

طراحی، سنتز و بررسی بیولوژیکی مشتق جدید سولفونامید به عنوان ترکیب مهار کننده تکثیر رده سلولی سرطان سینه انسانی (MCF-7)

محدثه برآورده^۱، حسین غفوری^{۲*}، اسداله محمدی^۳ و سودا زارعی^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۲- دانشیار، دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۳- دانشیار، دکتری تخصصی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: H.ghafoori@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵

چکیده:

هدف: طی تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌ها در بدن، زیرمجموعه‌ای از نوپلاسم‌ها یا تومورها به وجود می‌آیند، در نهایت تکثیر غیرطبیعی این سلول‌ها موجب تشکیل توده و سرانجام سرطان می‌شود که می‌تواند در سرتاسر بدن گسترش پیدا کند. بنابراین مهار تکثیر غیرطبیعی سلول‌های سرطانی، تأثیر به‌سزایی در جلوگیری از گسترش تومورهای سرطانی و بهبود بیماری خواهد داشت. از این رو در مطالعه حاضر، مشتق جدید سولفونامید طراحی و سنتز گردیده (HB20) و آثار ضدسرطانی آن بر روی رده سلولی سرطان سینه انسان (MCF-7) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)، برای سنتز مشتق سولفونامیدی (HB20)، ابتدا نمک دیازونیوم با استفاده از ترکیب پایه سولفامتوکسازول ساخته و سپس با یک ماده کوپل‌شونده پیریمیدینی ترکیب شد. غلظت‌های مختلفی از ترکیب جدید سنتزی (HB20) علیه سلول‌های MCF-7 استفاده شد. همچنین جهت سنجش بقا و تکثیر سلولی تست MTT انجام گرفت.

نتایج: ساختار شیمیایی ترکیب سنتز شده، به‌وسیله طیف‌های IR-FT و NMR تأیید شد. همچنین زنده‌مانی در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ترکیب سنتزی (HB20) نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) کاهش چشمگیری داشت. HB20 تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 را با مقدار IC_{50} ۷۵/۲۳ میکروگرم/ میلی‌لیتر مهار می‌کند.

نتیجه‌گیری: مشتق جدید سولفونامید (HB20) پتانسیل مهار تکثیر و خاصیت ضدسرطانی در رده سلولی MCF-7 را دارد.

کلیدواژگان: مشتقات سولفونامید، سرطان سینه، رده سلولی MCF-7، MTT

۱- مقدمه

واژه سرطان به خانواده بزرگی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که در نتیجه رشد غیرطبیعی سلول‌ها به وجود آمده به سایر نقاط بدن مهاجرت کرده و متاستاز داده و تومور بدخیم تشکیل می‌شود. در سلول‌هایی که سرطانی شده‌اند تغییرات بیان پروتئینی را شاهد هستیم، برای مثال گاهی بیان پروتئینی دچار افزایش، کاهش و یا توقف بیان می‌شود. بسته به این که توده تشکیل شده در کدام بخش از بدن باشد، علائم ظاهر شده نیز متفاوت خواهد بود (۱). عوامل مختلفی در ابتلا به سرطان ازجمله عوامل ژنتیکی، مواد شیمیایی، پرتوها و غیره نقش دارند. شش ویژگی در تمام سلول‌های سرطانی مشترک بوده است و قادر به تشکیل یک تومور سرطانی هستند (۲)، این ویژگی‌ها عبارتند از: - عدم وجود سیگنال‌های مناسب طی رشد و تقسیم سلولی؛ ۲- رشد و تقسیم مداوم سلولی حتی درحضور سیگنال‌های ممانعت‌کننده؛ ۳- عدم وجود مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی؛ ۴- تقسیم سلولی به تعداد نامحدود؛ ۵- تشکیل عروق خونی در اطراف توده‌ی سلولی و ۶- حمله به بافت و ایجاد متاستاز (۳).

در بین سرطان‌ها، سرطان پستان یا سینه دومین سرطان کشنده برای زنان در سراسر جهان است که از بافت پستان آغاز می‌شود. اگرچه مردان نیز به این سرطان مبتلا می‌شوند اما احتمال آن در زنان به مراتب بیشتر است (۴). این نوع سرطان، بعد از سرطان پوست شایع‌ترین و مهم‌ترین سرطان تشخیص داده شده عصر حاضر به‌خصوص در زنان است که ۲۵٪ از تمام موارد سرطان را به خود اختصاص می‌دهد (۵). سرطان پستان ناشی از تکثیر و رشد نامنظم سلول‌های بافت پستان، از قبیل سلول‌های پوششی مجاری^۱ شیری یا لوبول‌های

تولیدکننده^۲ شیر می‌باشد و شمار اندکی به بافت‌های دیگر مربوط می‌شوند. از علائم آن می‌توان به: ایجاد توده در پستان، تغییر شکل بافت پستان، ایجاد تورفتگی در پستان، خروج مایع از پستان، ایجاد زخم یا قرمزی در پستان اشاره کرد. در ۵ تا ۱۰ درصد موارد علت این بیماری وراثتی است که ژن‌های BRCA1 و BRCA2 درگیر هستند. گاهی می‌توانند در خارج از پستان از طریق رگ‌های خونی و عروق لنفاوی گسترش یافته و متاستاز دهند (۶، ۷). نتایج سرطان پستان بسته به نوع آن، میزان بیماری و سن فرد متغیر است. نرخ بقا در کشورهای توسعه‌یافته نسبت به کشورهای در حال توسعه بالاتر است، به گونه‌ای که ۸۰٪ و ۹۰٪ از افراد در انگلستان و آمریکا حداقل پنج سال زنده هستند (۷). رده سلولی MCF-7^۳ در سال ۱۹۷۰ از بیمار مبتلا به سرطان پستان متاستاتیک به‌دست آمد که به‌عنوان مدلی آزمایشگاهی برای مطالعه سرطان پستان گیرنده استروژن مثبت (ER+) در نظر گرفته می‌شود (۸).

امروزه روش‌های زیادی از جمله جراحی و شیمی درمانی و غیره برای مقابله و درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد، از آن جایی که مقاومت دارویی^۴ و آسیب سلول‌های طبیعی از مشکلات اساسی شیمی درمانی می‌باشد، به نظر می‌رسد با هدف قرار دادن ترکیباتی که موجب فعال شدن آنزیم‌های دخیل در فرایند آپوپتوز می‌شود، بتوان درمان بدون عوارض جانبی را باعث شد (۲). در علم دارویی فعلی، سولفونامیدها^۵ یک طبقه مهم از داروهای درمانی در سرطان می‌باشد. دارای یک موتیف شیمیایی مشترک از آروماتیک /هتروسیکلیک هستند (۹). مکانیسم‌های مختلفی برای عملکرد ضدتوموری آنها مانند اختلال در

2. Lobular cancer

3. Michigan Cancer Foundation-7

4. Drug resistance

5. Sulfonamide

1. Ductal cancer

پنی سیلین -استرپتومایسین (Pen/Strep) از شرکت سیگما آلد ریچ و رده سلولی سرطان سینه انسان (MCF-7) از انستیتو پاستور ایران بخش بانک سلولی خریداری شد. همچنین مواد شیمیایی مورد استفاده جهت سنتز مشتق (SMX) از شرکت داروسازی سبحان دارو رشت تهیه شد.

روش:

سنتز:

جهت سنتز ترکیب مورد نظر که از مشتقات سولفامتوکسازول می باشد، ابتدا نمک دیازیدول با استفاده از ترکیب پایه آمین دار سولفامتوکسازول سنتز شد و سپس با یک ماده کوپل شونده ترکیب شد DMF به عنوان حلال این واکنش می باشد.

سنتز HB20:

ابتدا جهت سنتز ترکیب مورد نظر، ترکیب سولفامتوکسازول در حضور سدیم نیتريت در شرایط اسیدی د^{۲۰} ازنه شد، سپس نمک دیازونیوم حاصل با ترکیب کوپل شونده پیریمیدینی^۷ در حلال DMF وارد واکنش شد. ماده مورد نظر پس از تنظیم pH محلول، صاف کردن و تبلورسازی، با بازدهی ۹۶٪ و نقطه ذوب ۲۵۷ درجه سلسیوس به دست آمد. ساختار شیمیایی ترکیب سنتز شده به وسیله طیف های FT-IR و NMR تأیید شد (۱۳، ۱۴).

کشت سلولی:

رده سلولی MCF-7 مربوط به سرطان سینه و از نوع چسبنده، در محیط حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده و در

مونتاز میکروتوبول، توقف چرخه سلولی در فاز G₁، مهار آنژیوژنز و مهار آنهیدراز کربنیک وجود دارد (۱۰). ترکیبات دارای قطعه سولفونامید به طور کلی از کلرید R- سولفونیل^۱ با آمین های اول یا دوم به وجود می آیند. به تازگی، مطالعات در زمینه سولفونامیدها به دلیل کاربردهای احتمالی آن، به طور مثال در شیمی دارویی، شیمی کاتالیزوری، کمی لومینسانس و شیمی تحلیلی افزایش یافته است. همچنین ترکیبات سولفونامید دارای فعالیت های دارویی ذاتی مانند فعالیت های ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد تکثیر، ضد آنژیوژنز و مهارکننده آنزیم هستند (۹، ۱۱).

در همین راستا در تحقیق حاضر اثر مهارى و ضد- تکثیرى ترکیب سنتزی جدید برپایه سولفامتوکسازول^۲ (SMX)، بر روی رده سلولی سرطان سینه انسان (MCF-7) مورد مطالعه قرار گرفت. سولفامتوکسازول به عنوان یک آنتی بیوتیک در دسته سولفونامیدها قرار داشته و برای درمان عفونت های باکتریایی (مهارگر باکتری در برابر هر دو گروه باکتری گرم منفی و مثبت) مانند عفونت های دستگاه ادراری، برونشیت و پروستاتیت مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱). همچنین از سنتز اسیدفولیک در باکتری هایی که قادر به ساخت آن هستند، جلوگیری می کند (۱۲). در این پژوهش سمیت سلولی ترکیب سنتزی HB20 در شرایط *in vitro* با تست MTT^۳ بر روی رده سلولی (MCF-7) بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

مواد شیمیایی:

محیط کشت های DMEM^۴، RPMI 1640^۵ بدون phenol red، سرم جنین گاوی (FBS^۶) و آنتی بیوتیک

1. sulphonyl
2. Sulfamethoxazole
3. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
4. Dulbecco's Modified Eagle Medium
5. Roswell Park Memorial Institute
6. Fetal bovine serum
7. 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidine

بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمون رنگ سنجی

MTT و تعیین IC_{50} ^۱:

این آزمون نوعی رنگ‌سنجی محسوب می‌شود که بر پایه شکستن نمک تترازولیوم MTT زرد رنگ و تبدیل آن به بلورهای فورمازان بنفش رنگ می‌باشد. این احیای سلولی با دخالت کوفاکتور NADH و NADPH و دهیدروژنازهای میتوکندریایی سلول‌های زنده صورت می‌گیرد. کریستال‌های فورمازانی تشکیل شده محلول در $DMSO^2$ هستند و میزان جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند به‌طور کمی مورد بررسی قرار گیرد. این روش امکان بررسی تعداد زیاد نمونه را در کمترین زمان و هزینه فراهم می‌کند. از این روش می‌توان برای تعیین زنده بودن سلول‌ها تحت تأثیر یک ماده استفاده کرد (۱۷).

روش انجام آزمون MTT:

پس از تیمار ۲۴ ساعت سلول‌ها با ترکیب سنتزی، محیط کشت قبلی خارج و با محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد محلول MTT جایگزین شد و به مدت ۴-۲/۴۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از اتمام این زمان، محیط کشت رویی سلول‌ها به آرامی خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر $DMSO$ جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد و پلیت‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه شیکر با دور پایین قرار داده تا رسوب‌های فورمازان کاملاً حل شوند. پس از انحلال فورمازان، جذب نوری (OD^3) هر چاهک توسط دستگاه الایزا ریدر^۴ (Biotek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که هر غلظت در سه چاهک تکرار شد. درصد بقا توسط فرمول زیر به دست آمد:

انکوباتور با ۵ درصد CO_2 ، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰ درصد نگه داری شدند. جهت پاساژ سلولی بعد از پر شدن ۸۰ تا ۹۰ درصد از کف فلاسک، سلول‌ها به کمک محلول تریپسین-EDTA از کف فلاسک برداشته شده و به میکروتیوب منتقل شد. بعد از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته و به رسوب محیط کشت DMEM حاوی FBS اضافه گشت و در فلاسک T25 کشت داده شد. سلول‌ها تا رسیدن به فاز رشدی مناسب پاساژ داده شدند (۱۵).

آماده سازی و تیمار سلول‌ها با ترکیب سنتزی HB20

:

به منظور بررسی اثر ترکیب سنتزی HB20 بر روی رده سلولی MCF-7، ابتدا سلول‌ها در فلاسک مناسب کشت داده شدند تا زمانی که به تراکم حدود ۹۰٪ رسیدند. سپس این سلول‌ها توسط تریپسین-EDTA از سطح فلاسک جدا و با رنگ تریپان بلو با استفاده از لام هموسیتر مورد شمارش قرار گرفتند (۱۶). تعداد حدود 1×10^5 سلول در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک Pen/Strep) در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. این زمان، فرصت اتصال سلول‌ها به پلیت و تکثیر آنها را فراهم می‌کند. روز بعد محیط داخل هر چاهک تخلیه شده و سلول‌ها با غلظت-های (۰، ۳/۰۴، ۶/۰۹، ۱۲/۱۹، ۲۴/۳۹، ۴۸/۷۹، ۹۷/۵۹ و ۱۹۵/۱۹ میکروگرم/میلی‌لیتر) از ترکیب HB20 در محیط کشت جدید حاوی ۱٪ FBS تیمار شدند. یک گروه بدون ترکیب سنتزی مورد نظر نیز به عنوان گروه کنترل (شاهد) جهت مقایسه در نظر گرفته شد. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد پس از آن میزان زنده ماندن سلول‌ها به روش سنجش MTT ارزیابی شد.

1. half maximal inhibitory concentration
2. Dimethyl sulfoxide
3. Optical Density
4. Elisa Plate Readers

$$\text{میانگین جذب گروه تیمار شده} \\ \text{درصد بقا} = \frac{\text{میانگین جذب گروه کنترل}}{\text{میانگین جذب گروه تیمار شده}} \times 100$$

IC₅₀ بیانگر غلظتی از ترکیب است که باعث مهار رشد ۵۰ درصد سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل می‌شود، پس از رسم منحنی، با به کارگیری غلظت‌های مختلف تیمار و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد (۱۷).

$$\text{میانگین جذب گروه تیمار شده} \\ \text{میانگین جذب گروه کنترل} = 1 - \frac{\text{میانگین جذب گروه تیمار شده}}{\text{میانگین جذب گروه کنترل}} \times 100 = \text{درصد مهارکنندگی تکثیر سلولی}$$

آنالیز آماری:

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS^۱ و GraphPad Prism 8 استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$)^۲ ارائه و اختلاف معنی‌دار بودن بین گروه‌ها توسط آزمون آنالیز طرح آزمایش تک متغیره (ANOVA)^۳ و آزمون t-test مورد بررسی قرار گرفت، اختلافات در سطح ($p < 0.0001$) معنی‌دار تلقی شدند.

۳- نتایج

تأیید سنتز ترکیب HB20:

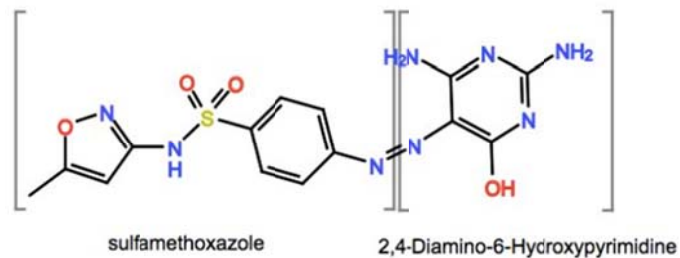
جهت بررسی و تأیید ساختار ترکیب سنتز شده (شکل ۱) از روش‌های FT-IR و NMR استفاده شد. طیف-FT IR (شکل ۲) و NMR (شکل ۳) حاصل از ترکیب HB20 نشان از تأیید سنتز صحیح ترکیب دارد. همچنین وزن مولکولی آن ۳۹۰/۳۸ گرم/مول می‌باشد.

ترکیب سنتزی HB20 به صورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان سینه می‌شود

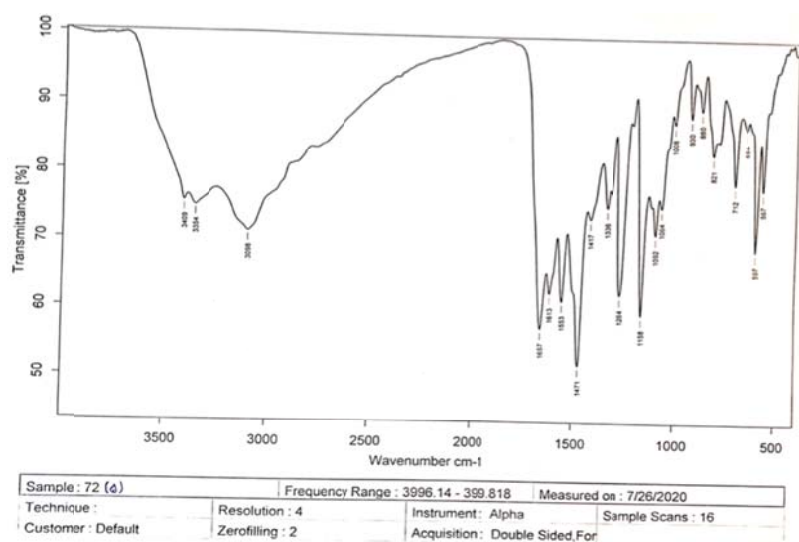
اثر سمیت سلولی ترکیب سنتزی HB20 بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)، با استفاده از تست MTT

انجام گرفت. همان‌طور که در (شکل ۴) نشان داده شده است، تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف ترکیب سنتزی HB20 به مدت ۲۴ ساعت، باعث مهار معنی‌دار رشد سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0.0001$). به این ترتیب با افزایش غلظت ترکیب سنتزی HB20، درصد بقا به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. همچنین مقدار IC₅₀ ترکیب HB20 معادل ۷۵/۲۳ میکروگرم/میلی‌لیتر طبق نمودار درصد مهارکنندگی (شکل ۵) محاسبه شد ($p < 0.005$). نتایج نشان داد که مشتق سولفونامید سنتز شده، تکثیر سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز مهار می‌نماید. مورفولوژی سلول‌های MCF-7 در محیط کشت، ظاهری چندوجهی (دوکی) و یا به طور تقریبی کروی داشته است، به شکل کلونی‌هایی که از تراکم سلولی و سرعت تکثیر بالایی برخوردار بوده و رشد می‌کنند. در شرایط کشت آزمایشگاهی برای گروه کنترل (بدون تیمار) (شکل ۶. الف) و گروه تیماری با ترکیب سنتزی HB20 برای دوزهای ۱۵/۶۱ (شکل ۶. ب) و ۲۳/۴۲ (شکل ۶. ج) میکروگرم/میلی‌لیتر بررسی شد.

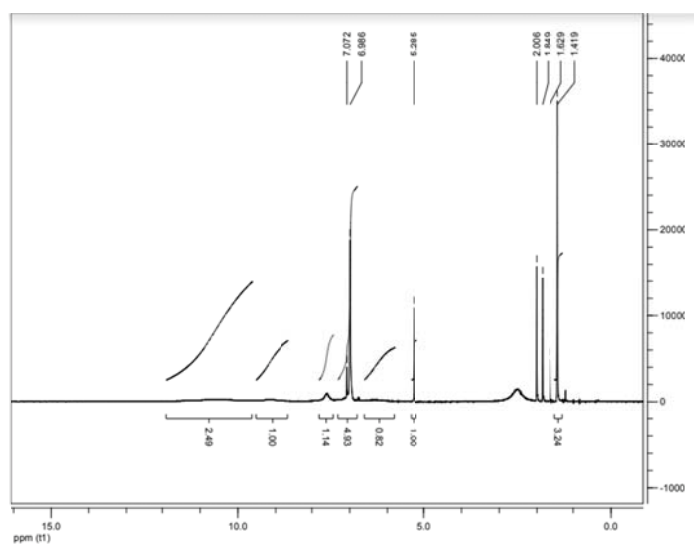
1. Statistical Package for the Social Sciences
2. standard error of the mean
3. variate analysis of variance



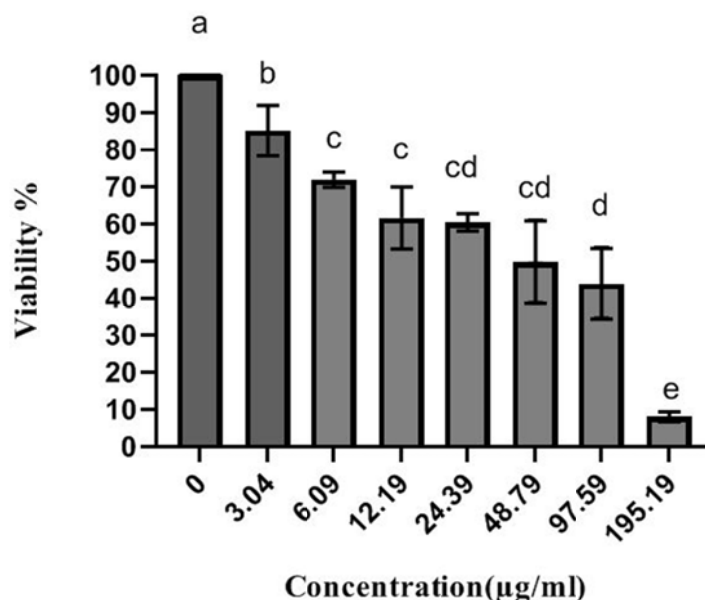
شکل ۱ - ساختار ترکیب سنتزی HB20.



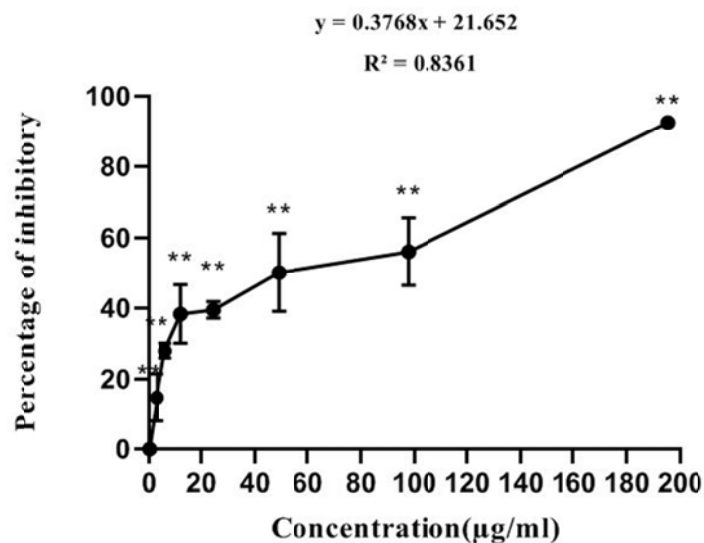
شکل ۲- طیف FT-IR حاصل از ترکیب HB20.



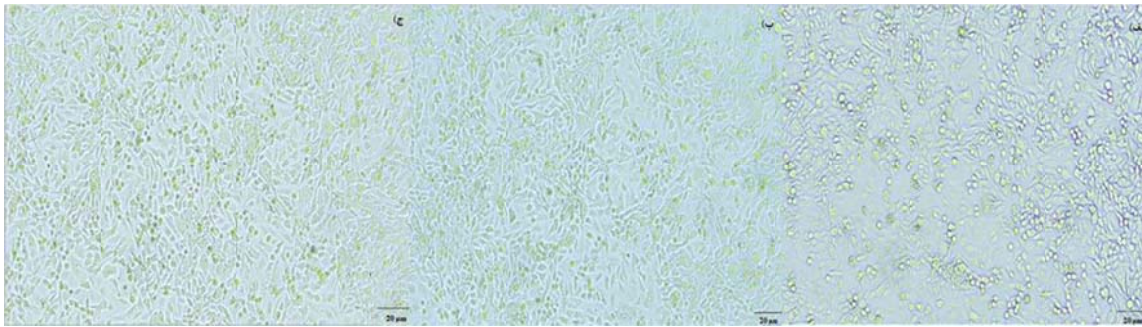
شکل ۳- طیف NMR حاصل از ترکیب سنتزی HB20.



شکل ۴- فعالیت ضد تکثیری ترکیب سنتزی HB20 علیه سلول‌های MCF-7. تیمار 24 ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب HB20، در مقابل درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از سنجش MTT. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون آنالیز طرح آزمایش تک متغیره (ANOVA) در سطح کمتر از ($p^{****} < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دارند.



شکل ۵- مهارکنندگی ترکیب سنتزی HB20 علیه سلول‌های MCF-7. تیمار 24 ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترکیب HB20، در مقابل درصد مهارکنندگی سلول‌ها با ترکیب HB20 با استفاده از سنجش MTT. مقدار IC_{50} ترکیب HB20 معادل ۷۵/۲۳ میکروگرم/میلی لیتر محاسبه شد. طبق آزمون t-test ($p^{***} < 0.005$)، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.



شکل ۶- الف- سلول‌های MCF-7 گروه کنترل (بدون تیمار). به شکل کلونی‌هایی متشکل از سلول‌های چندوجهی و یا کروی شکل می‌باشند و به کف فلاسک کشت چسبیده اند؛ ب) سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ترکیب سنتزی HB20 (دوز ۱۵/۶۱ میکروگرم/میلی‌لیتر). به شکل کلونی‌های دوکی بودند که پس از ۲۴ ساعت دچار استرس و کدر گردیدند؛ ج) سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ترکیب سنتزی HB20 (دوز ۲۳/۴۲ میکروگرم/میلی‌لیتر). پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها با افزایش دوز حالت دوکی و چندوجهی خود را از دست داده و همچنین کدورت بیشتر مشاهده گردید. بررسی سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی با میکروسکوپ اینورت (بزرگ‌نمایی ۲۰×).

۴- بحث

قطبی و غیرقطبی‌کننده گروه‌های کلرو متیل به‌طور قابل توجهی بر توانایی اتصال DNA ترکیبات تأثیر می‌گذارد. این ترکیبات در مقایسه با داروی ضدسرطانی معروف دوکسوروبیسین^۱ نسبت به گلبول‌های قرمز خرگوش نوع وحشی کمتر سمی بودند. همه ترکیبات سنتزی بر روی رده سلولی (MCF-7) نتیجه‌بخش بوده و موجب افزایش درصد بقا شدند (۱۹). ترکیبات سولفونامید دارای فعالیت-های دارویی ذاتی مانند فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد تکثیر، ضد رگ‌زایی و مهارکننده آنزیم از جمله مهار ایزوآنزیم‌های آنهیدراز کربنیک در شرایط آزمایشگاهی و یا داخل بدن می‌باشد (۹، ۱۰، ۲۰).^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای در زمینه خواص ضد میتوزی و ضدسرطانی بر روی چند ترکیب سولفونامیدی (۵ سولفونامید ایندول) انجام دادند. نتایج به این صورت بود که سولفونامیدهای ایندول، موجب پلیمریزاسیون پروتئین میکروتوبول در میکروتوبول‌های آزمایشگاهی می‌شوند. همچنین آنالوگ‌ها باعث مهار تکثیر رده سلولی HeLa^۳ با مقدار IC₅₀ در

سولفونامیدها یک طبقه مهم از داروهای درمانی در علم دارویی فعلی می‌باشند. ترکیبات حاوی سولفونامید به دلیل کاربردهایش در زمینه شیمی دارویی، شیمی کاتالیزوری، لوومینسانس شیمیایی و شیمی تحلیلی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۹). در تحقیقی، مشتقات سولفونامیدی (هیدروکسامیک اسیدهای سولفونامید و آنیلید) سنتز و به‌عنوان مهارکننده‌های هیستون دی استیلاز (HDAC) در نظر گرفته شد که در سلول‌های سرطانی انسان توانایی القای هاپر استیلاسیون هیستون‌ها را دارا بود. مهار فعالیت HDAC بیانگر رویکردی جدید برای مداخله در تنظیم چرخه سلولی است. نتایج حاکی از آن شد که ترکیبات سنتزی به‌طور انتخابی در سلول‌های سرطانی انسان تکثیر را مهار کرده و موجب توقف چرخه سلولی و شروع آپوپتوز می‌شوند (۱۸). در طی پژوهشی در پاسخ به افزایش تقاضا برای داروهای ضدسرطان مؤثر، یک‌سری سولفونامیدهای دی‌سدیم از گلوتامیک اسید L-استر و به‌طور جداگانه به ترتیب با یون‌های مس (II)، نیکل (II) و روتنیم (III) کمپلکس شدند. شواهد حاصل از نتایج در مطالعات اتصال به DNA نشان داد که اثرهای

1. Doxorubicin
2. Renu Mohan
3. Henrietta Lacks

محدوده ۶-۱۷ میکرومولار گشتند. این ترکیبات پیشرفت چرخه سلولی در میتوز را مسدود کرده و در پایین ترین غلظت های ضد میتوزی مؤثر، میکروتوبول های دوکی شکل را دپلمریزه کرده و باعث از هم گسیختگی کروموزوم ها شدند اما در میکروتوبول های سلول های اینترفاز تأثیری نداشتند. با این حال، در غلظت های به نسبت زیاد، میکروتوبول های اینترفاز نیز توسط این سولفونامیدها دپلمریزه می گردند. همچنین، هر ۵ ترکیب (سولفونامید های ایندولی) با ایجاد اختلال در پویایی مونتاژ میکروتوبول های دوکی شکل باعث مهار تکثیر سلولی در میتوز می گردند و می توانند از طریق مسیر وابسته به Bcl-^۱ موجب القای آپوپتوز و در نهایت منجر به مرگ سلول- های سرطانی شوند (۲۰). مصطفی م قورب^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۹ به طراحی، سنتز و ارزیابی ضد سرطانی مشتقات جدید ترا هیدرو کینولین^۳ دارای سولفونامید پرداختند. ترکیبات سنتزی به عنوان مهارکننده های انهدراز کرینیک، برای فعالیت ضد سرطانی علیه رده سلولی سینه (MCF-7) مورد بررسی قرار گرفت. بسیاری از ترکیبات غربال شده، فعالیت سیتوتوکسیک جالبی را در مقایسه با یک داروی مرجع از خود نشان داد (۲۱). همچنین در سال ۲۰۱۵ پژوهش دیگری در زمینه خواص ضد سرطانی مشتقات جدید سولفونامیدها انجام دادند. در این مطالعه، سری جدیدی از مشتقات سولفونامید با شروع از ۲-سیانو استیل- هیدرازون- اتیل- فیل- بنزن سولفون آمید (4a) و (۲-سیانواستیل هیدرازون اتیل فیل-4-متیل بنزن سولفون آمید 4b) سنتز شد که دارای نواحی مختلف فعال بیولوژیکی تحت عنوان پیرازول، تیوفن، پیریدین و پیریمیدین بود و به منظور بررسی فعالیت ضد سرطانی علیه رده سلولی هپاتوکارسینومای انسانی (HepG₂)^۴ در شرایط آزمایشگاهی، آزمایش شد. ترکیبات قوی در این

مطالعه ترکیبات 4a, 4b, 5a, 6a, 6b, 8, 9, 11, 13, 18 و 19 بودند که فعالیت ضد سرطانی بیشتری نسبت به دوکسوروبیسین با IC₅₀ از ۱۱ تا ۳۱/۸ میکرومولار از خود نشان دادند (۲۲). در پژوهشی احمد کوما اوغلو^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثرات پروآپوپتوزی مشتقات جدید سولفونامید را از طریق فعال سازی فسفوریلاسیون P38/ERK^۶ در سلول های سرطانی نشان دادند. آن ها، ترکیبات حاوی قطعه سولفونامید بر پایه ترکیباتی مانند [N-(2-amino-5-benzoylphenyl)-4-nitrobenzene [N-(quinolin- 8-sulfonamide hydrochloride] methyl)-4-nitro-benzenesulfonamide [N-(pyridine-2-methyl)-4-nitro- hydrochloride] benzenesulfonamide hydrochloride] سنتز کرده، فعالیت ضد سرطانی و مکانیسم های مولکولی درگیر را در شرایط *in vitro* علیه سلول های سرطانی رده های مختلف از جمله: کبد انسانی (HepG2)، پستان (MCF-7) و روده بزرگ (Colo-205)^۷ بررسی کردند و از روش های MTT، بیان mRNA ژن ها با qPCR^۸ و فسفوریلاسیون p38/ERK1/2 از وسترن بلات استفاده نمودند. نتایج آزمایش حاکی از این بود که ترکیبات سنتز شده می توانند به طور قابل توجهی تکثیر سلولی را کاهش داده و بیان mRNA ژن های پروآپوپتوزی (کاسپاز ۳، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹) را القاء کنند و برای درمان انواع سرطان های بدخیم کاربرد داشته باشند (۲۳). در مطالعه ای دیگر، فعالیت ضد سرطانی پنج ترکیب هیبرید سنتزی جدید حاوی کالکون^۹ مشتق شده از سولفونامید بر روی رده سلولی MCF-7 در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) بررسی شد. ترکیب سنتزی، (E)-2-methoxy-N-(4-methoxyphenyl)-5-(3-(4-nitrophenyl) acryloyl) benzene sulfonamide] قوی ترین فعالیت ضد سرطانی را در برابر رده سلولی MCF-7 از خود نشان داد (۲۴). در

5. Ahmet Cumaoglu
6. extracellular signal-regulated kinase
7. Human Colon Carcinoma
8. quantitative polymerase chain reaction
9. Chalcone

1. B-Cell Leukemia/Lymphoma 2
2.. Mostafa M Ghorab
3. tetrahydroquinoline
4. Hepatocellular carcinoma grade 2

تحقیقی، ترکیبی از سولفامتوکسازول و سلنیوم را به عنوان روشی جدید درمان ضد سرطان مورد بررسی قرار دادند. در مطالعات پیشین سولفونامیدها را دارای فعالیت ضد-توموری و همچنین مهارکننده‌های آنزیم از جمله آنهیدراز کربنیک گزارش کرده بودند. علاوه بر این، سلنیوم به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی، سم‌زدایی ماده‌ی سرطان‌زا، مهار مهاجم سلول و همچنین مهار آنژیوژنز، در مراحل مختلف سرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه با هدف ارزیابی و هم‌افزایی فعالیت سیتوتوکسیک سولفونامید و سلنیوم (SM + SE) به عنوان یک درمان مؤثر با استفاده از دی اتیل نیترو سامین (DENA) با یک تزریق داخل صفاقی به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافر فسفات برای درمان بیماری هپاتوکارسینوژنز^۱ انجام شد. ۳۰ موش صحرایی نر مورد استفاده در این مطالعه به‌طور تصادفی به پنج گروه مساوی تقسیم شدند. حیوانات تیمار شده با DENA تغییرات معنی‌داری را ($p < 0.001$) در آنزیم‌های اختصاصی کبد از جمله گلوتامات اگزالواسات ترانس آمیناز (SGOT)، گلوتامات پیرووات ترانس آمیناز (SGPT)، فسفاتاز کلیایی (ALP)، و آلفا فتوپروتئین (AFP) نشان دادند. درمان با (SM 30 mg / kg + SE 3 mg/ kg) (SE+SE) به‌طور قابل توجهی سطح SGPT، SGOT، ALP و AFP را کاهش می‌دهد ($P < 0.001$). این شواهد می‌تواند تأییدی بر خواص ضدسرطانی سولفونامیدها باشد (۲۵).

در مطالعه حاضر، مولکول‌های ساده و کوچک بر پایه ترکیب سولفامتوکسازول که حاوی قطعه سولفونامید می‌باشد، تحت عنوان ترکیب HB20 طراحی و سنتز شد. فعالیت سیتوتوکسیک و مهارکنندگی ترکیب سنتزی HB20 روی رده سلولی سرطان سینه انسان (MCF-7) به‌وسیله تست MTT اندازه‌گیری و ارزیابی شد. نتایج به‌دست آمده از تست MTT نشان داد که ترکیب HB20 با IC_{50} معادل

۷۵/۲۳ میکروگرم/ میلی‌لیتر باعث مهار تکثیر در سلول‌های MCF-7 در مقایسه با گروه کنترل شده و فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی را از خود نمایان می‌کند.

۵- نتیجه‌گیری

برای نتیجه‌گیری نهایی، نتایج پژوهش حاضر تأییدکننده و در راستای سایر مطالعات می‌باشد، مشتقات سولفامتوکسازول دارای اثرهای ضدسرطانی و مهارکننده تکثیر سلولی هستند. نتایج به‌دست آمده از مطالعه کنونی، پتانسیل ترکیب سنتزی HB20 را در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی سینه انسان (MCF-7) نشان می‌دهد.

۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه گیلان در انجام این پژوهش نهایت تشکر را دارند.

منابع

- Roy P, Saikia B. Cancer and cure: A critical analysis. Indian journal of cancer. 2016;53(3):441.
- Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. Journal of cancer science & therapy. 2009;1(2):1.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. CA: a cancer journal for clinicians. 2005;55(3):178-94.
- Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. Oncogene. 1999;18(20):3166-72.
- Williams F, Jeanetta SC. Lived experiences of breast cancer survivors after diagnosis, treatment and beyond: qualitative study. Health expectations. 2016;19(3):631-42.
- Oliveira N, Gomig T, Milioli H, Cordeiro F, Costa G, Urban C, et al. Comparative proteomic analysis of ductal and lobular invasive breast carcinoma. Genet Mol Res. 2016;15(2):1-10.
- Al-Badrashiny M, Bellaachia A. Breast cancer survivability prediction via classifier ensemble.

1. Hepatocellular carcinoma

- MCF-7 Cells by a Semi-Synthetic Derivative of Artemisinin: A Caspase-Related Mechanism. *Iranian journal of biotechnology*. 2017;15(3):157.
18. Bouchain G, Leit S, Frechette S, Khalil EA, Lavoie R, Moradei O, et al. Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003;46(5):820-30.
19. Ali I, Wani WA, Saleem K, Hsieh M-F. Anticancer metallodrugs of glutamic acid sulphonamides: in silico, DNA binding, hemolysis and anticancer studies. *RSC advances*. 2014;4(56):29629-41.
20. Mohan R, Banerjee M, Ray A, Manna T, Wilson L, Owa T, et al. Antimitotic sulfonamides inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry*. 2006;45(17):5440-9.
21. Ghorab MM, Ragab FA, Hamed MM. Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety. *European journal of medicinal chemistry*. 2009;44(10):4211-7.
22. Ghorab MM, Ragab FA, Heiba HI, El-Gazzar MG, Zahran SS. Synthesis, anticancer and radiosensitizing evaluation of some novel sulfonamide derivatives. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;92:682-92.
23. Cumaoglu A, Dayan S, Agkaya AO, Ozkul Z, Ozpozan NK. Synthesis and pro-apoptotic effects of new sulfonamide derivatives via activating p38/ERK phosphorylation in cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015;30(3):413-9.
24. Bonakdar APS, Vafaei F, Farokhpour M, Esfahani MHN, Massah AR. Synthesis and anticancer activity assay of novel chalcone-sulfonamide derivatives. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2017;16(2):565.
25. Gupta R, Kazmi I, Afzal M, Khan R, Chauhan M, Al-Abbasi FA, et al. Combination of sulfamethoxazole and selenium in anticancer therapy: a novel approach. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;384(1-2):279-85.
- International Journal of Computer and Information Engineering*. 2016;10(5):833-7.
8. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental biology and medicine*. 2003;228(9):995-1003.
9. Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran C. Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. *Current cancer drug targets*. 2002;2(1):55-75.
10. Koyuncu I, Tülüce Y, Slahaddin Qadir H, Durgun M, Supuran CT. Evaluation of the anticancer potential of a sulphonamide carbonic anhydrase IX inhibitor on cervical cancer cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2019;34(1):703-11.
11. Eliopoulos GM, Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical infectious diseases*. 2001;32(11):1608-14.
12. Smilack JD, editor *Trimethoprim-sulfamethoxazole*. Mayo Clinic Proceedings; 1999: Elsevier.
13. El-Sayed NS, El-Bendary ER, El-Ashry SM, El-Kerdawy MM. Synthesis and antitumor activity of new sulfonamide derivatives of thiadiazolo [3, 2-a] pyrimidines. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(9):3714-20.
14. Rama I, Selvameena R. Synthesis, structure analysis, anti-bacterial and in vitro anti-cancer activity of new Schiff base and its copper complex derived from sulfamethoxazole. *Journal of Chemical Sciences*. 2015;127(4):671-8.
15. Zonouz AM, Eskandari I, Khavasi HR. A green and convenient approach for the synthesis of methyl 6-amino-5-cyano-4-aryl-2, 4-dihydropyrano [2, 3-c] pyrazole-3-carboxylates via a one-pot, multi-component reaction in water. *Tetrahedron Letters*. 2012;53(41):5519-22.
16. Wang C, Dong S, Zhang L, Zhao Y, Huang L, Gong X, et al. Cell surface binding, uptake and anticancer activity of L-K6, a lysine/leucine-rich peptide, on human breast cancer MCF-7 cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-13.
17. Jamalzadeh L, Ghafoori H, Aghamaali M, Sariri R. Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer

Design, synthesis and biological evaluation of a novel sulfonanilide derivative as antiproliferative agents for human breast cancer Cell line (MCF-7)

Mohaddeseh Baravordeh M.Sc.¹, Hossein Ghafouri Ph.D.^{2*}, Assadollah Mohammadi Ph.D.³ and Sevda Zarei M.Sc.⁴

1- Master student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2-Associate Professor, PhD, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3-Associate Professor, PhD, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

4- PhD student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 2020/9/22

Accepted: 2021/2/3

Abstract:

Aim: During the uncontrolled development of cells in the body, a subset of neoplasms or tumors is formed, the abnormal proliferation of these cells leads to the formation of a mass and eventually cancer. This mass can spread throughout the body. Thus, inhibiting the abnormal growth of cancer cells will have a significant effect on preventing the spread of cancerous tumors and improving the disease. Therefore, in the present study, a new sulfonamide derivative was designed and synthesized (HB20) and its anti-cancer effects on human breast cancer cell line (MCF-7) were investigated.

Materials and Methods: For the synthesis of a sulfonamide derivative (HB20), dcriptiazonium salt was first made using a sulfamethoxazole base compound and then combined with a pyrimidine coupling agent. Concentrations of a new synthetic compound (HB20) against Cells (MCF-7) were used. MTT assay was also performed to measure survival and cell proliferation.

Results: The synthesized compound structure was confirmed by spectral analysis, such as FT- IR, and NMR. Also, Survival in MCF-7 cells treated with a synthetic compound (HB20) was significantly reduced compared to the control group (untreated). HB20 inhibits the proliferation of MCF-7 cancer cells with an IC₅₀ value of 75/23 µg/ml.

Conclusion: The new sulfonamide derivative (HB20) has the potential to inhibit proliferation and anti-cancer properties in cell line (MCF-7).

Keywords: sulfonamide derivatives, Breast cancer, MCF-7 cell line, MTT