بررسی اثرسمیت پپتید GL-9 بر سلولهای A549 و سلولهای خونی انسانی و حیوانی

کوثر هوشمند و احمد آسوده*

مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

چکیده

امروزه سرطان به یک بیماری همه گیر در جهان تبدیل شده است. دانشمندان در تلاش هستند تا با استفاده از روشهای متفاوت شیمی درمانی، اشعه درمانی و جراحی حال عمومی بیماران مبتلا به سرطان را ارتقاء بخشند. با این حال استفاده از این روشهای درمانی با عوارض جانبی شدیدی برای بیمار همراه هستند که روند درمان را بسیار خسته کننده و دردآور می‌کنند. از این رو دانشمندان به دنبال راههای درمانی جدیدی با کمترین عوارض جانبی هستند که در بر دارنده ترکیباتی همانند پپتیدها است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت پپتید GL-9 بر روی رده سلولی آدنوکارسینومای اپیتلیال ریوی انسانی(A549) و همچنین گلبولهای قرمز و سفید خونی انسان و گاو است. پپتید GL- 9 یک پپتید ۹ اسید آمینه ای با توالی GASRMWYFL است که درغلظتهای متفاوت ۱۲، ۲۵ و ۵۰ µg/ml سمیت آن بر سلولهای A549 بررسی شد. سمیت پپتید GL-9 بر روی رده سلولی A549 بر پایه سنجش MTT در طی زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت مشخص شد. همچنین سمیت این پپتید بر روی گلبولهای قرمز انسانی و گاوی از طریق روش همولیز جذبی و نشر شعاعی بررسی گردید. به علاوه سمیت این پپتید بر روی گلبولهای سفید انسانی از طریق روش شیب غلظتی فایکول ارزیابی شد. نتایج مطالعات حاکی از آن بود که پپتید GL-9 وابسته به دُز بر روی رشد رده سلولی A549 در زمان ۴۸ ساعت دارای اثر سمیت است. به علاوه مطالعات نشان داد که پپتید GL-9 کمترین اثر را در همولیز گلبولهای قرمز و کاهش تعداد گلبولهای سفید خون دارد. با توجه به نتایج به دست آمده، پپتید GL-9 دارای اثر سمیت بر روی سلولهای سرطانی است و کمترین اثر کشندگی را بر روی سلولهای طبیعی انسانی و حیوانی داراست. از این رو می‌توان امیدوار بود که با انجام بررسیها و آزمایشهای گسترده تر، در آینده ای نزدیک این پپتید به عنوان جایگزینی برای درمانهای رایج سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پپتید GL-9 ، سلولهای اندوکارسیتومای اپیتلیال ریوی انسانی (A549)، MTT، همولیز، گرادیان غلظتی فایکول

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۲۵ ، پست الکترونیکی: Asoodeh@um.ac.ir

مقدمه

پپتیدها یکی از مولکولهای مؤثر در فرآیندهای فیزیولوژیکی به شمار می‌روند. برخی از ترکیبات زیستی مانند اکسی توسین، هورمون رشد، گلوتاتیون، کارنوزین و برخی از آنتی بیوتیکها، دارای ماهیت پپتیدی هستند. پپتید-های زیستی معمولاً دارای ماهیت چند گانه در سیستمهای زیستی‌اند. فعالیتهای ضد میکروبی، التهاب یا ضدالتهاب، تنظیم کننده فشار خون، آنتی اکسیدانت، ضدکلسترول از جمله فعالیتهای این پتیدها است (۷و۶). امروزه تلاشهای بسیاری برای ساخت پپتیدهای ضدمیکروبی جدید با خواص درمانی، پزشکی و بیوتکنولوژی انجام شده است که از طریق اعمال تغییرات و یا طراحی توالیهای اسید آمینه‌ای آنها، امکان پذیر می‌باشد. با توجه به اینکه درمان سرطان بیشتر از طریق شیمی درمانی و داروهای متعدد صورت می پذیرد که علاوه بر خاصیت درمانی دارای

اثرات سوء، از جمله حالت تهوع، آسیب رسانی به پلاکتهای مغز و استخوان و کم خونی در فرد تحت درمان می‌باشد. امروزه درمانهای ضدسرطانی با استفاده از مواد فعال زیستی در دست بررسی است که از جمله آنها پپتیدهای بیولوژیک با خواص درمانی زیاد و اثر ات جانبی کمترند که به دلیل نقشهای مهم درون سلولی و مولکولی همانند: شناسایی مولکول، انتقال پیام، تکثیر سلولی و تمایز، جزء فاکتورهای اصلی برای پیشبرد فعالیت‌های ضد سرطانی و کاهنده رشد تومور هستند (۸، ۹ و ۱۷).

نمونه‌ای از توالی پپتیدی A_c-GASRHZBFL-NH_2 به همراه آنالوگهای خود که در جایگاههای B و Z دارای تنوع اسید آمینه‌ای می‌باشند، جهت بررسی این امر که آیا ایجاد جایگاههای آروماتیک اتصال یابنده NI(II) (شامل B و Z در ناحیه فرودست توالی پپتیدی) می‌توانند NI(II) میزان هیدرولیز پیوند پپتیدی را افزایش دهند یا خیر، انتخاب شدند. نتایج بررسیها حاکی از این بود که سریع ترین واکنش هیدرولیزی مربوط به توالی پپتیدی GASRHWYFL است که به نام GL-9 شناخته می‌شود. با توجه به نتایج، می‌توان نتیجه گرفت که سرعت تجزیه پیوند پپتیدی بین سرین و ترئونین در توالی پپتیدی تابع نوع اسیدهای آمینه و توالی پپتیدی است (۵و۱۱). در بررسی انجام شده توسط هانگ و همکاران در سال ۲۰۰۹، مشخص گردید که سلولهای دندرتیکی که توسط پپتید ۹ اسید آمینه‌ای GL-9 تیمار شده بودند در مقایسه با سلولهای دندرتیکی فاقد GL-9، پاسخهای قوی‌تر و سریع‌تر لنفوسیتهای T را در برابر ویروس افشتاین بار (EBV) ایجاد می‌کنند (۱۰). در این تحقیق، به تأثیر سمیت این پپتید بر علیه سلول سرطانی A549 و همین طور سلولهای طبیعی و غیر سرطانی پرداخته می شود.

رده سلولی A549 سلولهای اپیتلیال مشتق شده از بافت سرطانی ریه هستند. این سلولهای اپیتلیال با سنتز و ترشح سورفاکتانت، نقش مهمی در عملکرد و ایمنی ششها دارند. اپیتلیوم ریه همچنین نقش به سزایی را در کنترل و پیشرفت واکنشهای التهابی در ریه ایفاء می‌کند. سلولهای اپیتلیال ریه قادر به ترشح سیتوکاین‌های التهابی هستند و می‌توانند برای تحقیقات التهاب سلولی مورد استفاده قرار گیرند. زمانی که سلولهای ترشح کننده موکوز در ریه، سرطانی شده باشند، این سلولها، آدنو کارسینومای ریه نامیده می-شوند. این نوع سرطان بیش از ۴۰ درصد سرطانهای ریه را به خود اختصاص داده و عامل غالب آن، کشیدن سیگار است (۱۴).

بسیاری از ترکیبات به دلیل اینکه بر روی سلولها دارای اثرات سمی هستند، نمی‌توانند به عنوان دارو، استفاده شوند. ازاین رو، هدف از این مطالعه بررسی سمیت پپتید GL-9 بر روی رده سلولی A549 و همچنین گلبولهای قرمز و سفید خونی است که از نمونه های سالم انسانی و حیوانی تهیه شده است.

مواد و روشها

محیط سلولی: رده سلولی A549 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به شماره C-137 تهیه شد. از محیط کشت سلولی حاوی RPMI 1640 (Biosera, East sussex, UK) و FBS ۱۰درصد غیر فعال شده (Gibco, Grand island, NY, USA) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (Biosera, East sussex, UK) برای رشد و تکثیر استفاده شد. سلولها در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی محیط کشت سلولی در انکوباتور با اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. برای جداسازی سلولها از کف فلاسکها، از محلول ۲۵ درصد تریپسین (Biosera, East sussex, UK) و بافر فسفات نمکی(PBS) استفاده شد.

سنتز پپتیدها: پپتید GL-9 یک پپتید ۹ اسید آمینه ای با توالی GASRHWYFL است. این پپتید به وسیله شرکت GL Biochem واقع در شهر شانگهای چین سنتز شد.

پپتیدها با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس (RP-HPLC) در ستون C18 (10 × 250 mm.) خالص سازی و با کمک فریز درایز خشک گردید و خلوص پپتیدها توسط ستون آنالیتیکی (4.6× 250 mm) بررسی شد.

سنجش MTT : رده سلولی آدنوکارسینومای اپیتلیال ریه (A549) در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی بیوتیک پنی‌سیلین کشت داده شدند. از میکروپلیتهای ۹۶ خانه کشت در این زمینه استفاده گردید و اثر غلظتهای نهایی ۱۲ و ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید برروی رده سلولی A549 در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. بعد از گذشت زمانهای مورد نظر، رنگ MTT که قبلاً در تاریکی در بافر PBS حل شده به سلولها اضافه تا واکنش احیایی تبدیل رنگ تترازولیوم به بلور فورمازون انجام شود. این بلورها در ۱۲۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید حل شده و شدت رنگ محلول در هر چاهک میکروپلیت، توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد. شدت رنگ، معیاری از تعداد سلولهای زنده و به عبارتی درصد بقای سلولها است.

$$\text{درصد بقای سلولی} = ۱۰۰ \times \frac{\text{میانگین جذب نوری خانه های مربوط به هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه های کنترل}} \quad (۱)$$

سنجش همولیز: بسیاری از ترکیبات دارویی به دلیل داشتن فعالیت همولیتیک نمی‌توانند به عنوان دارو مورد استفاده قرار گیرند. این ترکیبات موجب لیز شدن گلبولهای قرمز خون و کم خونی می‌شوند. بدین جهت بررسی اثر همولیتیک پپتید GL-9 بسیار اهمیت دارد. برای آماده سازی گلبول قرمز ابتدا ۵ میلی‌لیتر از خون تازه انسانی در ۵۰ میکرولیتر EDTA به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۲۴۲۲ سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۴ میلی‌لیتر بافر PBS حل شده و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۲۴۲۲ سانتریفیوژ گردید. این عمل طی چند مرحله تکرار شد تا محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ کاملاً شفاف شود. بدین ترتیب گلبولهای قرمز خون از پلاسما جدا شد. سپس گلبولهای قرمز در ۸۰ میلی‌لیتر بافر PBS حل شد. بررسی فعالیت همولیتیک پپتید GL-9، از دو روش سنجش بر مبنای جذب و سنجش به روش نشر شعاعی استفاده گردید.

روش سنجش جذبی: حجم ۱۹۰میکرولیتر از سوسپانسون تهیه شده خونی در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰ میکرولیتر از غلظتهای µg/ml ۱۲و µg/ml ۲۵ و µg/ml ۵۰ پپتید GL-9 به میکروتیوب اضافه شد. نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۹۱۴gسانتریفیوژ (Vision vs.15000 CFN III) شدند. از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۱۰۰ ماکرولیتر برداشته و حجم آن توسط بافر PBS به حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر رسانده شده و سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Optizen 3220UV) در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجش شد. از تریتون۱۰۰-X به عنوان معیار ۱۰۰ درصد همولیز(کنترل مثبت) و از بافر PBS بعنوان معیار کنترل منفی استفاده شد. جذب تمامی سلولهای خونی تیمار شده با غلظتهای سریالی پپتید توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده و با جذب نمونه حاوی تریتون مقایسه و درصد همولیز محاسبه شد.

روش سنجش شعاعی: سوسپانسیون ۷ درصد تهیه شده از سلولهای خونی در قسمت قبل به محیط آگار خونی ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و در پلیت کشت میکروبی ریخته

شد. برای تهیه محیط کشت آگار خونی، ۴۰ گرم از پودر آگار خونی در ۱ لیتر آب حل و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. بعد از آنکه محیط کشت آگار خونی به حالت جامد درآمد، با پانچر سوراخهایی به تعداد غلظتهای استفاده شده از پپتید و همچنین کنترل مثبت و منفی (تریتون و بافر PBS) ایجاد گردید. بعد از آن در داخل چاهکهای ایجاد شده، ۵ میکرولیتر از غلظتهای مختلف پپتید و کنترلهای مثبت و منفی ریخته شد. پلیت در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. بعد از گذشت زمان مورد نظر، شعاع هاله ایجاد شده برروی محیط کشت بیانگر میزان همولیز سلولهای خونی است که از طریق مقایسه نمونه‌ها با کنترلهای مثبت و منفی سنجیده شدند.

بررسی سمیت پپتید بر روی لنفوسیتها: برای بررسی اثرات پپتید GL-9 برروی گلبولهای سفید (لنفوسیتها) از دو روش شمارش مستقیم سلولهای تیمار شده از طریق رنگ تریپان بلو و سنجش سمیت مبتنی بر سنجش (MTT) استفاده شد.

ابتدا برای جداسازی لنفوسیتها از نمونه خونی، خون هپارینه شده را در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و حجمی برابر با بافر x ۱ به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دور ۲۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. قطعات سلولی موجود در فاز رویی با استفاده از یک پیپت استریل برداشته شد. برابر با حجم باقی مانده از لکوسیتها، بافر PBS اضافه شد. به لوله‌های حاوی مخلوط، خون/ PBS مقدار ۱۰ میلی‌لیتر فایکول، اضافه شد. مخلوط به مدت زمان ۲۰ الی ۳۰ دقیقه با دور ۴۷۹g در دمای ۱۸–۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد (بهتر است که زاویه قرار گرفتن تیوب در سانتریفیوژ ۴۵ درجه باشد). بعد از انجام عمل سانتریفیوژ، سه لایه شکل می‌گیرد. لایه اول حاوی فایکول و پلاسما است، لایه دوم حاوی گلبولهای سفید و لایه سوم حاوی گلبولهای قرمز است. لایه میانی که نواری ابری و سفید است (حاوی گلبولهای سفید) به آرامی برداشته شده و به یک فالکون ۱۵ میلی-لیتری انتقال داده می‌شود. لنفوسیتها در سه نوبت و هر بار با ۳ میلی لیتر از محلول HBSS 10x (Biosera) ترکیب و در هر نوبت به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۴۵۰–۶۰۰ در دمای ۱۸–۲۰ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ شد. در هر نوبت لایه رویی خارج و شستشو تکرار شد تا پلاکتها به طور کامل حذف شوند. بعد از انجام آخرین مرحله، سلولها با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت (RPMI 1640 + FBS+ Peniciline/streptomycine) رقیق شدند. تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. بعد از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت، سلولها با غلظتهای مختلف پپتید GL-9 به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. بقای سلولی لکوسیتها در حضور پپتید توسط رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلولها در زیر میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شد و با استفاده از معادله ۲ بررسی گردید.

$$\text{درصد بقای سلولی} = ۱۰۰ \times \frac{\text{تعداد سلولهای زنده}}{\text{تعداد کل سلولها}}$$

به علاوه شمارش سلولهای لکوسیت با کمک MTT انجام شد. در این روش، سلولها پس از مخلوط شدن با ۱ میلی-لیتر محیط کشت در پلیتهای ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس لکوسیتها در معرض پپتید با

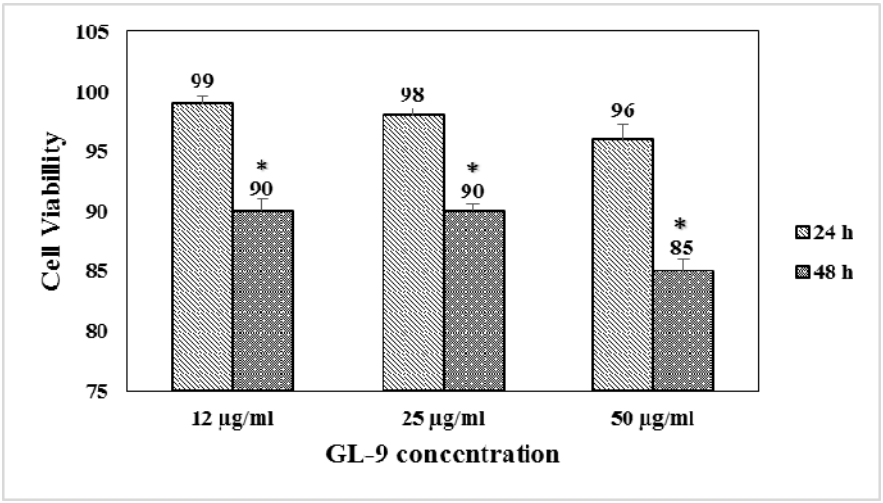
غلظتهای مورد نظر برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت ۴ ساعت از اضافه نمودن MTT، محلول DMSO (دی متیل سولفوکساید) به چاهکها اضافه گردید که در طی این امر کرسیتالهای فورمازون در DMSO حل شده و جذب آنها به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز های آماری: بررسیهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS، one way ONOVA و تست LSD انجام شد. تمام داده ها به صورت میانگین و انحراف از معیار نمایش داده شده اند و عبارت P< ۰,۰۵ بیانگر معنی دار بودن داده می باشد. تمام آزمایشها سه بار تکرار شدند.

بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج حاصل از TTM بر روی رده سلولی A549 : با استفاده از سنجش سمیّت پپتید به وسیله MTT، میزان اثر دهی پپتید GL-9 در رده سلولی A549 بررسی شد. از این رو سلولها به مدت ۲۴، ۴۸، ساعت با غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید GL-9 تیمار شدند. پس از گذشت مدّت زمانهای مربوطه، سلولها با محلول MTT تیمار و میزان جذب با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. درصد بقای سلولها با استفاده از نرم افزار اکسل محاسبه شد. از نرم افزار SPSS و تست Tukey و One way Anova برای بررسی داده‌ها و تعیین انحراف از میانگین استفاده شد.

نتایج نشان داد که پپتید GL-9 در غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار، باعث کاهش معنی‌داری در بقای سلولهای A549 شد. کاهش بقای سلولها در سه غلظت ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۴۸ ساعت، به ترتیب برابر با ۱۰، ۱۰ و ۱۵ درصد بود. (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < ۰,۰۵$) با تیمار ۴۸ ساعت است (شکل- ۱).



شکل۱- درصد بقاء رده سلولی A549 بر اثر تیمار با غلظتهای مختلف پپتید GL-9 در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. نتایج نشان داد که پپتید GL-9 در زمان ۴۸ ساعت و غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر در مقایسه با کنترل دارای اختلاف معنی دار ($p < ۰,۰۵$) است.

نتایج در مقایسه با تیمار رده سلولی لوسمی با ترکیبات Gemini vitamin D3 و یا 1,25(OH)2D3 در غلظتهای ۱/۵ و ۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر ،که حدود ۵۰ درصد کشندگی را نشان دادند، بیان میدارد که پپتید GL-9 در مقایسه با مشتقات فعال ویتامین D اثر سمیت کمتری را نشان داده، هر چندکه نوع سلولهای استفاده شده، با سلول

تیمار شده در این پژوهش متفاوت است(۱۳). به علاوه اثر داروهای سدیم سولفاتیازول، سدیم سولفاستامید و دوکسوروبیسین بر T-47D (رده سلولهای چسبنده با منشأ اپیتلیالی مجاری شیری) در طی زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که اثرات بازدارندگی وابسته به غلظت دارو در رشد و تکثیر سلولها در محدوده غلظتی صفر تا 6×10^{-4} mMبرای دوکسوروبیسین و محدوده غلظتی صفر تا ۵۰ میلی مولار برای سدیم سولفاتیازول و سدیم سولفاستامید می‌باشد. غلظت مؤثر دارو برای کاهش ۵۰ درصدی رشد و تکثیر سلولها (LC_{50}) در زمان ۴۸ ساعت برای دوکسوروبیسین، سدیم سولفاتیازول و سدیم سولفاستامید به ترتیب برابر با ۰/۳۳ میکرومولار، ۵/۶ میلی مولار و ۴۱ میلی مولار بود (۲). همچنین بررسی تأثیر پودوفیلوتوکسین بر ۵۶۳۷ (رده سلولی کارسینومای مثانه) نشان می دهد که پودوفیلوتوکسین در غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر روی رده سلولی۵۶۳۷ در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت دارای اثر کشندگی که این میزان در ۲۴ ساعت اولیه برابر با ۳۰ درصد و در زمان ۷۲ ساعت برابر با ۶۰ درصد می باشد (۱). رده سلولهای توموری هیپوفیز موش GH3/B6 با غلظتهای مختلف AP (FLUKA)، MCP (EcoNugenics) و SNP (MERCK) برای مدت زمانهای ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. نتایج حاکی از آن بود که AP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظتهای ۲,۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر باعث افزایش معنی دار درصد مهار تکثیر سلولها نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین MCP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظتهای ۳, ۵ میلی گرم بر میلی لیتر باعث افزایش معنی دار مهار تکثیراین سلولها شد. SNP نیز با غلظتهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار پس از ۶ ساعت باعث افزایش کشندگی در رده سلولهای GH3/B6 شد (۳).

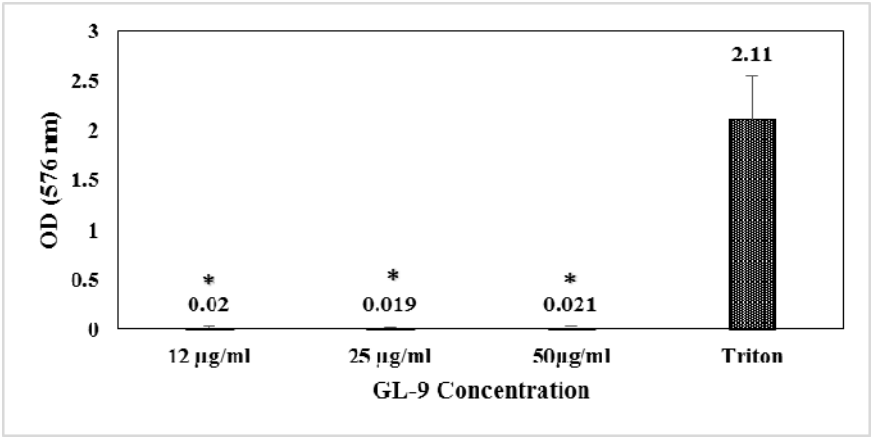
بررسی اثر پپتید بر اریتروسیت های انسانی و گاوی از طریق همولیز جذبی و شعاعی: اثر سمیت پپتید GL-9 در غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میگروگرم بر میلی‌لیتر بر روی نمونه‌های گلبولهای قرمز خونی انسانی و گاوی به دو روش همولیز جذبی و شعاعی مورد مطالعه قرار گرفت.

مقایسه نتایج حاصل از همولیز جذبی نمونه‌های گلبول قرمز تیمار شده با غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر پپتید با نمونه‌های تیمار شده با تریتون ۱۰۰ –X (۰/۱درصد)، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد که حاکی از عدم وجود فعالیت همولتیک پپتید GL-9 است. نتایج حاکی از جذب ۰/۰۲، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۲۱ در غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید بود که نسبت به نمونه‌های خونی تیمار شده با تریتون ۱۰۰ –X که دارای جذب ۲,۱۱ بود، بسیار ناچیز است (شکل–۲). بررسی‌های Shin و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داد که پپتید سنتزی سکروپین (1-8) A– ماگاینین 2 (12-1) هیچ‌گونه اثر همولیزی بر گلبولهای قرمز خون ندارد (۱۶).

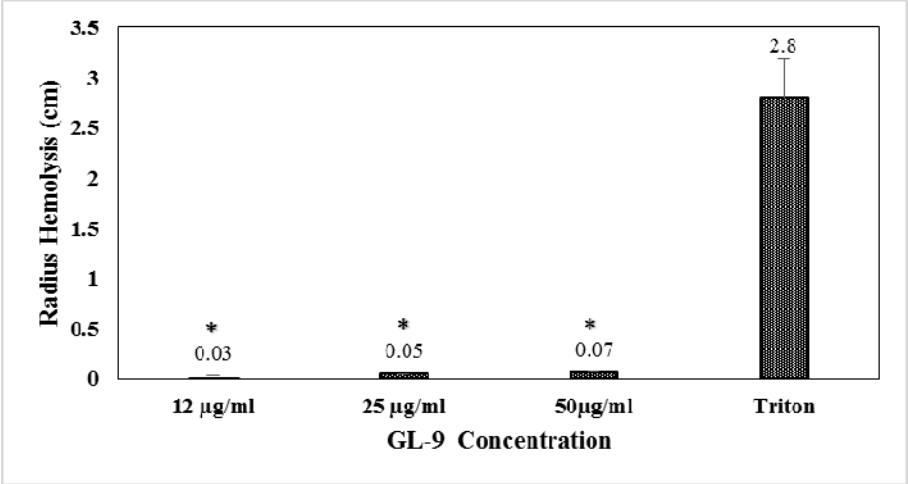
به علاوه فعالیت همولتیک پپتید GL-9 بر روی گلبولهای قرمز گاوی به روش همولیزی جذبی انجام شد. بر طبق نتایج به دست آمده، در غلظتهای ۱۲ و ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید GL-9 جذب به ترتیب برابر با ۰,۰۳، ۰,۰۵ و ۰,۰۷ بود که در مقایسه با جذب ۲,۸ تریتون ۱۰۰ –X ، اثر همولیزی ناچیزی ایجاد کرده است (شکل–۳).

مقایسه این اثر با سلولهای خونی انسانی که درصد همولیز کمتری را نشان داده، بیان می‌دارد که احتمالاً تفاوتی در پروتئینها و فسفولیپیدهای غشایی گاو با انسان وجود دارد، که موجب نفوذ پذیری بیشتر پپتید به درون سلولهای خونی گاو شده است.

بررسیهای انجام شده توسط Shai و همکاران در سال ۱۹۹۶ جهت مطالعه اثر سمیت پپتید ضدمیکروبی TApar بر گلبولهای قرمز نشان داد که این پپتید در غلظت ۵۰ میکرومولار میزان همولیز را افزایش می‌دهد (۱۵).



شکل۲- نمودار مقایسه ای اثر همولتیک پپتید GL-9 در غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در گلبولهای قرمز خونی انسان به روش نشر جذبی . اختلاف معنی داری در همولیز غلظتهای مختلف پپتید GL-9 و تریتون مشاهده شد. (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار(P< ۰,۰۵) است.

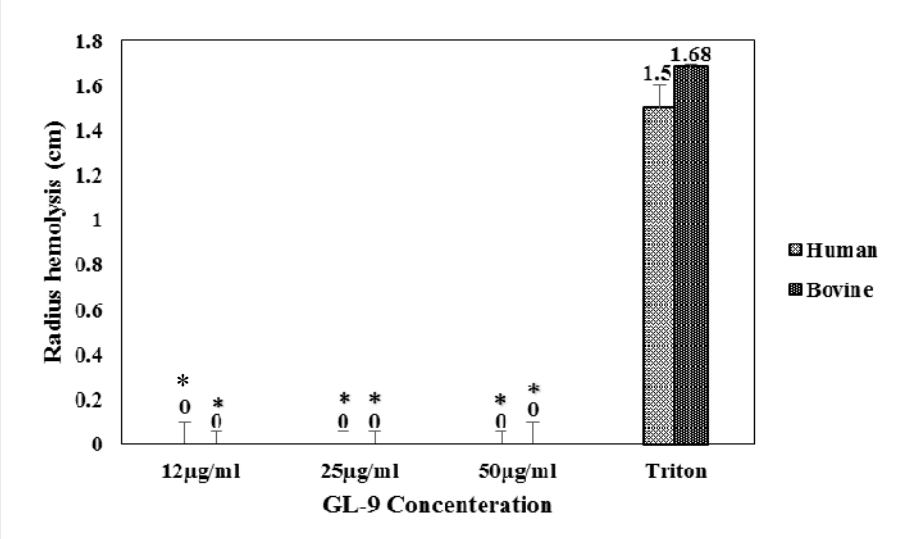


شکل۳- نمودار مقایسه‌ای، میزان اثر همولتیک پپتید GL-9 در غلظتهای مختلف بر گلبولهای قرمز گاوی. نتایج نشان دهنده اختلاف معنی دار (۰,۰۵ >P *) بین نمونه های تیمار شده با پپتید و تریتون X-۱۰۰ می باشد.

همچنین فعالیت همولتیک پپتید GL-9 بر روی گلبولهای قرمز خونی انسان و گاو با روش همولیز نشر شعاعی نیز بررسی شد. میانگین حاصل از اندازه‌گیری ۳ نقطه از هاله-های ایجاد شده در پلیت حاوی آگار خونی تهیه شده با خون انسان و گاو در اثر غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید GL-9 و تریتون X-۱۰۰ که بعنوان کنترل مثبت استفاده شده، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد که بیانگر عدم وجود فعالیت همولیتیک پپتید GL-9 بود.

از طریق مقایسه اندازه شعاع هاله همولیزی ایجاد شده در اثر اعمال تریتون X-۱۰۰ (که برابر با ۱/۶۸ سانتیمتر برای خون گاو و ۱/۵سانتیمتر برای خون انسانی است)، با غلظتهای مختلف۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدGL-9 می‌توان نتیجه گرفت که پپتید مورد نظر هیچ گونه اثر همولیتیک بر روی سلولهای خونی گاو و انسانی ندارد (شکل-۴). Munk و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر پپتید آنوپلین را بر روی گلبولهای قرمز خونی بررسی کردند، نتایج حاکی از عدم وجود همولیز بود (۱۲).

بررسی نتایج حاصل از شمارش و MTT گلبوهای سفید خونی انسان در حضور غلظتهای متفاوت پپتید GL-9 در ۲۴ و ۴۸ ساعت: برای بررسی سمیت پپتید GL-9 بر روی گلبولهای سفید خونی انسان، لکوسیتها از طریق شیب غلظتی فایکول استخراج شدند و بعد از شمارش به پلیتهای ۹۶ خانه‌ای منتقل و با غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید GL-9 به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. در بررسی بقای گلبولهای سفید در حضور و عدم حضور پپتید از روش شمارش گلبولهای سفید توسط رنگ تریپان بلو و همچنین تست MTT استفاده شد.



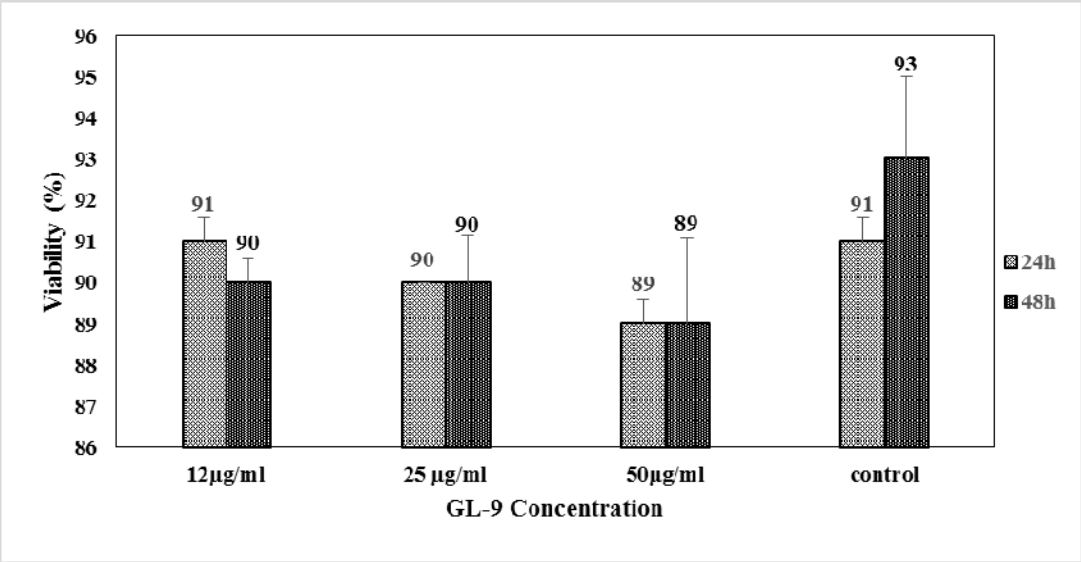
شکل ۴- بررسی همولیز گلبولهای قرمز انسانی و گاوی توسط پپتید GL-9 در غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش نشر شعاعی. نتایج نشان داد که میانگین شعاع هاله‌های ایجاد شده در این غلظتها برابر با صفر بود که نسبت به شعاع همولیز تریتون X-۱۰۰، نشان دهنده عدم وجود همولیز است.

در روش شمارش با رنگ تریپان بلو، غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید GL-9، در ۲۴ ساعت بترتیب صفر، ۱ و ۲ درصد و در ۴۸ساعت ۳، ۳ و ۴ درصد کاهش را در بقای سلولی نشان دادند که در مقایسه با درصد کنترل که تعداد ۹۱٪ و ۹۳٪ سلول را نشان می داد، می‌توان نتیجه گرفت که درصد بقاء لنفوسیتهای تیمار شده با پپتید نسبت به نمونه‌های کنترلی، به ازای افزایش غلظت و زمان اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (شکل-۵).

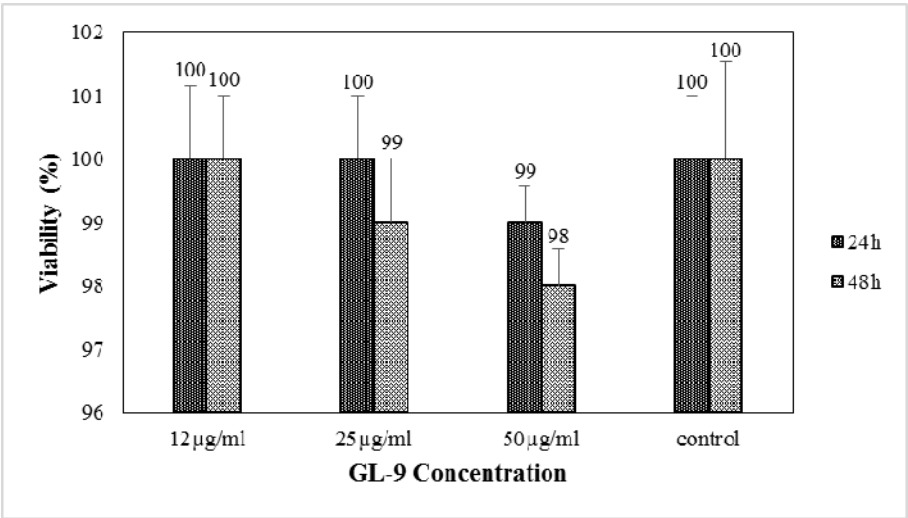
با توجه به اینکه بسیاری از داروهای جدید با وجود نقش درمانی‌شان، عوارض جانبی را در فرد بیمار از خود بروز می‌دهند، از اینرو این پپتید می‌تواند در آینده به عنوان دارویی بدون عوارض جانبی و با خاصیت درمانی مناسب، مورد استفاده قرار گیرد.

به علاوه در بررسی بقای سلولهای لنفوسیت به روش MTT، میانگین بقاء سلولهای تیمار شده با غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید GL-9 در ۲۴ساعت به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰ و ۹۹ درصد و در ۴۸ ساعت ۱۰۰، ۹۹ و ۹۸ درصد اندازه گیری شد. این نتایج نشان می‌دهند که پپتید GL-9 با افزایش غلظت و زمان در مقایسه با کنترل، تأثیری بر رشد سلولها ندارد (شکل-۶).

در بررسیهایی که توسط Agerberth و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد، نشان داد که پلی‌پپتیدهای ضد میکروبی استخراج شده از سلولهای T و NK انسانی LL-37 بر رده-های سلولی BL-28، CIR و JY منشأ گرفته از سلولهای B و T انسانی، هیچ‌گونه اثر سمیتی ندارند (۴).



شکل۵- بررسی اثرپپتید GL-9 بر لیز سلولهای لنفوسیت انسانی به روش شمارش. میانگین سلولهای شمرده شده برای لیز گلبولهای سفید در نمونه های تیمار شده با غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر است با ۹۱، ۹۰، ۸۹ و ۹۰، ۹۰ و ۸۹ که در مقایسه با تعداد ۹۱ و ۹۳ سلول شمرده شده در نمونه بدون تیمار، بسیار ناچیز است.



شکل۶- نمودار مقایسه‌ای حاصل از اثر پپتید GL-9 بر درصد بقاء لنفوسیتهای انسانی به روش MTT. تیمار گلبولهای سفید در غلظتهای ۱۲، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید، نسبت به حالت کنترل کاهش معنی داری را ایجاد نکرده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت و پشتیبانی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد (طرح پژوهشی شماره ۳/۳۸۴۶۳ مورخه ۱۳۹۴/۷/۲۰) انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱- صادقی. ایمان.، بهمنش. مهرداد.، شریفی. مظفر.، محمد سلطانی. بهرام.، احمدیان چاشمی. نجمه. (۱۳۹۱). القای آپوپتوز رده سلولی کارسینومای مثانه ۵۶۳۷ در اثر تیمار با پودوفیلوتوکسین. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، دور ۲۷، شماره۳، صفحه ۳۹۹- ۴۰۵.

۲- محمدپور.راضیه.، صفریان.شاهرخ.، نوروزی.سعید.، رزازان.عاطفه. (۱۳۹۰). بررسی اثرات سلولی آنتی باکتریهای سولفاتیازول و سولفاستامید بر روی سلولهای سرطان سینه (رده سلولی T-D۴۷). مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، دور ۲۶، شماره۴، صفحه ۵۳۲-۵۴۹.

۳- مقتدری. حسن.، سپهری. حوری.، رضایوف. آمنه.، دلفی. لادن.، دشت بزرگی. سارا. اثر دو پکتین سیب یا اسید پکتیک (AP) و پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) بر ترشح نیتریک اکساید در دودمان سلولهای توموری هیپوفیز موش HG۳/B۶. (۱۳۹۳). مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، دور ۲۷، شماره۱، صفحه ۱۴۴-۱۵۴.

4- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Gudmundsson, G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood, 96(9): 3086-3093.*

5- Ariani, H.H., Polkowska-Nowakowska, A., Bal, W. (2013). Effect of d-amino acid substitutions on Ni (II)-assisted peptide bond hydrolysis. *Inorganic Chemistry*, *52*(5): 2422-2431.

6- Asadi, F., Asoodeh, A., Kashef, R., Housaindokht, M.R., Haghparast, A., Chamani, J. (2013). The effect of antimicrobial peptide Temporin-Ra on cell viability and gene expression of pro-inflammatory factors in A549 cell line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *19*(4): 373-380.

7- Asoodeh, A., Haghparast, A., Kashef, R., Chamani, J. (2013). Pro-inflammatory cytokine responses of A549 epithelial cells to antimicrobial peptide Brevinin-2R. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *19*(2): 157-162.

8- Cohen, P. (2014). New role for the mitochondrial peptide humanin: protective agent against chemotherapy-induced side effects. *Journal of the National Cancer Institute*, *106*(3): 1-2.

9- Hancock, R.E., Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, *97*(16): 8856-8861.

10- Huang XL, Fan Z, Borowski L. (2009). Multiple T-cell responses to human immunodeficiency virus type 1 are enhanced by dendritic cells. *Clinical and Vaccine Immunology,* 16: 1504-1516.

11- Kopera. E., Krezel. A., Protas. AM., Belczyk. A., Bonna. A., Wyslouch-Cieszynska. A., Poznanski. J., Bal. W. (2010). Sequence-specific Ni(II)-dependent peptide bond hydrolysis for protein engineering: reaction conditions and molecular mechanism. *Inorganic Chemistry*. 49: 6636-6645.

12- Munk, J. K., Ritz, C., Fliedner. F. P., Frimodt-Moller. N., Hansen. P. R. (2014). Novel method to identify the optimal antimicrobial peptide in a combination matrix, using anoplin as an example. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(2): 1063-1070.*

13- Okamoto, R., Gery, S., Kuwayama, Y., Borregaard, N., Ho, Q., Alvarez, R., Akagi, T., Liu, G.Y., Uskokovic, M.R., Koeffler, H.P. (2014). Novel Gemini vitamin D3 analogs: Large structure/function analysis and ability to induce antimicrobial peptide. *International Journal of Cancer*, *134*(1): 207-217.

14- Sasco, A. J., Secretan, M. B., Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer, 45(1): 3-9.*

15- Shai. Y., Oren. Z. (1996). Diastereomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. *Journal of Biological Chemistry, 271(13): 7305-7308*.

16- Shin. S. Y., Kang. J. H., Jang, S. Y., Kim. Y., Kim. K. L., Hahm. K. S. (2000). Effects of the hinge region of cecropin A (1–8)–magainin 2 (1–12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1463(2): 209-218.*

17- Su, X., Dong, C., Zhang, J., Su, L., Wang, X., Cui, H. and Chen, Z. (2014). Combination therapy of anti-cancer bioactive peptide with Cisplatin decreases chemotherapy dosing and toxicity to improve the quality of life in xenograft nude mice bearing human gastric cancer. *Cell & Bioscience*, 4(1):1-7.

The influence of GL-9 peptide on A549 and human and animal blood cells

Hooshmand K. and Asoodeh A.

Chemistry Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Cancer has become an epidemic disease. Scientists are trying multiple methods of chemotherapy, radiotherapy and surgery to improve patient's health. However, the use of these methods of treatment are associated with severe side effects, which make the treatment process very painful. Therefore, researches are looking for new treatment options with fewer side effects using natural compounds such as peptides. In this study, we used different concentrations of GL-9 peptide to evaluate its cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma cells (A549) and normal human and bovine lymphocytes and erythrocytes cells was investigated. 12, 25 and 50 µg/ml of GL-9 peptide were used to examine its cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma cells (A549) after 24 h and 48 h via MTT assay. Furthermore, hemolysis and lympho-toxic assay were used to analyze GL-9 cytotoxic influence on human normal cells. Our results showed the cytotoxic effect of GL-9 peptide on A549 cell line within 48 h. Moreover, our results showed no hemolytic and cytotoxic effect on human and bovine red and white blood cells. GL-9 peptide had cytotoxic effect on A549 cell line after 48h with no toxic activity on human and bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC), therefore through further analysis and examination this peptide could be a replace for common cancer therapy drugs in the near future.

Key words: GL-9 peptide, A549 cell line, MTT, hemolytic activity, density gradient of Ficol-Hypaque