



## استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس در بررسی اثرات اکسیدانی پارتنولید بر رده سلولی سرطان ملانوما شبه بنیادی A2058

زهرا درستگو<sup>۱</sup>، ملیحه سادات حسینی<sup>۲\*</sup>، افسانه بهرامی<sup>۳</sup>، راحله ژبانی<sup>۲</sup>، مهناز محتشمی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوشیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

<sup>۲</sup> گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

<sup>۳</sup> واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان امام رضا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۴</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۴/۰۴/۲۵، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۴/۰۵/۰۳

### چکیده

مطالعه‌ی ملانوما پوست یکی از سرطان‌های کشنده است و مقاومت در برابر درمان در مراحل پیشرفته از چالش‌های اصلی است؛ پارتنولید به‌عنوان یک مولکول کوچک ضدسرطان با پتانسیل درمانی در ملانوما که نیاز به بررسی بیشتر دارد. در این مطالعه بررسی‌های مختلفی از جمله سمیت سلولی، آپوپتوز، آنالیز چرخه سلولی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، در سلول‌های تحت درمان با پارتنولید بود. تست ROS برای بررسی اثرات اکسیدانی پارتنولید که می‌تواند در آپوپتوز نقش داشته باشد انجام شد. همچنین، کامبینیشن بین پارتنولید و داکاربازین، یک داروی شیمی‌درمانی برای درمان سرطان پوست، نیز ارزیابی شد. نتایج نشان داد که با غلبه بر سلول‌های ملانوما A2058 به شیوه وابسته به دوز و زمان، ترکیب پارتنولید می‌تواند به طور قابل توجهی از زنده ماندن این سلول‌ها کاسته شود. علاوه بر این، در مقایسه با سلول‌های نرمال L929 (IC<sub>50</sub>: 27 میکرومول بعد از ۲۴ ساعت)، سلول‌های ملانوما A2058 حساسیت بیشتری نسبت به پارتنولید داشتند (IC<sub>50</sub>: 20 میکرومول بعد از ۲۴ ساعت). پارتنولید تولید ROS را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروفتومتر فلورسانس، پارتنولید، تست ROS، آپوپتوز، ملانوما A2058

### ۱. مقدمه

ملانوما پوستی از تهاجم‌پذیرترین و مقاوم‌ترین سرطان‌های پوستی است که با نرخ‌های بالای متاستاز و مقاومت به درمان‌های استاندارد همراه است. در رده‌های سلولی ملانومایی شبه‌بنیادی مانند A2058، اختلال‌های سیگنال‌دهی مربوط به استرس اکسایشی و

\*عهده دار مکاتبات: ملیحه سادات حسینی

نشانی: گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

پست الکترونیک: malihesadat.hosseiny@iaau.ac.ir

تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۴۲۸۹

بازسازی واکنش‌های دفاعی سلول، به تصمیم‌گیری‌های بقای سلولی منجر می‌شود. به طور خاص، تغییرات در رده‌های سیگنال‌دهی با پاسخ‌های اکسیداتی استرسی هم‌چون ROS (Reactive Oxygen Species) محور و مسیرهای بقای مرتبط با غشای فسفولیپیدی و پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز، می‌تواند سمت‌گیری‌های زیستی سلول را به سمت بقا یا مرگ هدایت کند. این فاکتورها، به‌ویژه در زمینه‌های درمانی که هدف‌گیری استرس اکسایشی یا پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی را هدف می‌گیرند، اهمیت بالینی دارند [۴-۱].

پارتنولید، یک ترکیب اکسیداتی قابل توجه، به واسطه ایجاد شوک‌های اکسایشی محدود یا تغییر در دینامیک‌های redox cellula می‌تواند به تغییرات قابل اندازه‌گیری در میزان بقا، آپوپوز یا مرزبندی سیگنال‌دهی منجر شود. در چارچوب اکسیداتی فلاورسانس، این اثرات قابل تفکیک‌اند: (۱) تولید ROS و تغییر در نرخ اکسی‌شناسی داخلی، (۲) تغییرات در Integrity و کارکرد غشای سلولی از طریق اکسیداسیون لیپیدها، (۳) فعال‌سازی یا خاموشی مسیرهای پاسخ به استرس مانند MAPK، Nrf2-ARE، و PI3K/Akt که به تصمیم‌گیری سلولی در برابر آسیب اکسیداتی اثر می‌گذارند.

ملانوما پوستی مولد متاستاز شدید است که با گسترش سلول‌های سرطانی به گره‌های لنفاوی، بالاترین نرخ مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان پوست را ایجاد می‌کند. این بیماری بیش از بسیاری از سرطان‌ها، تاثیر قابل توجهی بر افراد جوان دارد و در آمریکا یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان جوانان به‌ویژه زنان جوان است [۵، ۶].

تحول ملانوسیت‌ها به سلول‌های توموری که در ملانوما ایجاد می‌شود، به خوبی درک نشده است و تحقیقات ژنتیکی در حال ادامه است، با این حال، عوامل خطر مختلفی که در این فرآیند نقش دارند شناخته شده‌اند، از جمله سوابق خانوادگی، افزایش سن، پوست روشن، نور UV، تغییرات ژنتیکی، غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب کننده تومور، فعال شدن اونکوژن‌ها و اختلال در تعمیر DNA. اثر نور UV به عنوان عاملی در توسعه ملانوما خوب شناخته شده و به‌طور خاص به عنوان بخش اصلی از پاتوژنز بیماری تأکید شده است. سازمان بهداشت جهانی، تابش خورشید و اشعه UV را به عنوان کارسینوژن‌های گروه ۱ دسته‌بندی کرده است. تابش UV آسیب DNA، سرکوب ایمنی، موتاسیون‌های ژنتیکی، پاسخ‌های التهابی و تولید ROS را ایجاد می‌کند، که همه می‌توانند عملیات پیری پوست و کارسینوژنز را افزایش دهند [۷-۱۰].

ROS می‌تواند موجب التهاب شود؛ میتوکندری به‌عنوان منبع اصلی ROS نقش کلیدی ایفا می‌کند. تولید بیش از حد ROS، فرایند میتوفاژی را که وظیفه حذف میتوکندری‌های معیوب را بر عهده دارد مختل می‌کند و این امر منجر به افزایش ROS و شدت التهاب می‌شود. سلول‌های با میتوکندری ناقص در معرض آپوپتوز ROS وابسته قرار می‌گیرند.

رادیکال‌های آزاد به طور مستمر تولید می‌شوند و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برای خنثی‌سازی آن‌ها وجود دارند؛ اختلال در این تعادل منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. در حالت طبیعی، مسیرهای آنتی‌اکسیدانی فعال می‌شوند تا ROS را کاهش دهند؛ شکست این فرایند می‌تواند منجر به آسیب سلولی و مرگ سلولی شود. فاکتورهای کلیدی NF-κB توسط ROS فعال می‌شود و فرایندهای

التهابی را آغاز می‌کند. مسیرهای FOXO2 نیز در پاسخ به ROS فعال می‌شوند تا با افزایش بیان آنزیم‌هایی مانند SOD، ROS را کاهش دهند [۱۱ و ۱۲].

بنابراین تعادل بین اکسیدان و آنتی‌اکسیدان برای حفظ عملکرد نرمال سلول ضروری است و افزایش قابل توجه اکسیدان‌ها با پاتوژن بیماری‌ها ارتباط دارد.

پارتنولید یک لاکتون از خانواده Sesquiterpenes است که می‌تواند مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی القا کند و سلول‌های سالم را محافظت کند و در غلظت‌های مشخص، بقای سلول‌های سرطانی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد [۱۳].

Schnyder و همکاران نشان دادند که پارتنولید فعالیت USP7 و سیگنالینگ WNT/ $\beta$ -catenin را مهار می‌کند. آپوپتوزی که توسط پارتنولید ایجاد می‌شود، پیش از اینکه اتفاق بیافتد، با کاهش سطوح تیول‌های داخل سلولی، از جمله گلوکوتاتیون آزاد (GSH) و تیول‌های پروتئین، و تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) همراه است [۱۴]. D'Anneo و همکاران نشان دادند پارتنولید می‌تواند اتوفازی را تحریک کند که توسط ROS شروع می‌شود [۱۵]. پارتنولید به عنوان یک عامل هیپومتیلاسیون DNA گزارش شده است که به عنوان مهارکننده بیان و فعالیت DNA متیل ترانسفراز DNMT1 عمل می‌کند [۱۶ و ۱۷].

پارتنولید به عنوان کاندیدا برای ملانوما مطرح است، اما مکانیسم‌های اصلی آن هنوز روشن نیست.

این مطالعه، برای اولین بار، اثرات متاستاتیک و آپوپتوزی پارتنولید بر سلول‌های سرطانی را ارزیابی می‌کند.

## ۲. مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی از Merck و Fluka با خلوص بالا خریداری شد. رده‌های سلولی ملانوما انسانی (A2058) و فیروبلاست L929 از انستیتو پاستور ایران، محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FBS) از Gibco آمریکا، کیت سنجش ROS از Abcam انگلستان تهیه گردید.

### ۲-۱. یخ زدایی سلول‌ها

برداشت و ذوب سلول‌ها A2058 و L929 از تانک نیتروژن خارج و در آب گرم ۳۷ سانتی‌گراد ذوب شدند. محتویات ویال‌ها به آرامی مخلوط شد و فوراً به محیط سرد منتقل شد.

حذف DMSO و بقایای سلول‌های مرده توسط ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه انجام شد و مایع رویی، دور ریخته شد.

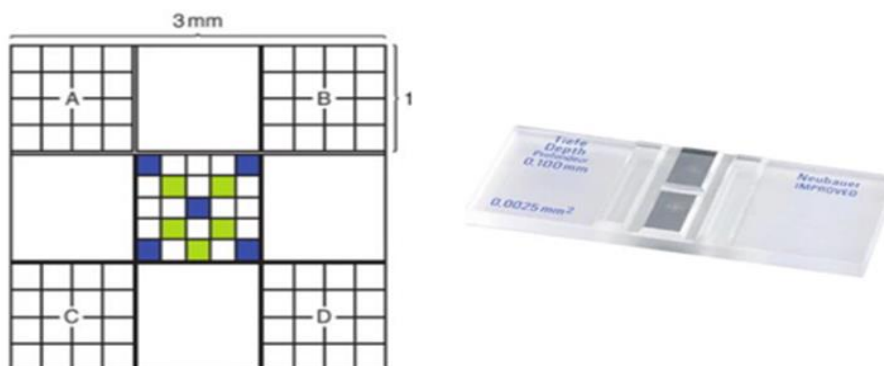
به رسوب سلولی DMEM و FBS (۱۵ درصد) اضافه شد تا سلول‌ها در محیط تغذیه‌ای مناسب مخلوط شوند. سپس محتویات فلاسک‌ها به فلاسک‌های استریل منتقل شد و در انکوباتور با ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ رطوبت نگهداری شدند. پس از ۱۲ ساعت، محیط کشت با DMEM گلوکز بالا و FBS (ده درصد) جایگزین شد. در نهایت، پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت از نظر مورفولوژی و تراکم جمعیت بررسی شدند تا در صورت نیاز پاساژ داده شوند و ادامه کشت و نگهداری انجام پذیرد.

## ۲-۲. پاساژ سلول ها

در این مرحله بررسی تراکم جمعیت سلولی با میکروسکوپ معکوس انجام شد. محیط کشت قبلی با پیت پاستور حذف و سلول ها با PBS شسته شدند، PBS باعث حذف  $Ca^{2+}$  و FBS می شود؛  $Ca^{2+}$  اتصال سلولی را کاهش می دهد و FBS حاوی مهارکننده های تریپسین است. برای جداسازی سلول ها از کف فلاسک های کوچک ۲۵ mL، ۳۵۰  $\mu$ L محلول تریپسین ۰/۲۵٪ استفاده شد. فلاسک به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا سلول ها جدا شوند. برای غیرفعال سازی تریپسین، ۵ میلی لیتر به FBS اضافه شد و محتویات فلاسک با پیت پاستور کاملاً به داخل فالكون منتقل شد. فالكون به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، روی مایع حذف شد و حدود ۴ میلی لیتر DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به فالكون اضافه شد. در نهایت سلول ها به فلاسک های جدید ریخته شده و به محیط انکوباتور بازگردانده شدند.

## ۲-۳. شمارش سلولی برای کشت سلول در پلیت

۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر محلول تریپان بلو ۰/۱ درصد مخلوط گردید. برای شمارش از لام هموسیتمتر استفاده شد و ۱۰ میکرولیتر از محتوای اپندورف به آرامی زیر لامل ریخته شد (شکل ۱). تعداد سلول ها در یک میلی لیتر = میانگین سلول های شمارش شده  $\times$  فاکتور رقت  $1 \times 10000$



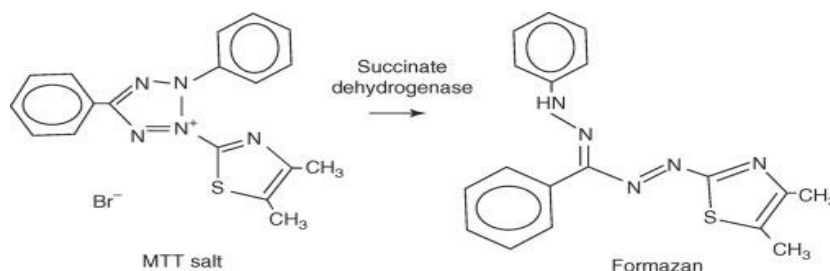
شکل ۱. نمایی از لام هموسیتمتر و نحوه شمارش سلولی

## ۲-۴. سنجش سمیت سلولی با آزمایش *MTT tetrazolium reduction*

تست MTT برای ارزیابی زنده ماندن سلولی یا سمیت داروها استفاده می شود و مکانیزم آن این است که سوکسینات دهیدروژناز سلولی فعال، تترازولیوم را به رنگ بنفش غیرمحلول تبدیل می کند؛ سلول های زنده شرکت کننده در این واکنش هستند و هر چه سلول زنده تر باشد، مقدار رنگ بنفش بیشتری تشکیل می شود. طراحی سه مرحله اصلی دارد: Seeding که در آن  $(1/2 \times 10^4)$

<sup>1</sup>- Dilution factor

سلول در هر چاهک ۹۶ در نظر گرفته گردید تا همگنی برقرار باشد، سپس تیمار با پارتنولید در دامنه (۰-۲۰۰  $\mu\text{M}$ ) و با سه پلیت برای هر تیمار انجام شد؛ و در پایان مرحله MTT که پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار، تست MTT انجام شد و جذب با طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (شکل ۲). خواندن هم با دستگاه فلوریمتری Elmer انجام شد تا فلورسانس چاهک ها ثبت شود و مقدار IC50 با نرم افزار GraphPad Prism 8.2.1 تعیین می شود؛ هر تیمار در سه تکرار بوده و برای کاهش متغیرها همگنی کاشت و شرایط کشت رعایت گردید.

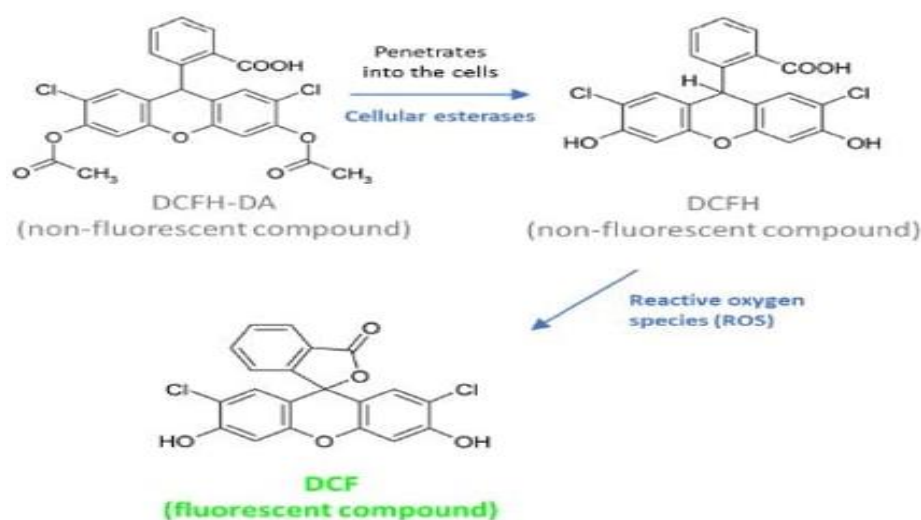


شکل ۲.۱ احیا MTT

## ۲-۵. اندازه گیری تولید رادیکال های آزاد اکسیژن

با ورود DCFH-DA به سلول و اکسیداسیون آن به DCF، شدت فلورسانس منعکس کننده سطح ROS در سیتوزول می باشد. شکل ۳ گویای این رابطه است.

DCFH-DA به درون سلول نفوذ کرده و توسط استرازهای سلولی به H2DCF تبدیل میگردد. H2DCF در مجاورت ROS به DCF فلورسنت اکسید می شود.



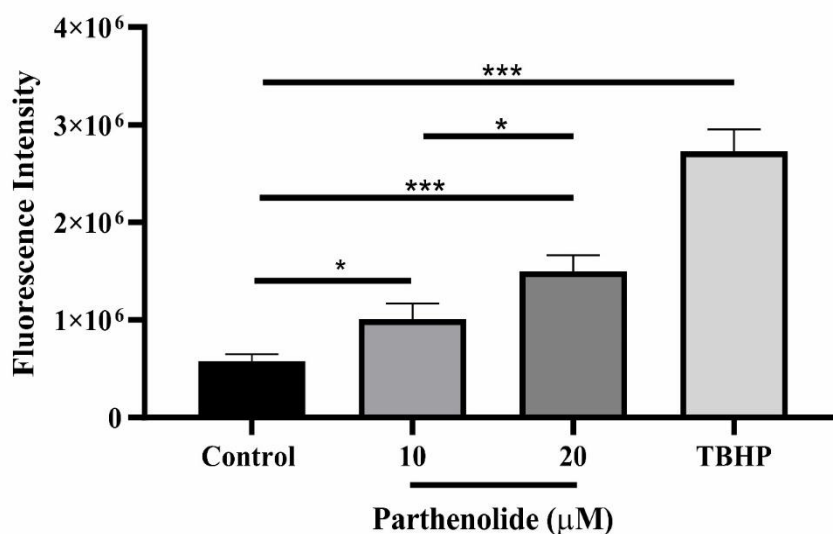
شکل ۳. مکانیسم سنجش ROS توسط رنگ DCFH-DA

## ۶-۲. اثر پارتنولید بر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های A2058

سلول‌های A2058 با دو غلظت پارتنولید:  $10 \mu\text{M}$  و  $20 \mu\text{M}$  تیمار شدند و مدت زمان تیمار برابر با ۲۴ ساعت بود. کنترل مثبت استفاده شده  $5 \mu\text{M}$  TBHP بود.

نمودار ۱ نشان می‌دهد که پس از ۲۴ ساعت، میزان رادیکال‌های آزاد با غلظت‌های مختلف پارتنولید اندازه‌گیری شد؛ سلول‌های تیمار شده با  $20 \mu\text{M}$  پارتنولید سطح ROS داخلی بالاتری نسبت به کنترل داشتند و معیاری بودن TBHP منجر به افزایش معنی‌دار ROS شد. همچنین، بین دو سطح پارتنولید، تیمار با  $20 \mu\text{M}$  منجر به تولید ROS بیشتری نسبت به  $10 \mu\text{M}$  شد.

در نتیجه افزایش غلظت پارتنولید تا  $20 \mu\text{M}$  به‌طور معنی‌داری سطح ROS در داخل سلول‌های A2058 را افزایش می‌دهد و با تشدید اثر TBHP، تفاوت معنی‌دار بین دو سطح غلظت پارتنولید مشاهده گردید.

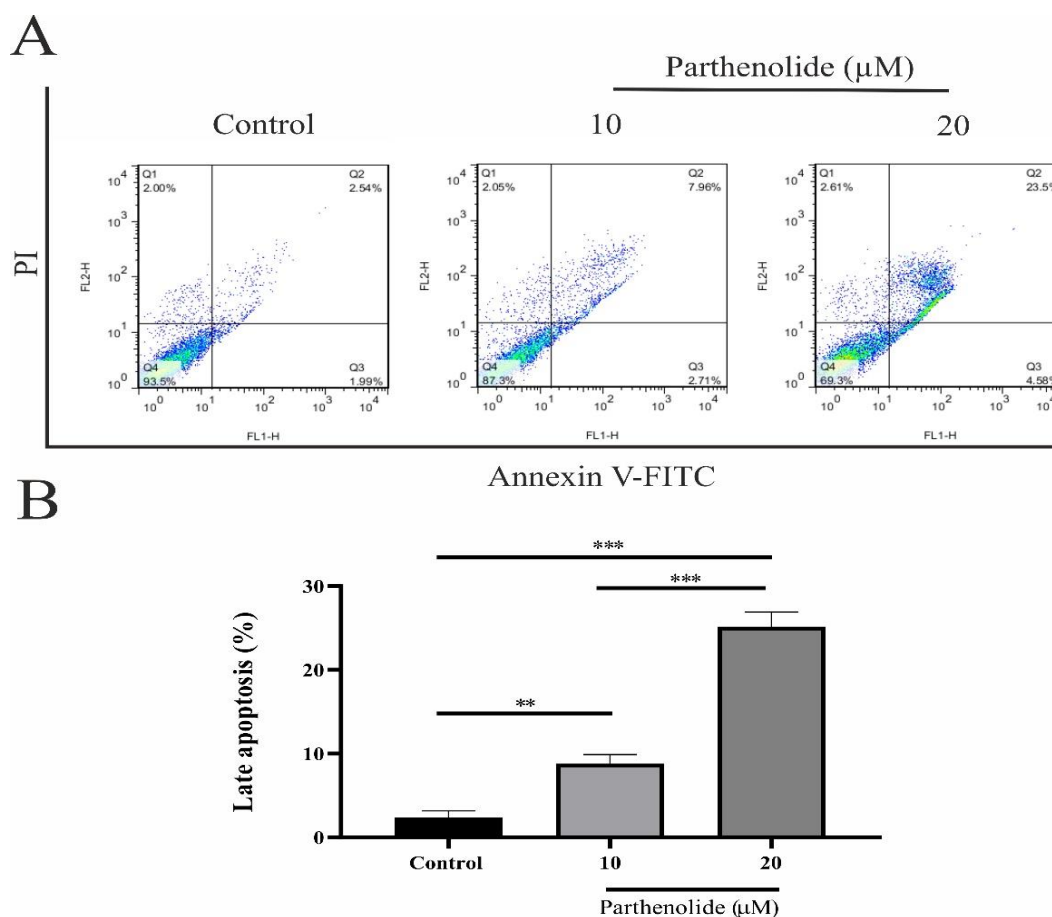


شکل ۴. بررسی اثر پارتنولید بر تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌های A2058

تجمع ROS در سلول‌های A2058 تحت تیمار با پارتنولید، با استفاده از DCFDA ارزیابی شد. تولید ROS پس از تیمار با  $10 \mu\text{M}$  و  $20 \mu\text{M}$  پارتنولید افزایش یافت. TBHP به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، و نتایج نشان داد که تولید ROS پس از تیمار با پارتنولید افزایش یافته است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. ( $* > 0.05$  و  $*** < 0.001$  p نسبت به کنترل).

## ۲-۷. آپوپتوز سلول‌های A2058 تحت تیمار با پارتنولید

آنالیز آپوپتوز سلول‌های A2058 تحت درمان با پارتنولید از طریق کیت رنگ آمیزی دوگانه انکسین V-FITC PI توسط فلوسایتومتری انجام شد (شکل ۴). سلول‌هایی که با  $10 \mu\text{M}$  پارتنولید تیمار شده بودند، باعث افزایش قابل توجهی در درصد سلول‌های فاز late آپوپتوز شدند (۷۹/۶٪). هنگامی که سلول‌های توموری با  $20 \mu\text{M}$  پارتنولید تیمار شدند، درصدهای سلول‌های آپپتوتیک early و late به ترتیب ۲۳/۵٪ و ۴/۵۸٪ بودند. در گروه کنترل، تنها ۱/۹۳٪ و ۲/۵۴٪ از سلول‌ها به ترتیب در فازهای early و late آپوپتوز بودند. در مقابل، در فاز نکروتیک تفاوت معنی داری بین گروه کنترل (۲٪)،  $10 \mu\text{M}$  پارتنولید (۲/۰۵٪) و  $20 \mu\text{M}$  پارتنولید (۲/۶۱٪) وجود نداشت. به طور کلی، این نتایج نشان داد که پارتنولید در هر دو غلظت ( $10 \mu\text{M}$  و  $20 \mu\text{M}$ ) به طور قابل توجهی آپوپتوز فاز late را در سلول‌های ملانوما A2058 افزایش می‌دهد.

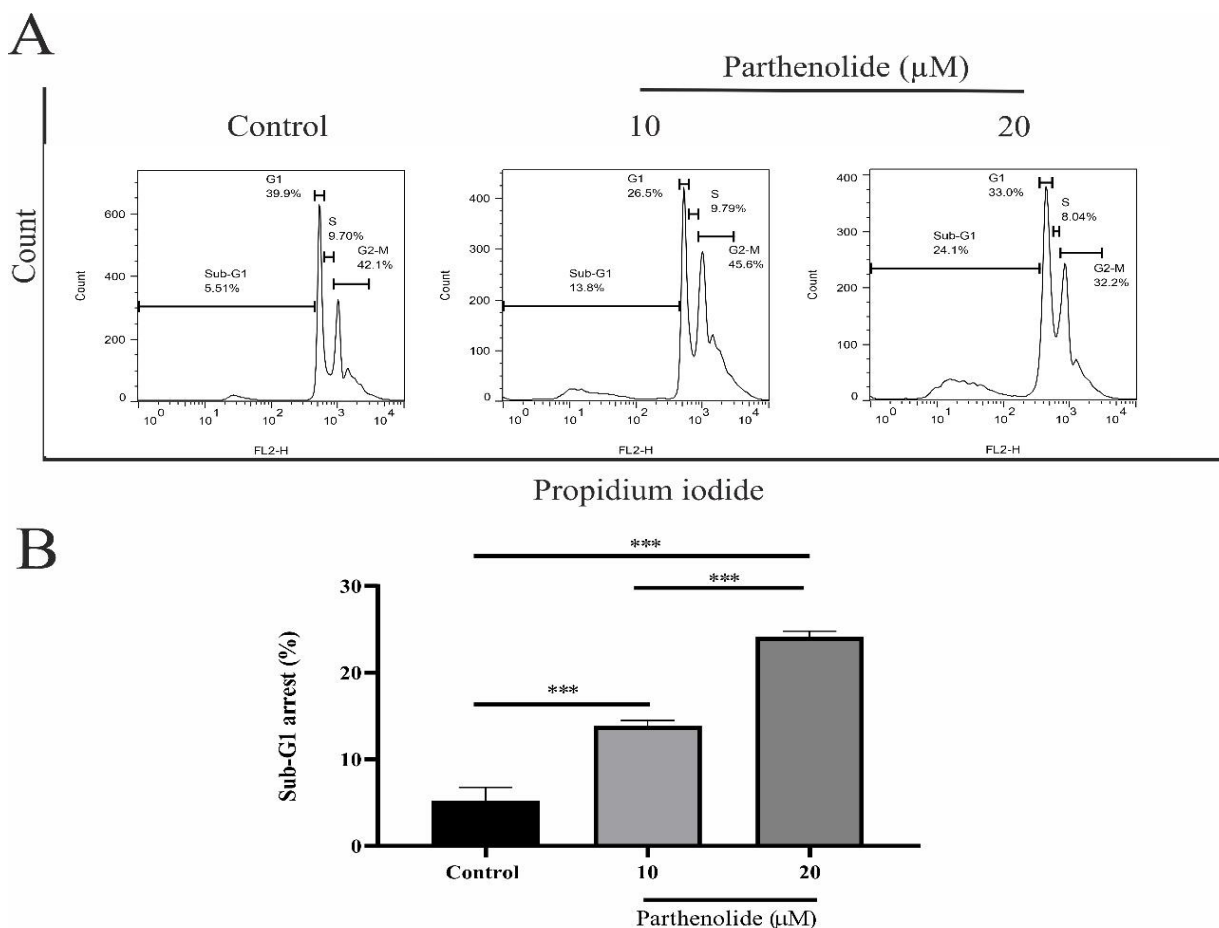


شکل ۵. اثر پارتنولید بر میزان آپوپتوز در سلول‌های A2058 تیمار شده با پارتنولید

اثر پارتنولید با غلظت  $10 \mu\text{M}$  و  $20 \mu\text{M}$  بر میزان آپوپتوز سلول‌های A2058 به روش Annexin V-FITC/ PI که با استفاده از فلوسایتومتری پس از ۲۴ ساعت بررسی گردید. Q1 تا Q4 به ترتیب سلول‌های زنده، فاز early و فاز late، و سلول‌های نکروتیک را نشان می‌دهند. فاز late به صورت وابسته به دوز افزایش نشان داد (هر ستون میانگین  $\pm$  SD را نشان می‌دهد).

## ۸-۲. چرخه سلولی سلول‌های A2058 تحت تیمار با پارتنولید

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌های A2058 با پارتنولید با ماده PI رنگ آمیزی شد و چرخه سلولی در فازهای مختلف بوسیله فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). تیمار با دو دوز مختلف پارتنولید ۱۰ و ۲۰  $\mu\text{M}$  باعث توقف چرخه سلولی A2058 در فاز subG1 به صورت وابسته به دوز شد (به ترتیب ۱۳/۸٪ و ۲۴/۱٪) نسبت به کنترل (۵/۵۱٪). بر اساس یافته‌ها، چرخه سلولی A2058 بطور معنی داری (دوز  $\text{IC}_{50}$  و دوز کمتر) در مرحله subG1 توسط پارتنولید متوقف شد. ( $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) و هر ستون میانگین  $\pm \text{SD}$  را نشان می‌دهد.



شکل ۶. آنالیز چرخه سلولی سلول‌های ملانوما A2058 پس از تیمار با پارتنولید با استفاده از فلوسایتومتری در دوزهای ۱۰ و ۲۰  $\mu\text{M}$  پارتنولید چرخه سلولی در سلول‌های A2058 در مرحله SubG1 متوقف گردید. ( $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) و هر ستون میانگین  $\pm \text{SD}$  را نشان می‌دهد.

## ۹-۲. روش انجام تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن

ROS درون سلولی توسط کیت DCFDA/H2DCFDA، به شرح زیر انجام شد:

- تعداد ۲۵۰۰۰ سلول A2058 در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای seed شد. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر موجود در کیت شسته و توسط ۱۰۰  $\mu\text{l}$  از محلول H2DCFDA به مدت ۴۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. بعد از



شست و شوی مجدد، سلول‌ها با غلظت‌های  $10 \mu\text{l}$  و  $20 \mu\text{l}$  از پارتنولید و NAC (۵ میلی مولار) در زمان ۲۴ ساعت انجام شد.

- سپس میزان فلورسانس، به وسیله دستگاه Perkin Elmer در ۴۸۵ نانومتر خوانش شد. تمامی تیمارها در سه تکرار انجام شد.

### ۳. نتایج و بحث

ملانوما یک تومور بدخیم است که منشأ آن ملانوسیت‌هاست. سالانه ۱۶۰۰۰۰ مورد ملانوم و ۴۸۰۰۰ مورد مرگ و میر ناشی از ملانوما در سراسر جهان شناسایی می‌شود [۱۷]. درمان ملانوم شامل برداشتن تومور به وسیله جراحی، پرتودرمانی و داروی Dacarbazine است که معمولاً باعث القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۸]. علیرغم پیشرفت‌های اخیر در استراتژی‌های تشخیصی و درمانی، ملانوما همراه با متاستاز پیش‌آگهی ضعیف داشته و بقای کل بیماران تنها حدود ۱۶ درصد می‌باشد [۱۹]. بنابراین، بررسی عوامل درمانی موثر با مکانیسم‌های جدید ضروری است. اخیراً، بسیاری از مطالعات گزارش داده‌اند که برخی از ترکیبات با پایه مواد گیاهی قادر به مهار رشد و متاستاز سلول‌های ملانوما و همچنین القای آپوپتوز هستند، که نشان‌دهنده کاربرد روزافزون این ترکیبات طبیعی به عنوان درمان دارویی است [۲۰].

بالا رفتن ROS داخل سلولی، در بروز آپوپتوز نقش دارد. یافته‌های ما نشان داد که پارتنولید آپوپتوز را در سلول‌های A2058 از طریق افزایش تولید ROS به صورت وابسته به زمان و دوز القا می‌کند. هماهنگ با یافته‌های ما، نشان داده شده است که پارتنولید تأثیر سمیتی قوی بر سلول‌های HeLa سرطان دهانه رحم و بدخیمی‌های لنفاوی با افزایش تولید ROS دارد [۲۱]. تحریک تولید ROS تحت تیمار با پارتنولید به انواع مختلفی از مرگ سلولی وابسته به نوع سلول مرتبط است. به عنوان مثال، Jeyamohan و همکاران گزارش دادند که پارتنولید مکانیسم‌های اتوفازیک و آپوپتوزیک را در سلول‌های سرطان دهانه رحم القا می‌کند که باعث افزایش تولید ROS و از دست دادن پتانسیل غشاء میتوکندریایی می‌شود [۲۲]. در کارسینومای هپاتوسلولار، پارتنولید منجر به کاهش تیول‌های درون سلولی با افزایش اکسایش تیول‌ها می‌شود که منجر به پلاریزاسیون زودرس میتوکندری و نقص عملکرد آن می‌شود. این رویدادهای ناخواسته همراه با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، به ferroptosis نوعی مرگ سلولی منجر می‌شود [۲۳]. علاوه بر این، فعال شدن p53 ناشی از آسیب DNA ناشی از ROS می‌تواند به رونویسی Bax و سایر ژن‌های حیاتی برای شروع آپوپتوز منجر شود. این نشان دهنده یک مکانیسم مهم برای فعال‌سازی آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار با پارتنولید است.

### ۴. نتیجه گیری

پارتنولید منجر به برهم خوردن بالانس ROS درون سلولی می‌شود. این افزایش بیش از حد ROS ممکن است به اثرات ضد-سرطانی پارتنولید بر روی سلول‌های A2058 مرتبط باشد. مطالعات بیشتر با استفاده از مدل‌های حیوانی یا آزمایشات بالینی ضروری است تا ویژگی‌های بالقوه درمانی پارتنولید در درمان سرطان ملانوما تأیید شود.

## ۵. مراجع

- [1] Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21:379-85.
- [2] Nambiar M, Kari V, Raghavan SC. Chromosomal translocations in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1786:139-52.
- [3] Chen J-M, Cooper DN, Férec C, Kehrer-Sawatzki H, Patrinos GP. Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2010;20:222-33.
- [4] Elliott B, Jasin M. Human Genome and Diseases:¶Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2002;59:373-85.
- [5] Davies EJ, Terlizzo M, Hayes AJ. *Melanoma. Surgery (Oxford)*. 2022;40:46-52.
- [6] Dessinioti C, Geller AC, Whiteman DC, Garbe C, Grob JJ, Kelly JW, et al. Not all melanomas are created equal: a review and call for more research into nodular melanoma. *Br J Dermatol*. 2021;185:700-10.
- [7] Centeno PP, Pavet V, Marais R. The journey from melanocytes to melanoma. *Nature Reviews Cancer*. 2023;23:372-90.
- [8] Leung AK, Barankin B, Lam JM, Leong KF, Hon KL. Xeroderma pigmentosum: an updated review. *Drugs Context*. 2022;11.
- [9] Long GV, Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2023;402:485-502.
- [10] Lopes FCPS, Sleiman MG, Sebastian K, Bogucka R, Jacobs EA, Adamson AS. UV Exposure and the Risk of Cutaneous Melanoma in Skin of Color: A Systematic Review. *JAMA Dermatology*. 2021;157:213-9.
- [11] Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression. *Nature Reviews Cancer*. 2022;22:280-97.
- [12] Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022;23:499-515.
- [13] Czyz M, Koprowska K, Sztiller-Sikorska M. Parthenolide reduces the frequency of ABCB5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres. *Cancer Biol Ther*. 2013;14:135-45.
- [14] Wen J, You K-R, Lee S-Y, Song C-H, Kim D-G. Oxidative Stress-mediated Apoptosis: THE ANTICANCER EFFECT OF THE SESQUITERPENE LACTONE PARTHENOLIDE \*. *J Biol Chem*. 2002;277:38954-64.
- [15] D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, Puleio R, Martinez R, Di Bella S, et al. Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell Death Dis*. 2013;4:e891.
- [16] Sztiller-Sikorska M, Czyz M. Parthenolide as Cooperating Agent for Anti-Cancer Treatment of Various Malignancies. *Pharmaceuticals*2020.
- [17] Rigel DS. Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2010;29:204-9.
- [18] Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000;19:21-34.
- [19] Ding L, Gosh A, Lee DJ, Emri G, Huss WJ, Bogner PN, et al. Prognostic biomarkers of cutaneous melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2022;38:418-34.
- [20] Tabolacci C, De Vita D, Facchiano A, Bozzuto G, Beninati S, Failla CM, et al. Phytochemicals as Immunomodulatory Agents in Melanoma. *Int J Mol Sci*2023.
- [21] Jorge J, Neves J, Alves R, Gerales C, Gonçalves AC, Sarmento-Ribeiro AB. Parthenolide Induces ROS-Mediated Apoptosis in Lymphoid Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2023;24.

- [22] Jeyamohan S, Moorthy RK, Kannan MK, Arockiam AJV. Parthenolide induces apoptosis and autophagy through the suppression of PI3K/Akt signaling pathway in cervical cancer. *Biotechnology Letters*. 2016;38:1251-60.
- [23] LoBianco FV, Krager KJ, Johnson E, Godwin CO, Allen AR, Crooks PA, et al. Parthenolide induces rapid thiol oxidation that leads to ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Front Toxicol*. 2022;4:936149.

## Fluorometric spectrometry to assess the oxidative effects of parthenolide on the A2058 melanoma cell line

Zahra Dorostgou<sup>1</sup>, Malihesadat Hosseiny<sup>2\*</sup>, Afsaneh Bahrami<sup>3</sup>, Rahele Zhiani<sup>2</sup> and Mahnaz Mohtashami<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

<sup>3</sup> Clinical Research Development Unit, Imam Reza Hospital, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>4</sup> Department of Microbiology, Ne.C., Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

Submitted: 03 May 2025, Revised: 16 July 2025, Accepted: 25 July 2025

### Abstract

Skin melanoma is one of the most lethal cancers and resistance to treatment in advanced stages is one of the main challenges; parthenolide as a small anticancer molecule with therapeutic potential in melanoma needs further investigation. In this study, various investigations were carried out, including cytotoxicity, apoptosis, cell cycle analysis, and production of reactive oxygen species (ROS), in cells treated with parthenolide. ROS assay was performed to investigate the oxidant effects of parthenolide that could play a role in apoptosis. Also, the combination of parthenolide and dacarbazine, a chemotherapy drug for the treatment of skin cancer, was also evaluated. The results showed that parthenolide compound could significantly reduce the viability of these cells by overcoming A2058 melanoma cells in a dose- and time-dependent manner. Furthermore, compared to normal L929 cells (IC<sub>50</sub>: 27  $\mu$ M after 24 h), A2058 melanoma cells were more sensitive to parthenolide (IC<sub>50</sub>: 20  $\mu$ M after 24 h). Parthenolide increased ROS production.

**Keywords:** fluorescence spectrophotometer, parthenolide, ROS assay, apoptosis, A2058 melanoma