ORIGINAL ARTICLE

Effect of Deacetyl chitin on VEGF Gene Expression in Metastatic Breast Cancer Model

Neda Soleimani[1],
Baharak Farhangi[2],
Seyyed Masoud Hosseini[3]

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[2] MSc in Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Received February 11, 2017 Accepted May 29, 2017)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer is one of the leading causes of death in women around the world. Conventional treatments use cytotoxic drugs which have high levels of side effects. Today, researchers are more interested in developing novel drugs that have lower side effects and maximum efficiency. Deacetylchitin is a biodegradable and biocompatible polymer. The goal of this research was to evaluate the effect of Deacetylchitin on VEGF gene expression in metastatic breast cancer model.

Materials and methods: In this study, Deacetyl chitin nanoparticle was synthesized. The size and zeta potential of nanoparticle was determined. Mouse models of breast cancer were treated by Deacetyl chitin. Expression of VEGF genes was evaluated using real time PCR.

Results: Deacetyl chitin nanoparticle size was 210 nm. Statistical analysis showed that Deacetyl chitin reduced the expression of VEGF gene ($P<0.05$) compared with that in the control group.

Conclusion: Deacetyl chitin reduced the expression of metastatic genes on mouse models of breast cancer, therefore, it could be suggested as a new tool for future therapeutic strategies aimed in cancer therapy.

Keywords: Deacetyl chitin, breast cancer, metastasis, VEGF gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (152): 1- 11 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 152 شهریور سال 1396 (11 -1)

ارزیابی اثر نانوذرات داستیل کیتین بر میزان بیان ژن VEGF در مدل متاستاتیک سرطان سینه

ندا سلیمانی[1]
بهارک فرهنگی[2]
سید مسعود حسینی[3]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان سینه از علل عمده مرگ و میر زنان در سراسر جهان می‌باشد. درمان‌های دارویی متعارف با استفاده از داروهای سیتوتوکسیک دارای سطح بالایی از عوارض جانبی برای بیمار است. امروزه محققین به‌دنبال درمان جایگزین با اثرات جانبی کم و حداکثر بهره‌وری می‌باشند. داستیل کیتین پلیمرکربوهیدراتی است که به‌عنوان یک ترکیب زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ارزیابی اثر نانوذرات داستیل کیتین بر میزان بیان ژن VEGF در مدل متاستاتیک سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نانوذرات داستیل کیتین سنتز شد. سایز و بار و مورفولوژی آن تعیین گردید. مدل موش‌های توموری سرطان سینه با داستیل کیتین تیمار شدند. بیان ژن VEGF با روش real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: اندازه داستیل کیتین به‌طور میانگین 210 نانومتر تعیین شد. آنالیز آماری با ($P<0.05$) نشان داد که داستیل کیتین موجب کاهش بیان ژن VEGF در مقایسه با گروه کنترل می‌شود.

استنتاج: داستیل کیتین بر بیان ژن‌های متاستاتیک در مدل موش‌های توموری سرطان سینه در مطالعات حیوانی اثر کاهشی دارد. این ترکیب ممکن است به‌عنوان یک ابزار جدید برای راهکارهای درمانی برای درمان سرطان در آینده مطرح باشد.

واژه های کلیدی: داستیل کیتین، سرطان سینه، متاستاز، ژن VEGF.

مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان است که آمار قابل توجهی را در این جنس به خود اختصاص می‌دهد. علی رغم پیشرفت‌های چشمگیر در تشخیص و درمان سرطان پستان، مرگ و میر در نتیجه متاستاز سرطان پستان در زنان مبتلا، با وجود انجام جراحی و درمان‌های لازم، به‌عنوان معضل پزشکی هم‌چنان باقی مانده است(1). امروزه پیشرفت سرطان بقاء بیمار را به خطر می‌اندازد و استراتژی‌های درمانی را با شکست مواجه می‌کند. در روند متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت مجاور، ابتدا این سلول‌ها به‌داخل بافت پایه (Basement membrane) نفوذ کرده و سد ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix) را از بین می‌برند. در این مرحله آنزیم‌های پروتئاز دارای نقش بسیار مهمی بوده که با هضم ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات آن، باعث تسهیل تهاجم سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر می‌شوند(2). تاکنون به‌خوبی روشن شده

مولف مسئول: ندا سلیمانی - تهران، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران Email: N_soleimani@sbu.ac.ir
1. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم وفناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
2. کارشناسی ارشد، ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم وفناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1395/11/23 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1395/11/25 تاریخ تصویب : 1396/3/8

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

است که سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های سالم میزان پروتئاز بیش‌تری تولید می‌کنندو ارتباط مثبت بین میزان تهاجم سلول‌ها و سطح پروتئاز آن‌ها هم در مدل‌های تومور آزمایشگاهی و هم در تومورهای بالینی انسانی ثابت شده است(2، 5). ژن VEGF با موقعیت سیتوژنتیکی p21.16 در ژنوم انسانی، دارای 8 اگزون نقش مهمی را در گسترش تومور به خود اختصاص داده است. اگزون 1 این ژن، مسئول سیگنال بخش ترشحی پروتئین بوده و ناحیه کدکننده اصلی، در اگزون 8-2 قرار دارد. محصول این ژن پروتئین VEGF بوده که یک فاکتور رشد اندوتلیال عروقی می‌باشد. این پروتئین توسط سلول‌های محرک رگ‌زایی تولید می‌شود. این پروتئین بخشی از سیستمی می‌باشد که در زمانی‌که گردش خون کافی نباشد اکسیژن را در بافت‌ها بازیابی می‌کند(6). سرطان‌هایی که قادر به بیان ژن VEGFهستند، توانایی رشد داشته و متاستاز می‌یابند(7). چنان‌چه ترکیبی بتواند سبب کاهش تولید پروتئین‌های دخیل در متاستاز و مهار تهاجم سلول‌های سرطانی به بافت مجاور شود، می‌تواند به‌عنوان راه‌گشایی برای جلوگیری از پیشرفت این بیماری صعب‌العلاج مطرح باشد. داستیل کیتین، یک آمینو پلی‌ساکارید خطی ترکیبی از واحدهای D-گلوکزآمین و N-استیل -D-گلوکزآمین (4→1) می‌باشد. این پلی‌ساکارید کاتیونی به‌دلیل در دسترس بودن، چسبندگی بی‌نظیر، خواص دارویی مناسب و دیگرخواص سودمند بیولوژیکی، مورد توجه گسترده قرارگرفته است(8). خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی داستیل کیتین به شدت توسط وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون، تحت تاثیر قرار می‌گیرد. اصلاح شیمیایی داستیل کیتین آب دوستی آنها را آشکار می‌کند که خصوصیت مهمی برای تشکیل نانوذرات خود تجمع است و به‌طور ذاتی برای کاربردهای دارو رسانی مناسب است. یافته‌های متعددی در این زمینه وجود دارد که هر یک اهمیت و نقش این پلیمر را واضح‌تر می‌نماید. فریرا و همکارانش (2013) از درمان ترکیبی فوتودینامیک و الکتروشیمی درمانی همراه با نانوذرات داستیل کیتین به‌عنوان حامل برای درمان ملانوما استفاده نمودند(9). برونچو و همکاران (2014) از نانوذرات داستیل کیتین -آلژینات به‌عنوان حامل دارو جهت درمان سرطان استفاده کردند(10). در دهه‌ی اخیر شاهد ظهور امیدبخش فناوری نانو و بیوتکنولوژی در سیستم‌های درمانی سرطان همچون انتقال دارو با خواص ضد توموری و فعال‌سازی سیستم ایمنی جهت درمان و پیشگیری هستیم. فناوری نانو با ابزارهای چند عملکردی و خواص گوناگون در مقیاس نانو و امکان دست‌ورزی در جهت هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی در راستای درمان مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر نانوذرات داستیل کیتین بر میزان بیان ژن VEGF در مدل متاستاتیک سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روش ها

تهیه نانوذرات پلیمری داستیل کیتین به روش ionic gelation

به منظور بررسی اثر داستیل کیتین با وزن مولکولی پایین (low molecular weith) تهیه شده از شرکت سیگما استفاده شد. در ابتدا این ترکیب دپلیمریزه گردید) .روش مورد استفاده، روش Huang و همکاران بود که از نیتریت سدیم برای این منظور استفاده شد (. ابتدا 2 گرم داستیل کیتین با وزن مولکولی400 kDa ، در 100 میلی لیتر محلول اسید استیک 6 درصد حل شد. برای به‌دست آوردن داستیل کیتین دپلیمریزه با وزن مولکولی پایین، مقدار 7 mg/ml سدیم نیتریت در 10 میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شد و به محلول فوق اضافه شد. این محلول برای یک ساعت در دمای اتاق به هم زده شد سپس با اضافه کردن سود 4 مولار تا رسیدن به pH= 9داستیل کیتین رسوب داده شد. رسوب حاصله بر روی قیف بوخنر فیلتر شد و سه بار با استون خالص شستشو داده شد. توده‌ی خشک شده در حداقل اسید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

استیک 0/1مولار 40 میلی‌لیتر حل شد و محلول دو بار و هر بار به‌مدت 90 دقیقه و به‌مدت یک شب تا صبح در حجم یک لیتر آب دیونیزه دیالیز شد. سپس محلول دیالیز شده فریز شد و تحت شرایط خلا در دمای 30 – درجه‌ی سانتیگراد و فشار0/01میلی بار لیوفیلیزه شد(19).

نانوذرات داستیل کیتین به‌روش ژل شدن یونی، تهیه شدند. در این روش از Tripolyphosphate (TPP) به‌عنوان اتصال‌دهنده متقاطع استفاده گردید. به‌طور جداگانه محلول مائی TPP با غلظت‌های 0/2، 0/4، 0/6، 0/8، 1، 1/2 و 1/4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. TPPدر محیط مائی دارای پنج گروه اکسیژن با بار منفی است. پس از انجام آزمایشات مکرر، غلظت و حجم بهینه از TPP و داستیل کیتین جهت شکل‌گیری نانوذرات به‌دست آمد TPP .به محلول داستیل کیتین اضافه شد. به محض افزودن محلول TPP به محلول داستیل کیتین در اسید استیک، گروه‌های دارای بار منفی با گروه‌های آمین موجود در داستیل کیتین که دارای بار مثبت هستند واکنش الکترواستاتیک ایجاد می‌کنند که منجر به ژل شدن و رسوب داستیل کیتین در محیط واکنش می‌شوند. نمونه‌های حاصله از نظر ظاهری در سه وضعیت محلول شفاف، سوسپانسیون با کدورت شیری رنگ و نمونه‌های توده‌ای شده، مشاهده شد. نمونه‌های کدر به عنوان نانوذره تلقی شدند. به‌منظور تعیین خصوصیت نانوذرات، از نمونه‌های تازه تهیه شده استفاده شد(19).

تعیین سایز و بار الکتریکی نانوذرات

DLS (Dynamic light scattering)دستگاهی است که با استفاده از تابش نور مرئی با طول موج 633 نانومتر به نمونه سوسپانسیون، می‌تواند برخی از خواص آن را از قبیل وزن مولکولی و توزیع اندازه ذرات در ابعاد نانو اندازه‌گیری کند. به‌منظور تعیین بار الکتریکی، پراکندگی و یکنواختی نانو ذرات داستیل کیتین از دستگاه ZETA SIZER (Malvern) استفاده شد(11).

میکروسکوپ الکترونی SEM

میکروسکوپ الکترونی روبشی که به آن Scanning Electron Microscopeیا به اختصار SEMگویند. مبنای عملکرد این میکروسکوپ، برهم کنش پرتوی الکترونی با ماده است. پرتوهای ساطع شده از این برهم‌کنش می‌تواند جهت بررسی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. به‌منظور تعیین شکل، اندازه، از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد(19).

مدل موش حیوانی و شرایط نگهداری موش توموری

از موش‌های 6-7 هفته‌ای ماده خالص نژاد بالبسی با وزن 19-90/23 گرم (انستیتوپاستور، ایران) استفاده شد. موش‌ها در دمای 24 درجهٔ سانتیگراد، نور (12 ساعت روشنایی، 12 ساعت تاریکی) و رطوبت مناسب با آب و غذای کافی نگهداری شدند. آنها در 2 گروه 6 تایی تست و کنترل دسته‌بندی شدند(12).

القاء سرطان پستان

رده موشی متاستاتیک سرطانی سینه 1t4 از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. محل تزریق با پنبه و الکل ضد عفونی شد. در روز صفر، تزریق سلول سرطانی به تعداد 7,105 از رده موشی متاستاتیک سرطانی سینه 1t4 به صورت زیر جلدی به تمام موش‌ها انجام گرفت(21). محل تزریق مجاور پایین‌ترین غدهٔ پستانی سمت چپ در نظر گرفته شد. از روز پانزدهم تزریق (نمایان شدن تومور) به مدت دو هفته به فواصل زمانی مشخص داستیل کیتین با غلظت 50 میکروگرم در میلی لیتر به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. به عنوان گروه6 کنترل از موش‌های توموری بدون درمان، با شرایط مشابه استفاده گردید(22).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

بررسی تغییرات بیان ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR

استخراج RNA

ابتدا بافت توموری در هاون استریل در حضور ازت مایع کاملا خرد شد. یک میلی‌لیتر محلول ترایزول به ازای هر قطعه تومور افزوده شد و به آرامی چندین بار پیپتاژ شد تا سلول‌ها در ترایزول حل شوند. به محلول یکنواخت حاوی سلول‌ها و ترایزول، 200 میکرولیتر کلروفورم (به ازای یک میلی لیتر تریزول) افزوده شد و تیوب به مدت 15 ثانیه ورتکس شد. تیوب به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت 15 دقیقه تیوب در دمای 4 درجه سانتیگراد با دور 12000g سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ 3 فاز تشکیل شد. فاز روئی حاوی RNA و در زیر، DNA، پروتئین و اجزای سلول و تریزول قرار داشت. فاز رویی به آرامی جدا و به تیوب‌های فاقد RNase منتقل شد. به محلول به‌دست آمده از مرحله قبل به مقدار هم حجم ایزوپروپانول افزوده شد. مخلوط فوق 30 دقیقه در دمای 20- درجه سانتیگراد قرار داده شد. به مدت 15 دقیقه تیوب در دمای 4درجه سانتیگراد با دور 1200g سانتریفیوژ شد. مایع روئی جدا و به رسوب داخل تیوب، یک میلی‌لیتر اتانول 75 درصد افزوده شد. مایع رویی خارج و تیوب در دمای محیط قرار داده شد تا اتانول موجود در رسوب تبخیر شود. سپس غلظت و خلوص RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد(20).

بررسی کمی و کیفی RNA ی استخراج شده

پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با روش های UVاسپکتروفتومتری با استفاده از جذب نوری در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز جهت حضور باندهای RNA ریبوزومی S18 و S28 نشان دهنده‌ی سالم و دست نخورده بودن RNA بررسی شد.

سنتز cDNA از RNA های استخراج شده

سنتز cDNA که به‌وسیله آنزیم نسخه بردار معکوس انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت (Takara Bio) PrimeScript™ RT reagent استفاده شد. کلیه مراحل با وسایل و محلول‌های عاری ازRNase انجام شد. هم‌چنین به منظور ساخت cDNA هایی با غلظت یکسان، در مورد هر نمونه با توجه به غلظت RNA حجمی را برداشته که در آن به میزان 1000 نانوگرم RNA موجود بود و با آب و Master Mixحجم نهایی به 10ml رسید.

جدول شماره 1: تهیه Master Mix برای یک واکنش سنتز cDNA

Reagent	Amount	Final concentration
5X PrimeScript™ Buffer	2 lμ	1X
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5 μl	-
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)	0.5 μl	50 pmol
total RNA	500 ng	-
RNase Free dH2O	Variable	-
Total	10 μl	-

طراحی پرایمرها

به منظور تکثیر هر قطعه ژنی، یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن انتخاب شد که شامل پرایمر رفت و برگشت بود. طراحی پرایمرها توسط نرم افزارهای Oligo، Allel ID و Perl Primer صورت گرفت.

جدول شماره 2: توالی و طول قطعه حاصل از پرایمرهای مرحله Real Time-PCR

نام ژن	ترادف (۵ به ۳)	طول محصول PCR
VEGFA	F 5'AGGCTGCTGTAACGATGAAG3' R 5'GTGCTGGCTTTGGTGAGG3'	197
GAPDH	F5'CCCACTCCTCCACCTTTGAC3' R5'CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA3'	270

واکنش Real-time PCR

از روش مبتنی بر استفاده از رنگ فلورسنس SYBR GreenI در تحقیق حاضر استفاده شد. انجام واکنش real-time PCRدر دستگاه Applied 7500

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Biosystems صورت گرفت. در این تحقیق از 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (ROX) ساخت شرکت Solis BioDyne استفاده شد.

جدول شماره 3: برنامه Real-time PCR

مراحل PCR	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد سیکل
Pre denaturation	95	15 دقیقه	1
Denaturation	95	5 ثانیه	40
Annealing	63		
Extention	72	34 ثانیه	

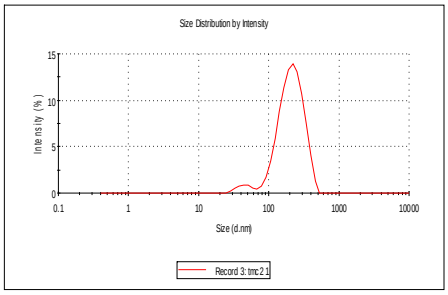
آنالیز آماری:

این مطالعه یک مطالعه ار نوع مداخله‌ای (interventional) می‌باشد. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار±میانگین گزارش شد و آنالیز آماری داده‌های آزمون با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون توکی (Tukey) بررسی گردید. نتایج با نرم افزار SPSS و Prism6 بررسی و P≤0/001 به صورت معنی‌دار تفسیر گردید.

یافته ها

سایز نانوذرات:

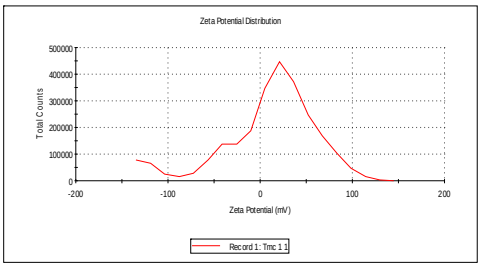
سایز نانوذرات، پراکندگی و یکنواختی نانو ذرات داستیل کیتین، توسط دستگاه DLS (Malvern) تعیین شد. شکل 1 سایز نانوذرات داستیل کیتین در pH برابر 6 را نشان می‌دهد که سایز نانوذرات داستیل کیتین بطور میانگین با سه تکرار 210 نانومتر تعیین شد. داده‌های دستگاه DLSدر مورد این نمونه نشان داد که بیش از 95 درصد از نمونه‌های مورد آزمایش در محدوده سایزی 210 نانومتر و پیک بزرگتر قرار دارند و حدود 5 درصد از بقیه در محدوده 20 تا 70 نانومتر و بطور میانگین 45 نانومتر است.



شکل شماره 1: سایز نانوذرات داستیل کیتین با دستگاه DLS بر اساس نانومتر

بار الکتریکی:

بار الکتریکی، پراکندگی و یکنواختی نانو ذرات داستیل کیتین توسط دستگاه ZETA SIZER (Malvern) تعیین شد. شکل 2 بار الکتریکی نانوذرات داستیل کیتین در pH برابر 6 را نشان می‌دهد که بار الکتریکی نانوذرات داستیل کیتین بطور میانگین با سه تکرار 11+ میلی ولت تعیین شد. داده‌های دستگاه DLS نشان داد که در بین نمونه‌ها هومولوژی وجود دارد.

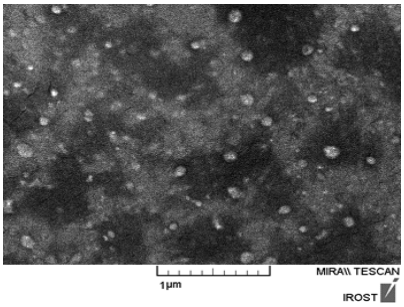


شکل شماره 2: بار الکتریکی نانوذرات داستیل کیتین با دستگاه ZETA SIZER بر اساس میلی ولت

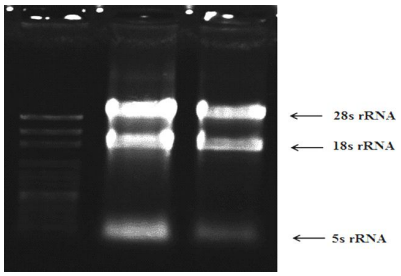
میکروسکوپ الکترونی: SEM

برهم‌کنش پرتوی الکترونی با ماده سبب نمایان شدن شکل ظاهری نانوذرات می‌شود. پرتوهای ساطع شده از این برهم‌کنش جهت بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. شکل 3 تصویر نانوذرات متیل داستیل کیتین با میکروسکوپ SEM را نشان می‌دهد.

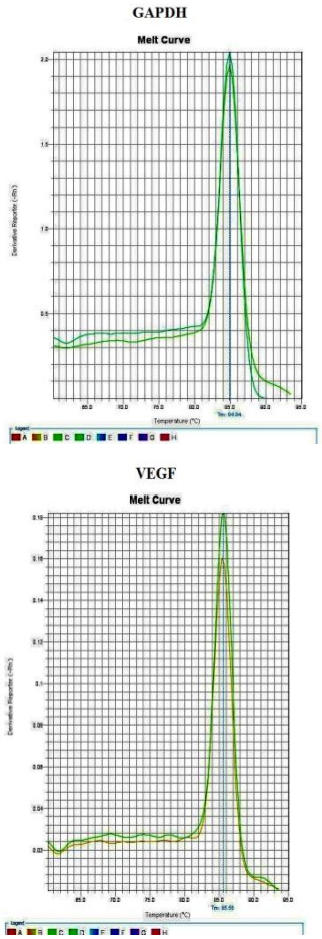
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]



شکل شماره 3: تصویر نانوذرات متیل داستیل کیتین با میکروسکوپ SEM



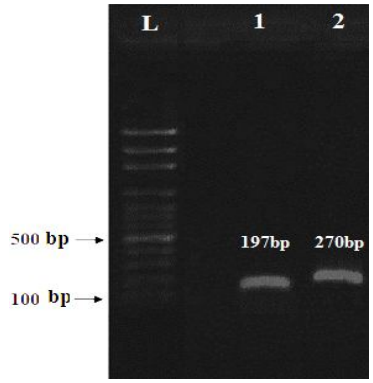
شکل شماره 4: بررسی کیفیت RNA تام خالص شده بر روی ژل آگارز 1 درصد.



شکل شماره 5: منحنی ذوب قطعات تکثیر شده توسط Real-Time PCR

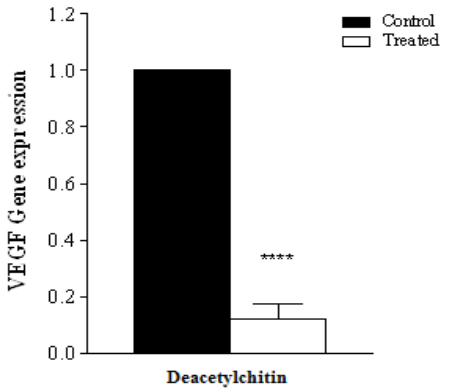
RNA استخراج و بررسی کیفیت RNA تام خالص شده بر روی ژل آگارز 1 درصد صورت گرفت که در شکل 4 قابل مشاهده می‌باشد. مطالعه بیان ژن‌ها انجام شد (شکل 5). محصولات واکنش روی ژل 1/5 درصد مورد بررسی قرار گرفتند؛ عدم حضور باند اضافی و صحت اندازه باند تکثیر شده مربوط به هر ژن که با اندازه ژن مطابقت داشت، نشان‌دهنده اختصاصی بودن تکثیر پرایمرها می‌باشد (شکل 6).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]



شکل شماره 6: الکتروفورز روی ژل آگارز محصولات Real-Time PCR. تک باند بودن محصول PCR و صحت اندازه قطعه تکثیر شده تایید گردید. L. مارکر 100 bp ، ستون 1: ژن VEGF، ستون 2: ژن GAPDH.

پس از تیمار موش‌های توموری با گروه‌درمانی مورد مطالعه، تغییرات بیان ژن VEGF با استفاده از تکنیک Real Time-PCR بررسی گردید. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. در نمودار 1 میزان بیان ژن¬ VEGF در موش‌های توموری در حالت تیمار نانوذرات داستیل کیتین نشان داده شده است. برای رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، اولین مرحله رگ‌زایی است. VEGF[1] فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است. نتایج آزمون Real time PCR کاهش بیان ژن VEGF را در اثر تیمار موش توموری با نانوذرات دی استیل کیتین، در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. آنالیز آماری ($p<0.001$) کاهش بیان ژن VEGF در گروه تست را معنادار نشان داد.



نمودار شماره 1: بررسی میزان بیان ژن¬ VEGF در موش های توموری در حالت تیمار نانوذرات داستیل کیتین.

بحث

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor) (VEGF)عاملی مهم در رگ‌زایی تومور است. سلول‌های تومور در مقایسه با سلول‌های عادی بدن در معرض تنش اکسیداتیو بالاتری هستند. مطالعات انجام شده نشان داده است که نحوه بیان VEGF به مقدار بالایی به میزان پتانسیل اکسایش – کاهش (ORP) بین سلولی وابسته است. موسوی و همکاران در سال 1392 اثرات عصاره زعفران را بر بیان ژن VEGF-Aدر شرایط آزمایشگاهی بر روی رده سلولی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بررسی‌های آنان کاهش معنادار در میزان بیان ژن VEGF-A تیمارشده با غلظت‌های 100، 200، 400 و 800 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران را نسبت به سلول‌های گروه کنترل نشان داد به نحوی که بیش‌ترین تغییرات کاهشی بیان ژن مربوط به بیش‌ترین غلظت عصاره زعفران بود(13). فرانسسکو و همکاران در سال 2013 با مطالعه مسیر سیگنالینگ HIF-1α/GPER رگ‌زایی و هیپوکسی وابسته به آنژیوژنز را در ارتباط با ژن VEGF مورد بررسی قرار دادند(14). تسوبویی در سال 2014 یک جز از گیاه زنجبیل را بر روی بیان ژن VEGF مورد ارزیابی قرار داد. نتایج آنان حاکی از آن بود که این بخش از گیاه، سبب کاهش بیان ژن VEGF در

[1] vascular endothelial growth factor

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

سلول‌های سرطانی معده AGS می‌شود(15). در این مطالعه داستیل کیتین موجب کاهش بیان ژن VEGF در مقایسه با گروه کنترل در مدل حیوانی سرطان سینه شد. تاکنون هیچ پژوهشی در مورد اثرات نانوذرات داستیل کیتین بر بیان ژن VEGF در مدل حیوانی جهت درمان سرطان مشاهده نشده و نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این نانوذرات در مقایسه با گروه کنترل موجب کاهش بیان ژن VEGF در مدل موشی شده و گویای این مطلب است که نانوذرات داستیل کیتین می‌توانند به‌عنوان یک فاکتور موثر موجب جلوگیری از متاستاز سلول‌های سرطانی در مدل متاستاتیک سلول‌های سرطانی سینه در موش گردد. یافته‌های دیگر اثرات سیتوتوکسیک داستیل کیتین را بر سلول‌های سرطانی مثانه نشان داد هر چند دوز بکار رفته برای LD50 کم‌تر بود(16). در مطالعه دیگر اثر توکسیسیتی داستیل کیتین را در غلظت 50 میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی سلول‌های معده این موضوع را تایید کرد(17).Potdar و همکاران در سال 2016 نشان دادند که نانوذرات کیتوزان می‌توانند مانع از رخداد متاستاز در سلول‌های سرطانی مری شوند(23). Solomonو همکاران در سال 2013 در طی یک بررسی نشان دادند که اثرات مهاری دارو به همراه نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با زمانی که دارو به تنهایی به کار می‌رود بیش‌تر است(24). در سال 2014 نتایج تحقیق Wimardhani و همکاران نشان داد که کیتوزان اثرات ضد سرطانی و القا کنندگی آپوپتوز بر سلول‌های سرطانی دستگاه گوارش دارد(25).

با توجه به مطالعات موجود هیچ مطالعه ای در مورد اثرات نانوذرات داستیل کیتین بر بیان ژن VEGF در مدل حیوانی جهت درمان سرطان انجام نشده و این مطالعه برای اولین بار در دنیا صورت گرفته است. با توجه به منابع موجود، داستیل کیتین موجب القای مرگ سلولی شده و با پدیده آپوپتوزیز سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. این ترکیب موجب کاهش بیان ژن‌هایی می‌گردد که در آنژیوژنز دخالت دارند و از گسترش این سلول‌ها در سراسر بدن جلوگیری می‌کند. این ترکیب با پتانسیل کاهش بیان ژن VEGF که بیومارکر ویژه آنژیوژنز می‌باشد می‌تواند به‌همراه یک داروی ضد سرطان درحذف سلول‌های سرطانی موثر واقع شود. با توجه به خواص موجود، این نانوذرات می‌توانند ابزار مناسب و موثری جهت کاربردهای ایمنی درمانی برای درمان سرطان در آینده باشند(18، 19). این مطالعه گشایشی برای ایده مذکور جهت درمان سرطان با استفاده از خاصیت ضد رگ‌زایی و ایمنومودولاتوری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله، از همکاری بی دریغ آزمایشگاه‌های دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر را دارد.

References

1. Uria JA, Stahle- Bachdahi M, Seiki M, Fueyo A, Lopez-otin C. Regulation of collagenase– 3 Expression in human breast carcinoma is mediated by stromal epithelial cell intractions. Cancer Research 1997; 57(21): 4882-4888.
2. Martinella-Catusse C, Polette M, Noel A, Gilles C, Dehan P, Munaut C, et al. Down-regulation of MT1-MMP expression by the alpha 3 chain of type IV collagen inhibits bronchial tumor cell line invasion. Lab Invest. 2001;81(2):167-175.
3. Gruss C, Herlyn M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. Curr Opin Oncol. 2001;13(2):117-123.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

4. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(12): 932-943.
5. Diamandis EP, Yousef GM. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. Clin Chem. 2002; 48(8): 1198-1205.
6. Hendrix MJC, Seftor EA, Seftor R. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. New Frontiers in Angiogenesis. Dorecht: Springer, 2006 . 97-109.
7. Breier G. Vasculogenesis. In: Unsicker K, Kriegistein K. Cell signaling and growth factors in development. Weinheim: Willey & Wang, 2006. 909-17.
8. Jarmila V, Vavríková E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review. Curr Pharm Des. 2011;17(32):3596-3607.
9. Ferreira DM, Saga YY, Aluicio-Sarduy E, Tedesco AC. Chitosan nanoparticles for melanoma cancer treatment by Photodynamic Therapy and electrochemotherapy using aminolevulinic acid derivatives. Curr Med Chem. 2013; 20(14):1904-1911.
10. Bhunchu S, Rojsitthisak P. Biopolymeric alginate-chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. Pharmazie. 2014; 69(8):563-570.
11. Soleimani N, Mobarez AM, Olia MSJ, Atyabi F. Synthesis, Characterization and Effect of the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles on Vancomycin-Resistant Enterococcus and Other Gram Negative or Gram Positive Bacteria. Int J Pure Appl Sci Technol. 2015; 26 (1): 14-23.
12. Mirpour Sh, Piroozmand S, Soleimani N, Faharani N J, Ghomi H, Eskandari HF, et al. Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application. Sci Rep. 2016; 6 (29048): 1-10.
13. Mousavi M, Javad Baharara, Khadijeh Shahrokhabadi, Saeedeh Balanejad. Effect of saffron extract on vegf-a expression in mcf7 cell line. Journal of kermanshah university of Medical Sciences. 2014; 17 (12): 739-846.(persian).
14. De Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, Marsico S, Caruso A, Maggiolini M. HIF-1α/GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). Breast Cancer Res. 2013; 15(4): R64.
15. Tsuboi K1, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, et al. Zerumbone inhibits tumor angiogenesis via NF-κB in gastric cancer. Oncol Rep. 2014; 31(1):57-64.
16. Hasegawa M, Yagi K, Iwakawa S, Hirai M. Chitosan Induces Apoptosis via Caspase-3 Activation in Bladder Tumor Cells. Jpn J Cancer Res. 2001; 92(4): 459– 466.
17. Qi Li, Xu Zi, Li Y, Jiang Xi, Han Xi. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. World J Gastroenterol. 2005; 11(33):5136-5141.
18. Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, et al. The neutrophil- activating protein

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

(HP-NAP) of Helicobacter pylori is a protective antigen and a major virulence factor. J Exp Med. 2000; 191(9): 1467–1476.

19. Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghighi MA. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014. 23 (2): 134-44.(persian).
20. Yousefpour P, Atyabi F, Dinarvand R, Vasheghani-Farahani E. Preparation and comparison of chitosan nanoparticles with different degrees of glutathione thiolation. Daru. 2011; 19(5): 367-75.
21. Soleimani N, Farhangi B, ashraf Mohabati mobarez, Fatemeh Etyabi.VEGF and MMP-9 Gene Expression Caused by Treatment with Helicobacter Pylori Neutrophil-activating Recombinant Protein in a Breast Cancer Model. J Babol Univ Med Sci. 2015: 17 (3), 13-19 (persian).
22. Van Slambrouck S, Daniels AL, Hooten CJ, Brock SL, Jenkins AR, Ogasawara MA, et al. Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells. Oncol Rep. 2007; 17(6):1487-1492.
23. Soleimani N, Tavakoli-Yaraki M, Farhangi B. Preparation and Evaluation indirect anticancer activity of D-glucosamine Nanoparticles on Metastatic cancer Model in vivo. Nanomed Res J. 2016: 1 (1), 53-58.
24. Potdar PD, Shetti AU. Evaluation of antimetastatic effect of chitosan nanoparticles on esophageal cancer associated fibroblasts. J Cancer Metasta Treat . 016; 2:259-267.
25. Solomon W Leung, Wenjuan Guo, Tae Hwan Park, James CK Lai. Effect of Chitosan and Nanoparticles on Cancer Cells Treated with Therapeutic Drugs: Comparison of Cell Survival, advance in nano biomechanics robot and energy research, 2013, the world congress.
26. Wimardhani YS, Suniarti DF, Freisleben HJ, Wanandi SI, Siregar, NC, Ikeda MA. Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells. J Oral Sci. 2014; 56(2): 119-126.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]