دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر
فصلنامه‌ی کاربرد شیمی در محیط زیست

سال چهارم، شماره‌ی۱۹
تابستان ۱۳۹۳، صفحات ۴۴-۴۱

سنتز و بررسی اثرات سمیت سولی و ضدسرطانی ترکیب فنچیل-۳و۴ - دی‌متوکسی بنزوات بر سلول‌های سرطان پروستات در شرایط invitro

سید نوید گفتاری
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
حمید صادقیان
گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
احمدرضا بهرامی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
فاطمه ملکی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
مریم مقدم متین
گروه پژوهشی زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فن‌آوری، دانشگاه فردوسی مشهد
matin@um.ac.ir

چکیده

سرطان دومین عامل مرگ در سراسر جهان می‌باشد. روش‌های درمان این بیماری اغلب ناکارا بوده و علی‌رغم وجود روش‌های درمانی موجود، هم‌چنان نیاز به تحقیق برای کشف روش‌های جدید و هدفمند برای درمان این بیماری احساس می‌شود. هدف از این پژوهش، سنتز منوترپنوئیدی به‌نام فنچیل-۳و۴دی‌متوکسی بنزوات (FDB) از طریق انجام واکنش استریفیکاسیون بین فنچیل- ۳و۴- دی‌متوکسی بنزوات و بررسی اثرات سمیت سلولی و ضدسرطانی این ترکیب بر روی سلول‌های سرطانی پروستات PC3 و سلول‌های فیبروبلاست انسانی HFF3، به‌عنوان نمونه‌ی سلولی طبیعی در شرایط in vitro بود. اثرات سمیت سلولی و میزان مرگ سلول‌ها تحت اثر غلظت‌های مختلف FDB در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و از طریق بررسی میزان احیا شدن ماده آلاماربلو انجام پذیرفت و در هر مورد مقدار IC_{50} محاسبه گردید. در نهایت بر روی مقادیر IC_{50} به‌دست آمده از سلول‌های PC3 در مقایسه با سلول‌های HFF3 تجزیه و

تحلیل آماری انجام گردید و مقدار P-value برای هر سه بازه زمانی محاسبه شد که همگی در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار بودند. کوچک بودن مقادیر IC_{50} بر روی سلول‌های PC3 در مقایسه با سلول‌های HFF3، نشان می‌دهد که ماده‌ی FDB می‌تواند اثرات ضدسرطانی داشته باشد.

کلید واژه: ترپنوئید، استایلوزین، فنچیل-۳و۴- دی‌متوکسی بنزوات، ضدسرطان

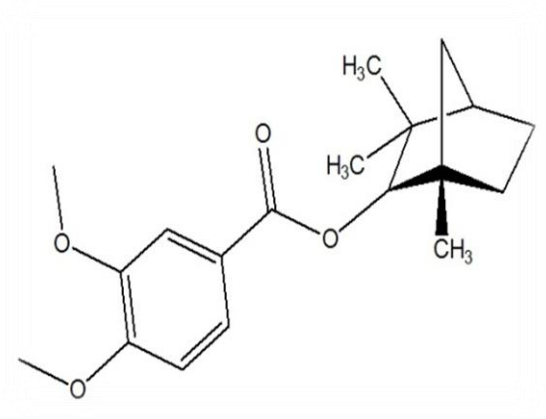
مقدمه

سرطان پروستات در مردان شیوع بالایی دارد. به‌طوری‌که در سال ۲۰۱۱ دومین سرطان شایع و ششمین علت مرگ‌ومیر در جهان معرفی شد [۱]. گزینه‌های درمانی موجود برای سرطان پروستات شامل عمل جراحی، هورمون درمانی، شیمی درمانی و پرتو درمانی می‌باشد، اما مدیریت بالینی نوع پیشرفته آن چالش برانگیز بوده و نیاز به کشف روش‌های درمانی کاراتر در این زمینه احساس می‌شود [۲]. رده‌های سلولی محدودی از این سرطان استحصال شده‌اند،که مهم‌ترین آن‌ها PC3، LNCaP و DU145 می‌باشند که به‌ترتیب از آدنوکارسینوماهای پروستات متاستاز دهنده به استخوان، گره‌های لنفاوی و مغز گرفته شده‌اند.

ترپنوئیدها ترکیباتی هستند که از واحدهای پنج کربنه ایزوپرن ساخته شده‌اند و از این رو ایزوپرنوئید نیز خوانده می‌شوند. ترپنوئیدها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند و تنوع بسیار زیادی دارند، به‌طوری‌که بیش از ۴۰۰۰۰ ترپن مختلف از گیاهان، جانوران و میکروب‌ها جداسازی شده است [۳, ۴]. تعداد زیادی از ترپنوئیدها شناخته شده‌اند که دارای اثرات ضدسرطانی هستند مانند: تاکسان‌ها، وین‌کریستین و وین بلاستین [۵, ۶]. یک گروه از ترکیبات ترپنوئیدی منوترپن‌ها هستند که از دو واحد ایزوپرن ساخته شده‌اند. تاکنون بیش از ۱۰۰۰ ترکیب منوترپنوئیدی در موجودات زنده کشف شده است [۷]. هم‌چنین منوترپنوئیدهای زیادی شناخته شده‌اند که خاصیت ضدسرطانی دارند. این ترکیبات نه تنها مانع شکل‌گیری و پیشرفت تومور شده، بلکه می‌توانند باعث بهبود تومورهای بدخیم نیز گردند [۸]. یکی از ترکیبات ترپنوئیدی، استایلوزین نام دارد. این ماده از ریشه گیاه Ferula stylosa [۹] و Ferula ovina و هم‌چنین پوسته[1] گیاه Fraxinus stylosa [۱۰] به دست آمده است. Rassouli و هم‌کارانش اثرات سمیت سلولی این ترکیب را روی رده سلولی ۵۶۳۷ (نوعی TCC[2]) بررسی نموده و نشان دادند که این ترکیب، رشد این سلول‌ها را مهار کرده و باعث القای آپوپتوز در آن‌ها می‌گردد [۱۱]. پس از آن Valiahdi و هم‌کارانش اثرات سمیت سلولی و ضد سرطانی چندین ترکیب ترپنوئیدی موجود در گونه‌های گیاه Ferula را بر چند رده سلولی سرطانی بررسی نموده و نشان دادند استایلوزین می‌تواند بر سرطان تخم‌دان، ملانوما و سرطان ریه نیز موثر بوده و تکثیر این سلول‌ها را محدود می‌کند [۱۲]. به دنبال این مشاهدات هدف از انجام این مطالعه سنتز شیمیایی مشتقی از استایلوزین به نام FDB (شکل ۱)

[1] Bark
[2] Transitional cell carcinoma

و بررسی اثرات سیتوتوکسیک و ضد سرطانی آن بود.



شکل ۱: ساختار **FDB**

مواد و روش

سنتز و آماده‌سازی FDB

ترکیب FDB از واکنش فنچول و ۳و۴دی‌متوکسی بنزوات در حضور ترکیب DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide) و در حلال کلروفرم تهیه گردید. محصول مورد نظر توسط کروماتوگرافی ستونی بر روی سیلیکاژل خالص شد. سپس ۲ میلی‌گرم FDB در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO[1] حل گردید تا غلظت ۲۰۰۰۰µg/mL به دست آید، و در ادامه به طور سریالی با DMSO رقیق گردید و به ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۵۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰µg/mL نیز به‌دست آمدند. سپس محتوای هر یک از ۵ میکروتیوب موجود به‌وسیله محیط کشت ۴۰۰ بار رقیق گردیدند تا به این ترتیب غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳ µg/mL به‌دست آمد.

کشت سلولی

برای این مطالعه سلول‌های PC3 انتخاب شد. هم‌چنین به‌عنوان نمونه سلولی طبیعی نیز از سلول‌های HFF3 (فیبروبلاست انسانی) استفاده گردید. از هر کدام از این سلول‌ها به ترتیب به تعداد ۱۰۰۰۰ و ۸۰۰۰ عدد در هر خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها تخلیه و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف FDB به چاهک‌های مختلف منتقل شد. برای هر غلظت سه تکرار قرار داده و هم‌چنین کنترل حاوی ۰/۲۵ درصد DMSO نیز در نظر گرفته شد. اثر FDB در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی گردید.

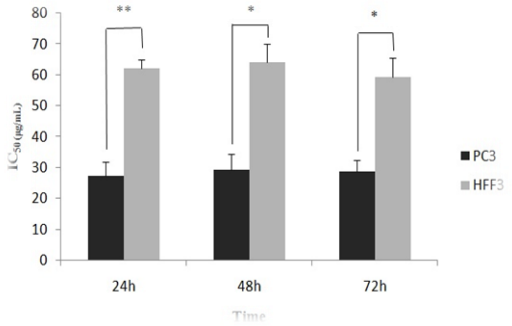
بررسی میزان مرگ سلولی با استفاده از اسپکتروسکوپی

برای سنجش میزان مرگ سلولی از ماده آلاماربلو و طبق دستورکار تولیدکننده استفاده گردید (www.lifetechnologies.com). برای هر غلظت در دستگاه اسپکتروفتومتر از بلانک استفاده شد، که محیط کشت حاوی DMSO و غلظت مربوطه‌ی FDB بود. درنهایت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار prism 5.0 انجام‌شده و از فاکتور IC_{50} برای مقایسه استفاده گردید.

[1] Dimethyl sulfoxide

یافته‌ها و بحث

ارزیابی تیمار سلول‌های PC3 با ماده FDB در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب مقادیر IC_{50} ۲۷/۳، ۲۹/۱۲ و ۲۸/۷۸ µg/mL را نشان داده و هم‌چنین تیمار سلول‌های HFF3 توسط این ماده در این بازه‌ها به ترتیب مقادیر IC_{50} ۶۲، ۶۴/۱۹ و ۵۹/۱۸ µg/mL را نشان داد. برای داده‌های به دست آمده تجزیه و تحلیل آماری از نوع t-test انجام گردید و مقدار P-value برای بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۰۰۳۱، ۰/۰۱۰۷ و ۰/۰۱۳۷ محاسبه گردید که همگی در سطح $P<0/05$ معنی‌دار هستند (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه IC_{50} حاصل از تیمار سلول‌های PC3 و HFF3 توسط ماده FDB در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (*و ** نشان می‌دهند که اختلاف‌ها به ترتیب در سطح $P<0/05$ و $P<0/01$ معنی‌دار هستند

نتیجه‌گیری

بررسی IC_{50} های حاصل از تیمار سلول‌های PC3 و HFF3 توسط ماده FDB در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و هم‌چنین مقایسه مقادیر P-value به دست آمده برای هر یک از این بازه‌های زمانی در سلول‌های PC3 و HFF3 که همگی در سطح $P<0/05$ معنی‌دار هستند، نقش منوترپنوئید سنتزی FDB را به‌عنوان یک ماده سیتوتوکسیک و ضدسرطانی نشان می‌دهد، اما درک مکانیسم درگیر در اثر بخشی این ماده هم‌چنان نیازمند مطالعات بیش‌تر می‌باشد.

منابع

[1]- Jemal, A., et al., a cancer journal for clinicians. 61, 69-90 (2011).

[2]- Walsh, P.C., T.L. DeWeese, and M.A. Eisenberger., New England Journal of Medicine. 357,2696-2705 (2007).

[3]- Rohdich, F., A. Bacher, and W. Eisenreich, Biochemical Society Transactions. 33, 785-791(2005).

[4]- Withers, S.T. and J.D. Keasling, Applied microbiology and biotechnology. 73, 980-990 (2007).

[5]- Cragg, G.M. and D.J., Journal of ethnopharmacology. 100, 72-79 (2005).

[6]- Srivastava, V., et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 13, 5892-5908 (2005).

[7]- Bouvier, F., A. Rahier, and B. Camara, Biogenesis, Progress in lipid research. 44, 357-429 (2005).

[8]- Crowell, P.L. and M.N. Gould, Critical Reviews in Oncogenesis. 5 (1994)

[9]- Bagirov, V.Y., et al., Chemistry of Natural Compounds. 16, 562-563 (1980).

[10]- Guo, X. and Y. Zhang, Yao xue xue bao Acta pharmaceutica Sinica. 18, 434-439 (1983).

[11]- Rassouli, F.B., et al., Fitoterapia. 82, 742-749 (2011).

[12]- Valiahdi, S.M., M. Iranshahi, and A. Sahebkar, DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 21, 39 (2013).