Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

سنتز هیبرید پارتنولید و ملفالان و بررسی قدرت سمیت سلولی آن در برابر سلولهای سرطانی سینه

انسیه کریمی[۱]، مهرداد ایرانشاهی[۲*]، علی الماسی راد[۳]، احسان کریمی[۴]

۱-دانشجو شیمی دارویی.
۲- استاد مرکز تحقیقات فناوری زیستی.
۳- دانشیار گروه شیمی دارویی.
۴- استادیار گروه زیست شناسی.

۱و۳-گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲-مرکز تحقیقات فناوری زیستی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴-گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول:
مهرداد ایرانشاهی؛ مرکز تحقیقات فناوری زیستی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۵۵۰۰۲۹۰۷
Email: iranshahim@mums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف : ملفالان (MEL) یک عامل شیمی درمانی در درمان ملانوم متاستاتیک و سرطان پستان است . با این حال، عوارض جانبی MEL برنامه های بالینی آن را محدود می کند.

پارتنولید، سزکویی ترپن لاکتون در گیاه دارویی گل بابونه گاوی میباشد که دارای خاصیت ضد لوسمی **است**. با وجود مزیت‌های زیاد ، این ترکیبات دو نقص آشکار دارند: غیر اختصاصی بودن برای سلول‌های سرطانی و حلالیت اندک در آب. هدف از انجام این تحقیق سنتز هیبریدی از ملفالان و پارتنولید بوده تا کارایی بهتری نسبت به داروهای ضد سرطان داشته باشد و همچنین اثر سمیت سلولی هیبرید به دست آمده بر روی رده سلولی پستان (MDA- MB-231) بررسی شد.

روش بررسی: جهت سنتز هیبرید مورد نظر، داروی ضد سرطان آمین دار ملفالان را از طریق واکنش افزایش مایکل به سزکوئی ترپن لاکتون سایتوتوکسیک پارتنولید مزدوج و پس از جداسازی هیبرید با روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، توسط تست آلاماربلو سمیت سلولی آن مورد بررسی قرار گرفت .

یافته ها: در ادامه مزدوج سازی داروی ضد سرطان ملفالان با سزکوئی ترپن لاکتون سایتوتوکسیک پارتنولید، محصول پارتالان سنتز و با استفاده از طیف های به دست آمده از LC-MS تأیید شد. نتایج حاصل از سمیت سلولی نشان داد که توان حیاتی سلول‌های سرطانی به صورت وابسته به دوز به کاهش و IC_{50} پارتالان، پارتنولید و هیبرید به ترتیب 13/5 ، 24 و 23 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد.

نتیجه گیری: براساس پژوهش انجام شده هیبرید شدن پارتنولید به همراه ملفالان باعث افزایش اثر ماده پارتنولید شده است.

واژگان کلیدی : سرطان پستان، ملفالان ، سزکوئی ترپن لاکتون، پارتنولید ، سمیت سلولی .

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۵/۳۰ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰ اعلام قبولی: ۱۳۹۹/۲/۴

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان اولین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته، دومین عامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و سومین عامل مرگ و میر در ایران میباشد. سرطان پستان یکی از شایع ترین انواع بدخیمی در بین زنان ایرانی است (۱). از دو دهه گذشته، تحقیقات مربوط به سرطان پستان منجر به پیشرفت فوق العاده ای در درک ما از این بیماری شده است، که منجر به درمان های مؤثرتر و با سمیت کمتر می شود(۲). درصد داروهایی که امروزه برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای منشاء طبیعی هستند که این مهم بر اهمیت تکیه بر ترکیبات طبیعی به منظور کشف داروهای ضد سرطان جدید و همچنین کشف هدفهای داخل سلولی جدید میافزاید (۳). بسیاری از ترکیبات ضد سرطانی که امروزه به عنوان دارو استفاده میشوند بر روی سلولهای بنیادی سرطان بی تاثیر یا کم تاثیر هستند و در نتیجه به طور انتخابی باعث افزایش جمعیت این سلولها شده و مشکلات بعدی حاصل از رشد این سلولها که شامل متاستاز و مقاومت به درمان است ایجاد می‌گردد(۴). بر روی این سلولها، سزکوئی ترپن لاکتونها از جمله پارتنولید بسیار موثر بوده اند و اثر بخشی آنها حتی از داروهای شیمیایی ضد سرطان نیز بهتر بوده است (۵). پارتنولید به عنوان یک داروی ضد سرطان بر روی انواع ردههای سرطانی ازجمله سرطان گردن، سرطان مغز، سرطان خون، سرطان پانکراس، سرطان پروستات، سرطان شش، سرطان پوست و سرطان روده تست شده است.

با وجود مزیتهای بسیار زیاد سزکوئی ترپن لاکتونها، این ترکیبات دو نقص آشکار دارند: غیر اختصاصی بودن برای سلولهای سرطانی و حلالیت اندک در آب. در واقع این ترکیبات می‌توانند به کمک پیوند دوگانهٔ خود با بسیاری از پروتئینها در سلولهای معمولی اتصال برقرار کنند و سمیت نشان دهند. از طرفی به دلیل ماهیت چربی دوستی آنها تهیهٔ یک فرآورده دارویی مناسب مشکل می‌باشد. تلاش‌های بسیاری برای ساختن آنالوگ‌های پارتنولید با حلالیت بهتر در آب با خواص سیتوتوکسیک قوی در چند سال گذشته انجام شده است. در سال ۲۰۰۸، نسیم و همکارانش با استفاده از آمین‌های نوع اول و دوم یک سری از آنالوگ‌های آمینوپارتنولید را سنتز کردند. همچنین اثرات سمیت سلولی آنالوگ‌های ۱۴۹–۱۵۸ را مورد بررسی قرار دادند (۶). در سال ۲۰۰۹، نیلاکانتان و همکارانش یک سری دیگری از آنالوگ‌های ۱۵۹–۱۶۸ آمینو پارتنولید را تولید و سمیت سلولی آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند (۷). همچنین در سال ۲۰۱۴ جانگاناتی و همکارانش توانستند آنالوگ‌های ۱۶۹–۱۷۳آمینو پارتنولید را سنتز کنند(۸). بکمن و همکاران در سال ۱۹۹۷ به بررسی سمیت سلولی ***helenalin*** نوعی سزکوئی‌ترپن لاکتون پرداختند(۹).

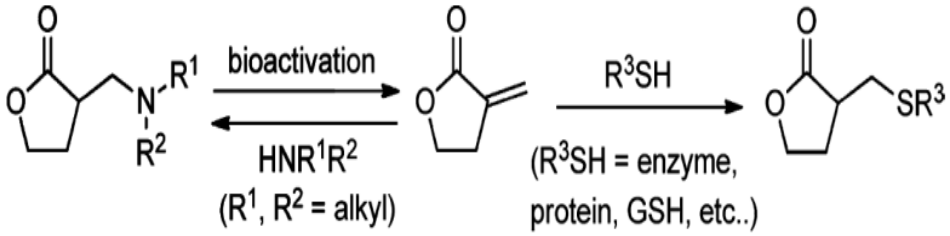
اضافه کردن یک آمین نوع اول و دوم به پیوند دوگانه موجود در حلقه لاکتون به عنوان بهترین راه حل در تبدیل سزکوئی ترپن لاکتونها به داروهای ضد سرطان گزارش شده است (۱۰).

از این روش در واقع یک پیش دارو تولید می‌شود و به دلیل اضافه شدن یک گروه آمین انحلال سزکوئی ترپن لاکتونها از جمله پارتنولید در آب بسیار بهبود پیدا میکند و مشکل عدم انحلال مناسب این ترکیبات در آب رفع می-شود. همچنین به دلیل اینکه در سلولهای سرطانی مقادیر بیشتری از گلوتاتیون نسبت به سلولهای معمولی وجود دارد پیوند دوگانه، که برای سمیت این ترکیبات ضروری است به طور اختصاصی تر در سلولهای سرطانی از طریق حملهٔ اتم Sو ترک مولکول آمین ایجاد می‌شود (شکل ۱) و از این طریق به طور اختصاصی تر آزادسازی دارو در سلول سرطانی انجام می پذیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

ملفالان ($C_{13}H_{18}Cl_{12}N_2O_2$) یک عامل آلکیله کننده شناخته شده است که در حال حاضر به عنوان یک عامل ضد سرطان در انسان استفاده می شود و در چرخه سلولی به‌طور غیراختصاصی اثر می‌کند. اثر این دارو عمدتاً مربوط به ایجاد اتصال بین دو رشته مولکولی DNA و RNAو مهار ساخت پروتئین است که در درمان سرطان تخمدان، پستان و بیضه مصرف می‌شود(۱۱). ملفالان، به ویژه هنگامی که در دوزهای بالا استفاده می‌شود، انواع مختلف عوارض جانبی را نشان می هد. شایعترین عارضه جانبی در طول درمان، سرکوب مغز استخوان است که منجر به لوسیون و ترومبوسیتوپنی می شود. مشکل این است که مشتقات آمین حاوی پارتنولید در اکثر موارد اثر خود را از دست می‌دادند. با توجه به نیاز به آنالوگ پارتنولید فعال با حلالیت مناسب در آب، ما یک روش جدید برای آماده‌سازی دارویی آنالوگ‌های پارتنولید با خواص سیتوتوکسیک قوی توسط واکنش پارتنولید با داروهای ضد سرطان از جمله ملفالان، از طریق یک واکنش کارامد آزا مایکل پیشنهاد دادیم و هیبرید جدیدی (پارتنولید–داروی ضد سرطان) به نام پارتالان سنتز و همچنین اثر سمیت سلولی هیبرید به دست آمده را بر روی رده های سلولی MDA-MB-231 بررسی کردیم.



شکل۱: مکانیسم تبدیل شکل آمین دار سزکوئی ترپن لاکتون به فرم فعال آن و نحوه اتصال به گروههای سولفیدریل

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

دستور کار عملی افزایش مایکل پارتنولید با ملفالان

۲۰ میلی گرم پارتنولید (۰/۰۸ میلی مول) در ۵۰۰ میکرولیتر حلال DMSO حل شده و سپس ۴۱ میلی گرم ملفالان (۰/۱۲ میلی مول)، به‌محلول اضافه شد. واکنش در حضور کاتالیزورهای مختلف از جمله PEG، [AC][DBU] و [DBU] مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با اعمال دما محصولی تولید نشده است. واکنش در دمای اتاق انجام شد نتایج نشان داد محصول ایجاد شده است ولی بازده محصول به‌دست آمده از کاتالیزور [DBU] بیشتر از کاتالیزور [AC][DBU] است و در مورد کاتالیزور PEG محصولی تولید نشده است. در ادامه برای افزایش بازده‌ی محصول تغییراتی در مقدار کاتالیزور داده شد، اما هیچ گونه تغییری در میزان بازده‌ی محصول ایجاد نشد (جدول1).

سپس ۲۵ میکرولیتر کاتالیزور مورد نظر (DBU) نیز به مخلوط واکنش اضافه شد و محلول به مدت ۸ ساعت با استفاده از یک مگنت بر روی دستگاه همزن مغناطیسی در دمای اتاق هم زده شد. پیشرفت واکنش با TLC کنترل شد (اتیل استات : متانول : آب: آمونیاک: ۴ : ۲ : ۰/۵: ۰/۱ میلی لیتر). پس از خالص‌سازی توسط دستگاه HPLC مقدار ۵۱/۸ میلی گرم محصول (پارتالان) در حلال DMSO و دمای اتاق و در حضور کاتالیزور [DBU] با راندمان ۸۵٪ به‌دست آمد.

جداسازی و خالص سازی هیبرید مورد نظر به روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC)

دستگاه *HPLC* با مشخصات زیر استفاده شد:

پمپ: ۱۰۵۰، دتکتور فرابنفش: ۲۵۰۰، ستون: مونولیت، لوپ: ۲۰۰۰ میکرولیتر.

دو نوع سیستم حلالی(فاز متحرک) گرادیانت برای جداسازی هیبرید حاصل از واکنش پارتنولید با ملفالان مورد استفاده قرار گرفت.

سیستم فاز متحرک یک: زمان شویش در این سیستم ۱۶ دقیقه بود که با ۸۰٪ آب و ۲۰٪ متانول شروع و در عرض ۱۰ دقیقه به ۱۰۰٪ متانول و ۰٪ آب رسید و ۳ دقیقه در متانول مطلق شویش ادامه پیدا کرد. طی دو دقیقه سیستم به حالت اولیه ۸۰٪ آب و ۲۰٪ متانول برگشت، و در این حالت برای ۱ دقیقه شسته شد.

سیستم فاز متحرک دو: زمان شویش در این سیستم ۱۱ دقیقه بود که شویش با۶۰٪ آب و ۴۰٪ متانول شروع شد و در عرض ۴ دقیقه به ۸۵٪ متانول و ۱۵٪ آب رسید و ۳۰ ثانیه در این حالت شویش پیدا کرد تا به ٪۱۰۰، متانول رسید و ۳ دقیقه با این سیستم شستشو پیدا کرد. طی ۱ دقیقه سیستم به حالت اولیه ۶۰٪ آب و ۴۰٪ متانول برگشت، و در این حالت برای ۲ دقیقه شسته شد. بعد از تنظیم کردن سیستم فاز متحرک، طول موج بر روی ۲۵۴ نانومتر تنظیم شد. قبل از تزریق نمونه برای اطمینان از صحت تنظیمات دستگاه و ستون، یک نمونه که حاوی چهار ترکیب اوراسیل، ۴-هیدروکسی متیل بنزوات، ۴-هیدروکسی اتیل بنزوات و بنزوفنون به عنوان استاندارد HPLC تزریق شد.

مقایسه‌ی کروماتوگرام سیستم فاز متحرک یک و دو(شکل ۳و۴).) با توجه به کروماتوگرام سیستم یک، هیبرید در زمان ۷/۳۲ ظاهر شد که در این زمان سیستم حلالی ۹۰٪ متانول و ۱۰٪ آب بود. در نتیجه هیبرید با این درصد فاز متحرک جدا شد. در سیستم دو با توجه به کروماتوگرام آن، هیبرید(شکل ۵). در زمان ۶/۸ دقیقه ظاهر شد که در این زمان سیستم حلالی ۱۰۰٪ متانول بود. در نتیجه هیبرید کاملا با حلال متانول جدا شد. از آن‌جا که پارتالان در مجاورت با آب ۸۰٪ تخریب می‌شد، ما سیستم مناسب برای جداسازی را سیستم دو انتخاب کردیم.

به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم واکنش، ۹۰ میلی گرم هیبرید جداسازی شد. سپس حلال متانول آن با دستگاه تبخیر کننده

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

دوار خشک شد. در نهایت ۹۰ میلی گرم هیبرید مورد نظر با نام پارتالان به صورت پودر سفید رنگ به دست آمد که خالص بودن آن با تزریق دوباره آن به سیستم HPLC تایید شد.

شکل شماتیک واکنش افزایش مایکل پارتنولید با ملفالان در زیر ارائه شده است(شکل ۲).

جدول۱: نتایج واکنش افزایش مایکل بین پارتنولید و ملفالان در شرایط مختلف[۱]

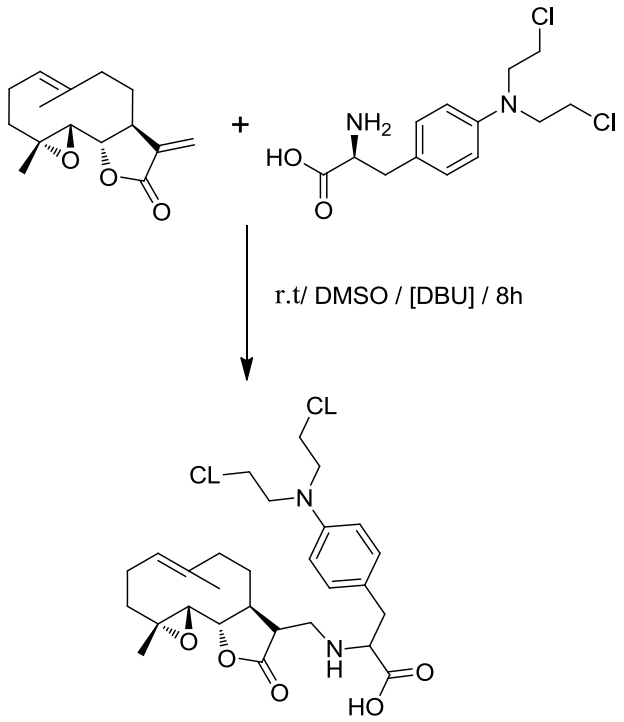
حلال	دما(°C)	کاتالیزور	زمان(h)	راندمان [۲]
DMSO	r.t	-	۲۴	-
DMSO	۵۰	–	۲۴	–
DMSO	۶۰	–	۲۴	–
DMSO	۷۰	–	۲۴	–
DMSO	۸۰	–	۲۴	–
Solvent free	۶۰	PEG	۲۴	–
Solvent free	r.t	PEG	۲۴	–
DMSO	r.t	[DBU][AC]	۲۴	٪۱۰
DMSO	۶۰	[DBU][AC]	۲۴	–
Solvent free	r.t	[DBU][AC]	۲۴	٪۵
Solvent free	۶۰	[DBU]	۲۴	–
DMSO	r.t	[DBU]	۸	٪۸۵

۱- شرایط واکنش: پارتنولید mg ۲۰ و ملفالان mg ۴۱

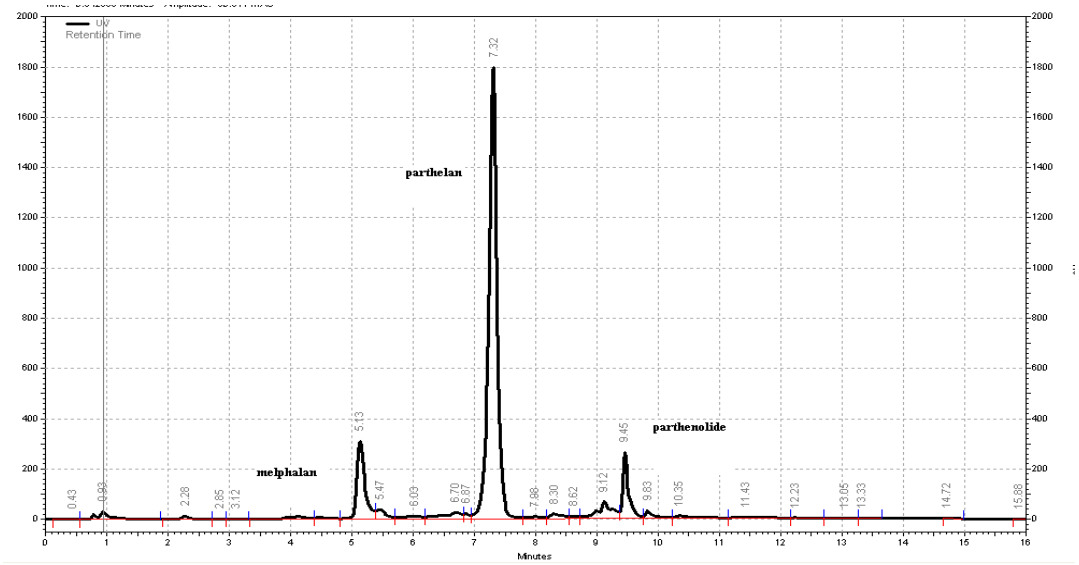
۲- راندمان محصول جداسازی شده

www.SID.ir

Archive of SID



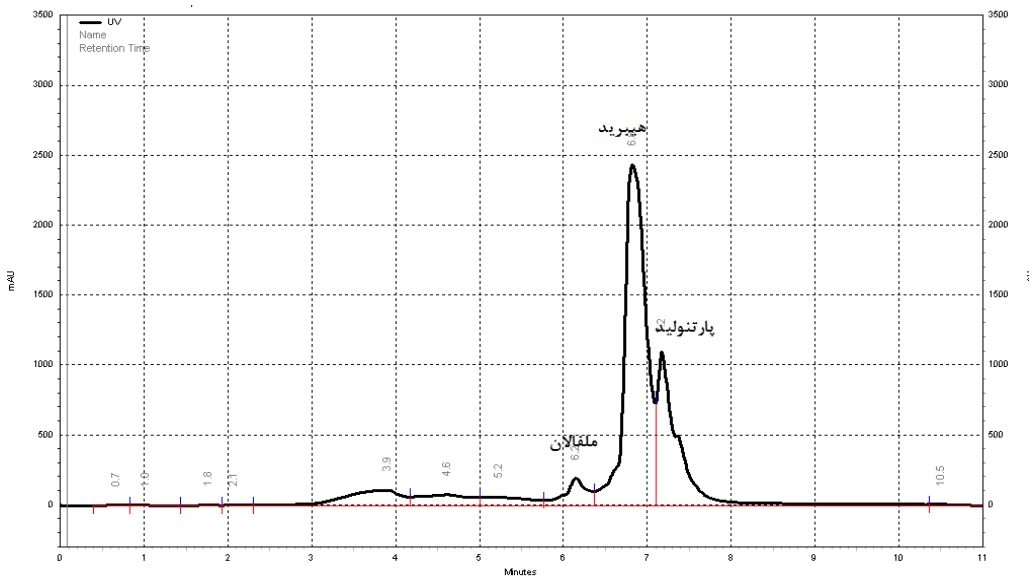
شکل۲: واکنش کامل پارتنولید با ملفالان



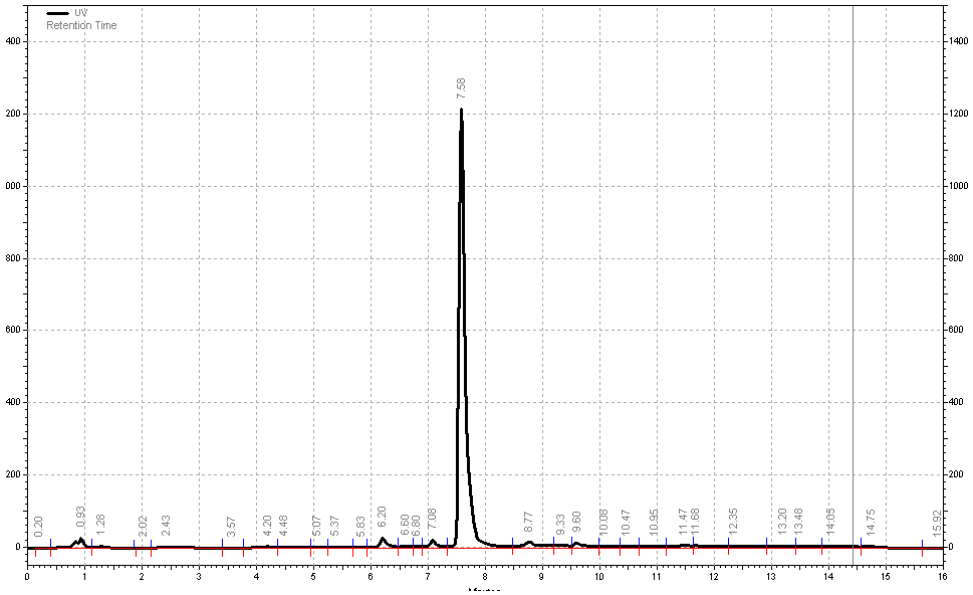
شکل ۳: کروماتوگرام واکنش با سیستم فاز متحرک یک

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: کروماتوگرام واکنش با سیستم فاز متحرک دو



شکل ۵: کروماتوگرام پیک هیبرید خالص

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی سمیت سلولی

آزمون AlamarBlue®

AlamarBlue® اولین نام تجاری برای رزازورین (resazurin) است. این رنگ از سال ۱۹۹۳ برای آزمون‌های سمیت سلولی و تکثیر رده‌های سلولی توموری مختلف و لنفوسیت‌ها در دسترس می‌باشد. رزازورین، آبی و غیر فلورسنت است (λ_{max}=۶۰۰ nm)که به رزورفین صورتی رنگ و بسیار فلورسنت احیا می‌شود (λ_{max}= ۵۷۰ nm) و احیاء بیشتر آن هیدرورزورفین را تولید می‌کند که بی رنگ و غیر فلورسنت است. واکنش این تبدیل در شکل زیر نمایش داده شده است(شکل۶).

از مهمترین مزایای این روش میتوان به موارد زیر اشاره کرد:

- ✓ رنگ AlamarBlue® دارای حساسیت بالایی است که به واسطه‌ی ویژگی فلورسنت آن می‌باشد.
- ✓ این تست علاوه بر رنگ سنجی، به وسیله‌ی فلوریمتری نیز قابل اندازه‌گیری است .
- ✓ این رنگ غیر سمی بوده و باعث کشته شدن سلول‌ها نمی‌شود.
- ✓ رنگ AlamarBlue® به مواد با خاصیت آنتی اکسیدان حساسیت نداشته و میزان احیا شدن آن تحت تاثیر قرار نمی-گیرد .

در طی 3 بار تکرار این تست از پارتنولید، ملفالان و مخلوط آنها یعنی مخلوط پارتنولید با ملفالان به عنوان کنترل مثبت و در غلظتهای یکسان استفاده شده است. بنابراین از تمامی داده ها میانگین گرفته و نمودار مربوط به درصد زنده ماندن سلولها در برابر غلظت برای رده سلولی MDA-MB-231 رسم شد.

با استفاده از فرمول زیر درصد کشندگی محاسبه شد که با کم کردن از صد، درصد زنده ماندن سلولها محاسبه گردید.

$$\%IC = \frac{T - UT}{B - UT} \times 100$$

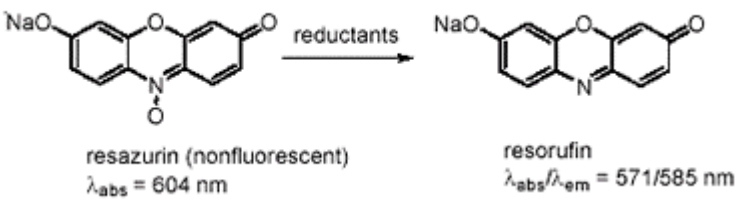
T: میزان جذب غلظت های مختلف نمونه ها در طول موج 600 nm

B : میزان جذب بلانک (دارای محیط کشت به تنهایی) در طول موج 600 nm

UT : میزان جذب کنترل منفی (دارای محیط کشت به همراه سلول) در طول موج 600 nm

پس از انجام محاسبه‌ی درصد زنده ماندن سلول‌ها در برابر غلظت‌های مختلف و رسم نمودارهای مربوطه (شکل ۷)، غلظتی که ۵۰ درصد کشندگی رخ داده است (IC_{50}) برای هر کدام از ترکیبات محاسبه گردید.

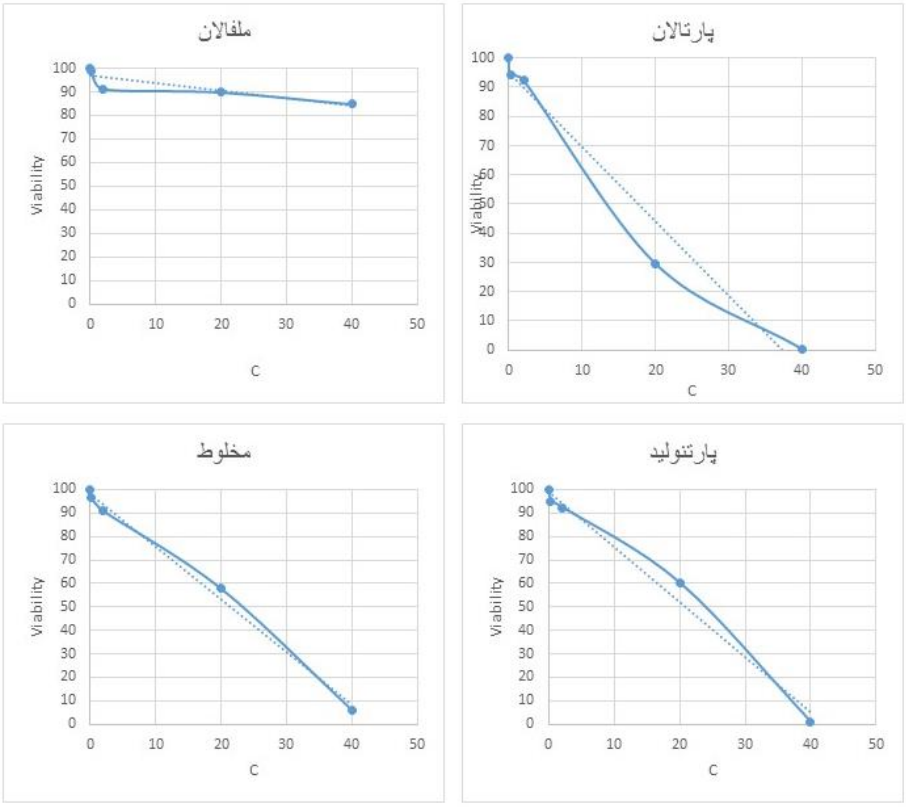
آنالیز آماری نتایج AlamarBlue® به وسیله نرم افزار Prism5، آزمون One way ANOVA و Two way ANOVA انجام شد.



شکل۶ : واکنش تبدیل رزازورین به رزورفین

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷: نمودار درصد زنده ماندن سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف در رده سلولی MDA-MB-231

یافته ها

بررسی واکنشهای انجام شده بین پارتنولید و ملفالان

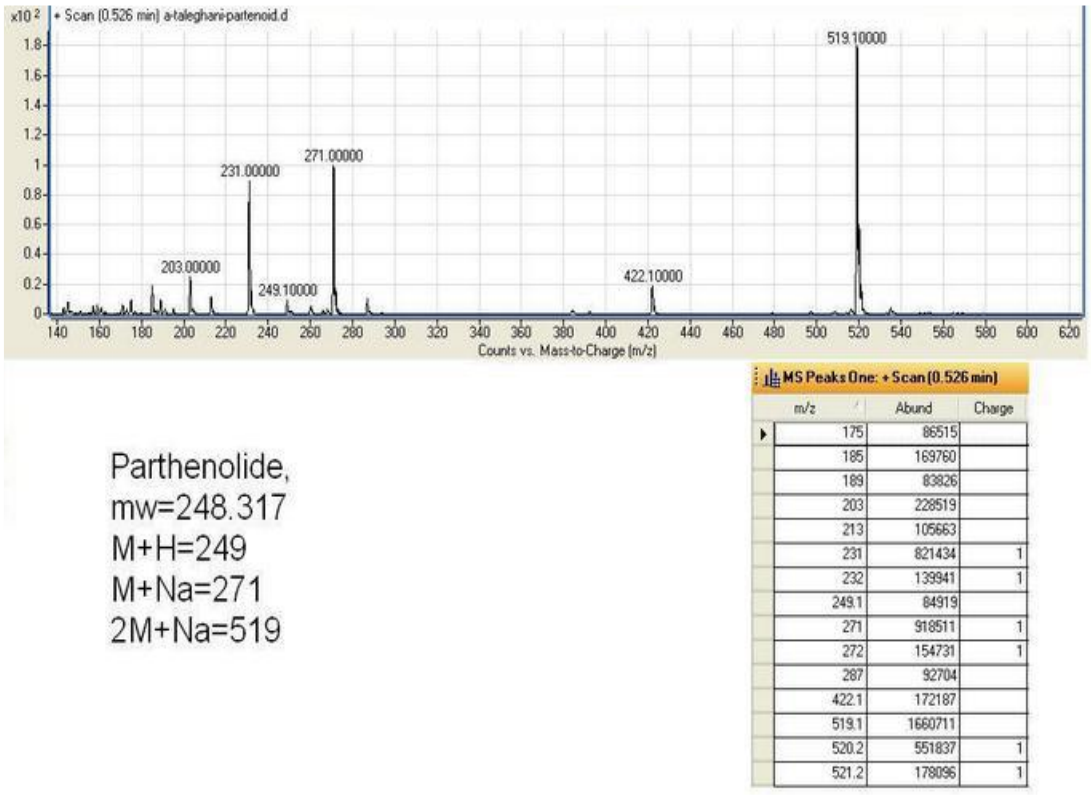
محصول پارتالان با روش مزدوج سازی سنتز و توسط کروماتوگرافی مایع با فشار بالا جداسازی شده و با استفاده از طیف LC-MS مورد شناسایی قرار گرفت(شکل ۸ و ۹و۱۰).

نتایج حاصل از درصد زنده ماندن سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف در رده سلولی MDA-MB-231

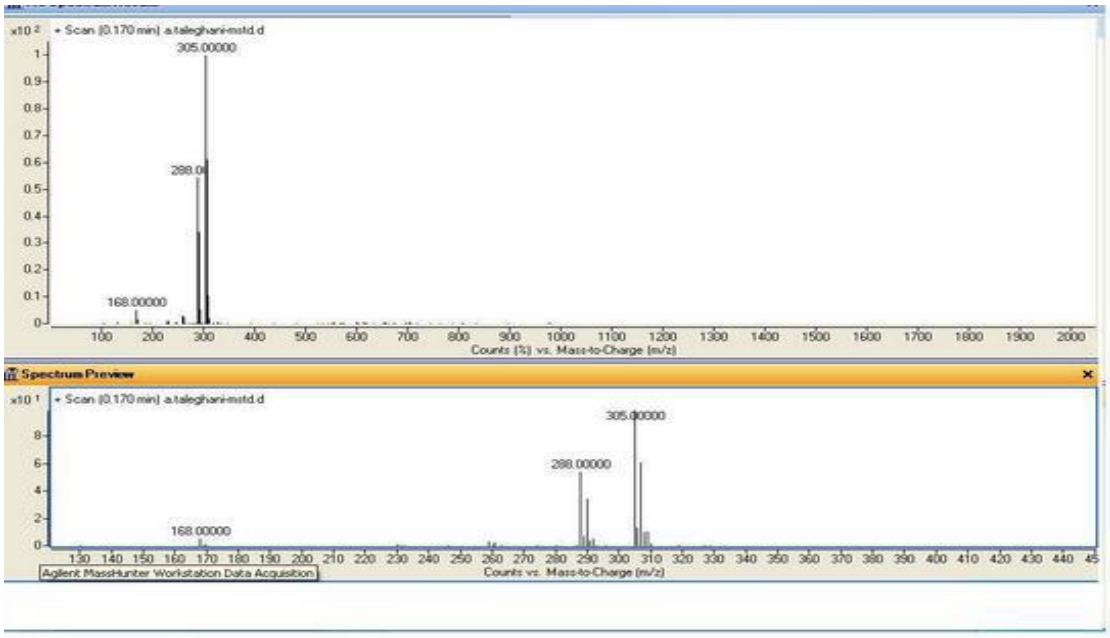
بر اساس نتایج بدست آمده در تست سمیت سلولی و نتایج IC_{50} پارتالان در مقایسه با پارتنولید و ملفالان بر روی رده‌ی سلولی MDA-MB-231 مشاهده می‌شود که هیبرید از غلظت ۰/۱-۲۰ میکرومولار موثر واقع شد. به هر حال با افزایش غلظت، هیبرید و کنترل‌ها اثربخشی بیشتری دارند. در غلظت ۲۰ میکرومولار، پارتالان ۹۰ تا ۱۰۰٪ سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند (جدول ۲). مقدار IC_{50} پارتالان، پارتنولید و مخلوط پارتنولید و ملفالان در ۴۸ ساعت بعد از تیمار، به ترتیب حدود 13/5 ، 24 و 23 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد(جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



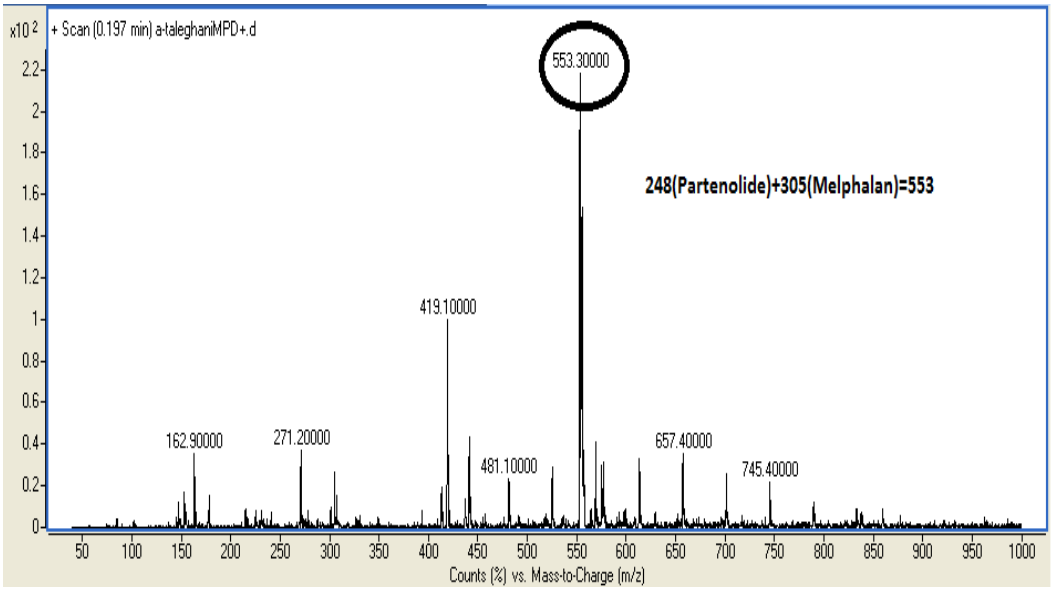
شکل ۸: طیف LC-MS پارتنولید



شکل ۹: طیف LC-MS ملفالان

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰: طیف LC-MS پارتالان

جدول۲ : محاسبه درصد زنده ماندن پارتالان و کنترل‌ها در رده سلولی MDA-MB-231

ترکیبات بکار رفته	20 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml
پارتنولید	0.89	60.12	92.33	95.18
ملفالان	84.7	89.82	91.25	98.7
هیبرید	6.14	57.74	90.73	96.38
پارتالان	0.46	29.72	92.65	94.45
کنترل منفی	100	100	100	100

جدول۳ : نتایج IC_{50} پارتالان در مقایسه با پارتنولید و ملفالان بر روی رده‌های سلولی MDA-MB-231

ترکیبات بکار رفته	IC_{50} (µM)
پارتنولید	24
ملفالان	23
هیبرید	-
پارتالان	13/5

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

سرطان دومین عامل مرگ و میر بعد از بیماری های قلبی عروقی در بسیاری از جوامع از جمله ایران است(۱۲). یکی از روش هایی که به طور معمول برای کنترل پیشرفت سرطان ها و از جمله سرطان پستان استفاده می شود، شیمی درمانی است. اما به دلیل عدم انتخابی بودن و سمیت بالا، عوارض جانبی و حتی آسیب های بافتی غیرقابل برگشتی در اندام سالم بدن ایجاد می کند(۱۲و۱۳).

از جمله ترکیبات طبیعی که اثر خوبی در از بین بردن رده سلولی MDA-MB-231 دارند، پارتنولید می باشد که یک سزکوئی ترپن لاکتون است. برخی از سزکوئی ترپن لاکتون ها دارای یک حلقه لاکتون غیر اشباع می باشند. این ترکیبات اثرات بیولوژیک بسیاری از خود نشان داده اند که از این میان می‌توان به خواص ضد التهاب، ضد مالاریا، ضد کرم، ضد باکتری و ضد سرطان آن‌ها اشاره کرد که اثرات ضد التهاب و ضد سرطان این ترکیبات در مرکز توجه هستند (۱۴و۱۵).

اما مشکلاتی در زمینهٔ سزکوئی‌ترپن لاکتون ها مطرح است. چربی دوستی بسیار بالای آن (که تهیه فرآورده دارویی از آنها را مشکل می‌کند) و همچنین اختصاصی بودن کمتر آنها در مقایسه با دیگر ترکیبات ضد سرطان از جمله این مشکلات است(۱۶و۱۷).

اضافه کردن یک آمین نوع اول و دوم به پیوند دوگانه موجود در حلقه لاکتون از طریق واکنش آزامایکل به‌عنوان بهترین راه حل در تبدیل سزکوئی ترپن لاکتون‌ها به داروهای ضد سرطان گزارش شده است(۱۸و۱۹). با این روش مشکل عدم انحلال مناسب این ترکیبات در آب رفع می‌شود. حضور ترکیباتی مانند دی متیل آمینو پارتنولید در فازهای بالینی برای درمان سرطان گواه این مطلب است. اتصال گروه دی متیل آمینو به پذیرنده‌ی مایکل علاوه بر این‌که باعث افزایش حلالیت می‌شود فعالیت پارتنولید در داخل سلول به‌خاطر جدا شدن این گروه حفظ می‌شود. برای سنتز دی متیل آمینو پارتنولید، پارتنولید با دی متیل آمین واکنش داده شد و محصولی با ۹۷٪ بازده تولید گردید. اما قدرت اثر سزکوئی ترپن لاکتون هایی که باند دوگانه ی آنها اشباع می شود اغلب کاهش می یابد. هدف ما در این پروژه بهبود حلالیت و همچنین حفظ کردن قدرت اثر می باشد که طبق نتایج بدست آمده علاوه بر حفظ آن، قدرت اثر بهتر هم شده است. در مشتقات آمین علی رغم اینکه باند دوگانه اشباع شده است ولی چون گروه آمین گروه ترک کننده خوبی است گروه های *SH* مستقر روی گلوتاتیون در رده سلولی MDA-MB-231 به آن حمله می کنند و پارتنولید آزاد می شود. گلوتاتیون در سلول های سرطانی بیشتر از سلول های عادی می باشد (۱۹). طبق نتایج گزارش شده محصول (پارتالان) در حلال DMSO و دمای اتاق و در حضور کاتالیزور [DBU] سنتز شد و با استفاده از طیف LC-MS مورد شناسایی قرار گرفت.

بررسی طیف LC-MS:

جرم مولکولی پارتنولید و ملفالان به ترتیب به‌صورت $[M]^+$= 248 m/z و $[M]^+$= 305 m/z گزارش شده است. نتایج طیف پارتالان نشان می‌دهد که پارتنولید با ملفالان به یکدیگر متصل شده است.

248 (parthenolide) + 305 (melphalan) = 553 m/z

بر اساس نتایج بدست آمده در تست سمیت سلولی و نتایج IC_{50} پارتالان در مقایسه با پارتنولید و ملفالان بر روی رده سلولی MDA-MB-231 مشاهده می‌شود که در این رده سلولی درصد زنده ماندن هیبرید سنتز شده و کنترل‌ها از غلظت پایین به بالا کاهش پیدا می‌کند. همچنین اثربخشی هیبرید پارتالان حتی در کمترین غلظت خود(۰/۱ میکرومولار) از تمام کنترل‌ها بیشتر است. بر طبق گزارش ها

www.SID.ir

Archive of SID

پارتالان در این رده از غلظت ۰/۱-۲۰ میکرومولار موثر واقع شده است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که هیبرید با رنج پایین IC_{50} نیز سمیت نشان داده است. ملفالان، پارتنولید و مخلوط پارتنولید با ملفالان به عنوان کنترل مثبت هستند. بر طبق مشاهدات با افزایش غلظت، هیبرید و کنترل‌ها اثربخشی بیشتری دارند بدین صورت که در غلظت ۲۰ میکرومولار، پارتالان، ۹۰ تا ۱۰۰٪ سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند.

در ادامه تحقیق می توان سمیت سلولی هیبرید سنتز شده را روی سایر رده های سلولی بررسی کرد. همچنین میتوان مکانیسم‌های دخیل شده‌ی آپوپتوز توسط پارتالان را مورد بررسی قرار داد.

قدردانی

مطالعه حاظر توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران و دانشکده دارو سازی مشهد حمایت شده است و بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را اعلام می دارند.

منابع

1-Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. The breast journal. 2007;13(4):383-91.
2-Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian pacific journal of cancer prevention. 2004;5(1):24-7.
3-Bishayee A, Sethi G, editors. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. Seminars in cancer biology; 2016: Elsevier.
4-Kim C, Kim B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. Nutrients. 2018;10(8):1021.
5-Gach K, Długosz A, Janecka A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2015;388(5):477-86.
6-Nasim, S.; Crooks, P. A., Antileukemic activity of aminoparthenolide analogs. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18 (14), 3870-3873.
7-Neelakantan, S.; et al., Aminoparthenolides as novel anti-leukemic agents: Discovery of the NF-κB inhibitor, DMAPT (LC-1). Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19 (15), 4346-4349.
8-Janganati, V.; et al., Heterocyclic aminoparthenolide derivatives modulate G 2-M cell cycle progression during Xenopus oocyte maturation. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014, 24 (8) 1963-1967.
9-Beekman AC, Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N, Konings AW, Wikstrom HV, et al. Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. J Nat Prod. 1997;60(3):252-7. Epub 1997/03/015.
10-Ren Y, Yu J, Douglas Kinghorn A. Development of anticancer agents from plant-derived sesquiterpene lactones. Current medicinal chemistry. 2016;23(23):2397-420.
11-Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99–06): a randomised trial. The Lancet. 2007;370(9594):1209-18.
12-Jazayeri SB, Saadat S, Ramezani R, Kaviani A. Incidence of primary breast cancer in Iran: Ten-year national cancer registry data report. Cancer epidemiology. 2015;39(4):519-27.
13-SeyyedHosseini S, Asemi A, Shabani A, CheshmehSohrabi M. An infodemiology study on breast cancer in Iran: Health information supply versus health information demand in PubMed and Google Trends. The Electronic Library. 2018;36(2):258-69.
14-Seca AM, Silva AM, Pinto DC. Parthenolide and parthenolide-like sesquiterpene lactones as multiple targets drugs: current knowledge and new developments. Studies in natural products chemistry. 52: Elsevier; 2017. p. 337-72.
15-Lin M, Bi H, Yan Y, Huang W, Zhang G, Zhang G, et al. Parthenolide suppresses non-small cell lung cancer GLC-82 cells growth via B-Raf/MAPK/Erk pathway. Oncotarget. 2017;8(14):23436.
16-Ivanescu B, Miron A, Corciova A. Sesquiterpene lactones from Artemisia genus: biological activities and methods of analysis. Journal of analytical methods in chemistry. 2015;2015.
17-Majdi M, Ashengroph M, Abdollahi MR. Sesquiterpene lactone engineering in microbial and plant platforms: parthenolide and artemisinin as case studies. Applied microbiology and biotechnology. 2016;100(3):1041-59.

www.SID.ir

Archive of SID

18-Perassolo M, Cardillo AB, Busto VD, Giulietti AM, Talou JR. Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Plants and Metabolic Engineering for Their Biotechnological Production. Sesquiterpene Lactones: Springer; 2018. p. 47-91.

19-Semakov A, Anikina L, Afanasyeva S, Pukhov S, Klochkov S. Synthesis and Antiproliferative Activity of Conjugates of Anthracycline Antibiotics with Sesquiterpene Lactones of the Elecampane. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018;44(5):538-46.

www.SID.ir

Archive of SID

Synthesis of Parthenolide-Melphalan Hybrid and Investigation of its Cytotoxicity Activity against Breast Cancer

Ensiyeh Karimi[1], Mehrdad Iranshahi [2*], Ali Almasi Rad[3], Ehsan Karimi[4]

1-Student of Pharmaceutical Chemistry.
2-Professor of Biotechnology Research Center.
3-Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry.
4-Assistant Professor of Biology.

1,3-Department of Medicinal Chemistry, Pharmacy Faculty, Pharmaceutical Sciences Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-Department of Biotechnology Research Center and School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4-Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Mashhad, Iran.

**Corresponding author:*
Mehrdad Iranshahi; Department of Biotechnology Research Center and School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Tel:+989155096126
Email: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Melphalan is a chemotherapy agent which used for treatment of metastatic melanoma and breast cancer. However, the side effects associated with this compound have limited its clinical use. Parthenolide, a sesquiterpene lactone, is a bioactive compound from *Tanacetum parthenium* medicinal plant has anti-leukemia properties. Despite the many advantages of sesquiterpene terpene lactones, these compounds have two obvious drawbacks: non-specificity for cancer cells and low solubility in water. Therefore, the aim of this study was to synthesis of a parthenolide-melphalan hybrid using conjugation method to enhance its anticancer potency. Moreover, the cytotoxicity activity of this compound was tested against breast cancer cell line (MDA-MB-231).

Materials and Methods: In order to synthesis of mentioned compound, melphalan was conjugated to parthenolide sesquiterpene lactone by aza-Michael reaction. Then, the cytotoxicity activity of this compound was tested using alamar blue assay.

Results: The parthalan product synthesis of melphalan anticancer drug and parthenolide sesquiterpene were analysed and identified by LC-MS. The cytotoxicity activity results indicated that cell viability of cancer cell (MDA-MB-231) was decreased in a dose- dependent manner and the IC_{50} of parthalan, parthenolide and the synthesized hybrid were reported with respective values of 13.5, 24 and 23 µg/ml.

Conclusion: The overall results of this research demonstrated that parthenolide-melphalan hybrid induce significantly enhanced the higher potency of parthenolide.

Keywords: Breast cancer, Melphalan, Sesquiterpene terpene lactones, Parthenolide, Cytotoxicity activity.

►*Please cite this paper as:*
Karimi E, Iranshahi M, Almasi Rad A, Karimi E. Synthesis of Parthenolide-Melphalan Hybrid and Investigation of its Cytotoxicity Activity against Breast Cancer . Jundishapur Sci Med J 2020; 19(1):11-25

Received: Aug 21, 2019 **Revised: Mar 10, 2019** **Accepted: Apr 23, 2020**

www.SID.ir