

## مطالعه فعالیت کمپلکس‌های Nic-امگا ۳ و Pic-امگا ۳ روی تیروزیناز قارچ و ویژگی

## ضد سرطانی آن‌ها روی سلول‌های A-۳۷۵ ملانوما

فرهاد سنگین آبادی<sup>۱</sup>، نعمت‌الله غیبی<sup>۲\*</sup>، عادلہ دیوسالار<sup>۳</sup>، علی اکبر صبوری<sup>۴</sup> و پریچهر یغمایی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی<sup>۲</sup> ایران، قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوتکنولوژی و بیوفیزیک<sup>۳</sup> ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی مولکولی<sup>۴</sup> ایران، تهران، دانشگاه تهران، مؤسسه بیوشیمی و بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۰

## چکیده

روش‌های درمانی کم‌خطر و کارآمد موضوع اصلی بسیاری از تحقیقات اخیر در زمینه درمان سرطان ملانوما بوده است. بر همین اساس، هدف در اینجا بررسی تأثیر کمپلکس‌های نیکوتینیک-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ بر روی تیروزیناز قارچ و ویژگی‌های ضد تکثیری آنها روی رده سلولی ملانوما A-۳۷۵ بود. در بررسی حاضر، سلول‌ها در معرض سطوح مختلف کمپلکس‌های نیکوتین-امگا ۳ و پیکولینیک-امگا ۳ قرار گرفتند. برای مشاهده تکثیر سلولی، از روش MTT و میکروسکوپ معکوس استفاده شد. تجزیه و تحلیل کنتیکی اثر این کمپلکس‌ها بر آنزیم تیروزیناز نیز مورد بررسی قرار گرفت. کمپلکس‌های نیکوتین-امگا ۳ و پیکولینیک-امگا ۳ با دنبال نمودن رفتاری وابسته به غلظت و زمان توانستند رشد سلولی را به طور قابل توجهی کاهش دهند. اثر مهارکنندگی معنی‌دار برای پیکولینیک-امگا ۳ در غلظت کمتر با افزایش زمان مشاهده شد. از سوی دیگر، نیکوتین-امگا ۳ سطح مشابهی از بازدارندگی را نشان نداد، و در ۲۴ ساعت تنها سطح ۲۰۰ میکرومولار معنی‌دار بود و در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، بازدارندگی معنی‌دار بین ۱۵۰-۲۰۰ میکرومولار مشاهده گردید. بدین معنا که رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی مورد بررسی به میزان قابل توجهی در زمان و غلظت مورد نظر کاهش یافت. شیوه عمل این دو کمپلکس بر روی تیروزیناز قارچ به صورت بازدارندگی رقابتی بود و مقادیر Ki شامل ۵/۲ و ۵/۱ میلی مولار، به ترتیب برای نیکوتین-امگا ۳ و پیکولینیک-امگا ۳ بود. به نظر می‌رسد کمپلکس‌های نیکوتین-امگا ۳ و پیکولینیک-امگا ۳ دارای پتانسیل ضد تکثیری قوی در برابر سلول‌های ملانوما هستند، که دال بر پتانسیل کاربردی آنها در درمان ملانوما می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: بازدارندگی رقابتی، تیروزیناز قارچ، پیکولینیک اسید، امگا ۳، آنالیز سینتیکی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۸-۲۲۳۰۲۶۳۴، پست الکترونیکی: [ngheibi@qums.ac.ir](mailto:ngheibi@qums.ac.ir)

## مقدمه

با ترکیبات سمی و خال‌های چندگانه مادرزادی اشاره نمود. پیشرفت ملانوما و بقای آن وابسته به سلول‌های سرطانی و قابلیت دستکاری مسیر مرگ سلولی، گریز از نظارت ایمنی و زنده ماندن در شرایط محیطی غیر مطلوب می‌باشد. از این جهت است که این سلول‌ها قابلیت زنده ماندن در هیپوکسی

ملانوما اگرچه شایعترین نوع سرطان پوستی نبوده ولی خطرناکترین و کشنده‌ترین نوع آن است که غالباً با ملانوسیت‌ها آغاز می‌گردد، و پرتوهای فرابنفش از جمله عوامل اصلی آن شناخته شده است. از دیگر عوامل بنیانی آن می‌توان به عوامل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی، تماس

اشباع‌نشده (polyunsaturated fatty acids (PUFAs) و اسیدهای چرب تک اشباع نشده (monounsaturated fatty acids) هر دو گروه دارای ویژگی‌های مهمی هستند که باعث جلوگیری از بدخیمی غدد سرطانی می‌گردد. PUFAs متشکل از خانواده‌های n-3 (امگا ۳) و n-6 (امگا ۶) می‌باشد که می‌تواند فعالیت ضد سرطانی در حالت درون شیشه‌ای و درون جاندارای داشته باشد (۲۶، ۳۰ و ۳۲).

پیکولینیک اسید (PA) محصول طبیعی تجزیه تریپتوفان است که کرومیوم پیکولینات به عنوان یک مکمل رژیم غذایی برای کاهش وزن تجویز می‌گردد (۱۴ و ۱۹). PA عمدتاً به‌عنوان تشدید کننده پاسخ‌های ایمنی شناخته می‌شود (۶، ۸ و ۱۰). اسید نیکوتینیک و امید آن نیکوتین امید رایج ترین اشکال ویتامین B نیاسین (ویتامین B3) که می‌تواند سطح کلسیم درون سلولی را به صورتی وابسته به زمان و غلظت کنترل نماید. علاوه بر این، غلظت نسبتاً بالای نیکوتینیک اسید (NA) به‌واسطه القای تخریب بتا توبولین باعث تجزیه اسکلت سلولی می‌شود. از آنجا که اسکلت سلولی نقش حیاتی در مهاجرت سلولی ایفا می‌کند، این تجزیه اسکلت سلولی توسط نیکوتین اسید ممکن است روند متاستاز را مختل کند (۳، ۲۸ و ۳۳).

با در نظر داشتن پتانسیل بالای NA و PA در درمانی‌های بالینی به دلیل دخیل بودن آنها در روندها و مکانیسم‌های بنیانی سلولی و ارائه دیدگاهی بهتر از نحوه عملکرد آنها در کنار اسید چرب امگا ۳ روی کنترل آنزیم تیروزیناز در سلول‌های سرطانی A-375 ملانوما به شیوه‌های مختلف در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین اثر کمپلکس‌های NA و PA با اسید چرب امگا ۳ بر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت.

را داشته و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌نمایند (۸ و ۱۰). پیشرفت‌های تحقیقاتی روی جزئیات و مکانیسم‌های کنترلی سلول‌های ملانوما در چند دهه اخیر باعث روشن نمودن بسیاری از مسائل مبهم گردیده و راه برای استفاده هدفمند از آنزیم‌های دخیل باز کرده و موجب ایجاد راه‌های عملی و کاربردی در مقابله با ملانوما گردیده. از این میان می‌توان به تیروزیناز (E.C.1.14.18.1) اشاره نمود که تغییر در میزان فعالیت آن نقشی بسیار بنیانی در ایجاد اختلالاتی چون ملانوما، هایپرپیگمانتاسیون، آلبینیسم و پیبالدیسم دارد. این اختلالات غالباً در نتیجه هیدروکسیله شدن L-تیروزین به L-DOPA در مرحله اول ملانوزن و به دنبال آن اکسیداسیون کاتکول‌آمین به O-quinine می‌باشد (۱-۴، ۱۱، ۱۹ و ۲۲).

همانطور که بیشتر اشاره گردیده، کاهش فعالیت تیروزیناز عامل ایجاد اختلالات پوستی شناخته شده و هدف قرار دادن این آنزیم می‌تواند برای جلوگیری و درمان ملانوما مفید باشد (۱۴ و ۳۴). تیروزیناز قارچ با منشاء Agaricus bisporus مدلی خوبی برای طراحی بازدارنده‌ها و بررسی فعالیت این آنزیم کلیدی می‌باشد. با توجه به در دسترس بودن آن و شباهت ساختاری بالای آن به تیروزیناز پستانداران مدل بسیار مناسبی برای انجام چنین بررسی‌هایی می‌باشد. از بازدارنده‌های مختلف تیروزیناز از قبیل ریسورسینیل مویتی (Resorcinyly moiety)، حلقه تیازول (Thiazole ring) (۲۸)، کوچیک اسید (kojic acid)، هیدروکوئینون (Hydroquinone)، آربوتین (Arbutin) (۷ و ۱۸)، گاما-توجاپلیسین ( $\gamma$ -thujaplicin) (۳۵) و بنزویک اسید و مشتقات پیریدین (benzoic acid & pyridine derivatives) (۱۶) اشاره نمود که از نظر بازدارندگی آنها روی بیش تولید ملانین مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

اسیدهای چرب غیراشباع به دلیل فعالیت ضد اکسیدانی بالا واجد خاصیت ضد سرطانی هستند. این نوع اسیدها بر اساس باندهای دوگانه به دسته اسیدهای چرب چند

## مواد و روشها

کشت سلول: رده سلولی A-375 ملانوما از مجموعه بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شد. محیط حاوی DMEM ۱۰٪ سرم جنینی غیرفعال شده با گرما و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین/استرپتومایسین برای کشت سلولها استفاده شد. پلیتهای کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت ۵٪ CO<sub>2</sub> نگهداری شدند.

بررسی میزان بقا و تکثیر سلولی به روش MTT: برای تعیین میزان بقا و تکثیر سلولها از روش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) بر اساس پروتوکل قبلی استفاده شد. به طور خلاصه، ۲۵۰۰ سلول از رده A-375 ملانوما در هر یک از چاهک‌های پلیتهای ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلولها در معرض غلظتهای مورد نظر از نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ قرار گرفتند. آزمایشات برای هر گروه در سه تکرار و با گروه کنترل تیمار نشده در سه زمان مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. پس از گذشت زمانهای مورد نظر، محیط کشت قبلی حذف و محیط ۲۰۰ μl DMEM ۱۰٪، FBS ۱۰٪ (۵ mg/mL) MTT (سیگما، ایالات متحده) اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت دیگر، محصول فورمازون احیا یافته داخل سلولی با جایگزینی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط DMEM-1640 با همان حجم دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد. مقادیر جذب در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیتریتر (BioTek, ELX800, USA) اندازه گیری شد. غلظت مهار کننده نصف حداکثر (IC<sub>50</sub>) از هر آزمایش محاسبه شد.

آنالیز تراکم سلولها توسط میکروسکوپ معکوس: سلولهای A-375 ملانوما به تعداد ۴×۱۰۴ درون پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار با دوزهای مختلف کمپلکس‌های نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳، سلول

های گروه کنترل و گروه‌های تحت تیماری مختلف به دقت در زیر میکروسکوپ معکوس (Leica, Germany) مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز سنتیکی بازدارندگی MT: سبتیک بازدارندگی با استفاده از غلظتهای مختلف L-DOPA (۱۰-۲،۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، P-ALA و N-ALA (۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ میلی‌مولار) ارزیابی شد، غلظت تیروزیناز ۴۰ واحد بود. حالت مهارتی و پارامترهای جنبشی توسط معادله Line weaver-Burk در یک شکل متقابل دو برابر معادله (۱) (۲۷)، که در آن ثابت Michaelis است. v و V max به ترتیب سرعت واکنش اولیه و حداکثر سرعت واکنش را مشخص می‌کنند، و [S] غلظت سوبسترا را نشان می‌دهد:

$$(1) \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{km}{V_{max}} \frac{1}{(S)}$$

ثابت اتصال برای آنزیم آزاد (K<sub>ic</sub>) از طریق نمودار خطی دیکسون معادله به دست آمد. (۲) v/۱ در مقابل [I]، که در آن (I) نشان دهنده غلظت بازدارنده است:

$$(2) \quad V = \frac{V_{max}(S)}{km \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S]}$$

ثابت اتصال برای کمپلکس سوبسترا-آنزیم (K<sub>iu</sub>) از طریق نمودار خطی Cornish-Bowden-Eisenthal معادله (۳) (۹) از (V/S) در مقابل [I] توصیف شد:

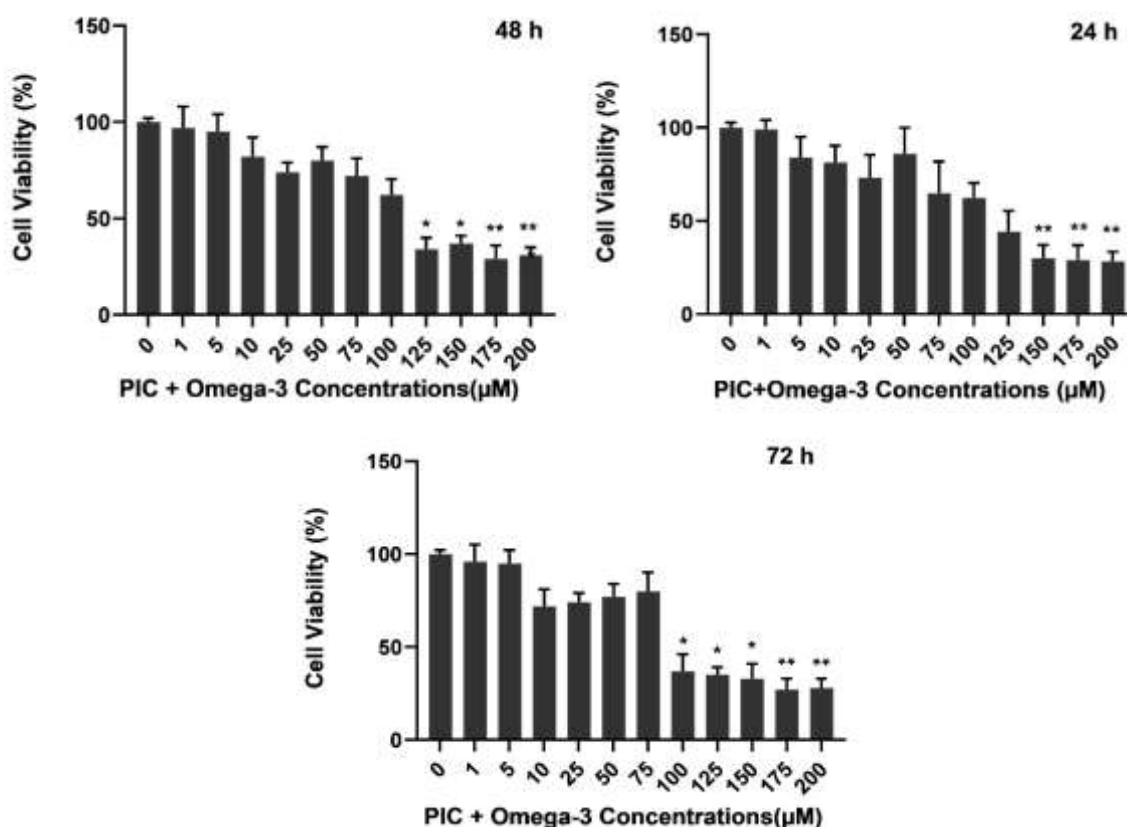
$$(3) \quad V = \frac{V_{max}(S)}{Km \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}$$

آنالیز آماری: کلیه نتایج حاصل از این مطالعه در رابطه با MTT با استفاده از روشهای آماری one way مورد تجزیه و two way ANOVA و ANOVA در نرم‌افزار SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) 28 تحلیل قرار گرفته و نمودارها در هر دو مورد با استفاده از نرم افزار Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) با سطح معنی داری ۰/۰۱ و p < ۰/۰۵ گزارش شدند.

## نتایج

حادث گردید (شکل ۱). روند مشابهی در تیمار زمانی ۴۸ مشاهده شد ولی با افزایش فاکتور زمان، سطح غلظت ۱۲۵ میکرومولار نیز مهار معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) رشد سلولی را نشان داد. بیشترین مهارکنندگی رشد سلولی تحت تیمار با کمپلکس پیکولینیک اسید-امگا ۳ در شرایط زمانی ۷۲ ساعت مشاهده گردید، چراکه غلظت ۱۰۰ میکرومولار این کمپلکس توانست رشد سلول‌های ملانوما A-375 را به شکل معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) مهار نماید. دیگر سطح‌ها، ۱۲۵-۲۰۰ میکرومولار نیز مشابه دو تیمار زمانی قبلی باعث مهار معنی‌دار سلول‌های سرطانی گردیدند (شکل ۱).

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف (۰-۲۰۰ میکرومولار) کمپلکس‌های پیکولینیک اسید-امگا ۳ و نیکوتینیک اسید-امگا ۳ تحت تیمارهای زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، شاهد اثر معنی‌دار این کمپلکس‌ها بر کاهش تکثیر و رشد سلولی بودیم. سلول‌های تحت تیمار ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف پیکولینیک اسید-امگا ۳، مهار رشد سلول‌های سرطانی ملانوما با افزایش غلظت نشان دادند ولی این افزایش مهار تنها از سطح ۱۵۰ میکرومولار به بعد مشاهده گردید و تفاوت معنی‌داری را در سطح  $p < 0.01$



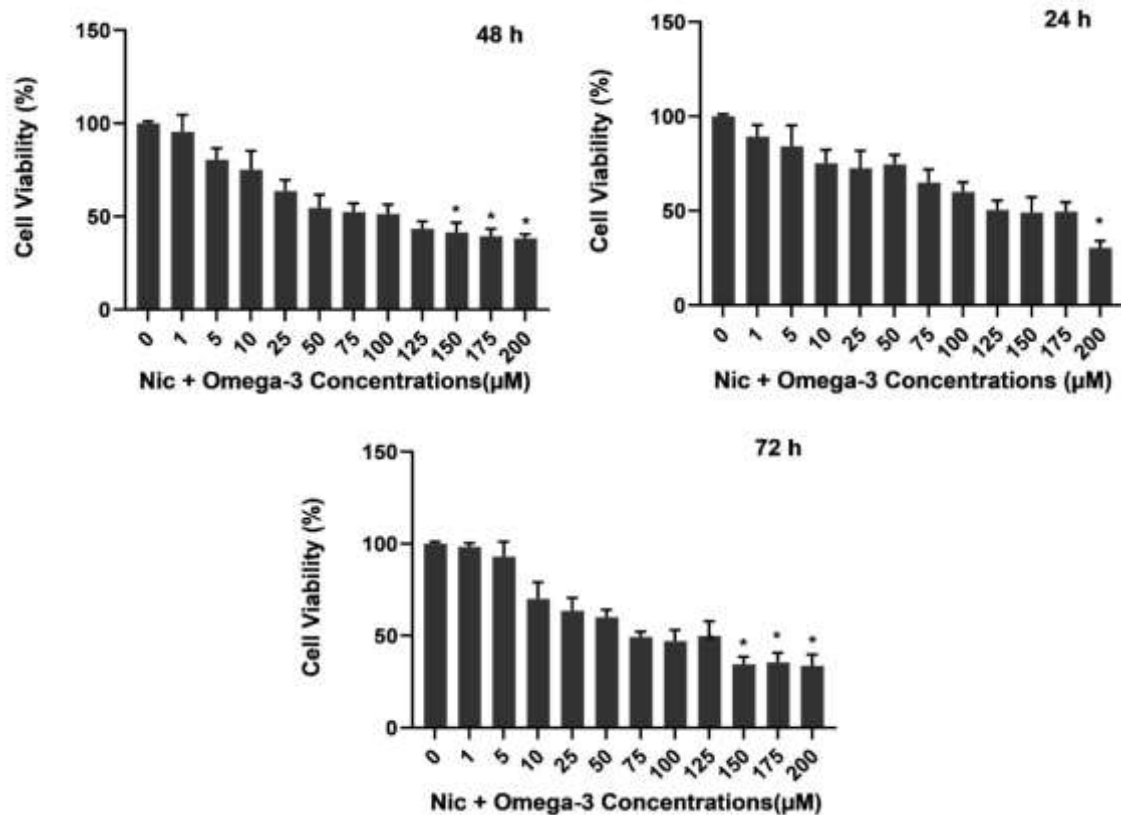
شکل ۱- آنالیز بقای سلول‌ها پس از در معرض قرار گرفتن با غلظت‌های مختلف کمپلکس پیکولینیک اسید-امگا ۳. به تیمارهای زمانی در شکل‌ها اشاره گردیده. علامت ستاره اشاره به اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ (\*) و ۱ (\*\* درصد دارد.

مهارکنندگی کمپلکس نیکوتینیک اسید-امگا ۳ مشاهده گردید (شکل ۲)، همانند کمپلکس قبلی، ولی این روند کاهش در نیکوتینیک اسید-امگا ۳ کم نوسان‌تر بود و صرفاً بیشترین غلظت به کاربرده شده (۲۰۰ میکرومولار)

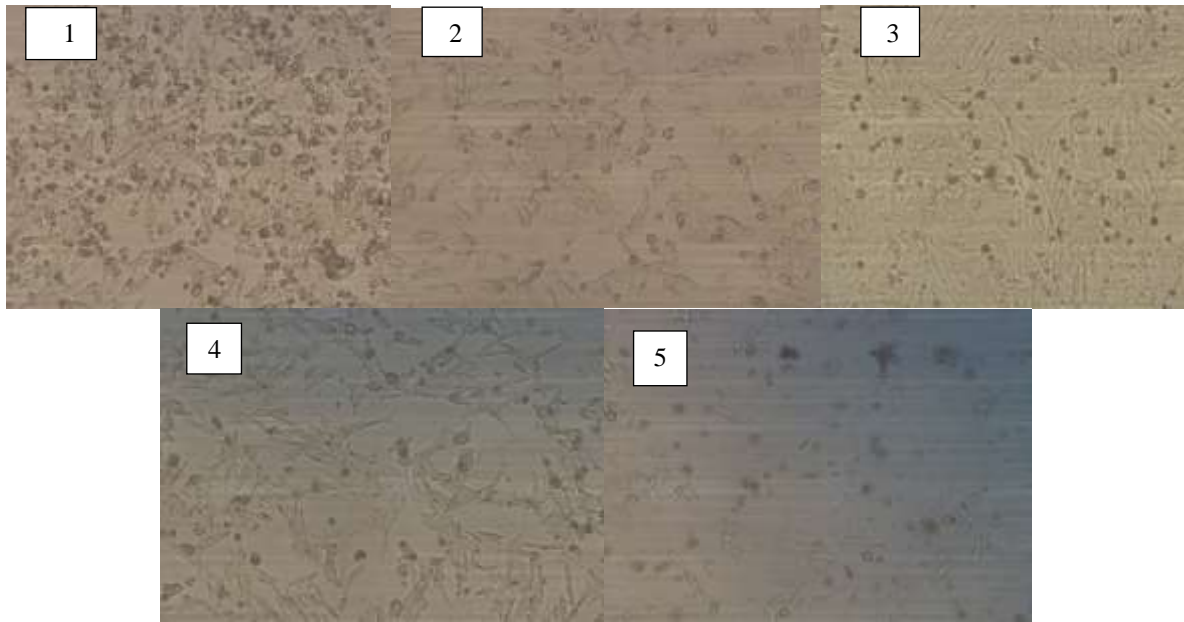
واکنش سلول‌های سرطانی ملانوما به نیکوتینیک اسید-امگا ۳ کمپلکس تحت تیمارهای زمانی نامبرده در بالا تا حدی متفاوت از کمپلکس پیکولینیک اسید-امگا ۳ بود. در تیمار زمانی ۲۴ ساعت، اثری وابسته به غلظت در توان

پارامتر سستیکی کمپلکس‌های نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ روی تیروزیناز فارچ مورد بررسی قرار گرفته و ویژگی‌های سستیکی با استفاده از نمودار مقایسه‌ای لینیور-برک به دست آمد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش بازدارنده موجب ایجاد خطوط مختلفی می‌گردد که دارای شیب بوده و از محور Y می‌گذرد (شکل A, B). مقدار  $K_i$  نمودار دوم لینیور-برک (شکل A, B) و معادله ۱ حاصل گردید. نوع بازدارندگی آنزیم به ترتیب در نیکوتینیک اسید-امگا ۳،  $V_{max}=0/134$  و  $K_m=0/19$ ،  $K_i=5/2$  و در پیکولینیک اسید-امگا ۳،  $V_{max}=0/14$  و  $K_m=0/19$ ،  $K_i=5/1$  رقابتی بود.

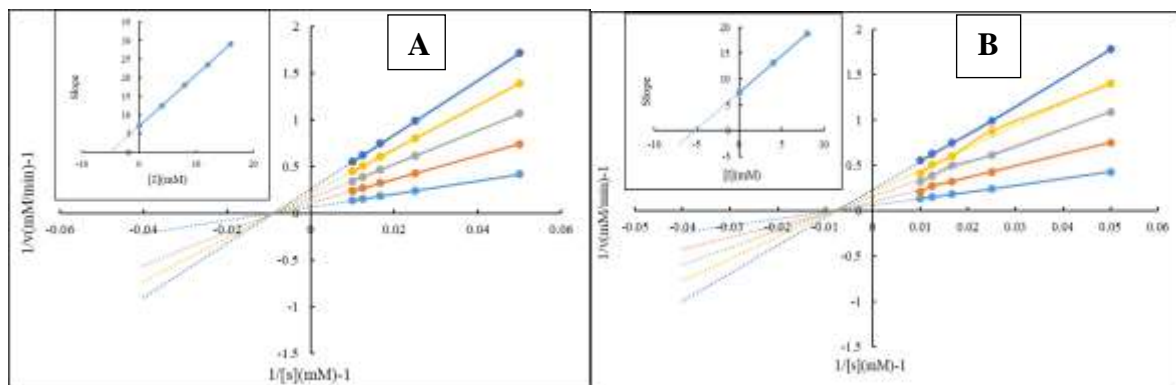
توانست مهارکنندگی معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) را نشان دهد. با افزایش زمانی به ۴۸ ساعت، این کمپلکس توانست مهارکنندگی معنی‌داری رو سلول‌های سرطانی در غلظت‌های پایین‌تر ۱۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار داشته باشد. روند مشابهی در تیمار ۷۲ ساعت مشاهده گردید، دال بر اینکه افزایش زمان اثری بر افزایش توان مهارکنندگی غلظت‌های پایین‌تر کمپلکس نیکوتینیک اسید-امگا ۳ ندارد (شکل ۲). تغییرات در تراکم سلول‌های A375 ملانوما قبل و بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ نیز می‌تواند در تصاویر میکروسکوپی مشاهده گردد (شکل ۳).



شکل ۲- آنالیز بقای سلولها پس از در معرض قرار گرفتن با غلظت‌های مختلف کمپلکس نیکوتینیک اسید-امگا-۳. به تیمارهای زمانی در شکل‌ها اشاره گردیده. علامت ستاره اشاره به اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ (\*) و ۱ (\*\*). درصد دارد.



شکل ۳- عکس‌های میکروسکوپ نوری (احتمالاً فاز-کنتراست تغییرات در تراکم سلول‌های سرطانی رده A-۳۷۵ ملانوما تحت تیمارهای (۱) کنترل (۲) ۵۰ میکرومولار (۳) ۲۰۰ میکرومولار نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و در تیمارهای زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت. عکس‌های ۵ و ۴ اثر غلظت‌های (۴) ۵۰، (۵) ۲۰۰ میکرومولار، پیکولینیک اسید-امگا ۳ به ترتیب در ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد.



شکل ۴- نمودار مقایسه‌ای لینیور-برک آزمون سنتیکی تیروزیناز قارچ روی کمپلکس‌های نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳. L-DOPA به‌عنوان سوبسترا در نظر گرفته شد. واکنش در ۱۰ میلی‌مولار PBS، pH ۶/۸، در دمای ۲۵ °C و ۴۰ واحد آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف از کمپلکس نیکوتینیک اسید-امگا ۳ (A): (نیلی) ۰، (نارنجی) ۴، (خاکستری) ۸، (زرد) ۱۲ و (آبی) ۱۶ میلی‌مولار؛ کمپلکس پیکولینیک اسید-امگا ۳ (B): (نیلی) ۰، (نارنجی) ۴، (خاکستری) ۸، (زرد) ۱۲ و (آبی) ۱۶ میلی‌مولار. پلات‌های ثانویه، شیب در مقابل غلظت‌های مختلف بازدارنده، که ثابت بازدارنده ( $K_i$ ) را از نقاط طولی ارائه می‌دهد.

## بحث

و بروز تومور را کاهش می‌دهند و موجب افزایش بیان TNF- $\alpha$  می‌گردد. همچنین سطح گونه‌های فعال اکسیژن را سرکوب می‌کنند و بر متابولیسم مواد مغذی در سلول‌های سرطانی تأثیر می‌گذارند (۱۴ و ۳۵). نیکوتینیک اسید از رگزایی از طریق بازسازی اسکلت سلولی جلوگیری

اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع و ترانس در صورت مصرف در مقادیر زیاد با به خطر انداختن ایمنی سلولی، خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهند (۱۲). در مقابل، PUFAهای امگا ۳ عملکرد ایمنی سلولی را بهبود می‌بخشد

همکاران (۱۹) با افزودن دو مولکول نیاسین مشتقی از کورکومین تولید کرد که فراهمی زیستی را بهبود بخشید و عملکرد ضد تکثیر قابل توجهی را در برابر رده‌های سلولی سرطانی روده بزرگ (HCT116)، پستان (MCF-7) و نازوفارنکس (CNE2, 5-8F و 6-10B) نشان داد. علاوه بر این، القای آپوپتوز علاوه بر توقف چرخه سلولی در فاز G2/M با مکانیسم با واسطه p53 است که رویکرد اصلی این مشتق می‌باشد در حالیکه گزینش پذیری بالایی را نیز حفظ می‌نماید.

ما این مشتق از اسید نیکوتین را برای بهبود فراهمی زیستی و کارایی حمل و نقل آن سنتز کردیم. این اصلاح ساختاری مولکولی احتمالاً جذب روده ای آن را افزایش می‌دهد. نیکوتینیک اسید و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD) دو پیش ساز نیاسین هستند. این دو ترکیب به‌عنوان بستری از آنزیم‌های تجزیه‌کننده NAD مانند پلیمرازهای (PARPs) (ADP-ribose)، CD38 و سیرتوئین‌ها عمل می‌کنند. علاوه بر این، تجزیه NAD توسط PARP1/2 به تولید PAR و ترمیم DNA اجازه می‌دهد و از طریق آسیب DNA، فعالیت PARP1/2 منجر به مرگ سلولی توسط آپوپتوز می‌شود، بنابراین نیاسین به عنوان یک عامل پیشگیری بالقوه از سرطان پوست می‌تواند در فرایند درمان در نظر گرفته شود. برای فعالیت مونوفنولاز، اسید ۲ آمینو بنزوئیک و اسید ۴ آمینو بنزوئیک فعالیت آنزیم را به صورت غیر رقابتی مهار کردند، در حالی که اسید نیکوتینیک و اسید پیکولینیک به طور رقابتی فعالیت آنزیم را محدود کردند (۳، ۷ و ۸).

نتایج مطالعه ما نشان داد که نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ باعث مهار فعالیت MT و بی‌ثباتی فیزیکوشیمیایی آن می‌شوند. نمودارهای مقایسه‌ای لینیور-برک الگوهای مختلفی از مهار رقابتی را برای هر دو کمپلکس نشان می‌دهد. بیشتر گزارش گردیده که حالت مهاری مهارکننده‌های فلاونول معمولاً مهار رقابتی برای

می‌کند. که نشان می‌دهد سنتز ALA به عنوان امگا ۳ و اسید نیکوتینیک به عنوان یک مشتق جدید، ممکن است عوامل شیمیایی پیشگیری کننده و درمانی ایمن برای انواع خاصی از سرطان‌ها باشند (۲۱، ۲۳ و ۳۱). مطالعه قبلی ما بر روی سنتز مشتقات اسید چرب غیراشباع چندگانه و تأثیر مشتقات کریزین امگا-۳ و ۶- که مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز هستند که در ملانوما بیش از حد بیان می‌شوند، متمرکز بود. اسیدها و ترکیبات پیریدین به عنوان مهارکننده‌های درمانی بالقوه بر روی آنزیم تیروزیناز و رده سلولی ملانوما A-۳۷۵ تأثیرگذاری قابل توجهی را نشان دادند. غلظت‌هایی که در آن مهارکننده‌ها تراکم سلولی را تا ۵۰ درصد کاهش دادند، (IC<sub>50</sub>) به ترتیب در ۲/۶۱ و ۲/۴۲ میلی‌مولار برای اسیدهای نیکوتین و پیکولینیک به دست آمد (۱۶).

ترکیب عوامل ضد سرطانی برای افزایش یا از بین بردن معایب ترکیبات مورد استفاده در فرایند درمان سرطان، یک رویکرد ثابت شده برای شیمی درمانی سرطان است (۲۴). همانطور که در نتایج سنجش MTT در شکل ۲ ذکر شد، IC<sub>50</sub> مشاهده شده برای نیکوتینیک اسید-امگا ۳ در رده سلولی ملانوما A-۳۷۵ برای سه تیمار زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۶۱/۵، ۱۴۹/۳ و ۱۴۵/۲ μM و برای پیکولینیک اسید-امگا ۳، ۱۴۱/۴، ۱۳۲/۸ و ۱۲۳/۹ μM بود، که بر اثر ضد تکثیری بیشتر این مشتقات را در مقایسه با هر کدام از ترکیبات به تنهایی تأکید می‌نماید. مالیخان و همکاران نیز در بررسی اثر مشتقات نیکوتینیک اسید-امگا ۳ روی سلول‌های سرطانی ملانوما سطح IC<sub>50</sub> مشابهی را شامل ۱۶۶/۷، ۱۴۴/۲ و ۱۴۶/۱ μM در سه تیمار زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ گزارش نمودند (۲۸). به‌طورکلی، در بررسی حاضر، مشتقات پیریدین (اسیدهای نیکوتین و پیکولینیک) به همراه امگا ۳ داری تأثیرگذاری قابل توجه و IC<sub>50</sub> پایین‌تر نیز نسبت به مطالعات پیشین بودند، بدین معنا که در غلظت پایین‌تری توانستند موجب کاهش ۵۰٪ تراکم سلول‌های سرطانی گردند. در مطالعه ای مشابه، هی و

سیستیک کمی کمپلکس‌های این مطالعه نشان داد که مهار آنزیم تیروزیناز رقابتی بود (شکل ۴A,B)، این یافته در موافقت با نتیجه گرفته شده توسط غیبی و همکاران بر روی نیکوتینیک و پیکولینیک اسید می‌باشد (۱۶).

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، کمپلکس‌های تازه طراحی شده نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ اثرات ضد تکثیر بر رده سلولی A-۳۷۵ ملانوما را به صورتی وابسته به غلظت و زمان را نشان دادند. نیکوتینیک اسید  $IC_{50}$  پایین-تری در مقایسه با اسید نیکوتین به تنهایی و همراه با امگا ۳ به همراه داشت. و این ویژگی مولکولی باعث بیشتر شدن فراهمی زیستی نیکوتینیک اسید-امگا ۳ در سلول‌های تیمار شده گردیده و بر همین اساس این کمپلکس قابلیت بیشتری در کاهش تراکم سلول‌های سرطانی را داشت. عکس‌های میکروسکوپی نیز نشان داد سلول‌های سرطانی تحت تیمارهای مختلف کاهش تراکم داشته‌اند. در راستای تغییرات سیستیک با استفاده از نمودار لینویور-برک، کمپلکس‌ها موجب القای ناپایداری ترمودینامیکی و تغییرات ساختاری در MT شدند. این کمپلکس‌ها، می‌تواند برای بررسی بیشتر پیشنهاد شوند و در مطالعات پیشرو به عنوان یک مکمل شیمی درمانی پیشگیری کننده اختلالات پوستی و سرطان در نظر گرفته شوند.

اکسیداسیون L-DOPA توسط تیروزیناز و پاره‌مولکول ۳-هیدروکسی-۴-کتو فلاونول است و ساختار نقش کلیدی در شلاته کردن مس دارد. ارزیابی سیستیک فعالیت آنزیم در حضور نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ یک شیوه رقابتی مهار را با ثابت مهاری (Ki) به ترتیب ۵/۲ و ۵/۱ میلی‌مولار برای نیکوتینیک اسید-امگا ۳ و پیکولینیک اسید-امگا ۳ القا نمود. در مطالعات قبلی، کمپلکس‌های Chyrsin به همراه امگا ۳ و ۶ یک اثر بازدارنده رقابتی بر MT با مقادیر Ki ۰/۴۵ و ۰/۲۹ میلی‌مولار نشان دادند و فعالیت اسید نیکوتینیک و پیکولینیک اسید به ترتیب دارای Ki ۲/۴ و ۲/۹۳ میلی‌مولار و ۲/۹۳ میلی‌مولار بودند (۱۶، ۲۱). مهار فعالیت تیروزیناز ممکن است به گروه‌های هیدروکسیل روی ترکیبات فنلی فلاونوئیدها بستگی داشته باشد که با آنزیم پیوند هیدروژنی ایجاد نمایند و موجب القای بازدارندگی رقابتی و نهایتاً منجر به کاهش فعالیت آنزیمی می‌گردند (۵ و ۲۵). چندین مطالعه نشان داده است که اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع اثرات مهاری بر فعالیت تیروزیناز دارند. تغییرات در فعالیت با افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع ممکن است تخریب تیروزیناز توسط کمپلکس پروتئازوم را افزایش دهد، در حالی که افزایش اسیدهای چرب اشباع شده اثر معکوس دارد (۱۵، ۱۶). جمالی و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که اثر بازدارندگی ترکیبی اسیدهای چرب بهتر از حالت جداگانه آن‌ها می‌باشد (۲۱). آنالیز

### منابع

- ۱- افشار، ص، نعمت پور، ف، شیرزاد، امیر. ۱۴۰۰. " تغییرات بیان ژن آدنوزین دامیناز (ADA) در سلول‌های سرطان پستان انسانی رده‌های MCF-۷ و MB-MDA-۲۳۱ و سلول‌های رده نرمال A-MCF1۰ تیمار شده با عصاره شیرین بیان " مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۴، شماره ۴، ص: ۳۱۸-۳۰۴.
- ۲- صفریان، ش، عرفانی، آ. ۱۴۰۰. " بررسی شیوع دو جهش در ژن FLT3 در میان بیماران مبتلا به لوسمی‌های حاد میلوئیدی با کاربوتایپ طبیعی در شمال شرق ایران " مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۴، شماره ۴، ص: ۶۵۲-۶۳۸.
- 3- Audrito, V., Managò, A., Gaudino, F., and Deaglio, S., 2020. Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: the key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). In *Seminars in cell and developmental biology*, Elsevier.
- 4- Azumi, J., Takeda, T., Shimada, Y., Aso, H., and Nakamura, T., 2019. The organogermanium

- compound THGP suppresses melanin synthesis via complex formation with L-DOPA on mushroom tyrosinase and in B16 4A5 melanoma cells. *International journal of molecular sciences*, 20(19): 4785.
- 5- Baek, H.S., Rho, H.S., Yoo, J.W., Ahn, S.M., Lee, J.Y., Lee, J.A., Kim, M.K., Kim, D.H., and Chang, I.S., 2008. The inhibitory effect of new hydroxamic acid derivatives on melanogenesis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(1): 43-46.
  - 6- Bosco, M. C., Rapisarda, A., Massazza, S., Melillo, G., Young, H., and Varesio, L., 2000. The Tryptophan Catabolite Picolinic Acid Selectively Induces the Chemokines Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 164(6): 3283-3291.
  - 7- Chang, Y.H., Kim, C., Jung, M., Lim, Y.H., Lee, S., and Kang, S., 2007. Inhibition of melanogenesis by selina-4 (14), 7 (11)-dien-8-one isolated from *Atractylodis Rhizoma Alba*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007. 30(4):719-723.
  - 8- Chen, L.M., Bao, C.H., Wu, Y., Liang, S.H., Wang, D., Wu, L.Y., Huang, Y., Liu, H.-R., and Wu, H.G., 2021. Tryptophan-kynurenine metabolism: a link between the gut and brain for depression in inflammatory bowel disease. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1): 135.
  - 9- Cornish-Bowden, A., 1975. The use of the direct linear plot for determining initial velocities. *Biochemical Journal*, 149(2):305-312.
  - 10- Dehghani, M., Kazemi Shariat Panahi, H., and Guillemin, G. J., 2019. Microorganisms, Tryptophan Metabolism, and Kynurenine Pathway: A Complex Interconnected Loop Influencing Human Health Status. *International Journal of Tryptophan Research*, 12: 117.
  - 11- Eftekhari, A., Ahmadian, E., Salatin, S., Sharifi, S., Dizaj, S. M., Khalilov, R., and Hasanzadeh, M., 2019. Current analytical approaches in diagnosis of melanoma. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116: 122-135.
  - 12- Freitas, R.D.S. and M.M. Campos., 2019. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer- Related Complications. *Nutrients*, 11(5).
  - 13- Friedman, M., 2018. Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan. *International Journal of Tryptophan Research*, 11:1178646918802282.
  - 14- Funayama, M., Arakawa, H., Yamamoto, R., Nishino, T., Shin, T., Murao, S., 1995. Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 59(1):143-144.
  - 15- Gheibi, N., Saboury, A., Haghbeen, K., Rajaei, F., and Pahlevan, A., 2009. Dual effects of aliphatic carboxylic acids on cresolase and catecholase reactions of mushroom tyrosinase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24(5): 1076-1081.
  - 16- Gheibi, N., Taherkhani, N., Ahmadi, A., Haghbeen, K., and Ilghari, D., 2015. Characterization of inhibitory effects of the potential therapeutic inhibitors, benzoic acid and pyridine derivatives, on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(2): 122-129.
  - 17- Grant, R. S., Coggan, S. E., and Smythe, G. A., 2009. The physiological action of picolinic Acid in the human brain. *International journal of tryptophan research*, 2:71-79.
  - 18- Ha, Y. M., Chung, S. W., Song, S., Lee, H., Suh, H., and Chung, H. Y., 2007. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1, 3-benzendiol: a potent, new tyrosinase inhibitor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(9): 1711-1715.
  - 19- Han, H. J., Park, S. K., Kang, J. Y., Kim, J. M., Yoo, S. K., and Heo, H. J., 2020. Anti-melanogenic effect of ethanolic extract of *Sorghum bicolor* on IBMX-induced melanogenesis in B16/F10 melanoma cells. *Nutrients*, 12(3): 832.
  - 20- Hassani, S., Haghbeen, K., and Fazli, M., 2016. Non-specific binding sites help to explain mixed inhibition in mushroom tyrosinase activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 122: 138-148.
  - 21- He, Y.C., He, L., Khoshaba, R., Lu, F.G., Cai, C., Zhou, F.-l., Liao, D.-f., and Cao, D., 2019. Curcumin nicotinate selectively induces cancer cell apoptosis and cycle arrest through a P53-mediated mechanism. *Molecules*, 24(22): 4179.
  - 21- Jamali, Z., Rezaei Behbehani, G., Zare, K., and Gheibi, N., 2019. Effect of chrysin omega-3 and 6 fatty acid esters on mushroom tyrosinase activity, stability, and structure. *Journal of food biochemistry*, 43(3): e12728.
  - 22- Ji, Y., Dai, F., Yan, S., Shi, J.Y., and Zhou, B., 2019. Identification of catechol-type diphenylbutadiene as a tyrosinase-activated pro-

- oxidative chemosensitizer against melanoma A375 cells via glutathione S-transferase inhibition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(32): 9060-9069.
- 23- Jing, K., Song, K.S., Shin, S., Kim, N., Jeong, S., Oh, H.R., Park, J.H., Seo, K.-S., Heo, J.Y., Han, J., Park, J.I., Han, C., Wu, T., Kweon, G.-R., Park, S.K., Yoon, W.H., Hwang, B.D., and Lim, K., 2011. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. *Autophagy*, 7(11): 1348-1358.
- 24- Kiesewetter, B., Simonitsch-Klupp, I., Mayerhoefer, M. E., Dolak, W., Lukas, J., and Raderer, M., 2020. First Line Systemic Treatment for MALT Lymphoma-Do We Still Need Chemotherapy? Real World Data from the Medical University Vienna. *Cancers*, 12(12): 3533.
- 25- Kim, Y. J., Kang, K. S., and Yokozawa, T., 2008. The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food and chemical toxicology*, 46(7): 2466-2471.
- 26- Li, J., Chen, C.Y., Arita, M., Kim, K., Li, X., Zhang, H., and Kang, J. X., 2018. An omega-3 polyunsaturated fatty acid derivative, 18-HEPE, protects against CXCR4-associated melanoma metastasis. *Carcinogenesis*, 39(11): 1380-1388.
- 27- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3): 658-666
- 28- Malikhani, H., Siasi Torbati, E., Majd, A., and Gheibi, N., 2021. Anti-Cancer Properties of Nicotinic Cid-Alpha Linolenic Acid Derivative on A375 Melanoma Cell Line: Assessment of Apoptosis and WNT Signaling Pathways. *Middle East Journal of Cancer*.
- 29- Miura, K., Way, M., Jiyad, Z., Marquart, L., Plasmeijer, E. I., Campbell, S., Isbel, N., Fawcett, J., Ferguson, L. E., and Davis, M., 2021. Omega-3 fatty acid intake and decreased risk of skin cancer in organ transplant recipients. *European Journal of Nutrition*, 60(4): 1897-1905.
- 30- Newell, M., Mazurak, V., Postovit, L. M., and Field, C. J., 2021. N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid, and the Role of Supplementation during Cancer Treatment: A Scoping Review of Current Clinical Evidence. *Cancers*, 13(6): 1206.
- 31- Saini, R. K., and Keum, Y.S., 2018. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life sciences*, 203: 255-267.
- 32- Scatozza, F., Moschella, F., D'Arcangelo, D., Rossi, S., Tabolacci, C., Giampietri, C., Proietti, E., Facchiano, F., and Facchiano, A., 2020. Nicotinamide inhibits melanoma in vitro and in vivo. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1): 1-17.
- 33- Skoniecka, A., Cichorek, M., Tyminska, A., Pelikant-Malecka, I., and Dziewiatkowski, J., 2021. Melanization as unfavorable factor in amelanotic melanoma cell biology. *Protoplasma* 21: 1-14.
- 34- Vanjare, B. D., Mahajan, P. G., Dige, N. C., Raza, H., Hassan, M., Han, Y., Kim, S. J., Seo, S.Y., and Lee, K. H., 2021. Novel 1, 2, 4-triazole analogues as mushroom tyrosinase inhibitors: synthesis, kinetic mechanism, cytotoxicity and computational studies. *Molecular diversity*, 25(4): 2089-2106.

## Studying the activity of Nic-Omega 3 and Pic-Omega 3 complexes on Mushroom Tyrosinase and their anti-cancer properties in A-735 melanoma cell line

### Running title: Nic-Omega 3 and Pic-Omega 3 complexes reduced cell viability in A-375 melanoma

Sanginabadi F.,<sup>1</sup> Gheibi N.,<sup>2\*</sup> Divsalar A.,<sup>3</sup> Saboury AA.<sup>4</sup> and Yaghmaei P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>2</sup>Dept. of Biotechnology and Biophysics, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R. of Iran.

<sup>3</sup>Dept. of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Khwarizmi University, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

#### Abstract

Low-risk and efficient therapeutic approaches have been central themes of many recent studies on melanoma treatment. Accordingly, here the aim was to study the impact of nicotinic and picolinic acid-omega 3 complexes on mushroom tyrosinase and their antiproliferation effect on the A-375 melanoma cell line. The cells were exposed to various levels of nicotinic-omega 3 and picolinic-omega 3 complexes. To screen for cell proliferation, MTT assay and inverted microscope were applied. Kinetic analysis of the inhibitory effect of the complexes on tyrosinase enzyme was also evaluated. Nicotinic-omega 3 and picolinic-omega 3 complexes significantly reduced cell growth with a concentration and time-dependent behavior. The significant inhibitory effect for picolinic-omega-3 was observed in a lower concentration as the time increased. However, nicotinic-omega 3 did not manifest a similar potency level as in 24 h only 200  $\mu$ M was significant, and in 48 h and 72 h, the significance in inhabitation was observed between 150-200  $\mu$ M. Meaning that the growth and multiplication of the cells under those treatments decreased considerably. These two complexes affected mushroom tyrosinase in a competitive inhibitory manner with  $K_i$  values of 5.2 and 5.1 mM for nicotinic - omega-3 and picolinic - omega-3, respectively. It seems nicotinic - omega 3 and picolinic – omega 3 complexes are capable of solid antiproliferative potential against melanoma cells, indicating their potential applicability for the melanoma cancer treatment.

**Key words:** Competitive inhibition, Mushroom Tyrosinase, Picolinic Acid, Omega 3, Kinetic Analysis