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

مسعود همایونی تبریزی[1*]، احمد آسوده[2]، محمد مشرقی[3]، ماهره رضازاده بزاز[4]، مجید درودی[5]، رضا کاظمی اسکویی[5]

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: ۹٤/۳/۱٦**

چکیده

مقدمه: پپتید بروینین ۲آر یک پپتید کاتیونیک است که از ترشحات غدد پوستی قورباغه مردابی Rana ridibunda استخراج شده است. این پپتید دارای خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی است و دارای توالی KLKNFAKGVAQSLLNKASCKLSGQC است. نانوذرات اکسید سریوم(نانوسریا) شکل اکسید شده عنصر کمیاب سریوم 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 سریم بررسی شد. اکسید سریوم(CeO_2، سریا) یکی از اکسیدهای فلزی لانتانید است که توانایی شرکت در واکنش های اکسایش و احیاء دارد.

مواد و روش ها: نانو ذرات اکسید سریوم در محلول نشاسته ستز شدند. در مرحله بعد گروه عاملی آمین به سطح نانو ذرات متصل گردید و سپس پپتید به نانو ذره اکسید سریوم 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($OH^{\circ-}$) و سوپراکسید($O_2^{\circ-}$) و مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید سنجش شد.

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

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سریم 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 آبگریز شامل لوسین و آلانین باشد. خصوصیات آنتی اکسیدانتی پپتید متصل به نانو ذره اکسید سریوم هم چنین به دلیل وجود سریوم باشد.

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

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

Email: mhomayouni6@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

مقدمه

اکسید سریوم(CeO_2، سریا) یکی از اکسیدهای فلزی لانتانید است که به داشتن پتانسیل اکسایش- کاهش معروف است(۱). نانو ذرات اکسید سریوم (نانوسریا) شکل اکسید شده عنصر کمیاب سریوم 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 می توانند به عنوان جاروب کننده های گونه های اکسیژن واکنش پذیر(ROS) در بسیاری از زمینه های بیولوژیک عمل کنند(۲،۳). این ویژگی اکسید سریوم در مقیاس نانو به دلیل نسبت بیشتر سطح به حجم در نانو ذرات افزایش می یابد 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) می باشد. در هر صورت تحقیقات در مورد کاربردهای زیستی نانوسریا سریعاً در حال گسترش است(۹). مثال های بسیاری از کاربردهای احتمالی آن در تحقیقات یافت می شود. این طور نشان داده شده است که نانو ذرات سریوم به وسیله تعدیل کردن محیط داخل سلولی اکسیژن روی آنژیوژنز اثر مثبتی دارند(۱۰). علاوه بر این نانو ذرات اکسید سریوم با کاهش سطح ROS اثری درمانی در پاتولوژی شبکیه 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 ماهی ها و هم چنین در گیاهان یافت می شوند(۱۲). بسیاری از این پپتیدها دارای خواص آنتی اکسیدانت هستند(۱۵-۱۳). علاوه بر منابع تغذیه ای، پپتیدهای فعال زیستی در ترشحات و سموم بسیاری از حیوانات یافت می شود. 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.

قورباغه مردابی گونه Rana ridibunda یکی از گونه های دوزیست است که به فراوانی در کشور ایران یافت می شود(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 پاسخ های التهابی است(۲۲). هدف از مطالعه حاضر اتصال پپتید Brevinin 2R به نانو ذره اکسید سریوم به منظور مطالعه اثرات آنتی اکسیدانتی ترکیب حاصل است.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، ترکیب 2, 2-Dipheny-l-picrylhydrazyl (DPPH)، فنانترولین، گلوتاتیون احیاء شده، محلول ABTS2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline- 6 -sulphonic acid) و کلرید آهن $FeCl_2$(II) از شرکت سیگما- آلدریش آمریکا و تری کلرواستیکاسید، اتانول، EDTA و استونیتریل از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

در این پژوهش، نانو ذرات اکسید سریوم(IV) به روش سل-ژل با لحاظ کردن قوانین شیمی سبز سنتز گردید. از نیترات سریوم و نشاسته به ترتیب عنوان منبع تامین کننده کاتیون های سریوم(III) و عامل محدود کننده اندازه استفاده گردید. به منظور سنتز نانو ذرات اکسید سریوم، ۰/۲ گرم پودر نشاسته در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و برای رسیدن به محلول شفافی از نشاسته به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد هم زده شد. در همین منوال، مقدار مورد نیاز محلول نیترات سریوم 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 سانتریفیوژ شده و چندین بار با استن و آب به منظور حذف نیترات، آمونیاک و ناخالصی های آلی شسته شد و سپس در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

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 سریوم متصل شد.

اتصال پپتید Brevinin 2R به نانو ذره اکسید سریوم: ابتدا، گروه عاملی آمین بر طبق روش Patil و همکاران به سطح نانو ذرات اکسید سریوم متصل گردیدند. به طور خلاصه، ۲۵۰ میلی گرم از نانو ذرات اکسید سریوم 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 سریوم 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 وو و همکاران 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} (IC_{50} غلظت مورد نیازبرای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی اکسیدانتی 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.

$$\text{درصدجذب رادیکال} = 100 \times \left(\frac{\text{جذب}_{\text{واکنش}} - \text{جذب}_{\text{پاشک}}}{\text{جذب}_{\text{پاشک}}} \right)$$

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

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 گلوتاتیون 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.

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

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 $OH^{\cdot}$: در این آزمایش، رادیکال های هیدروکسیل در سیستم فنانترولین/ H_2O_2/EDTA تولید شد و حذف آن توسط پپتید اندازه گیری شد. روش کار به صورت زیر انجام شد.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

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 فنانترولین 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=۷/۴ آماده شد، سپس ۶۰۰ میکرولیتر از نمونه پپتیدی با غلظت ۱ میلی‌گرم 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).

درصد فعالیت حذف رادیکال های هیدروکسیل $= (A_S - A_0) \times 100 / (A_C - A_0)$

در رابطه بالا 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.

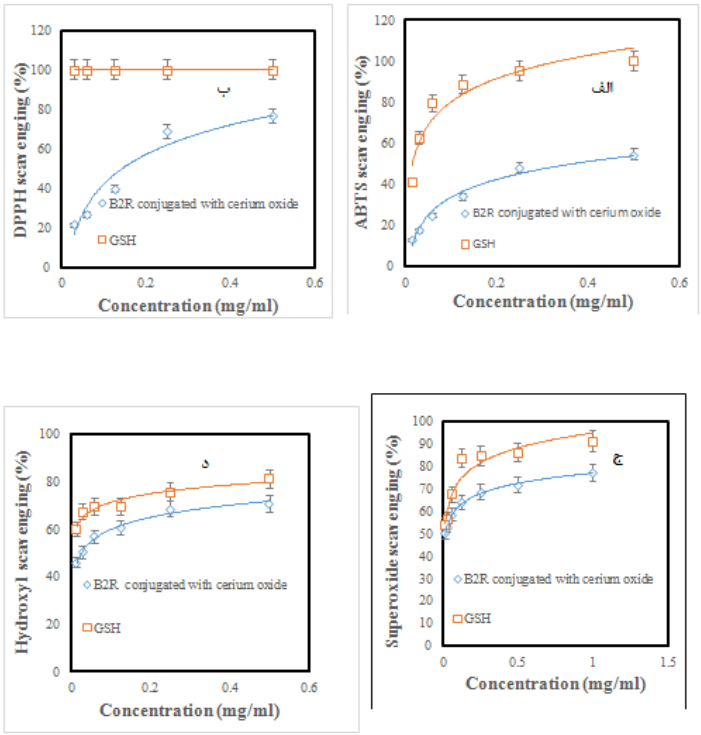
سنجش فعالیت جذب رادیکال سوپر اکسید: این سنجش با استفاده از روش پونال انجام شد(۱۴). ۸۰ میکرولیتر از پپتید یا آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد با ۸۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار pH=۸/۳ به داخل پلیت ۹۶ چاهک ریخته شد. ۴۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول در ۱۰HCl میلی مولار به هر چاهک اضافه شد. جذب پس از ۴ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنتی اکسیدانت در حضور و غیاب پیروگالول و پپتید از رابطه زیر محاسبه شد.

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

یافته های پژوهش

خصوصیات آنتی اکسیدانتی پپتید Brevinin 2R متصل شده به نانو ذره اکسید سریوم 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 سریوم را در مقایسه با گلوتاتیون 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 سریوم میزان خذف رادیکال های مذبور افزایش یافت(شکل شماره ۱.ب، ج، د). میزان IC_{50}(برحسب میلی گرم بر میلی لیتر) فعالیت آنتی اکسیدانی 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]



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

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق پپتید بروینین-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 بروینین-2R- برای اتصال به نانو ذره اکسید سریوم استفاده شد. و فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیب کونجوگه در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

پپتیدهای فعال زیستی، توالی های 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 آن ها می توانند نقش های مختلفی مانند خواص ضد سرطان(۲۶،۲۷)، شبه مخدری(۲۸)، تعدیل سیستم ایمنی(۲۹)، ضد میکروبی(۳۰)، آنتی اکسیدانی(۳۱)، ضد تشکیل لخته(۳۲)، کاهش سطح کلسترول(۳۳) و مهار فشار خون بالا(۳۴) را ایفا کنند. رادیکال های آزاد که به صورت فیزیولوژیک تولید می شوند، می توانند فعالیت های مختلفی مانند نقش سیگنالینگ و اثر حفاظتی در مقابل عفونت را داشته باشند با این حال مقدار مازاد رادیکال های آزاد می تواند باعث آسیب سلولی شود که متعاقباً به ایجاد بیماری های مختلف نظیر سرطان، دیابت، آترواسکلروز، آسم و هم چنین بیماری های نورودژنراتیو، ایسکمی ناشی از برقراری مجدد جریان خون، آرتریت، و بیماری های التهابی منتهی می گردد(۳۵).

بر اساس نظریه رادیکال های آزاد رشد یافته توسط Denham Harman وقتی رادیکال های آزاد روی هم انباشته می شوند اندامک ها در سلول ها پیر می شوند و به صورت مداوم باعث ایجاد آسیب می شود. به طور کلی گونه های واکنشی می توانند باعث آسیب به پروتئین ها، DNA، اکسیداسیون غشاء

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

فسفولیپیدها و تغییر در لیپوپروتئین های با چگالی کم(LDL) شود(۳۶). تحت شرایط عادی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی می تواند گونه های واکنشی را توسط آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی حذف کند، آنتی اکسیدان های آنزیمی مثل سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی مثل ویتامین های آنتی اکسیدان، عنصرها، کوآنزیم و کوفاکتورها. با این حال زمانی که سیستم دفاعی درونی برای جلوگیری از گونه های رادیکالی آزاد بدن شکست می خورد این نتایج باعث استرس اکسیداتیو می شود. این دلایل باعث به وجود آمدن نیاز به آنتی اکسیدان های(سنتزی) و آنتی اکسیدان های طبیعی می شود که می توانند از استرس اکسیداتیو و اثر زیان آور آن جلوگیری کنند. آنتی اکسیدان های سنتزی مقرون به صرفه هستند، ولی آثار سمی و خطرناکی را در مسائل بیوشیمی و تغذیه انسان نشان می دهند(۳۷).

آنتی اکسیدان های 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 آنتی اکسیدانت های طبیعی هستند. در یک مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی vitroin و vivoin پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین های عضله وزغ انجام شد، که هدف از آن جداسازی و شناسایی پپتیدهای دارای فعالیت بالای آنتی اکسیدانتی 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 جذب کننده رادیکال DPPH و هیدروکسیل و پراکسیداسیون لیپید و آسیب به DNA را مهار می کند. این پپتید فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی شامل کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در رت افزایش داد(۳۸). در مطالعه دیگری، خالص سازی و جداسازی یک پپتید آنتی اکسیدانتی از هیدرولیز پروتئین صدف آبی صورت گرفته است. در این تحقیق پروتئین های صدف با استفاده از چهار آنزیم پروتئاز پپسین، پاپایین، 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 رادیکال های DPPH، هیدروکسیل و سوپر اکسید(به ترتیب IC_{50} ۲/۶۲، ۰/۲۲۸ و ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) گزارش گردید(۳۹). پپتید متصل شده به نانو ذره اکسید سریوم در تحقیق ما دارای IC_{50} کمتری در مقایسه با این پپتید است. فعالیت بالای آنتی اکسیدانتی پپتید متصل شده به نانو ذره اکسید سریوم به دلیل حضور آمینو اسیدهای آبگریز مانند: فنیل آلانین و لوسین می باشد. خالص سازی یک پپتید جدید دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی از هیدرولیزات پوست bullfrog انجام شد. در این مطالعه ابتدا پروتئین پوست bullfrog توسط آنزیم های آلکالاز، نوترئاز، پپسین، پاپائین، کیموتریپسین و تریپسین هیدرولیز شد. به منظور خالص سازی بیشتر از سیستم های کروماتوگرافی پی در پی کروماتوگرافی تعویض آنیونی و ژل فیلتراسیون و در انتها HPLC یک پپتید با فعالیت بالای آنتی اکسیدانتی جدا شد. توالی این پپتید با دستگاه اسپکتروسکوپی جرمی شناسایی شد. این پپتید دارای توالی LEELEEELEGCE و وزن ملکولی ۱۴۸۷ دالتون است. این پپتید آنتی اکسیدان، پراکسیداسیون لیپید را بیشتر از α-توکوفرول به عنوان کنترل مثبت مهار می کند. این پپتید رادیکال DPPH را با IC_{50}=۱۶/۱ میکرومولار و رادیکال هیدروکسیل با IC_{50}=۱۲/۸ میکرومولار، رادیکال سوپراکسید با IC_{50}=۳۴ میکرومولار و رادیکال پراکسیل با IC_{50}=۳۲/۶ میکرومولار جذب کرد. علاوه بر این ها سنجش MTT نشان داد که این پپتید بر روی سلول های فیبروبلاست ریه انسانی(MRC-5) هیچ سمیتی ندارد(۴۰).

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

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 سریوم 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 آکسیدانی یک پپتید با نانو ذرات انجام نشده است. از این روی نمی توان نتایج یافته های این تحقیق را با نتایج مرتبط در این زمینه مقایسه کرد. در عین حال، از گلوتاتیون 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، گلوتانیون اثرات ضد اکسیداسیون بالاتری از پپتید متصل شده به نانوذره اکسید سریوم نشان داد.

خصوصیات آنتی اکسیدانتی اکسید سریوم 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 اندواتلیال انجام گرفت، نشان داده شد که اکسید سریوم به صورت کارآمدی این آسیب را کاهش می دهد. هم چنین مشخص شد که در این سلول ها آپوپتوز قویاً توسط نانو ذرات اکسید سریوم 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 سریوم برای هدف یابی پلاگ های Aβ 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 سریوم 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 vivoin ضرورت دارد.

References

1.Otsuka K, Wang Y, Sunada E, Yamanaka I. Direct Partial Oxidation of Methane to Synthesis Gas by Cerium Oxide. J CATAL1998;175:152-60.

2.Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of Cerium oxide nanoparticles. Nanoscale2011;3:1411-20.

3.Karakoti A, Singh S, Dowding JM, Seal S, Self WT. Redox-active radical scavenging nanomaterials. Chem Soc Rev2010;39:4422-32.

4.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 Res2013;154:156-66.

5.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.

6.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 One2013;8:54578.

7.Cimini A, Dangelo B, Das S, Gentile R, Benedetti E, Singh V, et al. Antibody-

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

conjugated pegylated Cerium oxide nanoparticles for specific targeting of Aβ aggregates modulate neuronal survival pathways. Acta Biomater2012;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 Nanoneurosci2009;1:130-43.
9.Celardo I, Traversa E, Ghibelli L. Cerium oxide nanoparticles a promise for applications in therapy. J Exp Ther Oncol2011;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. Biomaterials2012;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 ONE2013;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 Chem2014;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 Chem2008;106:185-93.
14. Cervato G, Cazzola R, Cestaro B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. Int J Food Sci Nutr1999;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 Chem1998;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 Lett1993;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 Res1981;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, Kroczak 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 Med2008;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 Ther2013;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 Int2014;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 Res2002; 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 Nutr2008;48:430-41.
27.Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Curr Opin Biotechnol2007;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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

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 Sci1983;80:940-4.
32.Fukudome SI, Yoshikawa M. Gluten exorphin C: a novel opioid peptide derived from wheat gluten. FEBS letters1993;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 Chem2010;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 Biochem2002; 66:36-43.
37.Gardner ML. Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet-a neglected field? Biol Rev Camb Philos Soc1984; 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 Sci2005;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 Technol2008;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 Res2011;11:306-19.
42.Sampathkumar NS, Nazeer RA, Jaiganesh R. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (Magalaspis cordyla) viscera protein. Peptides2011;32:1496-501.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]

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

Homayounitabrizi M[1], Asoodeh A[2], Mashreghi M[3], Rezazadebazaz M[4], Darroudi M[5], Kazemioskuee R[5]*

(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 (CeO_2, 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 (IC_{50}=0.2 mg/ml), ABTS (IC_{50}=0.54 mg/ml), superoxide (IC_{50}=0.078 mg/ml) and hydroxyl (IC_{50}=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*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-07]