسازی می‌توان سرعت خالص‌سازی را افزایش داد.

3. لکتین بلات

به کمک لکتین‌های متصل به یک نشانگر بلا تینگ صورت می‌گیرد. سلول‌های آگلوتینه شده می‌توانند توسط لکتین‌های بیوتینه شده جداسازی شوند.

بحث:

علیرغم اینکه زمان زیادی از کشف لکتین‌ها می‌گذرد، اما همچنان مجهولات زیادی در زمینه فعالیت بیولوژیک لکتین‌ها و نحوه عملکرد آن‌ها وجود دارد. بسیاری از تحقیقات در جهت کامل نمودن شناخت لکتین‌ها در جریان است که به دنبال آن معرفی کاربردهای جدید برای لکتین قابل پیش‌بینی است.

با توجه به اثرات اثبات‌شده لکتین‌ها بر آپیتوز سلول‌ها و خاصیت توکسیسته آن‌ها، جهت بسیاری از تحقیقات به سمت بهبود طراحی داروهای براساس خواص لکتین برای درمان بیماری‌ها بویژه سرطان می‌باشد.

همچنین طراحی تکنیک‌های بهبودیافته برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها بر مبنای تشخیص اختصاصی تغییرات سطح سلول توسط لکتین با وجود مقادیر کم نمونه، زمینه بسیاری از پژوهش‌های در حال انجام است تا تکنیک‌های مقرون‌به‌صرفه نسبت به تکنیک‌های مبتنی بر استفاده از آنتی‌بادی طراحی گردد که در عین حال اختصاصیت و حساسیت لازم را نیز داشته باشد.

منابع:

- 1- Kumar K K, Chandra K L, Sumanthi J, Reddy G S, Shekar P C, Reddy B. 2012. Biological role of lectins: A review. J Orofasc Sci. 4:20-5.
- 2- Kwan S and Bun T. 2011. Lectins: production and practical applications. Apply MicrobiolBiotechnol. 89:45-55.
- 3- Singh H and Sarathi S. 2012. Insight of Lectins- A review. International Journal of Scientific