

بررسی اثر پیتید آنتاگونیست فاکتور رشد فیروبلاستی بر رشد تومور پستان موشی، سطح سرمی اینترلوکین ۸ و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا

مهرداد جعفرزاده^۱، سید کاظم موسوی زاده^{۲،۳}، محمدتقی جغتایی^{۴،۵}، سید محسن اصغری^{۵*}

۱- گروه زیست‌شناسی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۴- گروه علوم اعصاب، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۵- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۶ / مسلسل ۷۲

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۶/۴/۲۷

مقدمه: سرطان پستان امروزه مهم‌ترین عامل تهدیدکننده سلامتی در زنان است. در اکثر سرطان‌ها علت اصلی شکست در درمان، متاستاز سلول‌های سرطانی است. جراحی و رادیوتراپی در درمان تومورهای موضعی کاربرد مناسب دارد اما در متاستازهای سرطانی کارایی لازم را نداشته و در چنین مواردی روش درمان اغلب بر پایه‌ی شیمی‌درمانی استوار است. به دلیل آثار جانبی داروهای شیمی‌درمانی و کمتر بودن این اثر در پیتیدها، در حال حاضر پیتید درمانی در دنیا رواج یافته است. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر پیتید آنتاگونیست bFGF طراحی شده بر مهار رشد تومور در مدل سرطان پستان متاستاتیک 4T1 و میزان سطح سرمی IL8 و TNF α می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از موش‌های نژاد BALB/C ماده‌ی ۷-۵ هفته‌ای استفاده شد. تومور به روش پیوند تومور 4T1 ایجاد شد. پس از گذشت دو هفته و مناسب شدن اندازه‌ی تومورها، تیمار آغاز شد و با پیتید طراحی شده در سه دوز انتخابی به صورت درون صفاقی و به مدت ۱۴ روز تزریق صورت گرفت. در هر بار تزریق از کنترل مثبت و منفی نیز استفاده شده است. به موش‌های گروه کنترل منفی PBS و به موش‌های گروه کنترل مثبت داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین تزریق گردید. سایز تومورها به صورت یک روز در میان با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و حجم تومور با استفاده از فرمول طول در عرض^۲ در ۵/۰ محاسبه شد. بعد از خونگیری از چشم موش‌ها و جداسازی پلاسما میزان تولید IL8 و TNF α به روش الایزا انجام شد.

یافته‌ها: با استفاده از آزمون One Way ANOVA با کمک نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت و با توجه به $P < 0.05$ مشخص شد که تزریق پیتید بر روی کاهش و یا مهار رشد تومور اثر داشته و اختلاف معناداری بین گروه کنترل منفی با گروه کنترل مثبت و گروه تیمار شده با پیتید وجود دارد. میزان سطح سرمی IL8 و TNF α در تومورهای که پیتید دریافت کرده اند نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معناداری دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که پیتید ضد رگ‌زایی به طور موثری موجب مهار رشد تومور پستان شده و میزان سطح سرمی IL8 و TNF α در تومورهایی که پیتید دریافت کرده اند نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معناداری دارد.

واژه‌های کلیدی: پیتید، سرطان پستان، اندازه تومور، IL8، TNF α .

*آدرس مکاتبه: رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

پست الکترونیک: sm_asghari@guilan.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از مشکلات اصلی سلامت در سراسر جهان است و یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر و بیماری در کودکان و بزرگسالان است (۱). سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان و مهم‌ترین عامل تهدیدکننده سلامتی در زنان است. سرطان پستان در کشورهای غربی حدود یک‌سوم از کل سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد. بر اساس آمارهای ایران در کشور ما از هر ۱۰ تا ۱۵ زن احتمال ابتلا یک زن به سرطان پستان وجود دارد و سن بروز دست‌کم یک دهه پایین‌تر از زنان کشورهای دیگر است (۲). آمارها سرطان پستان را رده نخست موارد سرطان در زنان و دومین علت مرگ‌ومیر مطرح کرده‌اند (۳).

سرطان یک فرایند چند مرحله‌ای است که شامل تغییرات برگشت‌ناپذیر ژنتیکی در سلول‌های بنیادی و پس از آن تکثیر کلونال سلول‌های مذکور و درنهایت ایجاد فنوتیپ مهاجم و متاستاز سرطان می‌باشد. پیشگیری و یا درمان سرطان باید در مراحل مختلف فرایند مذکور با استفاده از فنوتیپ‌های مختلف صورت گیرد (۴). درمان‌های متداول امروزی شامل جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی است (۵). در اکثر سرطان‌ها علت اصلی شکست در درمان، متاستاز سلول‌های سرطانی است (۶). جراحی و رادیوتراپی در درمان تومورهای موضعی کاربرد مناسب دارد اما در متاستازهای سرطانی کارایی لازم را نداشته و در چنین مواردی روش درمان اغلب بر پایه‌ی شیمی‌درمانی استوار است که البته کارایی این روش هم به دلیل آثار جانبی سمی که در دوزهای بالا دارد عملاً محدود می‌باشد (۷،۸). به دلیل آثار جانبی داروهای شیمی‌درمانی و کمتر بودن این اثر در پپتیدها در حال حاضر پپتید درمانی در دنیا رواج یافته است (۹،۱۰). سایتوکاین‌ها پروتئین‌ها یا لیپوپروتئین‌های تنظیمی با وزن مولکولی کوچک هستند که نقش مؤثری در تنظیم

عملکردهای ایمنی و التهابی بدن دارند (۱۱). این تأثیرات می‌تواند از طریق تحریک، جلوگیری از فعال‌سازی و تکثیر یا تمایز سلول‌های هدف اعمال شود. انواع مختلف سایتوکاین‌ها نقش‌های گوناگونی را در شروع یا تکثیر سرطان ایفا می‌کنند و می‌توانند از یک طرف زمینه را برای بروز و حتی تکثیر و متاستاز سرطان فراهم کنند و از طرف دیگر از طریق آثار ضدالتهابی و ضد توموری از پیشرفت و توسعه سرطان جلوگیری کنند (۱۲). تحقیقات نشان داده است که اینترلوکین ۸ دارای اثرات پیش التهابی فراوانی است و به وسیله سلول‌های تومور ترشح می‌شود. بیان بیش از حد اینترلوکین ۸ با افزایش رشد تومور و همچنین عود سرطان پستان همراه است. علاوه بر این رابطه مستقیمی بین سطوح اینترلوکین ۸ و آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور وجود دارد (۱۱). همچنین التهاب مزمن در کارسینوژنز و سرطان نقش مؤثری دارد (۱۳). اکثر پژوهش‌ها TNF- α را به عنوان پل ارتباطی بین سرطان و التهاب معرفی کرده‌اند (۱۴،۱۵).

مواد و روش‌ها

طراحی پپتید

پپتیدها مواد طبیعی هستند که دارای اثرات زیستی بالا و سمیت کم بوده و امکان تهیه‌ی آنها با قیمت مناسب وجود دارد (۱۶).

به دلیل محدودیت‌هایی نظیر هضم آنزیمی در بدن، انعطاف‌پذیری بالا، انتقال کم از غشاهای زیستی، عدم عبور از سد خونی- مغزی، کاربرد دارویی پپتیدها مستلزم توجه به شاخص‌های متعددی است. اعمال تغییرات شیمیایی بر روی اسیدهای آمینه، استفاده از اسیدهای آمینه‌ی غیرمعمول، استفاده از D- آمینواسیدها، سنتز معکوس یک پپتید، ایجاد پیوند شیمیایی بین زنجیره‌های جانبی و استفاده از ساختارهای آلی مشابه به جای ساختارهای معمول پپتیدی، انجام تغییرات شیمیایی مختلف بر روی پپتید و یا طراحی الگوهای مشابه پیوند

آنجا که سیستم ایمنی نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت سرطان دارد (۱۸)، مدل‌هایی که بتوان در موش برای ایمنی کامل به کار برد، برای ارزیابی داروها و پپتیدها ضروری است. رده‌ی سلولی موشی 4T1 یکی از چند رده‌ی سلولی سرطان پستان است که توانایی متاستاز مؤثر به مناطقی که در سرطان پستان انسانی آلوده می‌شوند را دارد (۱۹،۲۰).

رده‌ی سلولی سرطان پستان 4T1 با منشاء موشی نژاد BALB/C از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM high glucose حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۵ درصد اسیدآمینه‌های غیرضروری و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. موش‌های BALB/C ۵ تا ۷ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج خریداری شد و در شرایط دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت مناسب با آب و غذای کافی نگهداری شد. برای القای سرطان پستان دو روش تزریق سلول 4T1 و پیوند بافت سرطانی به صورت زیر انجام شد.

در روش تزریق سلول سرطانی، محل تزریق در موش با پنبه و الکل ضد عفونی شد. در روز صفر سلول سرطانی به تعداد 7×10^5 به صورت زیر جلدی به تمام موش‌ها تزریق شد. محل تزریق مجاور پایین‌ترین غده پستانی سمت راست در نظر گرفته شد. بعد از مناسب شدن اندازه‌ی تومور، از آنها جهت پیوند به سایر موش‌ها با عمر ۵ تا ۷ هفته استفاده گردید. در روش پیوند بافت سرطانی، بعد از اتانازی موش، قطعات تومور پستان به اندازه‌ی تقریبی $3 \times 3 \times 3$ میلی‌متر برداشته و از طریق کاشت زیر جلدی در ناحیه‌ی راست پشتی موش‌ها ایمپلنت شد و محل پیوند با کلیپس مخصوص در روی پوست بسته شد. زمانی که حجم تومور به ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر مکعب رسید،

پپتیدی و ساختارهای دوم، از جمله راهکارهایی است که بدون تأثیر منفی بر فعالیت پپتیدها نیمه عمر آنها را افزایش می‌دهد.

در ایجاد محدودیت‌های فضایی، برای کاهش تحرک پپتیدها می‌توان از اسیدهای آمینه‌ای استفاده کرد که محدودیت ساختاری موضعی ایجاد می‌کنند. اعمال تغییرات شیمیایی نظیر پیوند دو اسیدآمینه‌ی مجاور، پیوند بین اسیدآمینه‌های مختلف و ایجاد ترکیبات حلقوی جایگزین پیوند آمیدی از جمله راهکارهایی است که می‌تواند انعطاف‌پذیری پپتیدها را کاهش دهد.

خلوص یک پپتید دارویی با استفاده از روش‌های مختلف آنالیز آمینواسیدی، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، اسپکتروسکوپی جرمی، نقشه‌برداری پپتیدی برای آنالوگ‌های بالاتر از ۲۰ اسیدآمینه و در نهایت بررسی‌های چرخش نوری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. به منظور تعیین اثرات بهینه‌ی پپتید به عنوان دارو، موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شد. سپس به ۳ گروه تیمار، پپتید طراحی شده‌ی آنتاگونیست bFGF در سه دوز متفاوت (۵، ۱۰، ۲/۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، به گروه کنترل منفی PBS و به گروه کنترل مثبت داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین به مدت ۱۴ روز به صورت درون صفاقی تزریق شد.

مدل سازی سرطان پستان متاستاتیک در موش

نژاد BALB/C

سلول‌های توموری انسان اغلب به طور ضعیفی در موش متاستاز ایجاد می‌کند و اگر متاستاز ایجاد کند اغلب خصوصیات غیر منتظره به وقوع می‌پیوندد. در مقابل سلول‌های توموری با منشاء موشی مؤثرتر متاستاز یافته و خصوصیات نظیر آنچه در بیماران سرطانی دیده می‌شود تظاهر می‌یابد (۱۷). این نوع تومور امکان آنالیز تومور در حیوان دارای سیستم ایمنی طبیعی را فراهم می‌کند. از

درصد مهاری = $100 - \{ \text{OD نمونه} / \text{OD کنترل} \} \times 100$

تیمار با پپتید

به موش‌هایی که تومور سرطان پستان در آنها ایجاد شده است و تقریباً حجم تومور به $0/5$ تا 1 میلی متر مکعب رسیده است یعنی حدود دو هفته بعد از پیوند تومور، پپتید مهندسی شده آنتاگونیست bFGF در دوزهای 10 ، 5 و $2/5$ میلی گرم بر کیلوگرم طی سه دوره و هر بار به مدت 14 روز تزریق شد.

اندازه‌گیری سایز تومور

جهت بررسی تغییرات در روند رشد تومور اندازه‌ی تومور به صورت یک روز در میان تا پایان دوره‌ی تیمار تعیین شد. هر بار قبل از تزریق، طول و عرض تومور با کولیس اندازه‌گیری و با فرمول طول \times عرض $\times 0/5$ حجم تومور محاسبه شد. قبل از خارج کردن تومور از بدن موش‌ها از چشم موش‌ها با استفاده از لوله مویین خون-گیری انجام شد و سرم آن برای انجام آزمایشات در فریزر منفی 80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری اینترلوکین ۸ و فاکتور نکروز دهنده

تومور

قبل از قربانی کردن موش‌ها از چشم موش‌ها خونگیری انجام شد و سرم نمونه‌ها جدا شد. میزان تولید اینترلوکین ۸ با کیت Mouse Interleukin 8 (IL-8) ELISA Kit و فاکتور نکروز دهنده تومور با کیت Mouse TNF- α ELISA Kit به روش الایزا انجام شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده در نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر و با گروه کنترل مقایسه شد. اطلاعات به دست آمده از اندازه‌ی تومورها با استفاده از نرم‌افزار Excel جمع‌آوری شد و با نرم‌افزار آماری SPSS23 و آزمون One Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و $P < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

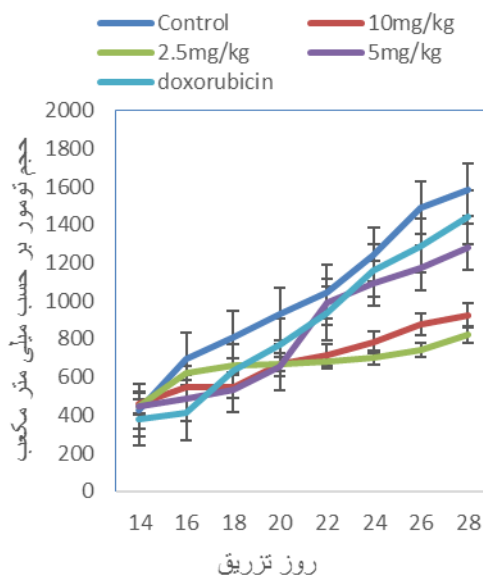
یعنی تقریباً دو هفته بعد از پیوند تومور، تیمار با پپتید شروع شد.

تعیین IC₅₀

رده سلولی مورد نظر از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM کشت داده شدند. آنتی‌بیوتیک به صورت مخلوطی از پنی‌سیلین به مقدار 100 میکروگرم در میلی‌لیتر برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت و استرپتومایسین به مقدار 100 میکروگرم در میلی‌لیتر برای رشد باکتری‌های گرم منفی به محیط کشت افزوده شد. در نهایت برای کشت سلولی، سرم جنین گاوی به نسبت 10 درصد به محیط افزوده شد و در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد CO_2 کشت داده شد. از تست MTT جهت اندازه‌گیری توان حیاتی سلول و اثرات سمی (سایتوتوکسیک) پپتید بر مهار رشد و تکثیر رده سلولی مورد نظر استفاده شد. برای ساخت محلول MTT از پودر این ماده به مقدار 5 میلی‌گرم در یک سی‌سی محیط RPMI1640 بدون FBS حل کرده و سلول‌های تیمار شده با پپتید به مدت 24 و 48 ساعت در شرایط دمایی 37 درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن 5% انکوبه شدند. در روز بعد مایع رویی دور ریخته شد و تیمار با دارو تکرار گردید. سپس به آن 100 میکرولیتر DMSO اضافه شد و حدود 10 دقیقه بعد OD ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج 570 نانومتر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده به ترتیب زیر محاسبه شد:

درصد فعالیت متابولیک = (جذب نوری سلول‌های تیمار شده / جذب نوری سلول‌های کنترل) $\times 100$

در انتها IC_{50} با غلظتی از دارو که جذبی برابر نصف کنترل تولید می‌کند یا به بیانی دیگر غلظتی از دارو که 50 درصد مهار در رشد سلول ایجاد می‌کند و طبق فرمول زیر محاسبه شد و دوز 10 میلی‌گرم / کیلوگرم به عنوان دوز مؤثر در نظر گرفته شد.



نمودار ۱. اعداد ۱۴ تا ۲۶ روزهای تزریق را نشان می‌دهد و در روز ۲۸ تومور از بدن موشها خارج شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون درمان‌های فعلی سرطان با عوارض متعددی از جمله آسیب به سلول‌های سالم در بدن انسان، مقاومت به دارو و در نتیجه عود مجدد بیماری همراه بوده‌اند. بنابراین استفاده از راهکارهای درمانی جدید از جمله پیتید درمانی با اثر بیشتر و سمیت و عوارض جانبی کمتر اهمیت ویژه‌ای دارند. در سال ۱۹۹۰ فولکمن از اولین محققانی بود که استفاده از مهار تشکیل عروق توموری را جهت درمان سرطان پیشنهاد کرد (۲۱). او در مطالعه‌ای دیگر با توجه به فعالیت زیستی بالای پپتیدها و هزینه کم برای درمان بیماران، این ترکیبات را کاندید بسیار مناسبی با عوارض کمتر و سمیت کم معرفی کرد (۲۲).

در سال ۲۰۰۵، کومالو و همکاران به دلیل افزایش مقاومت سرطان به درمان‌های رایج، تلاش برای کشف و شناسایی عوامل سرطانی جدید که موجب افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی شود را پیشنهاد کردند (۲۳). در سال ۲۰۰۷ ایچ‌هورن و همکاران گزارشی از نخستین داروهای ضد رگ زایی که به تأیید FDA رسیده است را در درمان تومورهای جامد و مهار رشد اندوتلیال عروقی ارائه دادند (۲۴) دستیابی به اثرات هم‌افزایی

اندازه تومور

نتایج به دست آمده در نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر و با گروه کنترل مقایسه شد. اطلاعات به دست آمده از اندازه‌ی تومورها با استفاده از نرم‌افزار Excel جمع‌آوری شد و با نرم‌افزار آماری SPSS23 و آزمون One Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. در این مطالعه سایز تومور موش‌هایی که پیتید دریافت کرده‌اند یا کوچک شده است و یا مهار رشد اتفاق افتاده است. این اختلاف در مقایسه با گروه کنترل مثبت و گروه کنترل منفی معنادار است. نمودار ۱ نشان می‌دهد که اندازه تومورها در تیمار با پیتید تغییر کرده است.

اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین ۸

نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار با پیتید موجب کاهش میزان سطوح توموری اینترلوکین ۸ که از فاکتورهای فعال کننده رگ‌زایی است، می‌شود. بین تغییرات سطح سرمی اینترلوکین ۸ در دو گروه کنترل و بیمار اختلاف معناداری وجود دارد. تغییرات سطح سرمی اینترلوکین ۸ در گروه کنترل منفی $33/20 \pm 3/74$ (پیکوگرم بر میلی لیتر) و در گروهی که پیتید دریافت کرده اند $12/45 \pm 2/51$ (پیکوگرم بر میلی لیتر) می‌باشد و اختلاف معناداری وجود دارد. این اختلاف در زمان قبل از تزریق پیتید بین دو گروه مشاهده نشده است.

اندازه‌گیری سطح سرمی TNF- α

نتیجه این تحقیق نشان داد میزان سطح سرمی فاکتور مؤثر در رگ زایی TNF- α در تومور موش‌هایی که با پیتید آنتاگونیست bFGF تیمار شده‌اند $0/0047 \pm 0/0024$ (پیکوگرم بر میلی لیتر) و در گروه کنترل منفی $0/0426 \pm 0/0074$ (پیکوگرم بر میلی لیتر) می‌باشد و این اختلاف معنادار است. اما اختلافی قبل از تیمار با پیتید مشاهده نشده است.

افزایش رشد تومور و همچنین عود سرطان پستان همراه است. علاوه بر این رابطه مستقیمی بین سطوح اینترلوکین ۸ و آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور وجود دارد (۱۱). نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار با پپتید موجب تغییر میزان سطوح سرمی اینترلوکین ۸ می‌شود.

فاکتور نکروز تومور آلفا از مهم‌ترین سایتوکاین‌های پیش التهابی است که در رشد، تمایز، عملکرد سلولی و بقای بسیاری از سلول‌ها نقش دارد. $TNF-\alpha$ به وسیله ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، فیبروبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های تومور ایجاد می‌شود (۳۰). چندین گزارش سطوح بالا و ناهنجار پروتئین $TNF-\alpha$ را در خون بیماران سرطانی در انواع سرطان گزارش کرده‌اند (۳۱). این پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سطوح بالاتر $TNF-\alpha$ با درجه وخامت تومور همبستگی دارد و با عوارض سرطان بیشتر و طول عمر کوتاه‌تر همراه است. بنابراین این احتمال وجود دارد که $TNF-\alpha$ در پاتوژنز و پیشرفت سرطان نقش داشته باشد. اکثر پژوهش‌ها $TNF-\alpha$ را به عنوان پل ارتباطی بین التهاب و سرطان معرفی کرده‌اند (۱۴، ۱۵). این فاکتور از یک طرف موجب رشد تومور و از طرفی موجب نکروز و آپوپتوز می‌شود. منتوانی و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان داشتند که وقتی $TNF-\alpha$ به منظور درمان و به صورت خارجی در دوز بالا تجویز می‌شود به عنوان سرکوب کننده تومور و وقتی به وسیله سلول‌های تومور و ماکروفاژهای همراه تومور یا سلول‌های استروما در سطوح فیزیولوژیک ترشح می‌شود نقش ارتقاء دهنده تومور را دارد و در گسترش از طریق تکثیر، انتقال، آنژیوژنز و تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش دارد (۳۲). نتیجه این تحقیق نشان داد سطح سرمی $TNF-\alpha$ در تومور موش‌هایی که با پپتید آنتاگونیست bFGF تیمار شده‌اند نسبت به گروه کنترل منفی تغییر داشته است.

ترکیبی با شیمی درمانی توسط استیوپ و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز ارائه شده است (۲۵). در سال ۲۰۱۰ اندرسن و همکاران این هم‌افزایی درمانی ترکیبی را با رادیوتراپی مطرح نمودند (۲۶). در سال ۲۰۱۲ لی و همکاران گزارشی از پپتیدی دادند که مانع تکثیر bFGF در سلول‌های سرطان پستان شده و احتمالاً باعث توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 گردیده است (۲۷). در سال ۲۰۱۵ ماکارویچ و همکاران استفاده از روش‌های جدید دارو رسانی و توسعه روش‌های ترکیبی و استفاده از مدل‌های حیوانی پیش بالینی برای درمان‌های ضد رگ‌زایی را عنوان کردند (۲۸). با توجه به گسترش پپتیدها در درمان‌های ضد رگ‌زایی، تلاش این پژوهش برای شناسایی پپتید آنتاگونیست bFGF مهندسی شده در جهت مهار رگ‌زایی تومورهای پستان بود.

در این مطالعه اثر پپتیدهای طراحی شده بر روی سلول‌های توموری بررسی شد و کاهش یا مهار رشد تومور مشاهده گردید و این کاهش در گروه کنترل منفی و گروه تیمار شده با پپتید و گروه کنترل مثبت که با داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین تیمار شده بودند اختلاف معناداری نشان داد. به نظر می‌رسد تیمار با پپتید روی تومورها اثر داشته است.

بسیاری از مطالعات صورت گرفته بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان حاکی از کاهش پاسخ‌های ایمنی، عملکرد سایتولیتیک و در نتیجه کاهش سایتوکاین‌ها، کاهش تکثیر در سلول‌های ایمنی و ابتلا به سرطان را به دنبال دارد (۲۹). اینترلوکین ۸ که به عنوان یک کموکاین CXC طبقه‌بندی می‌شود به طور ویژه در کموتاکسی گلبول‌های سفید مخصوصاً نوتروفیل و لنفوسیت‌ها نقش دارند که تحریک کننده و افزایش دهنده آنژیوژنز هستند (۱۱). تحقیقات نشان داده است که اینترلوکین ۸ دارای اثرات پیش التهابی فراوانی است و به وسیله سلول‌های تومور ترشح می‌شود. بیان بیش از حد اینترلوکین ۸ با

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه گیلان و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Rebecca siegel, Kimberly miller, ahmadin jemal. cancer statistics, 2017. CA Cancer Journal clin. 2017;67;7-30.
2. NoriiDaloii MR, Tabarestani S. Molecular Genetics. Diagnosis and treatment of breast cancer, review. J Sabzevar Univ Med Sci. 2010; 17(2): 74-87.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2009; 59(4): 225-249.
4. Institute NC. Breast Cancer. Cancer Stat Fact Sheet: Cancer of the Breast. 2015.
5. Trosko JE, Chang CC. Mechanism of upregulation gap junctional intercellular Communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. Mutat Res. 2001; 480-481.
6. Owonikoko TK, Arbiser J, Zelnak A, Shu HK, Shim H, Robin AM, et al. Current approaches to the treatment of metastatic brain tumours. Nat Rev Clin Oncol. 2014; 11(4): 203-222.
7. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. Annals Oncol. 2009; 20: 628-635.
8. Devita VT. Biologic therapy of cancer. Philadelphia, USA: Lippincott Pub. 1995.
9. National Cancer Institute. Breast cancer treatment. Bethesda: National Cancer Institute. 2012.
10. Bhutia SK, Maiti TK. Targeting tumors with peptides from natural sources. Trends Biotechnol. 2008; 26: 210-217.
11. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, Helal AN, Chouchane L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. Hum Immunol. 2006; 67(2): 13-21.
12. Smith JE, Rowan NJ, Salivan R. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Cancer Res. 2000; 49(2): 159-170.
13. Lanari C, Luthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, et al. Five novel hormone responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. Cancer Res. 2001; 61(1): 293-302.
14. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-[alpha] in disease states and inflammation. Crit Care Med. 1993; 21: 447-463.
15. Yan D, Qin N, Zhang H, Liu T, Yu M, Jiang X, et al. Expression of TNF- α leader sequence renders MCF-7 tumor cells resistant to the cytotoxicity of soluble TNF- α . Breast Cancer Res Treat. 2009; 116(1): 91-102.
16. Thundimadathil J. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. J Amino Acids. 2012; 45(2): 34-54.
17. Jonkers J, Derksen PW. Modeling metastatic breast cancer in mice. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2007; 12(3): 191-203.
18. Pulaski BA, Ostrand -Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. Curr Protoc Immunol. 2001; 20(8): 202-207.

19. DuPre SA, Redelman D, Hunter KWJ. The mouse mammary carcinoma 4T1 characterization of the cellular landscape of primary tumors and metastatic tumor foci. *Int J Exp Pathol*. 2007; 88(5): 351-360.
20. Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis -specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells invitro and invivo systems. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(5): 1918-1927.
21. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. *J National Cancer Inst*. 1990; 82: 4-6.
22. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *NEJM*. 1971; 285: 1182-1186.
23. Kummalue T. Molecular Mechanism of Herbs in Human Lung Cancer Cells. *J Med Assoc Thailand*. 2005; 88: 1725-1734.
24. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms clinical impact. *Langenbeck's Arch Surgery*. 2007; 392: 371-379.
25. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, et al. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2010; 28(16): 2712-2718.
26. Andersen MH, Junker N, Ellebaek E, Svane IM, Straten PT. Therapeutic cancer vaccines in combination with conventional therapy. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 23(6): 1-10.
27. Li Q, Gao S, Yu Y, Wang W, Chen X, Wang R, et al. A novel bFGF antagonist peptide inhibits breast cancer cell growth. *Mol Med Rep*. 2012; 6(1): 210-214.
28. Makarevich P, Rubina K, Diykanov D, Tkachuk V, Parfyonova YV. Therapeutic angiogenesis using growth factors: current state and prospects for development. *Kardiologija*. 2015; 55(9): 59-71.
29. Ardizzoia A, Lissoni P, Brivio F, Tisi E, Perego M, Grassi M, et al. Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease. *J Biol Regulat Homeostatic Agents*. 1992; 6(3): 103-107.
30. Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4: 314-320.
31. Leek R, Landers R, Fox S, Ng F, Harris A, Lewis C. Association of tumour necrosis factor α and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*. 1998; 77: 2246-2251.
32. Mantovani G, Macciò A, Mura L, Massa E, Mudu MC, Mulas C, et al. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. *J Mol Med*. 2000; 78(10): 554-561.

Effect of Fibroblast Growth Factor Antagonist Peptide on mouse Breast Tumor Growth and Serum Levels of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-Alpha

Jafarzadeh M¹, Mousavizadeh K^{2,3}, Joghataie M^{2,4}, Asghari SM^{*5}

1. Department of Biology, University Campuse2, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran.

3. Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran.

4. Department of Neuroscience, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran.

5. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, sm_asghari@guilan.ac.ir

Received: 3 April 2017 **Accepted:** 18 July 2017

Abstract

Background: Today, breast cancer is the biggest health threat to women. The current common treatments include surgery, chemotherapy, and radiotherapy. In most cancers, metastasis is the primary cause of treatment failure. Surgery and radiotherapy are effective on local tumors, but they cannot affect metastatic cancers. Chemotherapy is often used to treat metastatic cancers, the effectiveness of which is basically limited due to its toxic side effects at high doses. Due to the side effects of chemotherapy drugs, peptide therapy has become increasingly popular in the world. Accordingly, this study aims to investigate the effect of a designed bFGF antagonist peptide on inhibition of tumor growth in 4T1 metastatic breast cancer model and the serum levels of interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha.

Materials and Methods: Female Balb/c mice (5-7 weeks old) were used in this study. Tumors were established using 4T1 tumor transplantation method. Treatment began after two weeks, when tumors reached an appropriate size. After that, the designed peptides at three selected doses were injected intraperitoneally for 14 days. Positive and negative controls were also used for each injection. The mice in the positive and negative control groups were injected with PBS and doxorubicin, respectively. Tumors size was measured every other day using a digital caliper, and their volume was measured using the formula: length × width² × 0.5. After blood samples were taken from the mice's eyes and plasma isolation was performed, interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor-alpha were measured by ELISA.

Results: The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS. Given the value of $p \leq 0.05$, it can be concluded that peptide injection is effective in the reduction or inhibition of tumor growth. Significant differences are observed among the negative control group positive contro, group, and the peptide-treated group.

Conclusion: The results of this study showed that the anti-angiogenic peptide effectively inhibited the growth of the breast cancer and the results indicate that compared with the negative control group, serum levels of interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are significantly different.

Keywords: Peptide, Breast Cancer, Tumor Size, Interleukin-8, Tumor Necrosis Factor-Alpha.

***Citation:** Jafarzadeh M, Mousavizadeh K, Joghataie M, Asghari M. Effect of Fibroblast Growth Factor Antagonist Peptide on mouse Breast Tumor Growth and Serum Levels of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Yafte*. 2017; 19(2):125-135.