اثرات سایتوتوکسیک و القاء آپوپتوزیس بعضی از مشتقات جدید ترکیبات کرومن بر رشد رده‌های سلول سرطان انسانی در حالت in vitro

مجید محمودی،[۲و۱*] سعید رجبعلیان،[۱] علیرضا فرومدی،[۳] سعید حیدری کشل،[۴] ملیحه سادات صفوی،[۳] احد خوش زبان،[۴] کورس دیوسالار،[۱] محمدعلی محققی[۲]

۱- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲- مرکز تحقیقات سرطان
۳- مرکز تحقیقات علوم دارویی
۴- مرکز تحقیقات بانک فرآورده‌های پیوندی ایران

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، انتهای بلوار کشاورز، مجتمع بیمارستانی امام‌خمینی (ره)، کد پستی ۱۴۱۹۷
تلفن: ۶۱۱۹۲۵۰۶
email: dmahmoodi.@razi.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۳/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: ترکیبات کرومن با زنجیره شیمیائی 4-Aryl-4H-chromenes، گروهی از ترکیبات طبیعی هستند که خواص ضد توموری شدیدی در بافت‌های مبتلا به تومور از خود نشان می‌دهند. بر اساس گزارشات این ترکیبات از طریق جلوگیری از تشکیل توبولین در هنگام تقسیم سلولی باعث توقف تکثیر سلول‌ها می‌گردند. در این مطالعه اثرات سیتوتوکسیسیته سلولی و اثر القاء آپوپتوز (ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) مشتقاتی از این ترکیبات که در آزمایشگاه سنتز شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفته است. ***روش بررسی:*** اثر سیتوتوکسیسیته سلولی مشتقات سنتز شده ترکیبات کرومن با استفاده از رده‌های سلولی تومور انسانی شامل MCF-7 (کارسینومای پستان)، A549 (کارسینومای ریه)، HEPG-2 (کارسینومای کبد)، SW-480 (کارسینومای کولون)، 1321N1 (آستروسیتوما)، U87-MG (گلیوبلاستوما) و DAOY (مدولوبلاستوما) و با به‌کارگیری روش MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش جهت کنترل و مقایسه از داروی ضد سرطان etoposide استفاده شد. اثر القاء آپوپتوز این مشتقات با روش رنگ‌آمیزی DNA سلول (DAPI staining) مورد سنجش قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** نتایج این بررسی نشان داد که مشتقات سنتز شده‌ای که دارای گروه شیمیایی فنیل- ایزواکسال یا حاوی گروه متوکسی در زنجیره شیمیایی خود می‌باشند، اثر سیتوتوکسیسیته سلولی و اثر القاء آپوپتوزیس قابل مقایسه و یا حتی بیشتری در مقایسه با داروی etoposide از خود نشان می‌دهند. ***نتیجه‌گیری:*** جابه‌جایی گروه شیمیایی تری‌متوکسی‌فنیل (3,4,5-trimethoxyphenyl) با گروه شیمیایی تیازول در مشتقات کرومن سنتز شده باعث کاهش اثر سیتوتوکسیسیته ترکیب کرومن می‌گردد در حالی‌که مشتق سنتز شده‌ای که حاوی گروه شیمیایی فنیل- ایزواکسال باشد اثر سیتوتوکسیسیته و اثر القاء آپوپتوزیس شدیدتری دارد.

کلمات کلیدی: مشتقات ۴- آریل کرومن، سیتوتوکسیسیته سلولی، القاء آپوپتوزیس

مقدمه

آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یک پروسه تنظیم شده نرمال خودکشی سلولی است که موجود زنده را قادر می‌سازد تا تعداد سلول‌های خود را حفظ کرده و سلول‌های ناخواسته را که بقاء موجود را تهدید می‌کند حذف نماید. تعادل درست بین آپوپتوز و مهار آپوپتوز در حفظ هموستاز بافت و مورفوژنز اندام نقش مهم دارد.[۱و۲] در طی انجام آپوپتوز تغییرات بیوشیمیایی و سیتولوژیکی خاصی در سلول اتفاق می‌افتد که شامل متراکم‌سازی نوکلئوپلاسم و سیتوپلاسم، قطعه‌قطعه شدن DNA و تشکیل اجسام اپوپتوزی متصل به غشا می‌باشد که توسط سلول‌های مجاور شناخته شده و حذف می‌گردد.[۳و۴] هر گونه اشتباه در این پروسه باعث به‌وجود آمدن حالت‌های پاتولوژیک می‌شود. از جمله انحراف از مسیر آپوپتوز باعث گسترش تومور و متاستاز شده و القاء آپوپتوز باعث ایجاد بیماری‌های تحلیل اعصاب مثل الزایمر می‌گردد.[۵و۶] دوروش مهم آپوپتوز شناخته شده است، اتصال محرک مرگ سلولی به رسپتورهایی نظیر TNFα در سطح سلول‌ها باعث آپوپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود. از طرفی دیگر عوامل شیمی درمانی، استرس‌های ژنوتوکسیک و سایر عوامل محرک مرگ سلولی موجب آغاز آپوپتوز از طریق یک مسیر داخلی یا میتوکندری می‌گردد.[۷] داروهای شیمی درمانی که هدفشان از یک‌جهت جلوگیری از تکثیر

Archive of SID
www.SID.ir

بی‌رویه سلول‌ها در بافت‌های مشخصی از اندام‌های بدن می‌باشد و از طرفی القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری است، از کاندیداهای مهم در درمان سرطان محسوب می‌شوند. داروهای شیمی درمانی نظیر paclitaxel و vinblastine که از طریق جلوگیری از تشکیل توبولین در هنگام تکثیر سلولی هدف آنها است، از داروهای مفید و موفق ضد سرطان می‌باشند.[۸] paclitaxel یک عامل تثبیت کننده میکروتوبول microtubule stabilizing agent است که به میکروتوبول کامل چسبیده و از دپلیمریزاسیون زیر واحدهای توبولین جلوگیری می‌کند. Vinblastine با اتصال به منومرهای توبولین مانع پلیمریزاسیون آنها به صورت میکروتوبول می‌شود.[۷] پیدایش سلول‌های توموری مقاوم به این داروها و همچنین سمیت نورولوژیک وابسته به دوز آنها اگر چه استفاده از داروهای موثر بر توبولین را محدود کرده است، ولی با در نظر گرفتن اینکه جلوگیری از تشکیل توبولین از طریق اتصال ترکیبات دارویی به کلشی‌سین، که روی مونومرهای غیر پلیمریزه α/β توبولین قرار دارد، امکان‌پذیر می‌باشد، از اینرو داروهای جدیدتری معرفی می‌شوند که به طریق فوق عمل نموده و در نهایت مانع تشکیل توبولین خواهند شد.[۴و۷] علاوه بر این، اخیرا چندین مهارکننده توبولین معرفی شده‌اند که رگ‌های سلول‌های توموری را از طریق تاثیر بر سلول‌های اندوتلیال تخریب می‌کنند که در نهایت مانع تغذیه سلول‌های توموری می‌گردند. از جمله این داروها، پیش داروهای Combretastatin A-4 Phosphate (CA4P) و amide (AVE- 8062) هستند که در فاز بالینی می‌باشند. هر دو این داروها پلیمریزاسیون توبولین را با متصل شدن به محل اتصال کلشی‌سین مهار می‌کنند، به‌علاوه این داروها به‌عنوان عوامل جلوگیری کننده در تشکیل رگ‌های خونی در میان سلول‌های توموری شناخته شده‌اند.[۹-۱۱] کرومن‌ها ترکیبات ساده‌ای هستند که به گروه بزرگی از مولکول‌ها به نام مشتقات بنزو پیران و کرومن-۴-اون، که ترکیبات طبیعی هستند، تعلق دارند. این ترکیبات و مشتقات وابسته به آنها خواص بیولوژیک متنوعی دارند که شامل خواص آنتی‌توموری، اثر ضد لیشمانیایی و اثر ضد باکتریایی می‌باشند. این اثرات موجب شده که این ترکیبات جهت مشتق‌سازی و غربالگری به‌عنوان عوامل جدید درمانی مورد توجه قرار گیرند.[۱۲-۱۴] این مطالعه اثر سیتوتوکسیسیته مشتقاتی از ترکیبات کرومن که در آزمایشگاه شیمی داروئی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران سنتز شده‌اند را مورد بررسی قرار می‌دهد.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت یک بررسی تجربی در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بانک فرآورده‌های پیوندی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. مطالعه مزبور به مدت ۱۱ ماه از اردیبهشت ماه لغایت اسفند ماه ۱۳۸۶ به طول انجامید.

الف) رده‌های سلولی و کشت سلول: رده‌های سلولی و کشت سلول: رده‌های سلولی به‌کار برده شده در این مطالعه جهت ارزیابی اثرات سیتوتوکسیسیته مشتقات فوق به ترتیب شامل بود بر: MCF-7 (Human breast tumor cell line)، رده سلولی A549 (Human lung cancer cell line)، رده سلولی KB (Human epidermoid nasopharyngeal cell line)، رده سلولی U87-MG (human glioblastoma cell line)، رده سلولی HEPG-2 (liver carcinoma cell line)، رده سلولی SW-480 (colon adenocarcinoma cell line)، رده سلولی 1321N1 (astrocytoma cell line) و رده سلولی Daoy (glial cell line) که همگی از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین کشت و پاساژ داده می‌شدند. جهت جدا نمودن سلول‌ها از کف فلاسک از محلول تریپسین –EDTA استفاده شد. شمارش سلول با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی آزمون‌ها ابتدا درصد سلولهای زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵٪ بود.

ب) ارزیابی سیتوتوکسیسیته سلولی مشتقات کرومن: جهت سنجش اثر سیتوتوکسیسیته سلولی مشتقات کرومن از روش MTT assay استفاده شد.[۱۵] ابتدا ترکیبات کرومن در حلال DMSO حل شده و تا زمان مصرف نگهداری شدند. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۰/۱ درصد بود. در این مطالعه از کشت‌های سلولی در فاز رشد و تکثیر استفاده شد. ابتدا صد میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی معادل پنج هزار سلول در محیط کشت کامل به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های لگاریتمی هر یک از مشتقات (۰/۳ تا ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید. بدین ترتیب رقت نهایی بین ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم گردید. هر رقت مشتقات دارویی در سه چاهک

Archive of SID
www.SID.ir

سنجش شد. سه چاهک دارای سلول و محیط کشت کامل بـه عنـوان کنترل استفاده شد. پلیت‌ها در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمـسفر پنج درصد CO_2 و ۹۵ درصد هوا به مدت ۷۲ سـاعت انکوبـه شـدند. پس از پایان انکوباسیون ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شـده و پلیـت بـه مـدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایـان پـس از تخلیـه آرام محـیط کشت، کریستال‌هـای رنـگ فورمـازان راسـب شـده در سیتوپلاسـم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO بـه هـر چاهـک حـل شـد. شدت رنگ با دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۵۷۰ نانو متر و رفرانس ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید. تمامی مراحل آزمون سه مرتبـه تکـرار شـد. IC50 (غلظتی از هر مشتق داروئی که ۵۰ درصد رشد سلول را نـسبت به کشت کنترل کاهش دهـد) از طریـق معادلـه رگرسـیون غیرخطـی منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت مشتقات محاسبه شد.

ج) روش DAPI Staining برای بررسی آپوپتوز ناشـی از دارو: ابتـدا، یک و نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی معادل صد هزار سـلول در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری به مدت ۲۴ ساعت انکوبـه شـد. سپس محیط کشت آنها تخلیه گردید و سلول‌هـا را بـا محـیط کـشت کامل حاوی رقت‌هـای معـادل IC50 و IC75 از هـر یـک از مـشتقات سنتز شـده بـه مـدت ۲۴ تـا ۴۸ سـاعت انکوبـه شـد. پـس از پایـان انکوباسیون ادامه آزمون به شرح زیر انجام شد:

لایه سلولی پس از تخلیه کامل محـیط کـشت و شستـشو بـا PBS بـا پارافورمالدئید چهار درصد به مدت ده دقیقه فـیکس گردیـد. پـس از تخلیه کامل پارافورمالدئید و شستشو با PBS، لایه سـلولی بـا محلـول یک میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیب فلورسـانس DAPI بـه مـدت پـنج دقیقه پوشانده شد. پس از تخلیه کامل DAPI و شستشو با آب مقطـر، لایه سلولی به‌وسیله میکروسکوپ فلورسانس بررسی و عکس‌برداری شد. سلول‌های آپوپتوز شده بـا مورفولـوژی هـسته چروکیـده، قطعـه قطعه شده و با شدت فلورسانس بالا در مجموع صـد هـسته سـلولی شمارش شد و به عنوان درصد سلول‌های آپوپتوز شده گزارش شد.

یافته‌ها

نام شیمیائی هر یک از مشتقات کرومن سنتز شده عبارت بود از:

Compound (7a): 2-amino-7- (dimethylamino) -4- (2-phenylthiazol-4-yl) -4H-chromene-3-carbonitrile:

Compound (7b): 2-amino-4-(2-(2-chlorophenyl)thiazol-4-yl)-7-(dimethylamino)-4H-chromene-3-carbonitrile:

Compound (7c): 2-amino-4-(2-(3-chlorophenyl)thiazol-4-yl)-7-(dimethylamino)-4H-chromene-3-carbonitrile:

Compound (7d): 2-amino-4-(2-(4-chlorophenyl)thiazol-4-yl)-7-(dimethylamino)-4H-chromene-3-carbonitrile:

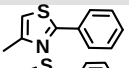
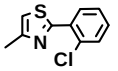
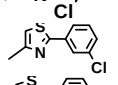
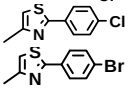
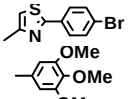
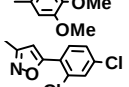
Compound (7e): 2-amino-4-(2-(4-bromophenyl)thiazol-4-yl)-7-(dimethylamino)-4H-chromene-3-carbonitrile:

Compound (9): 2-amino-7-(dimethylamino)-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile:

Compound (11): 2-amino-4-(5- (2, 4- dichlorophenyl) isoxazol-3-yl) -7- (dimethylamino) -4H –chromene -3- carbonitrile:

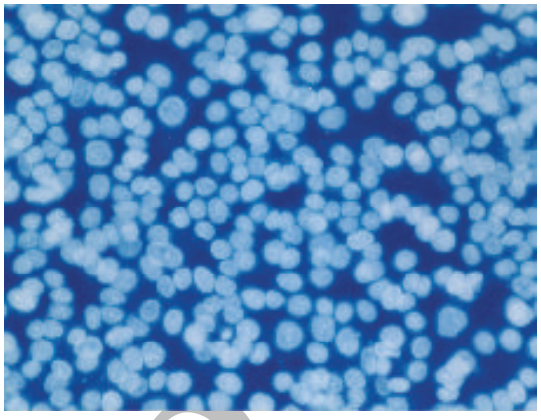
نتایج بررسی اثرات سیتوتوکسیک مشتقات ستز شـده کـرومن در جدول ۱ خلاصه شده است، به‌طوری‌که IC50 این ترکیبات بـرحسب

جدول- ۱: ساختمان و میزان سیتوتوکسیسیته (IC_{50}) ترکیبات کرومن سنتزشده (7a-7e، 9 و 11) در مقابل رده‌های سلولی سرطان انسانی و در مقایسه با Etopside در *in vitro*.

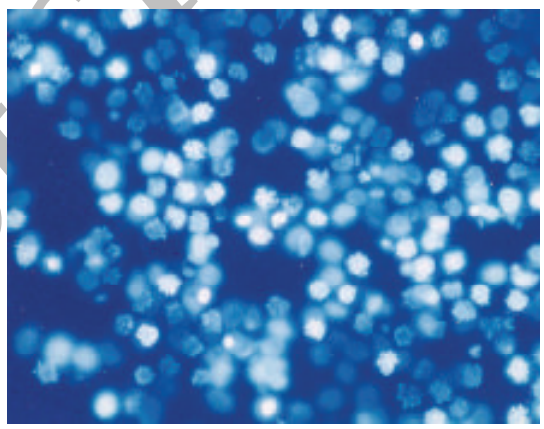
Compound	X	Cell line IC50 (µM)*							
		MCF-7	KB	A549	Hep-G2	SW480	Daoy	U87-MG	1321N1
7a		۵/۶±۱/۴۱	۲۸/۳±۱۱/۲	۱۱/۴±۰/۹	۲۶/۸±۲/۷	۲۸±۴/۴	۳۰±۸/۱	۳۴/۷±۱۱/۴	۳۶/۳±۱۹/۱
7b		۲/۷±۰/۴	۲/۰۵±۰/۱۷	۸/۷±۲/۵	۶/۴±۲/۴	۴/۸±۱/۹	۱/۸±۰/۱۷	۵/۹±۰/۷۸	۵/۲±۲/۹
7c		۵/۸±۰/۵۸	۳۱±۱۱/۹	۱۰/۵±۳/۶	۲/۲±۰/۶۳	۱۷/۴±۴/۷	۲۸±۰/۷	۳۱/۵±۹/۸	۹/۳±۴/۴
7d		۰/۳۶±۰/۰۲	۱۲/۵±۳/۱	۴/۱±۱/۷	۳/۸±۰/۹۷	۴/۲±۱/۱	۱۳/۹±۵/۳	۶/۴±۰/۳۱	۱۰/۴±۲/۲
7e		۳/۲±۰/۷۲	۷/۳±۱/۹	۱۱/۸±۲/۳	۶/۶±۰/۸۸	۶/۶±۰/۲۶	۱۲/۵±۱/۸	۳/۷±۰/۲۹	۹/۴±۵/۷
9		۱±۰/۴۴	۲/۵±۱/۱	۰/۴۹±۰/۳	۰/۸۹±۰/۴	۱/۱±۰/۳۱	۱/۲±۰/۱۸	۶/۸±۰/۸۳	۰/۷۳±۰/۲۸
11		۰/۹۸±۰/۷۷	۰/۳۹±۰/۳	۵/۱±۰/۶	۰/۲۸±۰/۰۹	۳/۷±۱/۶	۱۲/۱±۶/۹	۰/۸۴±۰/۳	۱/۲±۱/۳۸
Etoposide	–	۰/۵۴±۰/۱۱	۰/۷۶±۰/۱۹	۰/۶±۰/۴۳	۱/۱±۰/۸۹	۵/۲±۰/۷	۱۱/۱±۰/۶۵	۴/۴±۰/۴۶	۴/۹±۰/۵۴

* IC_{50}±SD (بر حسب میکرومولار) هر یک از ترکیبات کرومن سنتز شده نشان‌دهنده میانگین حاصل از سه بار آزمایش است ±SD

Archive of SID
www.SID.ir



شکل- ۱: میکروسکوپ فلوئورسانس از سلول‌های KB (رده سلولی اپیدرمال نازو-فارنکس) در محیط‌کشت DMEM بدون اضافه نمودن دارو به محیط (سلول‌های کنترل)



شکل- ۲: تصاویر میکروسکوپ فلوئورسانس از سلول‌های KB (رده سلولی اپیدرمال نازوفارنکس) در محیط کشت DMEM بعد از اضافه نمودن مشتق‌سنتز شده شماره ۱۱ با غلظت متوسط ۰/۳۹ میکرومولار به محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت

میکرومولار ارائه شده‌اند. نتایج نشان می‌دهند که همه ترکیبات دارای اثرات سیتوتوکسیک با IC50 کمتر از ۴۰ میکرومولار می‌باشند که در لاین‌های سلولی مختلف متفاوت است. ترکیبات ۹ و ۱۱ اثرات قویتری در اکثر لاین‌های سلولی دارند به‌طوری‌که IC50 این دو ترکیب بر علیه هشت لاین سلولی کمتر از ۶/۸ می‌باشد. مشتق سنتز شده 7d بر علیه لاین سلولی MCF-7 دارای IC50 معادل ۰/۳۶ می‌باشد. مشتق سنتز شده 7b، IC50 معادل ۱/۸ بر لاین سلولی Doay را دارد. ضعیف‌ترین ترکیب 7a است که بالاترین IC50 را بر علیه لاین‌های سلولی داراست. بیشتر ترکیبات بر لاین سلولی Daoy بالاترین IC50 را دارا می‌باشند. نتایج بررسی اثر القاء آپوپتوزیس این مشتقات در تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلورسانس در اشکال ۱ و ۲ نشان داده شده است. شکل ۱ نمونه کنترل منفی (بدون اضافه نمودن دارو به محیط کشت سلول) می‌باشد و شکل ۲ تصویر حاصل از اثر القاء آپوپتوز مشتق سنتز شده شماره ۱۱ را در محیط کشت سلولی KB نشان می‌دهد. در نمونه کنترل (بدون دارو) سلول‌ها با دیواره سلولی صاف و سیتوپلاسم روشن و کم رنگ مشاهده می‌گردند، در حالی‌که در نمونه‌های مجاور شده با دارو هسته سلول‌ها رنگ را به‌خود گرفته و دیواره سلول‌ها چروکیده می‌باشد.

بحث

رشد و توسعه تومور معمولاً در نتیجه عدم وقوع مرگ طبیعی و تنظیم شده سلولی (apoptosis) در هر یک از بافت‌های بدن می‌باشد و یا ممکن است به‌علت تکثیر نامنظم سلول‌ها صورت گیرد.[۱۶و۱۷] از طرفی مشخص شده است که بعضی از عوامل سیتوتوکسیک قادر به القاء اپوپتوزیس در سلول‌های توموری می‌باشند.[۱۸و۱۹] مکانیسم اثر این ترکیبات سیتوتوکسیک بر روی سلول متفاوت است. این تحقیق اثرات سیتوتوکسیک و القاء اپوپتوزیس مشتقاتی از ترکیبات کرومن که جدیداً در آزمایشگاه شیمی دارویی سنتز شده‌اند را مورد بررسی قرار داد. طبق مطالعات انجام یافته مشتقات دیگر این ترکیبات از طریق تداخل در تشکیل توبولین و یا ممانعت در پلیمرازسیون توبولین باعث القاء اپوپتوزیس در سلول‌های توموری می‌گردد. اثر سیتوتوکسیک این مشتقات با تست MTT مورد بررسی قرار گرفت و اثر القاء اپوپتوزیس از طریق رنگ‌آمیزی DNA سلول با ترکیب فلورسانس DAPI پی‌گیری شد. رده‌های سلولی مورد استفاده شامل هشت رده سلولی سرطان انسانی است که از بافت‌های مختلف بدن گرفته شده بودند. ترکیبات 7a-e دارای استخلاف‌های کلر و برم با موقعیت‌های متفاوت روی حلقه فنیل می‌باشند و ترکیب ۹ و ۱۱ دارای ساختار متفاوت از ترکیبات قبلی هستند. ترکیبات 7a-e دارای حلقه تیازول بوده و حلقه فنیل دارای کلر با موقعیت‌های متفاوت و برم در موقعیت پارا می‌باشد (جدول ۱). نتایج نشان می‌دهند این ترکیبات بر علیه برخی لاین‌های سلولی با IC50 پایین موثرند، اما در مقابل برخی دیگر IC50 بالایی از خود نشان می‌دهند به‌طوری‌که مشتق سنتز شده 7d بر علیه MCF-7 که یک لاین سلولی سرطان سینه می‌باشد دارای IC50=۰/۳۶ است که در مقایسه با دارویی Etoposide

Archive of SID

www.SID.ir

که در درمان سرطان سینه و یا دیگر سرطان‌ها به‌کار می‌رود با IC50=۰/۵۴ اثر قویتری از خود نشان می‌دهد. همچنین مشتق سنتز شده 7b با IC50=۱/۸ بر لاین سلولی Doay موثر است و در مقایسه با Etoposide که IC50 آن در مقابل این لاین سلولی برابر با ۱۱/۱ می‌باشد، اثر قویتری از داروی رفرانس دارد. در این سری از ترکیبات 7a ضعیف‌ترین ترکیب است، در این ترکیب حلقه فنیل فاقد استخلاف کلر می‌باشد. ترکیب 7c با داشتن کلر در موقعیت متا در رده بعدی قرار دارد، به‌نظر می‌رسد ترکیب 7b با داشتن کلر در موقعیت ارتو دارای IC50 پایین‌تری در اکثر لاین‌های سلولی می‌باشد. ترکیبات ۹ و ۱۱ نسبت به ترکیبات فوق قویترند به‌طوری‌که در اکثر لاین‌های سلولی دارای IC50 پائین‌تری نسبت به Etoposide می‌باشند. IC50 ترکیب ۹ در مقابل لاین سلولی Doay برابر با ۱/۲ بوده ولی IC50 اتوپوسید به‌عنوان داروی رفرانس برابر با ۱۱/۱ است. ترکیب ۱۱ دارای IC50=۰/۸۴ در برابر لاین سلولی U87-MG می‌باشد در حالی‌که IC50 اتوپوسید IC50=۴/۴ است. ترکیب ۹ فاقد حلقه تیازول بوده و دارای متوکسی در موقعیت‌های متا و پارا ست. ترکیب ۱۱ دارای یک حلقه ایزوکسازول و یک حلقه فنیل با دو برم در موقعیت‌های ارتو و پاراست. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مشتقات سنتز شده‌ای که دارای گروه شیمیائی فنیل- ایزواکسال یا حاوی گروه متوکسی در زنجیره شیمایی خود می‌باشند، اثر سیتوتوکسیسیته سلولی و اثر القاء آپوپتوزیس قابل مقایسه و یا حتی بیشتری در مقایسه با داروی etoposide دارند. این یافته‌ها نمایانگر این است که جابجایی گروه شیمیایی 3,4,5-trimethoxyphenyl با گروه شیمیایی تیازول در مشتقات کرومن سنتز شده باعث کاهش اثر سیتو-توکسیسیته ترکیب کرومن می‌گردد در حالی‌که مشتق سنتز شده‌ای که حاوی گروه شیمیائی فنیل- ایزواکسال باشد اثرسیتوتوکسیسیته و اثر القاء آپوپتوزیس شدیدتری دارد. *سپاسگزاری:* نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان که پشتیبان این طرح تحقیقاتی به شماره‌های ۴۷۸۵ و ع/۳۹-۸۵ بودند قدردانی می‌نماید.

References

1. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Wang Y, Zhao J, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 1. Structure-activity relationships of the 4-aryl group. *J Med Chem* 2004; 47(25): 6299-310.
2. O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3(2): 131-52.
3. Reed JC, Tomaselli KJ. Drug discovery opportunities from apoptosis research. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11(6): 586-92.
4. Kemnitzer W, Kasibhatla S, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Jia S, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 2. Structure-activity relationships of the 7- and 5-, 6-, 8-positions. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(21): 4745-51.
5. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(9): 2941-53.
6. Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathol* 2000; 10(2): 283-92.
7. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 3. Structure-activity relationships of fused rings at the 7,8-positions. *J Med Chem* 2007; 50(12): 2858-64.
8. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Crogan-Grundy C, Labreque D, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high throughput screening assay. 4. Structure-activity relationships of N-alkyl substituted pyrrole fused at the 7, 8-positions. *J Med Chem* 2008; 51(3): 417-23.
9. Gaya AM, Rustin GJ. Vascular disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005; 17(4): 277-90.
10. Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2): 415-27.
11. Haggarty SJ, Mayer TU, Miyamoto DT, Fathi R, King RW, Mitchison TJ, et al. Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis. *Chem Biol* 2000; 7(4): 275-86.
12. Lee KY, Nam DH, Moon CS, Seo SH, Lee JY, Lee YS. Synthesis and anticancer activity of lavendustin A derivatives containing arylethenylchromone substituents. *Eur J Med Chem* 2006; 41(8): 991-6.
13. Sang S, Lambert JD, Tian S, Hong J, Hou Z, Ryu JH, et al. Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Bioorg Med Chem* 2004; 12(2): 459-67.
14. Sairafianpour M, Kayser O, Christensen J, Asfa M, Witt M, Staerk D, et al. Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of Smirnowia iranica. *J Nat Prod* 2002; 65(12): 1754-8.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
16. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267(5203): 1445-9.
17. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-62.
18. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; 98(9): 2603-14.
19. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407(6805): 777-83.

Archive of SID
www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 6, Sep 2009: 387-392

In vitro cytotoxicity and apoptotic inducing activity of the synthesized 4-aryl-4H-chromenes derivatives against human cancer cell lines

Mahmoodi M.[1,2*]
Rajabalian S.[1]
Foroumadi A[3]
Hidarykeshel S.[4]
Safavi M.[3]
Khoshzaban A.[4]
Divsalar K.[1]
Mohagheghi MA.[2]

1- Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences
2- Cancer Research Center
3- Pharmaceutical Sciences Research Center
4- Iranian Tissue Bank Research & Preparation Center

Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding author: Cancer Research Center, Cancer Institute, Keshavarz Blv, Immam Khomeni Hospital
Tel: +98-21-61192506
email: dmahmoodi.@razi.tums.ac.ir

Received: May 09, 2009 Accepted: June 21, 2009

Abstract

***Background*:** 4-Aryl-4H-chromenes are novel anticancer agents which induce apoptosis in cancer cells. These compounds were found to induce apoptosis by targeting the tubulin/microtubule system in cell proliferation process. The aim of this study was to report cytotoxic and apoptosis inducing activities of a new series of synthesized 4-aryl-4H-chromenes compounds.

***Methods*:** The in vitro cytotoxic activity of the synthesized 4-aryl-4H-chromenes was investigated against a paned of human cancer cell lines including MCF-7 (breast carcinoma), A549 (lung carcinoma), HEPG-2 (liver carcinoma), SW-480 (colon adenocarcinoma), U87-MG (glioblastoma), 1321N1 (astrocytoma), and DAOY (medulloblastoma). The percentage of growth inhibitory activity was evaluated using MTT colorimetric assay versus controls not treated with test derivatives. The data for etoposide, a well known anticancer drug, was included for comparison. For each compound, the 50% inhibitory concentration (IC50) were determined. Apoptosis inducing activity were assessed by DAPI staining.

***Results*:** Preliminary screening showed that those chromenes analogs bearing phenyl-isoxazole-3-yl substitution or the derivatives containing methoxyphenyl in chromene ring exhibited cytotoxic and apoptotic inducing activity comparable with or even superior than the reference drug, etoposide. The compounds without this type of substitution have lower activity.

Conclusions: Replacement of 3, 4, 5-trimethoxyphenyl group with thiazol ring in the synthesized derivatives reduced the cytotoxic activity. However, the derivatives with phenyl-isoxazole analogue showed potent cytotoxic and apoptotic inducing activity.

Keywords: 4-aryl-4H-chromenes, cyototoxic activity, apoptosis.

Archive of SID

www.SID.ir