

تأثیر پپتید آنتاگونیست فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VGB4) بر مهار رشد تومور پستان در مدل حیوانی

مریم فرزانه بهلگردی^۱، صابر زهری^۱، فرهاد مشایخی^۲، سید محسن اصغری^{۳*}

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، ^۲ گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

تاریخ وصول: ۲۶/۴/۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۴/۱۰/۱۳۹۷

چکیده

زمینه و هدف: فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی ترشح شده از تومور با اتصال به رسپتورهای خود در سطح سلول‌های اندوتلیال نقش مهمی در نفوذپذیری عروقی و رگ‌زایی تومور ایفا می‌کنند. در این مطالعه پپتید آنتاگونیست فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) طراحی شد با این هدف که پپتید مورد نظر (VGB4) با تداخل در اتصال فاکتور رشد اندوتلیال عروق به رسپتورهای خود، مسیرهای پیام رسانی در پایین دست را غیر فعال کرده و در نتیجه باعث مهار آنژیوژنز شود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه گیلان انجام گرفت، تعداد ۴۲ سر موش ماده نژاد بالب / سی در محدوده سنی ۴ تا ۶ هفته با متوسط وزن ۲۰ گرم تهیه شد. از رده سلولی سرطانی 4T1 جهت مدل‌سازی سرطان پستان استفاده گردید. پس از پیوند زیر پوستی تومورهای پستانی به حیوانات، تزریق روزانه درون صفاقی دوزهای مختلف پپتید VGB4 (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز انجام شد و پتانسیل آنتی‌توموری دوزهای مختلف پپتید در طول دوره تزریق نسبت به کنترل، به روش آماری مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA و Duncan تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: افزایش دوز پپتید باعث کاهش میزان رشد تومور در گروه‌های تیمار می‌شود و افزایش دوز از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر ممانعت‌کنندگی معنی‌داری روی رشد تومور ندارد. بنابراین دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بهترین دوز ضد توموری پپتید VGB4 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: پپتید VGB4 اثر ممانعت‌کنندگی معنی‌داری بر میزان رشد تومور کارسینومای پستانی ایجاد شده به وسیله رده سلولی 4T1 دارد. با توجه به اثرات آنتی‌توموری VGB4 ممکن است بتوان در آینده از این پپتید برای درمان سرطان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنژیوژنز، پپتید، فاکتور رشد اندوتلیال عروق، سرطان پستان

نویسنده مسئول: سید محسن اصغری، گیلان، دانشگاه گیلان، گروه زیست شناسی

Email: sm_asghari@guilan.ac.ir

مقدمه

تومورها بافت‌های پیچیده و ناهمگونی از سلول‌های توموری و غیر توموری هستند که برهمکنش و ارتباط بین این سلول‌ها نقش مهمی در پیشبرد فرآیندهای مربوط به رشد و متاستاز تومور ایفا می‌نماید (۱).

در اثر رشد غیرطبیعی سلول‌های توموری مرکز بافت تومور دچار کمبود اکسیژن (هایپوکسی) می‌شود که این وضعیت منجر به تشکیل پاسخ‌هایی از قبیل تحریک رگ‌زایی به درون بافت توموری می‌گردد (۲).

آنژیوژنز یا تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های موجود پدیده‌ای فعال و پیچیده است که برای فرآیندهای فیزیولوژیک در دوران جنینی، چرخه‌های جنسی افراد بالغ و همچنین برای بسیاری از وضعیت‌های پاتولوژیک در ترمیم زخم‌ها، رشد تومورهای سرطانی مورد نیاز می‌باشد (۳). در شرایط فیزیولوژیک رگ‌زایی به شدت به وسیله فاکتورهای تحریک کننده و مهارکننده رگ‌زایی کنترل می‌شود. در بسیاری از سرطان‌ها این بالانس از بین می‌رود و رگ‌زایی به صورت کنترل نشده افزایش می‌یابد. از میان فاکتورهای ترشح شده از بافت توموری فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های اصلی و اختصاصی رگ‌زایی، برای رشد تومور و هم‌چنین متاستاز آن ضروری می‌باشد (۴). خانواده فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی شامل یک

سری گلیکوپروتئین‌های ترشحی (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, PLGF) از نظر ساختاری شباهت‌های بسیاری با هم دارند. این اعضا از طریق باند شدن به سه گیرنده تیروزین کینازی (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) در سطح سلول‌های اندوتلیال منجر به تکثیر، مهاجرت و نفوذپذیری عروقی می‌شوند (۵). بنابراین رویکردهای درمانی جدید بر پایه جلوگیری از اتصال فاکتور رشد VEGF به رسپتورهایش می‌تواند به میزان زیادی رشد تومور را سرکوب کند.

پپتیدها با توجه به مزیت‌های بسیاری نظیر؛ ایمنی‌زایی کم، هزینه تولید کمتر و داشتن اندازه کوچک و پتانسیل بالا در نفوذ به درون بافت‌های توموری بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (۶). پپتیدها به اندازه‌ای کوچک هستند که به راحتی از غشای سلول عبور می‌کنند و همچنین، پپتیدها می‌توانند طوری طراحی شوند که برای پروتئین هدف کاملاً اختصاصی عمل کرده و با کارایی بسیار بالا به هدف خود متصل شوند. در طراحی پپتیدها، ناحیه‌هایی انتخاب می‌شوند که در اتصال بین دو یا چند پروتئین هدف نقش اصلی و اساسی دارند. در نتیجه، پپتید طراحی شده با پتانسیل بالا به پروتئین هدف متصل شده و در دوزهای پایین به عنوان یک آنتاگونیست، عملکرد پروتئین هدف خود را با کارایی بالا مختل می‌کند. توانایی پپتیدها در نفوذ به درون بافت توموری نیز به عنوان یک مزیت محسوب می‌شود. بسیاری از

روش بررسی

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است. جمعیت مورد مطالعه، موش‌های ماده بودند که به طور تصادفی انتخاب شدند. جهت اجرا، ۴۲ سر موش ماده نژاد بالبسی در محدوده سنی ۴ تا ۶ هفته و متوسط وزن ۲۰ گرم از انستیتو پاستور در سال ۱۳۹۶ خریداری شدند. این حیوانات به صورت تصادفی به گروه کنترل و ۵ گروه تیمار تقسیم‌بندی شدند (تعداد ۷ موش در هر گروه) و در محیطی با دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آسان به آب و غذای کافی نگهداری شدند. تمام مراحل پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه کمیته اخلاق با کد ۲۵۱۰۴۰۰ دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید.

با مطالعه اطلاعات ساختاری کمپلکس گیرنده فاکتور رشد موجود در بانک داده‌های پروتئین، ریشه‌های آمینواسیدی والین ۴۸، لوسین ۸۱، ایزولوسین ۸۳، سرین ۸۸، گلوتامین ۸۹ و لوسین ۹۰ مربوط به فاکتور رشد اندوتلیال عروق نوع B و ریشه‌های آمینواسیدی ایزولوسین ۸۳، لیزین ۸۴، پرولین ۸۵، هیستیدین ۸۶ و گلیسین ۸۸ مربوط به فاکتور رشد اندوتلیال عروق نوع A انتخاب شد (۱۵ و ۱۴). پپتید خطی طراحی شده با درجه خلوص ۸۵ درصد به وسیله شرکت شاین ژن (کشور چین) سنتز

پروتئین‌های ضد رگ‌زایی موجود، به واسطه بزرگ بودن، به سختی درون بافت توموری نفوذ می‌کنند و تولید آنها بسیار پر هزینه می‌باشد. بنابراین تلاش‌های چشم‌گیری برای توسعه پپتیدها با خواص ضد رگ‌زایی در حال انجام می‌باشد. با توجه به این که فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی به عنوان اصلی‌ترین فاکتور ترشح شده از سلول‌های توموری می‌باشند، محققین زیادی با مطالعه ساختارهای این فاکتورهای رشد در کمپلکس با گیرنده‌های خود، پپتیدهای آنتاگونیست بسیاری علیه انواع فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی یا علیه گیرنده‌های آنها طراحی کرده اند و پتانسیل ضد توموری و ضد رگ‌زایی آنها به اثبات رسیده است (۷-۱۰). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بلوک کردن گیرنده‌های فاکتور رشد اندوتلیال عروق نوع ۱ یا نوع ۲ به طور مؤثری رگ‌زایی تومور را سرکوب می‌کنند (۱۲ و ۱۱). با توجه به وجود کراس تاک در مسیرهای پیام‌رسانی پایین دست مربوط به این گیرنده‌های تیروزین کینازی، بلوک کردن تنها یک گیرنده منجر به ایجاد مقاومت به درمان دارویی در بیماران خواهد شد (۱۳). بنابراین سرکوب هم‌زمان هر دو گیرنده برای به دست آوردن یک نتیجه بهتر، ضروری به نظر می‌رسد.

هدف مطالعه حاضر طراحی و تولید یک پپتید آنتاگونیست خطی با توانایی اتصال هم‌زمان به گیرنده‌های فاکتور رشد اندوتلیال عروق نوع ۱ و نوع ۲ و بلوک کردن آنها می‌باشد.

گردید. برای بررسی عملکرد آنتی‌توموری پپتید مورد نظر در مدل حیوانی به روش آماری، ابتدا تومور از موش‌های ماده نژاد بال‌بسی حمل‌کننده تومور کارسینومای پستان (4T1)، با تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر زایل‌زین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به عنوان ماده بیهوشی، در شرایط کاملاً استریل جدا و برش‌هایی از تومور به قطعات مساوی حدود ۳ میلی‌متر مربع تهیه گردید و به صورت زیر پوستی در پهلو راست موش‌های پذیرنده تومور قرار داده شد. در حدود ۱۴ روز بعد از پیوند تومور کارسینومای پستان، حجم تومورها به حدود ۲۰۰ میلی‌متر مکعب رسید. حیوان‌های حامل تومور در گروه‌های تیمار دوزهای مختلف از پپتید VGB4 (۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵/۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت تزریق درون صفاقی، روزی یک بار و به مدت ۱۴ روز دریافت کردند، در صورتی که به گروه کنترل حجم مساوی از PBS تزریق شد. در طول این دوره ابعاد تومورها به صورت یک روز در میان به وسیله یک کولیس دیجیتال اندازه‌گیری گردید و با استفاده از فرمول زیر حجم تومور در هر یک از گروه‌های تیمار و کنترل محاسبه شد (۱۶).

$$\text{حجم تومور} = ۰/۵۲ \times (\text{عرض})^2 \times \text{طول}$$

در تمام محاسبات آماری و رسم گراف از SPSS استفاده شد. در ابتدا با استفاده از آزمون

کولموگروف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها چک شد و سپس با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و به دنبال آن آزمون چند دامنه‌ای دانکن، علاوه بر اختلاف معنی‌دار میانگین حجم تومور بین گروه‌های مختلف تیمار و کنترل پس از تزریق پپتید، اختلاف معنی‌دار میانگین حجم تومور در هر یک از گروه‌های تیمار و نیز کنترل به صورت جداگانه طی دوره تزریق دو هفته‌ای پپتید VGB4، به صورت یک روز در میان مورد بررسی قرار گرفت. در انتخاب معادله خط برای بیان رابطه بین میانگین حجم تومور در هر یک از گروه‌های تیمار و نیز کنترل با روزهای تزریق در یک دوره دو هفته‌ای تزریق پپتید VGB4، از معادله خطی درجه یک استفاده شد که برای محاسبه آن از وبسایت <https://mycurvefit.com> انجام گردید.

یافته‌ها

در ارزیابی پتانسیل آنتی‌توموری پپتید طراحی شده VGB4 در مدل حیوانی، میانگین حجم تومور از روز چهاردهم تا روز بیست و هشتم به روش آماری مورد بررسی قرار گرفت. الگوی رشد تومورهایی که تحت تزریق دوزهای مختلف پپتید در طی دو هفته قرار گرفتند در شکل ۱ نشان داده شده است.

میانگین حجم تومور در موش‌های کنترل نسبت به میانگین حجم تومور در گروه‌های تیمار که تحت تزریق دوزهای مختلف پپتید VGB4 بودند بیشتر

در روزهای مختلف نشان داد که با وجود این که در گروه تیماری که دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را دریافت می‌کردند میانگین حجم تومور از روز ۱۶ تا ۲۰ با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p > 0.05$)، در گروه تیمار که تحت تزریق پپتید با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود فقدان اختلاف معنی‌دار از روز ۱۶ تا ۲۲ دیده شد ($p > 0.05$) و از این رو زمان بیشتری نرخ رشد تومور را کاهش می‌داد.

معادلات خط الگوی رشد میانگین حجم تومور در گروه کنترل و پنج گروه تیمار در زیر ارایه می‌شود؛ معادله الگوی رشد حجم تومور در گروه کنترل $y = 92/88611x - 1198/097$ ، معادله الگوی رشد حجم تومور در گروه تیمار شده با دوز ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم $y = 77/17241x - 960/8125$ ، معادله الگوی رشد حجم تومور در گروه تیمار شده با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم $y = 58/7377x - 706/2008$ ، معادله الگوی رشد حجم تومور در گروه تیمار شده با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم $y = 64/03173x$ ، معادله الگوی رشد حجم تومور در گروه تیمار شده با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم $y = 34/44893x - 348/1617$ ، معادله الگوی رشد حجم تومور در گروه تیمار شده با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم $y = 32/39521x - 326/9434$.

این معادلات نشان می‌دهند که با افزایش دوز پپتید شیب خط کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش

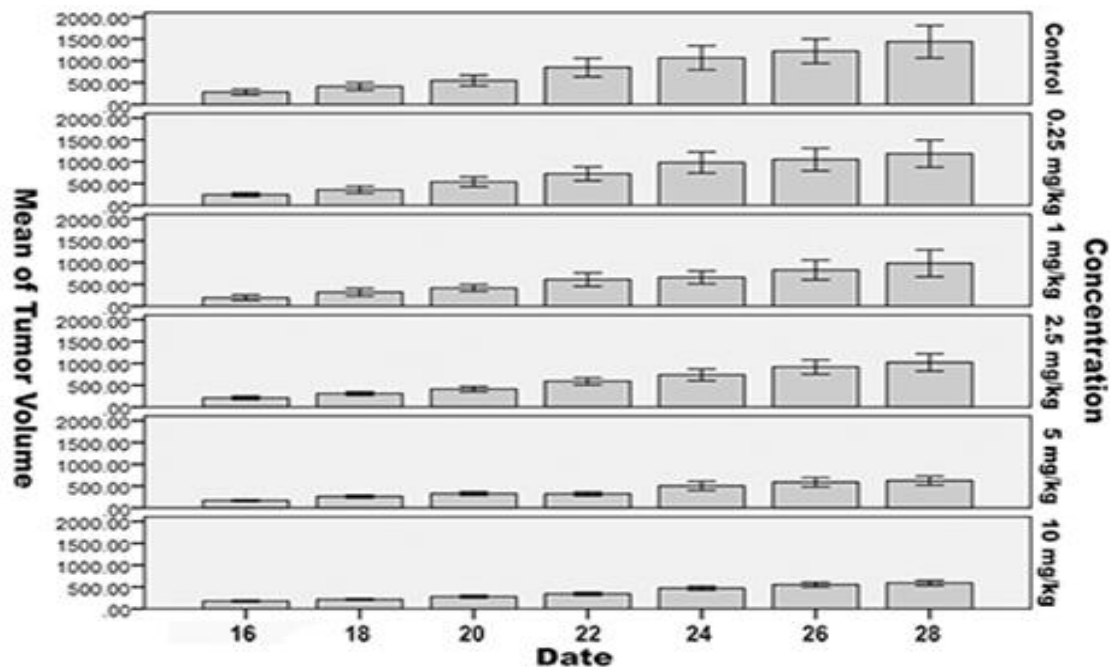
بود. تزریق سه گروه تیماری که به ترتیب دوزهای ۰/۲۵، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم را دریافت کردند تا حدودی باعث کاهش نرخ رشد تومور شدند در مقابل دو گروه تیماری که دوزهای ۵ و ۱۰ را دریافت کردند با اختلاف معنی‌داری نسبت به کنترل باعث کاهش نرخ رشد تومور شدند ($p = 0.04$) (شکل ۱) که این مورد با آنالیزهای دانکن به خوبی نشان داده می‌شود (جدول ۱). در حالی که میانگین حجم تومور در گروه‌های تیماری که به آنها دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از پپتید تزریق می‌شد اولین بار به ترتیب در روز بیست و چهارم و بیستم با میانگین حجم تومور گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p = 0.04$) (جدول ۱)، میانگین حجم تومور هیچ یک از دیگر گروه‌های تیمار در هیچ روزی از دوره دو هفته‌ای تزریق با میانگین حجم تومور گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0.05$). علاوه بر این نه تنها میانگین حجم تومور در گروه‌های تیمار شده با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیچ اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند ($p > 0.05$)، بلکه الگوی رشد کاملاً مشابهی نیز داشتند.

برای درک این مورد که کدام یک از دوزهای پپتیدی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثربخشی بهتری داشته و باعث کاهش نرخ رشد تومور در یک دوره زمانی بیشتری می‌شود، آنالیزهای دانکن (جدول ۲) بین میانگین حجم تومور هر یک از این دو گروه تیمار

که با وجود اینکه شاخص پراکندگی (خطای استاندارد) حجم تومور در روز ۱۶ برای هر پنج گروه تیمار و نیز کنترل کم می‌باشد، با گذر زمان در کنترل و گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۰/۲۵، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبتاً افزایش پیدا کرده، اما در دو گروه تیمار شده با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، همچنان ناچیز باقی می‌ماند. از این رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد بر خلاف گروه کنترل که در آن اختلاف در اندازه تومور بین افراد پس از دو هفته نسبتاً قابل توجه است، در دوز بهینه (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از این دوره حجم تومور در موش‌ها نسبتاً یکسان است.

نرخ رشد تومور می‌باشد و همچنین یکسان بودن تقریبی شیب خط در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأیید کننده این مطلب هستند که افزایش غلظت پپتید از ۵ به ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر ممانعت‌کنندگی بارزی روی رشد تومور ندارد و بنابراین، دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بهترین دوز از نظر اثر بخشی می‌باشد. بعلاوه این معادلات نشان می‌دهند که در مقایسه با کنترل هیچ یک از دوزها الگوی رشد تومور را تغییر نمی‌دهند و فقط باعث کاهش نرخ رشد تومور می‌شوند.

با توجه به شکل ۱ که خطای استاندارد میانگین حجم تومور در هر گروه در روزهای مختلف نشان داده شده است می‌توان به این مورد اشاره کرد



شکل ۱: الگوی رشد تومورهایی که تحت تزریق دوزهای مختلف پپتید (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱، ۰/۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) در طی دو هفته (روز ۱۴ تا ۲۸) قرار گرفتند

جدول ۱: آنالیز دانکن جهت نشان دادن اختلافات معنی‌دار بین میانگین حجم تومور گروه‌های تیمار و کنترل در روزهای مشخص هر ستون
بیانگر مواردی است که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند

دوز	روز ۱۶		روز ۱۸		روز ۲۰		روز ۲۲	
	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۱	ستون ۲
۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۷۶/۹۴		۲۱۴/۵۸		۲۷۸/۶۲		۳۴۳/۶۳	
۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۷۰/۰۹		۲۶۰/۶۱		۳۲۹/۳۵		۳۲۳/۶۵	
۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۱۱/۱۱		۳۰۹/۷۹		۴۱۱/۴۴		۵۹۱/۰۴	
۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۹۵/۹۲		۳۲۰/۷۲		۴۱۶/۸۶		۶۱۰/۶۸	
۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۴۵/۲۲		۳۵۶/۶۶		۵۳۸/۷۵		۷۲۳/۶۲	
کنترل	۲۸۴/۷۲		۴۱۲/۸۸		۵۴۸/۴۷		۸۴۷/۷۸	
Sig	۰/۱۰		۰/۰۵		۰/۲۷		۰/۰۵	
	روز ۲۴	روز ۲۶	روز ۲۸					
دوز	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۱	ستون ۲
۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۴۷۰/۵۶		۵۵۱/۶۴		۵۹۰/۸۵			
۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۵۰۶/۱۱		۵۸۹/۴۵		۶۲۲/۸۳			
۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۷۳۷/۵۶		۹۱۷/۷۸		۹۱۷/۷۸		۱۰۲۳/۰۱	
۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۶۶۰/۲۰		۸۳۱/۱۳		۸۳۱/۱۳		۹۸۲/۷۹	
۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۹۸۰/۵۷		۹۸۰/۵۷		۱۰۵۰/۴۵		۱۱۸۳/۱۷	
کنترل	۱۰۶۸/۴۱		۱۰۶۸/۴۱		۱۲۲۱/۰۵		۱۴۳۶/۷۶	
Sig	۰/۰۷		۰/۱۴		۰/۱۱		۰/۲۳	

جدول ۲: آنالیز دانکن جهت نشان دادن اختلاف معنی‌دار بین میانگین حجم تومور در گروه کنترل و نیز در هر یک از گروه‌های دریافت کننده پیتید با دوز مشخص در طی یک دوره تزریق دو هفته‌ای. هر ستون بیانگر مواردی است که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

روز	کنترل			۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم			۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم		
	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳
۱۶	۲۸۴/۷۲			۲۴۵/۲۲			۱۹۵/۹۲		
۱۸	۴۱۲/۸۸			۳۵۶/۶۶			۳۲۰/۷۲		
۲۰	۵۴۸/۴۷			۵۳۸/۷۵			۴۱۶/۸۶		
۲۲	۸۴۷/۷۸			۷۲۳/۶۲			۶۱۰/۶۸		
۲۴	۱۰۶۸/۴۱			۹۸۰/۵۷			۲۱۶۶۰		
۲۶	۱۲۲۱/۰۵			۱۰۵۰/۴۵			۸۳۱/۱۴		
۲۸	۱۴۳۶/۷۶			۱۱۸۳/۱۷			۹۸۲/۷۹		
Sig	۰/۱۲			۰/۱۲			۰/۱۷		
	۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم						
روز	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳
۱۶	۲۱۱/۱۱			۱۷۰/۰۹			۱۷۶/۹۴		
۱۸	۳۰۹/۷۹			۲۶۰/۶۱			۲۱۴/۵۸		
۲۰	۴۱۱/۴۴			۳۲۳/۶۵			۲۷۸/۶۲		
۲۲	۵۹۱/۰۳			۳۲۹/۳۵			۳۴۳/۶۳		
۲۴	۷۳۷/۵۶			۵۰۶/۱۱			۴۷۰/۵۶		
۲۶	۹۱۷			۵۸۹/۴۵			۵۵۱/۶۴		
۲۸	۱۰۲۳/۰۱			۸۳۶۲۲			۵۹۰/۸۵		
Sig	۰/۱۲			۰/۱۷			۰/۰۶		

بحث

با توجه به اهمیت رگ‌زایی در سرطان، درمان‌های ضد رگ‌زایی هدفمند با استفاده از عوامل ضد رگ‌زایی به طور قابل توجهی افزایش یافته است. پپتید درمانی براساس طراحی پپتیدهایی که نواحی اتصال اصلی در کمپلکس پروتئین - پروتئین را تقلید میکنند، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. نظر به این که فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی، به عنوان اصلی‌ترین فاکتور ترشح شده از ریز محیط توموری، نقش مهمی در پیشرفت و متاستاز سلول‌های سرطانی ایفا می‌کنند، تحقیقات آنتی توموری بسیاری بر علیه این فاکتورهای رشد در حال انجام می‌باشد. به طور مشخص طراحی پپتیدهای آنتاگونیست فاکتورهای رشد اندوتلیال عروق و یا گیرنده‌های آنها که در تشکیل کمپلکس VEGF/VEGFRs تداخل ایجاد می‌کنند منجر به کاهش شدید رگ‌زایی و در نتیجه کاهش رشد تومور می‌شوند (۱۷ و ۱۸)، لذا هدف از مطالعه حاضر طراحی و تولید یک پپتید آنتاگونیست خطی با توانایی اتصال هم‌زمان به گیرنده‌های فاکتور رشد اندوتلیال عروق نوع - ۱ و نوع - ۲ و بلوک کردن آنها می‌باشد.

در این مطالعه پس از طراحی یک پپتید خطی مناسب (طراحی شده بر اساس نواحی مشخصی از فاکتور رشد VEGFA و VEGFB که در اتصال به گیرنده‌های به ترتیب VEGFR1 و VEGFR2 نقش اساسی دارند)، پتانسیل آنتی توموری آن به صورت آماری در مدل حیوانی مورد بررسی قرار داده شد.

آنالیزهای آماری نشان داد که VGB4 به صورت وابسته به دوز باعث کاهش نرخ رشد تومور می‌شود. کاهش شیب خط در معادلات خطی درجه یک ($y = ax + b$) مربوط به موش‌های بال‌بسی حامل تومور کارسینوما پستان (4T1) تیمار شده با دوز ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($a=77/17$) نسبت به موش‌های گروه کنترل ($a=92/88$) نشان می‌دهد که پپتید VGB4 باعث کاهش نرخ رشد تومور می‌شود که با افزایش دوز پپتید VGB4 این تأثیر ممانعت‌کنندگی بر رشد تومور پستانی شدت می‌یابد، به طوری که در گروه تیمار شده با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، شیب خط ($a=32/39$) به شدت نسبت به کنترل کاهش می‌یابد، که نشان دهنده تأثیر ممانعت‌کنندگی بالا بر رشد تومور در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از پپتید VGB4 می‌باشد. همچنین نگاه دقیق‌تر به معادلات خطی مربوط به گروه‌های تیمار و کنترل نشان می‌دهد که شیب خط مربوط به دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری ندارند و در نتیجه به یک اندازه باعث کاهش رشد تومور می‌شوند. علاوه بر این با توجه به داده‌های جدول ۲ که نشان می‌دهد پپتید در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت زمان طولانی‌تری از افزایش حجم تومور جلوگیری می‌کند، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پپتید VGB4 در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بهترین تأثیر ممانعت‌کنندگی بر رشد تومور را نشان می‌دهد. همچنین در بسیاری از کارهای تحقیقاتی در زمینه پپتید درمانی برای ارزیابی پتانسیل آنتی توموری پپتیدهای طراحی شده در مدل حیوانی،

نتیجه‌گیری

پپتید VGB4 اثر ممانعت‌کنندگی قابل ملاحظه‌ای بر کاهش نرخ رشد تومور کارسینومای پستانی (4T1) دارد. با توجه به اثرات آنتی‌توموری VGB4 می‌توان گفت که این پپتید ممکن است کاندیدای مناسبی برای درمان‌های آنتی‌آنژیوژنیک و آنتی‌توموری در آینده باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد، لذا از کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی و حیوان‌خانه دانشگاه گیلان برای فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این مطالعه تشکر می‌گردد.

از زمانی تزریق درون صفاقی پپتید را آغاز می‌کنند که حجم تومور در حیوانات مورد مطالعه به حدود ۱۰۰ میلی‌متر مربع می‌رسد (۱۹). در صورتی که در این مطالعه تزریق درون صفاقی پپتید VGB4 زمانی آغاز شد که حجم تومور در موش‌های بالبسی به حدود ۲۰۰ میلی‌متر مربع رسید و در طول دو هفته تزریق سرعت رشد تومور در گروه‌های تیمار نسبت به کنترل به میزان زیادی کاهش یافت. بنابراین با توجه به تأثیر ممانعت‌کنندگی بارزی که پپتید VGB4 در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر رشد تومور نشان داد می‌توان گفت که پپتید VGB4 پتانسیل لازم در درمان‌های آنتی‌آنژیوژنیک را دارا می‌باشد. قابل ذکر است که در تأیید اثردهی پپتید VGB4 موارد زیر نیز جهت مقابله با تورش انتخاب و تورش اطلاعات لحاظ گردیدند، استفاده از یک نژاد مشخص از موش در این پژوهش؛ در نظر گرفتن سن موش‌ها هنگام تزریق، استفاده از شرایط تزریقی یکسان برای همه موش‌ها، ایجاد شرایط نگهداری یکسان برای همه موش‌ها شامل؛ وضعیت دمایی، نور، رطوبت و تغذیه و اندازه‌گیری حجم تومور با دقت بالا برای همه موش‌ها پس از یک بازه زمانی مشخص پس از تزریق، لذا پیشنهاد می‌شود پتانسیل آنتی‌توموری این پپتید طراحی شده در ترکیب با انواع داروهای شیمی‌درمانی مورد ارزیابی قرار گیرد و هم‌چنین در انواع دیگر سرطان‌ها نیز به بررسی عملکرد مهاری آن پرداخته شود.

REFERENCES

1. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science* 2012; 5591-6.
2. Kroemer G and Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* 2008; 13(6): 472-82.
3. Pelengaris S and Khan M. The molecular biology of cancer: A bridge from bench to bedside. 2th ed. Wiley-Blackwell; 2013; 632.
4. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(10): 795.
5. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006; 9(4): 225-30.
6. Miller MJ, Foy KC, Kaumaya PT. Cancer immunotherapy: present status, future perspective, and a new paradigm of peptide immunotherapeutics. *Discovery Medicine* 2013; 15(82): 166-76.
7. Goncalves V, Gautier B, Coric P, Bouaziz S, Lenoir C, Garbay C, et al. Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50(21): 5135-46.
8. Gautier B, Goncalves V, Diana D, Di Stasi R, Teillet F, Lenoir C, et al. Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 53(11): 4428-40.
9. Basile A, Del Gatto A, Diana D, Di Stasi R, Falco A, Festa M, et al. Characterization of a designed vascular endothelial growth factor receptor antagonist helical peptide with antiangiogenic activity in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry* 31; 54(5): 1391-400.
10. Wang L, Gagey-Eilstein N, Broussy S, Reille-Seroussi M, Huguenot F, Vidal M, et al. Design and synthesis of C-terminal modified cyclic peptides as VEGFR1 antagonists. *Molecules* 2014; 19(10): 15391-407.
11. Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, Hilbig A, Wild C, Clauss M, et al. Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants. *International Journal of Cancer* 2004; 111(3): 348-57.
12. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, et al. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Research* 1999; 59(20): 5209-18.
13. Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(1): 397-405.
14. Iyer S, Darley PI, Acharya KR. Structural insights into the binding of VEGF-B by VEGFR-1D2: Recognition and specificity. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(31): 23779-789.
15. Brozzo MS, Bjelić S, Kisko K, Schleier T, Leppänen VM, Alitalo K, et al. Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood* 2012; 119(7): 1781-88.
16. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2): 277-85.
17. Goncalves V, Gautier B, Garbay C, Vidal M, Inguibert N. Structure-based design of a bicyclic peptide antagonist of the vascular endothelial growth factor receptors. *Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society* 2008; 14(6): 767-72.
18. Wang L, Zhou L, Reille-Seroussi M, Gagey-Eilstein N, Broussy S, Zhang T, et al. Identification of peptidic antagonists of vascular endothelial growth factor receptor 1 by scanning the binding epitopes of its ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 60(15): 6598-606.
19. Bae DG, Kim TD, Li G, Yoon WH, Chae CB. Anti-Flt peptide, a vascular endothelial growth factor receptor 1-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(7): 2651-661.

The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Peptide (VGB4) on Breast Tumor Growth Suppression *in Vivo*

Farzaneh Behelgard M¹, Zahri S¹, Mashayekhi F², Asghari SM^{2*}

¹Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, ²Department of Biology, University of Guilan, Guilan, Iran

Received: 25 Dec 2018 Accepted: 22 Oct 2018

Abstract

Background & aim: The vascular endothelial growth factor of the tumor, which binds to its receptors at the level of endothelial cells, plays an important role in vascular permeability and tumor angiogenesis. In the present study, a vascular endothelial cell growth factor antagonist peptide (VEGF) was designed with the goal of inhibiting the desired peptide (VGB4) interfering with endothelial growth factor receptors in its receptors, thereby inhibiting the signaling pathways angiogenesis.

Methods: In the present experimental study, 42 female Balb / C mice (4 to 6 weeks old) with an average weight of 20 grams were used. Tissue cell line 4T1 was used to model breast cancer. It turned out after subcutaneous transplantation of mammary tumors in animals, daily intraperitoneal injection of different doses of VGB4 peptide (10, 5, 2.5, 1, 0.25 mg / kg) for 14 days, and the antitumor potential of different peptide concentrations during the injection period compared to the control was statistically analyzed. Data were analyzed by ANOVA and Duncan tests.

Results: Increasing the doses of peptide reduced the tumor growth in treated groups, but no significant inhibitory effect was seen on tumor growth by increasing the dose from 5 mg / kg to 10 mg / kg. Therefore, the dose of 5 mg / kg is the best anti-tumor dose of the VGB4 peptide.

Conclusion: VGB4 peptide had a significant inhibitory effect on the growth of breast cancer carcinoma of the 4T1 cell line. Due to the effects of VIT4 antitumor, it may be possible to use this peptide for cancer treatment in the future.

Key words: Angiogenesis, Peptide, Vascular Endothelial Growth Factor, Breast Cancer

Corresponding author: **Asghari SM**, Department of Biology, University of Guilan, Guilan, Iran

Email: sm_asghari@guilan.ac.ir

Please cite this article as follows:

Farzaneh Behelgard M, Zahri S, Mashayekhi F, Asghari SM. The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Peptide (VGB4) on Breast Tumor Growth Suppression *in Vivo*. Armaghane-danesh 2019; 23(6): 683-693