

بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانتی پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربیم

مسعود همایونی تبریزی^{۱*}، احمد آسوده^۲، محمد مشرقی^۳، ماهره رضازاده بزاز^۴، مجید درودی^۵، رضا کاظمی اسکویی^۶

- (۱) گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
 (۲) گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 (۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 (۴) مرکز تحقیقات نانو فن آوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 (۵) گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۶

چکیده

مقدمه: پپتید برونین ۲ آر یک پپتید کاتیونیک است که از ترشحات غدد پوستی قورباغه مرادی *Rana ridibunda* استخراج شده است. این پپتید دارای خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی است و دارای توالی KLKKNFAKGVAQSLLNKASCKLSGQC است. نانوذرات اکسید سربیم (نانوسریا) شکل اکسید شده عنصر کمیاب سربیم هستند که به دلیل تغییرات جای خالی اکسیژن سطحی و آرایش ظرفیتی می توانند به عنوان جاروب کننده های گونه های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) در بسیاری از زمینه های بیولوژیک عمل کنند. در این تحقیق خصوصیات آنتی اکسیدانتی پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربیم بررسی شد. اکسید سربیم (CeO_2 ، سریا) یکی از اکسیدهای فلزی لاتانید است که توانایی شرکت در واکنش های اکسایش و احیاء دارد.

مواد و روش ها: نانو ذرات اکسید سربیم در محلول نشاسته ستز شدند. در مرحله بعد گروه عاملی آمین به سطح نانو ذرات متصل گردید و سپس پپتید به نانو ذره اکسید سربیم متصل گردید. فعالیت آنتی اکسیدانتی پپتید متصل به نانو ذره با روش های جذب رادیکال های ۱، ۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، ۲ و ۲-آزینو بیس(۳-اتیل بنزوتیازولین ۶- سولفونیک اسید) (ABTS)، هیدروکسیل (OH^\ominus) و سوپراکسید (O_2^{\ominus}) و مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید سنجش شد.

یافته های پژوهش: نتایج نشان می دهد که پپتید متصل به نانو ذره اکسید سربیم اکسیداسیون لینولئیک اسید را مهار و به عنوان جذب کننده رادیکال DPPH ($\text{IC}_{50}=0.2 \text{ mg/ml}$)، ABTS ($\text{IC}_{50}=0.54 \text{ mg/ml}$)، سوپراکسید ($\text{IC}_{50}=0.078 \text{ mg/ml}$) و هیدروکسیل ($\text{IC}_{50}=0.1 \text{ mg/ml}$) عمل کرده است.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربیم جدا شده از ترشحات غدد پوست قورباغه، دارای فعالیت قوی آنتی اکسیدانتی است و فعالیت آنتی اکسیدانتی آن احتمالاً به علت حضور اسیدهای آمینه سیستئین، فنیل آلانین، اسیدهای آمینه آگریز شامل لوسین و آلانین باشد. خصوصیات آنتی اکسیدانتی پپتید متصل به نانو ذره اکسید سربیم هم چنین به دلیل وجود سربیم باشد.

واژه های کلیدی: پپتید، فعالیت آنتی اکسیدانت، نانو ذره اکسید سربیم

* نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

مقدمه

قورباغه مردابی گونه *Rana ridibunda* یکی از گونه‌های دوزیست است که به فراوانی در کشور ایران یافت می‌شود (۲۰). تاکنون تحقیقاتی بر روی ترشحات پوستی این دوزیست صورت گرفته است که یکی از پپتیدهای استخراج شده از این ترشحات پپتید Brevinin 2R با توالی (KLKNFAKGVAQSLLNKASCKLSGQC) است (۲۱). مشخص شده که این پپتید دارای خواص ضد سرطانی (۲۱) و دارای اثر تنظیمی در پاسخ‌های التهابی است (۲۲). هدف از مطالعه حاضر اتصال پپتید Brevinin 2R به نانو ذره اکسید سربوم به منظور مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانتی ترکیب حاصل است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، ترکیب 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)، فنانترویلین، گلوکاتینون احیاء شده، محلول ABTS₂ - 6 - 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-sulphonic acid) و کلرید آهن (II)FeCl₂ از شرکت سیگما-آلدیش آمریکا و تری کلرواستیکاسید، اتانول، EDTA و استونیتریل از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

در این پژوهش، نانو ذرات اکسید سربوم (IV) به روش سل-ژل با لحاظ کردن قوانین شیمی سبز سنتز گردید. از نیترات سربوم و نشاسته به ترتیب عنوان منبع تامین کننده کاتیون‌های سربوم (III) و عامل محدود کننده اندازه استفاده گردید. به منظور سنتز نانو ذرات اکسید سربوم، ۰/۲ گرم پودر نشاسته در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و برای رسیدن به محلول شفاف از نشاسته به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد هم زده شد. در همین منوال، مقدار مورد نیاز محلول نیترات سربوم ۰/۵ مولار به محلول نشاسته اضافه گردید. سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه استر شد و محلول آمونیوم ۱ مولار به صورت قطره قطره به آن اضافه گردید تا pH محلول به ۱۰ برسد. محلول ۱ ساعت دیگر نیز هم زده شد. سپس محلول ساترپیوژ شده و چندین بار با استن و آب به منظور حذف نیترات، آمونیاک و ناخالصی‌های آلی شسته شد و سپس در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید.

اکسید سربوم (CeO₂، سریا) یکی از اکسیدهای فلزی لاتناید است که به داشتن پتانسیل اکسایش-کاهش معروف است (۱). نانو ذرات اکسید سربوم (نانوسریا) شکل اکسید شده عنصر کمیاب سربوم هستند که به دلیل تغییرات جای خالی اکسیژن سطحی و آرایش ظرفیتی قادر به تقلید فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز هستند. بنا بر این این نانو ذرات می‌توانند به عنوان جاروب کننده‌های گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر (ROS) در بسیاری از زمینه‌های بیولوژیک عمل کنند (۲،۳). این ویژگی اکسید سربوم در مقیاس نانو به دلیل نسبت بیشتر سطح به حجم در نانو ذرات افزایش می‌یابد که هم اکنون کاربردهای بالقوه بسیاری در زیست پزشکی برای آن پیدا شده است؛ این کاربردها شامل محافظت سلول اندوتلیال (۴)، ترمیم زخم (۵)، کاربردهای ضد سرطان (۶)، حفاظت عصبی (۷) و ترمیم عصبی (۸) می‌باشد. در هر صورت تحقیقات در مورد کاربردهای زیستی نانوسریا سریعاً در حال گسترش است (۹). مثال‌های بسیاری از کاربردهای احتمالی آن در تحقیقات یافت می‌شود. این طور نشان داده شده است که نانو ذرات سربوم به وسیله تعدیل کردن محیط داخل سلولی اکسیژن روی آنژیوژنز اثر مثبتی دارند (۱۰). علاوه بر این نانو ذرات اکسید سربوم با کاهش سطح ROS اثری درمانی در پاتولوژی شبکه چشم دارند (۱۱).

پپتیدهای فعال زیستی، پپتیدهای مشتق شده غذایی هستند که فراتر از ارزش غذایی شان اثرات فیزیولوژیک و شبه هورمونی در بدن دارند. این گونه پپتیدها در شیر، تخم مرغ، گوشت و ماهی‌ها و هم چنین در گیاهان یافت می‌شوند (۱۲). بسیاری از این پپتیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانت هستند (۱۳-۱۵). علاوه بر منابع تغذیه‌ای، پپتیدهای فعال زیستی در ترشحات و سموم بسیاری از حیوانات یافت می‌شود. از این میان، پوست دوزیستان منبعی عظیم از این پپتیدهای فعال زیستی است. پوست دوزیستان دارای پپتیدهایی با خواص ضد میکروبی (۱۶،۱۷)، ضد ویروسی (۱۸) و ضد درد (۱۹) است.

صورت گرفت (۱۱). ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار تهیه شده در اتانول ۹۵ درصد با ۱۰۰ میکرولیتر محلول پپتید یا استاندارد مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه فعالیت پپتید از ترکیب استاندارد گلوتاتیون احیاء (GSH) به عنوان یک آنتی اکسیدان استاندارد استفاده شد. برای تعیین مقدار IC_{50} (غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی اکسیداتی تعریف می شود) برای پپتید و ترکیب استاندارد، آزمایش در هشت غلظت مختلف از محلول پپتید و استاندارد انجام شد. هر آزمایش در ۳ نوبت انجام شد و مقادیر میانگین ملاک محاسبات قرار گرفت. درصد فعالیت رادیکال زدایی از طریق رابطه زیر محاسبه شد.

$$درصد جذب رادیکال = 100 \times \left(\frac{\text{جذب - جذب پایه}}{\text{جذب پایه}} \right)$$

در این رابطه جذب بلانک نشان دهنده جذب محلول شاهد است که محتوی ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به جای محلول پپتید است و جذب واکنش نشان دهنده جذب محلول محتوی نمونه پپتید است.

بررسی قابلیت حذف رادیکال ABTS این روش هم برای ترکیبات هیدروفیل و هم برای ترکیبات لیپوفیل قابل استفاده است. برای انجام این آزمایش از روش ری و همکاران استفاده شد (۱۲). به منظور تهیه محلول رادیکال ABTS، ۲ میلی لیتر ABTS ۷ میلی مولار و ۱ میلی لیتر پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار با یکدیگر مخلوط گردید و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محلول حاصل با افزودن آب، تا رسیدن به جذب ۰/۷۵۶ در طول موج ۷۴۳ نانومتر رقیق شد. غلظت محلول رقیق شده حدود ۰/۵۱۴ میلی مولار بود. سپس ۱ میلی لیتر از محلول رقیق شده رادیکال ABTS با ۱۰۰ میکرولیتر محلول پپتید مخلوط شد و جذب محلول واکنش تا حدود دقیقه هفتم، یعنی تا زمانی که فعالیت نمونه به مقدار بیشینه خود برسد، پیگیری شد.

پودر خشک شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد در کوره حرارت داده شد (۲۳).

پپتید Brevinin 2R با کمک موسسه "GLBiochem" واقع در شهر شانگ های چین سنتز و با روش RP-HPLC خالص سازی شد. سپس این پپتید به نانو ذره اکسید سربوم متصل شد.

اتصال پپتید Brevinin 2R به نانو ذره اکسید سربوم: ابتدا، گروه عاملی آمین بر طبق روش Patil و همکاران به سطح نانو ذرات اکسید سربوم متصل گردیدند. به طور خلاصه، ۲۵۰ میلی گرم از نانو ذرات اکسید سربوم در محلول NaOH ۰/۱ مولار معلق شده و به مدت ۵ دقیقه هم زده شدند. سپس ۵ میلی لیتر از اپی کلروهیدرین و ۰/۵ میلی لیتر از محلول NaOH ۲ مولار به آن اضافه گردید و در دمای اتاق هم زده شد. سپس نانو ذرات با استفاده از سانتریفیوژ در 10000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه بازیابی شده و چندین بار با آب شسته شدند. مجدداً نانو ذرات در محلول آب و آمونیوم هیدروکساید ۳۰ درصد معلق شده و به دنبال آن چندین ساعت هم زده شدند. نهایتاً نانو ذرات عملکردی شده با آمین به وسیله سانتریفیوژ بازیابی شده و با آب شسته شدند (۳ تا ۴ بار)، و به وسیله دستگاه Rotary evaporator خشک شدند (۲۴).

به منظور اتصال پپتید Brevinin 2R به نانو ذره اکسید سربوم عملکردی شده با آمین از روش Cimini و همکاران استفاده شد که البته تغییراتی در آن اعمال شد. ابتدا، پپتید و نانو ذره عملکردی شده با آمین در آب مقطر معلق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شدند. پپتید Brevinin 2R از طریق واکنش EDC (۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینوپروپیل) کربودی ایمید) و NHS (ان-هیدروکسی سوکسینیمید) به نانو ذرات متصل گردید. نسبت مولی نانو ذره به پپتید 1:2 بود. سپس نسبت مولی برابر از EDC/NHS برای اتصال پپتید به نانو ذره مورد استفاده قرار گرفت. پپتید متصل شده به نانو ذره با سانتریفیوژ کردن بازیابی شده و با آب شسته شد (۳ تا ۴ بار) و مجدداً در آب مقطر معلق گردید (۲۵).

بررسی قابلیت حذف رادیکال DPPH: این آزمایش با کمی تغییرات در روش و همکاران

در رابطه با A_S جذب نمونه، A_0 جذب محلول شاهد (محلول حاوی آب به جای نمونه) و A_C جذب محلول کنترل در غیاب H_2O_2 است.

سنجش فعالیت جذب رادیکال سوپر اکسید: این سنجش با استفاده از روش پونال انجام شد (۱۴). ۸۰ میکرولیتر از پپتید یا آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد با ۸۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار $pH=8/3$ به داخل پلیت ۹۶ چاهک ریخته شد. ۴۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول در HCl ۱۰ میلی مولار به هر چاهک اضافه شد. جذب پس از ۴ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانت در حضور و غیاب پیروگالول و پپتید از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد جذب رادیکال} = 100 \times \left(\frac{\text{جذب} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \right)$$

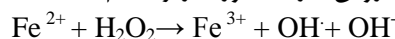
یافته های پژوهش

خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربوم ارزیابی شد. در این مطالعه فعالیت جذب رادیکال های DPPH، ABTS هیدروکسیل و سوپراکسید بررسی شد (شکل شماره ۱-الف) فعالیت جذب رادیکال ABTS پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربوم را در مقایسه با گلوکاتیون به عنوان استاندارد نشان می دهد. با زیاد شدن غلظت پپتید متصل به نانو ذره فعالیت جذبی رادیکال ABTS نیز افزایش می یابد. فعالیت جذب رادیکال های DPPH و هیدروکسیل و سوپر اکسید اندازه گیری شد و مشابه با آزمایش ABTS با افزایش غلظت پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربوم میزان حذف رادیکال های مذکور افزایش یافت (شکل شماره ۱، ب، ج، د). میزان IC_{50} (برحسب میلی گرم بر میلی لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتید در تست های DPPH برابر با ۰/۲، ABTS برابر با ۰/۵۴، هیدروکسیل برابر با ۰/۱ و سوپراکسید برابر با ۰/۰۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

این آزمایش برای به دست آوردن IC_{50} در هشت غلظت مختلف از پپتید و ترکیب استاندارد صورت گرفت. ترکیب استفاده شده استاندارد در این جا، ترکیب گلوکاتیون بود. محلول شاهد محتوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای محلول پپتید یا استاندارد بود. این آزمایش در ۳ نوبت انجام شد و مقادیر میانگین، ملاک محاسبات قرار گرفت. درصد فعالیت حذف رادیکال از رابطه زیر به دست آمد.

$$\text{درصد جذب رادیکال} = 100 \times \left(\frac{\text{جذب} - \text{جذب پایه}}{\text{جذب پایه}} \right)$$

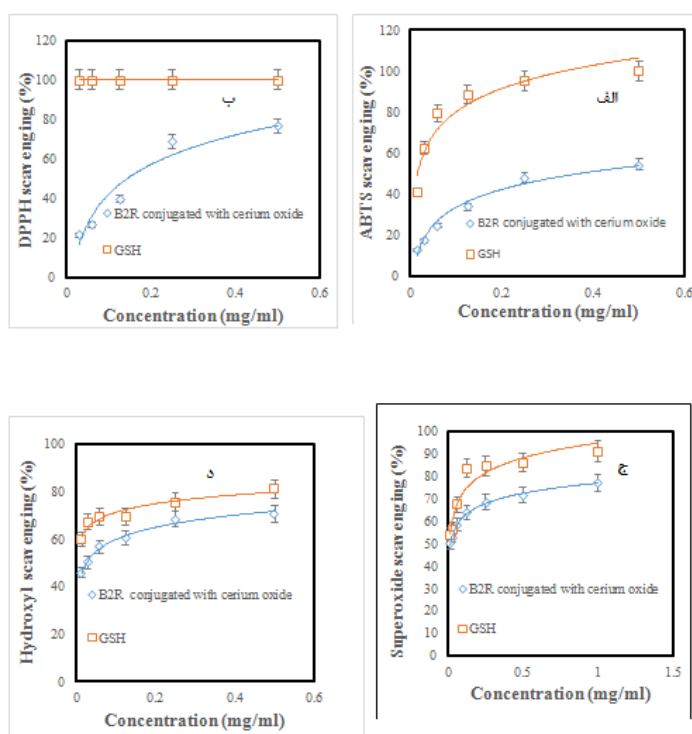
در این رابطه بلانک نماینده جذب محلول شاهد و جذب واکنش نشان دهنده جذب محلول نمونه است. اندازه گیری و محاسبه اثرگذاری پپتید در حذف رادیکال های هیدروکسیل OH . در این آزمایش، رادیکال های هیدروکسیل در سیستم فناترولین / $H_2O_2/EDTA$ تولید شد و حذف آن توسط پپتید اندازه گیری شد. روش کار به صورت زیر انجام شد.



فعالیت حذف رادیکال های هیدروکسیل با استفاده از روش Lijun و همکاران انجام شد (۱۱). به این ترتیب که در ابتدا، مخلوطی از ۶۰۰ میکرولیتر فناترولین با غلظت ۵ میلی مولار، ۶۰۰ میکرولیتر سولفات آهن با غلظت ۵ میلی مولار، ۶۰۰ میکرولیتر EDTA با غلظت ۱۵ میلی مولار و ۴۰۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات با غلظت ۰/۲ مولار و $pH=7/4$ آماده شد، سپس ۶۰۰ میکرولیتر از نمونه پپتیدی با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر به محلول اضافه شد و در نهایت ۸۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه شد. مخلوط ساخته شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و جذب آن توسط دستگاه طیف سنجی UV در ناحیه ۵۳۶ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج حاصل از فعالیت پپتید، توسط فرمول زیر محاسبه شد (۱۳).

$$\text{درصد فعالیت حذف} = (A_S - A_0) \times 100 / (A_C - A_0)$$

رادیکال های هیدروکسیل



شکل شماره ۱. فعالیت جذب رادیکال‌های (الف) ABTS، (ب) DPPH، (ج) سوپراکسید، (د) هیدروکسیل. گلوپتاتینون (GSH) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق پپتید برونین-2R یک پپتید ضد میکروبی جدا شده از ترشحات قورباغه مردابی- استفاده شد. این پپتید با طول ۲۵ اسید آمینه (KLKNFAKGVAQSLLNKASCKLSGQC) و دارای یک پل دی سولفیدی بین اسید آمینه ۱۹ و ۲۵ می باشد. این پپتید دارای ۵ واحد بار مثبت بوده و بیش از ۴۴ درصد اسیدهای آمینه آن را اسیدهای آمینه هیدروفوب تشکیل می دهند. از پپتید برونین-2R برای اتصال به نانو ذره اکسید سربوم استفاده شد. و فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیب کونچوگه در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

پپتیدهای فعال زیستی، توالی‌های آمینواسیدی کوتاهی هستند که یا به صورت پپتید آزاد هستند و یا در اثر در توالی یک پروتئین نهفته هستند که در اثر فرآیندهای گوارشی و یا فرآیندهای صنعتی آزاد می شوند. این پپتیدها بر اساس خواص ساختاری و ترکیب آمینواسیدی و توالی آن‌ها می توانند نقش‌های مختلفی مانند خواص ضد سرطان (۲۶،۲۷)، شبه

مخدري (۲۸)، تعديل سيستم ايمني (۲۹)، ضد ميكروبي (۳۰)، آنتی اکسیدانی (۳۱)، ضد تشکیل لخته (۳۲)، کاهش سطح کلسترول (۳۳) و مهار فشار خون بالا (۳۴) را ایفا کنند. رادیکال‌های آزاد که به صورت فیزیولوژیک تولید می شوند، می توانند فعالیت‌های مختلفی مانند نقش سیگنالینگ و اثر حفاظتی در مقابل عفونت را داشته باشند با این حال مقدار مازاد رادیکال‌های آزاد می تواند باعث آسیب سلولی شود که متعاقباً به ایجاد بیماری‌های مختلف نظیر سرطان، دیابت، آترواسکلروز، آسم و هم چنین بیماری‌های نورودژنراتیو، ایسکمی ناشی از برقراری مجدد جریان خون، آرتریت، و بیماری‌های التهابی منتهی می گردد (۳۵).

بر اساس نظریه رادیکال‌های آزاد رشد یافته توسط Denham Harman وقتی رادیکال‌های آزاد روی هم انباشته می شوند اندامک‌ها در سلول‌ها پیر می شوند و به صورت مداوم باعث ایجاد آسیب می شود. به طور کلی گونه‌های واکنشی می توانند باعث آسیب به پروتئین‌ها، DNA، اکسیداسیون غشاء

فسفولیپیدها و تغییر در لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) شود (۳۶). تحت شرایط عادی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند گونه‌های واکنشی را توسط آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی حذف کند، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مثل سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مثل ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان، عنصرها، کوآنزیم و کوفاکتورها. با این حال زمانی که سیستم دفاعی درونی برای جلوگیری از گونه‌های رادیکالی آزاد بدن شکست می‌خورد این نتایج باعث استرس اکسیداتیو می‌شود. این دلایل باعث به وجود آمدن نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های (سنتزی) و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌شود که می‌توانند از استرس اکسیداتیو و اثر زیان‌آور آن جلوگیری کنند. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مقرون به صرفه هستند، ولی آثار سمی و خطرناکی را در مسائل بیوشیمی و تغذیه انسان نشان می‌دهند (۳۷).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع طبیعی اند که در حال رشد برای استفاده سالم با اثرات جانبی کمتر یا بدون اثر جانبی هستند. پپتیدهای فعال زیستی از آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی هستند. در یک مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی vitroin و vivoin پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های عضله وزغ انجام شد، که هدف از آن جداسازی و شناسایی پپتیدهای دارای فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانتی بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پپتید خالص شده دارای توالی TFCGRHK و وزن ملکولی ۸۶۱/۶ دالتون بود. این پپتید به عنوان جذب‌کننده رادیکال DPPH و هیدروکسیل و پراکسیداسیون لیپید و آسیب به DNA را مهار می‌کند. این پپتید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی شامل کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز در رت افزایش داد (۳۸). در مطالعه دیگری، خالص‌سازی و جداسازی یک پپتید آنتی‌اکسیدانتی از هیدرولیز پروتئین صدف آبی صورت گرفته است. در این تحقیق پروتئین‌های صدف با استفاده از چهار آنزیم پروتئاز پپسین، پاپائین، نوترئاز و آلکالاز هیدرولیز شدند. بعد از اولترافیلتراسیون و ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی HPLC یک پپتید آنتی

اکسیدانتی جدید با توالی YPPAK و وزن ملکولی ۵۷۴ دالتون شناسایی شد. این پپتید با فعالیت بالای جذب رادیکال‌های DPPH، هیدروکسیل و سوپر اکسید (به ترتیب IC₅₀ ۲/۶۲، ۰/۲۲۸ و ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) گزارش گردید (۳۹). پپتید متصل شده به نانو ذره اکسید سربوم در تحقیق ما دارای IC₅₀ کمتری در مقایسه با این پپتید است. فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانتی پپتید متصل شده به نانو ذره اکسید سربوم به دلیل حضور آمینو اسیدهای آبگریز مانند: فنیل آلانین و لوسین می‌باشد. خالص‌سازی یک پپتید جدید دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی از هیدرولیزات پوست bullfrog انجام شد. در این مطالعه ابتدا پروتئین پوست bullfrog توسط آنزیم‌های آلکالاز، نوترئاز، پپسین، پاپائین، کیموتریپسین و تریپسین هیدرولیز شد. به منظور خالص‌سازی بیشتر از سیستم‌های کروماتوگرافی پی در پی کروماتوگرافی تعویض آنیونی و ژل فیلتراسیون و در انتها HPLC یک پپتید با فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانتی جدا شد. توالی این پپتید با دستگاه اسپکتروسکوپی جرمی شناسایی شد. این پپتید دارای توالی LEELEEELEGCE و وزن ملکولی ۱۴۸۷ دالتون است. این پپتید آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون لیپید را بیشتر از α-توکوفرول به عنوان کنترل مثبت مهار می‌کند. این پپتید رادیکال DPPH را با IC₅₀=۱۶/۱ میکرومولار و رادیکال هیدروکسیل با IC₅₀=۱۲/۸ میکرومولار، رادیکال سوپراکسید با IC₅₀=۳۴ میکرومولار و رادیکال پراکسیل با IC₅₀=۳۲/۶ میکرومولار جذب کرد. علاوه بر این‌ها سنجش MTT نشان داد که این پپتید بر روی سلول‌های فیبروبلاست ریه انسانی (MRC-5) هیچ سمیتی ندارد (۴۰).

در یک مطالعه دیگر، اثر آنتی‌اکسیدانی پپتید آنتی‌اکسیدین-RL استخراج شده از پوست وزغ اودورانا لیوید انجام شده، در این مطالعه اثر پپتید آنتی‌اکسیدین-RL بر حذف رادیکال ABTS مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن به قرار زیر بود. هم پپتید و هم آنتی‌اکسیدان استاندارد یعنی BHT فعالیت قوی در حذف رادیکال ABTS از خود نشان دادند. فعالیت پپتید به دو مرحله قابل تقسیم بود. مرحله اول طی ۵ ثانیه

گلوکاتینون که یک تری پپتید آنتی اکسیدانت طبیعی است به عنوان ترکیب استاندارد استفاده شد. در همه آزمایش های صورت گرفته، اهم از DPPH، ABTS و رادیکال هیدروکسیل و سوپراکسید، گلوکاتینون اثرات ضد اکسیداسیون بالاتری از پپتید متصل شده به نانوذره اکسید سربوم نشان داد.

خصوصیات آنتی اکسیدانتی اکسید سربوم نیز در چند مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه ای که روی آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط H_2O_2 بر روی سلول های اندوتلیال انجام گرفت، نشان داده شد که اکسید سربوم به صورت کارآمدی این آسیب را کاهش می دهد. هم چنین مشخص شد که در این سلول ها آپوپتوز قویاً توسط نانو ذرات اکسید سربوم کاهش پیدا کرده است (۳). مشخص شده است که استرس اکسیداتیو با پیشرفت بیماری های تجزیه عصبی همانند آلزایمر و پارکینسون در ارتباط است. در مطالعه ای از آنتی بادی متصل به نانو ذره اکسید سربوم برای هدف یابی پلاگ های $A\beta$ مرتبط با آلزایمر استفاده شد. این مطالعه نشان داد که افزایش بقای سلول های نورونی با کاهش آسیب اکسیداتیو و بر اثر خاصیت آنتی اکسیدانتی اکسید سربوم مرتبط بوده است (۸).

نتایج پیشنهاد می کند که این پپتید متصل شده به نانو ذره می تواند به عنوان آنتی اکسیدانت در بسیاری از جنبه های بالینی مورد استفاده قرار گیرد. هر چند مطالعات بیشتر در سیستم vivo ضرورت دارد.

اول که فعالیت سریع تری داشت و مرحله پس از ۵ ثانیه که سرعت آهسته ای داشت. پپتید در غلظت ۳ میکرومولار فعالیت قوی تر نسبت به BHT داشت و بالغ بر ۷۵ درصد از رادیکال های ABTS پس از ۵ ثانیه حذف شد (۴۱).

خالص سازی و تعیین ویژگی های بیوشیمیایی پپتید آنتی اکسیدانتی جدا شده از پروتئین احشاء اسب ماهی (horse mackerel) انجام شد. در این مطالعه یک پپتید با فعالیت بالای آنتی اکسیدانتی از پروتئین احشاء اسب ماهی جدا شد. هضم معده روده ای در شرایط *in vitro* برای به دست آوردن هیدرولیزات به کار گرفته شد. سپس کروماتوگرافی پی در پی شامل FPLC و کروماتوگرافی تعویض آنیونی و ژل فیلتراسیون G-25 انجام شد. توالی پپتید با اسپکتروسکوپی جرمی ACFL و وزن ملکولی ۵۱۸ دالتون به دست آمد. و فعالیت بالای در برابر پراکسیداسیون اسیدهای چرب بیشتر از آنتی اکسیدانت طبیعی α -توکوفرول نشان داد (۴۲). تحلیل کلی در مورد این تحقیق نشان داد پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سربوم با قدرت بالایی رادیکال های آزاد را جذب و توانست اکسیداسیون لیپیدها را نیز مهار کند. بررسی های ما نشان می دهد که تاکنون هیچ گونه مطالعه در خصوص مطالعه خواص آنتی اکسیدانی یک پپتید با نانو ذرات انجام نشده است. از این روی نمی توان نتایج یافته های این تحقیق را یا نتایج مرتبط در این زمینه مقایسه کرد. در عین حال، از

References

- Otsuka K, Wang Y, Sunada E, Yamanaka I. Direct Partial Oxidation of Methane to Synthesis Gas by Cerium Oxide. *J CATAL* 1998;175:152-60.
- Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of Cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 2011;3:1411-20.
- Karakoti A, Singh S, Dowding JM, Seal S, Self WT. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2010;39:4422-32.
- Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from

- apoptosis induced by oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 2013;154:156-66.
- Chigurupati S, Mughal MR, Okun E, Das S, Kumar A, McCaffery M, et al. Effects of Cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials* 2013;34:2194-201.
- Giri S, Karakoti A, Graham RP, Maguire JL, Reilly CM, Seal S, et al. Nanoceria: A rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. *Plos One* 2013;8:54578.
- Cimini A, Dangelo B, Das S, Gentile R, Benedetti E, Singh V, et al. Antibody-

- conjugated pegylated Cerium oxide nanoparticles for specific targeting of A β aggregates modulate neuronal survival pathways. *Acta Biomater*2012;8:2056-67.
8. Bhargava N, Das M, Karakoti AS, Patil S, Kang JF, Stancescu M, et al. Regeneration of adult mice motoneurons utilizing a defined system and anti-oxidant nanoparticles. *J Nanoneurosci*2009;1:130-43.
9. Celardo I, Traversa E, Ghibelli L. Cerium oxide nanoparticles a promise for applications in therapy. *J Exp Ther Oncol*2011;9:47-5.
10. Das S, Singh S, Dowding JM, Oommen S, Kumar A, Sayle TXT, et al. The induction of angiogenesis by Cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments. *Biomaterials*2012;33:7746-55.
11. Wong LL, Hirst SM, Pye QN, Reilly CM, Seal S, McGinnis JF. Catalytic nanoceria are preferentially retained in the rat retina and are not cytotoxic after intravitreal injection. *Plos ONE*2013;8:58431.
12. Taheri A, Sabeenafarvin KH, Jacobsen C, Baron CP. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chem*2014;142:318-26.
13. Binsan W, Benjakul S, Visessanguan W, Roytrakul S, Tanaka M, Kishimura H. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chem*2008;106:185-93.
14. Cervato G, Cazzola R, Cestaro B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int J Food Sci Nutr*1999;50:291-6.
15. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of Histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a Soybean protein. *J Agric Food Chem*1998;46:49-53.
16. Leite JR, Silva LP, Rodrigues MI, Prates MV, Brand GD, Lacava BM, et al. Phylloseptins a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* 2005;26:565-73.
17. Simmaco M, Mignogna G, Barra D, Bossa F. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Lett*1993;324:159-61.
18. Bradbury J. Frog skin hope for HIV prevention. *Drug Discov Today* 2005;10:1489-90.
19. Montecucchi PC, de Castiglione R, Erspamer V. Identification of dermorphin and Hyp6-dermorphin in skin extracts of the Brazilian frog *Phyllomedusa rhodei*. *Int J Pept Protein Res*1981;17:316-21.
20. Nasim H, Fereshteh G, Michael T. Biosystematic study of *Anura* in the Markazy Province of central Iran. *Pak J Biol Sci* 2007; 10:1321-5.
21. Ghavami S, Asoodeh A, Klonisch T, Halayko AJ, Kadkhoda K, Krocak TJ, et al. Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *J Cell Mol Med*2008;12:1005-22.
22. Asoodeh A, Haghparast A, Kashef R, Chamani J. Pro-inflammatory cytokine responses of A549 epithelial cells to antimicrobial peptide Brevinin-2R. *Int J Pept Res Ther*2013;19:157-62.
23. Darroudi M, Sarani M, Kazemi Oskuee R, Khorsand Zak A, Hosseini HA, Gholami L. Green synthesis and evaluation of metabolic activity of starch mediated nanoceria. *Ceram Int*2014;40:2041-5.
24. Patil S, Kuiry SC, Seal S, Vanfleet R. Synthesis of nanocrystalline ceria particles for high temperature oxidation resistant coating. *J Nanopart Res*2002; 4:433-438.
25. Cimini A, Dangelo B, Das S, Gentile R, Benedetti E, Singh V, et al. Antibody-conjugated pegylated cerium oxide nanoparticles for specific targeting of Abeta aggregates modulate neuronal survival pathways. *Acta Biomater* 2012; 8:2056-67.
26. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*2008;48:430-41.
27. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*2007;18:163-9.
28. Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Pept Sci* 1997;43:99-117.
29. Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T, Yoshikawa M. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean beta-conglycinin, is

- an fMLP agonist. FEBS Lett 2003;540:206-10
30. Boman HG. Antibacterial peptides key components needed in immunity. Cell 1991;65:205-7.
31. Chang K-J, Blanchard SG, Cuatrecasas P. Unmasking of magnesium-dependent high-affinity binding sites for DAla², DLeu⁵enkephalin after pretreatment of brain membranes with guanine nucleotides. Proc Natl Acad Sci 1983;80:940-4.
32. Fukudome SI, Yoshikawa M. Gluten exorphin C: a novel opioid peptide derived from wheat gluten. FEBS letters 1993;316:17-9.
33. Zhang J, Zhang H, Wang L, Guo X, Wang X, Yao H. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. Food Chem 2010;119:226-34.
34. Byun HG, Kim SK. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. Process Biochem 2001;36:1155-62.
35. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007; 18: 567-79
36. Ukeda H, Hasegawa Y, Harada Y, Sawamura M. Effect of carnosine and related compounds on the inactivation of human Cu, Zn-superoxide dismutase by modification of fructose and glycolaldehyde. Biosci Biotechnol Biochem 2002; 66:36-43.
37. Gardner ML. Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet-a neglected field? Biol Rev Camb Philos Soc 1984; 59:289-331.
38. Mendis E, Rajapakse N, Byun HG, Kim SK. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sci 2005;77:2166-78.
39. Wang B, Li L, Chi CF, Ma JH, Luo HY, Xu YF. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. Food Chem 2013;138:1713-9.
40. Qian ZJ, Jung WK, Kim SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresour Technol 2008;99:1690-8.
41. Yang X, Lee WH, Zhang Y. Extremely Abundant Antimicrobial Peptides Existed in the Skins of Nine Kinds of Chinese Odorous Frogs. J Proteome Res 2011;11:306-19.
42. Sampathkumar NS, Nazeer RA, Jaiganesh R. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. Peptides 2011;32:1496-501.



Antioxidant Properties of Brevinin-2R Peptide Conjugated with Cerium Oxide Nanoparticle

Homayounitabrizi M^{1*}, Asoodeh A², Mashreghi M³, Rezazadebazaz M⁴, Darroudi M⁵, Kazemioskuee R⁵

(Received: January 5, 2015 Accepted: June 6, 2015)

Abstract

Introduction: Peptide Brevinin-2R has been isolated from frog *Ranaridibunda* skin secretions. This peptide has anti-bacterial and anti-cancer properties. Cerium oxide (CeO₂, ceria) is a lanthanide metal oxide which has the ability to participate in the reduction and oxidation reactions. In this study, antioxidant properties of cerium oxide nanoparticles conjugated with the peptide Brevinin 2R were measured.

Materials & methods: Cerium oxide nanoparticles were synthesized in starch solution. Then, the surface of cerium oxide nanoparticles was functionalized with amine and conjugated with peptide Brevinin-2R. Furthermore, antioxidant activity of cerium oxide nanoparticles conjugated with peptide was evaluated by scavenging of DPPH, ABTS, and hydroxyl and superoxide radicals. Also, inhibition of linoleic acid oxidation was investigated.

Findings: The results showed that cerium oxide nanoparticles conjugated with peptide inhibits oxidation of linoleic acid and also served as radical scavenging of DPPH (IC₅₀=0.2 mg/ml), ABTS (IC₅₀=0.54 mg/ml), superoxide (IC₅₀=0.078 mg/ml) and hydroxyl (IC₅₀=0.1 mg/ml).

Discussion & Conclusions: The results showed that cerium oxide nanoparticles conjugated with Brevinin-2R peptide isolated from frog skin had a strong antioxidant activity. Its antioxidant activity is probably because of presence of amino acids such as cysteine, phenylalanine, and hydrophobic amino acids including leucine and alanine. The antioxidant properties of peptide conjugated nanoparticle could be due to the presence of cerium oxide.

Keywords: Peptide, Antioxidant activity, Cerium oxide nanoparticles

1. Dept of Biochemistry and Biophysics, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

2. Dept of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Nanotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4. Dept of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

5. Dept of Modern Sciences and Technologies, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* Correspondin author Email: mhomayouni6@gmail.com