دانشگاه کاشان

دانشکده‌ی شیمی

گروه شیمی آلی

رساله

برای اخذ درجه‌ی دکتری

در رشته‌ی شیمی آلی

عنوان:

طراحی، ساخت و شناسایی ساختار پپتیدهای خطی و حلقوی برپایه لانجیکالیسینین A وکارنوزین و بررسی اثرات زیست‌شناختی‌آن‌ها در سلول‌های سرطانی برخی از اندام‌ها

استاد راهنمای اول:

دکتر عبدالحمید بامنیری

استاد راهنمای دوم:

دکتر محمدحسن هوشدارتهرانی

استاد مشاور:

پروفسور بی‌بی فاطمه میرجلیلی

توسط:

محمدرضا قلی‌بیکیان

بهمن ۱۳۹۶

چکیده:

در این پروژه، آنالوگ‌های پپتیدهای خطی و حلقوی محافظت نشده لانجیکالیسینین A و آنالوگ‌های پپتیدهای خطی و حلقوی محافظت نشده از کارنوزین طراحی شده‌اند و به طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از روش فاز جامد Fmoc/t-Bu سنتز شدند. رزین ۲-کلروتریتیل‌کلراید به عنوان فاز جامد استفاده شد. در مرحله اول، آنالوگ‌های سنتز شده در ابتدا از رزین به عنوان پپتیدهای محافظت شده جدا شدند. محافظت‌زدایی نهایی با تری‌فلوئورواستیک اسید ۹۵٪ حاوی مواد به دام انداز برای تولید آنالوگ‌های خطی انجام شد که با روش‌های دستگاهی مختلف مانند مادون قرمز تبدیل‌فوریه، کروماتوگرافی مایع-طیف سنج جرمی، رزونانس مغناطیسی هسته هیدروژن و رزونانس مغناطیسی هسته کربن شناسایی شدند. در مرحله دوم، آنالوگ‌های خطی سنتز شده محافظت‌شده با استفاده از روش جدایی جزئی برای جدایی از فاز جامد جدا شدند. ماکروحلقوی شدن آنالوگ‌های خطی توسط معرف جفت‌کننده انجام شد و محافظت‌زدایی نهایی بر روی آنالوگ‌های حلقوی با تری‌فلوئورواستیک اسید ۹۵٪ و مواد به دام انداز برای تولید آنالوگ‌های حلقوی انجام شد که با روش‌های دستگاهی مختلف با استفاده از مادون قرمز تبدیل‌فوریه، کروماتوگرافی مایع-طیفسنج جرمی، رزونانس مغناطیسی هسته هیدروژن و رزونانس مغناطیسی هسته کربن شناسایی شدند. هجده آنالوگ‌های خطی و حلقوی از لانجیکالیسینین A، ده آنالوگ خطی از کارنوزین و شش آنالوگ حلقوی از کارنوزین به همین طریق سنتز شدند و فعالیت سمیتی‌شان در مقابل رده‌های سلولی HepG2 و HT-29 با استفاده از سنجش MTT (رنگ‌سنجی)، سنجش LDH (سنجش آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز) و آپاپتوز مشخص شدند. آنالوگ‌های سنتزی، فعالیت نسبی خوبی را در مقابل رده‌های سلولی از HepG2 و HT-29 با مقدارهای نیمی از غلظت مهار کننده (IC_{50}) مختلف در مقایسه با داروی استاندارد ۵-فلوئورواوراسیل نشان دادند. عدم سمیت آنالوگ‌های سنتز شده با استفاده از سلول‌های فیبروبلاست پوستی همچنین بررسی شدند. در بخش دوم پروژه، سرطان کبد بوسیله دی‌اتیل‌نیتروزآمین به عنوان یک آغازگر و ۲-استیل‌آمینوفلوئورن به عنوان یک پیش برنده در پنج موش القا شد. میتوکندری بافت کبد برای بررسی اثرکشندگی آنالوگ‌های کارنوزین خطی و حلقوی جداشدند و پارامترهای سلولی مرتبط به سیگنال آپاپتوز سپس مشخص شدند. همچنین در بخش سوم و چهارم پروژه، میتوکندری گلیوبلاستومای انسان و میتوکندری ریه انسان برای بررسی اثرات کشندگی آنالوگ‌های کارنوزین خطی و حلقوی جداشدند و پارامترهای سلولی مرتبط به سیگنال آپاپتوز سپس مشخص شدند. نتایج سمیت بالای آنالوگ‌های خطی و حلقوی سنتزشده کارنوزین با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سنجش MTT، یک افزایش درگونه‌های اکسیژن فعال میتوکندری (ROS)، تورم در میتوکندری، تولید آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP)، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری($\Delta\psi m$)، رهایش سیتوکروم c و فعالیت کاسپاز ۳ پس از مواجه شدن میتوکندری استخراج شده از گروه HCC و گلیوبلاستومای انسان و ریه انسان را نشان داد. بر اساس نتایج کلی، آنالوگ‌های کارنوزین حلقوی در مقابل آنالوگ‌های کارنوزین خطی برای توسعه عوامل ضدسرطان جدید مورد تشویق خواهند بود و ممکن است به عنوان یکی از عوامل درمانی مکمل امیدوارکننده برای درمان سرطان‌های کبد و مغز و ریه درنظر گرفته شوند.

کلمات کلیدی: لانجیکالیسینین A، کارنوزین، سنتز پپتید، رزین ۲-کلروتریتیل‌کلراید، سنجش MTT، ماکروحلقوی شدن، ضدسرطان، آپاپتوسیز، سرطان کبد، میتوکندری، گلیوبلاستومای انسان، سرطان ریه، سمیت.

Abstract

In this project, deprotected linear and cyclic peptides analogues of Longicalycinin A and deprotected linear and cyclic peptides analogues of carnosine, have been designed and successfully synthesized by solid phase methodology of Fmoc / t-Bu in two ways. 2-chlorotrityl chloride resin (2-CTC) was used as solid support. In the first track, the synthesized analogues were at first cleaved from the resin as protected peptides. The final deprotection was performed by treatment with TFA 95% containing scavengers to achieve linear analogues which characterized by different instrumental methods using FT-IR, LC-MS, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR. In the second track, the synthesized linear (O*t*-Bu) analogues were cleavaged by the method of partial cleavage for the separation of the solid phase. Macrocyclization of linear (O*t*-Bu) analogues were done by coupling reagent and then the final deprotection were done on cyclic (O*t*-Bu) analogues by treatment with TFA 95% and scavengers to achieve cyclic analogues which characterized by different instrumental methods using FT-IR, LC-MS, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR. Eighteen linear and cyclic analogues of Longicalycinin A, ten linear analogues of Carnosine and six cyclic analogues of Carnosine synthesized as such, were evaluated for their toxic activity against cell lines of HepG2 and HT-29 using MTT assay, LDH assay and apoptosis. The synthetic analogues showed relative good activity against cell lines of HepG2 and HT-29 with different IC_{50} values, in comparison to standard drug 5-fluorouracil (5-FU). Safety profiles of the synthesized analogues were also examined using skin fibroblast cells. In the second part of the project, Hepatocellular carcinoma (HCC group) was induced by diethylnitrosamine (DEN), as an initiator, and 2-acetylaminofluorene (2-AAF), as a promoter in five rats. Mitochondria liver tissue for evaluation of cytotoxic effect of linear and cyclic Carnosine analogues were isolated and cellular parameters related to apoptosis signaling were then determined. Also in the third and forth parts of the project, Mitochondria human glioblastoma multiforme and Mitochondria human lung for evaluation of cytotoxic effects of linear and cyclic Carnosine analogues were isolated and cellular parameters related to apoptosis signaling were then determined. Our results showed that high toxicity synthesized linear and cyclic Carnosine analogues with concentration 10 μg/mL in MTT assay, a raise in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) level, swelling in mitochondria, ATP generation, mitochondrial membrane potential (Δψm) collapse, release of cytochrome c and caspase-3 activation after exposure of mitochondria isolated from HCC group and the human glioblastoma multiforme and human lung . Based on the overall results, cyclic Carnosine analogues rather than linear Carnosine analogues would be encouraging to develop new anticancer agents and may be considered as promising complementary therapeutic agents for the treatment of liver, brain and lung cancers.

Keywords: Longicalycinin A, Carnosine, Peptide synthesis, 2-Cholorotrityl chloride resin, MTT assay, Macrocyclization, Anticancer, Apoptosis, Hepatocellular carcinoma, Mitochondria, Human glioblastoma, lung cancer, Cytotoxicity.