

تأثیر پپتیدهای ضد رگ‌زایی بر بیان ژن‌های Caspase-3 و Caspase-9 در مدل موش Balb/c دارای سرطان پستان القا شده با رده سلولی ۴T۱

- مهسا رهاننده*: گروه زیست‌شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
- زیور صالحی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- سید محسن اصغری: گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

چکیده

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان است و ۲۵ درصد تمام موارد سرطان را به‌خود اختصاص می‌دهد. در همه سرطان‌ها از جمله سرطان پستان مراحل رشد، تهاجم و متاستاز وابسته به عوامل درون سلولی متعددی است که یکی از آن‌ها فرایند رگ‌زایی (آنژیوژنز) می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر پپتیدهای ضد رگ‌زایی طراحی شده بر بیان ژن کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ در موش‌های Balb/c بوده است. در این تحقیق از نمونه بافت آماده موش‌های Balb/c ماده استفاده گردید که قبلاً به تومور پستان موشی مشتق از رده سلولی ۴T۱ مبتلا شده بودند (پس از بی‌هوشی با تزریق درون صفاقی (IP) به مدت ۳ تا ۵ هفته به پهلوی چپ آن‌ها پیوند زده شده بود). سپس استخراج TOTAL RNA از نمونه‌های توموری تحت تیمار با پپتیدهای ضد رگ‌زایی در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم انجام گردید. سنتز cDNA جهت پایدار کردن مولکول RNA انجام شد. پرایمرها جهت انجام Real time PCR برای هر دو ژن کاسپاز-۳ و ۹ طراحی و سنتز شد. اختصاصیت اتصال پرایمرها به رشته الگو تایید گردید. سپس تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS انجام گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای هر گروه از پپتیدهای ضد رگ‌زایی (VEGB1, VEGB2, VEGB3) در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم و میزان بیان ژن کاسپاز-۳ و ۹ وجود دارد ($p < 0/05$). در واقع هر سه پپتید ضد آنژیوژنز می‌تواند مسیر سیگنالینگ VEGFR را از طریق تنظیم مقادیر کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ مهار کند و منجر به افزایش آپوپتوز در تومور گردد.

کلمات کلیدی: رگ‌زایی تومور، پپتید مهارکننده رگ‌زایی، کاسپاز-۳، کاسپاز-۹، ریل تایم



مقدمه

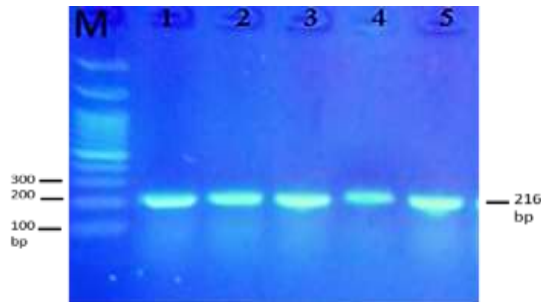
توسعه و پیشرفت درمان‌های هدفمند مرهون کشف مسیرهای بیولوژیکی و مولکولی سلول‌های توموری بوده و خوشبختانه در سرطان پستان بسیاری از این مسیرها کشف شده است (Harris و همکاران، ۲۰۱۱). رگ‌زایی یک فرآیند کلیدی در رشد و پیشروی تومور می‌باشد (Senger و همکاران، ۱۹۹۴). علاوه بر رشد تومور، رگ‌زایی نقش مهمی در تهاجم و انتشار به بافت‌های اطراف دارد. رشد تومور فراتر از محدوده انتشار اکسیژن از طریق مایع بینابینی، منجر به نواحی هیپوکسی، تقلیل مواد غذایی و عدم تعادل متابولیکی می‌شود. این شرایط باعث تولید فاکتورهای مختلف توسط سلول‌های توموری و اجزای استرومای مرتبط می‌شود (Ghavami-pour و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ebos و همکاران، ۲۰۰۹). این پروتئین‌ها شامل فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و فاکتورهای رشد انتقال دهنده α ، β (TGF) می‌باشند که مرحله آغازین رگ‌زایی را برنامه‌ریزی می‌نماید. سرطان، دومین عامل مرگ و میر پس از بیماری‌های قلبی و عروقی به‌شمار می‌رود. در بین انواع مختلف سرطان، سرطان پستان با شیوع ۲۳ درصد، به‌عنوان شایع‌ترین سرطان و کشنده‌ترین سرطان از نظر بدخیمی در بین زنان محسوب می‌شود و در همه کشورها میزان شیوع آن در حال افزایش است (Vecchia و همکاران، ۲۰۱۱؛ calle و همکاران، ۲۰۰۹). در چندین سال اخیر درمان‌های هدفمند سرطان بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است و در برخی از سرطان‌ها به نتایج خوبی دست یافته‌اند (Hanahan و Folkman، ۱۹۹۶؛ Senge و همکاران، ۱۹۹۴). VEGF به‌عنوان فاکتور کلیدی پروآنژیوژنیک شناخته شده است که تحت کنترل مستقیم فاکتور القاء کننده هیپوکسی (FIF1) قرار دارد و بیان آن تحت تأثیر هیپوکسی تحریک می‌شود. برخلاف وضعیت موجود طی فرآیندهای بیولوژیکی، بیان VEGF در تومورها تنظیم نشده و در سطوح بسیار بالایی بیان می‌شود که منجر به افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال و از دست دادن مکانیسم‌های کنترل جوانه‌زنی آنژیوژنیک می‌شود (Hanahan و Folkman، ۱۹۹۶؛ Hardwick و Soane، ۲۰۱۳). امروزه مطالعات مختلفی بر روی اندازه‌گیری VEGF و نقش آن در ایجاد آنژیوژنز و اثر آن در پیش‌آگهی سرطان پستان در افراد و سنین مختلف و در حضور یا عدم حضور متاستاز غدد لنفاوی صورت گرفته است (Mylona، ۲۰۰۷). VEGF یک پروتئین پیام‌رسان است که توسط سلول‌های آسیب‌دیده تولید می‌گردد و به یکی از رسپتورهایش به‌نام VEGFR-2 بر روی سطح سلول‌های رگ‌های خونی متصل می‌شود. زمانی که VEGF به رسپتور متصل می‌شود، فعال شده و پیام‌های بیوشیمیایی را به‌درون سلول‌های رگ خونی می‌فرستد تا رگ‌زایی آغاز گردد (Linderholm و همکاران، ۲۰۰۱). بیماری‌هایی با

قدرت نامحدود تکثیر، مثل سرطان در نتیجه تغییر در ژنوم ایجاد می‌شود و مطالعات نشان داده است که حداقل ۶ تغییر در فیزیولوژی سلولی موجب رشد بدخیمی می‌شود که این تغییرات شامل خودکفا بودن در تکثیر سلولی، مقاوم بودن سیگنال‌های بازدارنده تکثیر سلولی، فرار کردن از آپوپتوز، عدم محدودیت در تانسیل تکثیر، تقویت رگ‌زایی و حمله به سایر بافت‌ها هستند. مقاومت به آپوپتوز از ویژگی‌های سرطان است و کاهش حساسیت به آپوپتوز منجر به افزایش آستانه درمانی برای موارد کلاسیکی مانند شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌شود، بنابراین یکی از اهداف در درمان سرطان افزایش فعالیت آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی است (Potente و همکاران، ۲۰۱۱؛ Hardwick و Soane، ۲۰۱۳). لذا با توجه به این که یکی از مکانیسم‌های عملکردی داروهای ضدسرطان القای آپوپتوز است در این مطالعه بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و ۹ از جمله ژن‌های القاء کننده مسیر آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفته است. کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نمایند. به‌دنبال فعال شدن، این آنزیم‌ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک ایجاد می‌نمایند (Kohler و همکاران، ۲۰۰۲؛ Budihardjo و همکاران، ۱۹۹۹). کاسپاز-۳ نوعی آنزیم از دسته کاسپازهاست که در تعامل با کاسپاز ۸ و ۹ بوده و در انسان توسط ژن CASP3 کدگذاری شده است. کاسپاز-۳، توسط کاسپاز ۸، ۹ و ۱۰ فعال شده و به نوبه خود کاسپاز ۶ و ۷ را فعال می‌کند. امروزه در بسیاری از تحقیقات ژنتیکی از تکنیک ریل تایم PCR استفاده می‌کنند این تکنیک بسیار شبیه به روش PCR می‌باشد. در ریل تایم نیز همانند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، یک توالی تکثیر می‌گردد. اما تفاوت ریل تایم با PCR معمولی در سنجش کمی توالی تکثیر شده می‌باشد. در روش ریل تایم با به‌کار گرفتن یک نشانگر فلورسنت در واکنش، میزان تکثیر محصول ردیابی می‌گردد. این نشانگرهای فلورسنت به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، با اتصال آن‌ها به DNA نور تولید کنند. بنابراین نور بیش‌تر برابر است با تکثیر محصول و افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول به‌دست آمده نسبت مستقیم دارد (Oberst و همکاران، ۲۰۱۱؛ Brentnal و همکاران، ۲۰۱۳). از جمله اهداف این تحقیق، بررسی اثر پپتیدهای مهارنده در کنترل رگ‌زایی ناشی از فعالیت‌های سرطانی سلول‌های ۴T۱ در موش‌های Balb/c بوده است. چرا که پپتیدهای ضد رگ‌زایی ایمنی‌زایی کم‌تری نسبت به پروتئین‌های نوترکیب و آنتی‌بادی‌ها ایجاد می‌کنند (Vlieghe و همکاران، ۲۰۱۰؛ Senge و همکاران، ۱۹۹۹؛ Ferrera، ۲۰۰۲). بنابراین در تحقیق حاضر ۳ نوع پپتید، به نام VEGB طراحی و برای تیمار نمونه‌های سرطانی استفاده شد که آنتاگونیست VEGFA، VEGFB می‌باشند.

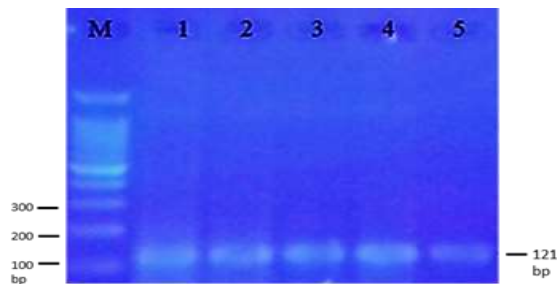
مواد و روش‌ها

نتایج

با استفاده از پرایمرهای Caspase-3,9RV و Caspase-3,9FW به ترتیب پرایمر کاسپاز-۳-قطعه‌ای به طول ۲۱۶bp از ژن کاسپاز-۳ و پرایمر کاسپاز-۹-قطعه‌ای با طول ۱۲۱bp از ژن کاسپاز-۹ را به طور اختصاصی تکثیر کردند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: ژل آگارز ۲٪ محصول PCR ژن Caspase-3 مربوط به سنتز cDNA از ۵ نمونه تومور با طول ۲۱۶ جفت بازی که در آن مارکر سیناژن با طول ۱۰۰bp با حرف M مشخص شده است.

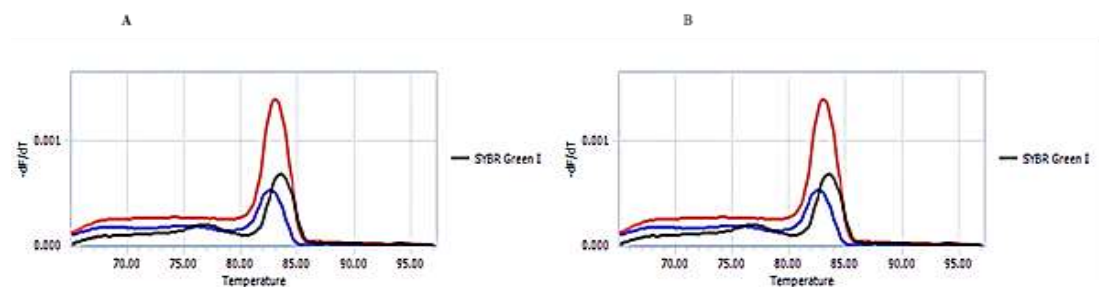


شکل ۲: ژل آگارز ۲٪ محصول PCR ژن Caspase-9 مربوط به سنتز cDNA از ۵ نمونه تومور با طول ۱۲۱ جفت بازی که در آن مارکر با طول ۱۰۰bp با حرف M مشخص شده است.

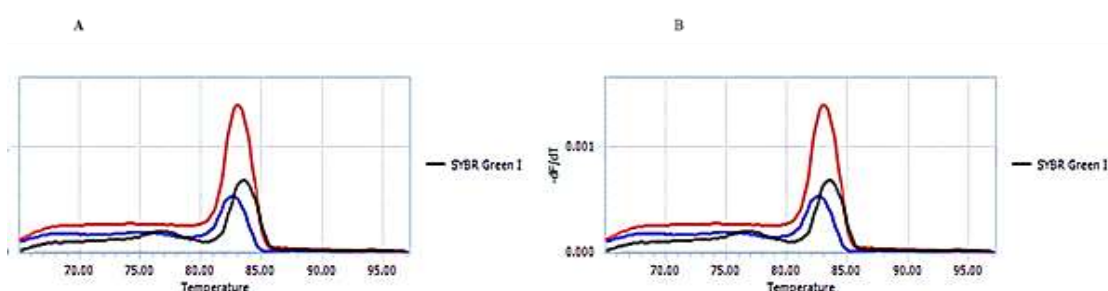
نتایج حاصل از Real-Time PCR ژن کاسپاز-۳ و ژن کاسپاز-۹ در شکل‌های ۳ تا ۵ آورده شده است. از آنجایی که سایبرگرین توانایی اتصال به DNA تک رشته‌ای را دارد، در دمای ذوب هر ژن رنگ فلورسین ناشی از سایبرگرین متعص می‌شود. در گراف‌های نمایش داده شده دمای ذوب ژن کاسپاز-۳ و ۹ در نمونه‌های تیمار شده با پپتید ضد رگ‌زایی VEGB2 برابر ۸۳ درجه سانتی‌گراد و در گروه تیمار با VEGB2 و VEGB3 دمای ذوب ۸۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. Melting peak مشتق حاصل از گراف melting curve می‌باشد. با توجه به شکل‌های ۴، ۵، پیک‌های منظم و تک قله نشان‌دهنده عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی و هم‌چنین عدم تشکیل پرایمر دایمر می‌باشد. نتایج نمودار ستونی (۱ و ۲) برای هر گروه تحت تیمار با پپتید آنتاگونیست برای ژن Caspase-3 و Caspase-9 در شکل‌های ۶ و ۷ آورده شده است.

این تحقیق که از مرداد ۹۶ تا مرداد ۹۷ به طول انجامید، تعداد ۲۱ نمونه از موش‌های Balb/c ماده با سن ۵-۷ هفته و وزن ۱۸-۲۰ گرم از انیستیتو پاستور کرج خریداری شد که قبلاً تومور پستان موشی مشتق از رده سلولی ۴T۱ پس از بی‌هوشی به صورت تزریق درون صفاقی (IP) به پهلو چپ آن‌ها پیوند زده شده بود. سایز این تومورها پس از ۳ الی ۴ هفته به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد، وقتی حجم تومورها به ۱ میلی‌متر مکعب رسید، تزریق پپتیدهای ضد رگ‌زایی VGB1 و VGB2 و به صورت تزریق درون صفاقی با دوز ۱ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم به صورت یک روز در میان با فاصله ۱۴ روز انجام گرفت. برای هر پپتید ضد رگ‌زایی تزریقی، یک گروه نیز با دریافت سرم فیزیولوژیک PBS با حجم مشابه به عنوان شاهد تعیین گردید. سپس بافت تومورها برداشته شده و جهت مطالعات بعدی مستقیماً در ازت مایع قرار گرفته و در نهایت به فریزر -۸۰ انتقال داده شدند تا مراحل استخراج RNA از تومور پستان انجام گیرد. استخراج Total RNA پس از تهیه بافت هموژنیزه با تریزول انجام شد. هم‌چنین ارزیابی کیفیت RNA به روش نانودراپ و ژل آگارز ۱ درصد (الکتروفورز افقی) صورت گرفت. در ادامه کار، سنتز cDNA انجام شد و نمونه‌ها در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا در مرحله بعد PCR-RT جهت تکثیر ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ انجام گیرد. شایان ذکر است پرایمرها با کمک نرم‌افزار OLIGO7 جهت تکثیر ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ طراحی و توسط شرکت پیشگام سنتز گردید. پس از Real time PCR، میزان بیان واقعی ژن‌های Caspase-3 و Caspase-9 نسبت به یک کنترل سنجیده شد. این معیار در مطالعه حاضر ژن خانه‌دار GAPDH بود، که به علت پایداری و ثبات نسبت به ۶ ژن خانه‌دار دیگر انتخاب شد. لازم به ذکر است که پپتیدهای مورد آزمایش این تحقیق توسط شرکت Shinegene biotechnologies Inc شانگ‌های چین با خلوص بالاتر از ۹۵٪ سنتز شدند. پپتید VGB1، پپتید آنتاگونیستی است که بر اساس نواحی α -helix طراحی شده است و توالی آن به صورت زیر است: Sequence peptid: C-S-W-I-D-V-Y-T-R-A-T-C-Q-P-R-P-L (17 amino acid) در این توالی، اسید آمینه سیستئین ابتدایی به ناحیه‌ای از VEGFB اضافه شده و بین این سیستئین با سیستئین بعدی، پیوند دی‌سولفید برقرار شده است. VEGB2 و VEGB3 پپتیدهای آنتاگونیست ۹ آمینواسیدی هستند که موجب بلوکه شدن VEGFR1 و VEGFR2 به طور هم‌زمان می‌شوند. هم‌چنین آنالیزهای آماری تحقیق حاضر توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ از تست One Way Anova صورت گرفت و نمودارهای مربوط به تغییرات بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و ۹ توسط نرم‌افزار graphpad prism 6 رسم شد.

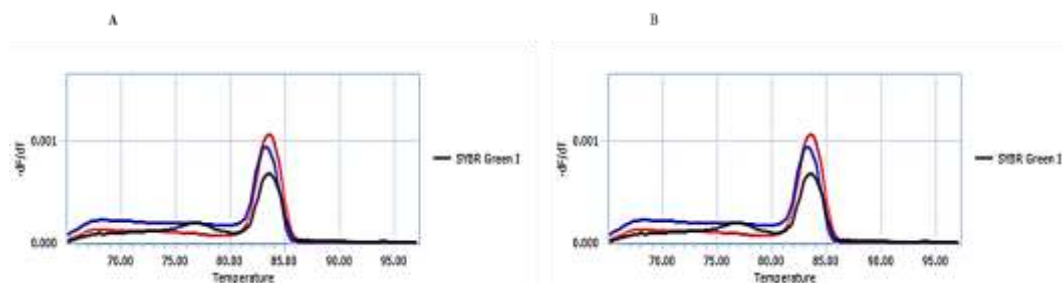




شکل ۳: نمودار نمودار پیک دمای ذوب ژن A = Caspase-3 و B = Caspase-9 که نمونه شاهد بارنگ سبز و نمونه‌های تیمار شده با پپتید ضد رگ‌زایی VEGB1 در غلظت ۱ میکروگرم با رنگ آبی و غلظت ۱۰ میکروگرم با رنگ قرمز نشان داده شده است. پیک‌های ژن کاسپاز-۳ و ۹ نشان‌دهنده تکثیر و نشر رنگ فلورسینس در دمای ۸۴ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های هدف می‌باشد.



شکل ۴: نمودار پیک دمای ذوب ژن A = Caspase-3 و B = Caspase-9 که نمونه شاهد بارنگ سبز و نمونه‌های تیمار شده با پپتید ضد رگ‌زایی VEGB2 در غلظت ۱ میکروگرم با رنگ آبی و غلظت ۱۰ میکروگرم با رنگ قرمز نشان داده شده است.

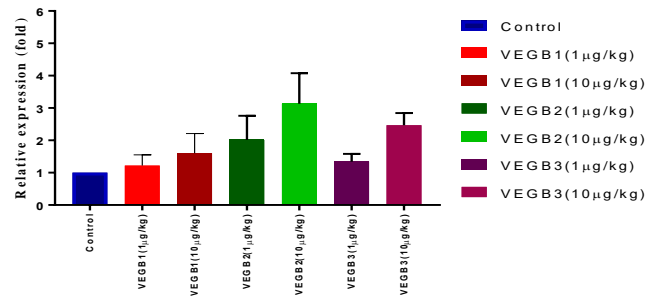


شکل ۵: نمودار پیک دمای ذوب ژن A = Caspase-3 و B = Caspase-9 که نمونه شاهد بارنگ سبز و نمونه‌های تیمار شده با پپتید ضد رگ‌زایی VEGB3 در غلظت ۱ میکروگرم با رنگ آبی و غلظت ۱۰ میکروگرم با رنگ قرمز نشان داده شده است.

تحت تیمار با نوع ۱ مقدار ۲/۰۶۶ بیش‌ترین نسبت افزایش بیان در بین پپتیدهای ضد رگ‌زایی را نشان داده است. هم‌چنین میزان بیان در گروه تحت تیمار با نوع ۳ نسبت به گروه، نوع ۱ و نوع ۲ به ترتیب ۲/۴۴ و ۲/۱۴ برابر می‌باشد. براساس نتایج آماری مقایسه میزان بیان گروه‌های مختلف در ژن کاسپاز-۹ تفاوت معنی‌داری در مقدار بیان ژن کاسپاز-۹ بین گروه‌های مختلف از پپتیدهای مهارکننده رگ‌زایی وجود دارد و میزان بیان در هر گروه تحت تیمار با پپتیدهای ضد رگ‌زایی VEGB1, VEGB2 و VEGB3 نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار $p < 0/05$ را نشان داد.

نتایج حاصل از تمام آنالیزهای آماری نشان داد که بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ در موش‌های ایمپلنت شده با رده سلولی ۴T۱ شده با سرطان پستان با اثر پپتیدهای ضد رگ‌زایی افزایش یافته است. در گروه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت پپتیدهای ضد رگ‌زایی افزایش بیان دو ژن کاسپاز-۳ و ۹ مشهود بود. نتایج حاصل از بیش‌ترین نسبت افزایش بیان ژن کاسپاز-۳ در بین نمونه‌های تحت تیمار با پپتید ضد رگ‌زایی نوع ۲ در غلظت ۱ میکروگرم به میزان ۱/۵۳ برابر نسبت به پپتید نوع ۱ در غلظت ۱ میکروگرم می‌باشد و هم‌چنین در غلظت ۱۰ میکروگرم پپتید مهارکننده میزان بیان ژن کاسپاز-۳ در گروه تحت تیمار با پپتید نوع ۲ نسبت به گروه

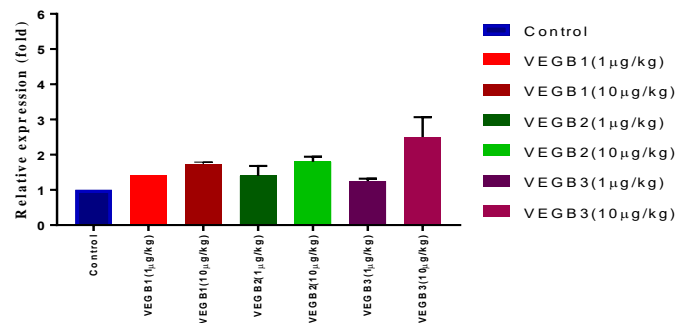
الفاکننده آنژیوژنز، VEGF می‌باشد که فعالیت بیولوژیک خود را از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین کینازی به نام گیرنده‌های Fit-1 (VEGFR1) و KDR (VEGFR2) اعمال می‌کند (Ferrara و Crawford، ۲۰۰۹). در آنژیوژنیک به طور کلی وقوع سیگنالینگ VEGF و متعاقباً VEGFR2 نقش بسیار مهم‌تری از خود نشان می‌دهند و به همین دلیل این مولکول به عنوان یک هدف دارویی ارزشمند در درمان‌های ضد آنژیوژنز مطرح می‌باشد (Ghavami-pour و همکاران، ۲۰۱۴). مسیر PI3K/AKT اصلی‌ترین مسیری است که تحت القای پیام VEGF به بقای سلول منجر می‌گردد. بنابراین ممانعت از اتصال فاکتور رشد به VEGFR2، می‌تواند این مسیر را غیرفعال کرده و باعث پیشرفت مسیر داخلی آپوپتوز از طریق آزاد کردن سیتوکروم C فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم شود. سیتوکروم C، با Apaf-1 و ATP و پروکاسپاز-۹، تعامل کرده و آپوپتوزوم ایجاد می‌شود. آپوپتوزوم، سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی، مثل کاسپاز-۳ می‌شود. از طرفی آپوپتوزوم، سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی، از جمله کاسپاز-۳ می‌شود (Kilbride و همکاران ۲۰۱۳؛ Osaki و همکاران ۲۰۰۴). تا به امروز، ۳۰۰ پپتید درمانی سنتز شده است که از این تعداد، حدود ۲۰ پپتید زیر نظر سازمان FDA آمریکا به عنوان دارو مورد تایید قرار گرفته است (Okarvi، ۲۰۰۸). از جمله ویژگی‌های مطلوب پپتید ضد رگ‌زایی، سمیت کم‌تر و اختصاصیت بیش‌تر، نسبت به دیگر مولکول‌های ضد رگ‌زایی است (Sah و همکاران، ۲۰۰۶). به طوری که موفقیت آن‌ها در درمان کلینیکی، دو تا سه برابر مولکول‌های کوچک ضد رگ‌زایی می‌باشد. اهمیت دیگر پپتیدها در سهولت نفوذ به درون بافت یا سلول می‌باشد که در مقایسه با پروتئین‌های ضد رگ‌زایی، که ساختاری بزرگ و پیچیده دارند، مفید واقع شده است، زیرا از لحاظ عملکرد خواصی مشابه پروتئین‌ها دارد (Saladi و همکاران، ۲۰۰۶). در این تحقیق نیز، سه نوع پپتید ضد رگ‌زایی مورد مطالعه قرار گرفتند. این پپتیدها بر اساس نواحی ای از VEGFA و VEGFB که در اتصال به VEGFR1 و VEGFR2 هستند، طراحی شدند. در واقع این پپتیدها، آنتاگو نیست VEGFA و VEGFB می‌باشند و VEGFR1 و VEGFR2 به طور اختصاصی متصل می‌شوند. به عبارت دیگر این توالی‌های طراحی شده، به صورت دقیق، اتصال لیگاند به گیرنده را تقلید می‌کنند، یعنی مشابه اتصال فاکتور رشد عروقی به VEGFR وارد عمل می‌شوند. آنالیزهای آماری تحقیق حاضر برای ۳ گروه از تیمارهای مختلف در پپتیدها میزان $p < 0.05$ را نشان داد که بیانگر معنی‌دار بودن داده‌های حاصل از Real-time می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از اختلاف بین میانگین گروه‌های تحت تیمار باهم در ژن کاسپاز-۳ با استفاده از آزمون Tukey نشان‌دهنده بیش‌ترین اختلاف معنی‌دار پپتیدهای ضد رگ‌زایی VEGB1 و VEGB2 با گروه شاهد بوده است. پپتید ضد رگ‌زای VEGB3، در غلظت ۱۰ میکروگرم



P value	F (DFn, DFd)	MS	DF	SS	ANOVA table
P= ۰/۰۰۳۴	F (۶ و ۱۴) = ۵/۷۲۴	۱/۷۴۶	۶	۱۰/۴۷	Treatment (between columns)
		۰/۳۰۵	۱۴	۴/۲۷	Residual (within columns)
			۲۰	۱۴/۷۴	Total

شکل ۶: نمودار اثر پپتید مهارکننده رگ‌زایی VEGFB1,2,3 بر بیان ژن کاسپاز-۳ در تومور نسبت به گروه شاهد

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در حضور پپتیدهای مهارکننده رگ‌زایی VEGB1, VEGB2, VEGB3 با افزایش غلظت مهارکننده میزان بیان ژن کاسپاز-۳ افزایش می‌یابد.



F (DFn, DFd)	MS	DF	SS	ANOVA table
F (۶ و ۹) = ۱۱/۱۲	۰/۵۳۴	۶	۳/۲۰۴	Treatment (between columns)
	۰/۰۴۸۰۴	۹	۰/۴۳۲۴	Residual (within columns)
		۱۵	۳/۶۳۷	Total

شکل ۷: نمودار اثر پپتیدهای مهارکننده رگ‌زایی VEGFB1,2,3 بر بیان ژن کاسپاز-۹ در تومور نسبت به گروه شاهد

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در حضور پپتیدهای مهارکننده رگ‌زایی VEGB1, VEGB2 و VEGB3 با افزایش غلظت مهارکننده میزان بیان ژن کاسپاز-۹ افزایش می‌یابد.

بحث

سرطان پستان به صورت تغییرات رشد خارج از کنترل سلول‌ها در بافت پستان تعریف می‌شود (Calle و همکاران، ۲۰۰۹). این بیماری در طی ۳۰ سال گذشته افزایش یافته و در ایران طبق آخرین گزارشات در سال ۲۰۰۸ به ۳۲/۲ درصد در یک صد هزار نفر جمعیت رسیده است و هم‌چنان رتبه اول سرطان در زنان ایرانی را حفظ نموده است (Entezarmahdi، ۲۰۱۲). از مزیت‌های بالقوه درمان ضد رگ‌زایی خصوصاً در مطالعات حیوانی این است که عامل ضد رگ‌زا، می‌تواند موجب پس رفت ضایعات متاستازی و متعاقباً جلوگیری از انتشار آن‌ها شود (Folkman، ۲۰۱۰). یکی از مهم‌ترین فاکتورهای

Control Program Breast of the Islamic Republic of Iran (First and second levels prevention). Arvige Publishing Company pp: 46-70.

8. Ferrara, N., 2002. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*. 795 p.
9. Folkman, J., 2010. Angiogenesis an integrative approach from science to medicine. Springer, New York 601 p.
10. Ghavaminour, F.; Shahansian, S.S.; Saiedi, R.H.; Arab, S.S.; Mansouri, K. and Aghamaali, M.R., 2014. Development of a highly-potent anti-angiogenic VEGF8-109 heterodimer by directed blocking of its VEGFR-2 binding site. *FEBS J.* Vol. 281, No. 19, pp: 4479-94.
11. Hanahan, D. and Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*. Vol. 86, No. 3, pp: 353-364.
12. Hardwick, J.M. and Soane, L., 2013. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Bio*. Vol. 1, No. 2, pp: 5
13. Harris, H.R.; Tamimi, R.M.; Willett, W.C.; Hankinson, S.E. and Michels, K.B., 2011. Body size across the life course, mammographic density, and risk of breast cancer. *American j of epidemiology*. Vol. 174, No. 8, pp: 909-918.
14. Kilbride, S.M. and Prehn, J.H., 2013. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. *Oncogene*. No. 32, pp: 2703-2711
15. Kohler, T.; Schill, C.; Deininger, M.W.; Krahl, R.; Rorcher, S.; Hasenclever, D.; Leiblein, S.; Wagner, O. and Niederwieser, D., 2002. High Bad and Bax mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*. No. 16, pp: 22-29
16. Linderholm, R.K.; Lindahl, T.; Holmberg, I.; Klaat, S.; Lennerstrand, J.; Henriksson, R. and Bergh, J., 2001. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Research*. Vol. 61, No. 5, pp: 2256-2260
17. Liu, Y.; Cox, S.R.; Morita, T. and Kourembanas, S., 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation research*. Vol. 77, No. 3, PP: 638-643.
18. Mylona, E.P.; Alexandrou, A.; Mpakali, I.; Giannopoulou, G.; Tzani, S.; Markaki, A.; Keramopoulos, L. and Nakopoulou, D., 2007. Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and-D and VEGF receptor 3 in invasive breast carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. Vol. 33, No.3, pp: 294-300.
19. Oberst, A.; Dillon, C.P.; Weinlich, R.; McCormick, L.L.; Fitzgerald, P.; Pop, C.; Hakem, R.; Salvesen, G.S. and Green, D.R., 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP (L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*. No. 471, pp: 363-367.
20. Okarvi, S.M., 2008. Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer Treat*. No. 34, pp: 13-26.
21. Osaki, M.; Oshimura, M. and Ito, H., 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. Vol. 9, No. 6, pp: 667-676.
22. Park, H.; Ju, E.; Jo, S.; Jung, U.; Kim, S. and Yee, S., 2009. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. *BMC Cancer*. pp: 9-85.
23. Potente, M.; Gerhardt, H. and Carmeliet, P., 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. No. 146, pp: 873-887.
24. Sah, N.K.; Khan, Z.; Nelly, M.F.; Pablo, D.M.; Rodriguez, S.S. and Ronell, B.M., 2006. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer letters*. Vol. 244, No. 2, pp: 164-171.
25. Saladin, P.M.; Zhang, B.D. and Reichert, J.M., 2009. Current trends in the clinical development of peptide therapeutics. *IDrugs*. Vol. 12, No. 12, pp: 779-784.
26. Salem, L.; ElKholy, S.M. and Al-Atrash, A., 2016. spleen and cancer cells in an experimental mouse model of Ehrlich ascite carcinoma. *J of Solid Tumors*. Vol. 6, No. 1, pp: 78.
27. Senger, D.; Brown, L.F.; Claffey, K.P. and Dvorak, H.F., 1994. Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion & metastasis*. Vol. 14, No. 6, pp: 385-394.
28. Shino, Y.; Folkman, J.; Sullivan, R.; Butterfield, C.; Murray, J. and Klagsbrun, M., 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*. Vol. 223, No. 4642, pp: 1296-1299.
29. Vecchia, J.C.; Giordano, S.H.; Hortobagyi, G.N. and Chabner, B., 2011. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *The oncologist*. Vol. 16, No. 6, pp: 776-779
30. Vlieshe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J. and Khrestchatsky, M., 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*. Vol. 15, No. 2, pp: 40-56.

دارای بیشترین اختلاف با پپتید VEGB3 در غلظت ۱ میکروگرم بود و هم‌چنین پپتید آنتاگونیست VEGB2 بیشترین نقش را در هدایت سلول سرطانی به سمت آپوپتوز با بیان ژن Caspase-3 داشته است. نتایج تزریق با غلظت ۱۰ میکروگرم از پپتیدهای آنتاگونیست به موش‌های تیمار شده و آنالیز دیتاهای Real time نشان‌دهنده افزایش بیان Caspase-3 بوده است. از طرفی همسان‌سازی واریانس‌های نمونه‌ها در هر پپتید دارای یک رابطه خطی بوده و این نشان‌دهنده اثربخشی همواره و اتصال اختصاصی پپتید آنتاگونیست به گیرنده‌های تیروزین کینازی VEGFR می‌باشد. در نتایج حاصل از بیان ژن کاسپاز-۹ نسبت به گروه شاهد در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم اختلاف معنی‌دار $p < 0/05$ وجود داشت. با توجه به این که فعال شدن و افزایش بیان Caspase-3 از طریق کاسپاز-۹ صورت می‌گیرد، این موضوع نشان‌دهنده تعامل و نقش مهم کاسپاز-۳ و ۹ در مرگ سلول‌های سرطانی می‌باشد به عبارتی دیگر افزایش بیان ژن کاسپاز-۹ در نمونه‌های تیمار شده با پپتید آنتاگونیست VEGB3 در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم به مانند افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ بوده است. این تحقیق با گزارش‌هایی که تاکنون در مورد بلوک کردن مسیر VEGF به‌عنوان یک روش درمانی پیشنهاد شده است مطابقت داشته است (Salem و همکاران، ۲۰۱۶؛ Park و همکاران، ۲۰۰۹؛ Maiti و Bhutia، ۲۰۰۸). بنابراین به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی پیشنهاد می‌شود که القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، از طریق تغییر بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و ۹ یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در فعالیت ضدسرطانی پپتید رگ‌زایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان جناب آقای دکتر شعبانی‌پور که امکانات پژوهشی این تحقیق را فراهم کردند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Bhutia, S.K. and Maiti, T.K., 2008. Targeting tumors with peptides from natural sources Trends 9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis in biotechnology. Vol. 26, No. 4, pp: 210-217.
2. Brentnall, M.; Rodriguez-Menocal, L.; De Guevara, R.L.; Cepero, E. and Boise, L.H., 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*. No. 14, pp: 32.
3. Budihardjo, I.; Oliver, H.; Lutter, M.; Luo, X. and Wang, X., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. No. 15, pp: 269-90
4. Calle, F.F.; Feigelson, H.S.; Hildebrand, J.S.; Teras, L.R.; Thun, M.J. and Rodriguez, C., 2009. Postmenopausal hormone uses and breast cancer associations differ by hormone. *Cancer*. Vol. 115, No. 7, pp: 15-87.
5. Crawford, Y. and Ferrara, N., 2009. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell and Tissue Research*. Vol. 335, No. 1, pp: 261-269.
6. Ebos, J.; Lee, C.; Cruz-Munoz, W. and Bjarnason, G., 2009. Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *cancer cell*. Vol. 15, No. 3, pp: 232-239.
7. Entezarmahdi, R., 2012. Overview of the National Cancer