

## مقایسه تاثیر Substance P هموسیستئینه و طبیعی بر رشد سلول‌های PC12 در حضور سیستئین

سمیرا داودمنش M.Sc.، محمد جعفر محمدیان Ph.D.\*

– دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mohama\_j@mut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۱

### چکیده

**هدف:** در این مطالعه تاثیر Substance P هموسیستئینه در حضور سیستئین بر میزان رشد سلول‌های سرطانی PC12 بررسی و نتایج با نوع طبیعی آن مقایسه شد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌ها در محیط کشت RPMI-Glutamax حاوی FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند و فعالیت متابولیکی آن‌ها در حضور غلظت‌های مختلف پپتید و سیستئین با استفاده از تست MTT ارزیابی شد. سپس تغییرات ریخت شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ تمایز فازی مطالعه شد. به منظور بررسی تاثیر حفاظتی پپتید هموسیستئینه در برابر  $H_2O_2$ ، سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در حضور  $H_2O_2$  با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شد و میزان تولید نیتریک اکسید آن‌ها به روش رنگ سنجی گریس مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان می‌دهد که هر دو نوع Substance p، در همه غلظت‌های انتخابی موجب افزایش رشد سلول‌ها و کاهش میزان NO در برابر سمیت  $H_2O_2$  شده است. به ویژه در غلظت ۶ تا ۱۰ مولار میزان رشد در حضور پپتید هموسیستئینه و طبیعی به ترتیب ۷۸/۶۵ درصد و ۳۸/۵۵ درصد افزایش داشته است که نشان می‌دهد نوع هموسیستئینه ۴۰/۱ درصد بیشتر از نوع طبیعی منجر به افزایش رشد شده است و میزان NO به ترتیب ۳۶ درصد و ۱۴ درصد کاهش داشته است. بنابراین Substance P هموسیستئینه توانسته ۲۲ درصد بیشتر از نوع طبیعی سلول‌های سرطانی PC12 را در برابر سمیت پراکسید هیدروژن محافظت کند.

**نتیجه‌گیری:** SP-H در شرایط پاتولوژیک می‌تواند از طریق کاهش تولید نیتریک اکسید باعث افزایش رشد سلول‌های سرطانی شده و روند پیشرفت بیماری را تسریع بخشد.

**واژگان کلیدی:** سلول سرطانی، سلول‌های PC12، هموسیستئین، Substance P

## مقدمه

در حال حاضر سرطان پس از بیماری‌های قلبی-عروقی دومین عامل مرگ و میر در کشورهای پیشرفته می‌باشد (۱، ۲). عوامل مختلفی در افزایش رشد سلول‌های سرطانی دخیل هستند که شناسایی آن‌ها می‌تواند در جهت کنترل و ممانعت از پیشرفت بیماری موثر بوده و محققین را در راستای کشف اقدامات پیشگیرانه یاری دهد. پپتید Substance P (SP) به فرمول C63H98N18O13S یکی از اعضای خانواده‌ی نوروپپتیدهای Tachykinin است که متشکل از ۱۱ باقی‌مانده‌ی اسیدآمینهای Arg (RPKPQQFFGLM) Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met-NH<sub>2</sub> می‌باشد. SP عملکردهای فیزیولوژیکی متعددی در بدن داشته و در کنترل سیستم قلبی عروقی، انقباضات روده‌ای و کاهش فشار خون نقش دارد و همچنین با احساس درد و پاسخ‌های عصبی در ارتباط است. این پپتید توان و اختصاصیت بالایی دارد به گونه‌ای که حتی با غلظت‌های نانومولار به‌خوبی در سطح سلول‌های حاوی NK1 (Neurokinin 1) (گیرنده‌ی اختصاصی SP) جذب می‌شود (۳-۵). NK1، بین‌غشایی بوده و دارای ۴۰۷ آمینواسید، با وزن مولکولی ۵۸ کیلودالتون می‌باشد که ۷ دمین بین غشایی هیدروفوب به‌همراه ۳ لوپ خارج سلولی و ۳ لوپ داخل سلولی را تشکیل می‌دهند. لوپ‌ها جایگاه‌های عملکردی برای واکنش با G-پروتئین‌ها دارند (۳). فعال شدن NK1 توسط Substance P منجر به هیدرولیز فسفوانیزوتید هیدرولاز، تجمع کلسیم و فعال‌سازی MAPK (Phosphoinositide Hydrolysis) (۷۶) شده و می‌تواند باعث تکثیر سلول‌های توموری، رگزایی (Angiogenesis)، مهاجرت و متاستاز شود. بنابراین مسیر انتقال پیام SP / NK1، نقش مهمی در پیشرفت سرطان ایفا می‌کند به گونه‌ای که تاکنون نقش SP به‌عنوان میتوزن از طریق گیرنده NK-1 در چندین نوع از سرطان‌های انسانی شامل آستروسیتوم، ملانوم، نوروبلاستوما، گلیوم، رتینوبلاستوما و همچنین پانکراس، حنجره، روده بزرگ، کارسینوم معده، لوسمی و سرطان سینه به اثبات رسیده است. همچنین تحقیقات نشان داده‌اند در سرطان سینه انتقال پیام SP / NK1 موجب فعال‌سازی گیرنده‌های

RTK (Receptor Tyrosine Kinases) مثل EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) شده و مقاومت دارویی را افزایش می‌دهد. به‌علاوه میزان بیان این پپتید و گیرنده‌اش (NK1)، در سلول‌های توموری نسبت به نمونه‌های سالم آن‌ها و نیز برخی دیگر از بیماری‌ها مثل افسردگی افزایش پیدا می‌کند. بنابراین امروزه طراحی آنتاگونیست مناسب که مانع از اتصال Substance P به NK1 شود در درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۸-۱۲). اما با این وجود هنوز نقاط مبهم زیادی در این رابطه وجود دارد و بسیاری از مکانیسم‌ها ناشناخته هستند.

هموسیستئین (Hcy) با فرمول CO<sub>2</sub>H HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>) مشتقی از اسیدآمین‌ی سیستئین بوده که طی حذف گروه متیل، در یک فرآیند چند مرحله‌ای، از متیونین تولید می‌شود (۱۳). هایپرهموسیستئینمی یا افزایش سطح پلاسمایی هموسیستئین، که در بسیاری از جوامع شیوع دارد، نقص ژنتیکی مرتبط با متابولیسم اسیدآمین‌ی متیونین است که در برخی بیماری‌ها مثل بعضی از سرطان‌ها و افسردگی نیز دیده می‌شود. یکی از مسیرهایی که عمدتاً در اثر افزایش سطح Hcy و در اختلال هایپرهموسیستئینمی اتفاق می‌افتد، متابولیزه شدن Hcy توسط آنزیم متیونین-tRNA-سنتاز (MetRS) و ایجاد هموسیستئین تیولاکتون (tHcy) است که یک مشتق تیواستری می‌باشد (۱۴). گروه‌های ε-آمینوی زنجیره‌ی جانبی آمینواسید لیزین در ساختار پروتئین‌ها، تحت شرایط فیزیولوژیک و در حضور tHcy، و به‌دلیل فعالیت بالای باند تیواستری آن، می‌توانند به‌راحتی و به صورت غیرآنزیمی و غیراختصاصی با اتصالی آمیدی و ایجاد پیوندی ایزوپپتیدی، طی فرآیندی به نام N-هموسیستئینی شدن، هموسیستئینه شوند (۱۵). در نتیجه با افزایش سطح Substance P و هموسیستئین تیولاکتون در بدن امکان تشکیل substance p(lys-homocysteine) و بروز طبعات ناشی از آن وجود دارد. هیپوکسی (Hypoxia) شرایطی است که در آن سطح اکسیژن بافت کاهش می‌یابد و به‌عنوان شرایط پاتوفیزیولوژیک ریزمحیط اطراف تومورهای جامد شناخته می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که هیپوکسی یکی از

رده‌ی سلولی PC12 نوعی سلول سرطانی بوده که از فتوکروموسایتمای موش صحرايي جدا می‌شود. این سلول در محیط کشت رشد نموده و می‌تواند ویژگی‌های سلول‌های عصبی را نشان دهد (۲۰ و ۲۱)، همچنین دارای گیرنده‌ی اختصاصی Substance P یعنی NK1 در سطح خود می‌باشد (۲۲).

در این تحقیق، به منظور شبیه سازی ریزمحیط احیا و هیپوکسی اطراف سلول‌های سرطانی از سیستمین به عنوان یک ماده‌ی احیاء کننده در غلظتی که برای سلول‌ها سمی نیست (۲۳)، استفاده شده است و تاثیر Substance P هموسیستئینه و طبیعی در حضور سیستمین بر میزان رشد سلول‌های سرطانی PC12 بررسی شد. در ادامه تغییرات ریخت شناسی سلول PC12 تحت تاثیر هر دو نوع پپتید و میزان تولید NO در برابر سمیت پراکسید هیدروژن مورد مطالعه قرار گرفت.  $H_2O_2$  می‌تواند به DNA هسته و DNA میتوکندری هر دو آسیب رسانده، موجب افزایش بیان مولکول‌های چسبنده‌ی سلولی شده، فعالیت P53 و دیگر فاکتورهای رونویسی که باعث مرگ سلول سرطانی می‌شوند را افزایش دهد (۲۴ و ۲۵).

#### مواد و روش‌ها

سلول‌های PC12 از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. مواد مورد نیاز کشت سلولی (شامل پنی سیلین-استرپتومایسین، سرم جنین گاوی و گلوتامین) از شرکت Gibco، فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت پارس آزمون، سیستمین از شرکت Sigma و مواد مورد نیاز برای واکنش گریس (Griess Reaction) از شرکت Promega خریداری شدند.

سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Gibco) 1640 حاوی  $NaHCO_3$  و HEPES (N-2-) hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane (sulfonic acid) (۱۰ Mm) به همراه سرم جنین گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد (W/V) که سیستم کمپلمان آن با گرما غیرفعال شده، گلوتامکس (L-alanyl-L-) Glutamax (dipeptide) ۱ درصد (V/V) و آنتی بیوتیک ۱ درصد (T-25) (NUNC) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی  $CO_2$  ۵ درصد، ۹۵ درصد هوا و رطوبت کافی کشت

دلایل پیشرفت سرطان است و می‌تواند منجر به شکل‌گیری تومورهای بدخیم شود به گونه‌ای که امروزه توجه به این مسئله در درمان سرطان بسیار اهمیت پیدا کرده و اثرات آن در پاسخ به رادیوتراپی و شیمی‌درمانی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. مکانیسم مرتبط با این اثرات مربوط به فاکتور القاکننده‌ی هیپوکسی (HIF) (Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Family) (Of Transcription Factors) است که از خانواده‌ی فاکتورهای رونویسی است و در شرایط هیپوکسی حاد یا مزمن می‌تواند منجر به افزایش رونویسی ژن‌های هدف شود. این فاکتور یک عامل تنظیم کننده‌ی بسیاری از فرآیندهای مهم سلولی مثل آپوپتوزیس، تکثیر سلولی، رگزایی و متابولیسم گلوکز است. بنابراین، هیپوکسی، بی‌ثباتی ژنتیکی، تشکیل سلول‌های خونی و متابولیسم بی‌هوازی را افزایش می‌دهد. فشار خون بالا، افزایش فشار مایع بینابینی (Interstitial Fluid Pressure)، گلوکز پایین و غلظت بالای لاکتات ناشی از غلبه‌ی متابولیسم بی‌هوازی، باعث کاهش pH خارج سلولی در بافت‌های تومور (اسیدوز تومور) می‌شود (۱۶ و ۱۷).

NO درون سلولی، توسط آنزیم‌هایی که نیتریک اکسید سنتاز (NOS) (Nitric Oxide Synthase) نامیده می‌شوند تولید می‌گردد. سه فرم اصلی از این آنزیم وجود دارد. NOS عصبی (nNOS)، NOS اندوتلیال (eNOS) و NOS القایی (iNOS) که در پاسخ به محرک‌ها بیان می‌شوند. هر سه ایزوفرم در سیتوپلاسم وجود دارند. به تازگی NOS میتوکندریایی (mNOS) نیز کشف شده که منحصراً در میتوکندری وجود دارد. همه آنزیم‌های NOS به صورت همودایمر عمل می‌کنند. آن‌ها نیتریک اکسید را طی دو مرحله اکسیداسیون آمینواسید L- آرژنین به L- سیترویلین و NO، از طریق ترکیب واسط N-هیدروکسی L- آرژنین تولید می‌کنند. عملکرد NO عمدتاً از طریق چرخه‌ی وابسته به cGMP (Cyclic Guanosine Monophosphate) است و گزارش شده است که NO نیز در صورتی که به میزان کم در سلول تولید شود به عنوان یک مبدل پیام عمل کرده و بر بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تنظیم جریان خون، هوموستاز آهن و انتقال نورونی تاثیر می‌گذارد. اما در سطح بالا باعث تخریب DNA و آپوپتوزیس می‌شود (۱۸ و ۱۹).

شد. نتایج حاصل به صورت درصد مقادیر حاصل از کنترل بیان شد.

**بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها:** برای این منظور تصویر سلول‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف از پپتیدهای SP-H و SP (از غلظت  $10^{-4}$  مولار تا  $10^{-10}$  مولار) و سیستئین به میزان  $5 \times 10^{-4}$  میکرومولار تیمار شده اند، سلول‌های شاهد که فاقد پپتید می‌باشد و کنترل منفی که حاوی سلول و محیط کشت به همراه محلول تریتون X-100 (Triton-X100) ۴ درصد است توسط میکروسکوپ تمایز فازی (۲۶) (Zeiss آلمان) با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر به دست آمد. لازم به ذکر است که به دلیل زیاد بودن تعداد تصاویر حاصله از بین سلول‌هایی که با غلظت‌های مختلف پپتیدی تیمار شده بودند، یک مورد (غلظتی که در آن بیشترین تاثیر دیده می‌شود) به عنوان نمونه گزارش شد.

سنجش سمیت القا شده با  $H_2O_2$  سپس به منظور بررسی اثر حفاظتی پپتید هموسیستئینه در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن، از  $H_2O_2$  به عنوان عامل القا کننده‌ی مرگ سلولی استفاده شد تا میزان رشد سلول‌ها در حضور و عدم حضور یک عامل القا کننده‌ی مرگ سلولی نیز مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور به هر چاهک از ظروف کشت ۹۶ خانه ای حدود ۷۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت نیز با غلظت‌های مختلف از  $H_2O_2$  تیمار شدند و  $IC_{50}$  (half maximal inhibitory concentration) با استفاده از تست MTT تعیین شد.

اندازه‌گیری میزان تولید نیتریک اکسید درون سلولی. در این آزمایش جهت تعیین میزان نیتریک اکسید تولید شده در سلول، از محلول گریس (۱۹ و ۲۷) با حساسیت (۱۲۵ pmol)  $2/5$  mM نترات (در آب دیونیزه یا آب مقطر) (Sensitivity: 2.5mM (125pmol) nitrite (deionized, distilled water) and (Catalog Number: G2930) استفاده شد. روش گریس مبتنی بر اندازه‌گیری غیر مستقیم نیتریک اکسید است. نیتریک اکسید یک مولکول به شدت ناپایدار بوده و نیمه عمر کوتاهی دارد، به این دلیل اندازه‌گیری مستقیم آن نسبتاً مشکل است اما این ماده سریعاً به متابولیت‌هایی همچون نیتريت و یا نترات تبدیل می‌شود که پایدار و

داده شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت قدیمی با محیط کشت تازه تعویض شد. هنگامی که سلول‌ها، ۷۰ تا ۸۰ درصد از کف فلاسک را فرا گرفتند، پاساژ سلول‌ها با استفاده از محلول (200 Unit/ml) Trypsin-EDTA، انجام گرفت و با پاساژ دادن سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد نگهداری شدند (۱۶).

پپتیدهای Substance P با خلوص (HPLC) ۹۶/۸۴ درصد و وزن مولکولی ۱۳۴۷/۶۳ gr/mol و p(lys-homocysteine) (HPLC) ۹۵/۹۲ درصد و وزن مولکولی ۱۴۶۳/۸۲ gr/mol توسط شرکت ProteoGenix SAS فرانسه تهیه شدند.

فعالیت متابولیکی سلول‌های انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف از پپتید و سیستئین با استفاده از تست MTT (MTT assay) مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این روش مقداری از MTT (3-(4, 5)-dimethylthiazolyl-2)-5, 5-(diphenyltetrazolium bromide) زرد رنگ که

وارد سلول‌های زنده می‌شود، توسط آنزیم دهیدروژناز این سلول‌ها احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگی ایجاد می‌کند که به روش اسپکتروسکوپی قابل اندازه‌گیری است. برای تهیه‌ی استوک MTT، ۵ میلی‌گرم از این ترکیب در ۱ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات حل شد. به هر چاهک از ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف پپتید (از غلظت  $10^{-4}$  مولار تا  $10^{-10}$  مولار) و سیستئین به میزان  $5 \times 10^{-4}$  میکرومولار تیمار شدند. سپس محیط کشت رویی خارج و ۵ میکرولیتر از استوک MTT به هر چاهک اضافه شد. پس از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه به دنبال خروج محیط رویی واکنش، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO متوقف شد. این محلول باعث حل شدن بلورهای فرمازان (Formazan) شده و درجات متفاوتی از شدت رنگ بنفش تا سفید ایجاد می‌کند که این شدت رنگ معیاری از تعداد سلول‌های زنده در محیط است. سپس میزان جذب نوری خانه‌ها به وسیله دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و توان حیاتی سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های شاهد (کنترل) محاسبه

میکرومولار نیترات سدیم) مقایسه و میزان نیتریک اکسید تولید شده در مایع رویی کشت سلولی اندازه گیری شد.

### آنالیز آماری

در این مطالعه، تمام آزمایشها به صورت سه بار تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از برنامه نرم افزاری Statistical Package For Social Science (SPSS Statistics (Version 23) استفاده شد و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  Standard Derivation (SD)) گزارش شد. اختلاف آماری بین گروههای کنترل و تیمار شده با استفاده از آزمون t-test مورد ارزیابی قرار گرفت و  $p < 0.05$  از نظر آماری معنی دار تلقی شد (۲۸).

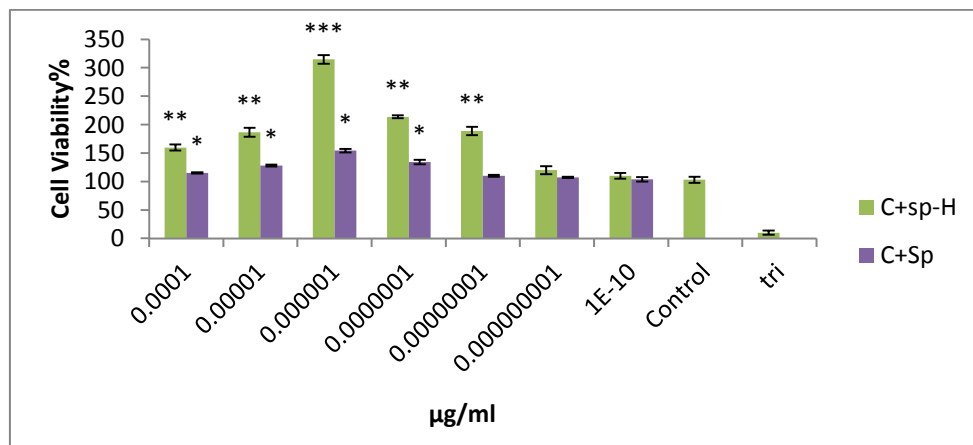
### نتایج

#### اثر غلظت‌های مختلف از پپتید Substance P و substance p(lys-homocysteine) بر توان حیاتی سلول‌های PC12.

بقای سلول‌های PC12 بعد از ۴۸ ساعت تیمار کردن با غلظت‌های مختلف از پپتید Substance P و substance p(lys-homocysteine) توسط تست MTT سنجیده و نتایج حاصل در شکل ۱ آورده شده است.

قابل اندازه‌گیری بوده و سنجش آنها یک تخمین قابل اطمینان از برون ده نیتریک اکساید در محیط *in vivo* فراهم می‌آورد.

به منظور انجام تست ابتدا منحنی استاندارد رسم شد سپس سلول‌هایی که قبلاً با پپتیدها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده بودند به منظور القای آپوپتوزیس، در معرض H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با غلظت ۱۵۰ میکرومولار به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به صورت ۳ بار تکرار در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و محلول گریس اضافه شد. برای اضافه کردن محلول گریس مراحل زیر انجام شد: ابتدا ۵۰ میکرولیتر محلول سولفانیل آمید (Sulfanilamide Solution (1% (sulfanilamide in 5% phosphoric acid) روی نمونه‌ها ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور انکوباسیون انجام شد، سپس ۵۰ میکرولیتر محلول اتیلین دی‌آمید دی هیدروکلرید (NEDSolution (0.1% N-1-) naphthylethylenediamine dihydrochloride in (water) اضافه شد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور انکوباسیون صورت گرفت و رنگ حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. آنگاه جذب نمونه‌ها با جذب استاندارد (۰ تا ۱۰۰



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف از پپتید Substance P و substance p(lys-homocysteine) در حضور سیستمین بر توان حیاتی سلول‌های PC12 بعد از ۴۸ ساعت تیمار کردن. نمونه‌ها شامل سلول و محیط کشت به همراه غلظت‌های مختلف پپتید (از غلظت ۴-۱۰ مولار تا ۱۰-۱۰ مولار) و سیستمین به میزان  $5 \times 10^{-4}$  میکرو مولار، شاهد (control) که تنها حاوی سلول، سیستمین و محیط کشت است و فاقد پپتید می‌باشد و چاهک حاوی سلول و محیط کشت که به همراه تریتون (tri) ۴ درصد به مدت ۲ ساعت تیمار شده است. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شده‌اند و  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.001$  \*\*،  $p < 0.0001$  \*\*\* در مقایسه با گروه شاهد.

به ترتیب به صورت (SP-H)+C و S+C نشان داده می‌شوند.

میزان افزایش رشد سلول‌های PC12 نسبت به گروه شاهد در جدول ۱ آمده است. ضمناً از اینجا به بعد به منظور ساده تر شدن، ترکیبات Substance P +Cys، substance p(lys-homocysteine)+Cys به اختصار و

جدول ۱: درصد افزایش رشد سلول‌های PC12 در نمونه‌های حاوی پپتید نسبت به گروه شاهد

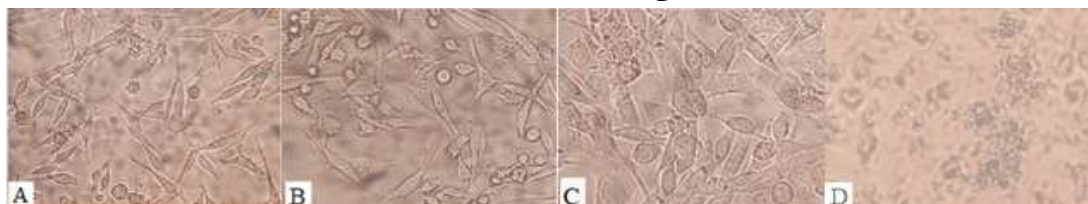
غلظت نمونه‌های مختلف از پپتید(مولار)	(SP-H)+C	S+C
$10^{-4}$	۳۹/۹	۲۸/۷۵
$10^{-5}$	۴۶/۶۷	۳۲
$10^{-6}$	۷۸/۶۵	۳۸/۵۵
$10^{-7}$	۵۳/۴۲	۳۳/۶۵
$10^{-8}$	۴۷/۱۷۵	۲۷/۵
$10^{-9}$	۲۷/۵	۲۶/۲۵
$10^{-10}$	۲۵/۲۵	۲۵/۰۷

کمترین میزان رشد نیز در چاهک محتوی تریتون دیده شد زیرا تریتون روی رشد اثر منفی داشته و باعث از بین بردن سلول‌ها می‌شود.

#### بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های PC12 در اثر تأثیر نمونه‌های مختلف پپتیدی

به منظور بررسی کیفی تغییرات مورفولوژیکی در اثر تاثیر نمونه‌های مختلف پپتیدی به عنوان نمونه غلظت  $10^{-6}$  مولار از پپتیدها که در آن غلظت بیشترین تاثیر دیده می‌شود انتخاب و تصویر سلول‌های مواجه یافته با این غلظت از پپتیدهای (SP-H)+C و (SP)+C، سلول‌های شاهد که فاقد پپتید می‌باشد و سلول‌هایی که حاوی محلول تریتون ۴ (tri) درصد است در شکل ۲ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود به طور کلی هر ۲ ترکیب به طور معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) موجب افزایش رشد سلول‌ها شده‌اند اما روند این افزایش به گونه‌ای می‌باشد که از غلظت  $10^{-4}$  مولار تا  $10^{-6}$  مولار رشد سلول‌ها به طور معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) بیشتر شده است به نحوی که میزان افزایش رشد با افزودن: (SP-H)+C از ۳۹/۹ درصد نسبت به گروه شاهد به ۷۸/۶۵ درصد، (SP)+C از ۲۸/۷۵ درصد نسبت به گروه شاهد به ۳۸/۵۵ درصد رسیده است. اما از غلظت‌های  $10^{-6}$  مولار تا  $10^{-10}$  مولار روند افزایش رشد به طور معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) کمتر شده است به نحوی که میزان افزایش رشد در مجاورت: (SP-H)+C از ۷۸/۶۵ درصد نسبت به گروه شاهد به ۲۵/۲۵ درصد، (SP)+C از ۳۸/۵۵ درصد نسبت به گروه شاهد به ۲۵/۰۷ درصد رسیده است. حداکثر میزان افزایش رشد در هر یک از گروه‌ها مربوط به غلظت  $10^{-6}$  مولار می‌باشد.

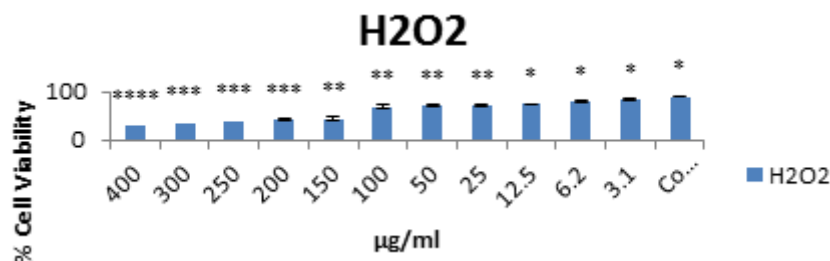


شکل ۲: تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها: A سلول‌های شاهد، B سلول‌های حاوی (S+C)  $10^{-6}$  مولار، C سلول‌های حاوی (H+C)  $10^{-6}$  مولار D سلول‌های حاوی محلول تریتون

سنجش سمیت القا شده با  $H_2O_2$ 

سپس به منظور القای استرس اکسیداتیو از  $H_2O_2$  به عنوان اکسیدان استفاده شد تا اثر محافظتی نمونه‌های پپتیدی فوق الذکر در برابر تغییر اعمال شده در ریز محیط مورد بررسی شود. ابتدا غلظتی از  $H_2O_2$  که در آن نیمی از توان حیاتی سلول‌های PC12 کاهش می‌یابد توسط تست MTT تعیین شد و سپس به بررسی تست NO در غلظت به دست آمده پرداخته شد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است سلول‌های حاوی پپتید هیچ‌گونه تغییر مورفولوژیکی مشخصی نسبت به سلول‌های شاهد نداشتند اما سلول‌هایی که با تریتون مواجه داشتند تحت تاثیر تریتون تغییر شکل واضحی داشته اند به گونه‌ای که از فرم دوکی شکل و چسبیده خارج شده، پاهای کاذب خود را از دست داده و به فرم دایره‌ای و تحلیل رفته تبدیل شده‌اند، محتوای سلولی برخی از آن‌ها نیز به بیرون ریخته و روی سطح محیط کشت شناور باقی مانده‌اند.

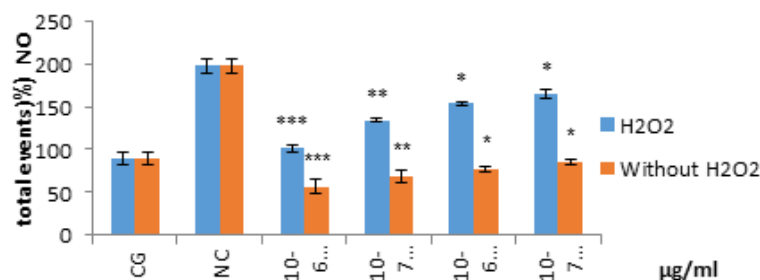


شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن بر توان حیاتی سلول‌های PC12 بعد از ۲۴ ساعت تیمار کردن. نمونه‌ها شامل سلول و محیط کشت به همراه غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (از غلظت  $400 \mu\text{g/ml}$  تا  $3.1 \mu\text{g/ml}$ )، شاهد (control) که تنها حاوی سلول و محیط کشت است و فاقد  $H_2O_2$  می‌باشد. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شده‌اند و  $p < 0.05$  و  $p < 0.001$  و  $p < 0.0001$  در مقایسه با گروه شاهد.

## اندازه‌گیری میزان تولید نیتریک اکسید درون سلولی

در نمودار زیر میزان نیتریک اکسید تولید شده توسط نمونه‌های انتخابی از سلول‌ها در حضور و عدم حضور  $H_2O_2$  نشان داده شده است.

همان‌طور که از شکل ۳ مشخص است غلظت  $150 \mu\text{g/ml}$  از  $H_2O_2$  بر توان حیاتی سلول‌های PC12 اثر مهاری داشته و می‌تواند نیمی از آن‌ها را بعد از ۲۴ ساعت تیمار کردن از بین ببرد.



شکل ۴: تست NO: بررسی مقایسه‌ای میزان نیتریک اکسید تولید شده از نمونه‌های انتخابی در حضور و عدم حضور  $H_2O_2$ . چاهک‌ها محتوی سلول و محیط کشت هستند به همراه غلظت‌های  $10^{-6}$  یا  $10^{-7}$  مولار از نمونه‌های مختلف پپتیدی که نیمی از چاهک‌ها به مدت ۳ ساعت با  $H_2O_2$  ( $150 \mu\text{g/ml}$ ) تیمار شدند، گروه شاهد (CG) که تنها حاوی سلول، سیستمین و محیط کشت است و کنترل منفی (NC) که حاوی سلول، سیستمین، محیط کشت و  $H_2O_2$  است. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شده‌اند و  $p < 0.001$  و  $p < 0.0001$  در مقایسه با گروه کنترل مثبت و  $p < 0.0001$  و  $p < 0.000001$  در مقایسه با گروه کنترل منفی.

جدول ۲: درصد کاهش تولید NO درون سلولی نمونه‌های انتخابی (شامل سلول، سیستین و محیط کشت به همراه غلظت‌های  $10^{-6}$  یا  $10^{-7}$  مولار پپتید) در حضور  $H_2O_2$  نسبت به کنترل منفی (حاوی  $H_2O_2$  و بدون پپتید) و عدم حضور  $H_2O_2$  نسبت به گروه شاهد (فاقد  $H_2O_2$  و بدون پپتید)

غلظت نمونه‌های مختلف از پپتید (مولار)	درصد کاهش تولید NO در	
	حضور $H_2O_2$	عدم حضور $H_2O_2$
$10^{-6}$ (SP-H)+C	۳۶	۴۹
(SP-H)+C $10^{-7}$	۲۴	۳۲
$10^{-6}$ SP+C	۱۴	۲۲
$10^{-7}$ SP+C	۵	۱۷

واکنش‌های سازگاری ایجاد کنند تا بتوانند فنوتیپ‌های بدخیم خود را حفظ کنند، با این حال هنگامی که تعادل مجدد سلول‌های سرطانی شدیداً مختل می‌شود، در اثر استرس اکسیداتیو حاصله خسارات فراوانی به بار می‌آید که نهایتاً می‌تواند با فعال کردن مسیر آپوپتوز و یا نکروزه کردن سلول‌ها منجر به مرگ سلول شود. (۲۴، ۲۵، ۲۹، ۳۰)

یکی دیگر از انواع ROS نیتریک اکسید است. غلظت فیزیولوژیک واقعی NO در سلول‌ها بسیار پایین است (۲۰ تا ۱۰۰ نانومولار) است. وقتی غلظت نیتریک اکسید در سلول کم باشد، اثرات موافق با تومور اتفاق می‌افتد که شامل: تکثیر، رگزایی، مهاجم، متاستاز و سرکوب آپوپتوز می‌باشند و در غلظت‌های بالا اثرات ضد توموری و مرگ سلولی اتفاق می‌افتد که شامل آسیب DNA، استرس اکسیداتیو/ نیتروزیو (Oxidative/ Nitrosative Stress)، سمیت سلولی و آپوپتوزیس است. مطالعات متعددی این اثر وابسته به غلظت را روی سلول‌های مختلف نشان داده‌اند. به عنوان مثال در سلول‌های PC12 به خوبی نشان داده شده است که غلظت پایین NO و اهدا کننده‌ی NO (DETA) NO donors (Diethylenetriamine Nitric Oxide Adduct) به طور قابل توجهی باعث تحریک تکثیر شده‌اند در حالی که غلظت بالا (۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر NO) مانع از تکثیر شده است. این روند در سلول‌های کراتینوسیت (Keratinocytes)، هپاتو کارسینوما (Hepatocellular Carcinoma)، لوسمی انسانی (HL-60) (Human Leukemia (HL-60)) نیز دیده شد و افزایش iNOS یکی از شاخص‌های تشخیص تومور در سلول‌های گلیوبلاستوما

چنانچه در جدول ۲ مشاهده می‌شود در حضور و عدم حضور  $H_2O_2$  هر دو ترکیب به‌طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) موجب کاهش تولید NO درون سلولی شده‌اند و این کاهش به نحوی است که در شرایط عدم وجود پراکسید هیدروژن، در غلظت  $10^{-6}$  مولار، پپتید هموسیستئینه توانسته ۲۷ درصد بیشتر از پپتید طبیعی منجر به کاهش تولید NO شود و در غلظت  $10^{-7}$  مولار نیز پپتید هموسیستئینه توانسته ۱۵ درصد بیشتر از پپتید طبیعی تولید NO را کاهش دهد و شدت تاثیر هموسیستئینه شدن Substance p در میزان تولید NO به گونه‌ای بوده است که حتی در شرایطی که یک عامل مهار کننده‌ی رشد مثل  $H_2O_2$  نیز در محیط وجود داشته باشد توانسته به خوبی منجر به کاهش درصد تولید NO شود چنانچه در حضور  $H_2O_2$  در غلظت  $10^{-6}$  مولار، پپتید هموسیستئینه ۲۲ درصد بیشتر از پپتید طبیعی منجر به کاهش تولید NO شده است و در غلظت  $10^{-7}$  مولار ۱۹ درصد بیشتر از پپتید طبیعی تولید NO را کاهش داده است.

## بحث

یکی از انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، پراکسید هیدروژن است که بسته به غلظت آن در درون سلول، در بسیاری از مسیرهای انتقال پیام و تصمیمات سلولی دخیل است. در سلول‌های سرطانی به دلایل مختلفی چون فعالیت متابولیک بالا، مسیرهای انتقال پیام، اختلال عملکرد میتوکندری، فعال شدن آنکوژن‌ها سطح ROS افزایش می‌یابد. گرچه سلول‌های سرطانی قادر هستند



Human Retinal Pigment Epithelium Cell ) نشان می‌دهد که باعث نجات سلول‌ها از مرگ القا شده توسط اکسیدان  $H_2O_2$  شده است (۳۳). نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان تولید نیتریک اکسید درون سلولی با استفاده از تست NO در حضور و عدم حضور  $H_2O_2$  ( $150 \mu g/ml$ ) در شکل ۴ نیز به خوبی نشان می‌دهد که به طور کلی میزان تولید NO در سلول‌هایی که در معرض  $H_2O_2$  ( $150 \mu g/ml$ ) و سیستئین همراه با پپتیدهای SP و SP-H بوده‌اند از سلول‌های کنترل منفی که حاوی  $H_2O_2$  ( $150 \mu g/ml$ ) بوده اما با نمونه‌های پپتیدی و سیستئین تیمار نشده بودند کمتر می‌باشد و این کاهش معنی‌دار، در میزان تولید NO در سلول‌هایی که در معرض سیستئین و پپتیدهای SP و SP-H بوده‌اند نسبت به سلول‌های کنترل مثبت که فاقد  $H_2O_2$  بوده و با نمونه‌های پپتیدی و سیستئین هم تیمار نشده بودند مشاهده می‌شود. بنابراین حضور SP+C و SP-H+C باعث کاهش میزان تولید NO در سلول‌های PC12 شده است. البته مکانیسم مولکولی که مسبب این کاهش است تاکنون گزارش نشده است (۳۴). اما از آنجایی که NOS1 و NOS3 غلظت نانومولار NO را برای دوره‌های بسیار کوتاه مدت (ثانیه / دقیقه) تولید می‌کنند و NOS2 غلظت میکرومولار NO را برای دوره‌های زمانی طولانی (ساعت و روز) تولید می‌کند و نقش موثرتری در سرطان دارد (۱۹)، همچنین گزارش شده است که افزایش بیش از حد NO درون سلولی خود اثر منفی بر تولید بیشتر آن دارد (۳۵)، به نظر می‌رسد نمونه‌های پپتیدی قادر خواهند بود با یک بازخورد منفی در مهار و یا کاهش بیان این آنزیم تاثیرگذار باشند. همچنین چنانچه از جدول ۲ مشخص است که SP-H+C تأثیر بیشتری در تولید NO نسبت به SP+C دارد. این امر می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که در برخی بیماری‌ها مثل سرطان که میزان SP و هموسیستئین خون افزایش می‌یابد، تشکیل SP-H می‌تواند از طریق کاهش تولید نیتریک اکسید درون سلولی و حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو باعث افزایش رشد بیشتر سلول‌های سرطانی شده و روند پیشرفت سرطان را سرعت بخشد.

#### نتیجه‌گیری

بنابراین با توجه به این‌که در درمان سرطان یکی از

(Glioblastoma) است. همچنین یافته‌های محققین نشان می‌دهد که آپوپتوز ناشی از NO در سلول‌های PC12 به فعالیت p53 بستگی دارد و مستقیماً شامل رونویسی ژن آپوپتوزیس، فعال‌سازی کاسپاز (Caspaseactivation)، دپلمیریزاسیون غشا میتوکندری و تقسیم هسته ای DNA می‌شود (۱۹ و ۳۰). پراکسید هیدروژن یکی از عوامل افزایش NO درون سلول است زیرا آنزیم iNOS قادر است L-Arg را توسط  $H_2O_2$  اکسید کرده و منجر به تولید NO شود. از طرفی علاوه بر این که افزایش غلظت  $H_2O_2$  و NO هر دو برای سلول سمی است از واکنش آن‌ها با هم امکان تشکیل پراکسی نیتریت به وجود می‌آید که بسیار سمی‌تر است و موجب آسیب شدیدتر به سلول‌های تومور می‌شود (۳۱). لذا در صورتی که تاثیر نمونه‌های مورد مطالعه بر رشد سلول‌های سرطانی مثبت باشد، می‌توان از  $H_2O_2$  برای ایجاد استرس اکسیداتیو استفاده کرد (۳۲) و میزان تولید NO در برابر سمیت پراکسید هیدروژن را نیز مورد مطالعه قرار داد تا مشخص شود که آیا نمونه‌های مورد مطالعه می‌توانند سلول را در برابر سمیت پراکسید هیدروژن در غلظتی که برای سلول سمی و کشنده است نیز محافظت کند. سنجش توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از تست MTT نشان داد که در حضور سیستئین، پپتید SP باعث افزایش رشد سلول‌های PC12 می‌شود و هموسیستئین شدن این پپتید باعث افزایش بیشتر رشد این سلول‌ها خصوصاً در غلظت ۱ میکرومولار می‌شود به نحوی که همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، به لحاظ کیفی هیچ گونه تغییر مورفولوژیکی (۲۶) مشخصی بین سلول‌هایی که در معرض SP+C و SP-H+C قرار گرفته‌اند با سلول‌هایی که در معرض آن‌ها قرار نداشته‌اند وجود ندارد. مطالعات محققین نشان می‌دهد که SP با مکانیسم‌های مختلفی می‌تواند از طریق گیرنده NK1 باعث افزایش رشد سلول شود. به‌عنوان مثال فعال‌سازی مسیر MAPK و تحریک میتوز در سلول‌های استروما (U-373MG Astrocytoma Cell Line) (۲۹)، کاهش آپوپتوزیس از طریق مسیر انتقال پیام Akt در سلول‌های کاردیومیوسیت (Cardiomyocytes) موش و افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوزیس از طریق فعال شدن مسیر Akt / GSK-3 $\beta$  (Human Retinal Pigment Epithelium Cell Line) در سلول‌های RPE

8. Chen X-Y, Ru G-Q, Ma Y-Y, Xie J, et al. High Expression Of Substance P And Its Receptor Neurokinin-1 Receptor In Colorectal Cancer Is Associated With Tumor Progression And Prognosis. *Oncotargets And Therapy*. 2016; 9: 3595–3602.
9. Munoz M, Covenas R. Neurokinin-1 Receptor: A New Promising Target In The Treatment Of Cancer. *Discovery Medicine*. 2010; 10(53): 305-13.
10. Rosso M, Munoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012: 381434.
11. Muñoz M, Berger M, Rosso M, Gonzalez-Ortega A, Et Al. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *International journal of oncology*. 2014; 44(1): 137-46.
12. Davoudmanesh S, Mosaabadi JM. Investigation of the effect of homocysteinylation of substance P on its binding to the NK1 receptor using molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling*. 2018; 24(7): 177.
13. Scott JM, Weir DG. Folic Acid, Homocysteine And One-Carbon Metabolism: A Review Of The Essential Biochemistry. *Journal Of Cardiovascular Risk*. 1998; 5(4): 223-7.
14. Jakubowski H. Molecular Basis Of Homocysteine Toxicity In Humans. *Cellular And Molecular Life Sciences CMLS*. 2004; 61(4): 470-87.
15. Ackers GK, Smith FR. Effects Of Site-Specific Amino Acid Modification On Protein Interactions And Biological Function. *Annual Review Of Biochemistry*. 1985; 54(1): 597-629.
16. Calorini L, Peppicelli S, Bianchini F. Extracellular Acidity As Favouring Factor Of Tumor Progression And Metastatic Dissemination. *Exp Oncol*. 2012; 34(2): 79-84.
17. Nurwidya F, Takahashi F, Minakata K, Murakami A, Et Al. From Tumor Hypoxia To Cancer Progression: The Implications Of Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression In Cancers. *Anatomy & Cell Biology*. 2012; 45(2): 73-8.
18. Brynczka C, Merrick BA. Nerve growth factor potentiates p53 DNA binding but inhibits nitric oxide-induced apoptosis in

روش‌های پیشنهادی استفاده از آنتاگونیست‌های Substance P می‌باشد در طراحی آن بایستی این نکته مورد توجه قرار گیرد که آنتاگونیست طراحی شده علاوه بر ممانعت از فعال سازی NK1، مانع از هموسیستئینه شدن SP در خون نیز شود.

### تشکر و قدردانی

از حمایت‌های گروه بیوفیزیک و بیوشیمی بخش فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر در انجام این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود.

### منابع

1. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, et al. Nanomaterials In Combating Cancer: Therapeutic Applications And Developments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology And Medicine*. 2014; 10(1):19-34.
2. Marzouni HZ, Lavasani Z, Shalilian M, Najibpour R, et al. Women's Awareness And Attitude Toward Breast Self-Examination in dezful city, Iran, 2013: *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2015; 17(1): 17829.
3. Muñoz M, Coveñas R. Involvement Of Substance P And The NK-1 Receptor In Pancreatic Cancer. *World Journal Of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20(9): 2321–2334.
4. Rizo J, Gierasch LM. Constrained Peptides: Models Of Bioactive Peptides And Protein Substructures. *Annual Review Of Biochemistry*. 1992; 61(1): 387-416.
5. Jensen J. Substance P And Other Tachykinins. *The Comparative Physiology Of Regulatory Peptides: Springer*; 1989. 130-49.
6. Munoz M, Rosso M, Pérez A, Covenas R, Et Al. Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005; 46(7): 2567-70.
7. Yang L, Sui W, Li Y, Qi X, et al. Substance P inhibits hyperosmotic stress-induced apoptosis in corneal epithelial cells through the mechanism of Akt activation and reactive oxygen species scavenging via the neurokinin-1 receptor. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0149865.

- 2007; 32(9): 1573-85.
19. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*. 2013; 34(3): 503-12.
20. Haviv R, Lindenboim L, Yuan J, Stein R. Need For Caspase- 2 In Apoptosis Of Growth- Factor- Deprived PC12 Cells. *Journal Of Neuroscience Research*. 1998; 52(5): 491-7.
21. Martin T, Grishanin R. PC12 Cells As A Model For Studies Of Regulated Secretion In Neuronal And Endocrine Cells. *Methods Cell Biol*. 2003; 71(34): 267-86.
22. Munoz M, Rosso M, Covenas R, Montero I, Et Al. Neurokinin-1 Receptors Located In Human Retinoblastoma Cell Lines: Antitumor Action Of Its Antagonist, L-732,138. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007; 48(6): 2775-81.
23. Nunes SC, Ramos C, Lopes-Coelho F, Sequeira CO, Et Al. Cysteine allows ovarian cancer cells to adapt to hypoxia and to escape from carboplatin cytotoxicity. *Scientific Reports*. 2018 Jun 22; 8(1): 9513.
24. Najmi Ns, Zhaleh H, Azadbakht M. Protective Effects Of Morphine Low Concentration On Dexamethasone-Induced Cell Death In Differentiated Pc12 Cells. 2013; 15(5): 7-16.
25. Vilema-Enríquez G, Arroyo A, Grijalva M, Amador-Zafra RI, Et Al. Molecular And Cellular Effects Of Hydrogen Peroxide On Human Lung Cancer Cells: Potential Therapeutic Implications. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2016; 2016: 1-13.
26. Lu YH, Su MY, Huang HY, Yuan CG. Protective effects of the citrus flavanones to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Neuroscience Letters*. 2010; 484(1): 6-11.
27. Lai Y, Shen L, Zhang Z, Liu W, Et Al. Synthesis and biological evaluation of furoxan-based nitric oxide-releasing derivatives of glycyrrhetic acid as anti-hepatocellular carcinoma agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010; 20(22): 6416-20.
28. Cheong CU, Yeh CS, Hsieh YW, Lee YR, Et Al. Protective effects of Costunolide against hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Molecules*. 2016; 21(7): 898.
- neuronal PC12 cells. *Neurochemical research*.
29. Lu W, Ogasawara MA, Huang P. Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2007; 4(2): 67-73.
30. Kumari S, Badana AK, Malla R. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. *Biomarker insights*. 2018;13:1177271918755391.
31. Fan W, Lu N, Huang P, Liu Y, et al. Glucose Responsive Sequential Generation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide for Synergistic Cancer Starving Like/Gas Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2017; 56(5): 1229-33.
32. Lv R, Du L, Lu C, Wu J, Et Al. Allicin protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017; 14(3): 2053-9.
33. Baek SM, Yu SY, Son Y, Hong HS. Substance P promotes the recovery of oxidative stress-damaged retinal pigmented epithelial cells by modulating Akt/GSK-3 $\beta$  signaling. *Molecular vision*. 2016; 22: 1015.
34. Villalobo A. Nitric oxide and cell proliferation. *The FEBS journal*. 2006; 273(11): 2329-44.
35. Kang BN, Jeong KS, Park SJ, Kim SH, Et Al. Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages. *Regulatory peptides*. 2001; 101(1-3): 43-9.

## Comparing the Effect of Homocysteinylated and Normal Forms of Substance P on the Proliferation of PC12 Cell-line in the Presence of Cysteine

Davoudmanesh S, M.Sc, Mohammadian MJ, Ph.D\*

- Faculty of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: [mohama\\_j@mut.ac.ir](mailto:mohama_j@mut.ac.ir)

Received: 2 Sep. 2018

Accepted: 23 Dec. 2018

---

### Abstract

**Aim:** In the present study, the effects of homocysteinylated and normal forms of substance P were investigated on the proliferation of PC12 cell-line in the presence of cysteine.

**Material and methods:** Cells were cultured in an RPMI-Glutamax medium containing 10% FBS and metabolic activity was assessed in the presence of different concentrations of peptide and cysteine using the MTT assay. Afterward, the morphological changes were determined using phase-contrast microscopy. In order to evaluate the protective effect of homocysteinylated peptide against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cells were treated with 150 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 h, and their nitric oxide production was assessed using the Griess colorimetric assay.

**Results:** findings showed that two forms of substance P, at selected concentrations, caused a significant increase in proliferation of PC12 cells and a decrease in the amount of NO production in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. At a concentration of 6-10 M, homocysteinylated and normal forms of substance P increased the rate of PC12 proliferation up to 78.65% and 38.55 % and decreased the levels of NO up to 36% and 14%, respectively. This indicates that homocysteinylated form of substance P is more potent (≈ 40%) than the normal form. The percentage of protection for homocysteinylated substance P was about 22% higher than the normal form.

**Conclusion:** It seems that homocysteinylated substance P can increase the growth rate of cancer cells and promote the disease course through the reduction in NO production in pathological conditions.

**Keywords:** Cancer cells; Homocysteine; PC12 cell line; Substance P