

مطالعه ی فعالیت ضد سرطانی برونین-۲R بر روی رده سلولی سرطان معده

رباب حسن وند جمادی^۱، اسداله اسدی^۲، مهدی حسن وند جمادی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اردبیل، ایران
۲- دکتری بیوفیزیک، استادیار، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اردبیل، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد آب و فاضلاب، دانشگاه صنعت آب و برق شهید عباسپور، دانشکده ی آب و محیط زیست، گروه مهندسی آب و فاضلاب، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطانهای معدی-رودی از جمله فراوانترین سرطانهایی است که در سراسر جهان رخ می دهد. علت این تومورها می تواند فاکتورهای محیطی و وراثتی باشد. آدنوکارسینومای معده رایجترین نوع سرطان معده است. برونین- ۲R پپتیدی جدید با خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی است که از ترشحات پوستی قورباغه های خانواده Rana بدست می آید و دارای ۲۵ آمینو اسید بوده و کاتیونی می باشد، فعالیت همولیتیک پایینی بر روی اریتروسیتها نشان میدهد. در این مطالعه غلظت های مختلف پپتید برونین-۲R روی سلولهای کارسینومای معده انسانی (AGS) اثر داده شد.

مواد و روش: رده سلولی AGS با غلظتهای مختلف پپتید در بازه های زمانی متفاوت تیمار شد و سمیت پپتید و زیستایی سلولها بوسیله ی سنجش MTT (دیمتیل تیازول دی فنیل هیدروژن تترازولیوم بروماید) بررسی گردید. آزمایش سه بار تکرار شد که میانگین مقادیر بدست آمده نشان داده شده است.

یافته ها: براساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت و همچنین مدت زمان تیمار سلولهای AGS با پپتید برونین-۲R درصد سلولهای زنده باقیمانده بسیار کاهش یافته بودند.

نتیجه گیری: به دلیل اثر همولیتیک جزئی، این پپتید نمونه خوبی در طراحی دارو به شمار می رود. این پپتید مرگ سلولی شامل فعالسازی اتوفازی را راه اندازی می کند و بر علیه رده های سلولی بدخیم AGS فعالیت ضد سرطانی نشان می دهد.

کلمات کلیدی: برونین-۲R، کارسینومای معده انسانی، سمیت پپتید، زیستایی؛

مقدمه

بر می گیرد. سرطان معده بر اساس معیار های آناتومیک و هیستولوژیک ممکن است به سه نوع نزدیک مبداء، پراکنده و دور از مبداء تقسیم شود که هر نوع ویژگیهای منحصر بفردی دارد. چندین نوع مختلف سرطان می تواند در معده ایجاد شود، رایجترین نوع، آدنوکارسینوما نامیده می شود که از یک نوع سلول معمولی آستری معده شروع می شود. آدنوکارسینومای معده رایجترین نوع سرطان معده است (۱). آدنوکارسینومای معده در مردان بالای ۴۰ سال به وفور دیده می شود. بررسی های اخیر نشان می دهد شیوع بالای عفونت H.pylori، رژیم غذایی پر نمک و دخانیات فاکتورهای اصلی سرطان معده در ایران می باشند (۱۱). اخیرا پیشرفتهای زیادی در درمان سرطان

سرطانهای معدی-روده ای از جمله فراوانترین سرطانهایی است که در سراسر جهان رخ می دهد. علت این سرطانها می تواند فاکتورهای محیطی و وراثتی باشد. فاکتورهای زندگی مثل عادات غذایی، تحرک فیزیکی، مصرف الکل، مصرف دخانیات و بروز عفونت می تواند نقش مهمی در ایجاد این نوع سرطانها بازی کند (۱۳و۴).

سرطان معده

سرطان معده حدود ۵۰٪ از کل سرطانهای گوارشی را در آدرس نویسنده مسئول: اردبیل- شهرک نیستان- کوچه ۱۰- پلاک ۳۳۴

Email : robab.hasanvand@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

معدده حاصل شده اما درمان سرطان معدده هنوز به عنوان چالشی مهم باقی است (۷۱۴).

پپتید درمانی

بروینین-۲R نانو پپتیدی با خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی است که بر علیه باکتری های گرم مثبت و منفی و برخی سرطانها فعال است. این پپتید، کاتیونی بوده و ۲۵ آمینواسید دارد، از ترشحات پوستی قورباغه های خانواده Rana بدست می آید و فعالیت همولیتیک پایینی بر روی اریتروسیتهها نشان می دهد. به دلیل اثر همولیتیک جزئی، این پپتید نمونه خوبی در طراحی دارو به شمار می رود (۸۱۰). برخی از پپتیدهای آنالوگ بروینین-۲R، خانواده بروینین-۱، بروینین-۲، اسکولنتین-۲ و تمپورین می باشند که از ترشحات پوستی گونه ای از قورباغه به دست می آیند (۲). این پپتیدها نیز فعالیت ضد میکروبی داشته و برای جانور کاربرد دفاعی دارند (۶). بروینین-۲R برای اولین بار توسط آقای آسوده و همکارانش از ترشحات پوستی قورباغه مردابی معمولی *Rana ridibunda* جدا گردید (۸). محل پیدایش این گونه بیشتر در ساحل شمالی دریای خزر و روسیه است. این پپتید حاوی ۲۵ آمینواسید می باشد. از لحاظ خصوصیات ساختاری این پپتید دارای انتهای آمینو آب دوست و انتهای کربوکسیل آن دارای لوپ است که توسط یک پیوند دی سولفیدی ایجاد شده است، این ساختار در گونه های *Rana* مشترک است.

مواد و روش ها

تهیه محلول MTT

۵۰ میلی گرم پودر MTT (مرک، آلمان) را در ۱۰ میلی لیتر PBS حل و فیلتر می کنیم. محلول حاصل باید در شرایط تاریکی نگهداری شود.

کشت و تیمار سلول سرطانی رده AGS

سلول سرطانی معدده (AGS) در فلاسک کشت سلول کشت داده شد و برای رسیدن به رشد کافی در انکوباتور قرار گرفت. در مرحله بعد سلولها به روش رنگ آمیزی با تریپان بلو شمارش و به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای منتقل شدند و به مدت ۱۲ ساعت انکوبه گردیدند. بعد از این مدت، رقتهای سریالی از پپتید بروینین-۲R به همراه محیط کشت جدید به چاهکهای حاوی سلول اضافه شدند؛ در یک چاهک دارای سلول پپتیدی

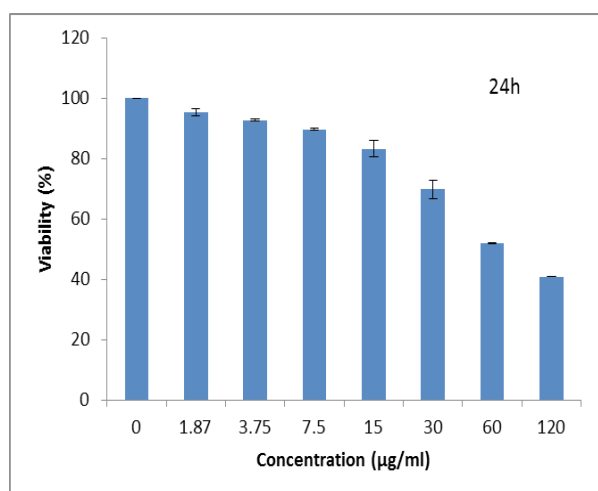
افزوده نشد و به عنوان کنترل نگه داشته شد. پلیت ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند؛ بعد از سپری شدن زمانهای تیمار، از انکوباتور خارج شده و محیط چاهکها حذف گردید. در این مرحله به هر چاهک محیط کشت به همراه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از این زمان، محیط چاهکها مجددا حذف گردید و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد سپس جذب آن با دستگاه الایزا در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید.

نتایج

نتایج نشان دادند که مورفولوژی سلولهای رده سرطان معدده (AGS) بر اثر تیمار با پپتید دچار تغییراتی میگردد.

سنجش اثر سیتوتوکسیک پپتید بروینین-۲R بر روی سلول های AGS

اثر سیتوتوکسیک پپتید بروینین-۲R بر روی سلولهای AGS در نسبتهای مختل فدز- زمان به روش سنجش MTT بررسی و نتایج در نمودارهای زیر نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت و همچنین مدت زمان تیمار سلولهای AGS با پپتید بروینین-۲R درصد سلولهای زنده باقیمانده کاهش چشمگیری را از خود نشان دادند.



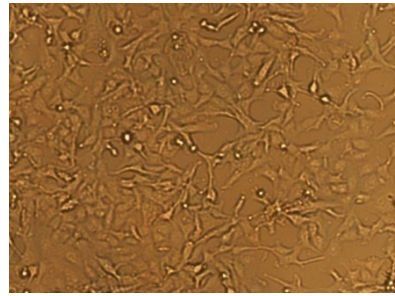
شکل ۱. نمودارهای تاثیر غلظت های مختلف پپتید بروینین-۲R بر روی رشد سلولهای AGS در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت؛ (نتایج بر حسب درصد سلول های زنده نسبت کنترل)

باقیمانده کاهش یافتند.

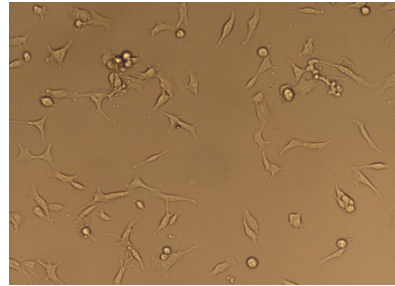
درمقایسه با سلولهای طبیعی یوکاریوت، سلولهای سرطانی دارای ۹٪-۳ فسفاتیدیل سرین بیشتری در سطح خود هستند (۹ و ۱۲). این عامل به انتخابی بودن برهمکنش بروینین-۲ R با سلولهای سرطانی درمقایسه با سلولهای طبیعی می افزاید.

تشکر و قدردانی

از زحمات و تلاش های بی وقفه ی استاد راهنمای بزرگوام آقای دکتر اسداله اسدی سپاسگذارم. از همکاری صمیمانه ی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی کمال تشکر را دارم.



سلولهای AGS کنترل



سلولهای AGS تیمار با بروینین-۲R

شکل ۲. تصویر مقایسه ای بین سلولهای تیمار شده و کنترل

بحث

اگرچه چندین دهه از مطرح شدن پپتیدها به عنوان دارو می گذرد، اما عوامل مختلفی مانند هضم پپتیدها توسط آنزیم های مختلف مانند پروتئازها، کندی سرعت انتقال این نوع داروها از غشاء و انعطاف پذیری بالای آنها محدودیت هایی را در استفاده از آنها به وجود آورده است که مانع گسترش مصرف آنها در میان بیماران می شود. علاوه بر این، پپتیدها ترکیباتی هیدروفیلیک یا آب دوست هستند و نمی توانند از مانع مغزی خونی عبور کنند (۳ و ۵). با این حال، بسیاری از محققان با توجه به این که پپتیدها از فعالیت زیستی بالایی برخوردار بوده و هزینه درمانی بسیار کمتری را به بیمار تحمیل می کنند این ترکیبات را کاندیداهای خوبی برای سنتز داروها می دانند. یکی دیگر از مهم ترین مزایای پپتیدها به عنوان دارو این است که معمولاً چنین داروهایی عوارض جانبی نداشته و به علت داشتن سمیت پایین، مشکلی را برای بیمار به وجود نخواهند آورد (۳). اثرسیتوتوکسیک پپتید بروینین-۲R بر روی رده سلولی AGS درنسبتهای مختلف دز-زمان به روش سنجش MTT بررسی شد؛ براساس نتایج بدست آمده، با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار رده سلولی AGS با پپتید بروینین-۲R، درصد سلولهای زنده

1. Albert S.R., Cervantes A, and van de Velde C.J., Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol.* 2003; 31-6.
2. Conlon J. M, Ahmed E, Condamine E. Antimicrobial Properties of Brevinin-2-Related Peptide and its Analogs: Efficacy against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Chem Biol Drug Des* 2009; 488-493.
3. Ehrenstein G. and Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys.* 1977; 1-34.
4. Kelsen, D. P., Daly, J. M., Kern, S. E., Levin, B., Tepper, J. E., & Van Cutsem, E. (eds.). *Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology*. (2nd Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008; 581-615.
5. Kwon, M. Y., Hong, S. Y. and Lee, K. H. Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Biochem Biophys Acta.* 1998; 239-248.
6. Liu X, Liu R, Wei L, Yang H, Zhang K, Liu J and Lai R. Two novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Rana nigrovittata*. 2011; 68-72.
7. Moehler, M., et al., The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Multimodal treatment of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2007; 965-81.
8. Naderi-manesh H., Asoodeh. S. Ghavami A., Klonisch. T., Los M. Andrew J.H., Kamran K., Tadeusz J.K., Spencer B.G, Evan P.B. Brevinin-2R semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway, *J. Cellular. Mol Medicine.* 2007; 1005-1022.
9. Oren Z, Hong J & Shai Y. A., repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *J. Biol. Chem.* 2004; 14643-9.
10. Pourfarzi, F., et al., The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study. *Int J Cancer*, 2009; 1953-60.
11. Purfarzi, F., et al., The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study. *Int J cancer*, 2009; 1953-60.
12. Risso, A., Braidot, E., Sordano, M.C., Vianello, A., Macri, F., Skerlavaj, B., Zanetti M., Gennaro R., & Bernardi P. BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Mol and Cell Biol*, 2002; 1926-35.
13. Taghavi, N., et al., Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: a sub site analysis of 761 cases. *World J Gastroenterol*, 2007; 5367-70.
14. Wong, R. and D. Cunningham, Optimizing treatment regimens for the management of advanced gastric cancer. *Ann Oncol*, 2009; 605-8.