

Construction of Cationic Virosome Derived from Vesicular Stomatitis Virus as a Promising Candidate for Efficient Gene Delivery to the Central Nervous System

Delaram Ahmadi¹, Mohsen Zargar^{1*}, Mohammad Reza Zolfaghari¹, Monireh Kazemimanesh², Amir Ghaemi^{3*}

¹Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

²Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Info:

Received: 21 Nov 2019

Revised: 10 Dec 2019

Accepted: 14 Dec 2019

ABSTRACT

Introduction: Nowadays, one of the barriers of gene therapy in the treatment of the CNS diseases is the lack of proper and safe carrier systems to cross the blood brain barrier (BBB). Virosomes are virus like particles which can be used in brain if made from neurotropic viruses. The aim of the study was to construct cationic virosomes derived from vesicular stomatitis virus using dialyzable short chain phospholipid (DCPC) and cationic lipid (DOTAP) in-vitro. **Materials and Methods:** The vesicular stomatitis virus was propagated in Vero cell line. Subsequently, the harvested virus was concentrated and purified using ultrafiltration and ultracentrifugation and finally, the virosome was synthesized by DCPC detergent and the addition of cationic lipid. Particle size distribution of virosome nanoparticles, cellular cytotoxicity and glycoprotein of vesicular stomatitis virus (VSV-G) were determined by measuring dynamic light scattering using zetasizer, MTT assay and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), respectively. **Results:** The harvested viruses were concentrated and purified by ultrafiltration and ultracentrifugation and the final concentration was 0.8 mg/ml. The cationic virosome mean size was 186.6 nm and, the cell viability was significantly decreased after 48 hours of treatment with different concentrations of virosome compared to the control group. The VSV-G protein with molecular weight of 63 kDa was approved by SDS-PAGE. **Conclusion:** The use of DCPC is an efficient method for solubilization and reconstruction of vesicular stomatitis virus envelope and does not alter the surface VSV-G. Due to the VSV-G protein and its wide range cell tropism, this cationic virosome can also be a promising candidate for crossing the BBB in order to efficient gene delivery and therapy of CNS diseases.

Key words:

1. Virosomes
2. Central Nervous System
3. Cell Culture Techniques

*Corresponding Authors: Mohsen Zargar, Amir Ghaemi

E-mail: zmohsen2002@yahoo.com, ghaem_amir@yahoo.com

ساخت وایروزوم کاتیونیک مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس به عنوان کاندید امیدوارکننده به منظور تحویل موثر ژن به سیستم عصبی مرکزی

دلارام احمدی^۱، محسن زرگر^{۱*}، محمد رضا ذوالفقاری^۱، منیره کاظمی منش^۲، امیر قائمی^{۳*}

^۱گروه میکروب شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

^۲گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۳گروه آنفلوانزا و ویروس های تنفسی شایع، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۲۳ آذر ۱۳۹۸

اصلاحیه: ۱۹ آذر ۱۳۹۸

دریافت: ۳۰ آبان ۱۳۹۸

چکیده

مقدمه: امروزه یکی از موانع ژن درمانی در درمان بیماری های سیستم اعصاب مرکزی، نبود سیستم های حامل مناسب و ایمن برای عبور از سد خونی مغزی است. وایروزوم ها ذرات شبه ویروسی بوده که اگر از ویروس های نوروتروپیک ساخته شوند، می توانند در مغز مورد استفاده قرار گیرند. هدف از این مطالعه ساخت وایروزوم کاتیونیک مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس با استفاده از فسفولیپید کوتاه زنجیر با قابلیت دیالیز و لیپید کاتیونیک در شرایط آزمایشگاهی می باشد. **مواد و روش ها:** ویروس وزیکولار استوماتیتیس در رده سلولی Vero تکثیر شد. متعاقباً، ویروس تولید شده با استفاده از اولترافیلتراسیون و اولتراسانتریفیوژ تغلیظ و تخلیص گردیده و در نهایت، وایروزوم توسط دترجنت DCPC و افزودن لیپید کاتیونیک، سنتز شد. توزیع سایز نانوذرات وایروزوم، میزان سمیت سلولی و پروتئین VSV-G به ترتیب توسط اندازه گیری پراکندگی نور دینامیک با استفاده از دستگاه زتا سایزر، روش زندهمانی سلولی و سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) آنالیز شد. **یافته ها:** ویروس های تولید شده با روش اولترافیلتراسیون و اولتراسانتریفیوژ تغلیظ گردیده و غلظت نهایی وایروزوم ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر شد. سایز وایروزوم کاتیونیک ۱۸۶/۶ نانومتر بود و بقای سلولی پس از ۴۸ ساعت درمان با غلظت های مختلف وایروزوم کاتیونیک در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی داری داشت. پروتئین VSV-G با وزن مولکولی ۶۳ کیلودالتون نیز از طریق SDS-PAGE تایید گردید. **نتیجه گیری:** استفاده از فسفولیپید کوتاه زنجیر یک روش مؤثر در حل کردن و بازآرایی پوشش ویروس وزیکولار استوماتیتیس بوده و در گلیکوپروتئین سطحی ویروس (VSV-G) تغییری ایجاد نمی کند. این وایروزوم کاتیونیک به دلیل دارا بودن پروتئین VSV-G و تروپیسیم وسیع سلولی، می تواند کاندید امیدوارکننده ای برای عبور از سد خونی مغزی جهت تحویل مؤثر ژن و درمان بیماری های سیستم اعصاب مرکزی باشد.

کلید واژه ها:

۱. وایروزوم
۲. سیستم اعصاب مرکزی
۳. روش های کشت سلولی

* نویسندگان مسئول: محسن زرگر، امیر قائمی

آدرس الکترونیکی: zmohsen2002@yahoo.com, ghaem_amir@yahoo.com

مقدمه

و فیوژن به سطح سلول هدف را دارا می‌باشند (۱۶، ۱۵). ویروس وزیکولار استوماتیتیس، یک ویروس پوشش‌دار با ریونوکلیک اسید منفی از خانوادهٔ رابدوویریده می‌باشد. پروتئین G این ویروس، یک گلیکوپروتئین غشایی است که در اتصال ویروس به گیرنده‌های اختصاصی موجود در سطح اکثر سلول‌ها دخالت دارد. عفونت‌زایی VSV در سلول‌های زنده نیازمند دو مرحلهٔ متوالی است. مرحلهٔ اول شامل اتصال پروتئین G به فسفاتیدیل سرین (PS) موجود بر روی سطح سلول می‌باشد (۱۷، ۱۸). به دنبال این اتصال، ویروس از طریق اندوسیتوز به واسطهٔ گیرنده وارد سلول می‌شود. متعاقباً، محیط درون اندوزومی با pH پایین، ادغام پوشش ویروسی با غشاءهای وزیکول‌های اندوسیتوزی را القاء می‌بخشد (۲۰، ۱۹). در نهایت، ویرون VSV نوکلئوکسید ویروسی را به درون سیتوپلاسم آزاد می‌سازد (۲۴-۲۱). به دلیل نوروپایسم بودن ویروس VSV و قابلیت اتصال پروتئین VSV-G به گیرندهٔ فسفاتیدیل سرین (PS) موجود در بافت مغز، مهندسی این ویروس در مطالعات مرتبط با درمان بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی می‌تواند راه‌گشا باشد (۲۵).

با توجه به مزایای ویروس VSV، نوروپایسم بودن آن و همچنین برتری ساختار وایروزم نسبت به دیگر نانوذرات، در مطالعهٔ حاضر، به طراحی و ساخت وایروزم کاتیونیک VSV مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس به‌عنوان یک نانوذرهٔ غیر ویروسی به‌منظور انتقال ژن و دارو و با امید به اینکه قابلیت عبور از سد خونی-مغزی را دارا باشد، پرداخته شد. بدین منظور، برای ساخت این وایروزم، از لیپید کاتیونیک DOTAP^۱ و دترجنت DCPC^{۱۱} (جهت حذف پوشش ویروسی) استفاده شد. سپس با استفاده از SDS-PAGE به بررسی حضور پروتئین VSV-G پرداخته و ارزیابی میزان سمیت و ریخت‌شناسی^{۱۲} وایروزم، به ترتیب از طریق آزمون MTT و آزمون زتا صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها

دترجنت DCPC (1,2-Dicaproyl-sn-glycero-3-) (phosphocholine, #850305p, Avanti Polar Lipids) لیپید کاتیونیک DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-) trimethylammonium-propane, #890890p, Avanti Polar Lipids) کاست دیالیز Slide-A-Lyzer™ Dialysis (Cassettes, 0.5-3 ml, 3-12 ml, Thermo Fisher Scientific) و رنگ (MTT, Sigma Aldrich)^{۱۳} خریداری شد. همچنین

امروزه ژن درمانی به دلیل پتانسیل بالا در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. ژن درمانی نمایانگر روش درمانی بالقوه و قابل تغییر برای ایجاد تأثیرات طولانی‌مدت از طریق بهبود علائم، کاهش سرعت پیشرفت و یا حتی اصلاح بیماری با کاربردهایی برای درمان اختلالات سیستم عصبی مرکزی (CNS)^۱ است (۳-۱). مهم‌ترین مانعی که در درمان اختلالات مغزی با آن مواجه هستیم، سد خونی-مغزی (BBB)^۲ می‌باشد که به‌منظور حفاظت از مغز در برابر عوارض جانبی نامطلوب (۴) از انتقال بسیاری از داروها، پپتیدها و مولکول‌های بزرگ از عرض لایهٔ سلول اندوتلیال جلوگیری می‌کند (۷-۵). سلول‌های اندوتلیال مغز به همراه عناصر خونی یک سد انتخابی و پویا را ایجاد می‌کنند که حرکت مولکول‌ها از خون به مغز را محدود می‌سازد (۸). راهبردهای بسیاری به‌منظور ورود به مغز ایجاد شده است، از جمله جراحی‌های مغز و روش‌های دارویی و فیزیولوژیکی. هر سه روش معایبی دارند که مانع موفقیت درمان می‌شود. با پیشرفت در فناوری‌های انتقال ژن، یک روش جایگزین برای غلبه بر برخی از این مشکلات، استفاده از نانوذرات مهندسی شده جهت انتقال و بیان ژن می‌باشد (۱۰، ۹). جهت دستیابی به فرایند ژن درمانی موفق، توسعهٔ سیستم‌های تحویل ژن مناسب، می‌تواند یکی از مهم‌ترین فاکتورها به شمار آید (۱۲، ۱۱). وایروزم پوشش ویروسی بازسازی شده، متشکل از لیپیدهای غشائی و اسپایک‌های گلیکوپروتئینی سطحی ویروس بوده که فاقد مادهٔ ژنتیک ویروسی می‌باشد. سطح خارجی وایروزم مشابه ذرات ویروسی است که پروتئین‌های اسپایک از غشای آن‌ها به بیرون جوانه زده است، در حالی که فضای داخل وایروزم خالی می‌باشد (۱۴، ۱۳). Almedia و همکاران، برای اولین بار ساخت وایروزم را با استفاده از وارد کردن پروتئین‌های اسپایک تخلیص شدهٔ ویروس آنفلوانزا به لیپوزوم‌های از پیش ساخته شده گزارش کردند. تا به امروز، بازسازی برخی از پوشش‌های ویروسی از جمله ویروس آنفلوانزا^۳، ویروس سندای^۴، ویروس بیماری نیوکاسل^۵، VSV^۶، HIV^۷، HSV^۸ و EBV^۹ صورت گرفته است (۱۵). این وزیکول‌های فسفولیپیدی تک لایه یا دو لایه، قطری در حدود ۱۸۰-۱۲۰ نانومتر داشته و در مقایسه با لیپوزوم‌ها واجد گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروسی می‌باشند. از این رو، وایروزم‌ها قابلیت تکثیر و عفونت‌زایی را ندارند ولی به علت حضور اسپایک‌های ویروسی توانایی اتصال

^۱ Central nervous system^۲ Blood brain barrier^۳ Influenza virus^۴ Sendai virus^۵ Newcastle disease virus^۶ Vesicular stomatitis virus^۷ Human immunodeficiency virus^۸ Herpes simplex virus^۹ Epstein barr virus^{۱۰} 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane^{۱۱} 1,2-Dicaproyl-sn-glycero-3-phosphocholine^{۱۲} Morphology^{۱۳} 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl tetrazoliumbromide

و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون و خارج کردن محیط حاوی ویروس، محیط کشت جدید DMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۲ درصد سرم گاوی به داخل فلاسکها افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. با اتمام مدت زمان انکوباسیون و مشاهده اثرات آسیب سلولی (CPE)^{۱۸} ناشی از تکثیر ویروس، شامل گرد شدن و جدا شدن سلولها از سطح فلاسک، جمع آوری ویروس از طریق سانتریفیوژ محتویات فلاسکها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. در نهایت ویروس VSV جمع آوری شده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تیتراسیون ویروس با استفاده از تست (TCID₅₀)

مقدار ویروس در واحد میلی لیتر که توان ایجاد CPE در ۵۰ درصد از سلولهای تلقیح شده را دارا می باشد با استفاده از فرمول کربر^{۱۹} محاسبه گردید (۲۷). بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲۰ هزار سلول Vero به همراه محیط کشت DMEM واجد آنتی بیوتیک -pen strep و سرم گاوی ۱۰ درصد جهت تشکیل سلولهای تک لایه با تراکم ۸۰ درصد، به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ته صاف افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت، تلقیح ویروس با تیترا اولیه ۱۰^۷ و با استفاده از رقت سازی (رقت های صفر تا ۱۰^{-۱۲}) بر روی سلولهای تک لایه صورت گرفت. برای هر رقت، ۴ چاهک با شرایط یکسان در نظر گرفته شد. در نهایت، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، TCID₅₀^{۲۰} بر مبنای CPE و فرمول کربر محاسبه گردید.

تغلیظ اولیه ویروس (اولترا فیلتراسیون)

به منظور تغلیظ ویروس جمع آوری شده به نسبت ۱:۱۰، از دستگاه اولترا فیلتراسیون (TFF)^{۲۱} شرکت Millipore (USA) با فیلتر ۱۰۰ هزار دالتون استفاده گردید. ارلن حاوی ویروس روی یخ قرار داده شد و سوسپانسیون ویروسی با فیلتر مجاور گردید. محیط کشت از فیلتر عبور کرده اما ویروس به دلیل اندازه بزرگتر توانایی عبور از فیلتر را نداشته و مجدداً به ظرف اصلی باز می گردد. این بازچرخش باعث تغلیظ ویروس تا ۱۰ برابر می گردد (۲۸). در نهایت ویروس تغلیظ یافته جمع آوری و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آماده سازی وایروزم

وایروزم کاتیونیک VSV، بر اساس روش de Jonge و همکاران آماده گردید (۲۹). ابتدا، با ایجاد یک

تریپسین، DMEM^{۱۴} و FBS^{۱۵} از شرکت Gibco تهیه گردید.

کشت سلول

سلولهای مورد استفاده در این تحقیق سلولهای کلیه میمون سبز آفریقای (African Green Monkey Kidney Cells, Vero Cells) می باشد که از بانک سلول انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده است. سلولها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) / استرپتومایسین (۱۰۰ ماکروگرم بر میلی لیتر)، به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شد.

ویروس

در مطالعه حاضر، ویروس وزیکولار استوماتیتیس با تیترا اولیه ۱۰^۷ میلی لیتر از بخش هاری انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

تعیین ضریب آلودگی بهینه (MOI)

ضریب آلودگی بهینه (MOI)^{۱۶}، در واقع نسبت تعداد ذرات ویروسی را به ازا یک سلول به ما نشان می دهد (۲۶). از این رو، حجم مناسب ویروس جهت آلوده نمودن سلولهای رده Vero بر مبنای ضریب آلودگی تعیین گردید. بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲۰ هزار سلول Vero جهت تشکیل سلولهای تک لایه با تراکم ۸۰ درصد به همراه محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک Pen-Strep و ۱۰ درصد سرم گاوی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ته صاف (SPL Life Science Co., Ltd, Korea) افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت، تلقیح ویروس با تیترا اولیه ۱۰^۷ میلی لیتر در MOI های ۱ تا ۲۰ بر روی سلولهای تک لایه صورت گرفت. برای هر ضریب آلودگی، ۳ چاهک با شرایطی یکسان در نظر گرفته شد. همچنین سرعت تخریب سلولها به واسطه تکثیر ویروس در زمانهای مختلف به منظور تعیین ضریب آلودگی مناسب مورد ارزیابی قرار گرفت.

تلقیح ویروس

پس از تشکیل سلولهای تک لایه با تراکم ۸۰ درصد، تلقیح ویروس VSV با ضریب آلودگی ۶ به عنوان دوز بهینه صورت گرفت. پس از دو مرتبه شست و شوی سلولها با فسفات بافر (PBS)^{۱۷} استریل، ۳ سی سی محیط واجد ویروس به داخل فلاسک حاوی سلول تلقیح شد. سپس فلاسکها به مدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه ۵ درصد CO₂

^{۱۴} Dulbecco's modified eagles' medium

^{۱۵} Fetal bovine serum

^{۱۶} Multiplicity of infection

^{۱۷} Phosphate-buffered saline

^{۱۸} Cytopathic effect

^{۱۹} Karber

^{۲۰} Tissue culture infectious dose 50%

^{۲۱} Tangential flow filtration

تمامی میکروتیوب‌ها اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله را در ۱ میلی‌لیتر معرف لوری حل کرده و پس از انکوباسیون، فولین رقیق شده (نسبت یک به یک) به هر میکروتیوب اضافه و ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. در نهایت، هر میکروتیوب را در چاهک‌های مربوطه در پلیت الایزا به صورت تکرارهای دوتایی منتقل کرده و جذب نوری با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و نتایج به دست آمده از رقت‌های ویروسی با رقت‌های استاندارد مقایسه گردید.

سنجش توانایی زیستی سلولی با روش رنگ‌سنجی MTT

به‌منظور بررسی اثر وایروزم کاتیونیک VSV بر رشد و تکثیر سلول‌های Vero، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. اساس این روش، شکسته شدن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. در این روش، مقدار دانسیته نوری^{۲۳} هر چاهک نشان‌دهنده میزان تغییر رنگ زرد به بنفش ناشی از فعالیت دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده است (۳۱). حدود ۵۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک کشت داده شده و ۲۴ ساعت زمان داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت ۹۶ خانه بچسبند. سپس غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از وایروزم کاتیونیک VSV به سلول‌ها اضافه گردیده و پلیت را به مدت ۴۸ ساعت انکوبه کردیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت رویی تخلیه شده و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از محلول MTT حل شده در بافر فسفات افزوده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. در این فاصله زمانی، MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز احیاء شده و کریستال‌های فورمازان آبی رنگ تشکیل می‌شود. شدت رنگ تولید شده، به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است. پس از ۴ ساعت، کریستال‌های غیرمحلول فورمازان تشکیل شده، توسط ۱۰۰ میکرولیتر از حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO)^{۲۴} به صورت محلول در آمده و در نهایت جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر در برابر طول موج رفرنس ۶۹۰ نانومتر قرائت شد. درصد بقا سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور شد. این آزمایش جهت نتیجه بهتر دو بار تکرار شده و درصد سلول‌های زنده طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری نمونه‌های کنترل/جذب نوری نمونه‌های تیمار شده}) = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

بررسی حضور پروتئین VSV-G با روش SDS_PAGE

گرایانت سوکروز ناپیوسته [10-60% (w/v)]، ویروس VSV، از طریق اولترا سانتریفیوژ (دور ۳۲۰۰ rpm، ۲ ساعت، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تا حدود ۲۰۰ برابر تغلیظ گردید. سپس، به‌منظور تخلیص و حذف سوکروز، پس از خارج کردن ویروس از لایه مابین سوکروز ۱۰ درصد و ۶۰ درصد، آن را وارد کاست دیالیز ۱۲ میلی‌لیتری کرده و در بافر HBS با $\text{pH} = 7.4$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز دیالیز گردید. متعاقباً، ویروس دیالیز شده VSV، توسط اولترا سانتریفیوژ (۳۲۰۰ rpm، یک ساعت، ۴ درجه سانتی‌گراد) رسوب داده شد و رسوب حاصله در ۳۷۵ میکرولیتر بافر HBS 1X حل شد. جهت تخریب پوشش ویروسی و آزادسازی نوکلئوپروتئین ویروس، ۳۷۵ میکرولیتر از دترجنت DCPC که طبق دستورالعمل شرکت از قبل آماده گردیده بود، به ویروس خالص VSV اضافه گردید و این مخلوط دترجنت DCPC و ویروس VSV به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت (در این مرحله پوشش ویروس حل می‌شود) و به‌منظور جداسازی نوکلئوپروتئین از پوشش ویروسی، لیزات ویروسی حاوی دترجنت DCPC، به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۲۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اولتراسانتریفیوژ شد. در نهایت سوپرناتانت حاوی فسفولیپید و گلیکوپروتئین‌های ویروسی برداشت شد. جهت ساخت وایروزم کاتیونیک، از لیپید کاتیونیک DOTAP استفاده گردید. بدین منظور ۰/۸۰۸ ماکرومول از پودر DOTAP (۳۵ درصد کل فسفولیپیدها) را در کلروفرم حل کرده و در معرض گاز نیتروژن خشک قرار داده تا حلال آن به طور کامل حذف شده و برای مدت زمان ۲ ساعت در پمپ خلاء قرار گرفت. سوپرناتانت مرحله قبل به DOTAP خشک شده اضافه شد و برای مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از اتمام ۳۰ دقیقه، به‌منظور شکل‌گیری مجدد پوشش ویروس، دترجنت DCPC از طریق دیالیز حذف گردید. بدین صورت که سوپرناتانت حاوی پروتئین‌ها و لیپیدهای ویروسی، DCPC و DOTAP به کاست دیالیز ۳-۵/۰ میلی‌لیتری وارد گردیده و به مدت دو شبانه‌روز در ۲ لیتر بافر HBS 1X در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز گردید. در نهایت پس از اتمام فرایند دیالیز و حذف دترجنت DCPC، وایروزم کاتیونیک VSV به صورت نقاط سفید رنگی قابل رؤیت گردید.

سنجش میزان پروتئین تام (تست لوری)

غلظت پروتئین موجود در وایروزم کاتیونیک، با استفاده از تست لوری تخمین زده شد (۳۰). رقت‌های سریالی از سرم آلبومین گاوی (BSA)، به‌عنوان رقت‌های استاندارد آماده گردید. به همه نمونه‌ها اعم از استاندارد و مجهول، محلول سدیم دئوکسی کولات اضافه گردید. سپس محلول (تری کلرواستیک اسید TCA)^{۲۲} را به

²² Trichloro acetic acid

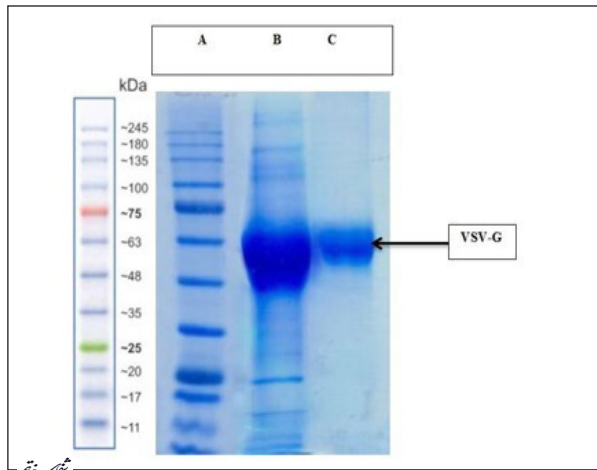
²³ Optical density

²⁴ Dimethyl sulfoxide

کاتیونیک VSV با استفاده از تست لوری، ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر تخمین زده شد.

بررسی حضور پروتئین VSV-G با روش SDS-PAGE

در تصویر ۱ محتویات پروتئینی ویروس سالم VSV و وایروزم کاتیونیک VSV قابل مشاهده می باشد. وزن مولکولی پروتئین VSV-G، ۶۳ کیلودالتون می باشد.



تصویر ۱- ژل الکتروفورز: (A) نشانگر پروتئینی، (B) ویروس سالم (C) VSV، وایروزم کاتیونیک VSV حاوی پروتئین VSV-G.

اثر وایروزم بر زنده ماندن سلول های Vero

رده سلولی Vero با غلظت های مختلف ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ ماکروگرم بر میلی لیتر از وایروزم کاتیونیک VSV به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد. میزان سمیت وایروزم کاتیونیک، با افزایش غلظت (۱۵ ماکروگرم بر میلی لیتر) با تغییراتی از جمله کاهش حجم و گرد شدن سلول ها قابل مشاهده بود (تصویر ۲). همچنین وایروزم، بقای سلولی را در مقایسه با چاهک کنترل، با افزایش غلظت به صورت معنی داری کاهش داد (نمودار ۱).

سایز وایروزم کاتیونیک VSV

سایز وایروزم کاتیونیک ساخته شده با استفاده از دستگاه zetasizer اندازه گیری شد. سایز وایروزم کاتیونیک ۱۸۶/۶ نانومتر و دارای پتانسیل زتا ۶/۷۵+ میلی ولت و شاخص پراکندگی (PDI) ۰/۲۳۴^{۲۷} بود.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، به ساخت وایروزم کاتیونیک مشتق شده از ویروس VSV با استفاده از دترجنت DCPC و لیپید کاتیونیک پرداخته شد. به طور کلی ژن رسانی با دو روش حامل های ویروسی و غیر ویروسی انجام می گیرد. سیستم تحویل ژن ایده آل دارای سه معیار عمده می باشد: حاملین می بایست ژن انتقالی را از آزمون های آندونوکلئاز درون ماتریکس های داخل سلولی

به منظور تأیید حضور پروتئین VSV-G در وایروزم کاتیونیک تشکیل شده، از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده گردید که شامل ژل جداکننده ۱۲ درصد تا ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد می باشد (۳۲). به منظور آماده سازی نمونه ها، ابتدا پروتئین های مورد نظر باید به حالت خطی تبدیل شوند. بدین منظور پروتئین ها در مقدار کافی از SDS و همچنین ماده احیاء کننده مرکاپتو اتانول جهت از بین بردن باندهای دی سولفیدی قرار گرفته و دقایقی حرارت می دهیم. پس از آماده سازی ژل، دستگاه الکتروفورز را به داخل تانک الکتروفورز منتقل کرده و مخزن تانک و مخزن الکتروفورز را با بافر تانک 1X پر می کنیم. سپس نشانگر پروتئینی را در چاهک اول و به ترتیب نمونه های ویروس VSV سالم و وایروزم کاتیونیک را پس از آن لود کرده و در نهایت ولتاژ را وصل می کنیم. رنگ آمیزی ژل به روش کوماسی بلو انجام گرفت و پس از رنگبری ژل، به بررسی باندهای تشکیل شده پرداخته شد.

تعیین سایز و بار وایروزم کاتیونیک

سایز و بار وایروزم کاتیونیک VSV، با روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)^{۲۵} و با استفاده از دستگاه (ZETASIZER NANO-ZS90 (Malvern Instruments اندازه گیری شد. نمونه های وایروزم به نسبت ۱:۶ در بافر PBS رقیق شده و یک میلی لیتر از آن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد آنالیز گردید.

آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده گردید و نتایج به صورت درصد و انحراف معیار گزارش شد. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آزمون واریانس یکطرفه^{۲۶} استفاده گردید. مقادیر $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری نتایج در نظر گرفته شد.

یافته ها

تعیین ضریب آلودگی بهینه

بررسی ضریب های آلودگی ۱ تا ۲۰ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون نشان داد که ضریب آلودگی بهینه وابسته به زمان بوده و در زمان های مختلف، اثرات آسیب سلولی در چاهک های مختلف تغییر می نماید. جهت تکمیل سیکل ویروس و کاهش میزان تولید ذرات شبه ویروسی، ضریب آلودگی ۶ با دوره انکوباسیون ۲۴ ساعته انتخاب شد.

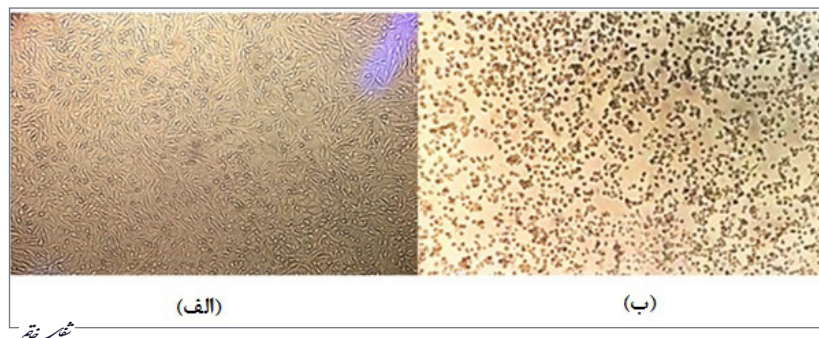
تعیین غلظت پروتئین تام وایروزم کاتیونیک

ویروس VSV تغلیظ شده، دارای غلظت پروتئینی معادل ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. غلظت نهایی وایروزم

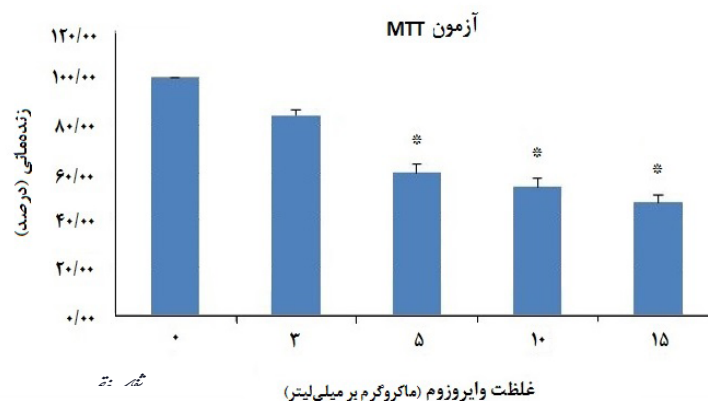
²⁵ Dynamic light scattering

²⁶ ANOVA

²⁷ Index of dispersion



تصویر ۲- اثرات آسیب سلولی (CPE) ناشی از آلودگی رده سلولی Vero با ویروس وزیکولار استوماتیتیس. (الف): سلول‌های سالم Vero. (ب): اثرات سایتوپاتیک سلول‌های آلوده به ویروس. تغییر شکل ساختاری (کاهش حجم سلول‌ها و گرد شدن آن‌ها) سلول‌های Vero ناشی از وایروزم در مقایسه با سلول‌های سالم قابل مشاهده است.



نمودار ۱- سمیت وایروزم کاتیونیک VSV در سلول‌های Vero در ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر). سمیت سلولی با آزمون MTT سنجیده شد. هر ستون بیانگر میانگین و انحراف معیار در نمونه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$ در مقایسه با کنترل).

و به محتوای آن‌ها این توانایی را می‌دهد که تا زمان رسیدن به سیتوپلاسم سالم باقی بمانند. این امر منجر به تمایز عمده وایروزم‌ها نسبت به سایر سیستم‌های لیپوزومی شده است (۱۶). همچنین، وایروزم‌ها به دلیل توانایی اتصال با میل ترکیبی بالا به گیرنده‌های خود بر روی سطح غشاهای بیولوژیکی، اندوسیتوز را القاء کرده و منجر به ادغام غشای اندوزومی با پروتئین‌های بسیار فیوژنیک خود می‌گردند (۳۹). لازمه استفاده موفقیت‌آمیز از وایروزم‌ها، بازسازی پروتئین‌های غشایی است. بدین صورت که خواص ایمونولوژیک و اتصال به گیرنده‌ها و فعالیت‌های فیوژنیک آن‌ها حفظ شود (۲۹). زمانی مفهوم بازسازی، به پروتئین‌های غشایی اطلاق می‌شود که عموماً پروتئین مد نظر با کمک یک دترجنت، از غشاء اصلی خود استخراج شده و متعاقباً با حذف دترجنت در غشای تشکیل شده جدید جای گیرد (۴۰).

در این مطالعه به دلیل نوروتروپیس بودن ویروس وزیکولار استوماتیتیس و گرایش به اتصال با گیرنده‌های فسفاتیدیل سرین (PS) موجود بر روی غشاء سلول‌های مغزی، از این ویروس به‌منظور ساخت وایروزم کاتیونیک استفاده گردید. پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس دارای گیرنده‌های پراکنده بر روی سطح اکثر غشاهای سلولی است. برهم کنش‌های غیراختصاصی الکترواستاتیک، هیدروفوبیک و

محافظت کنند، همچنین باید ژن را از غشای پلاسمایی به هسته سلول هدف منتقل کرده و نباید هیچ‌گونه سمیتی را ایجاد کنند (۱۲). ژن‌رسانی و همچنین تحویل دارو به مغز به دلیل وجود سد خونی-مغزی که حتی به نانوذرات‌هایی با اندازه کوچک اجازه عبور نمی‌دهد، یکی از مهم‌ترین نکات کلیدی در رابطه با ژن درمانی بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد. سیستم‌های ویروسی نسبت به سیستم‌های غیر ویروسی قدیمی‌تر و کارآمدتر بوده زیرا ویروس‌ها به طور طبیعی از مکانیسم‌های متنوعی برای عبور از موانع سلولی استفاده می‌کنند (۳۴، ۳۳). علی‌رغم استفاده وسیع از سیستم‌های ویروسی، امروزه حامل‌های غیر ویروسی به دلیل ایمنی بالاتر، تولید آسان و تنوع بیشتر به‌عنوان یک جایگزین مناسب مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۵). سیستم‌های ویروسی از جمله حامل‌های رترو ویروسی، آدنو ویروسی و لنتی ویروسی معمولاً نسبت به دیگر موارد در تحویل ژن مؤثرتر عمل کرده‌اند، اما برای تحویل عواملی از جمله الیگونوکلوئیدهای سنتتیک، پروتئین‌ها یا ترکیبات کوچک، ایده‌آل نمی‌باشند (۳۸-۳۶). مطالعات گوناگون پیرامون وایروزم‌ها نشان می‌دهد که وایروزم می‌تواند مولکول‌های فعال بیولوژیکی بسیاری از جمله اسیدهای نوکلئیک، پپتیدها، پروتئین‌ها و مولکول‌های آلی کوچک را با خود حمل کرده و همچنین در برابر تجزیه پروتئولیتیک و اندوزوم‌های pH پایین از آن‌ها حفاظت کرده

ساخته شده حاوی پروتئین G با وزن مولکولی ۶۳ کیلو دالتون بوده و در مقایسه با ویروس سالم VSV فاقد نوکلئوکپسید می‌باشد. قطر میانگین وایروزم کاتیونیک، در حدود ۱۸۶/۶ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات ۰/۲۳۴ بود. این شاخص حاکی از آن است که نمونه وایروزم ساخته شده به طور منطقی هموزن می‌باشد. ویروس وزیکولار استوماتیتیس سالم دارای طولی در حدود ۱۹۶ نانومتر و عرض ۷۰ نانومتر است (۴۵). همچنین، نتایج مربوط به اثرات سایتوتوکسیک وایروزم بر رده سلولی Vero که با آزمون MTT تعیین گردید، یک روند مهار تکثیر سلولی وابسته به غلظت را نشان می‌دهد.

همچنین در تحقیقاتی که بر روی پروتئین VSV-G انجام گرفته است، این پروتئین به‌عنوان یک پروتئین مهم در ژن درمانی سلول‌های مختلف معرفی گردیده است. در مطالعاتی که Coil و Miller بر روی پروتئین G انجام دادند، نشان داده شد که تروپیسیم سلولی بالای این پروتئین، به دلیل وجود فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌ها است (۴۶). Dobrzynska و همکارانش نشان دادند که سلول‌های سرطانی قادر به بیان مقادیر بیشتری از مولکول فسفاتیدیل سرین نسبت به سلول‌های طبیعی می‌باشند (۴۷). در پژوهشی دیگر که Jiang و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام دادند، نشان داده شد که به‌منظور دستیابی به یک هدف اختصاصی در درمان سرطان‌های مغزی و بیماری‌های مرتبط با CNS، لیپوزوم‌ها می‌توانند با ترکیبات ویروسی (وایروزم) ادغام شده و به دلیل اندازه کوچک و ترکیبات لیپیدی ساختار خود، توانایی ذاتی در ورود به سلول‌های اندوتلیال مویرگی مغز (BCECs) داشته باشند. آن‌ها در این تحقیق فاکتور نوروتروپیک مشتق شده از سلول گلیال (GDNF) را در شرایط in-vivo، از طریق تحویل ژن به BCEC، از عرض سد خونی-مغزی که به اکثر ترکیبات و بسیاری از داروها نفوذ ناپذیر است، با استفاده از لیپوزوم ویروس HVJ^{۳۲} که در بردارنده ژن mGDNF بود، عبور دادند (۴۸).

با توجه به عدم موفقیت درمان‌های رایج انواع سرطان از جمله تومورهای مغزی، افزایش تحویل و سمیت برای تومورهای مغزی به واسطه ناقلین ویروسی و غیر ویروسی، حاملین سلولی با گرایش به سمت تومور و بیان‌کننده ژن‌های درمانی و نیز تروپیسیم بالای VSV-G به فسفاتیدیل سرین سلول‌های سرطانی، وایروزم کاتیونیک وزیکولار استوماتیتیس می‌تواند به‌عنوان کاندیدی برای تحویل مؤثر ژن القاء‌کننده آپوپتوز Trail، در کنار داروهای شیمی درمانی و رادیوتراپی، مورد استفاده قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتر بر روی نحوه دقیق عبور از سد خونی-مغزی و همچنین القای اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوزیک بر روی رده‌های سلولی

فسفولیپیدهای با بار منفی، در اتصال پروتئین VSV-G به سطح غشاءها دخالت دارند (۴۱).

تا به امروز با وجود تمام کاستی‌ها، چندین روش برای ساخت وایروزم انجام گرفته است. Paternoster و همکاران در سال ۱۹۸۹، از Triton X-100 به‌منظور حل کردن غشاء VSV و به دنبال آن حذف دترجنت به کمک رزین‌های هیدروفوبیک (SM2 Bio-Beads) استفاده نمودند. در این روش برخی ضعف‌های مرتبط با استفاده از رزین‌های هیدروفوبیک از جمله استریل نگه داشتن شرایط، وجود داشت. همچنین گزارش کردند که قرار گرفتن طولانی‌مدت پروتئین G در معرض رزین‌های هیدروفوبیک، منجر به غیرفعال شدن بخشی از آن می‌شود (۴۲). Paternoster و همکاران در سال ۱۹۹۷، از اکتیل گلوکوزید (OG) به‌عنوان یک دترجنت با CMC بالا استفاده کرده و به‌منظور حذف آن، دیالیز صورت گرفت. آن‌ها تنها قادر به بازیابی پروتئین‌های عملکردی G در غلظت‌های کمی از OG شدند (۴۰). در این مطالعه، به‌منظور ساخت وایروزم کاتیونیک مشتق شده از ویروس وزیکولار استوماتیتیس، روشی که قبلاً توسط de Jonge و همکاران در سال ۲۰۰۶ استفاده شده بود، به کار گرفته شد. بر اساس این روش، DCPC که یک عامل شبه دترجنت کوتاه زنجیر با CMC بالا است، به‌منظور حل کردن پوشش ویروسی مورد استفاده قرار گرفت. این ماده نسبت به سایر دترجنت‌ها بی‌خطر بوده و می‌تواند از طریق دیالیز حذف گردد. به محض حذف غشای ویروس وزیکولار استوماتیتیس به وسیله DCPC، مقادیر زیادی از پروتئین G از ویروس استخراج گردیده و به دنبال آن نوکلئوپروتئین ویروسی از طریق اولترا سانتریفیوژ حذف شد. دیالیز لیفات ویروسی و در نتیجه حذف DCPC منجر به بازسازی غشای وزیکول‌ها به همراه گلیکوپروتئین‌های سطحی گردید (۲۹). به‌منظور ایجاد بار مثبت بر روی ساختار وایروزم، از لیپید کاتیونیک استفاده شد. زمانی که لیپیدهای کاتیونیک قبل از بازآرایی پوشش ویروسی در ساخت وایروزم مورد استفاده قرار می‌گیرند، وایروزم‌ها برای اتصال یا در برگرفتن دئوکسی ریبونوکلیک اسید^{۲۸} (۴۳) یا ریبونوکلیک اسید تداخل‌گر کوچک (siRNA)^{۲۹} (۴۴) مناسب‌تر شده و متعاقباً این اسیدهای نوکلئیک را به هدف تحویل خواهند داد (۲۹). در این شرایط لیپید کاتیونیک بار مثبت به سطح وایروزم القاء کرده و همین امر منجر به اتصال بیشتر مولکول هدف و به‌خصوص دئوکسی ریبونوکلیک اسید با سطح وایروزم می‌شود. ویروس VSV تغلیظ شده دارای غلظتی برابر با ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بوده و غلظت ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر وایروزم ساخته شده نشان‌دهنده آن است که در پروسه ساخت وایروزم بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و نوکلئوپروتئین ویروس از بین رفته است. نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان داد که وایروزم کاتیونیک

^{۲۸} DNA

^{۲۹} Small interfering ribonucleic acid

^{۳۰} Brain capillary endothelial cells

^{۳۱} Glial cell-derived neurotrophic factor

^{۳۲} Hemagglutinating virus of Japan

جهت اخذ درجه دکتری در رشته زیست‌شناسی میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد. بدینوسیله از تمامی اساتید شرکت‌کننده در این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

تومورهای مغزی ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم دلارام احمدی به

منابع

1. Lykken EA, Shyng C, Edwards RJ, Rozenberg A, Gray SJ. Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J Neurodev Disord*. 2018; 10(1): 16. doi: 10.1186/s11689-018-9234-0.
2. Costantini L, Bakowska J, Breakefield X, Isacson O. Gene therapy in the CNS. *Gene Ther*. 2000; 7(2): 93-109.
3. Pardo J, R Morel G, Astiz M, I Schwerdt J, L Leon M, S Rodriguez S, et al. Gene therapy and cell reprogramming for the aging brain: achievements and promise. *Curr Gene Ther*. 2014; 14(1): 24-34.
4. Patel MM, Patel BM. Crossing the blood-brain barrier: recent advances in drug delivery to the brain. *CNS Drugs*. 2017; 31(2): 109-33.
5. Elias D, Blot F, El Otmany A, Antoun S, Lasser P, Boige V, et al. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*. 2001; 92(1): 71-6.
6. Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain via blood-brain barrier receptor-mediated transport systems. *International Congress Series*. 2005; 49-62.
7. Maussang D, Rip J, van Kregten J, van den Heuvel A, van der Pol S, van der Boom B, et al. Glutathione conjugation dose-dependently increases brain-specific liposomal drug delivery in vitro and in vivo. *Drug Discov Today Technol*. 2016; 20: 59-69.
8. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007; 12(1-2): 54-61.
9. Pandey PK, Sharma AK, Gupta U. Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking. *Tissue Barriers*. 2016; 4(1): e1129476.
10. Tapeinos C, Battaglini M, Ciofani G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *J Control Release*. 2017; 264: 306-32.
11. Morgan JR. Gene therapy protocols. Springer Science & Business Media. 2002.
12. Cevher E, Sezer AD, Çağlar E. Gene delivery systems: recent progress in viral and non-viral therapy. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. 2012; 437-70.
13. Earp LJ, Delos S, Park H, White J. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Membrane Trafficking in Viral Replication*. 2004; 25-66.
14. Jardetzky TS, Lamb RA. Virology: a class act. *Nature*. 2004; 427(6972): 307.
15. Almeida J, Edwards DC, Brand C, Heath T. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *The Lancet*. 1975; 306(7941): 899-901.
16. Kaneda Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Advanced drug Delivery Reviews*. 2000; 43(2-3): 197-205.
17. Schlegel R, Dickson RB, Willingham MC, Pastan IH. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982; 79(7): 2291-5.
18. Wehland J, Willingham MC, Gallo MG, Pastan I. The morphologic pathway of exocytosis of the vesicular stomatitis virus G protein in cultured fibroblasts. *Cell*. 1982; 28(4): 831-41.
19. Helenius A, Mellman I, Wall D, Hubbard A. Endosomes. *Trends in Biochemical Sciences*. 1983; 8(7): 245-50.
20. Pastan I, Willingham MC. Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. *Trends in Biochemical Sciences*. 1983; 8(7): 250-4.
21. Ghandehari F, Behbahani M, Pourazar A, Nourmohammadi Z. Producing vesicular stomatitis virus G (VSVG) protein and assessment of its cytotoxic activity against breast cancer cells. *Journal of Isfahan Medical School*. 2015; 33(325): 221-30.
22. Cartwright B, Smale C, Brown F. Surface structure of vesicular stomatitis virus. *Journal of General Virology*. 1969; 5(1): 1-10.
23. Schloemer RH, Wagner RR. Sialoglycoprotein of vesicular stomatitis virus: role of the neuraminic acid in infection. *Journal of virology*. 1974; 14(2): 270-81.
24. Schloemer RH, Wagner RR. Cellular adsorption function of the sialoglycoprotein of vesicular stomatitis virus and its neuraminic acid. *Journal of Virology*. 1975;

15(4): 882-93.

25. Hastie E, Cataldi M, Marriott I, Grdzelishvili VZ. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Research*. 2013; 176(1-2): 16-32.

26. González-Jara P, Fraile A, Canto T, García-Arenal F. The multiplicity of infection of a plant virus varies during colonization of its eukaryotic host. *Journal of Virology*. 2009; 83(15): 7487-94.

27. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*. 2016; 5(2): 85.

28. Wickramasinghe S, Kalbfuss B, Zimmermann A, Thom V, Reichl U. Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005; 92(2): 199-208.

29. de Jonge J, Schoen P, Stegmann T, Wilschut J, Huckriede A. Use of a dialyzable short-chain phospholipid for efficient solubilization and reconstitution of influenza virus envelopes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2006; 1758(4): 527-36.

30. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 1977; 83(2): 346-56.

31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.

33. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2014; 15(8): 541-55.

34. Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aranega A. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2005; 51(1): 3-22.

35. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Therapy*. 2006; 13(18): 1313-9.

36. Baum C, Schambach A, Bohne J, Galla M. Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Molecular Therapy*. 2006; 13(6): 1050-63.

37. Li C, Bowles DE, van Dyke T, Samulski RJ.

Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. 2005; 12(12): 913-25.

38. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *The Journal of Pathology. Journal of Pathology*. 2006; 208(2): 299-318.

39. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(32): 18997-9007.

40. Paternostre M, Viard M, Meyer O, Ghanam M, Ollivon M, Blumenthal R. Solubilization and reconstitution of vesicular stomatitis virus envelope using octylglucoside. *Biophysical Journal*. 1997; 72(4): 1683-94.

41. Carneiro FA, Bianconi ML, Weissmüller G, Stauffer F, Da Poian AT. Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *Journal of Virology*. 2002; 76(8): 3756-64.

42. Paternostre MT, Lowy RJ, Blumenthal R. pH-dependent fusion of reconstituted vesicular stomatitis virus envelopes with vero cells. Measurement by dequenching of fluorescence. *FEBS Letters*. 1989; 243(2): 251-8.

43. Schoen P, Chonn A, Cullis P, Wilschut J, Scherrer P. Gene transfer mediated by fusion protein hemagglutinin reconstituted in cationic lipid vesicles. *Gene Therapy*. 1999; 823-32.

44. de Jonge J, Holtrop M, Wilschut J, Huckriede A. Reconstituted influenza virus envelopes as an efficient carrier system for cellular delivery of small-interfering RNAs. *Gene Therapy*. 2006; 13(5): 400.

45. Ge P, Tsao J, Schein S, Green TJ, Luo M, Zhou ZH. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science*. 2010; 327(5966): 689-93.

46. Coil DA, Miller AD. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*. 2004; 78(20): 10920-6.

47. Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005; 276(1-2): 113-9.

48. Jiang C, Koyabu N, Yonemitsu Y, Shimazoe T, Watanabe S, Naito M, et al. In vivo delivery of glial cell-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier by gene transfer into brain capillary endothelial cells. *Human Gene Therapy*. 2003; 14(12): 1181-91.