Archive of SID

بررسی فعالیت ضد توموری سولفونامیدهای XSF و SSF با سنجش دیسک سیب زمینی

*دکتر جواد بهروان، *دکتر محمد رمضانی، ** دکترمحمد رحیمی زاده، *دکتر الهام ملک زاده

*بخش بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** بخش شیمی، دانشکده علوم ، دانشگاه فردوسی مشهد

خلاصه

به منظور تعیین اثرات ضد توموری احتمالی دو ترکیب سنتتیك ساخته شده در دانشکده داروسازی مشهد تست دیسك سیب زمینی در این پروژه مورد استفاده قرار گرفت. دیسك هایی از سیب زمینی با قطر و ارتفاع مشخص تهیه و روی آگار ۱/۵ درصد گذاشته شد و پس از تلقیح سوسپانسیون اگروباکتریوم توم فشنز به عنوان یك باکتری تومورزای گیاهی در درجه حرارت C ° ۲۵ نگهداری و ۳۰ روز بعد تومورهای تاجی شکل ایجاد شد. پس از اطمینان از حصول شرایط لازم برای ایجاد تومور، وینکریستین به عنوان یك ماده ضد تومور با مکانیسم مشخص، جهت ارزیابی مهار یا عدم مهار تومورزایی در حضور باکتری مذکور روی سطح دیسك های سیب زمینی به کار برده شد. ایجاد تومور در غیاب داروی وینکریستین و مهار تومور زایی در حضور ترکیب فوق مشاهده گردید. در مرحله بعد اثرات مهارکننده تومور سولفونامیدهای سنتزی SSF و XSF مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله فعالیت ضد توموری ترکیبات SSF و XSF را نشان داد که اثرات ضد توموری XSF بسیار قابل توجه تر بود.

کلمات کلیدی :اگروباکتریوم توم فشنز، دیسك سیب زمینی، اثرات آنتی تومور

مقدمه

اولین سولفونامید در حدود دو قرن پیش شناسایی شد و مدتی بعد اثرات ضد باکتریایی آن اثبات گردید (۴). گزارش تجمع انتخابی سولفادی آزین در تومور زیر جلدی ایجاد شده در موش در سال ۱۹۷۳ باعث جلب توجه محققین به اثرات احتمالی ضد تومور این ترکیبات گردید (۱) و به دنبال آن فعالیت ضد توموری ترکیب کلروکینوکسالین سولفونامید در سال ۱۹۸۸ گزارش گردید (۲) و در سال ۱۹۹۲ سنتز و اثرات ضد توموری سولفونامیدهای هتروسیکل جدید بر رده های سلولی سرطانی KB و Colon 38 گزارش شد (۷).

از آن جائی که به کار گیری یك روش غربالگری ساده برای آنتی تومورها در سیستم گیاهی ارزان و راحت می باشد، بنابراین منافع زیادی به صورت یك جایگزین تست های گران حیوانی در یافتن داروهای جدید ضد سرطان خواهد داشت و این جنبه‌ای است که امروزه به آن توجه زیادی می شود (۶). در سال ۱۹۷۷ تومورهای تاجی شکل روی دیسك های سیب زمینی به صورت یك سیستم ایده آل جهت بررسی فرآیند ترانسفورماسیون سلول ها به سلول سرطانی مطرح شد. در سال ۱۹۷۹ نیز تومورهای تاجی شکل روی نشاء نخود فرنگی عمل دوگانه سرطانی ـ ضد سرطانی داروهای مشخصی را نشان داد و سرانجام گالسکی و همکارانش این ایده ها را درکنار هم قرار داده و مهار تومورهای تاجی شکل روی دیسك سیب زمینی را اثبات کردند (۵).

تومور تاجی شکل یك بیماری نئوپلاستیك گیاهی است که به وسیله گونه خاصی از باکتری های گرم منفی به نام اگروباکتریوم توم فشنز ایجاد می شود (۶). اعضای جنس اگروباکتریوم به تاج، ریشه و ساقه های گروه وسیع و متنوعی

www.SID.ir

Archive of SID

از گیاهان از طریق زخمهای روی این اندامها وارد شده و باعث ترانسفورماسیون سلولهای گیاهی به سلولهای توموری می‌شود. این تومورها قابل پیوند زدن به بافتهای گیاهی دیگر هستند. گونه‌های سرطانزای اگروباکتریوم بیشتر در خاکهایی که با اندامهای بیمار گیاهی آلوده شده اند، پیدا می‌شود. البته بعضی از سویه‌های اگروباکتریوم از نمونه های بالینی مربوط به بیماران نیز جدا شده اند (۹). این باکتری ها حاوی پلاسمیدهای بزرگ Ti می باشند که اطلاعات ژنتیکی آنها را حمل می کند و در صورت انتقال آن به سلول گیاهی، سلولهای گیاهی نرمال یا زخمی را به سلولهای توموری خودکار و مستقل تبدیل می کند. بنابراین ارگانیسم مذکور مکانیسم تومورزائی مشخصی به شکل ادغام ژنتیکی داخل سلولی دارد (۶). این باکتری بعد از ورود ازطریق زخم و جایگزینی، توالی‌های خاص از DNA پلاسمیدی (T-DNA) خود را به درون ژنوم گیاه وارد می‌کند. گونه‌های سرطانزای اگروباکتریوم هنگامی که پلاسمید تومورزای خود را از دست بدهند توانایی القاء تومور را نخواهند داشت. از طرف دیگر وارد کردن پلاسمید Ti در گونه‌های غیر مهاجم اگروباکتریوم چه توسط ترانسفورماسیون DNA و چه از طریق کونژوگاسیون اگروباکتریوم تومورزا را ایجاد می‌کند (۸). در طی مراحلی بعد از آلوده شدن یك گیاه حساس و زخم پلاسمید Ti به سلولهای گیاهی منتقل شده و بخشی از آن یعنی T-DNA به داخل هسته سلول وارد می‌شود (۹). امروزه ترانسفورماسیون سلولهای گیاهی با انواع تغییر یافته از پلاسمید Ti جهت ایجاد گیاهان ترانسژنیك گسترش یافته و با استفاده از این پلاسمیدها متخصصین ژنتیك گیاهی به اطلاعات متنابهی در مورد مکانیسم‌های مولکولی در سلولهای گیاهی دست یافته‌اند (۳). در سال ۱۹۸۱ مطالعات گسترده‌ای نشان داد که مهار رشد تومورها در روش دیسك سیب زمینی در مجموع با سنجش فعالیت ضدتوموری در سیستم های حیوانی به خوبی هماهنگ و مرتبط است (۶). بر اساس اطلاعات به دست آمده از مطالعات فوق و با در نظر گرفتن محدودیتهای روش ، تست بررسی تومورهای تاجی شکل دیسك سیب زمینی می تواند به طور روتین به عنوان یك روش نسبتاً سریع، ارزان، سالم و غربالگری ابتدایی معتبر از نظر آماری برای فعالیت آنتی توموری به کار گرفته شود. مطالعه حاضر ارائه نتایج حاصله از مطالعات ضد توموری دو ترکیب سولفونامیدی سنتز شده در دانشکده داروسازی مشهد با روش ذکر شده فوق می باشد (۶،۵).

مواد و روش کار

محیط های کشت: NUTRIENT BROTH (HIMEDIA) و SOYBEAN CASEIN DIGEST BROTH (MERCK) جهت کشت روتین و نگهداری ارگانیسم به مدت کوتاه مورد استفاده قرار گرفتند. آگار (Gibco BRL) با غلظت ۱/۵ درصد در پلیت های مورد استفاده جهت آزمایش اصلی ایجاد تومور به کار برده شد.

مواد شیمیایی: آمپول وینکریستین ۱mg سفارش شرکت سهامی کشور ، ساخت بوداپست مجارستان، نمونه های XSF وSSF سنتز شده در دانشکده داروسازی مشهد مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری اگروباکتریوم توم فشنز از کشور آلمان توسط آقای دکتر نادری منش به صورت کشت عمقی داخل محیط کشت جامد و در لوله های پلی اتیلن ۲ میلی لیتری دریافت شد. بلافاصله پس از دریافت کشت های جامد تازه تهیه و از آنها در محیط نوترینت براث حاوی ۲۰٪ گلیسرول کشت های ذخیره تهیه نموده و در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد.

تهیه دیسک سیب زمینی و انجام تست : به طور کلی روش و مراحل انجام این تست را می توان در مراحل زیر خلاصه نمود:

۱ـ در ابتدا سیب زمینی های ترجیحاً مغز سفید به کمك غوطه ور شدن در وایتکس (سدیم هیپوکلرایت۱٪) به مدت ۳۰ دقیقه، استریل شدند.

۲ـ درمحفظه جریان هوای لایه‌ای افقی به کمك سمبه استریل دستگاه پرس قرص با قطر داخلی ۱/۵ سانتی متر، از سیب

www.SID.ir

Archive of SID

زمینی ها سیلندرهایی با قطر ۱/۵ و ارتفاعی وابسته به انـدازه سیب زمینی ها تهیه شد.

۳ـ در ادامـه و در زیـر دسـتگاه لامینـارفلو (GELAIR) دو سانتی متر از انتهای هر سیلندر سیب زمینی را روی یك صفحـه شیشه ای تمیز و استریل، به کمك چاقوی جراحی استریل بریده و باقیمانده سیلندر سیب زمینی به کمك چاقوی جراحی با سطح استریل شده به صورت دیسك های به ارتفاع ۰/۵ سانتی مـتر بریده شد.

۴ـ دیسك ها با پنس استریل به پلیت های حـاوی آگار ۱/۵٪ (۱/۵ g آگار حل شده در ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر، اتوکـلاو شده و سپس ۲۰ میلی لیتر در داخـل هـر پـتری دیـش بـزرگ ریخته شد) با نظم خاص و مشخصی منتقل شـد. در هـر پلیـت ۴ عدد دیسك سیب زمینی استفاده شـد و حداکـثر پـس از ۳۰ دقیقه، تلقیح بر روی دیسك های سیب زمینی انجام گرفت.

۵ـ تهیه کنترل : دو میلی لیتر آب مقطر استریل با دو میلی لیتر از کشت آبگوشتی میکروب (SCDB یا NB) که بـه کمـك اندازه گیری جذب یا مقایسه با محلول نیـم مـك فـارلند تعـداد سلول بـاکتری در حـدود $10^{9} - 10^{8}$ واحـد تشـکیل دهنـده کولونی در هر میلی لیتر بود (تعداد باکتری در هر میلـی لیـتر بر اساس تعیـین ارتبـاط بـین جـذب ۵۸۰ نـانومتر و شمـارش میکروبی به روش pour plate تعیـین گردیـد) بـه صـورت آسپتیك مخلوط و آماده استفاده شد.

۶ـ با سمپلر یا میکروپیپت ۵۰ میکرولیتری تلقیح به نمونه ها بـه هر دیسك سیب زمینی انجام شد، به نحوی که محلول نمونه ها به طورکامل ً روی سطح هر دیسك پخش شد.

۷ـ درب پلیت ها پس از آماده شـدن نهـایی و تلقیـح بسـته و سپس به کمك پارافیلم کاملا منـافذ پلیـت بسـته شـده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوباسیون انجام شد.

۸ـ پس از ۴۵ـ۳۰ روز از تلقیح، تومورها قابل شمارش شدند. جهت شمارش از میکروسکوپ تشریحی و یا رنگ کردن محیـط کشت (زمینه) و دیسك ها با محلـول لـوگول (ید ۵٪ + یدیـد پتاسیم ۱۰٪ در آب) کمك گرفته شد. از آنجایی که سـلولهای تومووری نشاسته را از دست می دهند، تومورها به رنگ سـفید و زمینه بنفش دیده می شد(تصویر۱). ابتدا از وینکریستین بـه عنوان نمونه ضد تومور با فعـالیت مشـخص و بـا غلظت‌هـای مختلف (محدوده غلظت ۰/۰۰۰۴ الی ۰/۰۸ میلی گرم بر میلـی لیتر) استفاده شد. غلظت مورد اسـتفاده ازXSF ($1mg.ml^{-1}$) و SSF ($1mg.ml^{-1}$) به شرح زیـر تهیـه گردیـد. جـهت ایـن منظور پنجاه میلی‌گرم از ماده مذکور در ده میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حـل شـد و سـپس ۰/۸ میلی‌لیـتر از محلول حاصله با ۱/۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی که در آن حـدود $10^{9} - 10^{8}$ واحـد تشکیل دهنده کولونی در هر میلی لیـتر بـود، مخلـوط شـده و مورد استفاده قرار گرفت. در مورد نمونه شرایط کـار و روش آزمایش چندین بار تکرار شد تـا براسـاس آن شـرایط اپتیمـم تعیین گردیده و به کار برده شود. از نکات بسیار قـابل توجـه که در فرآیند راه اندازی روش بـه آن توجـه شـد، نگهـداری رطوبت دیسك های سیب زمینی در طی برش، هنـگام تلقیـح و سایر مراحل و همچنین در مهمترین مراحل یعـنی در طـی زمـان انکوباسیون بود که در قسمت بحث به آنها اشاره خواهد شد.

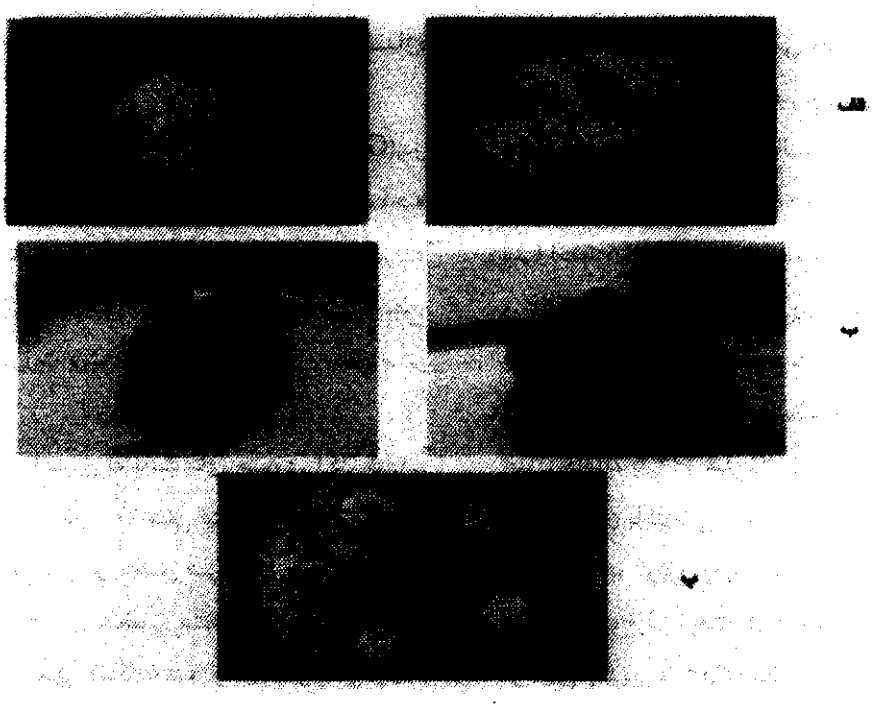
نتایج و بحث

نتایج شمارش میکروبی

جهت شمارش میکروبی از روش شمارش پرگنه های تشکیل شده در روش pour plate استفاده شد که نتایج مربوطـه بـا نمونه گیری در طـی سـاعات مختلـف (۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و۴ ساعت) حـاصل شـده و بـا رسـم نمـودار بـین لگاریتـم تعـداد پرگنه ها در مقابل جذب، در جذب بـین ۰/۴ـ ۰/۳ در طـول موج ۵۸۰ نانومتر، تعداد میکروب $10^{9} - 10^{7}$ واحـد تشـکیل دهنده کلونی در هر میلی لیتر حاصل شد. با توجه به اینکـه در ابتدای این تحقیق بهینه سازی روش تست دیسك سـیب زمیـنی انجام گرفت، درمورد بهینه سازی و کاربرد ایـن روش نکـات زیر حایز اهمیت و قابل ذکر است. علیرغم استفاده از دمای ۳۷ درجـه سـانتیگراد و دمـای اطـاق تنـها در ۲۵ درجـه سـانتیگراد نتـایج مناسـب حـاصل شـد. در توجیـه

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱: الف: نمایش تومورهای تاجی شکل درتست دیسک سیب زمینی قبل از رنگ آمیزی. ب. نمایش تومورهای تاجی شکل در تست دیسک سیب زمینی پس از رنگ آمیزی با لوگول. پ. نمایش تومورهای تاجی شکل در تست دیسک سیب زمینی در کنار دیسک های بدون تومور حاوی وینکریستین

این یافته باید توجه کرد که اگروباکتریوم توم فشنز بـرای انتقال پلاسمید خود و مکانیسم تومورزایی در محدوده دمایی ۲۵ تا ۲۸° C فعال است. علاوه بر اثر دما، ایجاد و حفـظ رطوبـت کافی در پلیت ها جهت انجام تست و تومورزایی و جلوگیری از خشك شدن سطح دیسك های سیب زمینی بسیار الزامی اسـت، به صورتی که بایستی بین برش دیسك ها و تلقیح نمونه ها روی آنها بیش از ۳۰ دقیقه فاصله زمانی نباشد و نیز در این فاصلـه از خشك شدن سطح دیسك به وسیله قرار دادن سر پتری دیش ممانعت شود. به صورت تجربی نتایج بهتر زمانی به دسـت آمـد که پلیت ها، بلافاصله پـس از تلقیـح در سـاعت اول پـارافیلم بسته و سپس در گرمخانه قرار داده می شـود. در همـین راسـتا میزان آب مورد استفاده جـهت تهیـه آگار ۱/۵٪ بـه عنـوان محیط پایه نگهداری دیسك ها نیز مهم مـی باشـد و ترجیحـاً برای فراهم شدن رطوبت کافی بایستی آگار بـه صـورت تـازه تهیه شود. جهت رشد تومورهای تاجی شکل روی دیسك‌های سیب زمینی، پس از فراهم شدن شرایط اُپتیمم دمـا و رطوبـت، زمان لازم بین ۳۰ تا ۴۰ روز می باشد و از آن جا که این زمان نسبتاً طولانی می باشد، امکـان آلـودگی قـارچـی و میکـروبی پلیت ها و تغییر شرایط و به هم خوردن تست وجود دارد.

نتـایج حـاصل از تسـت دیسـک سـیب زمینـــی در نمونه های وینکریستین

در مرحلـه اول از ۲۵ پلیـت کنـــترل مثبـــت (میکـــروب تومورزا) در تمام دیسك ها تومورهای تاجی شکل و برآمـده از سطح دیسك سیب زمینی دیده شد. در همین زمان در دیسـکهای حاوی وینکریستین به تنهایی (کنترل منفی) هیچ تغییری دیـده نشد. همچنین در پلیت هایی که حاوی دیسکهای کنترل مثبـت (میکروب تومورزا) به تنهایی بودند، از ۳ تا ۲۰ تومور بـه ازای هر دیسك شمرده شد. این پلیت ها هر کدام حاوی یـك دیسـك سیب زمینی بدون تلقیح به عنوان کنترل بافت سیب زمینی بودند که روی کنترل بافت سیب زمینی نیز هیچ پدیده ای دیده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از تست دیسک سیب زمینی در غلظت های مختلف وینکریستین

در این تست در غلظت های C_1 و C_2 و C_3 از وینکریستین مهار رشد تومور به طور کامل دیده شد. در غلظت C_4، از ۲۵ پلیت تهیه شده و ۱۰۰ دیسک حاوی این غلظت تنها در سه دیسک تومور دیده شد.

جدول۱ : نتایج حاصل از تست دیسک سیب زمینی در غلظت های مختلف وینکریستین، SSF و XSF

ترکیب مورد مطالعه	غلظت	درصد تعداد تومور تاجی
وینکریستین	$C_1 = ۰/۰۸ \text{ mg} . \text{ml}^{-1}$	———
وینکریستین	$C_2 = ۰/۰۰۸ \text{ mg} . \text{ml}^{-1}$	———
وینکریستین	$C_3 = ۰/۰۰۴ \text{ mg} . \text{ml}^{-1}$	———
وینکریستین	$C_4 = ۰/۰۰۰۴ \text{ mg} . \text{ml}^{-1}$	٪۳
SSF	$۱ \text{ mg}. \text{ml}^{-1}$	٪۲۱
XSF	$۱ \text{ mg}. \text{ml}^{-1}$	———

در مورد نمونه SSF ، ۲۵ پلیت که هرکدام حاوی دوعدد دیسک کنترل (بدون ماده مورد آزمایش) و دو عدد دیسک حاوی نمونه بود، نتایج زیر حاصل گردید. تعداد دیسکهای کنترل حاوی تومور ۳۹ عدد که با ماکزیم دقت بیش از ۷۰۰ عدد تومور بر روی آنها شمارش شد. دیسکهای حاوی نمونه مورد آزمایش همگی واجد تومور بودند و ۱۵۰ عدد تومور بر روی آنها شمارش شد. در آزمایشات انجام گرفته با XSF علیرغم ایجاد تومورهای تاجی شکل بر روی کلیه دیسکهای کنترل، هیچگونه رشد تومور در دیسکهای تحت تاثیر ماده مورد آزمایش در غلظت مورد نظر مشاهده نشد.

اثرات مهارکننده توموری در مورد ترکیب SSF با توجه به نتایج حاصله بسیار قابل توجه است (۷۹٪ مهار رشد توموری) و در مورد ترکیب XSF این اثر بیشتر قابل ملاحظه است. متاسفانه یکی از اشکالات روش به کار گرفته شده که در مقابل نقاط قوت آن می‌توان مطرح نمود صرف زمان نسبتا طولانی برای گرفتن و خواندن نتایج است، به نحوی که علاوه بر صرف زمان زیاد در راه اندازی روش ، زمانی در حدود یك ماه برای بررسی نتایج هر سری آزمون لازم بود. بنابراین آزمایشات تکمیلی و مفصل با ترکیبات فوق الذکر و سایر عواملی که به عنوان ترکیبات دارای اثرات ضد توموری هستند برای نتیجه‌گیری نهایی اثرات آنها لازم است وکسب نتایج فوق می‌تواند تنها به عنوان یك نقطه شروع برای این کار به حساب آید.

References

1. Abel G., Connors T. A., Ross W. C., Nguyen-Hong-Nam., Hoellinger H., Pichat L., 1973, The selective concentration of sulphadiazine and related compounds in malignant tissue, European Journal of Cancer (Oxford), 9 (1):49-54.
2. Branda R. F., McCormack J. J., Perlmutter C. A., 1988, Cellular pharmacology of chloroquinoxaline sulfonamide and a related compound in murine B16 melanoma cells, Biochemical Pharmacology, 37 (23):4557-64.
3. Christey M. C., Braun R. H., Kenel F. O., Podivinsky E., 1999, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of swede. Proceeding of the 10th international rapeseed congress, Canberra, Austeralia, 1-6.
4. Delgado J. N., Remes W. A., Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998, 223-234.
5. Ferrigni N. R., Putnam J. E., Anderson B., Jacobsen L. B., Nichols D. E., Moore D. S. and MC, Laughlin J. L., 1982, Modification and evaluation of the potato disc assay and anti -tumor screening of euphorbiacea seeds, Journal of Natural Products, 45, 679 – 686.
6. Mclaughlin J. L., Crown Gall Tumors, in: Hostettmann, K., (ed) Methods in Plant Biochemistry., Academi Press, London, 1994, Vol. 6, 1- 31.
7. Owa T., Yoshino H., Okauchi, T., Yoshimatsu K., Ozawa Y., Sugi N. H., Nagasu T., Koyanagi N., Kiotoh K., 1999, Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of cell cycle, Journal of Medicinal Chemistry, 42 (19): 3789-99.
8. Quoirin M., Hagiwara W. E., Zanette F., Oliviera D. E., 2000, In vitro susceptibility of two tropical Acacia species to Agrobacterium tumefaciens. Scientia Forestalis, 58, 91-97.
9. Stanley J. T. *et. al.*, Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989, 244-255.

www.SID.ir